



# **Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

Aus dem Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie

Zentrum für Experimentelle Medizin

Direktor: Prof. Dr. U. Schumacher

und

der Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie

Zentrum für Radiologie und Endoskopie

Direktor: Prof. Dr. G. Adam

## **Untersuchung des Migrationsverhaltens multipotenter mesenchymaler Stromazellen in Selektin-defizienten Mäusen mit Magnetresonanztomographie und Mikroskopie**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Johannes Martin Salamon

aus Hamburg

Hamburg 2011

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 27.06.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:

Prof. Dr. med. Udo Schumacher

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter:

Prof. Dr. med. Gerhard Adam

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter:

Prof. Dr. Janos Mester

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Arbeitshypothesen und Fragestellungen</b> .....	6
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	8
2.1	Multipotente mesenchymale Stromazellen .....	8
2.2	E- und P-Selektine und ihre Funktionen .....	9
2.3	Magnetresonanztomographie zum Monitoring der Zellmigration in vivo.....	10
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	12
3.1	Markierung multipotenter mesenchymaler Stromazellen zur Detektion einzelner Zellen mit der Magnetresonanztomographie und Fluoreszenzmikroskopie.....	12
3.1.1	Murine multipotente mesenchymale Stromazellen.....	12
3.1.2	Zellkultur.....	12
3.1.3	Markierung der Zellen mit superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln .....	15
3.1.4	Markierung der Zellen mit einem zytoplasmatischem Fluoreszenzfarbstoff..	15
3.1.5	Bestimmung des zellulären Eisengehalts mittels Atomabsorptionsspektrometrie.....	16
3.1.6	Magnetresonanztomographische Untersuchungen in vitro.....	16
3.1.7	Mehrkanalfluoreszenzmikroskopie .....	17
3.1.8	Nachweis charakteristischer Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie .....	19
3.1.9	Nachweis von E-/P-Selektin-Bindungsstellen der Zellen mittels Durchflusszytometrie und Immunhistochemie .....	20
3.1.10	Proliferationstest mittels Durchflusszytometrie.....	23
3.1.11	Chondrogene Differenzierung .....	23

3.2	Nachweis einzelner multipotenter mesenchymaler Stromazellen in Mäusen mittels in vivo Magnetresonanztomographie und Fluoreszenzmikroskopie .....	24
3.2.1	BALB/c C57BL/KaIgh-I scid/scid Mäuse .....	24
3.2.2	Präparation der multipotenten mesenchymalen Stromazellen .....	25
3.2.3	Ultraschallgesteuerte intrakardiale Injektion der Zellen .....	25
3.2.4	Magnetresonanztomographische Untersuchung der Mäuse in vivo .....	27
3.2.5	Histologische Präparation und Auswertung .....	28
3.3	Untersuchung der Migration und Degradation multipotenter mesenchymaler Stromazellen in E-/P-Selektin-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen .....	30
3.3.1	Pfp/rag2 MM-Mäuse mit und ohne E-/P-Selektindefizienz .....	30
3.3.2	Validierung der Selektin-Defizienz mittels Polymerasekettenreaktion .....	31
3.3.3	Präparation der multipotenten mesenchymalen Stromazellen .....	32
3.3.4	Injektionsmethoden .....	32
3.3.4.1	Ultraschallgesteuerte intrakardiale Injektion .....	32
3.3.4.2	Intravenöse Injektion .....	33
3.3.4.3	Intraperitoneale Injektion .....	33
3.3.5	Magnetresonanztomographische Untersuchung der Mäuse in vivo .....	33
3.3.6	Histologische Präparation und Auswertung .....	34
3.4	Untersuchung des Migrationsverhaltens multipotenter mesenchymaler Stromazellen in einem Tumormodell in E-/P-Selektin-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen .....	34
3.4.1	Humane Adenokarzinom-Zelllinie HT29 .....	34
3.4.2	Magnetresonanztomographische Untersuchung der Mäuse in vivo .....	35
3.4.3	Histologische Präparation und Auswertung .....	35
3.5	Statistik .....	35

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	37
4.1	Markierung multipotenter mesenchymaler Stromazellen zur Detektion einzelner Zellen mit der Magnetresonanztomographie und Fluoreszenzmikroskopie.....	37
4.1.1	Bestimmung des zellulären Eisengehalts mittels Atomabsorptionsspektrometrie.....	37
4.1.2	Magnetresonanztomographische Untersuchungen in vitro.....	37
4.1.3	Mehrkanalfluoreszenzmikroskopie .....	38
4.1.4	Nachweis charakteristischer Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie .....	39
4.1.5	Nachweis von E-/P-Selektin-Bindungsstellen mittels Durchflusszytometrie und Immunhistochemie .....	40
4.1.6	Proliferationstest mittels Durchflusszytometrie.....	44
4.1.7	Chondrogene Differenzierung.....	44
4.2	Nachweis einzelner multipotenter mesenchymaler Stromazellen in Mäusen mittels Magnetresonanztomographie und Fluoreszenzmikroskopie .....	45
4.2.1	Magnetresonanztomographische Untersuchung der Mäuse in vivo .....	45
4.2.2	Histologische Auswertung .....	47
4.3	Nachweis des Migrationsverhaltens multipotenter mesenchymaler Stromazellen in E-/P-Selektin-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen .....	54
4.3.1	Validierung der Selektin-Defizienz mittels Polymerasekettenreaktion .....	54
4.3.2	Magnetresonanztomographische Untersuchung der Mäuse in vivo .....	55
4.3.2.1	Ultraschallgesteuerte intrakardiale Injektion .....	55
4.3.2.2	Intravenöse Injektion.....	59
4.3.2.3	Intraperitoneale Injektion.....	61

4.3.3	Histologische Auswertung .....	64
4.3.3.1	Ultraschallgesteuerte intrakardiale Injektion .....	64
4.3.3.2	Intravenöse Injektion.....	67
4.3.3.3	Intraperitoneale Injektion .....	71
4.4	Untersuchung des Migrationsverhaltens multipotenter mesenchymaler Stromazellen in einem Tumormodell in E-/P-Selektin-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen .....	76
4.4.1	Magnetresonanztomographische Untersuchung in vivo .....	76
4.4.2	Histologische Auswertung .....	77
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>79</b>
5.1	Markierung von multipotenten mesenchymalen Stromazellen zur Detektion mittels Magnetresonanztomographie und Fluoreszenzmikroskopie .....	79
5.2	Nachweis einzelner multipotenter mesenchymaler Stromazellen in Mäusen mittels in vivo Magnetresonanztomographie und Fluoreszenzmikroskopie .....	81
5.3	Untersuchung der Migration und Degradation multipotenter mesenchymaler Stromazellen in E-/P-Selektin-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen .....	84
5.4	Untersuchung des Migrationsverhaltens multipotenter mesenchymaler Stromazellen in einem Tumormodell in E-/P-Selektin-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen .....	89
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>90</b>

<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	91
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	91
7.2	Literaturverzeichnis .....	93
7.3	Danksagung .....	109
7.4	Lebenslauf .....	112
7.5	Eidesstattliche Versicherung .....	114

# 1 Arbeitshypothesen und Fragestellungen

Nach bisherigem Kenntnisstand ist nicht abschließend geklärt, ob und in welchem Maße Selektine eine Rolle bei der Einwanderung von multipotenten mesenchymalen Stromazellen (MSZ) aus dem Blutstrom heraus in verschiedene Gewebe spielen. Diese Frage stellt sich sowohl in Zusammenhang mit normalem Gewebe, ohne einen die Selektin-Expression erhöhenden Reiz, als auch im Rahmen eines pathologischen Reizes, wie bei Entzündungen oder soliden Tumoren, bei denen Selektine am Ort des Geschehens vermehrt exprimiert werden (Shanley et al., 1995). Zur Untersuchung dieser Fragestellungen an der lebenden Maus eignet sich die Magnetresonanztomographie (MRT), die repetitiv eine nichtinvasive Darstellung von magnetisch markierten MSZ ermöglicht. Die Zielsetzung dieser Arbeit umfasste daher zum einen die Etablierung einer Methode zur magnetresonanztomographischen Darstellung einzelner magnetisch markierter MSZ und der anschließenden korrelativen Darstellung doppelt fluoreszenz-markierter MSZ mittels Fluoreszenzmikroskopie. Im Weiteren bestand die Zielsetzung darin, an der lebenden Maus zu überprüfen, ob MSZ den über Selektine vermittelten Migrationsmechanismus benutzen. Hierfür sollte das Migrationsverhalten der magnetisch markierten MSZ in E-/P-Selektin-defizienten Doppelknockout-Mäusen (Doppel-KO) und Wildtyp-Mäusen (WT) sowie unter Verwendung eines Tumormodells untersucht werden. Die konkreten Fragestellungen dieser Studie waren:

- Ist die magnetische Markierung von MSZ mittels eisenoxidhaltigen Mikropartikeln und CFSE ohne Beeinflussung der Zellvitalität und der Expression charakteristischer Oberflächenmarker möglich?
- Ermöglicht diese Doppelmarkierung die Detektion einzelner MSZ mittels der Magnetresonanztomographie und anschließend in verschiedenen Geweben mittels histologischer Methoden?
- Ist der in vivo Nachweis einzelner magnetisch markierter MSZ mittels eines klinischen 3.0T MR-Tomographen unter Verwendung von Kleintierempfangsspulen und hochauflösenden Gradientenecho-Sequenzen (GRE) möglich?

- Lässt sich unter Berücksichtigung der verschiedenen Applikationsformen – intravenös, intrakardial, intraperitoneal – ein unterschiedliches Verteilungs- und Degradationsverhalten der MSZ in E-/P-Selektin-defizienten Doppelknockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen darstellen?
- Veranlasst ein xenotransplantiertes Tumor der humanen Adenokarzinom-Zelllinie HT29 MSZ in E-/P-Selektin-defizienten Doppelknockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen in unterschiedlicher Ausprägung zum Einwandern in das vom Tumor geschädigte Areal?

## 2 Einleitung

### 2.1 Multipotente mesenchymale Stromazellen

Multipotente mesenchymale Stromazellen sind Vorläuferzellen aus einem komplexen Bindegewebe im Knochenmark (Nakahara et al., 1991), welche die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene mesenchymale Zellarten, wie zum Beispiel Fibroblasten, Adipozyten, Myozyten, Knorpel- oder Knochenzellen besitzen (Dominici et al., 2006; Johnstone et al., 1998; Pittenger et al., 1999). In der wissenschaftlichen Literatur wird alternativ auch der Ausdruck mesenchymale Stammzellen verwendet, wobei sich die Bezeichnung als multipotente mesenchymale Stromazellen zunehmend durchsetzt (Grove et al., 2004). MSZ wurden erstmals von Friedenstein et al. 1960 aus dem Knochenmark isoliert, später auch aus anderen hämatopoetisch aktiven Organen wie Leber und Milz (Friedenstein et al., 1976; Friedenstein et al., 1966). In den folgenden Jahrzehnten wurden sie zusätzlich im peripheren Blut, der Nabelschnur, Plazenta, dem Amnion und im Fettgewebe sowie in Leber, Milz, Periost und Haut nachgewiesen (Rosenbaum et al., 2008). MSZ werden durch ihre Fähigkeit an Plastik adhärent zu wachsen isoliert und behalten ihre Multipotenz auch über viele Passagen in der Zellkultur (Pittenger et al., 1999). Sie sind immunologisch charakterisiert durch die Expression von CD29, CD105, Sca-1, CD90, CD44, CD73, CD166 und sind negativ für hämatopoetische Marker wie CD14, CD34 und CD45. MSZ haben ein immunsuppressives Potential, was sie für die allogene Stammzelltransplantation besonders attraktiv macht (Aggarwal and Pittenger, 2005; Le Blanc, 2003; McIntosh et al., 2006; McTaggart and Atkinson, 2007). Neueren Erkenntnissen zufolge spielen MSZ eine wichtige Rolle bei regenerativen Prozessen im Organismus, wie bei der Wundheilung (Falagna V, 2007), nach Knochenbrüchen (Bruder et al., 1998) oder bei Knorpel- (Johnstone and Yoo, 1999) und Sehnenschäden (Young et al., 1998). In diesen Zusammenhängen konnten mit allogenen transplantierten MSZ auch therapeutische Erfolge verzeichnet werden. Die Volkskrankheit Osteoporose ist eine weitere Systemerkrankung, die durch das osteogene Potential der MSZ positiv beeinflusst werden kann (Jilka et al., 1996; Parfitt et al., 1995).

Eine wichtige Funktion der MSZ ist die Bildung einer unterstützenden Matrix im Knochenmark. MSZ schütten Wachstumsfaktoren, die die Hämatopoese regulieren, aus und haben somit positiven Einfluss auf die Differenzierung und Proliferation hämatopoetischer Stammzellen (Dexter et al., 1977; Gordon et al., 1990; Weimar et al., 1998). Zu einer Zerstörung dieser Matrix kommt es regelhaft nach zytotoxischer Chemotherapie

(Ishida et al., 1994) zum Beispiel zur Therapie des metastasierten Mammakarzinoms. Diese kann eine Stammzelltransplantation auch von MSZ notwendig erscheinen lassen, um die Hämatopoese der Patienten wieder herzustellen (Koc et al., 2000). Da sich MSZ aus dem Knochenmark isolieren lassen und in Kultur über viele Passagen nicht ihre Eigenschaften verlieren (Caplan, 1991), sind sie auch als Transportsystem für virale Gene einsetzbar (Allay et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass multipotente mesenchymale Stromazellen lokal appliziert Narbenbildung nach einem Herzinfarkt verringern (Jaquet et al., 2005) oder systemisch eingebracht die Regeneration des Nierenparenchyms nach akutem Nierenversagen beschleunigen (Morigi et al., 2008). Weiter war es möglich zu beweisen, dass diese Zellen sich in neuronale Zellen ausdifferenzieren können (Sanchez-Ramos et al., 2000; Woodbury et al., 2000). Mit der zuletzt genannten Untersuchung ist ein nachhaltiger Hinweis auf den Übergang vom mesodermalen zum ektodermalen Entwicklungsschritt gezeigt worden. Daher ist auch das Verhalten der Zellen im Endstromgebiet des ZNS von besonderem Interesse. Desweiteren konnte für MSZ gezeigt werden, dass sie in solide Tumoren einwandern (Stagg, 2008) und dort eventuell modulierende Effekte auf die Angiogenese und die Bildung des Tumorstromas besitzen könnten. Aufgrund der genannten Eigenschaften ist es erforderlich zu verstehen, wie MSZ aus dem Blutstrom in Gewebe einwandern können und wie sie sich im Organismus verteilen um daraus ableiten zu können, wie man MSZ verstärkt therapeutisch einsetzen und nach systemischer Applikation gezielter an den Ort des Geschehens bringen kann.

## **2.2 E- und P-Selektine und ihre Funktionen**

Es ist von besonderem Interesse, über welchen Mechanismus im Blut zirkulierende MSZ das Gefäßsystem verlassen und in die verschiedenen Gewebe übertreten. Die entscheidende initiale Bindung von MSZ an das Gefäßendothel scheinen Selektine zu vermitteln. Selektine sind eine der kleinsten Genfamilien des Menschen und umfassen drei Mitglieder, die E-, P- (beide kommen auf Endothelzellen vor) und L-Selektine (kommen auf Leukozyten vor). Alle drei sind bei der initialen Anheftung, dem ersten Schritt der Transmigration von Leukozyten aus dem Blut, beteiligt (Springer, 1994) und auch in den Kapillaren des Hirns spielen sie dabei nach neuesten Erkenntnissen eine wichtige Rolle (Wong et al., 2007). Darüber hinaus sind Selektine wichtig für den Vorgang der Diapedese von Zellen durch seröse Häute, wie zum Beispiel dem Peritoneum (Borges et al., 1997; Bosse et al., 1994; Bullard et al., 1995; Gardner et al., 1995; Matsukawa et al., 2002; Preobrazhenskaya et al., 1997; Xie et al., 2000). Auch die Tumormetastasierung, die durch

den Knockout von E- und P-Selektinen im Mausmodell drastisch reduziert werden kann (Köhler et al., 2010) scheint maßgeblich durch Selektine beeinflusst zu sein. Es zeigte sich, dass Prostatakrebszellen bei nicht vorhandenen Selektinen nicht in das Knochenmark einwandern können (Dimitroff et al., 2005). Gleiches gilt für die Rezirkulation von Blutstammzellen in Selektin-defizienten Mäusen, bei denen die Hämatopoese vorwiegend in der Milz und Leber stattfindet. Vor allem letztere Erkenntnisse legen nahe, dass MSZ ebenfalls Selektine zur Einwanderung in die Zielgewebe benutzen.

### **2.3 Magnetresonanztomographie zum Monitoring der Zellmigration in vivo**

Die Magnetresonanztomographie ist ein Schnittbildverfahren auf der Grundlage des physikalischen Phänomens des Eigendrehimpulses, dem so genannten Kernspin, von Protonen. Neben dem vielfachen Einsatz in der radiologischen Diagnostik wird die MRT zunehmend in experimentellen Studien zur Untersuchung von Kleintieren eingesetzt. Ein experimenteller Anwendungsbereich der MRT-Bildgebung ist der nichtinvasive Nachweis von magnetisch markierten Zellen. Mit dieser Methode wurde zum Beispiel die Migration von Lymphozyten (Anderson et al., 2004), hämatopoetischen Stammzellen und mesenchymalen Stromazellen (Bos et al., 2004), neuronalen Vorläuferzellen (Shapiro et al., 2006), Makrophagen und Tumorzellen (Heyn et al., 2006) in verschiedenen Kleintiermodellen beschrieben. Zur magnetischen Markierung von Zellen werden superparamagnetische Eisenoxidpartikel genutzt, deren Durchmesser von einigen Nanometern (Fleige et al., 2002; Gardner et al., 1995) bis zu mehreren Mikrometern (Shapiro et al., 2004) reicht. Zur Zellmarkierung werden typischerweise Partikel mittlerer Größe verwendet (Sipe et al., 1999). Die Ansätze zur Markierung variieren von der einfachen Zellinkubation und endosomalen Anreicherung der Partikel (Bulte et al., 2001) bis hin zum Gebrauch von Transfektionsmedien, durch die die Aufnahme von Partikeln erleichtert wird (Frank et al., 2002). Die magnetische Markierung von Zellen führt zu einem enormen Anstieg des intrazellulären Eisengehaltes bis zu 100 pg/Zelle (Shapiro et al., 2005), wo hingegen nicht markierte Zellen einen physiologischen Eisengehalt von unter 1 pg aufweisen (Sun et al., 2005). Die durch Eisenoxidpartikel markierten Zellen stellen sich in der MRT-Bildgebung mit T2\* gewichteten Gradientenecho-Sequenzen durch Suszeptibilitätsartefakte, also Signalminderungen dar (Majumdar et al., 1989), die um ein vielfaches größer sind als die Zellen selbst. Hierdurch ergibt sich die hohe Sensitivität der MRT bis hin zum Nachweis einzelner, magnetisch markierter Zellen (Foster-Gareau et al., 2003; Shapiro et al., 2006). Vielversprechende Ergebnisse bezüglich der in vivo Bildgebung von einzelnen Zellen lieferte

die intrakardiale Injektion von Makrophagen und deren anschließender Nachweis im Gehirn (Heyn et al., 2006), sowie die Darstellung der Migration von Hepatozyten in die Leber nach intrasplener Injektion (Shapiro et al., 2005). Das Monitoren größerer Zellpopulationen von MSZ konnte in Rattenmodellen nach intravenöser (Hauger et al., 2006) und intraarterieller (Ittrich et al., 2007) Injektion sowie nach intramyokardialer Applikation in einem Herzinfarktmodell im Schwein gezeigt werden (Kraitchman et al., 2003). In einer weiteren Arbeit zur Verwendung magnetisch markierter neutrophiler Granulozyten (Krieg et al., 1995) als Abszessmarker wurden größere Zellpopulationen verwendet. Im Gegensatz dazu wurden einzelne MSZ bisher nur in vitro nachgewiesen (Peldschus et al., 2007; Shapiro et al., 2005). Um sehr kleine MSZ Populationen, bis hin zu einzelnen Zellen in vivo verfolgen zu können war es nötig, ein neues methodisches Vorgehen zu etablieren.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Markierung multipotenter mesenchymaler Stromazellen zur Detektion einzelner Zellen mit der Magnetresonanztomographie und Fluoreszenzmikroskopie**

#### **3.1.1 Murine multipotente mesenchymale Stromazellen**

Die in dieser Arbeit verwendete murine MSZ-Zelllinie wurde freundlicherweise von Frau PD Dr. rer. nat. Claudia Lange (Zentrum für Knochenmarkstransplantation, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) aus männlichen Balb/C C57Bl6 Mäusen nach standardisiertem Verfahren isoliert (Schrepfer et al., 2007a) und zur Verfügung gestellt. Die folgend beschriebenen Labortätigkeiten wurden in Kooperation zwischen der Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie mit der Abteilung Anatomie II des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

#### **3.1.2 Zellkultur**

Zur Standardisierung und Reproduzierbarkeit der Experimente wurden vor Versuchsbeginn von den MSZ, bei Passage 5, Aliquots gewonnen und diese kryokonserviert. Hierzu wurden die Zellen in Suspension gebracht und in ein 30 ml Zentrifugenröhrchen überführt (30 ml Weißkappenröhrchen, Greiner Bio-one / Kremsmünster, AT). Die Zellen wurden 5 min. bei 1500 U/min. zentrifugiert (Labofuge A mit 4-fach-Rotor (2143), Heraeus Sepatech / Hanau, DE) und der Überstand anschließend abgesaugt (Vascusafe comfort, INTEGRA Biosciences AG / Chur, CH). Die resultierenden Zellpellets wurden anschließend in Gefriermedium (Cryo-safe Ir, c.c. pro GmbH, Neustadt, DE) resuspendiert und in Einfrierröhrchen (Nunc Cryo Tube Vials, Nalge Nunc, Roskilde, Dänemark) auf identische Aliquots von je 1 ml verteilt. Diese wurden gemäß den Vorgaben des Herstellers für 40 min. bei  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und hiernach über Nacht auf  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  herunter gekühlt. Im Anschluss daran erfolgte die endgültige Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff bei ca. 77 Kelvin (ca.  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Zur Revitalisierung der kryokonservierten Zellen wurden zwei Zellpelets der MSZ bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in einem Wasserbad aufgetaut und in eine zuvor mit dem entsprechenden Kulturmedium befüllte T25 Zellkulturflasche gegeben.

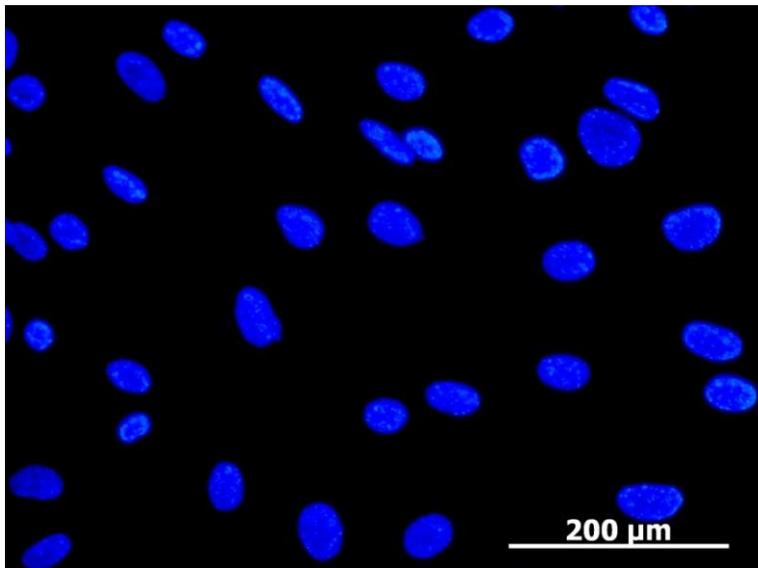
Die Zellkultur erfolgte in belüfteten, 250 ml großen T75 ( $75\text{ cm}^2$  Wachstumsbereich) Kulturflaschen (Sarstedt AG & Co Nümbrecht, Deutschland) bei Standardbedingungen

(37 °C, 100 % relative Luftfeuchtigkeit, 5 % CO<sub>2</sub>/75 % Luft) in einem Hera Cell Zellkulturschrank (Heraeus Instruments GMBH, Hanau. DE). Das Kulturmedium setzte sich aus DEMEM/HAM's F-12 (Biochrom AG Berlin, Deutschland), 20 % Foetal Bovine Serum (FCS, Gibco® Life Technologies Ltd. Pasley, SCO), 2 mM L-Glutamin (Gibco® Life Technologies Ltd. Pasley, SCO) und 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin (Gibco® Life Technologies Ltd., Pasley, SCO) zusammen. Es wurde zweimal pro Woche gewechselt, wobei jeweils einmal mit 10 ml PBS (Dulbeccos Phosphat Buffer Saline, (Gibco® Life Technologies Ltd., Pasley, SCO) gespült wurde. Bei einer Konfluität von 90–95 % ( $10.7 \times 10^3$ – $13 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup>) wurde das Medium abgesaugt, die Zellen dreimal mit 10 ml PBS gespült, um danach für 10 min. unter Standardbedingungen mit 5 ml Trypsin-EDTA (Gibco® Life Technologies Ltd., Pasley, SCO) inkubiert zu werden, so dass sich die Zellen vom Flaschenboden ablösen. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 5 ml Kulturmedium hinzugegeben. Etwa 1 bis 4 ml der entstandenen Zellsuspension wurden in neue Kulturflaschen gegeben und mit Kulturmedium auf 15 ml aufgefüllt. Alle Arbeiten mit der Zellkultur wurden unter einer Steril Gard Class II Type A/B3 Sicherheitsbank (The Baker Company, Sanford, Maine, USA) durchgeführt. Um Passageeffekte zu minimieren wurden die MSZ nur von Passage sechs bis zwölf verwendet. Die Kultivierung erfolgte, bis eine hinreichende Zelldichte erreicht war. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen wie oben beschrieben in Suspension genommen und den entsprechenden Experimenten zugeführt oder zur Vermehrung auf weitere Kulturflaschen verteilt.

Die Zählung der Zellen erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld GmbH Lauda-Königshofen, DE), 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm<sup>2</sup> Fläche, indem die Zellsuspension gut resuspendiert wurde und 10 µl auf den Objektträger pipettiert wurden. Unter einem Axiovert 35 Mikroskop (Carl Zeiss AG, DE) wurden vier Großquadrate (jeweils 16 Kleinquadrate mit jeweils 0,1 µl Volumen) ausgezählt und die Zellanzahl wie folgt berechnet: Gezählte Zellen / 4 × Verdünnungsfaktor × 10.000 = Zellen/ml. Bei mehr als 40 Zellen/Großquadrat wurde mit PBS um Faktor 10 verdünnt. Durch anschließendes Verdünnen oder Konzentrieren der Stammlösung wurde die jeweils benötigte Zellzahl/Volumen eingestellt.

Mycoplasmen sind intrazellulär wachsende Bakterien, die in Zellkulturen weit verbreitet und relativ schwer nachweisbar sind. Es gibt Hinweise darauf, dass Mycoplasmen die Molekülstrukturen auf der Oberfläche der Zellen verändern, so dass sie insbesondere in Versuchen wie diesem, der unter anderem die Oberflächenstrukturen der Zellen untersucht,

einen erheblichen Einfluss auf die Resultate haben können. Es gibt verschiedene Methoden, Mycoplasmen in Zellkulturen zu erkennen. Unter diesen ist die PCR die spezifischste Methode. Sensitiver jedoch ist die Färbung mit dem fluoreszierenden DNA-Farbstoff DAPI (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), der sowohl die Zellkerne der MSZ, als auch, im Falle einer Infektion, das Genom der Mycoplasmen sichtbar macht. Für den Test auf Mycoplasmen wurden MSZ resuspendiert, 1 ml von ca. 5000 Zellen/ml wurde auf ein 6-Well-Chamberslide (NUNC, LabTek, Chamber-Slide, 6-Well-Paramox-Slide, Langensfeld, DE) gegeben und für zwei Tage bis zu einer annähernden Konfluenz inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und mit 100 % Ethanol für jeweils zweimal 5 min. fixiert. Nach Absaugen des Ethanols trockneten die Slides bei Raumtemperatur und wurden danach mit jeweils zwei Tropfen DAPI pro Untersuchungsfeld angefärbt. Die gefärbten Zellen wurden schließlich im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axioplan 2, Jena, DE) untersucht. Die vor Zellinjektion durchgeführte Testung der Zellen auf Mykoplasmen zeigte stets nur die Zellkerne der dichtliegenden MSZ. Perinukleär angeordnete kleine Kerne als Hinweis auf eine Mykoplasmeninfektion fanden sich nicht (Abbildung 1).



**Abb. 1:** Mykoplasmentest  
DAPI Kernfärbung (blau), MSZ auf Chamberslides, 40 fache Vergrößerung. Es sind keine perinukleär angeordneten Mykoplasmen zu erkennen.

### **3.1.3 Markierung der Zellen mit superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln**

Die Zellen wurden in T75 Kulturflaschen bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % gezogen. Unter sterilen Bedingungen wurden 100 µl, 40 µl oder 20 µl einer Lösung der ca. 1,63 µm durchmessenden Eisenoxidpartikel (Bang Laboratorie, Inc, Fishers, IN, USA) auf 10 ml Kulturmedium gegeben. Somit wurde eine maximale Eisenkonzentration von 25 µg/ml bzw. 10 µg/ml oder 5 µg/ml Medium eingestellt. Die Zellen wurden für 12 Stunden bei Standardbedingungen mit den Eisenoxidpartikeln inkubiert. Hierbei erfolgte durch unspezifische Phagozytose eine intrazelluläre Aufnahme. Aufgrund des in ihrer Dextran-Umhüllung enthaltenen Fluorochroms (Ex: 540 nm / Em: 600 nm) konnten die Partikel im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Zur Entfernung aller nicht aufgenommenen Partikel wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen viermal mit je 5 ml Serum freiem Medium DEMEM/HAM's F-12 (Biochrom AG Berlin, DE) gewaschen. Anschließend wurden alle Zellen einer Flasche wie beschrieben abgelöst und in eine neue Flasche überführt. Nach 24 Stunden in Kultur wurden die Zellen zur Abtrennung restlicher freier Partikel erneut mit serumfreiem Medium gespült, bis unter konventioneller inverser Fluoreszenzmikroskopie (Axio Invert; Karl Zeiss, DE) keine freien Partikel mehr nachzuweisen waren.

### **3.1.4 Markierung der Zellen mit einem zytoplasmatischem Fluoreszenzfarbstoff**

Die bereits mit den Eisenpartikeln markierten MSZ, kultiviert in einer T75-Zellkulturflasche, wurden in 5 ml serumfreiem Medium mit 7,5 µl einer frisch in DMSO angesetzten und vorgewärmten 5 mM Stammlösung von CellTrace™ Carboxyfluorescein succinimidyl Ester (CFSE) Cell Proliferation Kit (Invitrogen, Karlsruhe, DE) für 20 min. unter Standardbedingungen inkubiert. Zum Ansetzen der 5 mM Stocklösung direkt vor Anwendung wurden 18 µl Dimethylsulfoxide (DMSO) auf 5 µg Lyophilisat gegeben. Die Reaktion wurde mit 4 °C kaltem Kulturmedium für 5 Minuten erstickt und die Zellen zweimal mit PBS gespült. Während der Reaktion diffundiert der CFSE passiv in die Zellen. Er ist solange farblos und nicht fluoreszierend, bis intrazelluläre Esterasen die Acetatgruppe abspalten, woraufhin die Estergruppe mit intrazellulären Aminen reagiert und eine fluoreszierende Verbindung entsteht, die bei 492 nm ihr Excitations- und bei 517 nm ihr Emissionsmaximum hat.

### **3.1.5 Bestimmung des zellulären Eisengehaltes mittels Atomabsorptionsspektrometrie**

Markierte und unmarkierte MSZ wurden wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, trypsiniert, gezählt und in 500 µl PBS aufgenommen, bei eingestellten Zelldichten von  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$ . Die Zellen wurden mit 0,02 molarer Salpetersäure und Triton X 100 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MI, USA) bei Raumtemperatur für 30 min. inkubiert und folglich lysiert. Die entstandenen Suspensionen wurden kräftig gevortext. Aus diesen Proben wurden Verdünnungsreihen mit Verdünnungen von 1 zu 10, 1 zu 100, und 1 zu 1000 hergestellt. Je 100 µl dieser Verdünnungen wurden in die Analysegefäße eines Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometers (Perkin Elmer 2100, Norwalk, CT, USA) eingebracht. Das Gerät plasmarisiert die Proben bei 2600 °C und misst den Eisengehalt photometrisch. Diese Messungen wurden für jede Suspension dreifach durchgeführt und der mittlere zelluläre Eisengehalt berechnet.

### **3.1.6 Magnetresonanztomographische Untersuchungen in vitro**

Zur Herstellung der Gelphantome wurden 20 g Gelatine (Carl Roth GMBH, Karlsruhe, DE) und 20 ml destilliertes Wasser in einen Glaskolben (Carl Roth GMBH, Karlsruhe, DE) gegeben und durch wiederholtes Erhitzen und Schwenken in der Mikrowelle in Lösung gebracht. Die Gelatinelösung wurde für mindestens 2 Stunden bei 55 °C im Wasserbad stehen gelassen, so dass sich auch kleinste Luftblasen auflösen konnten, die sonst in der MRT-Untersuchung punktförmige schwarze Artefakte geliefert hätten. Anschließend wurden je 2 ml der Lösung in 5 ml PVC-Röhrchen (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) mit Rundboden gefüllt. In diese Röhrchen wurden jeweils 5.000, 15.000 oder 50.000 wie in den Kapiteln 3.1.3 und 3.1.4 beschrieben markierte Zellen zu einem Gesamtvolumen von 500 µl in PBS aufgenommen, in die Gelatine einpipettiert und gut durchmischt. Die Zellen wurden gemäß Kapitel 3.1.2 vorbehandelt und über das beschriebene Verfahren in Suspension gebracht. Anhand dieser Gelphantome erfolgten die Evaluierung der Effektivität der magnetischen Markierung sowie die Optimierung der MRT-Sequenzen. Die Untersuchungen wurden an einem klinischen 3,0 T MRT-Gerät (Intera, Philips Medical Systems, Best, NL) durchgeführt. Das System ist mit einer Körper-Sende-Spule und einem konventionellen Gradientensystem ausgerüstet, das eine maximale Amplitude von 30 mT m<sup>-1</sup> und eine Anstiegsrate von 50 mT<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> ermöglicht. Zum Signalempfang wurde eine solenoidförmige Kleintierspule (Philips Research Laboratories, Hamburg, DE) mit einem inneren Durchmesser von 6 cm und einer Länge von 7 cm benutzt. Die optimierten Sequenzen zur Untersuchung der Eisenmarkierung sind Tabelle 1 zu entnehmen.

**Tabelle 1:** MRT-Untersuchungsprotokolle für die in vitro Testung

Sequenz	TR (ms)	TE (ms)	FOV	Voxel (mm)	FA (°)	S	SA (mm)	NSA	Zeit (min.)
T2* Axial 3D GRE	1360	15	22 × 22	0,2/0,2/0,2	15	55	–	4	15:41
Diese Sequenz diente der Einzelzelldetektion im Gelphantom, der Optimierung des Eisengehaltes, der Einzelzelldetektion im ZNS, sowie der SNR Bestimmung des ZNS.									
T2* Axial 2D GRE	1360	7	32 × 26	0,2/0,2/0,5	40	40	1	5	12:23
Diese Sequenz diente der Detektion von Einzelzellen im Gelphantom, in den Nieren, sowie der SNR Bestimmung von Leber, Niere, Knochenmark, Milz und Tumor.									

TR: Repetitionszeit; TE: Echozeit; FOV: Blickfeld; FA: Flipwinkel; S: Schichtanzahl; SA: Schichtabstand; NSA: Anzahl der Aquisitionen

Es handelt sich hierbei um Gradientenecho (GRE)-Sequenzen. Es wird nicht ein Hochfrequenzimpuls, sondern nur die Gradientenspulen zur Echoerzeugung verwendet. Der Frequenzkodiergradient wird zuerst in negativer Polarität geschaltet und bewirkt eine Dephasierung der Spins. Schaltet man ihn nun auf positive Polarität um, entsteht die Rephasierung, es kommt zum Echo. Durch Wegfall des 180°-Impulses der Spinechosequenzen können wesentlich kürzere TR (Repetitionszeiten) gewählt werden, so dass die Bildgebungsdauer deutlich verkürzt werden kann. GRE-Sequenzen sind also deutlich weniger anfällig gegenüber Bewegungen, wie z. B. der Atembewegung der Mäuse über dem Thorax und dem Abdomen. Da durch Wegfall des 180°-Impulses die statistischen Magnetfeldinhomogenitäten nicht ausgeglichen werden, zerfällt das Signal mit T2\*, die Sequenzen sind also sehr anfällig gegenüber Suszeptibilitätsartefakten, wie sie z. B. durch die von uns verwendeten Eisenoxidpartikel verursacht werden. Der T2\* Kontrast wird hier also durch die Echozeit beeinflusst. Einen maximalen T2\* Effekt bei niedrigem T1-Kontrast erlangt man durch eine lange TE und einer langen TR. Es gilt jedoch einen Kompromiss zwischen T1-Kontrast zur morphologischen Diagnostik und T2\* Kontrast zur Eisendetektion mit einem möglichst hohen SNR zu finden.

### 3.1.7 Mehrkanalfluoreszenzmikroskopie

In eine 35/10 mm Petrischale (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE) wurde ein 21 × 26 mm Deckgläschen (Marienfeld GmbH Lauda-Königshofen, DE) eingelegt, mit 2 ml Kulturmedium überschichtet und vorsichtig mit einer sterilen Pinzette angeedrückt. Es wurden 5000 Zellen der Passage 14 einpipettiert und 24 Stunden adhärent wachsen gelassen. Dann wurden 20 µl der superparamagnetischen und fluoreszierenden Eisenoxidpartikel, wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, zum Medium hinzugegeben und die Zellen damit für 24 Stunden

bei Standardbedingungen inkubiert. Mit Ende der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt. Unter Schräghalten der Petrischale wurde das Deckgläschen dreimal durch kräftiges Aufschießen 1 ml serumfreien Mediums (DEMEM/HAM's F-12 ohne weitere Zusätze) bei 37 °C gespült und die Schale mit 2 ml serumfreien Mediums aufgefüllt. Zur Markierung der Zellmembranen wurde das CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit verwendet. Das Ansetzen der 5 mM Stammlösung direkt vor Anwendung erfolgte wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben. 1 µl dieses Stocks pro ml Kulturmedium (5 µM) wurden zugesetzt und die Zellen für 10 min. unter Standardbedingungen inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden dreimal je 1 ml -4 °C kaltes Kulturmedium für einige Minuten auf die Deckgläschen gegeben. Anschließend wurde dreimal für 5 min. mit PBS gespült. Zur Fixierung der Zellen wurden 3 ml vierprozentiges Paraformaldehyd in 0,2 molarem Phosphatpuffer für 20 min. in die Petrischalen gegeben. Hierzu wurden 14,21g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O und 2,76g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × 1 H<sub>2</sub>O (Merk, Darmstadt, DE) in 500 ml Aqua dest. gelöst. Es stellt sich in 0,2 molarem Phosphatpuffer ein pH von 7,2 –7,4 ein. 4g PFA (Merk, Darmstadt, DE) wurden in 45 ml Aqua dest. unter Erhitzen auf 80 °C, Rühren und tropfenweiser Zugabe von 1 normaler NaOH gelöst und mit 50 ml 0,2 molarem Phosphatpuffer aufgefüllt. Die Kerngegenfärbung erfolgte, indem 4 µl der Stammlösung DRAQ5™ (Biostatus Limited, Leicestershire, UK, Anregung: 646 nm / Emission: 681 nm / 697 nm intercaliert mit dsDNA) auf 2 ml PBS gegeben wurden. 1 ml dieser Lösung wurde für 5 min. auf die Deckgläschen gegeben. Nach anschließendem einmaligem Spülen mit PBS wurden die Deckgläschen mit Fluoreszenz Mounting Medium (DAKO, Hamburg, Deutschland) einzeln auf Histo-Bond® Objektträger (75x25x1 mm Marienfeld, Marienfeld GmbH Lauda-Königshofen, DE) aufgebracht.

Die Proben wurden am konfokalen Mikroskop (LSM 710 ConfoCor 3, Carl Zeiss, Jena, DE) mit einem Scaling von 0,2 × 0,2 µm / Stack 103,41 µm unter einem 63× / 1,4 Scan Zoom Öl Objektiv mikroskopiert. Zur Darstellung der Zellproteine, mit CFSE gefärbt wurde bei 488 nm angeregt, bei: 505–530 nm ausgelesen. Zur Darstellung der mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel, wurde eine Excitation bei 543 nm und ein Emissionsfilter von 560–615 nm verwendet. Die mit DRAQ5 gefärbten Zellkerne wurden bei 633 nm angeregt und bei 670–798 nm ausgelesen.

### 3.1.8 Nachweis charakteristischer Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden doppeltmarkierte (wie in den Kapiteln 3.1.3 und 3.1.4 beschrieben) und unmarkierte MSZ zur Schonung der Oberflächenmoleküle mit einem enzymfreien Zell-Dissoziations-Puffer (Gibco® Life Technologies Ltd., Pasley, SCO) für 20 min. bei Standardbedingungen inkubiert und so in Suspension gebracht. Die Zellen wurden, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, pelletiert und in FACS Puffer (1 × PBS, 5 % FCS, 0,1 % NaN<sub>3</sub>; Merk, Darmstadt, DE) überführt. So wurden beide Gruppen der MSZ auf die Expression der charakteristischen Oberflächenmarker CD105+, CD90+, Sca-1+, CD45- und CD34- untersucht (Minguell et al., 2001; Pittenger et al., 1999; Schrepfer et al., 2007a). Der Versuch wurde für CD105 und CD44 mit unmarkierten MSZ bei Passage 14 und 40 im Vergleich wiederholt. Eine Differenzierung von lebenden und toten Zellen erfolgte durch Zugabe von 15 µl Propidium Iodid (PI) (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) auf 1 ml Zellsuspension. Für die Untersuchungen wurden die folgenden monoklonalen Antikörper und Isotyp IgG Antikörper verwendet: Biotin Rat Anti-Mouse Sca-1 Monoclonal Antibody, IgG2a, k (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA), Biotin Rat Anti-Mouse CD34 Monoclonaler Antikörper, IgG2a, k, Biotin Rat Anti-Mouse CD90.2 Monoclonaler Antikörper, IgG2a, k, (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) Biotin Rat IgG2a, k Isotype Kontrolle (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA), Rat Anti-Mouse CD105/Endoglin Allophycocyanin, IgG2a (R&D Systems, Minneapolis, USA), Rat IgG2a Isotype Kontrolle APC Conjugated (R&D Systems, Minneapolis, USA), Biotin Rat Anti-Mouse CD45, IgG2b, k (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA), Biotin Rat Anti-Mouse CD44, IgG2b, k (BD Biosciences, Franklin Lakes, US), Biotin Rat IgG2b, k Isotype Kontrolle (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA), Rabbit Anti-mouse CD105 und polyklonal IgG (Microprobes, Inc.). Die Färbung erfolgte an je 150.000 Zellen in 1 ml FACS-Puffer in 1,5 ml Eppendorf-Tubes. Zwischen den Färbeschritten von je 30 min. mit Primär-, ggf. Sekundär- und ggf. Tertiärantikörpern wurden die Zellen in einer 32 R Universalzentrifuge (Hettich Zentrifugen GmbH & Co. KG, Tuttlingen, DE) bei 1250 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen wieder in FACS-Puffer resuspendiert. Während der Präparationszeit wurden die Zellen bei 4 °C auf Eis gehalten.

Die FACS-Analysen erfolgten mit einer Detektion von APC bei 661 nm und PI bei 585 nm. Zur Kompensation des durch die rot fluoreszierenden Partikel in den APC-Kanal einstrahlenden Signals wurde eine Probe mit CFSE und Partikeln markierter MSZ mitgeführt

und deren Signal als Nullwert eingestellt. Für diese und alle weiteren FACS Untersuchungen wurde ein Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS Calibur, Beckton Dickenson) benutzt.

### **3.1.9 Nachweis von E-/P-Selektin-Bindungsstellen der Zellen mittels Durchflusszytometrie und Immunhistochemie**

Doppeltmarkierte und unmarkierte MSZ wurden gemäß Kapitel 3.1.7 in Suspension gebracht, pelettiert und in einen speziellen Lektinpuffer überführt, der  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen enthält, welche Lektine zum Binden benötigen (PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{Mg}^{2+}$ ). Die MSZ zur Färbung auf CD15s und CD162 wurden behandelt, wie in Kapitel 3.1.7 beschrieben. Eine Differenzierung von lebenden und toten Zellen erfolgte durch Einsetzen von 15  $\mu\text{l}$  Propidium Iodid (PI) (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) auf 1 ml Zellsuspension. So wurden die Zellen auf E-/P-Selektin-Bindungsstellen hin untersucht, sowie auf die Expression von CD15s, dem Hauptbindungspartner des E-Selektins (Becker-Andre et al., 1992; Kansas, 1996) und CD162, dem Hauptbindungspartner des P-Selektins (Kansas, 1996; Weller et al., 1992). Die Selektine binden jedoch an spezielle Zucker auf den Proteinen, nicht an die Proteine selber. Der Versuch wurde mit unmarkierten MSZ bei Passage 14 und 40 im Vergleich wiederholt.

Verwendet wurden: Rat Anti-Mouse CD162 IgG1, k (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA), Biotin konjugiert, Rat IgG1, k Isotype Kontrolle (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA); CD15s IgM k Maus-Anti-Human-Monoklonaler Antikörper (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA), unkonjugiert, Anti-Maus IgM k Sekundärantikörper, Biotin konjugiert (Sigma, Saint Luis, USA), Recombinantes Mouse E-/P-Selektin / FC Chimera (R&D Systems, Minneapolis, USA) mit einem humanen Fc-Teil, Mouse Anti-Human IgG Sekundärantikörper, Biotin konjugiert (Sigma, Saint Luis, USA). Zur sekundären Markierung der nicht primär fluoreszierenden Antikörper wurde APC Streptavidin (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA), eingesetzt. Die Färbung erfolgte an je 150.000 Zellen in 1 ml FACS-Puffer in 1,5 ml Eppendorf-Tubes. Zwischen den Färbeschritten von je 30 min. mit Primär-, ggf. Sekundär- und ggf. Tertiärantikörpern wurden die Zellen in einer 32 R Universalzentrifuge (Hettich Zentrifugen GmbH & Co. KG, Tuttlingen, DE) bei 1250 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen wieder in FACS-Puffer resuspendiert. Die ganze Zeit über wurden die Zellen bei 4 °C auf Eis gehalten. Die FACS-Analysen erfolgten mit einer Detektion von APC bei 661 nm und PI bei 585 nm. Auch hier wurde zur Kompensation des durch die rot fluoreszierenden Partikel in den APC-Kanal

einstrahlenden Signals, eine Probe mit CFSE und Partikeln markierter MSZ mitgeführt und deren Signal als Nullwert eingestellt.

Für den immunhistochemischen Nachweis von CD162 wurden MSZ in Suspension gebracht, eine Zellzahl von ca. 5000 Zellen/ml eingestellt und 1 ml dieser Suspension auf die Kammern eines 6-Well-Chamberslides ((NUNC, LabTek, Chamber-Slide, 6-Well-Paramox-Slide, Langensfeld, DE) aufgeteilt. Die Chamberslides wurden für 24 Stunden bei Standardbedingungen inkubiert, so dass MSZ fest adhärent wachsen konnten. Die MSZ wurden nun dreifach mit PBS gewaschen und dann mit 4 % PFA für zwanzig Minuten fixiert. Nach erneutem, mehrmaligem Waschen mit PBS erfolgte nun die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation der Zellen mit 1 zu 10 in Antikörper-Pufferlösung (Antibody Diluent with Background-Reducing DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA) verdünntem Kaninchenserum (DAKO A/S, Glostrup, DK) für 30 Minuten. Die Färbung erfolgte ebenfalls in Antikörper-Pufferlösung. Die zur Färbung und Isotypenkontrolle eingesetzten Antikörper waren: Rat Anti-Mouse CD162 IgG1, k (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA), Phycoerythrin-konjugiert, Rat IgG1, k Isotype Kontrolle (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA); Phycoerythrin-konjugiert und wurden jeweils 1 zu 500 verdünnt eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug vier Stunden. Nach erneutem, sechsmaligem Waschen mit PBS, wurden die Kammern entfernt und die Objektträger mit Fluorescence Mounting Medium (Dako, Hamburg, DE) eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte am Konfokalmikroskop bei einer Anregung von 488 nm und einem Detektor-Empfindlichkeitsmaximum von 578 nm.

Die MSZ wurden wie oben beschrieben vorbereitet, auf Chamberslides anwachsen gelassen, fixiert und gespült. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde nun für 30 Minuten mit 1 zu 10 in Antikörper-Pufferlösung verdünntem Kaninchenserum inkubiert. Um den blockierenden Effekt nicht zu verlieren, wurde das Serum nicht wieder herunter gespült, sondern lediglich abgesaugt, wobei es in den zur Negativkontrolle vorgesehenen Kammern über Nacht belassen wurde. Der Anti-CD15s Antikörper; IgM k, Maus-Anti-Human-Monoklonaler Antikörper (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA), unkonjugiert, wurde nun über Nacht 1 zu 50 in Antikörper-Pufferlösung verdünnt und zur Inkubation bei 4 °C auf die Objektträger gegeben. Ebenso wurde mit der Isotypkontrolle verfahren. Am nächsten Tag wurde das ABC-AP-Reagenz angesetzt (Vectastain Universal ABC-AP Kit, Vector Laboratories LTD., Peterborough, UK). Dazu wurden gemäß den Angaben des

Herstellers 5 ml PBS mit je einem Tropfen (ca. 50 µl) des Reagenzes A und einem Tropfen des Reagenzes B versetzt, und in einem 5 ml Weißkappenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, DE) für mindestens 30 min. auf einem Rollmischer durchmischt (Labor Rollmischer, Stuart Equipment, Dynalab Corp. NY, USA). Nun wurden die Chamberslides zweimal für 5 min. mit PBS gespült, um die ungebundenen Primärantikörper zu entfernen. Dann wurde der Sekundärantikörper, Anti-Maus IgM k Sekundärantikörper, Biotin konjugiert (Sigma, Saint Luis, USA) 1 zu 200 in Antikörper-Pufferlösung verdünnt zur dreißigminütigen Inkubation in alle Kammern gegeben. Es folgte ein erneuter Waschschrift zur Entfernung ungebundenen Sekundärantikörpers für zweimal 5 min. mit PBS. Nun folgte die Inkubation mit dem ABC-AP Reagenz für 30 min. und ein anschließender Waschschrift mit TBS (Tris-buffered saline: 50 mM Tris Base, 150 mM NaCl, mit 2 N HCl add pH 7.6). Zur Herstellung des Reaktionsansatzes (Mengen je Küvette angegeben) für die enzymatischen Farbstoffentwicklung durch die alkalische Phosphatase wurden 400 mg Natrium-Nitrit in 10 ml Aqua dest. gelöst und mit 400 µl Neufuchsin (5 g/100 ml 2 N HCl) und 400 ml TBS (50 mM Tris base, 150 mM NaCl, mit 2 N HCl add pH 8.24) ergänzt. Danach wurden in rascher Folge 40 mg Naphthol AS in 1000 µl Dimethylformamid (DMF) gelöst und hinzugeben, 260 µl Tween 20 hinzugeben, der gesamte Ansatz gemischt und die Objektträger darin für 30 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch fünfminütiges Spülen unter fließendem Leitungswasser gestoppt und die Objektträger danach in Aqua dest. überführt. Anschließend wurden die Präparate mit frisch gefiltertem Mayers Hämalun (1 zu 1 in Aqua dest.) 10 Sekunden gegengefärbt, für 5 min. in fließendem Leitungswasser gebläut, erneut in Aqua dest. überführt und mit Hilfe des wasserhaltigen Mediums Clarion/Crystal Mount (Biomedica corp., Foster City, California, USA) eingedeckt.

Die Immunhistochemie zum Nachweis von E-/P-Selektin-Bindungsstellen an MSZ erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie auch die oben beschriebene Färbung auf CD15s mit denselben Reagenzien und denselben Inkubationszeiten. Es wurde lediglich Lektinpuffer zur Bereitstellung von  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ - Ionen anstelle von PBS verwendet, um die Selektin-Bindung zu ermöglichen und erst im letzten Waschschrift vor dem Pipettieren des Entwicklungsreagenzes auf TBS als Puffer umgestellt. Die verwendeten Antikörper waren: Recombinantes Mouse E-/P-Selektin / FC Chimera (R&D Systems, Minneapolis, USA) mit einem humanen Fc-Teil, Mouse Anti-Human IgG Sekundärantikörper, Biotin konjugiert (Sigma, Saint Luis, USA) und einer Humanen IgG Isotypkontrolle, unkonjugiert (R&D Systems, Minneapolis, USA). Für den E-Selektin-Antikörper wurde eine Verdünnung von

1 zu 200, für den P-Selektin-Antikörper eine Verdünnung von 1 zu 20 gewählt. Die Verdünnung der Isotypenkontrolle wurde diesem Verhältnis jeweils angepasst.

### **3.1.10 Proliferationstest mittels Durchflusszytometrie**

Die Zellen wurden vom Flaschenboden durch Inkubation mit Cell dissociation buffer (Invitrogen, Carlsbad, USA) für 15 min. abgelöst. Jeweils etwa 250.000 doppelt markierte und lediglich mit CFSE markierte Zellen wurden in je 1 ml FACS-Puffer (20 % Fetales Kälberserum, Invitrogen, Carlsbad, USA) aufgenommen und im FACS gegen eine Kontrolle von 250.000 nativen Zellen auf ihren CFSE Gehalt hin untersucht. Ca. 100.000 Zellen jeder Gruppe wurden für sieben weitere Tage in Kultur genommen und bis auf 95 % Konfluität wachsen gelassen. Diesen Kulturen wurden am 7. Tag wieder je 250.000 Zellen entnommen und vergleichend bei 488 nm auf ihren CFSE-Gehalt hin untersucht. Vor jeder Messung wurden Zellen untersucht, die nur mit Partikeln markiert waren und deren Signal als Ausgangssignal für die folgenden Messungen verwendet. Da CFSE die Zellmembranen anfärbt und bei jeder Zellteilung die Hälfte der Zellmembran auf die Tochterzelle übergeht, nehmen der CFSE-Gehalt und damit die Fluoreszenz korrelierend zur Zellproliferation ab.

### **3.1.11 Chondrogene Differenzierung**

Zur Überprüfung des Differenzierungspotentials der verwendeten MSZ in Chondrozyten als Minimalkriterium der Differenzierung für multipotente mesenchymale Stammzellen (Dominici et al., 2006) wurde ein leicht modifiziertes Verfahren nach Shakibaei (Shakibaei and De Souza, 1997) durchgeführt. Diese Untersuchung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. rer. nat. Lange, Zentrum für Knochenmarkstransplantation, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Hierzu wurden je ca.  $1,5 \times 10^6$  /ml doppelt-markierte MSZ und nicht markierte MSZ wie beschrieben in Suspension genommen und in 2 % Alginatsäure (Sigma Aldrich, Rödermark, DE) überführt. Die Zellen in Alginat wurden nun tropfenweise in 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (Merk, Darmstadt, DE) eingebracht und so für 10 Minuten zum Gelieren gebracht. Die Alginat-MSZ-Kügelchen wurden sodann mit PBS gespült und für 7 Tage in Kulturmedium überführt, wobei alle drei Tage ein Mediumwechsel vorgenommen wurde. Die Alginat-MSZ-Kügelchen wurden für eine Stunde in 10 % Formalin fixiert. Es folgte ein fünfminütiger Waschschrift mit 2 % Essigsäure, anschließend wurden die Alginat-MSZ-Kügelchen für 24 Stunden in einer Lösung aus 0,05 % Alcian Blue (Sigma Aldrich, Rödermark, D) und 4 % MgCl<sub>2</sub> (Fluka, Chemie AG Buchs, CH) gefärbt. Die

gefärbten Alginat-MSZ-Kügelchen wurden dann in aufsteigender Alkoholreihe und zum Schluss in Xylol (Merk, Darmstadt, DE) entwässert. Die Kügelchen wurden mit einem Deckgläschen auf Objektträger aufgequetscht. Eingedeckelt wurde mit Entellan (Merk, Darmstadt, DE). Zum Ausschluss einer Proteoglycan-Expression in nicht induzierten MSZ wurden markierte und unmarkierte MSZ direkt nach dem Gelieren fixiert und eingedeckelt (Lange et al., 2005).

### **3.2 Nachweis einzelner multipotenter mesenchymaler Stromazellen in Mäusen mittels in vivo Magnetresonanztomographie und Fluoreszenzmikroskopie**

#### **3.2.1 BALB/c C57BL/KaIgh-I scid/scid Mäuse**

Alle Arbeiten mit Versuchstieren waren durch den Tierversuchsantrag Nr. 73/07 vom 24.10.2007 durch die Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Stadt Hamburg genehmigt.

Pathogenfreie, weibliche BALB/c C57BL/KaIgh-I scid/scid Mäuse wurden im Alter von 10 bis 12 Wochen und mit einem Körpergewicht von 21–29 g von der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bezogen. Die Tiere wurden in Gruppen von maximal 4 pro Käfig in Racks mit Einzelkäfig-Zu- und Abluft (IVC-Rack, Techniplast, DE) gehalten und mit sterilem Futter und Wasser (ssniff, Soest, DE) *ad libitum* versorgt. Alle Experimente und Eingriffe an den Tieren wurden unter einer Laminar Flow Sicherheitsbank vollzogen. Severe combined immunodeficient (SCID) Mäuse wurden verwendet, um eine spezifische Immunreaktion auf die Fremdzellen mit konsekutiver Abstoßung der MSZ zu verhindern. Die kombinierte Immundefizienz wurde durch eine spontane Mutation in der C.B-17/lcr Genregion der schweren Kette der Immunglobuline erworben, was zu einem Verlust von Immunglobulinen und T-Zellrezeptor führt, mit der Konsequenz, dass die Mäuse keine funktionierenden B- und T-Zellen ausbilden. Zur Verifizierung des Zustands der Immundefizienz, wurde routinemäßig ein Dot Blot Assay durchgeführt, um die Gesamtmenge an Immunglobulin im Mausserum zu bestimmen. Es wurde eine Standardkurve aus 1 mg IgG-Lyophilisate (Sigma, St. Luis, USA) aufgenommen in 500 µl 0,9 % NaCl (J. T. Baker, Deventer, NL) und mit Aqua dest. 1 zu 1, und weiter 1 zu 10 zu 100 µg IgG/ml verdünnt, sowie der weiteren Verdünnungsreihe zu 50, 25, 12,5, 6,25 und 3,125 µg IgG/ml erstellt. Durch Punktion des Venenplexus im Kieferwinkel der Mäuse wurden repräsentative

Blutproben gewonnen, welchen durch 5 Minuten Zentrifugation bei 5.000 U/min. das Serum abgetrennt wurde. Je 10 µl dieser Proben und jeder Verdünnung des Standards wurden auf Nitrozellulose pipettiert, luftgetrocknet und für 30 min. mit 3 % Tween (Sigma, St. Louis, USA) gelöst in PBS geblockt. Nun wurde die Nitrozellulose für 30 min. bei Raumtemperatur mit einem monoklonalen Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper, biotinkonjugiert, (DakoCytomation, Glostrup, DK), 1 zu 500 in Antikörper-Pufferlösung verdünnt, inkubiert. Nach einem fünfminütigem Waschschrift mit PBS schloss sich die Inkubation mit Meerrettich-Peroxidase (DakoCytomation, Glostrup, DK), 1 zu 500 in PBS verdünnt, bei Raumtemperatur für 30 Minuten an. Nach erneutem Waschen wurde die Peroxidasebindung nun durch 30 minütige Inkubation mit DAB-Hydrogen-Peroxid (100 mg Diaminobenzidin (Sigma, St. Louis, USA), gelöst in 20 ml Tris (Sigma, St. Louis, USA) mit einem pH 7,6 eingestellt mit 1 M HCL (Merck, Darmstadt, Germany) sichtbar gemacht. Die Tiere wurden als SCID anerkannt, wenn die Färbungsintensität des Mausserums geringer war als die des auf 25 µg/ml verdünnten Standards (Bosma et al., 1992; Brown et al., 1997).

### **3.2.2 Präparation der multipotenten mesenchymalen Stromazellen**

Die, wie unter 3.1.3 und 3.1.4 beschrieben, doppeltmarkierten MSZ wurden zur Schonung der Oberflächenmoleküle mit enzymfreien Zell-Dissoziations-Puffer, wie in Kapitel 3.1.8 beschrieben, in Suspension gebracht. Es erfolgte dann die Pelletierung und Überführung in serumfreies Medium. Die Zellzahl wurde wie für die folgenden Versuche benötigt wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben eingestellt. Die MSZ wurden jeweils frisch für die Injektion vorbereitet, in sterilen 5 ml Bechergläsern (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE) auf Flockeneis (Flockeneismaschine Hoshizaki, FM-120 EE/Nagoya, JP) gehalten. In den Zentrifugenröhrchen zeigte sich bereits nach ca. 5 Minuten eine deutliche Adhärenz der MSZ, diese konnte durch das beschriebene Verfahren minimiert werden.

### **3.2.3 Ultraschallgesteuerte intrakardiale Injektion der Zellen**

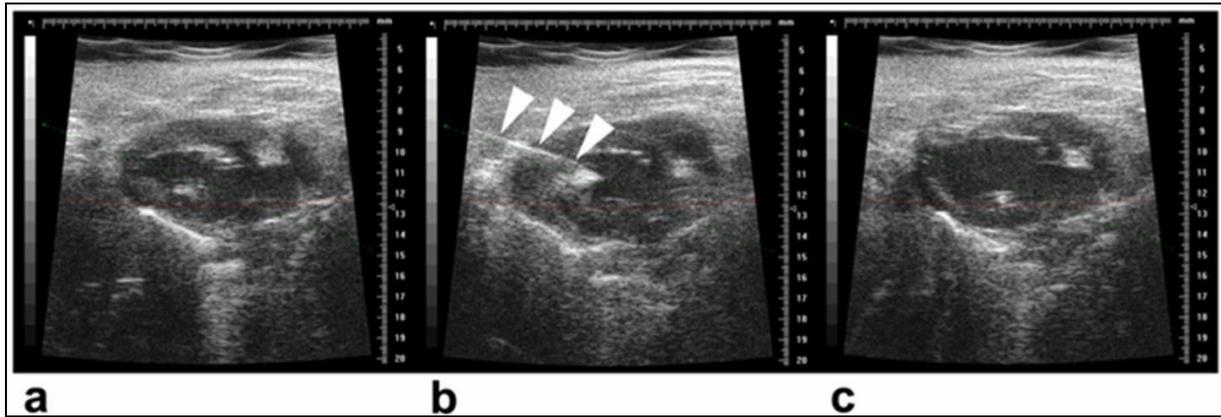
Doppeltmarkierte MSZ wurden mittels des Zell-Dissoziations-Puffers in Suspension gebracht, pelletiert und in serumfreiem Medium resuspendiert. Es wurden Zellzahlen von  $1 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  eingestellt und auf Flockeneis transportiert. Direkt bevor die Zellen aufgezogen wurden, wurden sie auf- und abpipettiert und durch ein Zellsieb (Cell Strainer 100 µm Poresdurchmesser, BD Bioscience, Heidelberg, DE) gegeben. Drei weibliche BALB/c C57BL/KaIgh-I scid/scid Mäuse wurden pro Kohorte verwendet. Es wurden je 50 µl der Zellsuspensionen, entsprechend Zellzahlen von 5000, 15.000, und 50.000, in den linken

Ventrikel der Mäuse appliziert. Zur Kontrolle wurden drei Tiere analog mit serumfreiem Medium ohne Zellen behandelt. Für die Injektion der Zellen wurden die Tiere mit einem 1–1,5 % Isofluran/Luft-Gemisch narkotisiert (Compact Anästhesie System, VisualSonics Inc., Toronto, CA). Zur EKG- und Atmungsfrequenzkontrolle wurden die Tiere an den Extremitäten auf stationären Ableitelektroden auf dem Untersuchungstisch in Rückenlage fixiert (s. Abbildung 2). Unter der Narkose wurde eine Herzschlagrate von ca. 250 Schlägen/Minute eingestellt. Mit Enthaarungscreme (Veet Enthaarungsgel, Reckitt Benckiser Deutschland GmbH, Mannheim, DE) wurde das Fell im Brustbereich entfernt. Zur Bildgebung wurde ein 30 MHz Kleintierultraschallsystem Vevo 770 Microimaging System (VisualSonics Inc., Toronto, Canada) verwendet. Für die ultraschallgesteuerte linksventrikuläre Injektion wurde ein modifizierter Längsachsenschnitt des linken Ventrikels gewählt. Die Injektion erfolgte mit 30 G Nadeln (Braun AG, Melsungen, DE) und einer 250 µl Glas-Spritze (Hamilton AG, Bonaduz, CH). Um Zellverklumpungen zu minimieren, wurde die Spritze gekühlt und mit purem FCS vorgespült, so dass kleinste Angriffspunkte auf der Glasoberfläche blockiert wurden. Direkt vor der Injektion wurde die Spritze einmal mit serumfreiem Medium gespült. Die Nadel wurde über eine Führungsvorrichtung von subxyphoidal in einem Winkel von ca. 30° in den linken Ventrikel vorgeschoben und die Zellsuspensionen bzw. das Kontrollmedium langsam injiziert (s. Abbildung 3b). Zum Ausschluss eines Perikardergusses erfolgte nach Injektion eine Ultraschallkontrolle des Einstichgebietes (Springer et al., 2005) (s. Abbildung 3c).



**Abb. 2:** Ultraschallgesteuerte intrakardiale Injektion

Eine 30 G Kanüle auf einer Hamiltonspritze wird von subxyphoidal in das vordere Mediastinum eingebracht. Der 30 MHz Schallkopf wird mit Ultraschallgel thorakal aufgesetzt. Die Maus ist auf dem Elektrodentisch mit Klebestreifen fixiert, so dass die Schnauze in der Isofluranmaske zu liegen kommt.



**Abb. 3:** Intrakardiale Injektion markierter MSZ in den linken Ventrikel  
 Ansicht: Modifizierter Längsachsenschnitt des linken Ventrikels; **a)** Vor der Injektion zeigt sich ein anatomisch und funktionell unauffälliger linker Ventrikel. **b)** Während der Injektion mit der Nadel (↘) im linken Ventrikel ist der Herzmuskel normal kontraktile, die eingebrachten Zellen erscheinen als hyperreflektile Punkte. **c)** Nach der Zellinjektion zeigt sich der linke Ventrikel wie vor der Injektion anatomisch und funktionell unauffällig.

### 3.2.4 Magnetresonanztomographische Untersuchung der Mäuse in vivo

Die MRT-Untersuchungen erfolgten an einem klinischen 3,0-Tesla-Gerät in der MRT-Abteilung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie. Zur Untersuchung der Mäuse wurde eine spezielle solenoid-förmige Empfangsspule für Kleintiere mit einem Innendurchmesser von 6 cm und 7 cm Länge verwendet. Für die Untersuchungen wurden die Tiere gewichtsadaptiert ( $1 \mu\text{l/g KG}$ ) mit einem Gemisch aus 1,2 ml Ketamin (100mg/ml) (Gräub AG, Bern, CH), 0,8 ml Rompun (20mg/ml Xylazine) (Bayer AG, Leverkusen, Germany) und 8 ml NaCl-Lsg (GIBCO™, invitrogen corporation / Carlsbad, CA, USA) narkotisiert (Mengenangaben für 10 ml Narkoselösung). Die Dauer der Narkose betrug etwa 45 min., sodass hierfür die Augen mit Bepanthen Augensalbe (Bayer AG, Leverkusen, DE) überdeckt wurden. Die Auskühlung der bewegungslosen Tiere wurde über eine in die Spule integrierte Heizeinheit ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) verhindert. Die Untersuchungen erfolgten mit den in Kapitel 3.1.6 beschriebenen  $T2^*$  gewichteten 3D und 2D Gradientenechosequenzen. Als Localiser dienten  $T1$  gewichtete Sequenzen in drei orthogonal zueinander stehenden Ebenen. Zur Planung der hochauflösenden Sequenzen verwendeten wir eine  $T2^*$  gewichtete Ganzkörpersequenz und eine sagittale  $T2$  gewichtete Sequenz (s. Tabelle 2a und b). Die gesamte Untersuchungszeit pro Maus betrug etwa 30 Minuten.

**Tabelle 2a:** MRT-Untersuchungsprotokolle für die in vivo Testung

Sequenz	TR (ms)	TE (ms)	FOV	Voxel (mm)	FA (°)	S	SA (mm)	NSA	Zeit (min.)
T2* Cor. 2D GRE	1690	7	80 × 32	0,25/0,25/1,0	15	12	1	5	1:49
Diese Sequenz diente als Localiser und Übersichtsaufnahme zur Planung der axialen Sequenzen.									

TR: Repetitionszeit; TE: Echozeit; FOV: Blickfeld; FA: Flipwinkel; S: Schichtanzahl; SA: Schichtabstand; NSA: Anzahl der Aquisitionen

**Tabelle 2b:** MRT-Untersuchungsprotokolle für die in vivo Testung

Sequenz	TR (ms)	TE (ms)	FOV	Voxel (mm)	FA (°)	S	SA (mm)	NSA	Zeit (min.)
T2 Sag. 2D TSE	382	90	80 × 40	0,2/0,2/2,0	90	1	10	2	0:16
Diese Sequenz diente als Localiser, nach ihr wurde sowohl die Höhe der axialen Sequenzen eingestellt, als auch die 3D Sequenz über das ZNS nach der Medulla Oblongata geplant und nach der Hirnbasis gekippt.									

TR: Repetitionszeit; TE: Echozeit; FOV: Blickfeld; FA: Flipwinkel; S: Schichtanzahl; TSF: Turbospinfaktor; NSA: Anzahl der Aquisitionen

Alle Auswertungen und Messungen wurden mit K-Pacs Free Software (IMAGE Information Systems Europe Ltd., London, UK) durchgeführt. Die Durchsicht der Datensätze nach einzelnen MSZ erfolgte stets unter Einbezug der Vor- und Nachaufnahmen. Die Bestimmung des SNR (Signal zu Rausch Ratio) erfolgte nach der Formel:

$$\text{SNR} = \frac{(\text{Mittlere Signalintensität des Gewebes}) - (\text{Mittlere Signalintensität der Luft})}{\text{Standardabweichung der Signalintensität der Luft}}$$

Die Dichtemessungen erfolgten in den hochauflösenden T2\* gewichteten Datensätzen mittels einer runden, manuell platzierten Region-of-Interest (ROI) von 10 mm<sup>2</sup> in den Organen. Die Signalintensität der Luft wurde mittels einer ROI von 100 mm<sup>2</sup> am kranialen Bildrand bestimmt, um Überlagerungen von Bewegungsartefakten zu vermeiden.

### 3.2.5 Histologische Präparation und Auswertung

Zur histologischen Auswertung wurden die Gehirne inklusive des Bulbus olfaktorius und der Medulla oblongata freipräpariert, in axialer Schnitfführung halbiert und in Metallschalen eingelegt. Anschließend wurden sie mit OCT™ Tissue Tek (Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, NL) überschichtet und in mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten

Isopentan (Merk, DE) eingefroren. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Ebenso wurde mit den Lebern, Milzen, Lungen und Nieren der Versuchstiere verfahren. Zur Minimierung von Gefrierartefakten bei Leber und Nieren wurde jeweils nur ein repräsentativer Leberlappen bzw. eine Hälfte der Niere, in axialer Schnittrichtung halbiert, eingefroren.

Die histologische Präparation erfolgte an einem Cryotom (Laika CM 3050, Wetzlar, DE). Die verwendeten Klappen (C35 Type Microtome Blades, Feather Safty Razorm Osaka, JP) wurden mindestens 15 min. vor Arbeitsbeginn in die Halterung eingespannt, so dass sie herunterkühlen konnten. Je nach Luftfeuchtigkeit und Außentemperatur etwas variierend, wurden Lebern bei  $-17\text{ °C}$ , Milzen, Lungen und Nieren bei  $-14$  bis  $-15\text{ °C}$ , und Gehirne bei  $-22\text{ °C}$  geschnitten. Es wurden  $10\text{ }\mu\text{m}$  dicke Schnittpräparate der gesamten Hirne aus der Versuchsreihe zum Einzelzellnachweis erstellt. Diese wurden auf Histo Bond® Objektträger aufgebracht. Auf die Schnitte wurde ein kleiner Tropfen PBS und ein Tropfen DAPI Mounting Medium zur Gegenfärbung der Zellkerne (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) gegeben.

Das Eindeckeln erfolgte mit langen Deckgläsern ( $60 \times 24 \times 0,11\text{ mm}$  Marienfeld, Marienfeld GmbH Lauda-Königshofen, DE). Für konfokalmikroskopische Aufnahmen wurden die Schnitte vor dem Eindeckeln für 5 min. mit einigen Tropfen DRAQ5™ 1 zu 5.000 in PBS verdünnt inkubiert, um die Zellkerne in den Schnitten auch konfokal darstellen zu können.

Die Präparate wurden unter einem Durchlicht-Fluoreszenzmikroskop (Axio Phot, Carl Zeiss, Jena, DE) bei  $480\text{ nm}$  zur Darstellung des CFSE, bei  $540\text{ nm}$  zur Darstellung der Partikel, bei  $345\text{ nm}$  zur Darstellung der Zellkerne (gefärbt mit DAPI) und mit Nomansikontrast quantitativ ausgewertet. Dazu wurden von den Gehirnpräparaten die Einzelzellen in je drei Regionen der Hirne, in je 20 ganzen axialen Hirnschnitten ausgezählt und mit den entsprechenden MRT-Schichten gleicher Dicke und Region korreliert. Die Auswertung der Nierenschnitte erfolgte in den Regionen, in denen im MRT einzelne Zellen gefunden wurden, sowie in unauffälligen Bereichen. Es wurden also unterschiedlich viele Schnitte von den Nieren erstellt, bis die einzelnen MSZ repräsentativ zur Darstellung kamen. Aus Lunge, Milz und Leber der Versuchsreihe zur Einzelzelldetektion wurden ebenfalls unterschiedliche Anzahlen an Schnitten erstellt, bis einzelne MSZ repräsentativ zur

Darstellung kamen. Zum Ausschluss von Zell-Agglomeraten wurden zusätzlich Untersuchungen an repräsentativen Schnitten am konfokalen Mikroskop (LSM 710 ConfoCor 3, Carl Zeiss, Jena, DE) durchgeführt.

### **3.3 Untersuchung der Migration und Degradation multipotenter mesenchymaler Stromazellen in E/P-Selektin-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen**

#### **3.3.1 Pfp/rag2 MM-Mäuse mit und ohne E-/P-Selektindefizienz**

Es wurden immundefiziente Mäuse benutzt, um eine mögliche „host versus graft“ Reaktion zu verhindern und so gleichzeitig den Verlust an eingebrachten MSZ durch Immunreaktionen so gering wie möglich zu halten. Das Besondere an Pfp/rag2 Mäusen ist der Verlust der Fähigkeit, das Pore Forming Protein (Pfp), auch als Perforin bekannt, zu bilden. Dies liegt normalerweise, zusammen mit einer Reihe anderer lysierender Agentien, in cytoplasmatischen Granulationen von Natürlichen-Killer-Zellen (NK-Zellen) und Cytotoxischen-T-Lymphozyten vor (Henkart, 1985; Podack et al., 1991). Es wird angenommen, dass sich die Perforin-Monomere zu einer Polymerstruktur zusammenfügen, die sich in die Zellmembran der Zielzelle integriert. Dieser Vorgang ist maßgeblich am apoptose-ähnlichen Zelltod der Zielzellen beteiligt (Tschopp and Nabholz, 1990; Young, 1989). Die beschriebenen Funktionen des Perforins sind bei den verwendeten Mäusen ausgeschaltet, so dass ihnen ein wichtiger Mechanismus zum Abtöten fremder oder infizierter Zellen fehlt. Die zweite Komponente der Immundefizienz der verwendeten Mäuse ist auf das Fehlen des „Rekombination aktivierenden Gens 2“ (rag2) zurückzuführen. Lymphozyten des Säuger-Immunsystems reagieren mit einer riesigen Anzahl verschiedener Antigene. Diese Vielfalt wird durch die variable Domäne sowohl der Immunglobuline als auch des T-Zell-Rezeptors ermöglicht. Die Gene, die diesen Prozess kodieren, werden in der frühen Differenzierungsphase der B- und T-Zellen in dem Prozess der V(D)J Rekombination zusammengefügt. Dies geschieht ausschließlich in frühen Phasen der B- und T-Zell-Differenzierung, nicht in späteren Stadien oder etwa in nicht-lymphatischen Zellen (Blackwell et al., 1986; Lieber et al., 1987). Die für diesen Prozess verantwortlichen Gene sind rag1 und rag2 (Oettinger et al., 1990; Schatz et al., 1989). Es zeigte sich, dass Mäuse mit den beschriebenen Defekten einen sehr kleinen oder gar keinen Thymus, hypoplastische Lymphknoten und Milzen haben. Diese Organe haben jedoch einen höheren Anteil an Granulozyten, NK-Zellen und Makrophagen als Wildtyp-Kontrolltiere. Ansonsten sind Mäuse

mit den genannten Defekten phänotypisch wie auch in histologischen Untersuchungen nicht unterschiedlich von Wildtyp-Kontrollen (Shinkai et al., 1992; Walsh et al., 1994). Mäuse mit den oben beschriebenen Defekten wurden auf einem C57Bl6 Hintergrund als Wildtyp-Kontrolltiere zu den Selektin-defizienten Mäusen verwendet.

E- und P-Selektin-defiziente Mäuse (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA, stock 002916) wurden mit Pfp/rag2 C57Bl6 Mäusen der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf verpaart, bis sich die Pfp/rag2 Komponente, der Back 6 Hintergrund, sowie die E- und P-Selektin-Defizienz rein und homozygot darstellten (Köhler et al., 2010). Im Folgenden werden diese Mäuse auch Knockout-Tiere genannt.

### 3.3.2 Validierung der Selektin-Defizienz mittels Polymerasekettenreaktion

Vor der Sakrifizierung der Versuchstiere wurden repräsentativ Schwanzbiopsien entnommen, um die Selektin-Doppeldefizienz zu verifizieren. Die Schwanzspitzen wurden in sterilen 1,5 ml Eppendorf-Tubes (Eppendorf AG, Hamburg, DE) bei  $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die DNA Extraktion erfolgte mit dem Invisorb Spin Tissue Midi Kit (Invitek Gesellschaft für Biotechnik & Biodesign mbH, Berlin, DE) gemäß des Herstellerprotokolls. Es wurden folgende vorbeschriebene Primer (Frenette et al., 1996; Kim et al., 1998) benutzt:

- (1) P-Selektin for.            5'-TTG TAA ATC AGA AGG AAG TGG-3'  
    (Lektin-Domäne)
- (2) P-Selektin rev.         5'-AGA GTT ACT CTT GAT GTA GAT CTC C-3'
- (3) E-Selektin for.         5'-GGA CTG TGT AGA GAT TTA CAT CC-3'  
    (Lektin-Domäne)
- (4) E-Selektin rev.         5'-GCA GGT GTA ACT ATT GAT GGT-3'  
    (EGF-Domäne)
- (5) P und E-Selektin for. 5'-CAC GAG ACT AGT GAG ACG TG-3'  
    (Hygromycin-Kassette)

Diese wurden bezogen von MWG-Biotech AG, Ebersberg, DE. Die PCR zur Vervielfältigung des P-Selektin-Alleles wurde in sterilen 25  $\mu\text{l}$  PCR-Tubes (Stratagene, La Jolla Ca, USA) mit 12,32  $\mu\text{l}$  destilliertem Wasser, 2,5  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer S, 5,0  $\mu\text{l}$  Verstärkerlösung P, 0,52  $\mu\text{l}$  Primer 1 (24  $\mu\text{M}$ ), 1,47  $\mu\text{l}$  Primer 2 (17  $\mu\text{M}$ ), 0,6  $\mu\text{l}$  Primer 3 (21 $\mu\text{M}$ ), 0,5  $\mu\text{l}$  d-NTPs (10 mM), 0,16  $\mu\text{l}$  Taq-DNA-Polymerase (5 U  $\mu\text{l}^{-1}$ ), und 2,0  $\mu\text{l}$  des

DNA-Extracts angesetzt. Reaktionspuffer S, Verstärkerlösung P, d-NTPs sowie taq-Polymerase wurden als SAWADY Taq-DNA-Polymerase-Kit von peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE bezogen. Der Ansatz zur Vervielfältigung des E-Selektin-Alleles wurde nach dem selben Schema angesetzt, mit dem Unterschied, dass 12,26 µl destilliertes Wasser, 0,6 µl Primer 3 (21 µM), Primer 4 (19 µM), 1,32 µl Primer 5 (19 µM) und 0,165 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U µl<sup>-1</sup>) eingesetzt wurden. Die PCR wurde in folgendem Thermocycler-Programm vollzogen:

**Tabelle 3:** Thermocycler Programm der PCR zur Validierung der Selektindefizienz

Programmschritt	Zeit	Temperatur	Anmerkungen
Denaturierung	3 min.	94 °C	
Denaturierung	30 s	94 °C	
Primer Hybridisierung	30 s	64 °C	12 Zyklen, wobei jeweils pro Zyklus -0,5 °C
Extension	35 s	72 °C	
Denaturierung	20 s	94 °C	
Primer Hybridisierung	30 s	58 °C	20 Zyklen
Extension	35 s	72 °C	
Extension	10 min.	72 °C	
Pause	∞ min.	4 °C	

### 3.3.3 Präparation der multipotenten mesenchymalen Stromazellen

Die MSZ wurden für diese Versuche wie im Kapitel 3.1.2 beschrieben kultiviert und mit der Doppelfluoreszenz markiert wie in den Kapiteln 3.1.3 und 3.1.4 dargelegt. Die Vorbereitung zur Injektion erfolgte wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben.

### 3.3.4 Injektionsmethoden

#### 3.3.4.1 Ultraschallgesteuerte intrakardiale Injektion

Die MSZ wurden wie in den Kapiteln 3.1.3 und 3.1.4 beschrieben markiert und wie in Kapitel 3.1.2 gezählt. Die Vorbereitung zur Injektion und der Transport auf Flockeneis erfolgten wie in Kapitel 3.2.2 erläutert. Wie im Kapitel 3.2.3 ausführlich dargelegt, erfolgte die ultraschallgesteuerte Injektion von 50.000 markierten MSZ in die Höhle des linken Ventrikels von je sechs Mäusen der beiden unter 3.3.1 beschriebenen Gruppen.

### **3.3.4.2 Intravenöse Injektion**

Die MSZ wurden wie erläutert markiert, gezählt und zur Injektion vorbereitet. Um eine langsame und schonende Injektion von  $1 \times 10^6$  markierten MSZ gewährleisten zu können, wurde ein Mikrokatheter-System benutzt. Die Nadel einer sterilen 30 G Einmalkanüle (Sterican Einmalkanülen, Braun AG, Melsungen, DE) wurde direkt nach dem Austritt aus dem Plastikanteil der Kanüle abgebrochen und das Ende an der Bruchstelle zum Schliff hin auf Offenheit überprüft. Die abgebrochene Spitze wurde auf ein 20 cm langes Stück eines kleinlumigen Polyethenschlauches (Portex, Fine Bore Polythene Tubing 0,28 mm Innendurchmesser, 0,61 mm Außendurchmesser; Smiths Medical International Ltd., Kent, UK) aufgesteckt. Auf das andere Ende des Schlauches wurde eine 30 G Einmalkanüle unverändert aufgebracht. Das Kathetersystem und die verwendete Spritze wurden mit reinem FCS vorinkubiert und dann dreimal mit serumfreiem Medium gespült. Es wurde eine auf Eis vorgekühlte Glasspritze verwendet (Fortuna, Optima, Windaus-Labortechnik GMBH & CO. KG, Clausthal-Zellerfeld, DE). Zur Injektion am wachen Tier wurde die Maus im Mäuseschlitz am Schwanz fixiert, eine Schwanzvene punktiert und  $1 \times 10^6$  Zellen in 200  $\mu$ l über 2 bis 3 Minuten langsam injiziert.

### **3.3.4.3 Intraperitoneale Injektion**

Zur intraperitonealen Injektion wurden die MSZ wie bereits erläutert markiert, gezählt zur Injektion vorbereitet. Zur Injektion wurden 30 G Einmalkanülen und die im Kapitel 3.3.4.2 beschriebene Glasspritze verwendet. Es wurden  $4 \times 10^6$  MSZ durch Punktion des linken Unterbauches in die Peritonealhöhle eingebracht.

### **3.3.5 Magnetresonanztomographische Untersuchung der Mäuse in vivo**

Die MRT-Untersuchungen erfolgten an einem klinischen 3,0-Tesla-Gerät in der MRT-Abteilung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie. Für die Untersuchungen der Mäuse wurde eine Kleintier-Empfang-Ganzkörperspule mit acht zirkulär angeordneten Empfangseinheiten, einer Länge von 12 cm und einem Innendurchmesser von 2,5 cm verwendet (Philips Research Laboratories, Hamburg, DE). Für die Untersuchungen der Mäuse nach intrakardialer Injektion wurde die in Kapitel 3.1.6 beschriebene Spule verwendet. Die verwendeten MRT-Sequenzen wurden bereits in den Kapiteln 3.1.6 und 3.2.4 beschrieben.

### **3.3.6 Histologische Präparation und Auswertung**

Die Gewebe wurden wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben gewonnen und fixiert. Von den Organen der Versuchstiere zur Untersuchung des Migrationsverhaltens der MSZ wurden je zehn Schnitte, welche jeweils 200 µm Abstand zueinander hatten, erstellt. Diese wurden auf Histo Bond® Objektträger aufgebracht, mit 100 %, -21 °C kaltem Methanol für zwei Minuten fixiert und bei 4 °C luftgetrocknet. Auf die Schnitte wurde ein kleiner Tropfen PBS und ein Tropfen DAPI Mounting Medium zur Gegenfärbung der Zellkerne (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) gegeben. Zur Auswertung von Nieren, Milzen, Lungen und Lebern wurden jeweils drei Blickfelder in je 10 Schnitten ausgezählt. Es wurden sowohl einzelne Partikel als auch einzelne Zellen gezählt. Nach intrakardialer Applikation der Zellen erfolgte die histologische Aufarbeitung der Gehirne und die Suche nach den im MRT detektierten und als potenziell einzeln einzustufenden MSZ in den Regionen der Organe, in denen die Zellen detektiert wurden. Kontrollschnitte aus unauffälligen Bereichen wurden ebenfalls mikroskopiert.

## **3.4 Untersuchung des Migrationsverhaltens multipotenter mesenchymaler Stromazellen in einem Tumormodell in E-/P-Selektin-defizienten Mäuse und Wildtyp-Mäusen**

### **3.4.1 Humane Adenokarzinom-Zelllinie HT29**

Die Humane Adenokarzinom-Zelllinie HT29 wurde von der Europäischen Zell Kultur Kollektion (Porton Down, Wiltshire, UK) käuflich erworben.

Zur Gewährleistung von Standardisierung und Reproduzierbarkeit der Experimente wurden vor Versuchsbeginn bei Passage 12 Aliquots gewonnen und diese kryokonserviert. Die Kryokonservierung, und Revitalisierung erfolgte wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben. Es erfolgte eine Mykoplasmentestung wie im Kapitel 3.1.2 beschrieben.

Zur Kultivierung der HT29 wurde GIBCO® RPMI-Medium 1640 1x (+) L-Glutamine (invitrogen™ corporation / Carlsbad, CA, U.S.) verwendet, dem 10 % fetales Kälberserum (50 ml, GIBCO® FCS, invitrogen™ corporation / Carlsbad, CA, USA), sowie Penicillin und Streptomycin (5 ml, 10.000 U/ml Penicillin G-Natrium + 10.000 µg/ml Streptomycin-Sulfat in 0,85 % NaCl, GIBCO™, invitrogen corporation / Carlsbad, CA, USA) beigemischt war. An

drei Tagen in der Woche wurde der Kultur frisches Medium zugegeben. Bei 100 % Konfluenz wurden die Zellen wie oben beschrieben in Suspension gebracht und 1ml Zellsuspension in eine neue T75-Kulturflasche überführt. Diese wurde auf 10 ml Nährmedium aufgefüllt. Zur subkutanen Implantation an Mäusen wurden die Zellen in Suspension gebracht, wie beschrieben pelettiert und in serumfreien Medium resuspendiert. Es wurde eine Zellzahl von  $1 \times 10^6 / 200 \mu\text{l}$  eingestellt. Die Zellen wurden so in einem Volumen von 200  $\mu\text{l}$  subkutan in die rechte Flanke zwischen dem Hautmuskel des rechten Rumpfes und dem oberflächlichen Glutealmuskel der Tiere eingebracht (Takamasa Iwaki, 2001). Zur Injektion wurden sterile Einmalspritzen (Omnifix Insulinspritzen 1 ml, Braun AG, Melsungen, DE) und 26 G Injektionsnadeln (Sterican Einmalkanülen, Braun AG, Melsungen, DE) verwendet.

### **3.4.2 Magnetresonanztomographische Untersuchung der Mäuse in vivo**

Je drei der in Kapitel 3.3.1 vorgestellten Doppel-KO-Mäusen und drei der WT-Kontrolltiere bekamen wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben HT29-Zellen injiziert. Die Tumore wurden 22 Tage wachsen gelassen. Alle methodischen Arbeiten an den Versuchstieren geschahen in Übereinstimmung mit den „UKCCR guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia“ (Workman et al., 1988).

### **3.4.3 Histologische Präparation und Auswertung**

Die Gewebe wurden gemäß Kapitel 3.2.5 gewonnen und fixiert. Von den Tumoren wurden wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben jeweils 10 Serien im Abstand von einem Millimeter von je 4,7  $\mu\text{m}$  dicken Präparaten hergestellt und wie in Kapitel 3.2.5 dargelegt am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axioplan 2, Jena, DE) untersucht.

## **3.5 Statistik**

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS PASW Statistics 18 (SPSS Inc., an IBM Company, Chicago, IL, USA). Es wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  angenommen. Die Testung erfolgte mit dem Friedman Test. Der Test dient der Untersuchung von drei oder mehr gepaarten Stichproben auf Gleichheit des Lageparameters, wobei die Werte innerhalb der Gruppen voneinander unabhängig sind. Er setzt keine Normalverteilung der Stichproben voraus, und zählt somit zu den nicht-parametrischen Tests. Die Analyse beruht auf einer Sortierung der Werte in jedem gepaarten Satz von Daten vom kleinsten zum größten Wert,

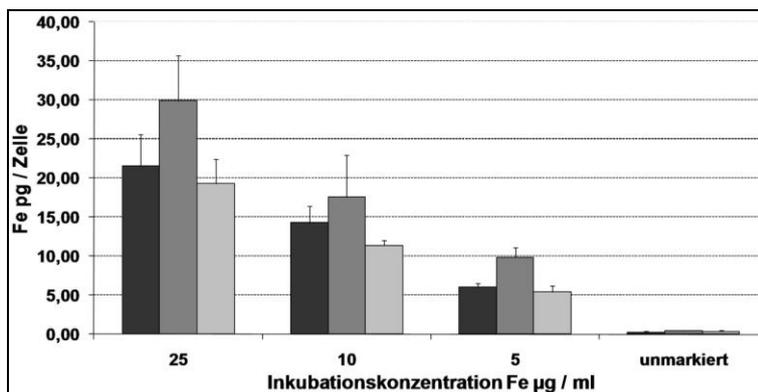
wobei jeder Wertesatz separat sortiert wird. Anschließend werden die Ränge in jeder Stichprobe addiert. Der p-Wert als Maß für die statistische Signifikanz ist dabei umso geringer, je größer die Unterschiede zwischen den Rangsummen der einzelnen Stichproben sind. Unter der Voraussetzung, dass die untersuchten Stichproben eine vergleichbare Häufigkeitsverteilung aufweisen, ist die Nullhypothese des Tests die Annahme, dass zwischen den Stichproben kein Unterschied in der Lage besteht. Ein p-Wert kleiner 0,05 wird deshalb im Allgemeinen so interpretiert, dass sich der Medianwert mindestens einer der untersuchten Stichproben signifikant von dem der anderen Stichproben unterscheidet (Friedman, 1937; Sheskin, 2007). Für die statistische Auswertung der SNR-Messungen aus Tabelle 4 wurde der Wilcoxon Test verwendet. Dieser vergleicht nur zwei nicht parametrische, gepaarte Stichproben miteinander (Sheskin, 2007; Wilcoxon, 1945).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Markierung multipotenter mesenchymaler Stromazellen zur Detektion einzelner Zellen mit der Magnetresonanztomographie und Fluoreszenzmikroskopie

#### 4.1.1 Bestimmung des zellulären Eisengehalts mittels Atomabsorptionsspektrometrie

Bei einer maximalen Inkubationskonzentration von 25 µg/ml Eisen (Fe) in 10 ml Kulturmedium konnte der mittlere zelluläre Eisengehalt mit  $23,6 \pm 4,3$  pg bestimmt werden. Eine Inkubationskonzentration von 10 µg Fe/ml führte zu  $14,5 \pm 2,5$  pg, und eine Inkubationskonzentration von 5 µg Fe/ml führte zu  $6,5 \pm 3,5$  pg. Unmarkierte Zellen hingegen hatten nur einen Eisengehalt von  $0,38 \pm 0,1$  pg. (Abbildung 4). Wie in Kapitel 4.1.2 gezeigt, ist dieser zelluläre Eisengehalt nach unspezifischer Phagozytose der Partikel für eine Detektion der Zellen mit der Magnetresonanztomographie ausreichend (Abbildung 5). Die ermittelten Daten liegen im selben Bereich von bereits publizierten Daten (Ittrich et al., 2005).



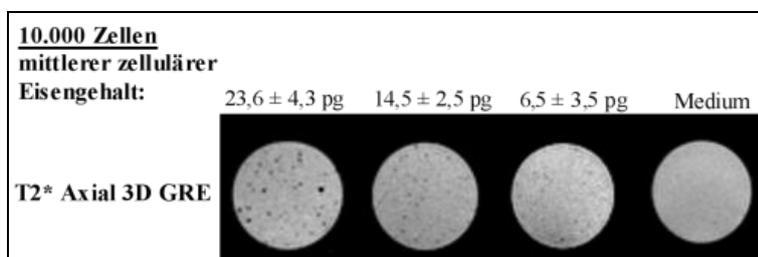
**Abb. 4:** Zellulärer Eisengehalt vor und nach Markierung. Es zeigt sich eine direkte Abhängigkeit des mittleren zellulären Eisengehalts (pg / Zelle) von der eingesetzten Inkubationskonzentration µg / ml), wobei höhere Inkubationskonzentrationen auch zu einem höheren mittleren zellulären Eisengehalt führen.

- Ansatz 1: Suspensionen von  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  MSZ, jeweils 3 Werte ermittelt
- Ansatz 2: Suspensionen von  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  MSZ, jeweils 3 Werte ermittelt
- Ansatz 3: Suspensionen von  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  MSZ, jeweils 3 Werte ermittelt

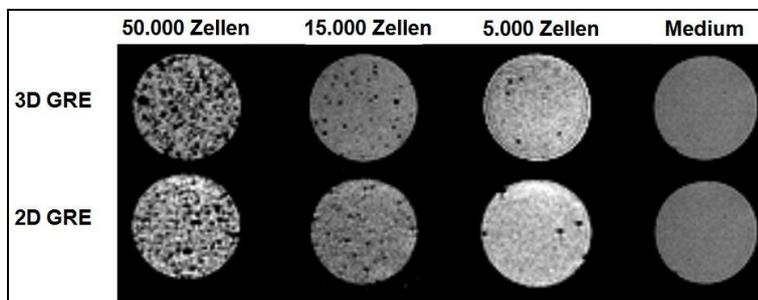
#### 4.1.2 Magnetresonanztomographische Untersuchungen in vitro

Im Rahmen der magnetresonanztomographischen Untersuchungen der Gelphantome wurden die in Kapitel 3.1.6 vorgestellten Sequenzen verwendet. Die beschriebene 3D Sequenz ist eine hochauflösende und sehr sensitive Sequenz für Suszeptibilitätsartefakte, in der sich die markierten Zellen als scharf begrenzte Signalauslöschungen darstellen. Da sie aber sehr anfällig gegenüber Bewegungsartefakten ist, wurde zur Untersuchung des

Abdomens der Mäuse eine 2D Sequenz verwendet. Diese zeigt scheinbar eine geringere Sensitivität und etwas unschärfer begrenzte Auslöschungsartefakte. Insgesamt können mit beiden Sequenzen die doppelt markierten Zellen in den Gelphantomen mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden (Abbildung 6). Es zeigte sich, dass bei einem mittleren zellulären Eisengehalt von  $23,6 \pm 4,3$  pg die höchste Sensitivität in der Detektion der Zellen gegeben ist. Bei mittlerem zellulären Eisenwerten von  $14,5 \pm 2,5$  pg und  $6,5 \pm 3,5$  pg zeigten sich deutlich weniger und unschärfer begrenzte Signalminderungen (Abbildung 5). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Untersuchungen mit markierten Zellen mit einem mittleren zellulären Eisengehalt von  $23,6 \pm 4,3$  pg durchgeführt.



**Abb. 5:** MSZ in Zellphantomen mit verschiedenen mittleren zellulären Eisengehalten  
Die einzelnen Zellen stellen sich als schwarze Signalminderungen dar. Es zeigt sich die beste Abgrenzbarkeit der Zellen bei einem mittleren zellulären Eisengehalt, von  $23,6 \pm 4,3$  pg. Bei  $14,5 \pm 2,5$  pg und  $6,5 \pm 3,5$  pg zeigen sich weniger und geringere Signalminderungen.

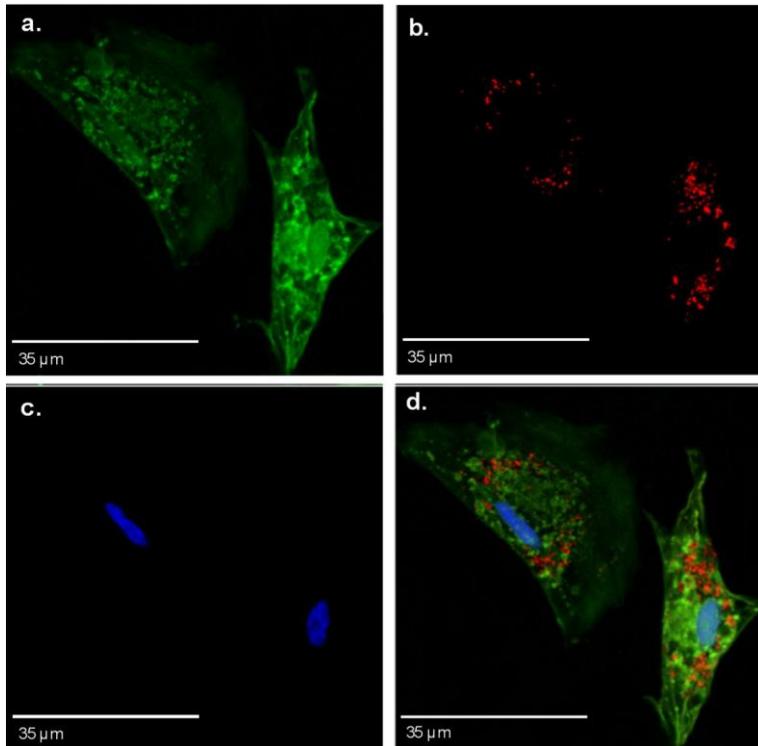


**Abb. 6:** MSZ in Zellphantomen bei einem mittleren zellulären Eisengehalt von  $23,6 \pm 4,3$  pg; Vergleich der 3D GRE und 2D GRE Sequenz  
Die einzelnen Zellen stellen sich bei einem mittleren zellulären Eisengehalt von  $23,6 \pm 4,3$  pg als schwarze Signalminderungen dar. Die 3D Sequenz liefert eine schärfere Abgrenzbarkeit der Zellen als die 2D Sequenz. Beide weisen eine hohe Sensitivität auf.

#### 4.1.3 Mehrkanalfluoreszenzmikroskopie

In der Mehrkanal-Konfokal-Fluoreszenzmikroskopie konnten die intrazellulären, perinukleär akkumulierenden Eisenpartikel aufgrund ihrer roten Fluoreszenz deutlich nachgewiesen werden (Abbildung 7). Hierbei wurde sichtbar, dass sich die Partikel in Phagosomen, von Zellmembran umgeben, befinden und nicht an der Zelloberfläche haften. Die CFSE-Färbung stellt sich als geeignete, grüne Membranfärbung dar. Die fluoreszierende

Doppelfärbung der Zellen dient der späteren Detektion und Identifizierung der Zellen im Gewebe. Zur besseren Übersicht ist der Zellkern mit blau dargestelltem DRAQ5™ gegengefärbt.



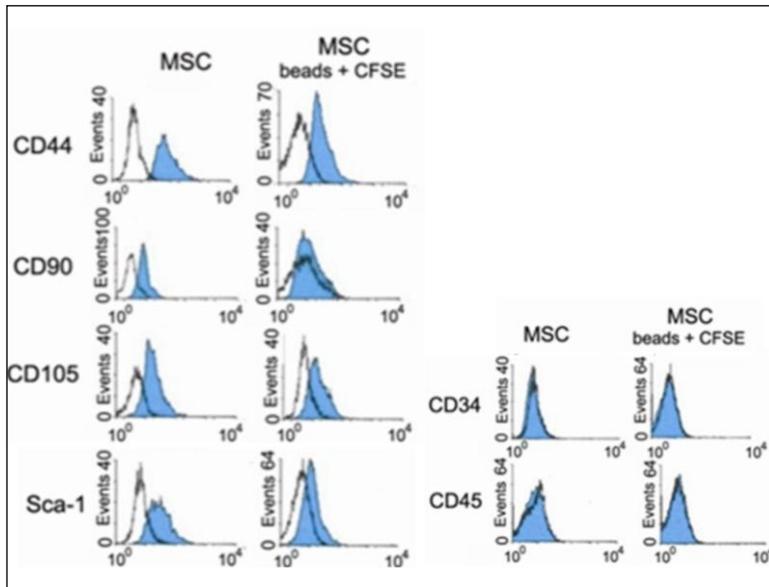
**Abb. 7:** Mehrkanal Konfokalmikroskopie der markierten MSZ

Scaling:  $0,2 \times 0,2 \mu\text{m}$  / Stack  $103,41 \mu\text{m}$ ; Objektiv:  $63\times / 1,4$  Scan Zoom Ölimmersion. **a)** Es zeigen sich grün fluoreszierende intrazelluläre Proteine, gefärbt mit CFSE; Excitation:  $488 \text{ nm}$  / Emissionsfilter:  $505\text{-}530 \text{ nm}$  **b)** Es zeigen sich die intrazellulär gelegenen, Suncoast Yellow markierten Partikel rot fluoreszierend; Excitation:  $543 \text{ nm}$  / Emissionsfilter:  $560\text{-}615 \text{ nm}$  **c)** Die Zellkerne sind mit DRAQ5 gefärbt und kommen blau zur Darstellung; Excitation:  $633 \text{ nm}$  / Emissionsfilter:  $670\text{-}798 \text{ nm}$ . **d)** Das Fusionsbild aus (a+b+c) zeigt die grüne Plasmamembran, die die intrazellulären, perinukleär angeordneten roten Partikel umschließt.

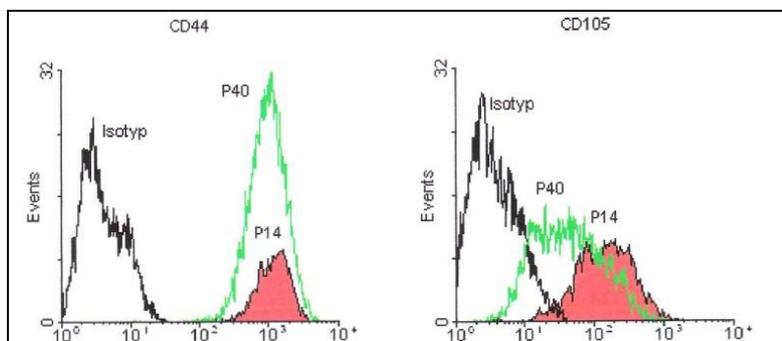
#### 4.1.4 Nachweis charakteristischer Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie

Im Zuge der Untersuchung der Expression der charakteristischen Oberflächenmarker vor und nach Markierung konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden. CD105, CD44, Sca-1 und CD90 konnten vor und nach Doppelmarkierung wie erwartet detektiert werden, die Unterschiede entlang der x-Achse (Fluoreszenzaktivität) im Vergleich zur jeweiligen Isokontrolle (weiße Kurven) blieben nahezu unverändert (Abbildung 8). CD45 und CD34, als typische Marker hämatopoetischer Zellen ließen sich weder vor noch nach Doppelmarkierung auf der Oberfläche der MSZ darstellen, die Fluoreszenzaktivität von Probe und Isokontrolle ist nahezu deckungsgleich. (Abbildung 8). Die Oberflächenmarker der Zellen entsprechen den in der Literatur beschriebenen Anforderungen für MSZ. Die Doppelmarkierung nimmt hierauf keinen Einfluss. Die Untersuchung der Expression von

CD105 und CD44 zum Zeitpunkt von Passage 14 und 40 legt keine Veränderungen der Expression von CD44, und nur eine geringfügige Verminderung von CD105 bei Passage 40 dar (Abbildung 9).



**Abb. 8:** Expression charakteristischer Oberflächenmarker mesenchymaler Stromazellen MSZ wurden vor Markierung und nach Markierung auf ihre Expression von CD44, CD90, CD105, Sca-1, CD 34 und CD45 getestet. Es sind keine signifikanten Unterschiede in der Expression von CD44, CD90, CD105 und Sca-1 vor und nach Markierung zu erkennen. Die Zellen zeigten vor und nach Markierung keine Expression von CD34 und CD45.

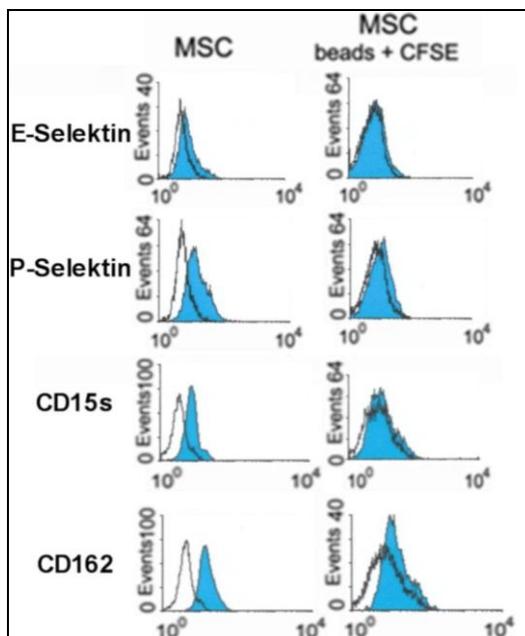


**Abb. 9:** Expression charakteristischer Oberflächenmarker verschiedener Passagen mesenchymaler Stromazellen MSZ wurden bei Passage 40 (grün) und Passage 14 (rot) auf ihre CD 44 und CD105 Expression getestet (Isotyp weiß). Mit zunehmender Passagierung zeigt sich keine signifikante Änderung in der Expression von CD44 und CD105.

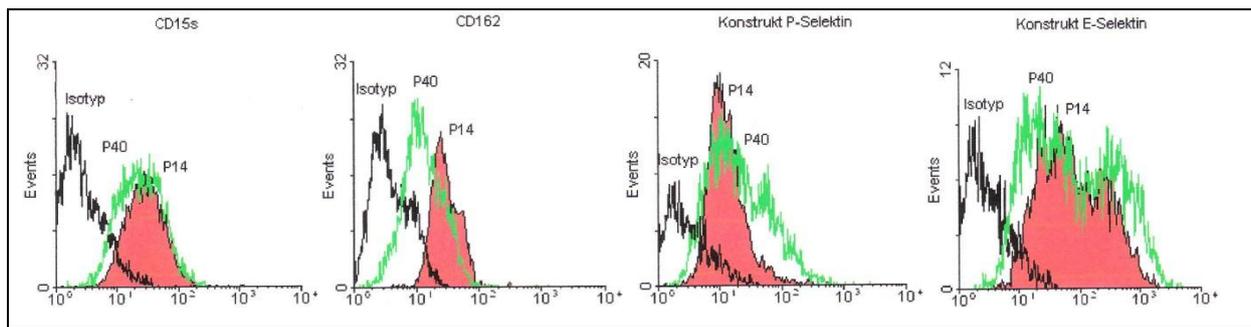
#### 4.1.5 Nachweis von E-/P-Selektin-Bindungsstellen mittels Durchflusszytometrie und Immunhistochemie

Die Expression der Hauptbindungsstelle des E- und des P-Selektins CD15s und CD162, sowie die generelle Fähigkeit der MSZ über diese und weitere Bindungsstellen mit E- und P-Selektin zu interagieren zeigte sich sowohl vor als auch nach Doppelmarkierung. Es scheint, als hätte der Fluoreszenzshift entlang der x-Achse nach Doppelmarkierung

abgenommen. Dies ist jedoch am ehesten auf den starken Crosstalk durch die Fluoreszenz der Partikel und die dadurch schwierige Kompensation hervorgerufen (Abbildung 10). In der Untersuchung der Expression von CD15s, CD162 und der generellen E- und P-Selektin-Bindungsfähigkeit zeigt sich für CD15s kein Unterschied bei Passage 14 und 40 (Abbildung 11), für CD162 allerdings eine geringfügige Verminderung bei Passage 40 (Abbildung 11). Hinsichtlich der E- und P-Selektin-Bindungsfähigkeit (Abbildung 11) scheinen sich bei Passage 40 zwei Populationen mit unterschiedlich starker Expression zu demarkieren. Der Beginn dieser Entwicklung scheint sich beim E-Selektin bereits früh zu manifestieren (Abbildung 11).

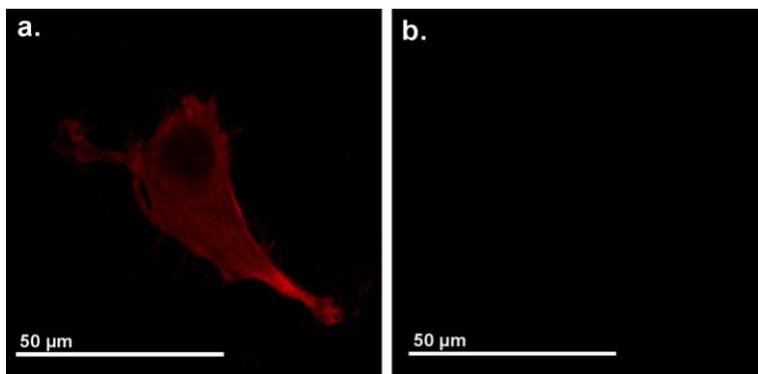


**Abb. 10:** Expression der E- und P-Selektinbindungsstellen mesenchymaler Stromazellen  
 MSZ wurden vor Markierung und nach Markierung auf ihre E-Selektinbindungsfähigkeit, P-Selektinbindungsfähigkeit, Expression von CD15s und CD162 getestet. Die markierte Probe kommt blau zur Darstellung, die Isotypkontrolle weiß. Die Expression der Bindungsstellen bleibt auch nach Doppelmarkierung erhalten.



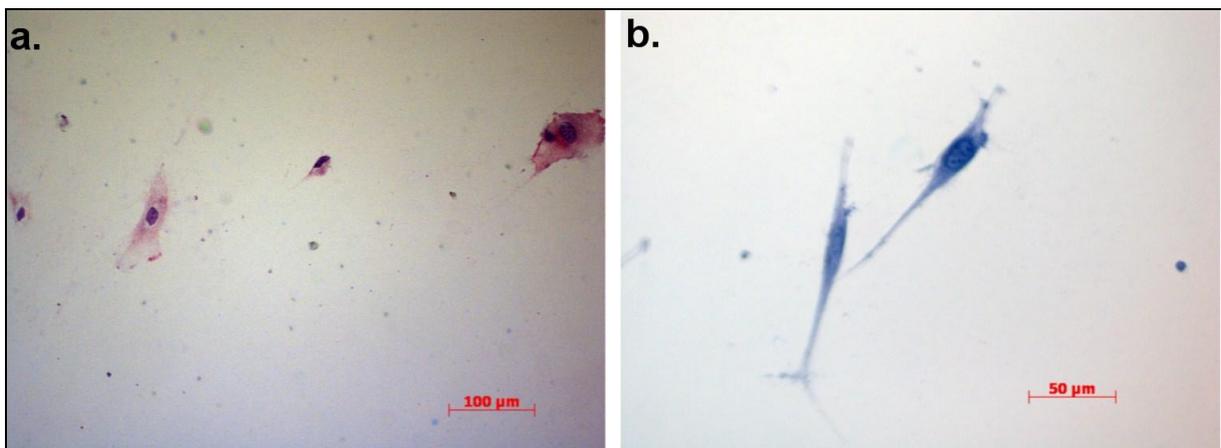
**Abb. 11:** Expression der E- und P-Selektinbindungsstellen verschiedener Passagen mesenchymaler Stromazellen MSZ wurden bei Passage 40 (grün) und Passage 14 (rot) auf ihre CD15s, CD162 Expression, sowie auf ihre generelle Fähigkeit E-/P-Selektin zu binden getestet; (Isotyp weiß). Mit zunehmender Passage scheinen sich zwei verschiedene Populationen der Stammzellen hinsichtlich ihrer Selektinbindungsfähigkeit auszubilden, wohingegen die Expression der Selektinhauptbindungsstellen nahezu unverändert bleibt.

In der Fluoreszenz-Immunhistochemie auf CD162 zeigte sich ein gleichmäßig über die gesamte Zellmembran verteiltes Signal. Bei der verwendeten Isotypkontrolle konnte bei gleichen Abtastungsparametern keinerlei Signal detektiert werden. Zusätzlich zu den FACS-Analysen, die eindeutig das Vorhandensein des CD162 auf den MSZ zeigt, gibt diese Untersuchung auch Information über die Verteilung des Antigens auf der Oberfläche der Zellen (Abbildung 12).



**Abb. 12:** Konfokal-Fluoreszenz-Immunhistochemie zum Nachweis von CD162  
Scaling:  $0,09 \times 0,09 \mu\text{m}$  / Stack 89,  $69 \mu\text{m}$ ; Objektiv:  $63\times/1,4$  Scan Zoom Ölimmersion **a)** Färbung mit Anti CD162 Antikörper; Ex.:  $488 / 543 \text{ nm}$  / Em.:  $560 \text{ nm}$  **b)** Isotypkontrolle; Ex.:  $488 / 543 \text{ nm}$  / Em.:  $560 \text{ nm}$ . Es zeigt sich der spezifische Nachweis von CD162. Das Antigen ist an Stellen hoher Membrandichte stärker exprimiert.

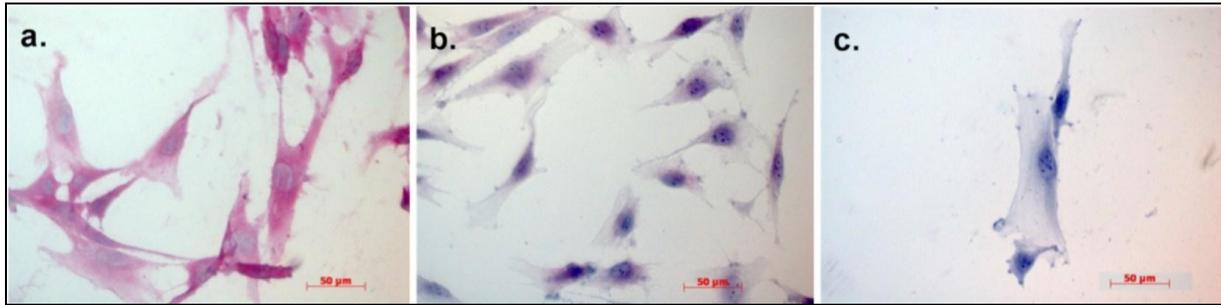
Die Immunhistochemie der MSZ auf Chamberslides gestaltete sich schwierig, da die Zellen eine ungenügende Adhärenz auf allen im Labor standardmäßig verwendeten Chamberslides zeigten und sich über den Färbeprozess hinweg restlos ablösten. Die Verwendung verschiedener Fixationvorgänge brachte keine Lösung des Problems. Allein unter der Verwendung von Paramox-Slides überstand ein Teil der Zellen den Färbeprozess. Mehr Waschschrte als unbedingt nötig verbatn sich daher. Trotzdem gelang es zusätzlich zu den FACS-Ergebnissen CD15s als homogen über die Zellen verteiltes Antigen nachzuweisen. Die Isotypenkontrolle zeigt ein negatives Ergebnis (Abbildung 13).



**Abb. 13:** Immunhistochemischer Nachweis von CD 15s auf MSZ

**a)** Positive Anti CD 15s Antikörperfärbung; rote Alkalische Phosphatasereaktion, die Zellkerne sind mit Hämatoxylin gegengefärbt. **b)** Negative Färbung der Isotypenkontrolle; blaue Hämalaunfärbung, die Zellkerne sind mit saurem Hämatoxylin gegengefärbt.

Bei der Durchführung der Färbungen der MSZ auf Chamberslides hinsichtlich ihrer E- und P-Selektin-Bindungsfähigkeit zeigte sich dasselbe Problem wie oben beschrieben. Trotzdem konnten sowohl die E-Selektin-Bindungsfähigkeit (Abbildung 14a) als auch die P-Selektin-Bindungsfähigkeit (Abbildung 14b) mit dieser Methode nachgewiesen werden. Die Isotypenkontrolle (Abbildung 14c) zeigte keine Bindung des Kontrollantikörpers. Mit dieser Methode zeigte sich für das E-Selektin eine deutlich ausgeprägtere Bindungsfähigkeit als für das P-Selektin.

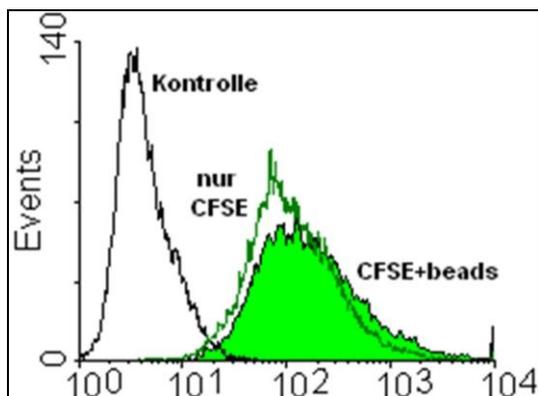


**Abb. 14:** Immunhistochemischer Nachweis der E- und P-Selektin-Bindungsstellen der MSZ

**a)** Positive FC-Chimera-E-Selektinfärbung; rote Alkalische Phosphatasereaktion, Zellkernfärbung mit saurem Hämatoxylin **b)** Positive FC-Chimera-P-Selektinfärbung; rote Alkalische Phosphatasereaktion, Zellkernfärbung mit saurem Hämatoxylin **c)** Die Isotypkontrolle zeigt keine Bindung des Kontrollantikörpers; Zellkernfärbung mit saurem Hämatoxylin.

#### 4.1.6 Proliferationstest mittels Durchflusszytometrie

Im Proliferationstest zeigen die Zellen mit CFSE und Partikeln sowie die Zellen mit CFSE gleiche Ergebnisse. Beide Gruppen hatten also eine vergleichbare Proliferation innerhalb der beobachteten sieben Tage (Abbildung 15).

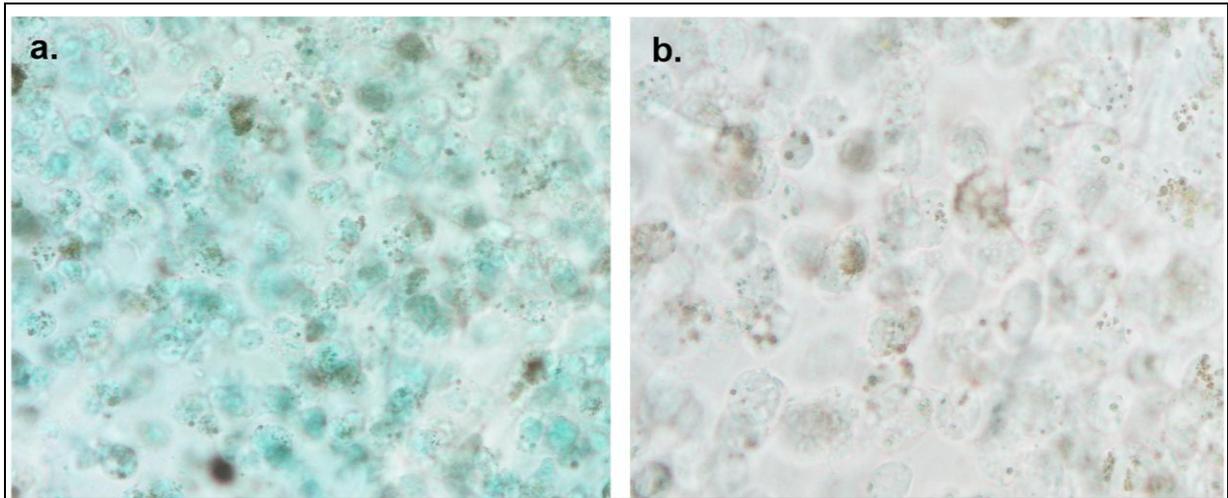


**Abb. 15:** Proliferationstest

MSZ mit Partikeln und CFSE markiert sind grün gefüllt dargestellt. Sie zeigen keinen signifikanten Shift gegenüber den nur mit CFSE markierten MSZ (grün umrandet). Die unmarkierte Kontrollgruppe ist schwarz umrandet dargestellt.

#### 4.1.7 Chondrogene Differenzierung

Die mit CFSE und Eisenpartikeln doppeltmarkierten Zellen zeigen nach Induktion zur chondrogenen Differenzierung eine positive Alcianblau Färbung auf sulfatierte Glycosaminoglycane. Die mitgeführte nichtinduzierte Kontrolle hingegen zeigte keine Anfärbung mit Alcianblau (Abbildung 16). Es kann davon ausgegangen werden, dass die etablierte Doppelmarkierung keinen Einfluss auf die Differenzierungskapazität der MSZ hat.



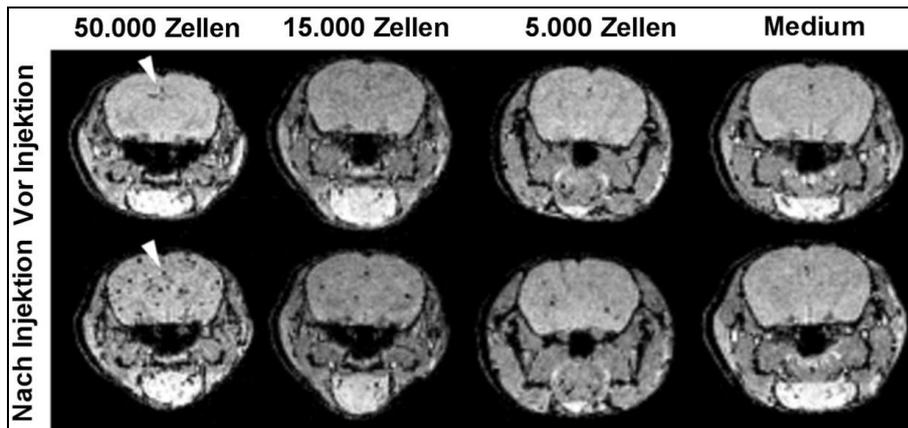
**Abb. 16:** Chondrogene Differenzierung in  $200 \times$  Vergrößerung

**a)** Induzierte, doppelmarkierte MSZ zeigen eine positive Alcianblau Färbung auf sulfatierte Glycosaminoglycane; Nachweis chondrogener Differenzierung der Zellen. **b)** Nicht induzierte doppel markierte MSZ zeigen eine wesentlich schwächere Alcianblau Färbung auf sulfatierte Glycosaminoglycane.

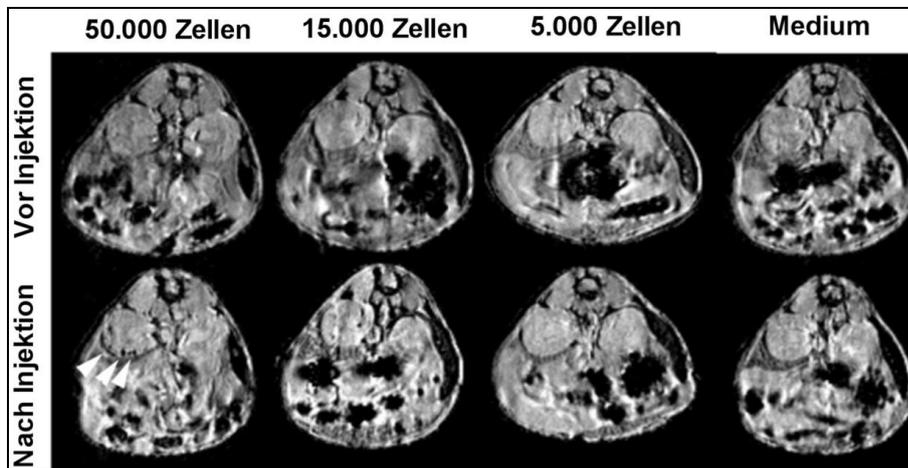
## 4.2 Nachweis einzelner multipotenter mesenchymaler Stromazellen in Mäusen mittels Magnetresonanztomographie und Fluoreszenzmikroskopie

### 4.2.1 Magnetresonanztomographische Untersuchung der Mäuse in vivo

Die Untersuchungen im MRT unter Ketamin/Rompun-Narkose wurden von den Versuchstieren gut toleriert. Die MRT-Untersuchungen der Gehirne mit der hochauflösenden T2\* gewichteten 3D GRE Sequenz zeigt über das gesamte Hirn verteilt multiple scharf abgrenzbare Signalauslöschungen, ähnlich den in den Gelphantomen detektierten (Abbildung 17). Die höchste Zelldichte konnte im Mediastromgebiet gefunden werden. Nach Injektion von Medium blieben derartige Signalauslöschungen aus (Abbildung 17). Die hochauflösende T2\* gewichtete 2D GRE Sequenz zur Untersuchung des Abdomens zeigte lediglich nach Injektion von 50.000 Zellen einige eher unscharf abgrenzbare Signalauslöschungen. Die etwas verwaschene Darstellung der intestinalen Organe ist auf die flache Atembewegung zurückzuführen (Abbildung 18).

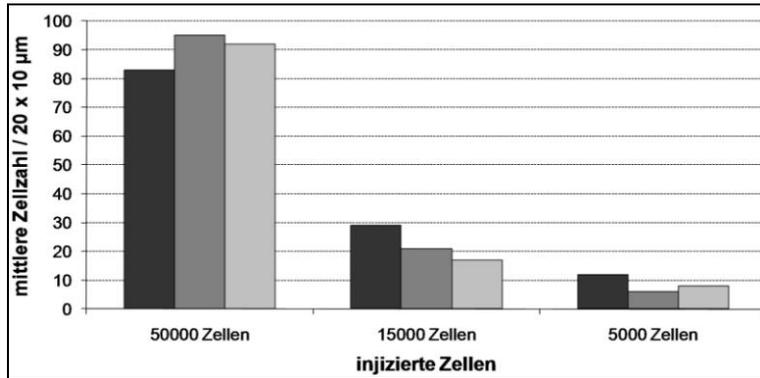


**Abb. 17:** MRT der Gehirne vor und nach Injektion von 50.000, 15.000, 5000 Zellen oder Medium ohne Zellen. In den Gehirnkapillaren gefangene MSZ zeigen sich als Auslöschungsartefakte. Schwarze Auslöschung vor Injektion entspricht dem sinus sagittalis Superior (▷).



**Abb. 18:** MRT des Abdomen vor und nach Zellinjektion. Lediglich nach Injektion von 50.000 markierten MSZ konnten punktförmige Auslöschungsartefakte im Nierenkortex detektiert werden (▷).

Die Untersuchung der Signalintensitäten (SNR) von Gehirn, Leber, Milz und beiden Nieren vor und nach Injektion der Zellen zeigte eine signifikante Differenz des durchschnittlichen SNR im Gehirn nach Injektion von 50.000 Zellen. In allen anderen Organen und bei allen anderen Zellzahlen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 6). Die quantitative Auswertung der Signalauslöschungen in den axialen Schichten der Gehirne ergab nach Injektion von 50.000 Zellen einen Wert von durchschnittlich  $25,0 \pm 1,0$  Signalauslöschungen pro Schicht,  $9,0 \pm 3,6$  nach Injektion von 15.000 Zellen und  $4,6 \pm 1,2$  nach Injektion von 5.000 Zellen. Die detektierten Zellzahlen stehen somit nahezu im selben Verhältnis zueinander wie die injizierten Zellzahlen. Die statistische Korrelation der im MRT detektierten Signalauslöschungen mit den in der Histologie gefundenen Einzelzellen in äquivalenten Schichten ergibt eine lineare Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,91$  (Abbildung 19).



**Abb. 19:** Quantitative Auszählung einzelner MSZ im Gehirn nach intrakardialer Injektion von 50.00, 15.000 und 5000 markierten MSZ korreliert mit der histologischen Auszählung. Ein Balken beschreibt jeweils den Durchschnittswert ( $n = 3$ ) der Zählung von je  $3 \times 20, 10 \mu\text{m}$  dicken, Serienschnitten aus einer Maus nach Injektion von 50.000, 15.000 oder 5000 markierten MSZ.

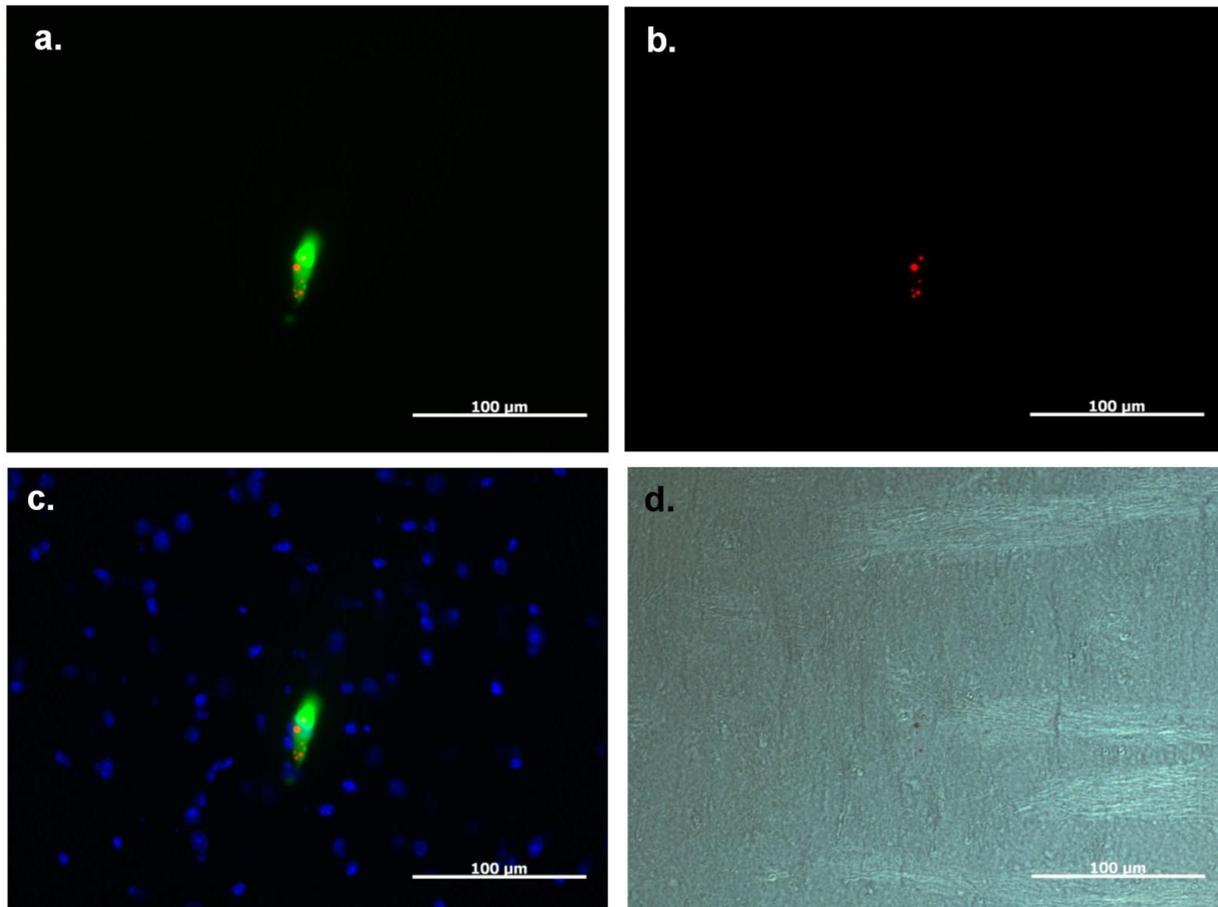
**Tabelle 4:** SNR Messungen von Hirn, Leber, Milz und der Nieren vor und nach Injektion von 50.000, 15.000 und 5.000 markierten MSZ

Zellzahl	Injektion	ZNS	Leber	Milz	Linke Niere	Rechte Niere
50.000	Nativ	$16,0 \pm 0,9$	$30,1 \pm 7,7$	$10,1 \pm 2,2$	$28,7 \pm 0,7$	$31,5 \pm 8,9$
	Nach Injektion	$12,9 \pm 1,5^*$	$24,5 \pm 0,2$	$5,9 \pm 3,4$	$29,0 \pm 3,5$	$31,4 \pm 2,7$
15.000	Nativ	$15,2 \pm 0,7$	$37,1 \pm 3,4$	$15,8 \pm 4,8$	$44,2 \pm 1,1$	$44,9 \pm 2,3$
	Nach Injektion	$14,9 \pm 0,8$	$35,0 \pm 3,5$	$13,1 \pm 1,8$	$43,0 \pm 5,8$	$42,0 \pm 5,8$
5.000	Nativ	$14,7 \pm 1,1$	$39,8 \pm 8,3$	$12,5 \pm 1,1$	$42,3 \pm 6,3$	$44,5 \pm 7,1$
	Nach Injektion	$17,9 \pm 2,2$	$42,7 \pm 5,6$	$9,7 \pm 2,0$	$48,9 \pm 7,4$	$48,2 \pm 3,7$
Medium	Nativ	$14,2 \pm 0,9$	$44,7 \pm 5,2$	$16,9 \pm 4,9$	$51,9 \pm 7,9$	$49,0 \pm 11,3$
	Nach Injektion	$14,4 \pm 1,2$	$44,2 \pm 6,9$	$15,6 \pm 5,9$	$48,3 \pm 7,2$	$47,5 \pm 8,6$

Durchschnittlicher SNR-Wert  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ). Signifikante Unterschiede bei ( $p < 0,05$ ) des SNR nativ und nach Zellinjektion, nach Wilcoxon Test, sind gezeigt durch \*. Nach intrakardialer Injektion zeigt sich lediglich nach Injektion von 50.000 Zellen ein signifikanter SNR Verlust.

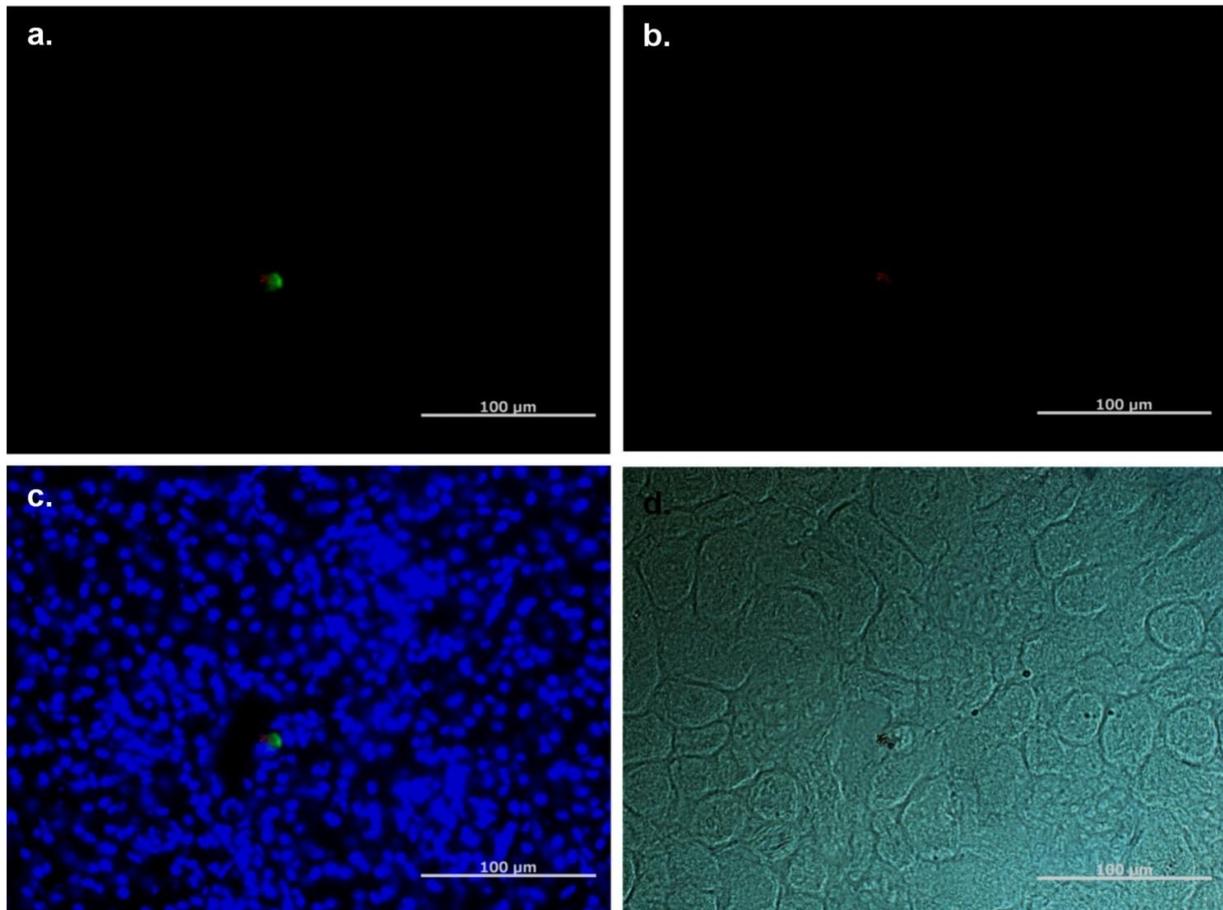
#### 4.2.2 Histologische Auswertung

Die Mikroskopie der Cryostatschnitte zeigte einzelne MSZ in Gehirn, Leber, Lunge, Milz, und Nieren. Die Zellen fanden sich teilweise in Gefäßen gefangen, aber auch bereits ins Parenchym eingewandert. Auch fanden sich freigesetzte Partikel von zerstörten MSZ in Milz und Leber (Abbildungen 20 bis 24). Intakte markierte MSZ konnten durch die Doppelmarkierung gut identifiziert werden. Durch konfokalmikroskopische Untersuchungen exemplarischer Schnitte der Gehirne konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Signalauslöschungen in den Gehirnen um Zellhaufen handelt und somit der Einzelzellnachweis im Gehirn verifiziert werden (Abbildung 25).



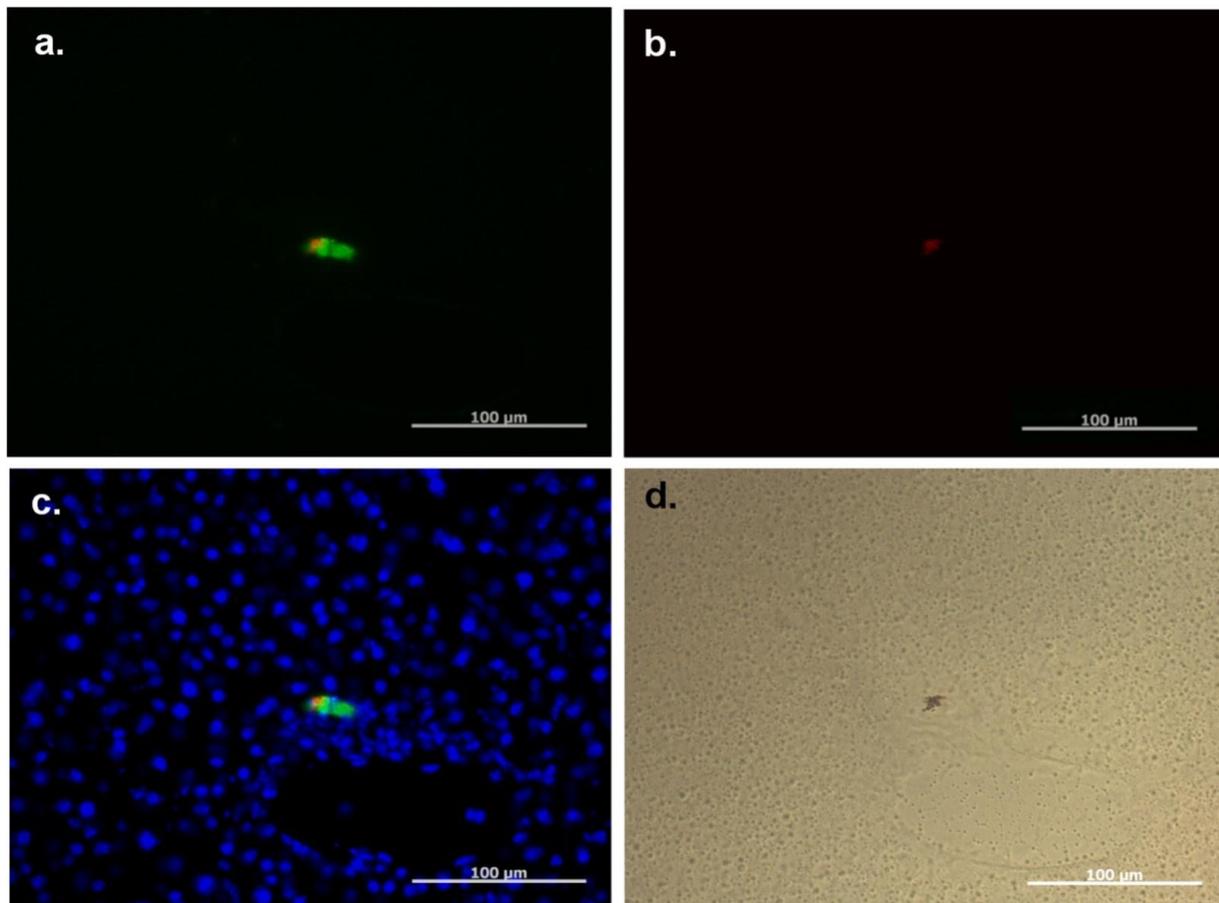
**Abb. 20:** Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie von MSZ im Gehirn

**a)** Zellproteine, gefärbt mit CFSE, kommen grün zur Darstellung, die mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel kommen intrazellulär gelegen rot zur Darstellung. **b)** Die Partikel, mit Suncoast Yellow gefärbt, kommen rot zur Darstellung. **c)** Die Zellproteine, gefärbt mit CFSE, kommen grün zur Darstellung, die mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel kommen intrazellulär rot zur Darstellung. Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt und kommen blau zur Darstellung. **d)** Der Phasenkontrast zeigt die Struktur des umgebenden Gewebes, sowie die Partikel. Es zeigt sich eine einzelne intakte Zelle, mit perinukleär angeordneten Partikeln, umschlossen von Zellmembran.



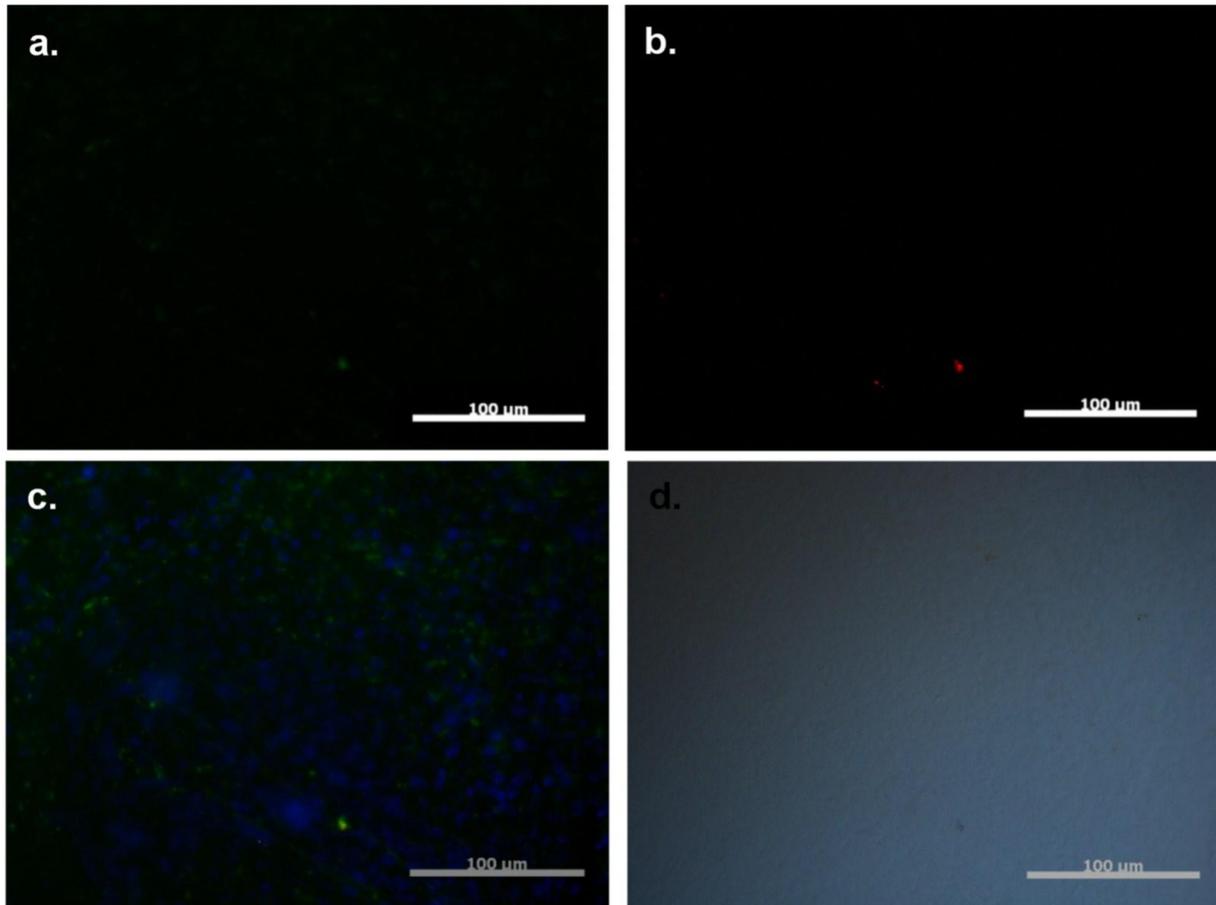
**Abb. 21:** Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie von MSZ in der Niere

**a)** Zellproteine, gefärbt mit CFSE, kommen grün zur Darstellung, die mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel kommen intrazellulär rot zur Darstellung. **b)** Die Partikel, mit Suncoast Yellow gefärbt, kommen rot zur Darstellung. **c)** Die Zellproteine, gefärbt mit CFSE, kommen grün zur Darstellung, die mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel kommen intrazellulär rot zur Darstellung. Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt und kommen blau zur Darstellung. **d)** Der Phasenkontrast zeigt die Struktur der umgebenden Glomeruli, sowie die Partikel. Es zeigt sich eine einzelne intakte Zelle, mit intrazellulär gelegenen Partikeln.



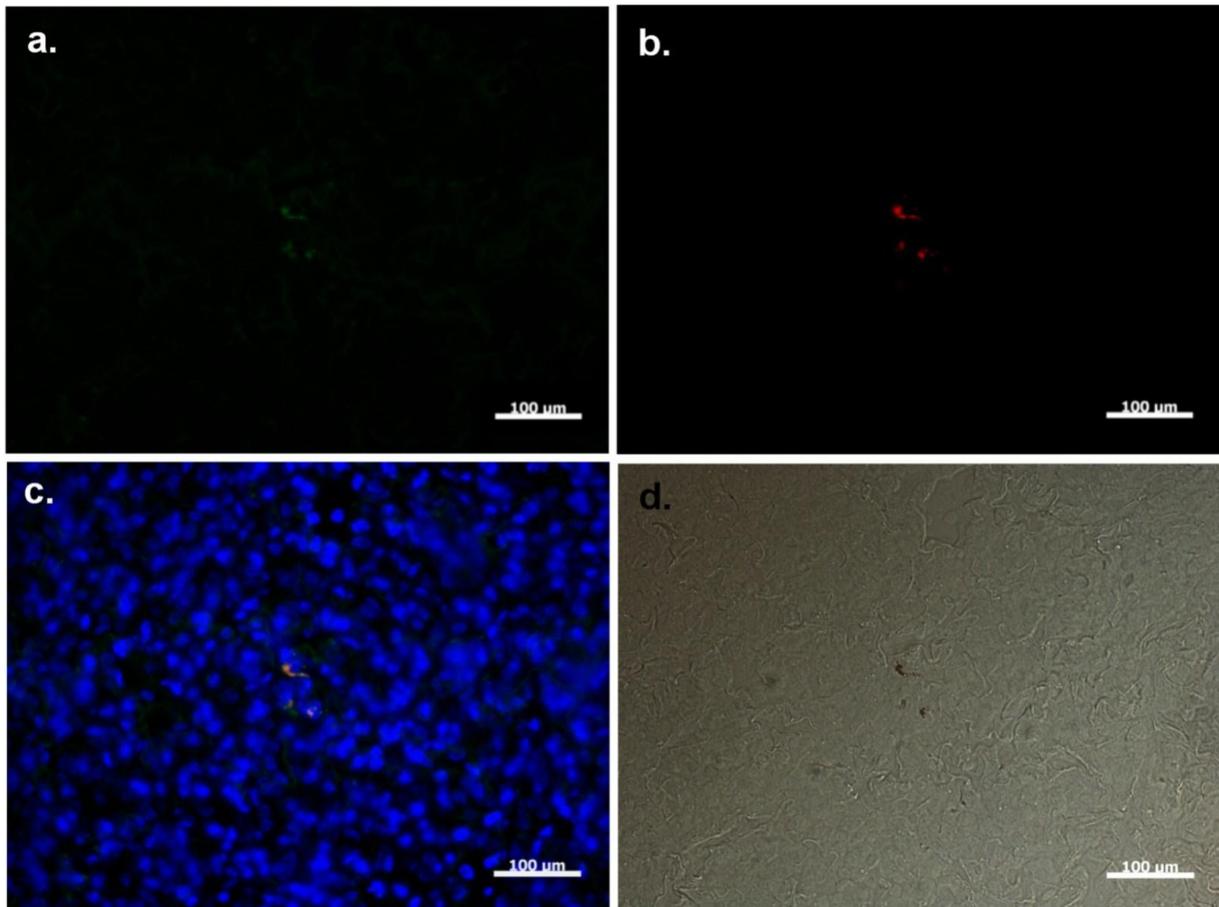
**Abb. 22:** Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie von MSZ in der Leber

**a)** Zellproteine, gefärbt mit CFSE, kommen grün zur Darstellung, die mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel kommen intrazellulär rot zur Darstellung. **b)** Die Partikel, mit Suncoast Yellow gefärbt, kommen rot zur Darstellung. **c)** Die Zellproteine, gefärbt mit CFSE, kommen grün zur Darstellung, die mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel kommen intrazellulär rot zur Darstellung. Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt und kommen blau zur Darstellung. **d)** Der Phasenkontrast zeigt die Struktur des umgebenden Lebergewebes, sowie die Partikel. Es zeigt sich eine einzelne intakte Zelle, mit perinukleär angeordneten Partikeln, umschlossen von Zellmembran.



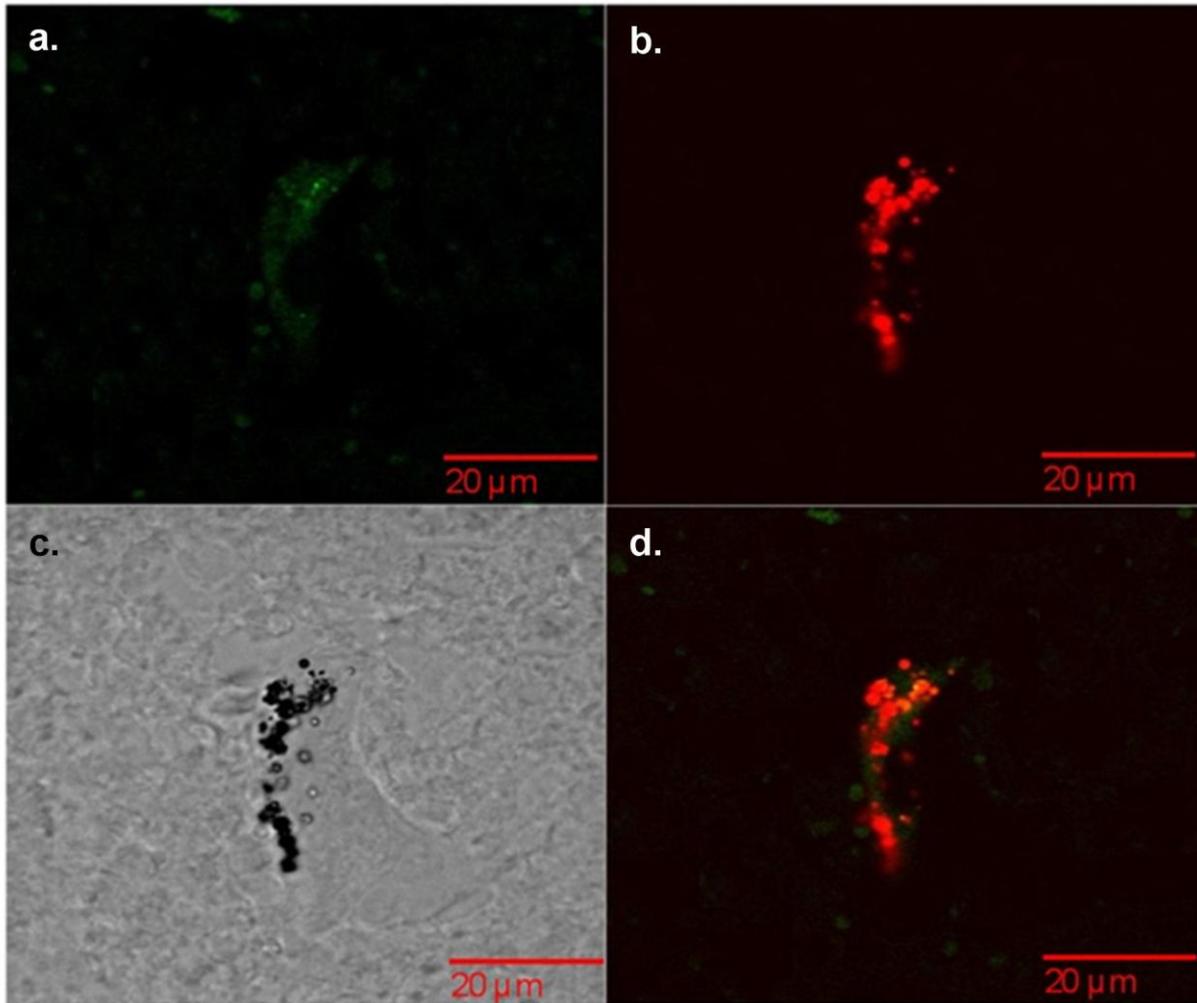
**Abb. 23:** Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie von MSZ in der Milz

**a)** Zellproteine, gefärbt mit CFSE, kommen grün zur Darstellung. **b)** Die Partikel, mit Suncoast Yellow gefärbt, kommen rot zur Darstellung. **c)** Die Zellproteine, gefärbt mit CFSE, kommen grün zur Darstellung, die mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel kommen intrazellulär und frei im Gewebe liegend rot zur Darstellung. Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt und kommen blau zur Darstellung. **d)** Der Phasenkontrast zeigt die Struktur der umgebenden Milzpulpa. Es zeigt sich eine einzelne intakte Zelle mit intrazellulär gelegenen Partikeln. Hier finden sich auch freie Partikel als rote Signale in **b)**, ohne Äquivalent in **c)**.



**Abb. 24:** Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie von MSZ in der Lunge

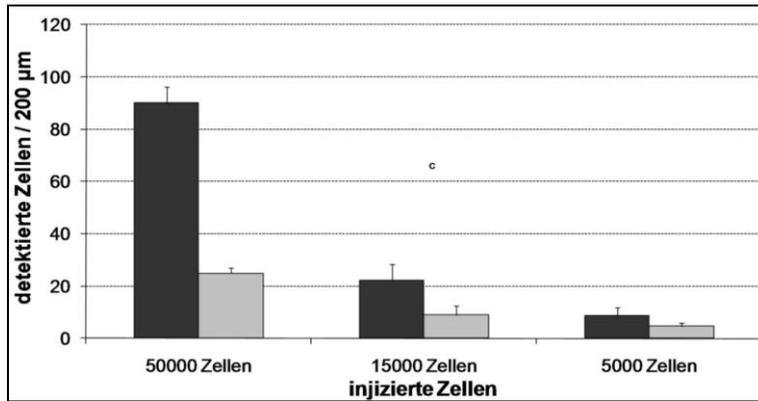
**a)** Zellproteine, gefärbt mit CFSE, kommen grün zur Darstellung. **b)** Die Partikel, mit Suncoast Yellow gefärbt, kommen, gruppiert stehend, rot zur Darstellung. **c)** Die Zellproteine, gefärbt mit CFSE, kommen grün zur Darstellung, die mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel kommen intrazellulär rot zur Darstellung, sie sind um die Zellkerne herum angeordnet. Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt und kommen blau zur Darstellung. **d)** Der Phasenkontrast zeigt die Struktur der umgebenden Lungenalveolen, sowie die Partikel. Es zeigen sich zwei einzelne intakte Zellen mit perinukleär angeordneten Partikeln, von Zellmembran umschlossen.



**Abb. 25:** Mehrkanal Konfokalmikroskopie markierter MSZ im Hirn

Scaling:  $0,11 \times 0,11 \mu\text{m}$  / Stack  $57,59 \mu\text{m}$ ; Objektiv:  $40 \times / 1,3$  Scan Zoom Ölimmersion

**a)** Die Zellproteine sind mit CFSE gefärbt und stellen sich grün dar; Excitation: 488 nm / Emissionsfilter: 505-530 nm **b)** Die mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel stellen sich rot dar; Excitation: 543 nm / Emissionsfilter: 560-615 nm **c)** Die Phasenkontrastmikroskopie zeigt die Umrisse einer intakten Zelle, umgeben von axial angeschnittenen Nervenfasern. Die Partikel kommen schwarz zur Darstellung. **d)** Im Fusionsbild a + b wird deutlich, dass die Partikel intrazellulär liegen, umgeben von grün dargestellten Zellproteinen. Es zeigen sich einzeln liegende Zellen, keine Konglomerate.



**Abb. 26:** Korrelation der mittels MRT und Histologie detektierten Zellzahlen zueinander

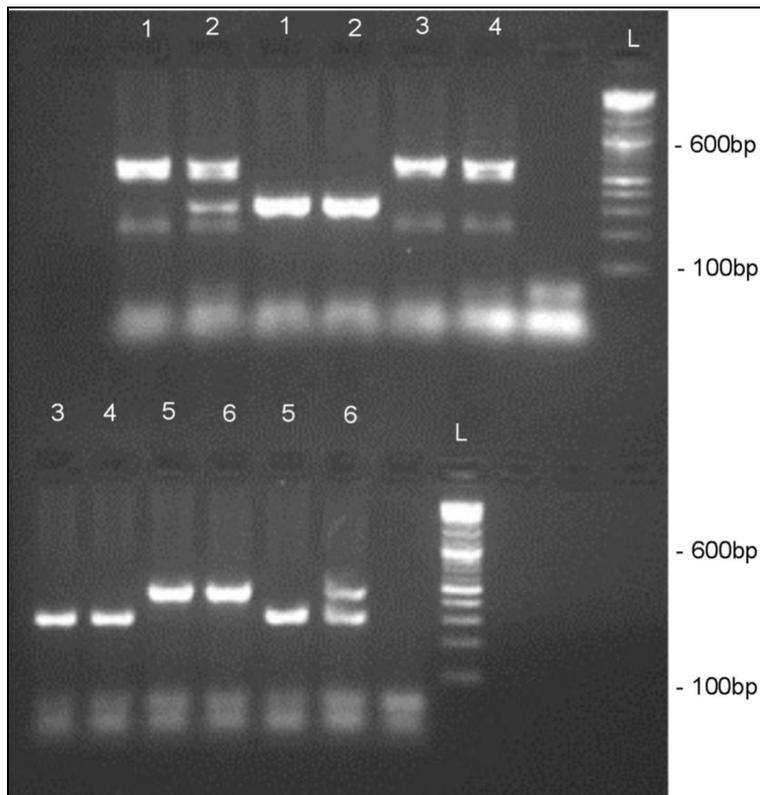
Histologie  
 MRT

Es zeigt sich eine lineare Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,91$ .

### 4.3 Nachweis des Migrationsverhaltens multipotenter mesenchymaler Stromazellen in E-/P-Selektin-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen

#### 4.3.1 Validierung der Selektin-Defizienz mittels Polymerasekettenreaktion

In den durchgeführten PCR Untersuchungen zeigte sich die erwartete homozygote Selektin-Defizienz für alle Knockout-Tiere. In diesem Beispiel wurden sechs Mäuse auf ihre E- und P-Selektin-Defizienz hin untersucht. Alle sechs Tiere zeigten sowohl eine Bande bei 315 bp als Ausdruck der homozygoten E-Selektin Mutante, als auch eine bei 479 bp als Ausdruck der homozygoten P-Selektin Mutante (Abbildung 27).



**Abb. 27:** PCR zur Validierung der E- und P-Selektindefizienz  
 Die Mäuse 1–6 zeigen eine Bande bei 479 bp und eine bei 315 bp, sie sind homozygot defizient für E- und P-Selektin.

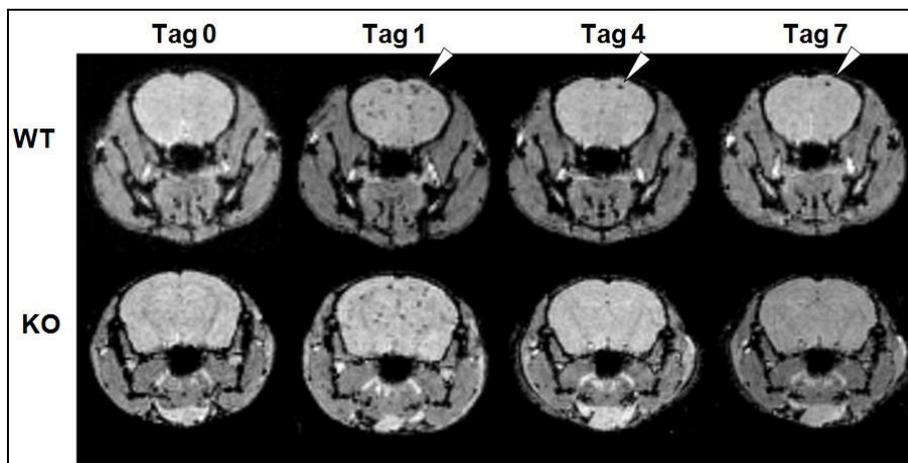
### 4.3.2 Magnetresonanztomographische Untersuchung der Mäuse in vivo

Die magnetresonanztomographischen Untersuchungen der Mäuse unter Narkose verliefen komplikationslos. Auch die wiederholten Untersuchungen und Narkosen stellten sich für das Wohlbefinden der Versuchstiere als unkritisch heraus. Es zeigte sich, dass die solenoidförmige Kleintierempfangsspule gegenüber der Ganzkörperspule mit vier parallel geschalteten Elementen deutlich vorteilhafter in Bezug auf die Einzelzelldetektion ist, da sie trotz des größeren Durchmessers ein höheres SNR liefert. Die Verwendung der Ganzkörperspule hingegen bringt den Vorteil einer homogenen Signalverteilung in Längsachsenrichtung und ein größeres Untersuchungsvolumen und somit eine artefaktfreiere Bestimmung des SNR der intestinalen Organe. Daher wurde die solenoidförmige Spule nur für die Untersuchungen nach intrakardialer Injektion verwendet.

#### 4.3.2.1 Ultraschallgesteuerte intrakardiale Injektion

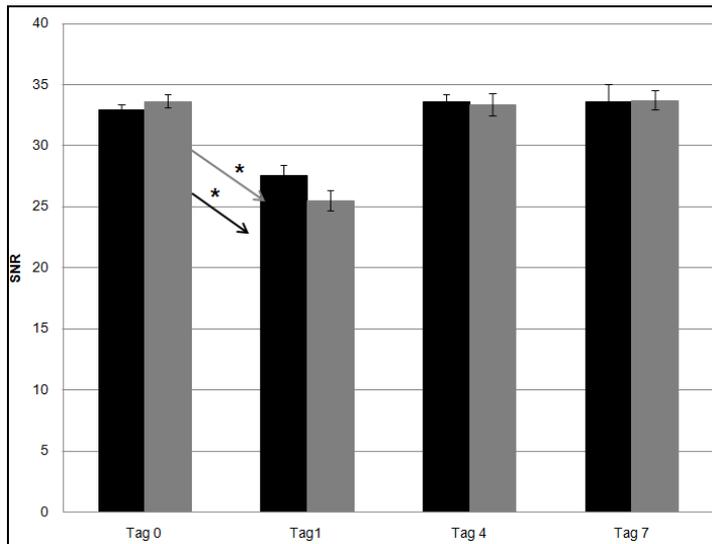
In den SNR-Messungen nach intrakardialer Injektion zeigte sich nur für die Gehirne ein signifikanter Signalabfall am Tag nach der Injektion, bei Messung am Tag 4 war der SNR-Wert wieder auf sein Ursprungsniveau zurückgekehrt (Abbildung 29). Es zeigten sich bei

beiden Mäusegruppen multiple, über das Hirn verteilte einzelne Auslöschungsartefakte am Tag nach Zellinjektion. Bei den Wildtyp-Mäusen konnten sehr vereinzelt auch an Tag 4 und 7 noch einzelne Signalauslöschungen detektiert werden, dies war bei den Knockout-Tieren nicht der Fall (Abbildung 28). Weitere signifikante SNR-Veränderungen im Verlauf innerhalb der Gruppen waren nicht zu finden (Abbildung 31 a–d). Auffällig war, dass innerhalb der Gruppen zwar konstante, aber im Vergleich der Gruppen untereinander signifikant unterschiedliche SNR von Milz und Knochenmark bestimmt wurden. Dies ist auf einen weniger weit ausgezüchteten C57Bl6 Hintergrund der hier verwendeten Knockout-Tiere zurückzuführen (Abbildung 31 b und c). In den Tieren beider Gruppen fanden sich vereinzelte Signalauslöschungen im Nierenkortex am Tag nach Injektion, die sich jedoch an Tag 4 und 7 nicht mehr darstellen ließen (Abbildung 26).



**Abb. 28:** MRT der Gehirne im Verlauf nach intrakardialer Zellinjektion

An Tag 1 finden sich multiple Signalauslöschungen in den Hirnen beider Gruppen. An Tag 4 und 7 finden sich lediglich in der WT-Gruppe noch vereinzelte Signalauslöschungen (▷). Dies ist ein Hinweis auf eine selektivvermittelte Einwanderung der Zellen in das Gehirn.

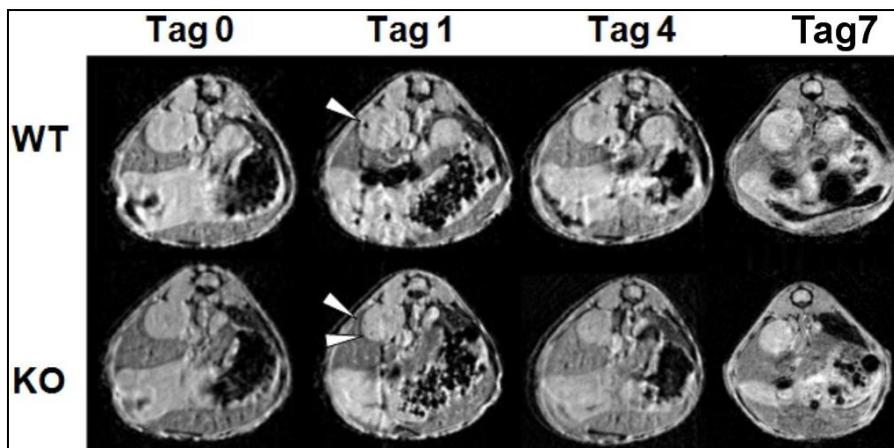


**Abb. 29:** SNR-Messungen der Gehirne nach intrakardialer Zellinjektion

■ Selektindefizienz

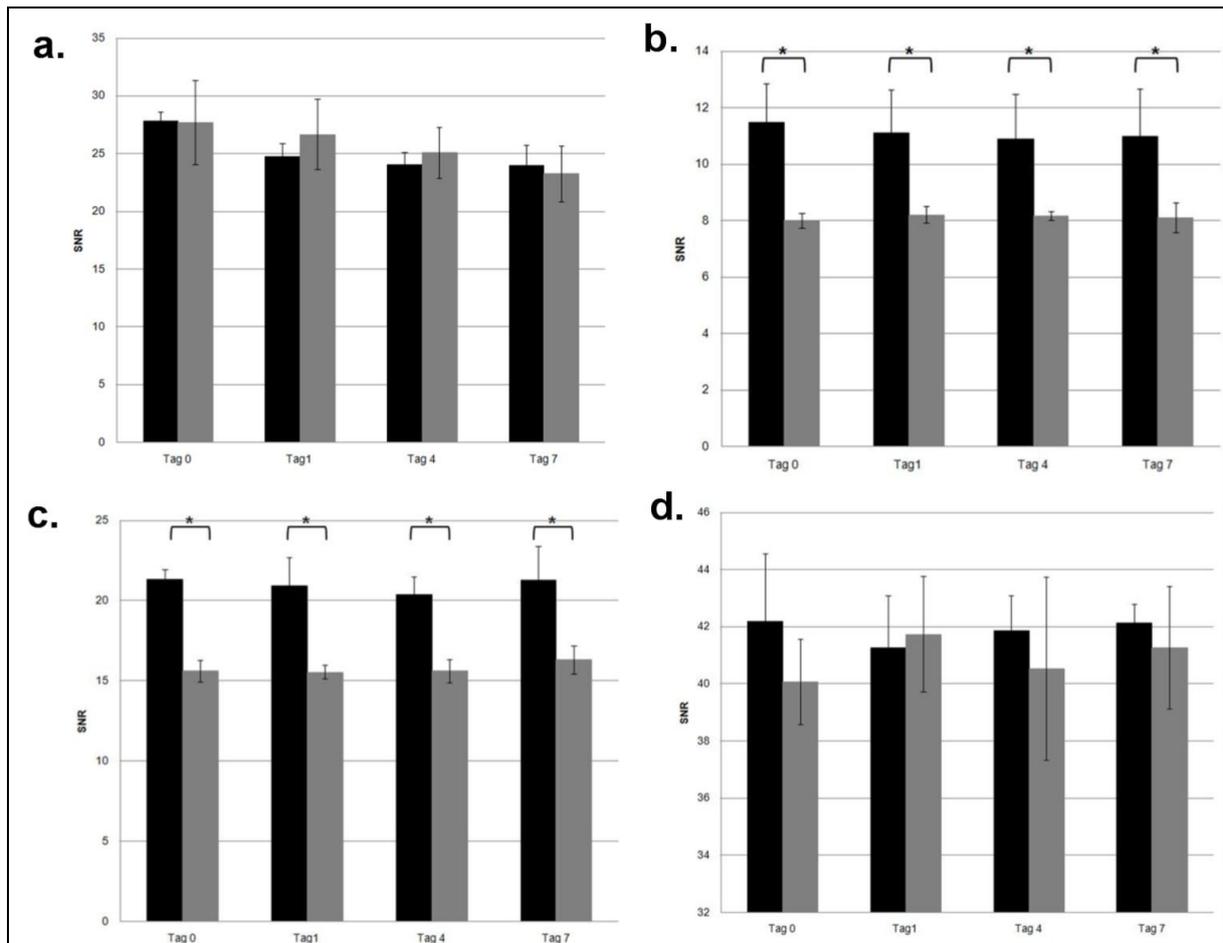
■ Wildtyp

Durchschnittliches SNR  $\pm$  Standardabweichung (n = 3). Signifikante Unterschiede bei ( $p < 0,05$ ) des SNR (Tag 0, 1, 4 und 7), nach Friedman Test, gezeigt durch \*. Eine signifikante SNR Reduktion ist nur direkt nach der Injektion durch multiple, in den Kapillaren hängengebliebene, Zellen in beiden Gruppen zu erkennen. Die Persistenz einzelner Zellen in der WT-Gruppe hat keinen Einfluss auf die SNR Messung.



**Abb. 30:** MRT der Nieren im Verlauf nach intrakardialer Zellinjektion

An Tag 1 finden sich einzelne Signalauslöschungen im Nierenkortex beider Gruppen (▷), diese sind ab Tag 4 nicht mehr nachweisbar.



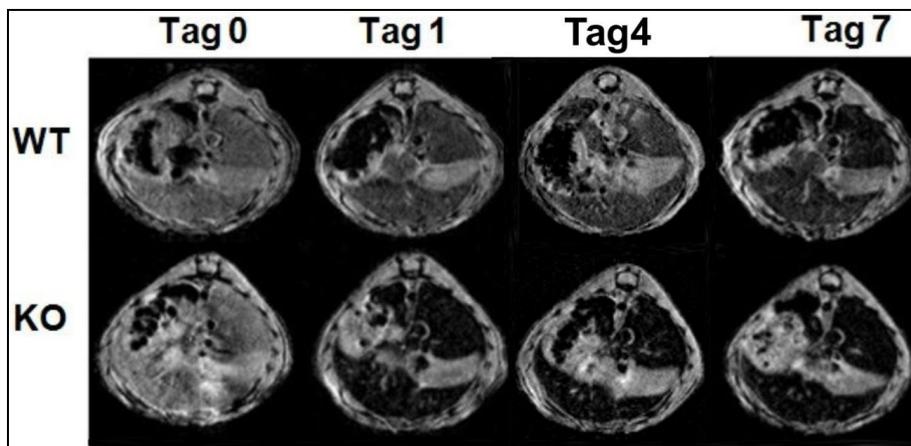
**Abb. 31:** SNR-Messungen der Lebern, Milzen, des Knochenmarkes und der Nieren nach intrakardialer Zellinjektion

Selektindefizienz  
 Wildtyp

Durchschnittliches SNR  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ). Signifikante Unterschiede bei ( $p < 0,05$ ) des SNR (Tag 0, 1, 4 und 7), nach Friedman Test, werden gezeigt durch \*. **a)** In der Leber zeigen sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen oder im Vergleich der Gruppen. **b)** In der Milz zeigen sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen jedoch im Vergleich der Gruppen. Dies ist auf den unterschiedlichen Mausstamm zurückzuführen. **c)** Im Knochenmark zeigen sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen, jedoch im Vergleich der Gruppen. Dies ist auf den unterschiedlichen Mausstamm zurückzuführen. **d)** In der Niere zeigen sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen oder im Vergleich der Gruppen.

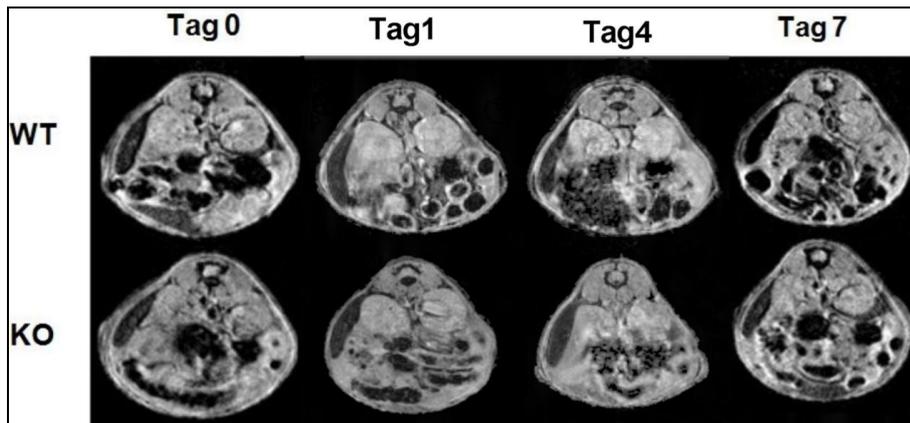
### 4.3.2.2 Intravenöse Injektion

Die Bestimmung des SNR nach intravenöser Injektion zeigte in den Lebern der E- und P-Selektinknockout-Mäuse einen signifikant höheren Signalabfall von Tag 0 auf Tag 1 (Tag 0:  $25,267 \pm 2,887$  zu Tag 1:  $8,733 \pm 1,804$ ) als in den Wildtyp-Mäusen (Tag 0:  $24,333 \pm 1,007$  zu Tag 1:  $20,067 \pm 2,230$ ). Zusätzlich zeigte sich eine unterschiedliche Dynamik. Das SNR der Lebern der Knockout-Tiere blieb von Tag 1 bis Tag 7 auf dem gleichen Level, wohingegen bei den Wildtyp-Tieren ein weiterer signifikanter Signalabfall von Tag 4:  $19,933 \pm 1,973$  auf Tag 7:  $13,467 \pm 1,604$  zu verzeichnen war (Abbildungen 32 und 34a). In der SNR-Bestimmung der Milz fällt auf, dass es lediglich in der Wildtyp-Gruppe von Tag 4:  $7,989 \pm 0,929$  auf Tag 7:  $4,067 \pm 0,757$  zu einem signifikanten Signalabfall kommt (Abbildungen 33 und 34b). In der Untersuchung des Knochenmarks zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen an Tag 7 (WT:  $14,333 \pm 2,335$  / KO:  $22,533 \pm 3,722$ ). Hier besteht eine Signifikanz innerhalb der Gruppe nur von Tag 0:  $20,933 \pm 3,402$  auf Tag 7:  $14,333 \pm 2,335$  (Abbildung 35a). In den SNR-Messungen der Nieren (Abbildung 35b) zeigten sich sowohl innerhalb der Gruppen als auch zwischen den Gruppen keinerlei signifikante Unterschiede.



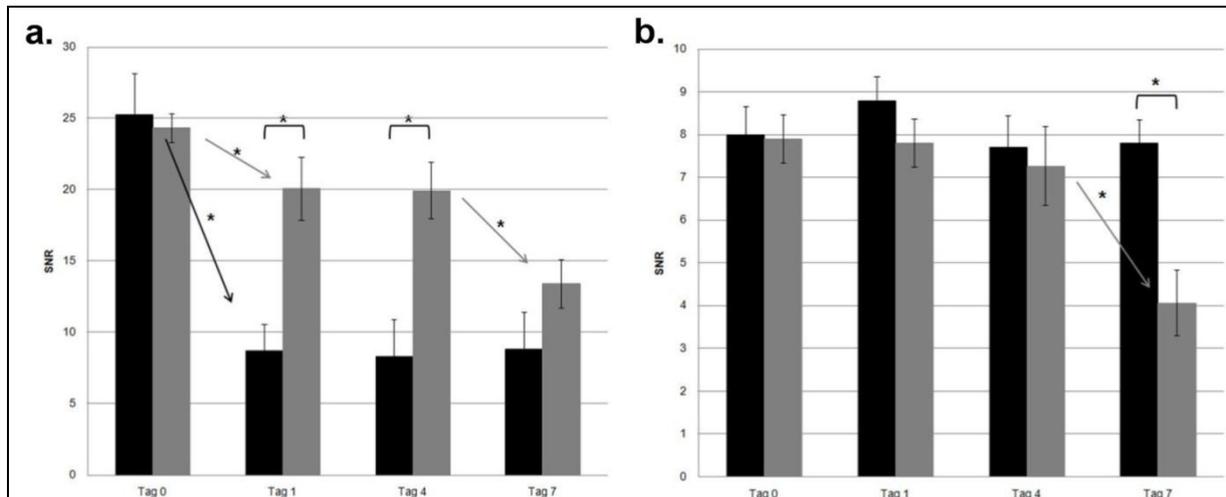
**Abb. 32:** MRT der Lebern im Verlauf nach intravenöser Zelinjektion

Es findet sich bei den KO-Tieren eine deutlichere Signalminderung der Lebern von Tag 0 auf Tag 1 als bei den WT-Tieren. Die Signalminderung der Lebern der KO-Tiere bleibt im Verlauf konstant. Bei den WT-Tieren zeigt sich eine weitere Signalminderung. Dies lässt darauf schließen, dass die Zellen in den WT-Mäusen die Möglichkeit haben in verschiedene Gewebe auszuwandern bzw. initial selektinvermittelt an die Gefäßwand anheften können und somit weniger schnell in der Leber herausgefiltert werden. In den KO-Mäusen müssen die Zellen länger zirkulieren bis sie schließlich zugrunde gehen und die freigesetzten Partikel vom retikulären endothelialen System phagozytiert werden.



**Abb. 33:** MRT der Milzen im Verlauf nach intravenöser Zellinjektion

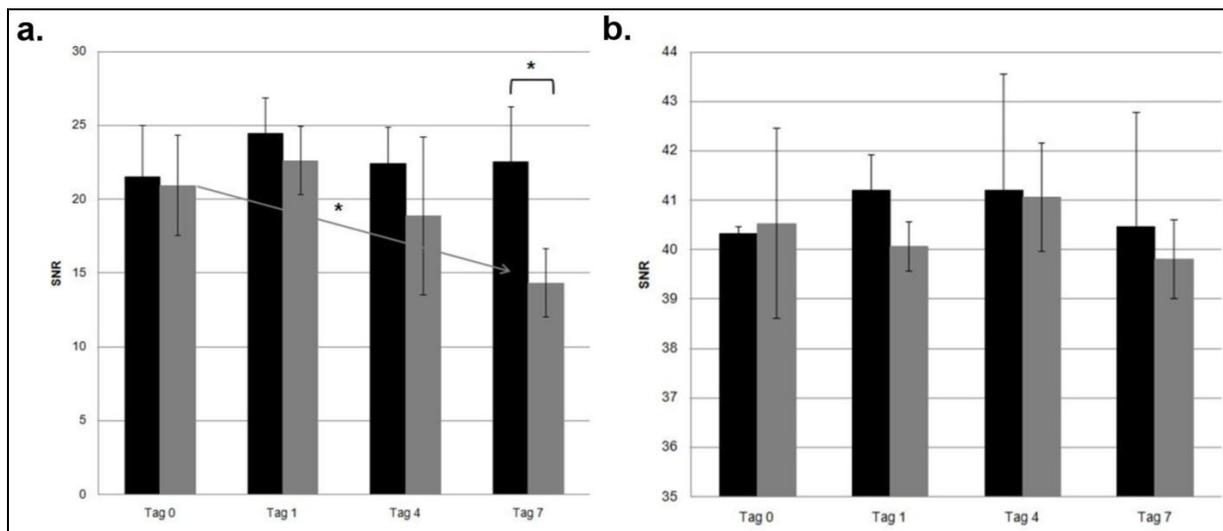
Bei den WT-Tieren zeigt sich im Verlauf an Tag 7 eine signifikante Signalmindering, die KO-Tiere bleiben unverändert. Dies deutet daraufhin, dass eine Einwanderung intakter Zellen in die Milz nur in der WT-Gruppe selektiv vermittelt möglich ist, während die Zellen in den KO-Tieren im Blutstrom zugrunde gehen.



**Abb. 34:** SNR-Messungen der Leber und Milz nach intravenöser Zellinjektion

■ Selektindefizienz  
 ■ Wildtyp

Durchschnittliches SNR  $\pm$  Standardabweichung (n = 3). Signifikante Unterschiede bei (p < 0,05) des SNR (Tag 0, 1, 4 und 7), nach Friedman Test, werden gezeigt durch \*. **a)** In der Leber fällt der initiale Signalabfall in den WT-Mäusen weniger stark aus, es zeigt sich ein zweiter signifikanter Signalabfall. Dies kann ein Zeichen dafür sein, dass die Zellen sich in den WT-Mäusen initial an die Gefäßwand anheften können. Im Verlauf der Untersuchung abgestorbene Zellen gelangen erst später zum Abbau in die Leber. In den KO-Mäusen werden gleich mehr Zellen von der Leber herausgefiltert. **b)** Der Signalabfall in der Milz der WT-Mäuse, der in der KO-Gruppe fehlt, kann Hinweis darauf sein, dass eine Einwanderung in die Milz nur in WT-Mäusen selektiv vermittelt möglich ist, während die Zellen in den KO-Tieren im Blutstrom zugrunde gehen.



**Abb. 35:** SNR-Messungen des Knochenmarks und der Niere nach intravenöser Zellinjektion

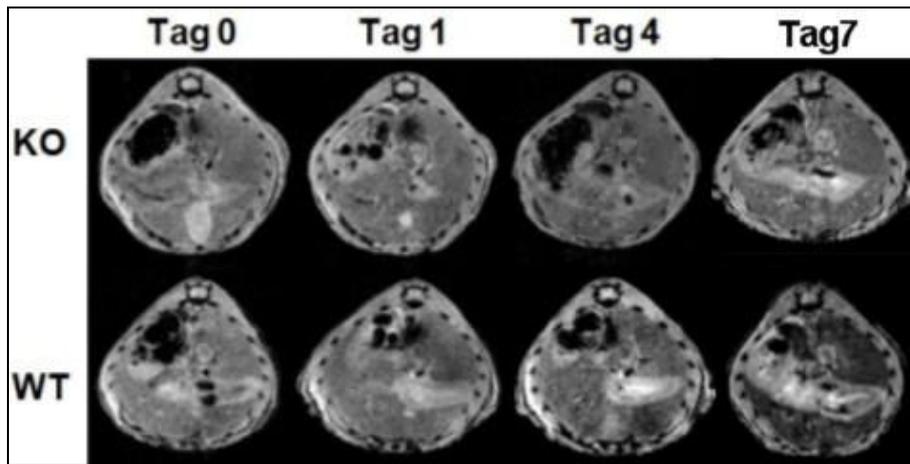
■ Selektindefizienz

■ Wildtyp

Durchschnittliches SNR  $\pm$  Standardabweichung (n = 3). Signifikante Unterschiede bei ( $p < 0,05$ ) des SNR (Tag 0, 1, 4 und 7), nach Friedman Test, werden gezeigt durch \*. **a)** Der Signalabfall im Knochenmark der WT-Mäuse, der in der KO-Gruppe fehlt, kann Hinweis darauf sein, dass eine Einwanderung in das Knochenmark nur in WT-Mäusen selektinvermittelt möglich ist. **b)** In der Niere zeigen sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen oder im Vergleich der Gruppen.

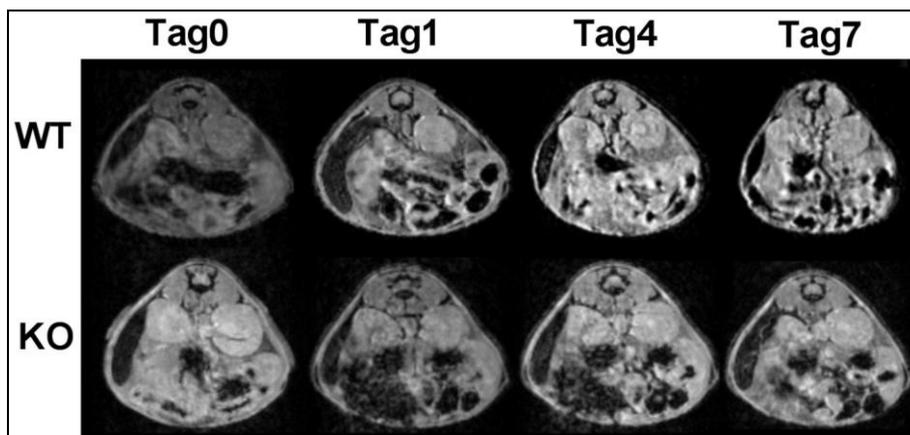
#### 4.3.2.3 Intraperitoneale Injektion

Bei der SNR-Bestimmung der Lebern nach intraperitonealer Injektion zeigte sich nur bei den Wildtyp-Tieren ein kontinuierlicher, signifikanter Signalverlust in den Lebern von Tag 0 bis hin zu Tag 4 (Tag 0:  $23,467 \pm 1,301$  zu Tag 1:  $17,333 \pm 1,609$  zu Tag 4:  $11,033 \pm 0,8505$ ) (Abbildungen 36 und 38a). Analog dazu stellten sich bei den Messungen von Milz und Knochenmark signifikante Signalveränderungen auch nur bei der Wildtyp-Gruppe ein (Milz: Tag 0:  $8,767 \pm 1,150$  zu Tag 4:  $2,633 \pm 0,737$  zu Tag 7:  $1,267 \pm 0,643$ ; Knochenmark: Tag 0:  $18,907 \pm 5,277$  zu Tag 4:  $11,933 \pm 1,629$  zu Tag 7:  $6,486 \pm 1,058$ ) (Abbildungen 37 38b und 39a). Die SNR-Bestimmung in der Niere zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen oder innerhalb der Gruppen (Abbildung 39b). Auf eine Bestimmung des SNR im Gehirn wurde verzichtet, da eine aktive Migration der MSZ ins Hirn nicht zu erwarten war und sich auch kein bildmorphologischer Unterschied innerhalb der Gruppen einstellte.



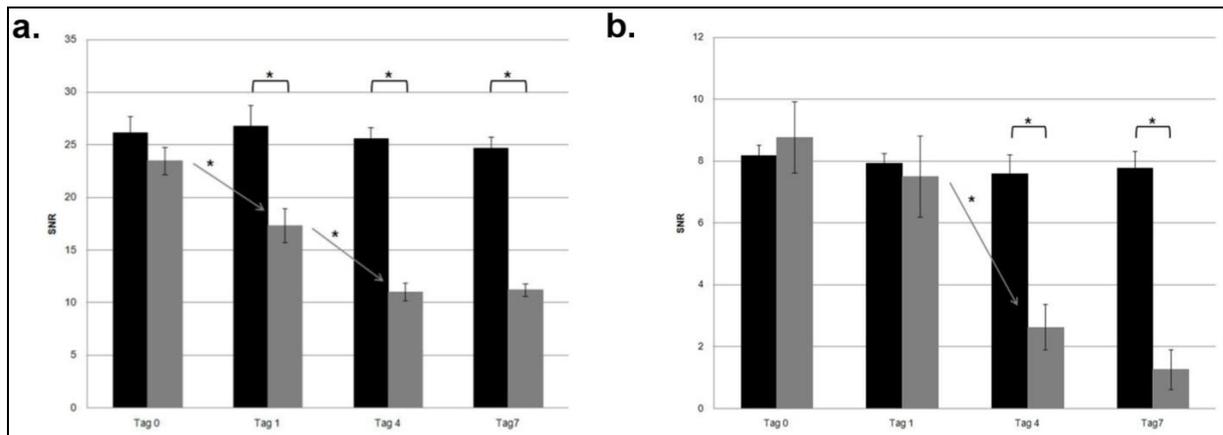
**Abb. 36:** MRT der Lebern im Verlauf nach intraperitonealer Zellinjektion

Es findet sich an Tag 1 bei den WT-Tieren ein deutlich höherer Signalverlust der Lebern von Tag 0 auf Tag 1 als bei den KO-Tieren. Der Signalverlust der Lebern der KO-Tiere bleibt im Verlauf konstant. Bei den WT-Tieren zeigt sich ein weiterer Signalverlust. Dies kann Hinweis darauf sein, dass nur in den WT-Mäusen eine aktive Auswanderung aus dem Peritoneum selektinvermittelt möglich ist, die Zellen in den Blutstrom gelangen und aktiv in die Leber einwandern bzw. in der Leber abgebaut werden.



**Abb. 37:** MRT der Milzen im Verlauf nach intraperitonealer Zellinjektion

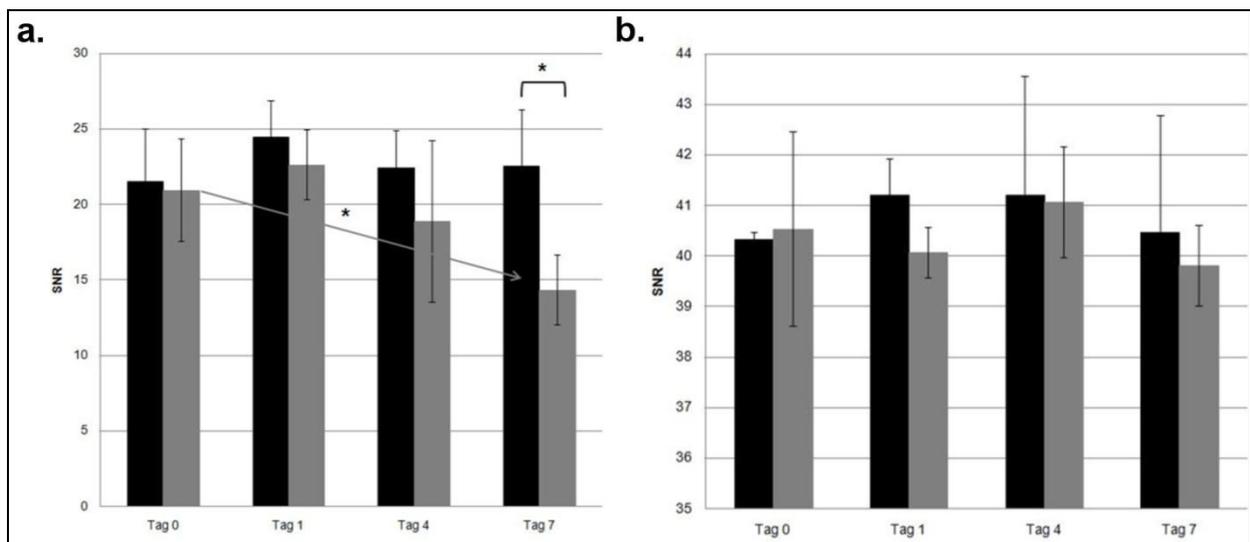
Bei den WT-Tieren zeigt sich im Verlauf bei Tag 4 ein deutlicher Signalverlust, die KO-Tiere zeigen keine signifikante Änderung. Dies ist Hinweis darauf, dass nur in den WT-Mäusen eine aktive Auswanderung aus dem Peritoneum selektinvermittelt möglich ist und die Zellen so in den Blutstrom gelangen und in die Milz einwandern.



**Abb. 38:** SNR-Messungen der Leber und Milz nach intraperitonealer Zellinjektion

Selektindefizienz  
 Wildtyp

Durchschnittliches SNR  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ). Signifikante Unterschiede bei ( $p < 0,05$ ) des SNR (Tag 0, 1, 4 und 7), nach Friedman Test, werden gezeigt durch \*. **a)** Der Signalverlust in der Leber wird nur in der WT-Gruppe signifikant, und nimmt bis Tag 4 zu. Dies ist ein Hinweis darauf, dass eine selektinvermittelte Auswanderung aus dem Peritoneum und Einwanderung der Zellen bzw. deren Abbau durch die Leber nur in dieser Gruppe möglich ist. **b)** Der Signalverlust in der Milz wird nur in der WT-Gruppe an Tag 4 signifikant und nimmt bis Tag 7 zu. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass eine selektinvermittelte Auswanderung aus dem Peritoneum und Einwanderung der Zellen bzw. deren Abbau in der Milz nur in dieser Gruppe möglich ist.



**Abb. 39:** SNR-Messungen des Knochenmarks nach intraperitonealer Zellinjektion

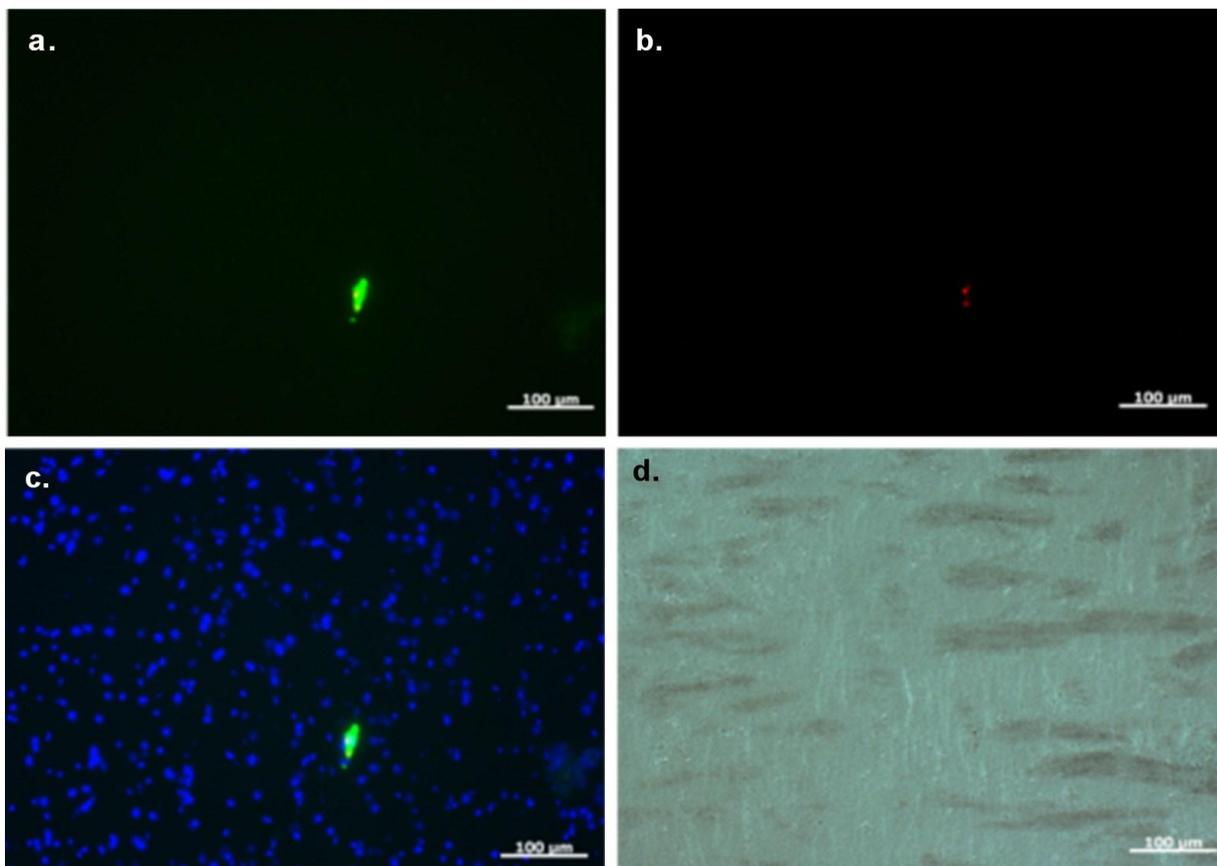
Selektindefizienz  
 Wildtyp

Durchschnittliches SNR  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ). Signifikante Unterschiede bei ( $p < 0,05$ ) des SNR (Tag 0, 1, 4 und 7), nach Friedman Test, werden gezeigt durch \*. **a)** Der Signalabfall im Knochenmark der WT-Mäuse, der in der KO-Gruppe fehlt, kann Hinweis darauf sein, dass eine Einwanderung in das Knochenmark nur in WT-Mäusen selektinvermittelt möglich ist. **b)** In der Niere zeigen sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen oder im Vergleich der Gruppen.

### 4.3.3 Histologische Auswertung

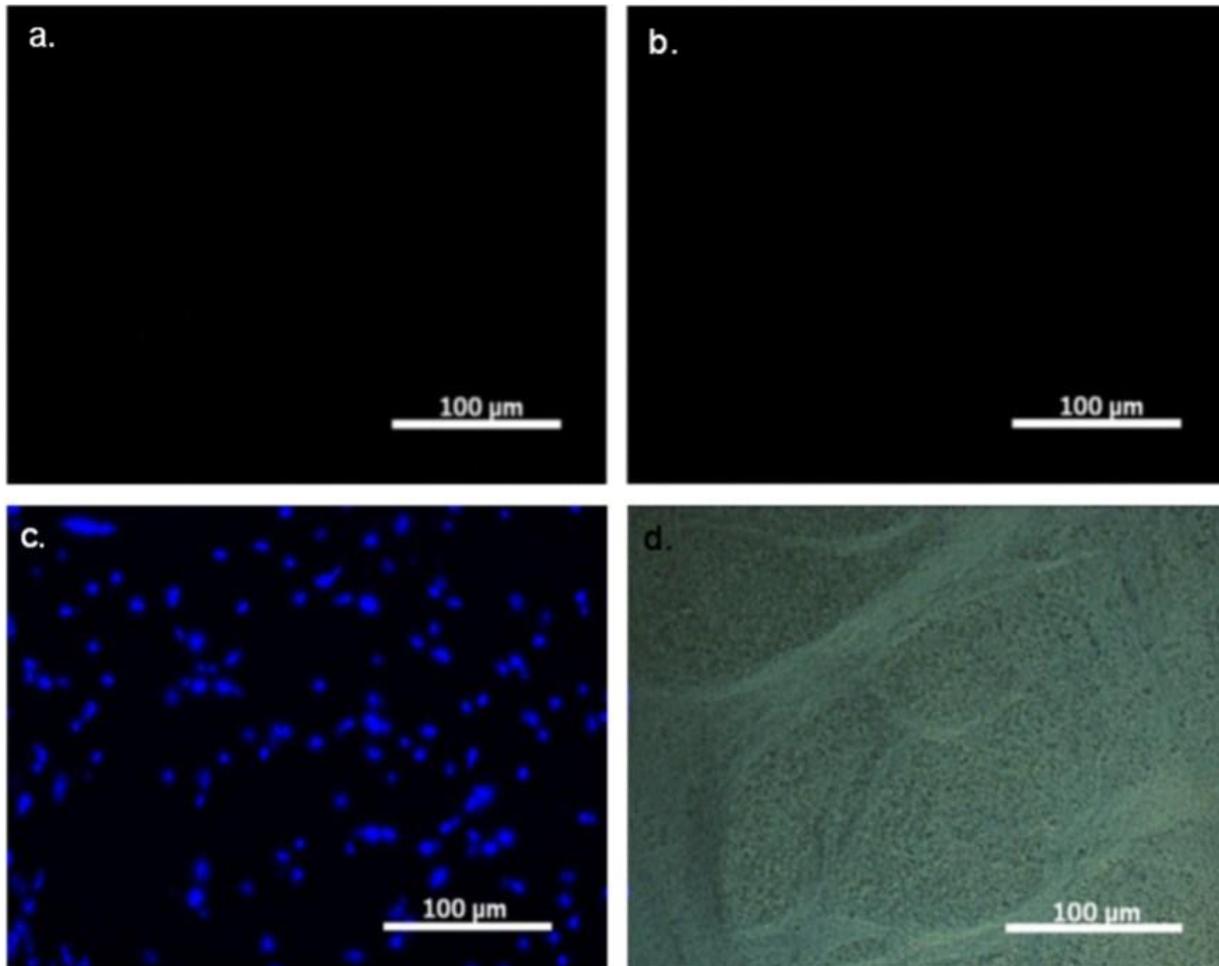
#### 4.3.3.1 Ultraschallgesteuerte intrakardiale Injektion

Die histologische Auswertung des ZNS nach intrakardialer Injektion zeigte sehr vereinzelt markierte intakte Zellen in der Wildtyp-Gruppe (1,3 Zellen in 100 aufeinanderfolgenden 10 µm dicken Schnitten mit je 10µm Abstand). Freie Partikel waren kaum zu finden (25 in 3× 100 aufeinanderfolgenden 10 µm dicken Schnitten mit je 10 µm Abstand) (Abbildung 40). In der Knockoutgruppe waren keine intakten Zellen mehr zu finden, freie Partikel waren ebenfalls sehr selten (22,3 in 3 × 100 aufeinanderfolgenden 10 µm dicken Schnitten mit je 10µm Abstand) (Abbildung 41). Die Mikroskopie der Nieren zeigte weder intakte Zellen noch freie Partikel bei beiden Tiergruppen (Abbildung 42 und 43). Dies war auch nach allen anderen Injektionsformen der Fall.



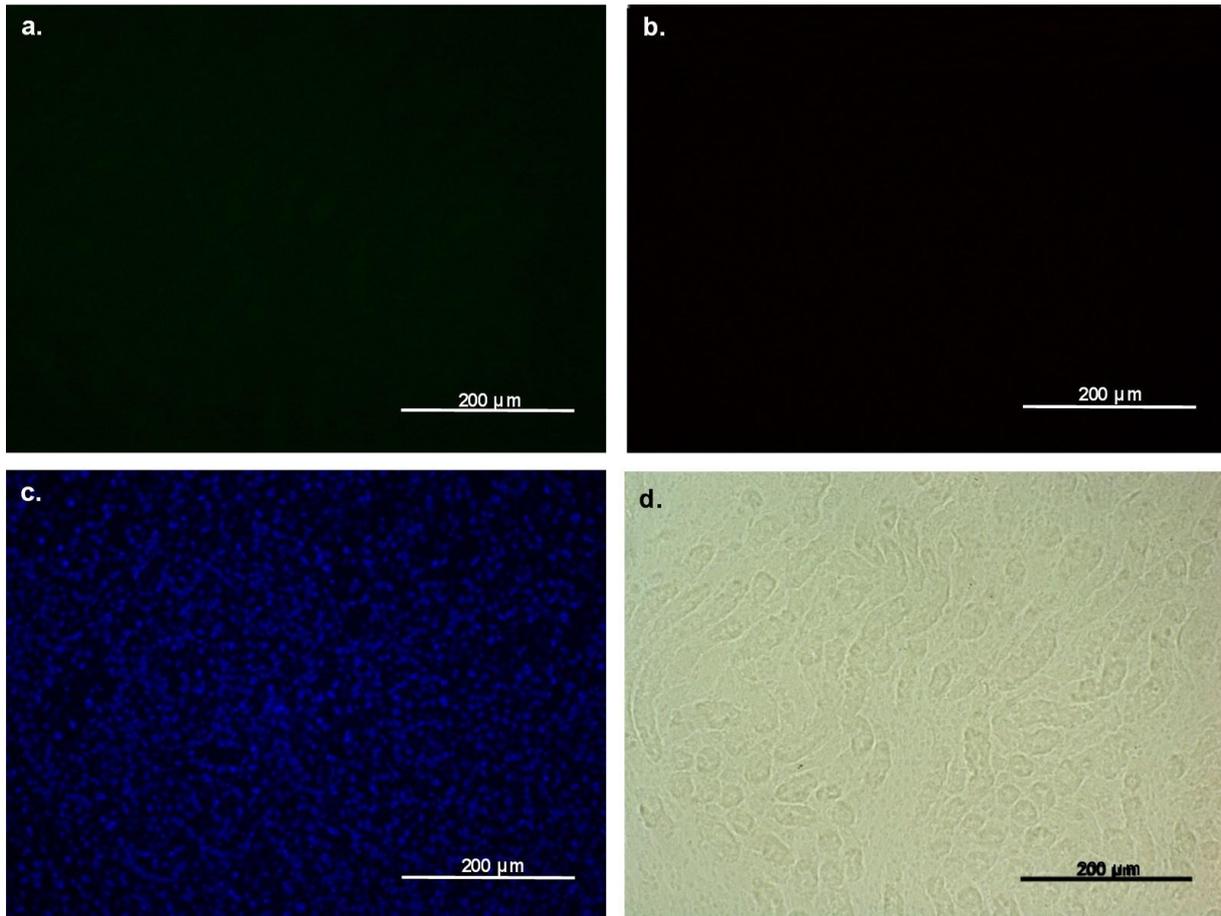
**Abb. 40:** Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie des ZNS der Wildtyp-Mäuse nach intrakardialer Zellinjektion

**a)** Zellproteine, gefärbt mit CFSE, kommen grün zur Darstellung, die mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel kommen intrazellulär gelegen rot zur Darstellung. **b)** Die Partikel, mit Suncoast Yellow gefärbt, kommen gruppiert stehend rot zur Darstellung. **c)** Zellproteine, gefärbt mit CFSE, kommen grün zur Darstellung, die mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel kommen intrazellulär rot zur Darstellung. Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt und kommen blau zur Darstellung. **d)** Der Phasenkontrast zeigt die Struktur des umgebenden Gewebes, sowie die Partikel. Es zeigt sich eine einzelne intakte Zelle, mit perinukleär angeordneten Partikeln, umschlossen von Zellmembran. Dies spricht für eine aktive Einwanderung einzelner Zellen.



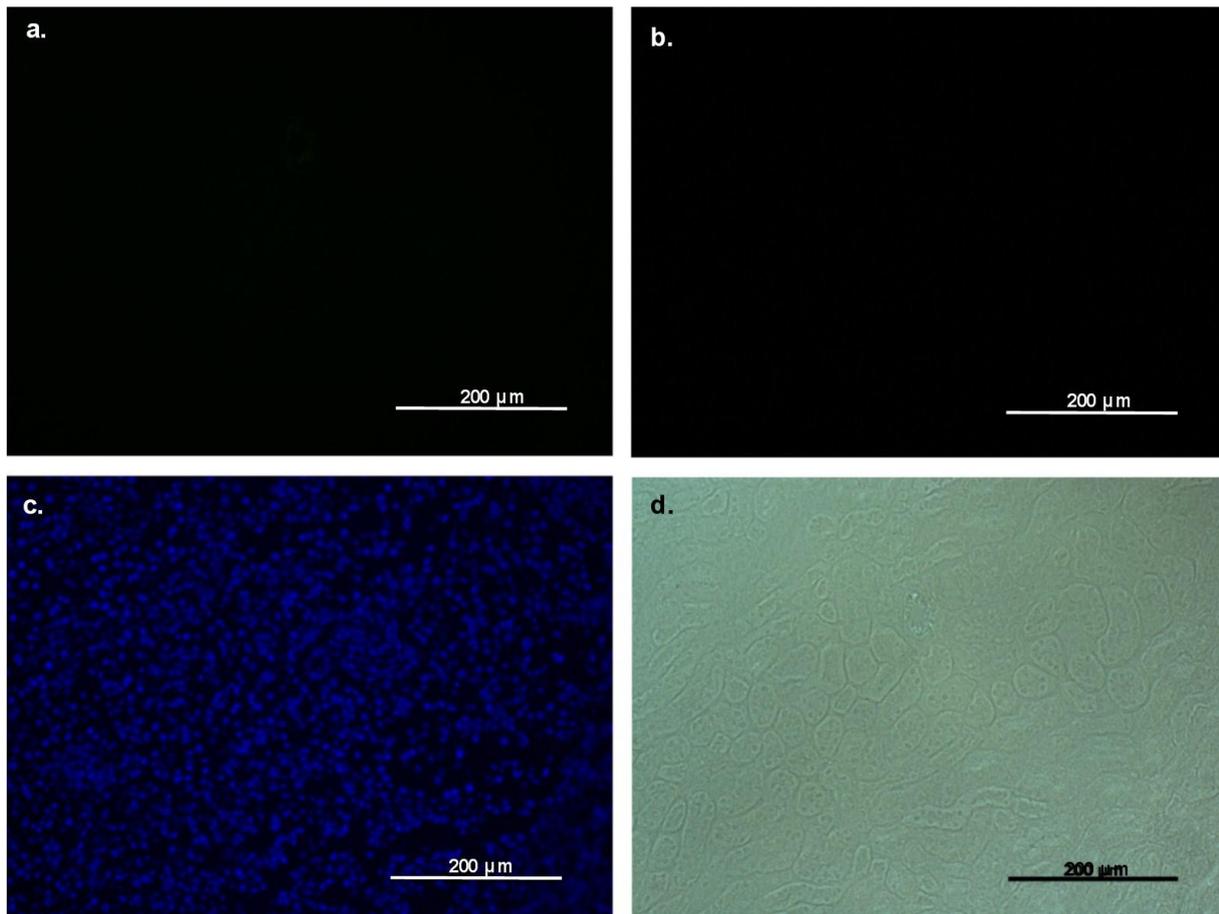
**Abb. 41:** Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie des ZNS der Knockout-Mäuse nach intrakardialer Zellinjektion

**a)** Im Grünkanal zur Darstellung der Zellproteine, gefärbt mit CFSE, sowie im Rotkanal zur Darstellung der mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel zeigt sich kein Signal. **b)** Im Rotkanal zur Darstellung der mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel zeigt sich kein Signal. **c)** Im Rot- und Grünkanal zur Darstellung der Zellproteine und der Partikel zeigen sich keine Signale. Die mit DAPI gefärbten Zellkerne kommen blau zur Darstellung. **d)** Der Phasenkontrast zeigt die Struktur des Hirngewebes. Es finden sich keine Zellen oder Zellreste im ZNS der Knockout-Mäuse.



**Abb. 42:** Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie der Niere der Wildtyp-Mäuse nach intrakardialer Zellinjektion

**a)** Im Grünkanal zur Darstellung der Zellproteine, gefärbt mit CFSE, sowie im Rotkanal zur Darstellung der mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel zeigt sich kein Signal. **b)** Im Rotkanal zur Darstellung der mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel zeigt sich kein Signal. **c)** Im Rot- und Grünkanal zur Darstellung der Zellproteine und der Partikel zeigen sich keine Signale. Die mit DAPI gefärbten Zellkerne kommen blau zur Darstellung. **d)** Der Phasenkontrast zeigt die Struktur der Nierenglomeruli. Es finden sich keine Zellen oder Zellreste in den Nieren der Wildtyp-Mäuse.

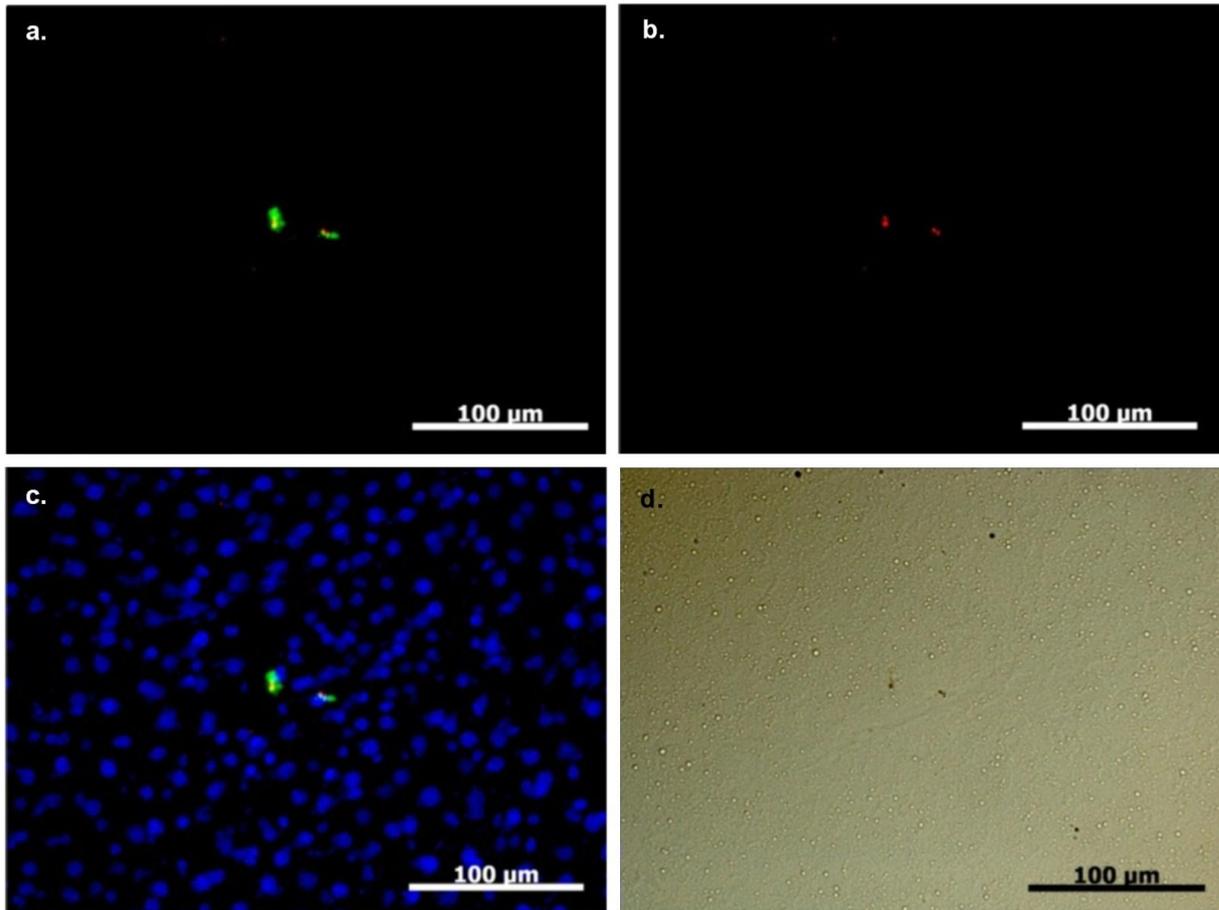


**Abb. 43:** Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie der Niere der Knockout-Mäuse nach intrakardialer Zellinjektion

**a)** Im Grünkanal zur Darstellung der Zellproteine, gefärbt mit CFSE, sowie im Rotkanal zur Darstellung der mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel zeigt sich kein Signal. **b)** Im Rotkanal zur Darstellung der mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel zeigt sich kein Signal. **c)** Im Rot- und Grünkanal zur Darstellung der Zellproteine und der Partikel zeigen sich keine Signale. Die mit DAPI gefärbten Zellkerne kommen blau zur Darstellung. **d)** Der Phasenkontrast zeigt die Struktur der Nierenglomeruli. Es finden sich keine Zellen oder Zellreste in den Nieren der Knockout-Mäuse

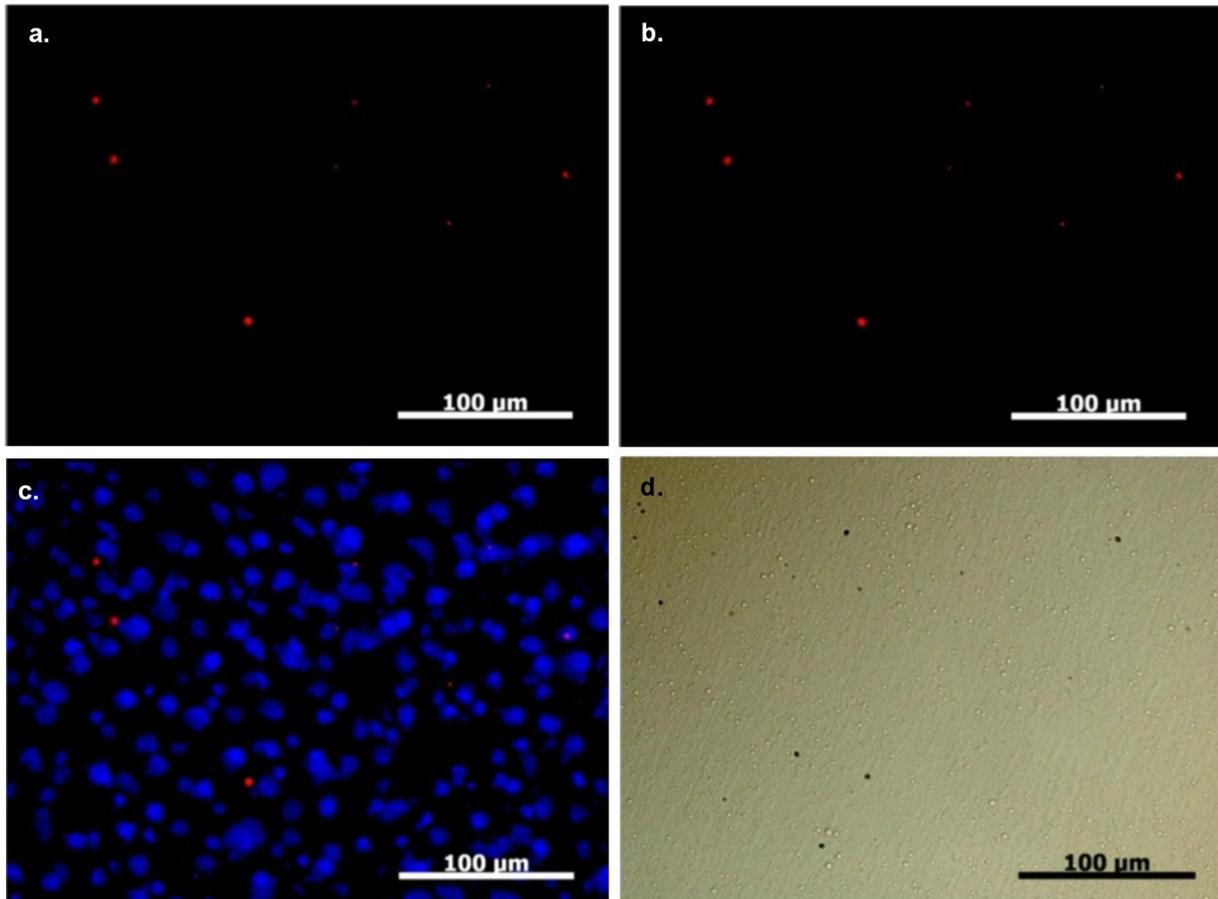
#### 4.3.3.2 Intravenöse Injektion

In der histologischen Auswertung der Lebern nach intravenöser Zellinjektion zeigten sich bei den Wildtyp-Tieren im Durchschnitt 2,3 intakte Zellen und 2,5 freie Partikel pro Blickfeld (Abbildung 44), in den Lebern der Knockout-Tiere waren 0,04 intakte Zellen und 10,2 freie Partikel pro Gesichtsfeld (Abbildung 45) zu finden. Die Auswertung der Milzen ergab ähnliche Befunde mit 4,3 intakten Zellen und 4,5 freien Partikel pro Gesichtsfeld in den Wildtyp-Tieren (Abbildung 46) und lediglich 5,7 freien Partikeln pro Gesichtsfeld in den Knockout-Tieren (Abbildung 47).



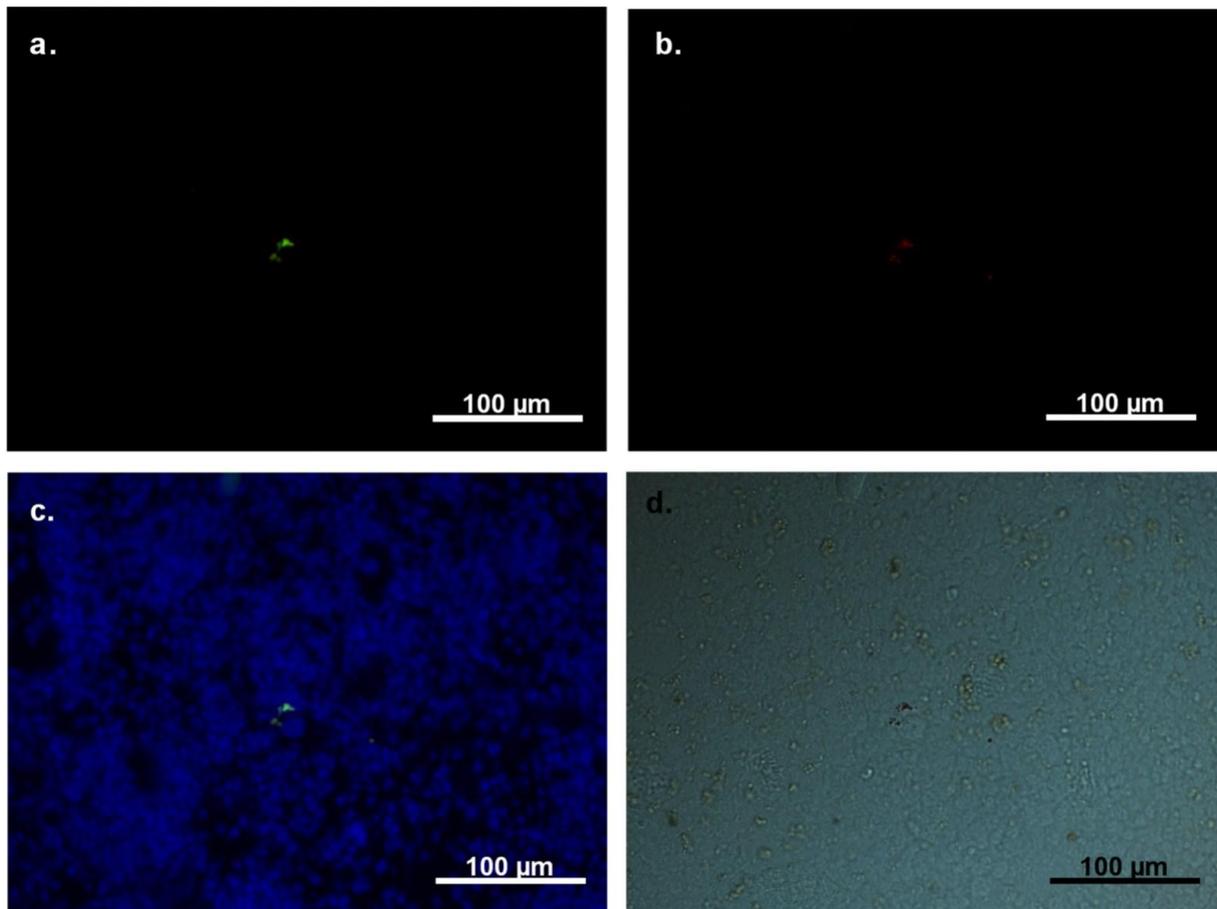
**Abb. 44:** Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie der Leber der Wildtyp-Mäuse nach intravenöser Zellinjektion

**a)** Zellproteine, gefärbt mit CFSE, kommen grün zur Darstellung, die mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel kommen intrazellulär gelegen rot zur Darstellung. **b)** Die Partikel, mit Suncoast Yellow gefärbt, kommen gruppiert stehend rot zur Darstellung. **c)** Zellproteine, gefärbt mit CFSE, kommen grün zur Darstellung, die mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel kommen intrazellulär rot zur Darstellung. Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt und kommen blau zur Darstellung. **d)** Der Phasenkontrast zeigt die Struktur des umgebenden Leberparenchyms, sowie die Partikel. Es zeigen sich zwei intakte Zellen mit intrazellulären Partikeln, umschlossen von Zellmembran.



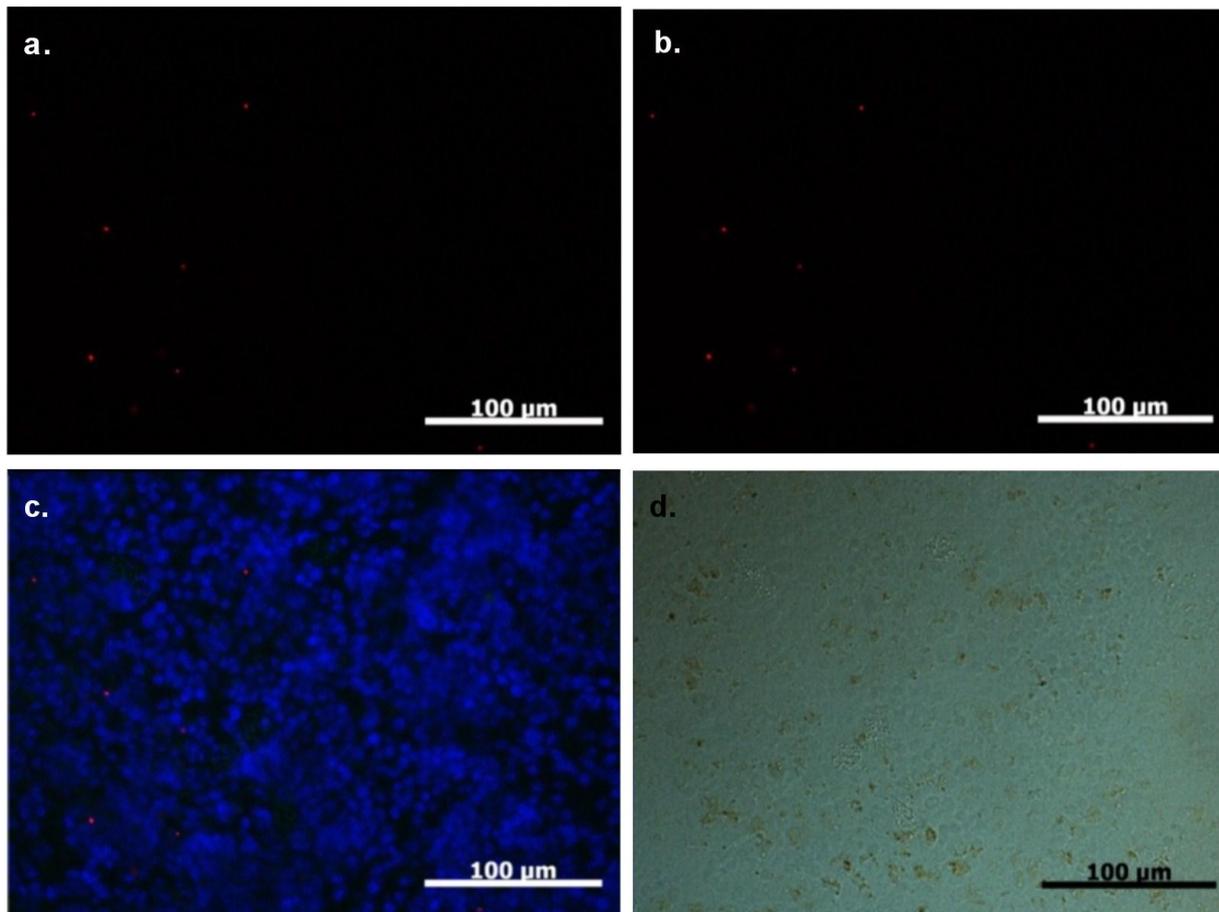
**Abb. 45:** Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie der Leber der Knockout-Mäuse nach intravenöser Zellinjektion

**a)** Im Grünkanal zur Darstellung der Zellproteine, gefärbt mit CFSE, findet sich kein Signal. Im Rotkanal zur Darstellung der mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel zeigen sich einzelne Partikel. **b)** Im Rotkanal zur Darstellung der mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel zeigen sich frei liegende einzelne Partikel. **c)** Im Grünkanal zur Darstellung der Zellproteine zeigt sich kein Signal. Im Rotkanal finden sich einzelne frei liegende Partikel. Die mit DAPI gefärbten Zellkerne kommen blau zur Darstellung. **d)** Der Phasenkontrast zeigt die Struktur des Leberparenchyms und einzelne Partikel. Es finden sich keine intakten Zellen, jedoch multiple frei liegende Partikel in den Lebern der Knockout-Mäuse.



**Abb. 46:** Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie der Milz der Wildtyp-Tiere nach intravenöser Zelinjektion

**a)** Zellproteine, gefärbt mit CFSE, kommen grün zur Darstellung. **b)** Die Partikel, mit Suncoast Yellow gefärbt, kommen rot zur Darstellung. **c)** Die Zellproteine, gefärbt mit CFSE, kommen grün zur Darstellung, die mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel kommen intrazellulär rot zur Darstellung. Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt und kommen blau zur Darstellung. **d)** Der Phasenkontrast zeigt die Struktur der umgebenden Milzpulpa. Es zeigt sich eine einzelne intakte Zelle mit intrazellulär gelegenen Partikeln.

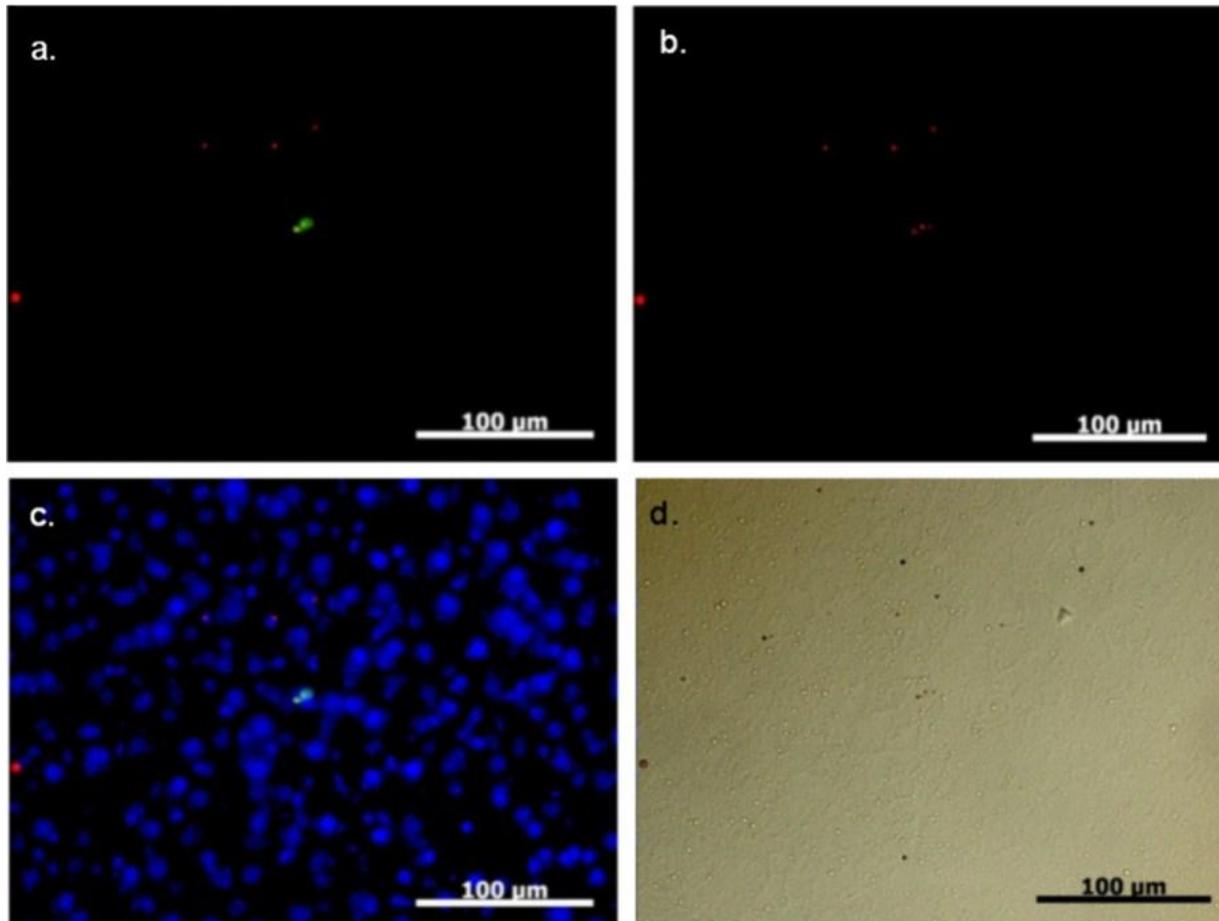


**Abb. 47:** Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie der Milz der Knockout-Tiere nach intravenöser Zellinjektion

**a)** Im Grünkanal zur Darstellung der Zellproteine, gefärbt mit CFSE, findet sich kein Signal. Im Rotkanal zur Darstellung der mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel zeigen sich einzelne Partikel. **b)** Im Rotkanal zur Darstellung der mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel zeigen sich frei liegende einzelne Partikel. **c)** Im Grünkanal zur Darstellung der Zellproteine zeigt sich kein Signal. Im Rotkanal finden sich einzelne frei liegende Partikel. Die mit DAPI gefärbten Zellkerne kommen blau zur Darstellung. **d)** Der Phasenkontrast zeigt die Struktur des Leberparenchyms und einzelne freiliegende Partikel.

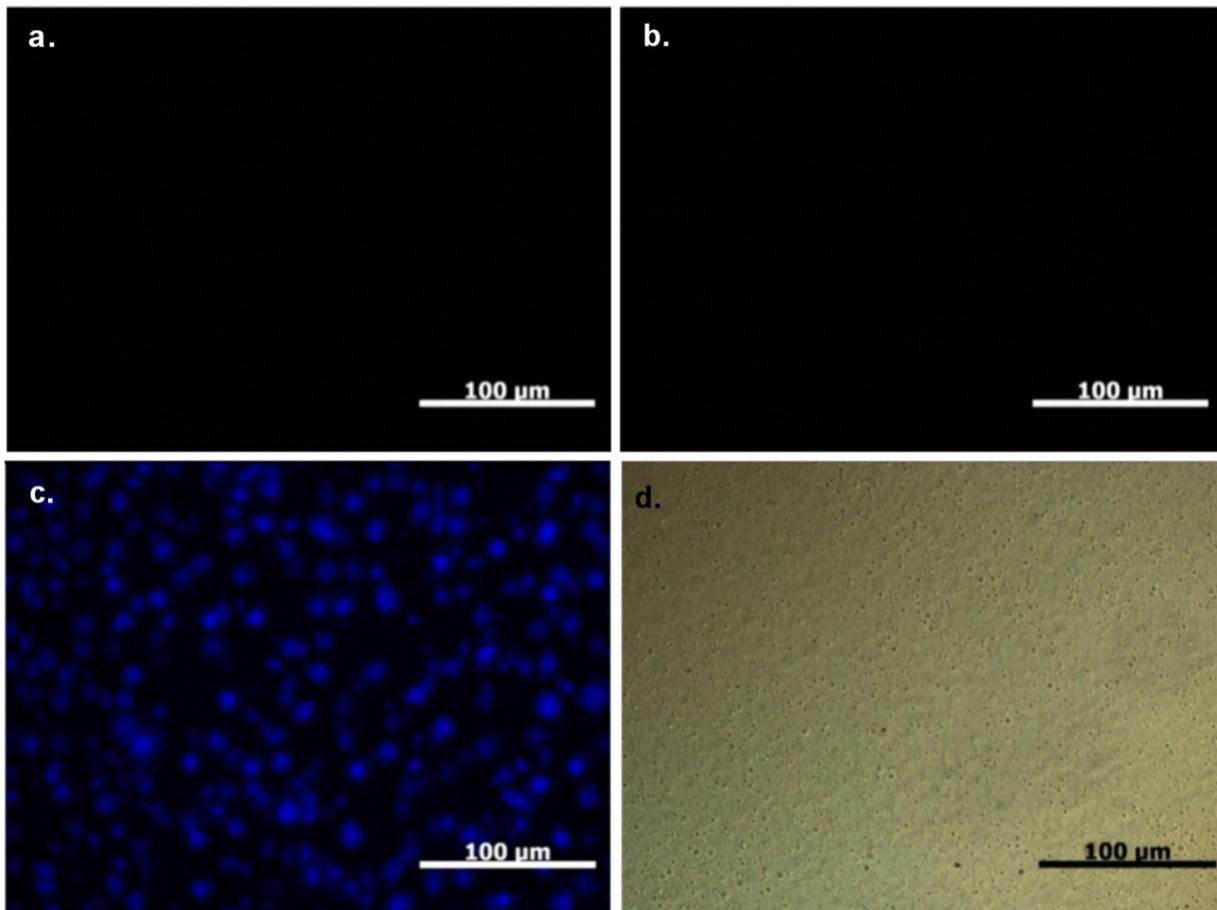
#### 4.3.3.3 Intraperitoneale Injektion

Die histologische Aufarbeitung der Lebern der Wildtyp-Mäuse nach intraperitonealer Zellinjektion zeigte durchschnittlich 0,7 intakte Zellen und 4,3 freie Partikel pro Blickfeld (Abbildung 48). In den Milzen der Wildtyp-Mäuse zeigten sich durchschnittlich 4,3 intakte Zellen und 8,6 freie Partikel pro Gesichtsfeld (Abbildung 50). Leber und Milz der Knockout-Mäuse waren fast vollständig frei von Partikeln und Zellen (Abbildung 49 und 51). Bei der Sektion der Tiere fiel auf, dass sich in der Peritonealhöhle der Knockout-Tiere an der Stelle der Zellinjektion sehr viele Partikel angesammelt hatten (Abbildung 52). Bei den Wildtyp-Mäusen war dies nicht der Fall.



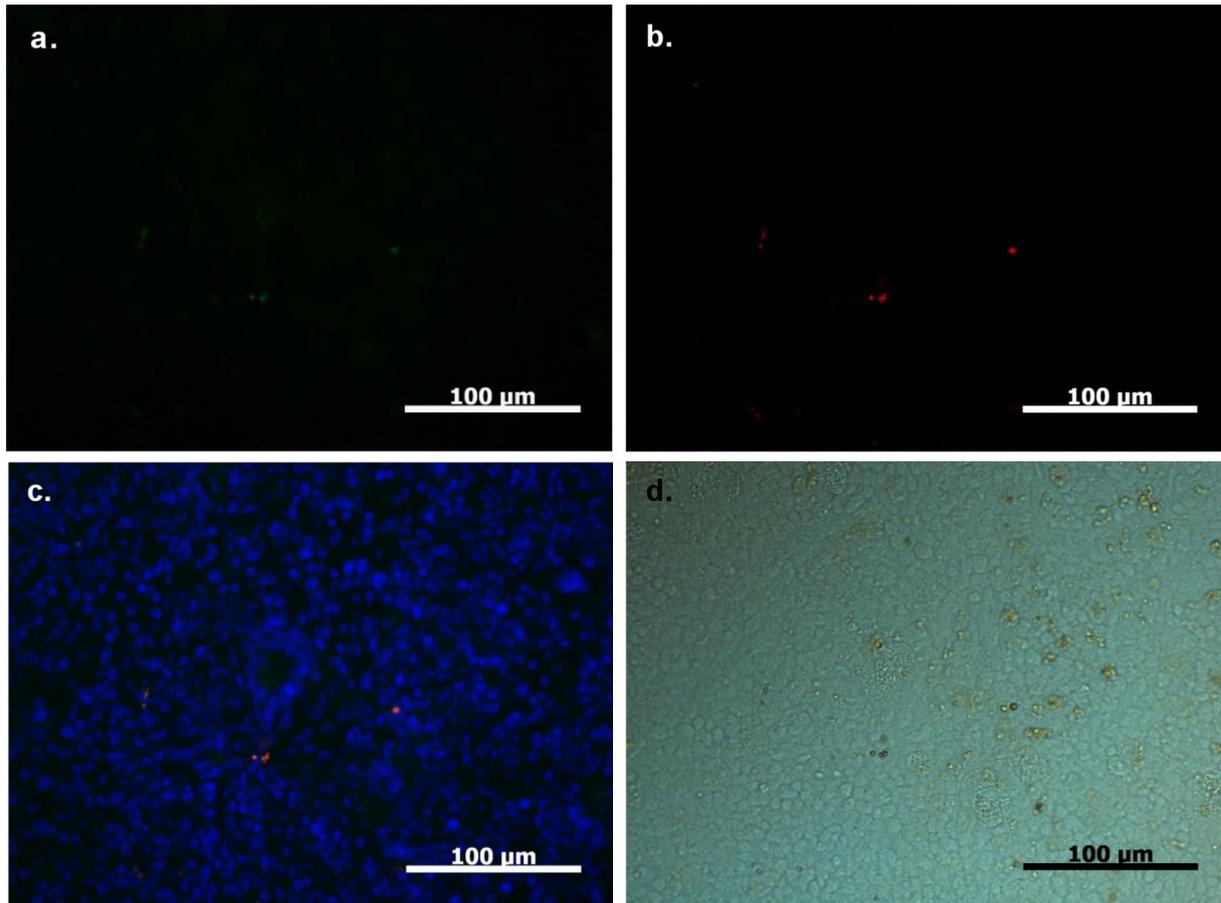
**Abb. 48:** Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie der Leber der Wildtyp-Mäuse nach intraperitonealer Zellinjektion

**a)** Zellproteine, gefärbt mit CFSE, kommen grün zur Darstellung. Die Partikel, mit Suncoast Yellow gefärbt, kommen rot zur Darstellung. **b)** Die Partikel, mit Suncoast Yellow gefärbt, kommen, intrazellulär gruppiert und einzeln frei liegend, rot zur Darstellung. **c)** Die Zellproteine, gefärbt mit CFSE, kommen grün zur Darstellung, die mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel kommen intrazellulär und frei im Gewebe liegend rot zur Darstellung. Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt und kommen blau zur Darstellung. **d)** Der Phasenkontrast zeigt die Struktur des umgebenden Leberparenchyms. Es zeigt sich eine einzelne intakte Zelle, mit intrazellulär gelegenen Partikeln. Es finden sich auch freie Partikel als rote Signale in **b)** ohne Äquivalent in **c)**. Es liegen sowohl intakte Zellen als auch freiliegende Partikel vor.



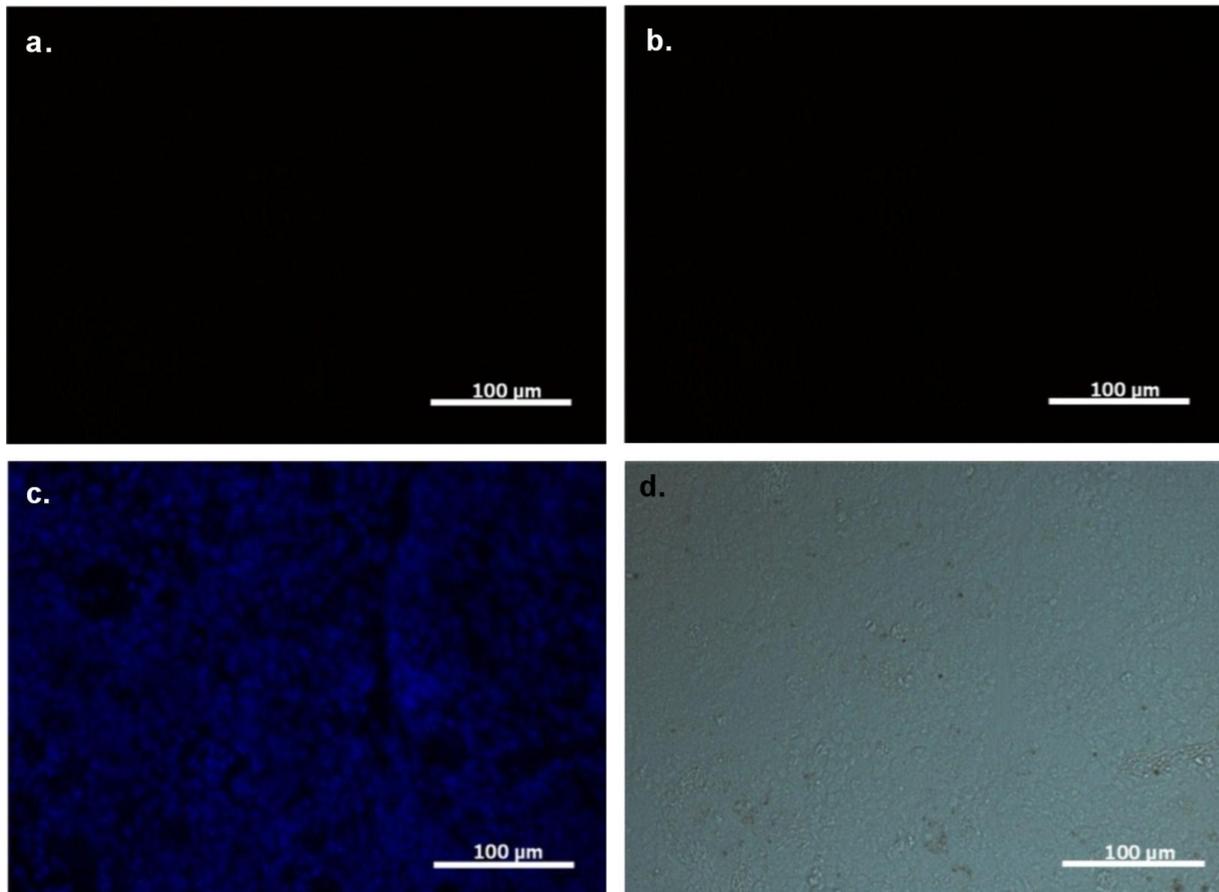
**Abb. 49:** Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie der Leber der Knockout-Mäuse nach intraperitonealer Zellinjektion

**a)** Im Grünkanal zur Darstellung der Zellproteine, gefärbt mit CFSE, sowie im Rotkanal zur Darstellung der mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel zeigt sich kein Signal. **b)** Im Rotkanal zur Darstellung der mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel zeigt sich kein Signal. **c)** Im Rot- und Grünkanal zur Darstellung der Zellproteine und der Partikel zeigen sich keine Signale. Die mit DAPI gefärbten Zellkerne kommen blau zur Darstellung. **d)** Der Phasenkontrast zeigt die Struktur des Leberparenchyms. Es finden sich keine Zellen oder Zellreste in den Lebern der Knockout-Mäuse.



**Abb. 50:** Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie der Milz der Wildtyp-Tiere nach intraperitonealer Zellinjektion

**a)** Im Grünkanal zur Darstellung der Zellproteine, gefärbt mit CFSE, findet sich kein Signal. Im Rotkanal zur Darstellung der mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel zeigen sich einzelne Partikel. **b)** Im Rotkanal zur Darstellung der mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel zeigen sich frei liegende einzelne Partikel. **c)** Im Grünkanal zur Darstellung der Zellproteine zeigt sich kein Signal. Im Rotkanal finden sich einzelne frei liegende Partikel. Die mit DAPI gefärbten Zellkerne kommen blau zur Darstellung. **d)** Der Phasenkontrast zeigt die Struktur der Milzpulpa und einzelne Partikel. Es finden sich keine intakten Zellen, jedoch multiple frei liegende Partikel in den Milzen der Wildtyp-Mäuse.



**Abb. 51:** Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie der Milz der Knockout-Mäuse nach intraperitonealer Zellinjektion

**a)** Im Grünkanal zur Darstellung der Zellproteine, gefärbt mit CFSE, sowie im Rotkanal zur Darstellung der mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel zeigt sich kein Signal. **b)** Im Rotkanal zur Darstellung der mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel zeigt sich kein Signal. **c)** Im Rot- und Grünkanal zur Darstellung der Zellproteine und der Partikel zeigen sich keine Signale. Die mit DAPI gefärbten Zellkerne kommen blau zur Darstellung. **d)** Der Phasenkontrast zeigt die Struktur des Leberparenchyms. Es finden sich keine Zellen oder Zellreste in den Milzen der Knockout-Mäuse.

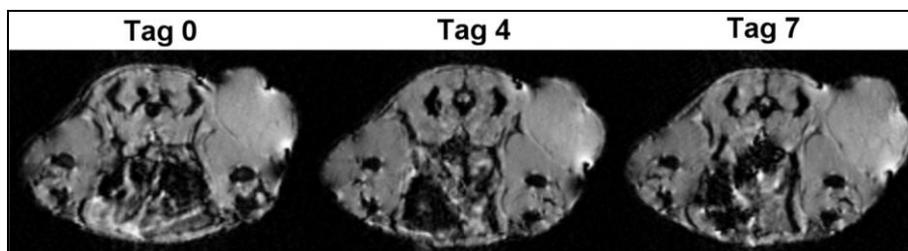


**Abb. 52:** Photographie des Bauchsitus einer Knockout-Maus nach intraperitonealer Zellapplikation  
Flächige Ansammlungen von Partikeln sind an der Applikationsstelle im linken Unterbauch der Maus als braunrötliche Flecken zu erkennen. Diese waren bei den Wildtyp-Mäusen nicht vorhanden. Dies spricht für ein frühes Absterben der MSZ in den Knockout-Mäusen.

#### 4.4 Untersuchung des Migrationsverhaltens multipotenter mesenchymaler Stromazellen in einem Tumormodell in E-/P-Selektin-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen

##### 4.4.1 Magnetresonanztomographische Untersuchung in vivo

Die magnetresonanztomographische Untersuchung von MSZ hinsichtlich ihrer Fähigkeit in HT29-Tumoren einzuwandern zeigte im Zeitverlauf keine Auslöschungsartefakte und keinen signifikanten Abfall des SNR als Surrogat für eingewanderte Zellen. Der Tumor stellt sich in der gezeigten axialen 2D GRE-Sequenz über den Untersuchungszeitraum homogen dar (Abbildung 53).

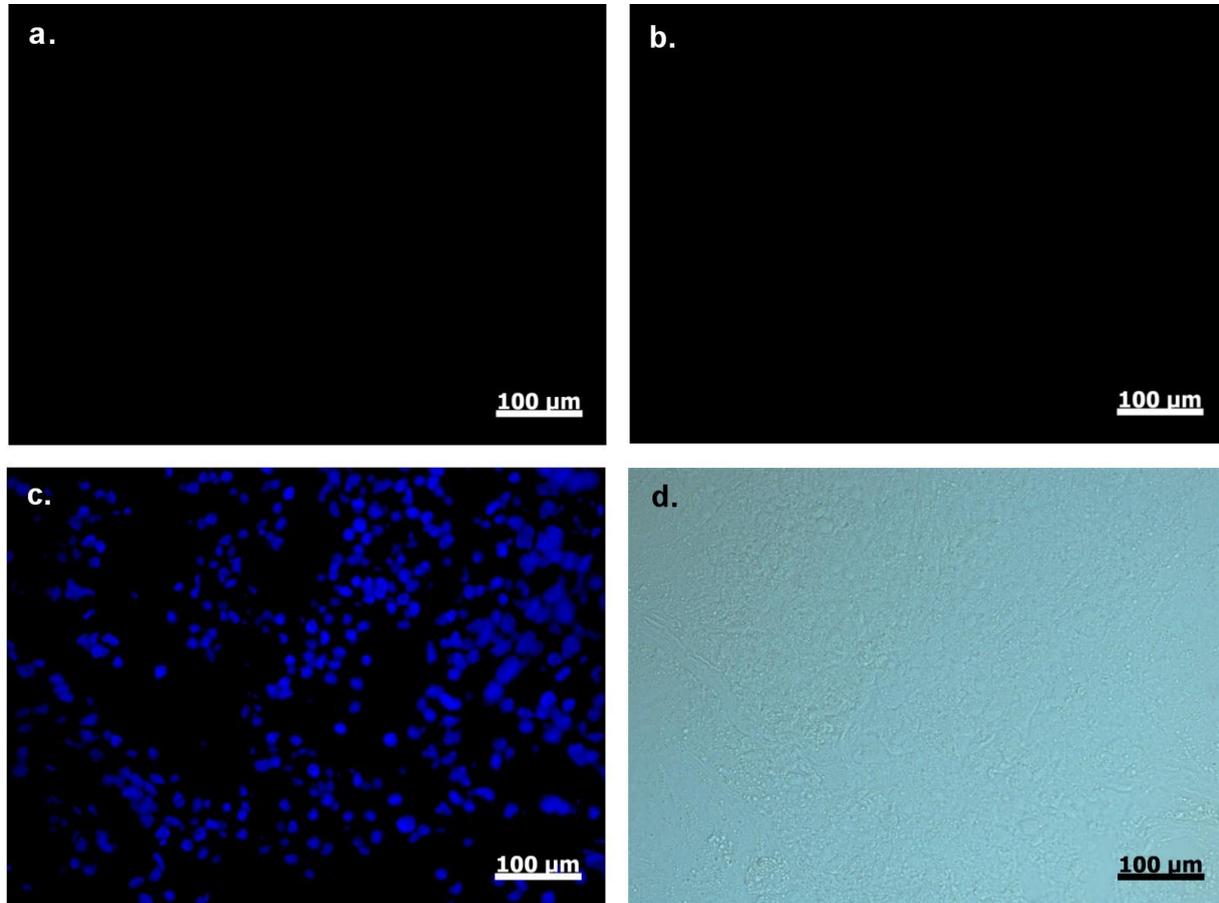


**Abb. 53:** MRT der HT29-Tumoren im Verlauf nach intravenöser Zellinjektion

In der axialen 2D GRE-Sequenz stellen sich die Tumore vor und nach Zellinjektion im Verlauf homogen dar. Einen MR-tomographischen Hinweis auf eingewanderte Zellen (Auslöschungsartefakte, Signalverlust) finden sich nicht.

#### 4.4.2 Histologische Auswertung

Die Mikroskopie der HT29 Tumoren zeigte keinerlei Zellen oder freie Partikel (Abbildung 54).



**Abb. 54:** Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie der Tumoren der Wildtyp-Mäuse nach intravenöser Zelinjektion

**a)** Im Grünkanal zur Darstellung der Zellproteine, gefärbt mit CFSE, sowie im Rotkanal zur Darstellung der mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel zeigt sich kein Signal. **b)** Im Rotkanal zur Darstellung der mit Suncoast Yellow gefärbten Partikel zeigt sich kein Signal. **c)** Im Rot- und Grünkanal zur Darstellung der Zellproteine und der Partikel zeigen sich keine Signale. Die mit DAPI gefärbten Zellkerne kommen blau zur Darstellung. **d)** Der Phasenkontrast zeigt die Struktur des Tumorstromas. Es finden sich keine Zellen oder Zellreste in den Tumoren der Wildtyp-Mäuse.

Aus den Ergebnissen lassen sich die einleitend gestellten Fragen wie folgt zusammenfassend beantworten:

- Die magnetische Markierung von MSZ mittels eisenoxidhaltigen Mikropartikeln und CFSE ist ohne Beeinflussung der Zellvitalität und der Expression charakteristischer Oberflächenmarker möglich.
- Diese Doppelmarkierung ermöglicht die Detektion einzelner MSZ in verschiedenen Geweben mittels histologischer Methoden.
- Der in vivo Nachweis einzelner magnetisch markierter MSZ mittels eines klinischen 3.0T MR-Tomographen unter Verwendung von Kleintierempfangsspulen und hochauflösenden Gradientenecho-Sequenzen (GRE) ist möglich.
- Unter Berücksichtigung der verschiedenen Applikationsformen – intravenös, intrakardial, intraperitoneal – zeigt sich ein unterschiedliches Verteilungs- und Degradationsverhalten der MSZ in E-/P-Selektin-defizienten Doppelknockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Selektine scheinen eine bedeutende Rolle für Auswanderung von MSZ aus der Peritonealhöhle, sowie dem Blutstrom zu spielen. Insbesondere bei der Migration in Gehirn, Leber, Milz und Knochenmark.
- Ein xenotransplantierte Tumor der humanen Adenokarzinom-Zelllinie HT29 veranlasst MSZ in Wildtyp-Mäusen nicht zum Einwandern in das vom Tumor geschädigte Areal.

## 5 Diskussion

### 5.1 Markierung von multipotenten mesenchymalen Stromazellen zur Detektion mittels Magnetresonanztomographie und Fluoreszenzmikroskopie

In dieser Studie zur Untersuchung des Migrationsverhaltens multipotenter mesenchymaler Stromazellen im Selektin-defizienten Mausmodell unter Verwendung der Magnetresonanztomographie und histologischer Methoden konnte eine Doppelmarkierung multipotenter mesenchymaler Stromazellen mit rot fluoreszierenden Eisenoxid-Mikropartikeln und dem grün fluoreszierendem Cytoplasma-Farbstoff CFSE ohne wesentliche Einflussnahme auf die Zellvitalität und die Expression sowohl charakteristischer Stammzell-Oberflächenmarker als auch von Selektin-Bindungsstellen gezeigt werden. Durch die Markierung blieb die chondrogene Differenzierungskapazität der MSZ ebenfalls unbeeinflusst. Dies zeigt, dass auch längerfristig durch die Doppelmarkierung keine Störung in den Zellen hervorgerufen wird. Die Verwendung dieser großen Eisenoxidpartikel zur Zellmarkierung wurde von Shapiro et al. 2005 eingeführt. Diese Partikel haben den Vorteil, dass sie aufgrund ihres großen Eisenoxidkerns ausgeprägte lokale Magnetfeldinhomogenitäten erzeugen. Sie liefern eine deutliche Signaländerung, besonders in T2\* gewichteten Sequenzen, so dass sogar einzelne dieser Partikel mit der MRT detektiert werden können (Shapiro et al., 2004). Dieser Effekt wird durch die von Hinds et al. 2003 beschriebene und hier konfokalmikroskopisch gezeigte endosomale Zusammenlagerung zu Konglomeraten zusätzlich verstärkt (Bowen et al., 2002). Die Fluoreszenzdoppelmarkierung mit rot fluoreszierenden Mikropartikeln und dem grün fluoreszierendem CFSE erlaubte eine gute Detektion einzelner Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 7). Ebenso war die Unterscheidung zwischen Makrophagen, die einzelne freigesetzte Partikel phagozytierten, und intakten MSZ möglich. Es wurde ein besonderes Augenmerk auf mögliche Auswirkungen dieser Markierung auf die Vitalität der MSZ und ihre speziellen Eigenschaften, wie Oberflächenmarkerexpression und chondrogene Differenzierung, gelegt. Die Reinheit und der Phänotyp multipotenter, mesenchymaler Stromazellen wurde in vitro über den Nachweis von CD44, CD90, CD105 und Sca-1 als Marker für MSZ und die Abwesenheit von CD34 und CD45 zum Ausschluss von hämatopoetisch differenzierten Zellen überprüft (Schrepfer et al., 2007a). Es konnten die Selektin-Hauptbindungsstellen CD15s und CD162 (Becker-Andre et al., 1992; Kansas, 1996; Weller et al., 1992) sowie die generelle Fähigkeit, E- und P-Selektin zu binden, vor und nach Doppelmarkierung der Zellen gezeigt werden. Im Vergleich doppelt markierter Zellen zu den lediglich mit CFSE markierten

Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Zellproliferation. Das oben genannte, für MSZ typische Oberflächenexpressionsprofil konnte vor und nach Markierung der Zellen nachgewiesen werden. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die osteogene und adipogene Differenzierung von MSZ durch Markierung der Zellen mit Eisenoxidpartikeln nicht beeinflusst wird. Bezüglich der chondrogenen Differenzierung kommen sie zu unterschiedlichen Ergebnissen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass diese sensibel auf Eisenbeladung reagiert (Arbab et al., 2004; Kostura et al., 2004).

In dieser Studie zeigte sich eine positive chondrogene Induktion innerhalb von sieben Tagen durch Färbung auf knorpelspezifisches Glykosaminoglykan. Der mit der beschriebenen Methode erreichte durchschnittliche zelluläre Eisengehalt betrug 24 pg und befindet sich in dem auch von anderen Arbeitsgruppen als nicht toxisch bewerteten Bereich (Arbab et al., 2004; Ittrich et al., 2005; Sun et al., 2005). Daher ist nach unseren Befunden eher zu schließen, dass die Eisenbeladung keine funktionelle Rolle spielt.

Zusammenfassend kann die beschriebene Methode als geeignet angesehen werden, um MSZ mittels MRT in vivo zu detektieren und ihre Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie zu bestätigen.

Weiterer Optimierungsbedarf besteht bei der Auswahl der Fluoreszenzfarbstoffe. Es zeigte sich, dass eine Vitalitätsbeurteilung mit Propidiumiodid an markierten Zellen aufgrund des Crosstalks der verschiedenen Fluoreszenzsignale sehr aufwendig war. Gleiches gilt für die Detektion von Oberflächenmolekülen. Es gilt hier vor allem Partikel mit einem engeren Fluoreszenzspektrum und dem zufolge weniger Crosstalk mit Allophycocyanin zu finden. Eine gute Möglichkeit wären Quantumdots. Ihre Anwesenheit könnte im FACS anhand der Granularität nachgewiesen werden. Sie werden bereits erfolgreich zur Markierung von Immun- und Stammzellen (Li et al., Mrinmoy et al., 2008; Pi et al.) eingesetzt.

Auch bieten die kürzlich vorgestellten InGaP/ZnS quantum dots die Möglichkeit  $F^{19}$  MR-Bildgebung und Fluoreszenzbildgebung unter Verwendung einer Art von Partikel durchzuführen (Lim et al 2010.).  $F^{19}$  MR-Bildgebung ist mit dem in dieser Arbeit verwendeten Gerät jedoch nicht möglich. Der ideale Partikel, z. B. mit einem Magnetitkern und einer äußeren Schicht aus Quantumdots, Dextran ummantelt, bleibt zu erwarten. Ein weiteres Problem der Markierung zeigte sich im Verlauf der Untersuchungen. Das CFSE

bleicht unter Anregung schnell aus und verliert auch über die Zeit im Tier deutlich an Signalstärke. Weiter verlor es sein Signal auch im Zuge des Paraffin-Einbettungsprozesses, so dass nur Gefrierschnitte mit erheblich geringerer morphologischer Aussagekraft angefertigt werden konnten. Bezüglich dieses Problems würde es sich anbieten zukünftige Studien mit GFP transfizierten Zellen durchzuführen. Stabil transfizierte Stammzellen sind bereits beschrieben und verfügbar (Bosch et al., 2006; Lüttichau et al., 2005). Auch bei Differenzierung von lebenden und toten Zellen würde die Verwendung von GFP-transfizierten Zellen helfen. Die valideste Unterscheidung von MSZ und Makrophagen, die freie Partikel aufgenommen haben, könnte eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf das murine Y-Chromosom bringen, wie beispielsweise von Benjamin et al. und Kidder et al., (2008) beschrieben wurde, da nur männliche Zellen in weiblichen Mäusen verwendet wurden.

## **5.2 Nachweis einzelner multipotenter mesenchymaler Stromazellen in Mäusen mittels in vivo Magnetresonanztomographie und Fluoreszenzmikroskopie**

In den in vivo Experimenten konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, einzelne doppeltmarkierte MSZ mit dem MRT zu detektieren. Auffällig war, dass die MRT zur Einzelzelldetektion bei höherer Zellzahl unzuverlässiger wird. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass es bei hoher Dichte der Signalauslöschungen zu einem Verschmelzen selbiger kommt. Da unabhängig ihrer Größe jede Signalauslöschung jedoch nur als eine Zelle gezählt wurde, nimmt die Sensitivität zur Einzelzelldetektion der MRT mit steigender Zellzahl wieder ab.

Zur systemischen Applikation wurde die Injektion der Zellen in die Höhle des linken Ventrikels vorgenommen, ähnlich wie es bereits von Heyn et al., 2006 für markierte Makrophagen gezeigt wurde. Im Gegensatz zur Injektion nach Eröffnung des Brustkorbs verwendeten wir eine minimalinvasive, ultraschallgesteuerte Injektionsmethode, die von Springer et al. (2005) zur intramyokardialen Applikation als sicher beschrieben wurde. Alle Tiere überlebten diese Prozedur ohne Folgeschäden oder sonstige Beeinträchtigungen. Ähnlich wie Makrophagen sind MSZ in Suspension mit einem Durchmesser von 15-20 µm relativ große Zellen, so dass sie sich nach systemischer Applikation zunächst in den kleinen Kapillaren ansammeln (Schrepfer et al., 2007b). Eine wirklich verlässliche und quantifizierbare Einzelzelldetektion war in dieser Arbeit jedoch auf das ZNS der Tiere beschränkt (Abbildung 17 und 28). Im Abdomen konnten mit der MRT nur einige unscharf

begrenzte Signalauslöschungen im Nierenkortex (Abbildung 18) als Hinweis auf einzelne angereicherte MSZ gefunden werden. Die SNR-Analysen zeigten bis auf das ZNS nach Applikation der höchsten Zelldosis von 50.000 Zellen keine signifikanten Signalunterschiede vor und nach Applikation markierter MSZ. Der leichte Anstieg des SNR nach Applikation von 5000 Zellen (Tabelle 4) ist auf vermehrte Bewegungsartefakte aufgrund einer suboptimalen Narkose bei einem der Tiere zurückzuführen. Das Ausmaß dieser Varianzen liegt jedoch in dem Bereich der Standardabweichung, die sich auch in den anderen Gruppen findet und ist nicht statistisch signifikant. Generell muss davon ausgegangen werden, dass einige wenige MSZ, auch wenn sie sich in den hochauflösten MRT Bildern deutlich abzeichnen, keinen Einfluss auf das SNR der Organe (Tabelle 4) haben, und folglich hierdurch nicht quantifiziert werden können. Dies ist auf den Partialvolumeneffekt des umgebenden Gewebes innerhalb einer ROI zurückzuführen. Der limitierende Faktor bei der Untersuchung des Abdomens waren die Atembewegungen der Tiere, daher konnte die hochauflösende 3D GRE Sequenz, die für die Einzelzelldetektion im ZNS entwickelt wurde, nicht für das Abdomen eingesetzt werden. Für das Abdomen wurde eine für Bewegungsartefakte weniger anfällige 2D GRE Sequenz verwendet. Auch wenn diese Sequenz mit derselben axialen Auflösung wie die 3D Sequenz von  $200 \times 200 \mu\text{m}$  angefertigt werden konnte, konnte nur eine minimale Schichtdicke von  $500 \mu\text{m}$  mit dem vorhandenen Gradienten und Empfangssystem des klinischen Scanners erreicht werden. In-vitro-Studien zur Optimierung des Maus-Scanprotokolls zeigten jedoch mit beiden Sequenzen eine verlässliche Detektion der doppeltmarkierten Einzelzellen im Gelphantom.

Ein weiteres Ziel dieser Studie war die Darstellung einzelner MSZ im Abdomen ohne Verwendung einer Atemtriggerung. Es sollte nur mit flacher Atmung unter Ketamin/Xylazine-Narkose gearbeitet werden. Es wurde versucht, die feinen Bewegungsartefakte durch die Erhöhung der Aquisitionen auf bis zu  $n = 4$  auszugleichen. Dennoch konnten die mikroskopisch auch in anderen Organen detektierten Einzelzellen mit dem MRT nur in der Niere wiedergefunden werden. Die Nieren haben zwar ein mit der Leber vergleichbares SNR, sind jedoch durch ihre retroperitoneale Lage deutlich weniger Atembewegungen ausgesetzt. Um auch in anderen Organen Einzelzellen detektieren zu können, kann eine Atemtriggerung helfen, wie sie bei speziellen Kleintier-MRT-Anlagen mittels spezieller Triggereinheiten standardmäßig verwendet werden kann. Mit derartigem Equipment wurden einzelne Zellen bereits in der Leber nachgewiesen (Shapiro et al., 2006). Eine adäquate Atemtriggerung für Kleintiere und im speziellen für Mäuse an einem

klinischen MRT zu realisieren ist sehr aufwendig, da die Umwandlung des physiologischen Signals einer Maus in ein für den klinischen Scanner verständliches Signal oftmals, wenn nicht an Amplitude und Frequenz des Signals, dann an herstellerspezifischen Voreinstellungen scheitert. Somit bleibt es weiterhin eine Herausforderung, eine Atemtriggerung für Kleintiere an einem klinischen MRT zu realisieren (Inderbitzin et al., 2007).

Die Möglichkeit, doppelmarkierte MSZ bis hin zur einzelnen Zelle im lebenden Tier wiederfinden zu können, kombiniert mit der Möglichkeit, MRT-Messungen wiederholt durchführen zu können, ist interessant, da sich nach systemischer Applikation nur ein geringer Prozentsatz der eingebrachten MSZ im Knochenmark und anderen Organen wiederfinden lässt (Bensidhoum et al., 2004). Die hochauflösende MRT ermöglicht ein dynamisches, sensitives Tracking von Zellen für verschiedene Organe. Der Abstand zwischen zwei Messungen ist dabei lediglich durch die Narkose auf ca. 12 Stunden limitiert und würde sich unter Verwendung einer Inhalationsnarkose mittels Isofluran weiter reduzieren.

Die in vivo Detektion von einzelnen, magnetisch markierten Zellen mittels MRT konnte bisher mit selbstgebauten einschiebbaren Gradientensystemen in Kombination mit kombinierten Sende- und Empfangsspulen (Heyn et al., 2006) und mit einem 7,0T Kleintier-MRT-System (Shapiro et al., 2006) gezeigt werden. In dieser Studie hingegen konnte erstmals die in vivo Einzelzellbildung unter der Verwendung eines klinischen 3,0T MRT Systems und einer kommerziell erhältlichen Kleintierempfangsspule realisiert werden. Mit einer Untersuchungszeit von 30 Minuten pro Tier, welche sich einfach mit einer intraperitonealen Ketamin/Xylazine-Narkose überbrücken lässt, ist diese Methode auch zur Untersuchung größerer Versuchstierkohorten einfach und praktisch durchführbar.

Der beschriebene Ansatz mit doppelmarkierten Zellen sowie die Bildgebungsverfahren dieser Studie sind für die experimentelle Anwendung in Mäusen ausgelegt, eine Überführung ähnlicher Techniken zu hochauflösendem MRT am Menschen scheint jedoch in der Zukunft möglich zu werden. Bereits jetzt können MRT Untersuchungen des Muskuloskelettsystems bei 7,0T mit einer Auflösung von  $156 \times 156 \times 500 \mu\text{m}$  angefertigt werden (Krug et al., 2009), was sich im Bereich der für die Einzelzelldetektion im Abdomen der Maus verwendeten 2D GRE Sequenz befindet. Über den experimentellen Bereich hinaus wurden erste klinische Studien mit Zellen durchgeführt, welche mit bereits klinisch zugelassenen Eisenoxidpartikeln

markiert wurden (de Vries et al., 2005; Toso et al., 2008). Diese Kontrastmittel können ebenfalls dazu verwendet werden MSZ zur Einzelzelldetektion zu markieren (Peldschus et al., 2007). So könnte beispielsweise das Homing von MSZ nach Applikation zur minimalinvasiven Knorpelreparatur mit dem MRT dargestellt werden (Koga et al., 2009). Eine generelle Limitation dieses Projektes ist, dass nur murine MSZ verwendet wurden, da der Einwanderungsprozess humaner MSZ in immundefizienten Mäusen bereits gezeigt worden ist (Bensidhoum et al., 2004; Erices et al., 2003). Sowohl die beschriebene Doppelmarkierung, als auch die Bildgebungsverfahren sind sicherlich auch mit humanen MSZ möglich, müssen aber im Detail noch untersucht werden.

### **5.3 Untersuchung der Migration und Degradation multipotenter mesenchymaler Stromazellen in E-/P-Selektin-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen**

In dieser Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass doppelmarkierte multipotente mesenchymale Stromazellen die grundsätzliche Fähigkeit besitzen, mit E- und P-Selektinen, sei es auf der Endothelzelloberfläche kleiner Gefäße und Kapillaren oder auf dem Peritoneum, zu interagieren. Weiter wurde deutlich, dass MSZ vor und nach der beschriebenen Doppelmarkierung die Hauptbindungspartner von E- und P-Selektinen tragen, nämlich CD15s (Hidalgo et al., 2007) und CD162 (Moore et al., 1995; Yang et al., 1999), welche die initiale Anheftung von Leukozyten und Granulozyten an die Gefäßwand vermitteln und damit den vielschrittigen Prozess der Einwanderung dieser Zellen in ein Gewebe ermöglichen (Butcher, 1991; Springer, 1994). Auch konnte CD44, ebenfalls ein wichtiger E-Selektin-Bindungspartner (Hidalgo et al., 2007; Katayama et al., 2005; Zhu et al., 2006), auf der Oberfläche der MSZ nachgewiesen werden. In Abhängigkeit von der Applikationsart konnten Unterschiede in der Verteilung, Verteilungsdynamik und Degradation doppelmarkierter MSZ in Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu E- und P-Selektin-Doppeltknockout-Mäusen erkannt werden.

Nach intrakardialer Injektion von 50.000 MSZ zeigte sich, dass MSZ nur in den Wildtyp-Tieren auch an Tag 4 und 7 nach Injektion noch im ZNS nachgewiesen werden konnten. Dies deutet darauf hin, dass ein kleiner Teil der applizierten MSZ eine selektinvermittelte Extravasation vollzieht. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die E-Selektin-Expression auf dem Endothel von Gehirnkapillaren eine wichtige Rolle bei entzündlichen Prozessen wie MS, Encephalitis, Vaskulitis, Meningitis und Infarkten spielt

(Cannella and Raine, 1995; Clark et al., 1991; Dorovini-Zis, 1992; 1993). Neueste Studien beschreiben, dass die Blut-Hirnschranke bei vorhandener P-Selektin-Expression nach einer transienten Ischämie stärker durchlässig wird, als bei Tieren mit Knockdown der Selektin-Expression (Jin et al 2007.). Es ist zu vermuten, dass auch in dieser Arbeit eine minimale transiente Ischämie durch die zellulären Embolien in den Endstromgefäßen ausgelöst wurde. So konnte vermutlich der Prozess der Einwanderung der MSZ über eine Hochregulation von P- und E-Selektin vermittelt werden. Andere Adhäsionsmoleküle, denen bei der Zellmigration im ZNS eine Rolle zugesprochen wird wie VCAM-1 oder ICAM-1 (Wong et al., 2007), scheinen für die Extravasation der MSZ eine nachgestellte Rolle zu spielen. Yang et al. (2009.) konnten zeigen, dass MSZ in von Ischämie geschädigte Hirnareale einwandern und sich positiv auf die Regeneration von Neuronen auswirken, Rice et al. (2009) demonstrierten, dass MSZ auf Chemokine, die bei Demyelinisierungsvorgängen ausgeschüttet werden, in das Gehirn einwandern und dort positiv auf Reparaturvorgänge wirken (Rice et al. and Scolding et al., 2009). Beides sind Hinweise darauf, dass MSZ an natürlichen Heilungsprozessen auch im Hirn beteiligt sind. Reddy et al (2002) zeigten, dass MSZ dieses Potenzial auch nach Markierung mit Eisenoxidpartikeln nicht verlieren.

Im Gegensatz dazu konnten die initial in den Nierengefäßen gefundenen MSZ bei keiner der beiden Gruppen an Tag 4 und 7 wieder nachgewiesen werden. Dies kann an einem höheren Scherstress in den Nierengefäßen oder an mangelndem Stimulus zur Extravasation in das Nierenparenchym liegen. Ein adäquater Stimulus kann, wie von Park et al., (2010) gezeigt, eine Ischämie sein, die in dieser Studie jedoch nicht vorlag. Brunswig-Spickenheier et al. konnten zeigen, dass MSZ aus Schweinen nicht die selben regenerativen Eigenschaften (Gupta et al., 2002; Herrera et al., 2004; Kale et al., 2003; Morigi et al., 2004; Poulsom et al., 2001; Ricardo and Deane, 2005) bei akuter Nierenschädigung haben (Brunswig-Spickenheier et al., 2009). Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass ähnliches auch für murine MSZ gelten könnte.

Die Limitation der intrakardialen Injektionsmethode ist die sehr geringe Zellzahl, die zwar zum Studium von einzelnen Zellen im ZNS geeignet ist, für therapeutische Ansätze jedoch zu gering erscheint. Auch dies kann ein Grund dafür sein, dass in der Niere keine Extravasation beobachtet werden konnte. Eine intrakardiale Applikation größerer Zellzahlen könnte bei den Mäusen multiple Gefäßverschlüsse und somit einen Apoplex verursachen.

Nach intravenöser Applikation von  $10^6$  MSZ zeigte sich ein signifikant höherer initialer SNR-Verlust in der Leber der Knockout-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Ein weiterer Signalabfall in den Lebern der Wildtyp-Mäuse zeigte sich von Tag 4 auf Tag 7 und beschreibt eine andere Dynamik der Degradation und Verteilung der Zellen. Der initial stärkere Signalabfall in den KO-Tieren lässt sich dadurch erklären, dass die Zellen keine Möglichkeit hatten, aus dem Blutstrom auszuwandern. Bei den Wildtyp-Mäusen war dies anscheinend möglich, wobei zunächst extravasierte oder in den Kapillaren angereicherte MSZ im Verlauf zugrunde gehen und die somit freigesetzten Partikel von Tag 4 auf Tag 7 in die Leber und Milz umverteilt werden. Andere Zellen sind zwischen dem 4. und dem 7. Tag nach Injektion aktiv in Milz, Leber und Knochenmark eingewandert und konnten hier mittels Histologie als intakte Zellen wiedergefunden werden. Ein ähnliches Verteilungsmuster der MSZ wie in unseren WT-Mäusen fanden Bensidhoum et al. (2004) in ihrer Studie zur Verteilung von MSZ. Eine weitere Ursache für die spätere Signaländerung in Leber und Milz wurde bereits von Gao et al. (2001) beobachtet. Sie beschrieben die Tatsache, dass sich die Zellen, die zunächst in der Lunge stecken bleiben, nach einigen Tagen lösen und migrieren. Andere gehen zugrunde und werden in der Leber abgebaut.

Auch nach intravenöser Injektion wird ein Großteil der Zellen im Blutstrom sofort mechanisch zerstört. Desweiteren ist auch hier die maximal applizierbare Zellzahl limitiert. Die Gefahr, eine zelluläre Lungenembolie zu erzeugen, steigt mit steigender Zellzahl und bei limitiertem, maximal applizierbarem Volumen von ca. 200  $\mu$ l zwangsläufig auch mit steigender Zelldichte pro Volumen.

Eine Möglichkeit dafür zu sorgen, dass mehr Zellen die Lunge passieren, stellt die Applikation von Nitroprussid-Natrium als Vasodilatator direkt vor Zellinjektion dar (Gao et al., 2001; Schrepfer et al., 2007b). Ein Problem dieser Methode ist die Toxizität der Abbauprodukte des Wirkstoffes. In der Klinik wird daher mit einer simultan einlaufenden Antidotlösung gearbeitet, was am Kleintier nicht praktikabel ist.

Ein weiteres Problem ist der von Lefer et al. (1999) beschriebene Effekt des NO auf die Expression von P-Selektin und von Lush et al. (2001) auf E- und P-Selektine. Beide Gruppen beschreiben ein umgekehrt proportionales Verhältnis von NO und der Expression der Selektine und damit auch zur Fähigkeit der Anheftung und des Rollens der Zellen auf einer Endothelzellschicht. Da die Dynamik dieses Prozesses nicht vollständig geklärt, es jedoch

anzunehmen ist, dass die Herabregulation der Selektin-Expression nach Nitroprussid-Natrium wenigstens einige Stunden andauert, wurde in dieser Arbeit von dieser Methode abgesehen.

Nach intraperitonealer Zellapplikation zeigten sich signifikante Veränderungen des SNR der Organe nur in den Wildtyp-Tieren. Es war ein signifikanter Signalabfall in der Milz von Tag 1 auf Tag 4, ein kontinuierlicher Signalabfall bis zu Tag 4 in der Leber und ein signifikanter Signalabfall von Tag 0 auf Tag 4 im Knochenmark zu erkennen. In der Niere hingegen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen. Dieses Verteilungsmuster zeigte sich auch bei Gao et al. (2001) bei Untersuchungen an Ratten und MSZ, abgesehen von der beobachteten Akkumulation in der ischämischen Niere. Dies kann daran liegen, dass sich murine MSZ wie oben beschrieben diesbezüglich wie porcine MSZ verhalten. Bei der histopathologischen Präparation der Tiere stellten sich in den Knockout-Mäusen im linken Unterbauch in Höhe der Injektionsstelle agglomerierte, freie Partikel dar. Dies spricht dafür, dass die MSZ in den Knockout-Tieren ohne E- und P-Selektin die Peritonealhöhle nicht verlassen können. Noch unpublizierte Daten der AG Schumacher zeigen, dass E- und P-Selektin in der Bauchhöhle auf dem Peritoneum exprimiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass ein Ovarialkarzinom in E- und P-Selektin-defizienten Tieren signifikant weniger aus der Peritonealhöhle in die Lunge metastasiert als in der WT-Vergleichsgruppe (Unveröffentlichte Beobachtung AG Schumacher).

Gao et al. (2001) beobachteten in ihrer Studie nach intraperitonealer Applikation eine geringere Anreicherung der MSZ in den untersuchten Organen im Vergleich zu der nach intravenöser oder intraarterieller Applikation. Durch Applikation von  $4 \times 10^6$  Zellen konnten eine genügende Auswanderung aus dem Peritoneum erreicht werden. Diese Beobachtungen legen die Schlussfolgerung nahe, dass E- und P-Selektin eine bedeutende Rolle bei der Migration von MSZ aus der Bauchhöhle heraus spielen.

Wenn die MSZ als Paradigma für die metastasierende Tumorzelle genommen wird, sind diese Ergebnisse nicht nur für die selektive, therapeutische Anreicherung von Stammzellen in geschädigtem Gewebe interessant. Selektine können durch Injektion von TNF- $\alpha$  hochreguliert (Mercer-Jones et al., 1999) werden. Dies führt zu einer vermehrten Akkumulation von Stammzellen, wie es bereits von Kim et al. (2009) in einem Herzinfarktmodell gezeigt wurde. Allerdings steigt das Thromboserisiko in dem entsprechenden Bereich (Esmon et al., 2004). Weiterhin sind diese Erkenntnisse für das

Verständnis von Tumormetastasen interessant. Von Thorlacius et al. (1997) wurden keine Anhaltspunkte für ein Anheften und Rollen von HT29, DLD-1 and HCT-8, alle hoch positiv für sialyl-Lewis<sup>x</sup> und sialyl-Lewis<sup>a</sup> (CD15s und CD15a, Hauptbindungspartner des E-Selektins) nach Injektion in einen Ast der Arteria mesenterica superior gefunden. Vielmehr führten sie den initialen Metastasierungsprozess auf ein mechanisches Steckenbleiben der Tumorzellen zurück (Thorlacius et al., 1997). 2010 hingegen präsentierten Köhler et al. signifikant weniger Metastasen in einem HT29 Xenograftmodell in der E- und P-Selektin-defizienten SCID-Maus (Köhler et al., 2010). Vergleicht man diese Ergebnisse mit den beschriebenen unveröffentlichten Daten, den Ergebnissen dieser Studie, den beschriebenen Erkenntnissen über die Einwanderung von MSZ in Entzündungsgebiete, in denen Selektine hochreguliert sind, sowie mit den Ergebnissen von Ruster et al. (2006), dass MSZ auf P-Selektinen in vitro haften und miteinander rollen, so liegt der Schluss nahe, dass die Ergebnisse von Thorlacius et al. (2007) auf die Verwendung eines unphysiologischen Modells zurückzuführen sind. In dem damaligen Versuch stammten die Tumorzellen nicht aus einem soliden Primarius, sondern wurden einfach in die Blutbahn gegeben.

Bedenkt man die Gemeinsamkeiten von Tumorzellen und Stammzellen bezüglich ihres Migrationsverhaltens, so erscheint bemerkenswert, dass die Expression von CD44 mit dem metastatischen Verhalten von humanen Neuroblastomen im SCID-Maus-Xenograft-Modell (Valentiner et al., 2008) positiv korreliert und CD44v4 als wichtiger E-Selektin-Ligand für Brustkrebszellen angesehen werden muss, der die transendotheliale Migration, somit die Metastasierung vermittelt (Zen et al., 2008). Gleichzeitig spielt CD44 die entscheidende Rolle bei der Einwanderung von MSZ in das Knochenmark (Sackstein et al., 2008) und CD15s und CD162 vermitteln die Einwanderung von Prostatakarzinomzellen ins Knochenmark (Dimitroff et al., 2005). Betrachtet man zusätzlich, dass in früheren Studien und in der vorliegenden gezeigt werden konnte, dass MSZ in E- und P-Selektin-defizienten Mäusen nicht ins Knochenmark einwandern können, liegt die These nahe, dass E- und P-Selektine in komplexen Zusammenspiel mit ihren Liganden CD15s, CD15a, CD162 und CD44 bei der Metastasierung in andere Organe und insbesondere in das Knochenmark eine wichtige Rolle spielen. Um diese Phänomene weiter zu untersuchen, wäre es nötig, eine noch bessere Methode zur Quantifizierung der in das Knochenmark und in andere Organe eingewanderten MSZ zu entwickeln. Eine Möglichkeit wäre die selektive Y-Chromosom-PCR (Han et al., 1993), eine weitere die Analyse der Zellen des Knochenmarkes mittels Durchflusszytometrie.

#### **5.4 Untersuchung des Migrationsverhaltens multipotenter mesenchymaler Stromazellen in einem Tumormodell in E-P-Selektin-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen**

Bezüglich der Experimente, ob murine MSZ in einen humanen Xenograft-HT29-Tumor einwandern, kam die vorliegende Studie zu einem negativen Ergebnis. Andere Arbeitsgruppen konnten mit ähnlichen Methoden zeigen, dass sowohl endotheliale Vorläuferzellen (Arbab et al., 2006) als auch mesenchymale Stammzellen (Stagg, 2008) in solide Tumoren wie in Gliome (Xu et al., 2005) oder Lungenmetastasen (Loebinger et al., 2009) einwandern. Letzteres konnte auch mit magnetisch markierten Zellen im MRT nachgewiesen werden. Dieser Versuch als Homingmodell wird mit einem mauseigenen Tumor oder einem sekretorisch aktiverem Tumor wie einem Gliom wiederholt werden.

## 6 Zusammenfassung

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurden eine Methode zur in vivo MRT-Bildgebung einzelner, multipotenter mesenchymaler Stromazellen etabliert und die MRT Befunde mit histologischen Befunden korreliert. Zu diesem Zweck wurden MSZ mit eisenoxidhaltigen, rot fluoreszierenden Mikropartikeln und einem grün fluoreszierenden zytoplasmatischem Farbstoff markiert. Mittels der Atomabsorptionsspektrometrie erfolgte die Evaluation des optimalen zellulären Eisengehalts zur magnetresonanztomographischen Detektion einzelner MSZ. Die immunhistochemische und durchflusszytometrische Charakterisierung der so markierten Zellen zeigte, dass die magnetische Markierung von MSZ mittels eisenoxidhaltigen Mikropartikeln und CFSE ohne Beeinflussung der Zellvitalität und der Expression charakteristischer Oberflächenmarker möglich ist.

Anschließend wurde nach ultraschallgesteuerter intrakardialer Applikation der doppelt markierten Zellen in vivo MRT-Bildgebung und histologische Aufarbeitung der Organe der Versuchstiere vorgenommen. Der in vivo Nachweis einzelner MSZ mittels eines klinischen 3,0 T MR-Tomographen unter Verwendung von Kleintierempfangsspulen und hochauflösenden Gradientenecho-Sequenzen (GRE) konnte erbracht werden. Diese einzelnen Zellen konnten ex vivo mittels Fluoreszenzmikroskopie in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden.

Das Migrations- und Degradationsverhalten markierter MSZ unter Berücksichtigung von intravenöser, intrakardialer und intraperitonealer Applikation in E-/P-Selektin-defizienten Doppelknockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen wurde über sieben Tage täglich mittels der magnetresonanztomographisch bestimmten SNR-Veränderungen und nach Tötung der Tiere mittels Fluoreszenzmikroskopie von Leber, Milz und Hirn untersucht. Nach allen Applikationsformen zeigte sich ein unterschiedliches Migrations- und Degradationsverhalten der MSZ in E-/P-Selektin-defizienten Doppelknockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. So konnten die Zellen beispielsweise nach intraperitonealer Applikation in den KO-Mäusen das Peritoneum nicht verlassen, wohingegen in den WT-Tieren eine normale Migration möglich war. Es konnte somit die hohe Signifikanz der Selektine für die Stammzellmigration gezeigt werden.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

- °C Grad Celsius
- 2D zweidimensional
- 3D dreidimensional
- AAS Atomabsorptionsspektrometrie
- Abb. Abbildung
- bzw. beziehungsweise
- c Centi
- CD Cluster of differentiation (Unterscheidungsgruppen)
- Cor. Coronal
- DMSO Dimethylsulfoxid
- DNA Desoxyribonukleinsäure
- Doppel-KO Doppelknockoutmäuse
- EDTA Ethylendiamintetraacetat
- Em. Emission
- Ex. Exzitation (Anregung)
- FA Flipwinkel (Flip Angle)
- et. al. lat: et aliter (und weitere)
- FACS Fluorescence Activated Cell Sorter
- FCS Fetales Kälberserum (Fetal calf serum)
- for. vorwärts (forward)
- FOV Blickfeld
- g Gramm
- G Gauge
- GRE Gradientenechosequenz
- Ig Immunglobulin
- In vitro im Reagenzglas (lat. vitrum, i, n: das Glas)
- in vivo im Lebenden (lat. vivum, i, n: das Lebendige)
- kb Kilobasen
- KG Körpergewicht

- l Liter
- m Milli
- M Molar
- n Nano
- $\mu$  Mikro
- mA Milli-Ampere
- min. Minute
- MRT Magnetresonanztomographie
- MSZ multipotente, mesenchymale Stromazellen
- NSA Anzahl der Aquisitionen
- PBS Phosphatpuffer
- PCR Polymerasekettenreaktion
- pg Picogramm
- PI Propidium Iodid
- rev rückwärts (reverse)
- ROI Region of Interest
- rpm Umdrehung pro Minute (rounds per minute)
- s Sekunde
- s. siehe
- S Anzahl der Schichten
- SA Abstand zwischen den Schichten
- Sag. sagittal
- SNR Signal zu Rausch Ratio
- SPSS Statistical Package of the Social Sciences
- T Tesla
- Tab. Tabelle
- TE Echozeit
- TR Repetitionszeit
- TSE Turbo Spin Echo
- TSF Turbo Spin Faktor
- U Unit
- V Volt
- WT Wildtyp-Mäuse
- ZNS Zentrales Nervensystem

## 7.2 Literaturverzeichnis

- Aggarwal S, Pittenger MF. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105(4):1815-1822.
- Allay JA, Dennis JE, Haynesworth SE, Majumdar MK, Clapp DW, Shultz LD, Caplan AI, Gerson SL. 1997. LacZ and interleukin-3 expression in vivo after retroviral transduction of marrow-derived human osteogenic mesenchymal progenitors. *Hum Gene Ther* 8(12):1417-1427.
- Anderson SA S-QJ, Jordan EK, Arbab AS, Martin R, McFarland H, Frank JA. 2004. Magnetic resonance imaging of labeled T-cells in a mouse model of multiple sclerosis. *Annals of Neurology*(55(5)):654-659.
- Arbab AS, Pandit SD, Anderson SA, Yocum GT, Bur M, Frenkel V, Khuu HM, Read EJ, Frank JA. 2006. Magnetic resonance imaging and confocal microscopy studies of magnetically labeled endothelial progenitor cells trafficking to sites of tumor angiogenesis. *Stem Cells* 24(3):671-678.
- Arbab AS, Yocum GT, Kalish H, Jordan EK, Anderson SA, Khakoo AY, Read EJ, Frank JA. 2004. Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood* 104(4):1217-1223.
- Becker S, Ogon, M. 2006. *Epidemiologie der Osteoporose*. Wien: Springer. 1-3 p.
- Becker-Andre M, Hooft van Huijsduijnen R, Losberger C, Whelan J, Delamarter JF. 1992. Murine endothelial leukocyte-adhesion molecule 1 is a close structural and functional homologue of the human protein. *Eur J Biochem* 206(2):401-411.
- Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, Demarquay C, Mazurier C, Fouillard L, Bouchet S, Bertho JM, Gourmelon P, Aigueperse J, Charbord P, Gorin NC, Thierry D, Lopez M. 2004. Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood* 103(9):3313-3319.
- Blackwell TK, Moore MW, Yancopoulos GD, Suh H, Lutzker S, Selsing E, Alt FW. 1986. Recombination between immunoglobulin variable region gene segments is enhanced by transcription. *Nature* 324(6097):585-589.

- Borges E ER, Moll T, Steegmaier M, Campbell MA, Ley K, Mossmann H, Vestweber D. 1997. The P-selectin glycoprotein ligand-1 is important for recruitment of neutrophils into inflamed mouse peritoneum. *Blood*(90(5)):1934-1942.
- Bos C DY, Desmoulière A, Solanilla A, Hauger O, Grosset C, Dubus I, Ivanovic Z, Rosenbaum J, Charbord P, Combe C, Bulte JW, Moonen CT, Ripoche J, Grenier N. 2004. In vivo MR imaging of intravascularly injected magnetically labeled mesenchymal stem cells in rat kidney and liver. *Radiology*(233(3)):781-789.
- Bosch P, Pratt SL, Stice SL. 2006. Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. *Biol Reprod* 74(1):46-57.
- Bosma MJ. 1992. B and T cell leakiness in the scid mouse mutant. *Immunodeficient Rev* 3(4):261-276.
- Bosse R VD. 1994. Only simultaneous blocking of the L- and P-selectin completely inhibits neutrophil migration into mouse peritoneum. *European Journal of Immunology*(24(12)):3019-3024.
- Bowen CV, Zhang X, Saab G, Gareau PJ, Rutt BK. 2002. Application of the static dephasing regime theory to superparamagnetic iron-oxide loaded cells. *Magn Reson Med* 48(1):52-61.
- Brown KL, Stewart K, Bruce ME, Fraser H. 1997. Severely combined immunodeficient (SCID) mice resist infection with bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol* 78 (Pt 10):2707-2710.
- Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, Mosca JD, Kraus KH, Kadiyala S. 1998. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res*(355 Suppl):S247-256.
- Brunswig-Spickenheier B, Boche J, Westenfelder C, Peimann F, Gruber AD, Jaquet K, Krause K, Zustin J, Zander AR, Lange C. Limited immune-modulating activity of porcine mesenchymal stromal cells abolishes their protective efficacy in acute kidney injury. *Stem Cells Dev* 19(5):719-729.
- Bullard DC QL, Lorenzo I, Quinlin WM, Doyle NA, Bosse R, Vestweber D, Doerschuk CM, Beaudet AL. 1995. P-selectin/ICAM-1 double mutant mice: acute emigration of

neutrophils into the peritoneum is completely absent but is normal into pulmonary alveoli. *The Journal of Clinical Investigation* 95(4):1782-1788.

Bulte JW, Douglas T, Witwer B, Zhang SC, Strable E, Lewis BK, Zywicke H, Miller B, van Gelderen P, Moskowitz BM, Duncan ID, Frank JA. 2001. Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nat Biotechnol* 19(12):1141-1147.

Butcher EC. 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67(6):1033-1036.

Cannella B, Raine CS. 1995. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 37(4):424-435.

Caplan AI. 1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9(5):641-650.

Clark WM, Madden KP, Rothlein R, Zivin JA. 1991. Reduction of central nervous system ischemic injury in rabbits using leukocyte adhesion antibody treatment. *Stroke* 22(7):877-883.

de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Barentsz JO, Verdijk P, van Krieken JH, Boerman OC, Oyen WJ, Bonenkamp JJ, Boezeman JB, Adema GJ, Bulte JW, Scheenen TW, Punt CJ, Heerschap A, Figdor CG. 2005. Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy. *Nat Biotechnol* 23(11):1407-1413.

Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. 1977. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 91(3):335-344.

Dimitroff CJ, Descheny L, Trujillo N, Kim R, Nguyen V, Huang W, Pienta KJ, Kutok JL, Rubin MA. 2005. Identification of leukocyte E-selectin ligands, P-selectin glycoprotein ligand-1 and E-selectin ligand-1, on human metastatic prostate tumor cells. *Cancer Res* 65(13):5750-5760.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4):315-317.

- Dorovini-Zis K, Wong, D., Newman, W. 1992. Endothelial leucocyte adhesion molecule-1 in inflammatory and reactive disorders of the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*(51):378.
- Dorovini-Zis K, Wong, D., Newman, W.A., Dupuis, B., 1993. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in inflammatory disorders of the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*(52):316.
- Erices AA, Allers CI, Conget PA, Rojas CV, Minguell JJ. 2003. Human cord blood-derived mesenchymal stem cells home and survive in the marrow of immunodeficient mice after systemic infusion. *Cell Transplant* 12(6):555-561.
- Esmon CT. 2004. Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturitas* 47(4):305-314.
- Falagna V IS, Chartier M, Yufit T, Butmarc J, Kouttab N, Shroyer D, Carson P. 2007. Autologous Bone Marrow-Derived Cultured Mesenchymal Stem Cells Delivered in a Fibrin Spray Accelerate Healing in Murine and Human Cutaneous Wounds. *Tissue Engineering* 13:1299-1312.
- Fleige G, Seeberger F, Laux D, Kresse M, Taupitz M, Pilgrimm H, Zimmer C. 2002. In vitro characterization of two different ultrasmall iron oxide particles for magnetic resonance cell tracking. *Invest Radiol* 37(9):482-488.
- Foster-Gareau P, Heyn C, Alejski A, Rutt BK. 2003. Imaging single mammalian cells with a 1.5 T clinical MRI scanner. *Magn Reson Med* 49(5):968-971.
- Frank JA, Zywicke H, Jordan EK, Mitchell J, Lewis BK, Miller B, Bryant LH, Jr., Bulte JW. 2002. Magnetic intracellular labeling of mammalian cells by combining (FDA-approved) superparamagnetic iron oxide MR contrast agents and commonly used transfection agents. *Acad Radiol* 9 Suppl 2:S484-487.
- Frenette PS, Mayadas TN, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. 1996. Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell* 84(4):563-574.
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4(5):267-274.

- Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 16(3):381-390.
- Friedman M. 1937. The Use of Ranks to Avoid the Assumption of Normality Implicit in the Analysis of Variance. *Journal of the American Statistical Association* 32(200):675-701.
- Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. 2001. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 169(1):12-20.
- Gardner MJ, Jones LM, Catterall JB, Turner GA. 1995. Expression of cell adhesion molecules on ovarian tumour cell lines and mesothelial cells, in relation to ovarian cancer metastasis. *Cancer Lett* 91(2):229-234.
- Gordon MY, Clarke D, Atkinson J, Greaves MF. 1990. Hemopoietic progenitor cell binding to the stromal microenvironment in vitro. *Exp Hematol* 18(7):837-842.
- Grove JE, Bruscia E, Krause DS. 2004. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 22(4):487-500.
- Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, Kim Y, Rosenberg ME. 2002. A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure. *Kidney Int* 62(4):1285-1290.
- Han YM, Yoo OJ, Lee KK. 1993. Sex determination in single mouse blastomeres by polymerase chain reaction. *J Assist Reprod Genet* 10(2):151-156.
- Hauger O, Frost EE, van Heeswijk R, Deminiere C, Xue R, Delmas Y, Combe C, Moonen CT, Grenier N, Bulte JW. 2006. MR evaluation of the glomerular homing of magnetically labeled mesenchymal stem cells in a rat model of nephropathy. *Radiology* 238(1):200-210.
- Henkart PA. 1985. Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 3:31-58.

- Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Fonsato V, Romanazzi GM, Camussi G. 2004. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med* 14(6):1035-1041.
- Heyn C RJ, Ramadan SS, Snir JA, Barry AM, MacKenzie LT, Mikulis DJ, Palmieri D, Bronder JL, Steeg PS, Yoneda T, MacDonald IC, Chambers AF, Rutt BK, Foster PJ. 2006. In vivo MRI of cancer cell fate at the single-cell level in a mouse model of breast cancer metastasis to the brain. *Magn Reson Med* (56(5)):1001-1010.
- Heyn C, Ronald JA, Mackenzie LT, MacDonald IC, Chambers AF, Rutt BK, Foster PJ. 2006. In vivo magnetic resonance imaging of single cells in mouse brain with optical validation. *Magn Reson Med* 55(1):23-29.
- Hidalgo A, Peired AJ, Wild MK, Vestweber D, Frenette PS. 2007. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity* 26(4):477-489.
- Hinds KA, Hill JM, Shapiro EM, Laukkanen MO, Silva AC, Combs CA, Varney TR, Balaban RS, Koretsky AP, Dunbar CE. 2003. Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells. *Blood* 102(3):867-872.
- Inderbitzin D, Stoupis C, Sidler D, Gass M, Candinas D. 2007. Abdominal magnetic resonance imaging in small rodents using a clinical 1.5 T MR scanner. *Methods* 43(1):46-53.
- Lüttichau I, Wechselberger A, Peters C, Henger P, Seliger P, Djafarzadeh R, Huss R., Nelson PJ. 2005. Human Adult CD34 Progenitor Cells Functionally Express the Chemokine Receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4. *Stem Cells and Development* (14):329–336.
- Ishida T, Inaba M, Hisha H, Sugiura K, Adachi Y, Nagata N, Ogawa R, Good RA, Ikehara S. 1994. Requirement of donor-derived stromal cells in the bone marrow for successful allogeneic bone marrow transplantation. Complete prevention of recurrence of autoimmune diseases in MRL/MP-Ipr/Ipr mice by transplantation of bone marrow plus bones (stromal cells) from the same donor. *J Immunol* 152(6):3119-3127.
- Ittrich H, Lange C, Dahnke H, Zander AR, Adam G, Nolte-Ernsting C. 2005. [Labeling of mesenchymal stem cells with different superparamagnetic particles of iron oxide and detectability with MRI at 3T]. *Rofo* 177(8):1151-1163.

- Ittrich H, Lange C, Togel F, Zander AR, Dahnke H, Westenfelder C, Adam G, Nolte-Ernsting C. 2007. In vivo magnetic resonance imaging of iron oxide-labeled, arterially-injected mesenchymal stem cells in kidneys of rats with acute ischemic kidney injury: detection and monitoring at 3T. *J Magn Reson Imaging* 25(6):1179-1191.
- Jaquet K, Krause KT, Denschel J, Faessler P, Nauerz M, Geidel S, Boczor S, Lange C, Stute N, Zander A, Kuck KH. 2005. Reduction of myocardial scar size after implantation of mesenchymal stem cells in rats: what is the mechanism? *Stem Cells Dev* 14(3):299-309.
- Jilka RL, Weinstein RS, Takahashi K, Parfitt AM, Manolagas SC. 1996. Linkage of decreased bone mass with impaired osteoblastogenesis in a murine model of accelerated senescence. *J Clin Invest* 97(7):1732-1740.
- Jin AY, Tuor UI, Rushforth D, Kaur J, Muller RN, Petterson JL, Boutry S, Barber PA. Reduced blood brain barrier breakdown in P-selectin deficient mice following transient ischemic stroke: a future therapeutic target for treatment of stroke. *BMC Neurosci* 11:12.
- Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. 1998. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238(1):265-272.
- Johnstone B, Yoo JU. 1999. Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*(367 Suppl):S156-162.
- Kale S, Karihaloo A, Clark PR, Kashgarian M, Krause DS, Cantley LG. 2003. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J Clin Invest* 112(1):42-49.
- Kansas GS. 1996. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 88(9):3259-3287.
- Katayama Y, Hidalgo A, Chang J, Peired A, Frenette PS. 2005. CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils. *J Exp Med* 201(8):1183-1189.

- Kidder BL, Oseth L, Miller S, Hirsch B, Verfaillie C, Coucouvanis E. 2008. Embryonic stem cells contribute to mouse chimeras in the absence of detectable cell fusion. *Cloning Stem Cells* 10(2):231-248.
- Kim YJ, Borsig L, Varki NM, Varki A. 1998. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(16):9325-9330.
- Kim YS PH, Hong MH, Kang PM, Morgan JP, Jeong MH, Cho JG, Park JC, Ahn Y. 2009. TNF-alpha enhances engraftment of mesenchymal stem cells into infarcted myocardium. *Front Biosci Jan* 1(14):2845-2856.
- Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM. 2000. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 18(2):307-316.
- Koga H, Engebretsen L, Brinchmann JE, Muneta T, Sekiya I. 2009. Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 17(11):1289-1297.
- Kohler S, Ullrich S, Richter U, Schumacher U. 2010. E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung. *Br J Cancer* 102(3):602-609.
- Kostura L, Kraitchman DL, Mackay AM, Pittenger MF, Bulte JW. 2004. Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis. *NMR Biomed* 17(7):513-517.
- Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E, Amado LC, Martin BJ, Pittenger MF, Hare JM, Bulte JW. 2003. In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Circulation* 107(18):2290-2293.
- Krieg FM, Andres RY, Winterhalter KH. 1995. Superparamagnetically labelled neutrophils as potential abscess-specific contrast agent for MRI. *Magn Reson Imaging* 13(3):393-400.

- Krug R, Stehling C, Kelley DA, Majumdar S, Link TM. 2009. Imaging of the musculoskeletal system in vivo using ultra-high field magnetic resonance at 7 T. *Invest Radiol* 44(9):613-618.
- Lange C, Schroeder J, Stute N, Lioznov MV, Zander AR. 2005. High-potential human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 14(1):70-80.
- Le Blanc K. 2003. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 5(6):485-489.
- Lefer DJ, Jones SP, Girod WG, Baines A, Grisham MB, Cockrell AS, Huang PL, Scalia R. 1999. Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol* 276(6 Pt 2):H1943-1950.
- Li SC, Tachiki LM, Luo J, Dethlefs BA, Chen Z, Loudon WG. A Biological Global Positioning System: Considerations for Tracking Stem Cell Behaviors in the Whole Body. *Stem Cell Rev.*: 317-333.
- Lieber MR, Hesse JE, Mizuuchi K, Gellert M. 1987. Developmental stage specificity of the lymphoid V(D)J recombination activity. *Genes Dev* 1(8):751-761.
- Lim YT, Cho MY, Kang JH, Noh YW, Cho JH, Hong KS, Chung JW, Chung BH. Perfluorodecalin/[InGaP/ZnS quantum dots] nanoemulsions as <sup>19</sup>F MR/optical imaging nanoprobe for the labeling of phagocytic and nonphagocytic immune cells. *Biomaterials* 31(18):4964-4971.
- Loebinger MR, Kyrtatos PG, Turmaine M, Price AN, Pankhurst Q, Lythgoe MF, Janes SM. 2009. Magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells homing to pulmonary metastases using biocompatible magnetic nanoparticles. *Cancer Res* 69(23):8862-8867.
- Lush CW, Cepinskas G, Sibbald WJ, Kvietys PR. 2001. Endothelial E- and P-selectin expression in iNOS- deficient mice exposed to polymicrobial sepsis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280(2):G291-297.
- Majumdar S, Zoghbi SS, Gore JC. 1989. The influence of pulse sequence on the relaxation effects of superparamagnetic iron oxide contrast agents. *Magn Reson Med* 10(3):289-301.

- Matsukawa A, Lukacs NW, Hogaboam CM, Knibbs RN, Bullard DC, Kunkel SL, Stoolman LM. 2002. Mice genetically lacking endothelial selectins are resistant to the lethality in septic peritonitis. *Exp Mol Pathol* 72(1):68-76.
- McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, Kloster A, Di Halvorsen Y, Ting JP, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. 2006. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells* 24(5):1246-1253.
- McTaggart SJ, Atkinson K. 2007. Mesenchymal stem cells: immunobiology and therapeutic potential in kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 12(1):44-52.
- Mercer-Jones MA, Shrotri MS, Heinzelmann M, Peyton JC, Cheadle WG. 1999. Regulation of early peritoneal neutrophil migration by macrophage inflammatory protein-2 and mast cells in experimental peritonitis. *J Leukoc Biol* 65(2):249-255.
- Minguell JJ, Erices A, Conget P. 2001. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 226(6):507-520.
- Moore KL, Patel KD, Bruehl RE, Li F, Johnson DA, Lichenstein HS, Cummings RD, Bainton DF, McEver RP. 1995. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol* 128(4):661-671.
- Morigi M, Imberti B, Zoja C, Corna D, Tomasoni S, Abbate M, Rottoli D, Angioletti S, Benigni A, Perico N, Alison M, Remuzzi G. 2004. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 15(7):1794-1804.
- Morigi M, Inrona M, Imberti B, Corna D, Abbate M, Rota C, Rottoli D, Benigni A, Perico N, Zoja C, Rambaldi A, Remuzzi A, Remuzzi G. 2008. Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. *Stem Cells* 26(8):2075-2082.
- Mrinmoy De PSG, and Vincent M. Rotello. 2008. Applications of Nanoparticles in Biology. *Advanced Materials*(20):4225-4241.

- Nakahara H, Dennis JE, Bruder SP, Haynesworth SE, Lennon DP, Caplan AI. 1991. In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp Cell Res* 195(2):492-503.
- Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D. 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248(4962):1517-1523.
- Parfitt AM, Villanueva AR, Foldes J, Rao DS. 1995. Relations between histologic indices of bone formation: implications for the pathogenesis of spinal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 10(3):466-473.
- Park HC, Yasuda K, Kuo MC, Ni J, Ratliff BB, Chander PN, Goligorsky MS. Renal Capsule as a Stem Cell Niche. *Am J Physiol Renal Physiol*.
- Peldschus K, Kaul M, Lange C, Nolte-Ernsting C, Adam G, Ittrich H. 2007. [Magnetic resonance imaging of single SPIO labeled mesenchymal stem cells at 3 Tesla]. *Rofo* 179(5):473-479.
- Pi QM, Zhang WJ, Zhou GD, Liu W, Cao Y. Degradation or excretion of quantum dots in mouse embryonic stem cells. *BMC Biotechnol* 10(1):36.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411):143-147.
- Podack ER, Hengartner H, Lichtenheld MG. 1991. A central role of perforin in cytolysis? *Annu Rev Immunol* 9:129-157.
- Poulsom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnarajah S, Jeffery R, Hunt T, Alison M, Cook T, Pusey C, Wright NA. 2001. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol* 195(2):229-235.
- Preobrazhenskaya ME BA, Mikhailov VI, Ushakova NA, Mazurov AV, Semenov AV, Usov AI, Nifant'ev NE, Bovin NV. 1997. Fucoidan inhibits leukocyte recruitment in a model peritoneal inflammation in rat and blocks interaction of P-selectin with its carbohydrate ligand. *Biochemistry and molekular biology international*(43(2)):443-451.

- Reddy AM, Kwak BK, Shim HJ, Ahn C, Lee HS, Suh YJ, Park ES. 2002. In vivo tracking of mesenchymal stem cells labeled with a novel chitosan-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles using 3.0T MRI. *J Korean Med Sci* 25(2):211-219.
- Ricardo SD, Deane JA. 2005. Adult stem cells in renal injury and repair. *Nephrology (Carlton)* 10(3):276-282.
- Rice CM, Scolding NJ. 2009. Adult human mesenchymal cells proliferate and migrate in response to chemokines expressed in demyelination. *Cell Adh Migr* 4(2).
- Rosenbaum AJ, Grande DA, Dines JS. 2008. The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering: A global assessment. *Organogenesis* 4(1):23-27.
- Ruster B, Gottig S, Ludwig RJ, Bistrrian R, Muller S, Seifried E, Gille J, Henschler R. 2006. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood* 108(12):3938-3944.
- Sackstein R, Merzaban JS, Cain DW, Dagia NM, Spencer JA, Lin CP, Wohlgenuth R. 2008. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nat Med* 14(2):181-187.
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. 2000. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 164(2):247-256.
- Schatz DG, Oettinger MA, Baltimore D. 1989. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59(6):1035-1048.
- Schrepfer S, Deuse T, Lange C, Katzenberg R, Reichenspurner H, Robbins RC, Pelletier MP. 2007a. Simplified protocol to isolate, purify, and culture expand mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 16(1):105-107.
- Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, Fischbein MP, Robbins RC, Pelletier MP. 2007b. Stem cell transplantation: the lung barrier. *Transplant Proc* 39(2):573-576.
- Shakibaei M, De Souza P. 1997. Differentiation of mesenchymal limb bud cells to chondrocytes in alginate beads. *Cell Biol Int* 21(2):75-86.

- Shanley TP, Warner RL, Ward PA. 1995. The role of cytokines and adhesion molecules in the development of inflammatory injury. *Mol Med Today* 1(1):40-45.
- Shapiro EM G-PO, Manuel García-Verdugo J, Alvarez-Buylla A, Koretsky AP. 2006. Magnetic resonance imaging of the migration of neuronal precursors generated in the adult rodent brain. *NeuroImage*(32(3)):1150-1157.
- Shapiro EM, Sharer K, Skrtic S, Koretsky AP. 2006. In vivo detection of single cells by MRI. *Magn Reson Med* 55(2):242-249.
- Shapiro EM SS, Koretsky AP. 2005. Sizing it up: cellular MRI using micron-sized iron oxide particles. *Magn Reson Med*(53(2)):329-338.
- Shapiro EM SS, Sharer K, Hill JM, Dunbar CE, Koretsky AP. 2004. MRI detection of single particles for cellular imaging. *Proceedings of the national academy of the united states of america*(101(30)):10901-10906.
- Sheskin D. 2007. *Handbook of Parametric and Nonparametric Statistical Procedures*. CRC Press, Boca Raton.
- Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM, et al. 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68(5):855-867.
- Sipe JC, Filippi M, Martino G, Furlan R, Rocca MA, Rovaris M, Bergami A, Zyroff J, Scotti G, Comi G. 1999. Method for intracellular magnetic labeling of human mononuclear cells using approved iron contrast agents. *Magn Reson Imaging* 17(10):1521-1523.
- Springer ML, Sievers RE, Viswanathan MN, Yee MS, Foster E, Grossman W, Yeghiazarians Y. 2005. Closed-chest cell injections into mouse myocardium guided by high-resolution echocardiography. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(3):H1307-1314.
- Springer TA. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76(2):301-314.
- Stagg J. 2008. Mesenchymal Stem Cells in Cancer. *Stem cell reviews* 4 (2):24-30.

- Sun R, Dittrich J, Le-Huu M, Mueller MM, Bedke J, Kartenbeck J, Lehmann WD, Krueger R, Bock M, Huss R, Seliger C, Grone HJ, Misselwitz B, Semmler W, Kiessling F. 2005. Physical and biological characterization of superparamagnetic iron oxide- and ultrasmall superparamagnetic iron oxide-labeled cells: a comparison. *Invest Radiol* 40(8):504-513.
- Takamasa Iwaki HY, Toshiyuki Hayakawa. 2001. *A Color Atlas of Sectional Anatomy of the Mouse*. 2nd ed. Tokyo. 184 p.
- Thorlacius H, Prieto J, Raud J, Gautam N, Patarroyo M, Hedqvist P, Lindbom L. 1997. Tumor cell arrest in the microcirculation: lack of evidence for a leukocyte-like rolling adhesive interaction with vascular endothelium in vivo. *Clin Immunol Immunopathol* 83(1):68-76.
- Toso C, Vallee JP, Morel P, Ris F, Demuylder-Mischler S, Lepetit-Coiffe M, Marangon N, Saudek F, James Shapiro AM, Bosco D, Berney T. 2008. Clinical magnetic resonance imaging of pancreatic islet grafts after iron nanoparticle labeling. *Am J Transplant* 8(3):701-706.
- Tschopp J, Nabholz M. 1990. Perforin-mediated target cell lysis by cytolytic T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 8:279-302.
- Valentiner U, Valentiner FU, Schumacher U. 2008. Expression of CD44 is associated with a metastatic pattern of human neuroblastoma cells in a SCID mouse xenograft model. *Tumour Biol* 29(3):152-160.
- Walsh CM, Matloubian M, Liu CC, Ueda R, Kurahara CG, Christensen JL, Huang MT, Young JD, Ahmed R, Clark WR. 1994. Immune function in mice lacking the perforin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(23):10854-10858.
- Weimar IS, Miranda N, Muller EJ, Hekman A, Kerst JM, de Gast GC, Gerritsen WR. 1998. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is produced by human bone marrow stromal cells and promotes proliferation, adhesion and survival of human hematopoietic progenitor cells (CD34+). *Exp Hematol* 26(9):885-894.
- Weller A, Isenmann S, Vestweber D. 1992. Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem* 267(21):15176-15183.

- Wilcoxon F. 1945. Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin* 1:80–83.
- Wong D, Prameya R, Dorovini-Zis K. 2007. Adhesion and migration of polymorphonuclear leukocytes across human brain microvessel endothelial cells are differentially regulated by endothelial cell adhesion molecules and modulate monolayer permeability. *J Neuroimmunol* 184(1-2):136-148.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61(4):364-370.
- Workman P, Balmain A, Hickman JA, McNally NJ, Rohas AM, Mitchison NA, Pierrepont CG, Raymond R, Rowlatt C, Stephens TC, et al. 1988. UKCCCR guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia. *Lab Anim* 22(3):195-201.
- Xie X RA, Zakrzewicz A, Bernimoulin M, Zeng XL, Wessel HP, Schapira M, Spertini O. 2000. Inhibition of selectin-mediated cell adhesion and prevention of acute inflammation by nonanticoagulant sulfated saccharides. Studies with carboxyl-reduced and sulfated heparin and with trestatin a sulfate. *The Journal of biological chemistry* 275(44):34818-34825.
- Xu F, Shi J, Yu B, Ni W, Wu X, Gu Z. Chemokines mediate mesenchymal stem cell migration toward gliomas in vitro. *Oncol Rep* 23(6):1561-1567.
- Yang J, Hirata T, Croce K, Merrill-Skoloff G, Tchernychev B, Williams E, Flaumenhaft R, Furie BC, Furie B. 1999. Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *J Exp Med* 190(12):1769-1782.
- Yang M, Wei X, Li J, Heinel LA, Rosenwasser R, Iacovitti L. Changes in Host Blood Factors and Brain Glia Accompanying the Functional Recovery after Systemic Administration of Bone Marrow Stem Cells in Ischemic Stroke Rats. *Cell Transplant*.
- Young JD. 1989. Killing of target cells by lymphocytes: a mechanistic view. *Physiol Rev* 69(1):250-314.

Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. 1998. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res* 16(4):406-413.

Zen K, Liu DQ, Guo YL, Wang C, Shan J, Fang M, Zhang CY, Liu Y. 2008. CD44v4 is a major E-selectin ligand that mediates breast cancer cell transendothelial migration. *PLoS One* 3(3):e1826.

Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, Barsky LW, Weinberg K, Barr ML, Demetriou A, Wu GD. 2006. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells* 24(4):928-935.

### 7.3 Danksagung

Zuerst möchte ich der Werner Otto Stiftung für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit im Rahmen des Werner Otto Stipendiums in der Zeit vom 01.11.2009-30.10.2010 danken. Ohne diese Zuwendung wäre die Durchführung dieser Dissertation für mich nicht möglich gewesen.

In erster Linie möchte ich mich bei meinen „Doktorvätern“ Prof. Adam und Prof. Schumacher für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit in zwei Abteilungen bedanken. Ganz besonders danke ich für die vorbehaltlose Unterstützung dieses Projektes, die stete Diskussionsbereitschaft, das Öffnen diverser Türen und alle Ratschläge.

Ganz besondere Dankesworte möchte ich an den Betreuer dieser Arbeit, Kersten Peldschus richten, der eine unendliche Geduld aufgebracht hat, stets ein offenes Ohr für alle Sorgen hatte und immer den richtigen Rat parat.

Ich danke dem gesamten Team der Morphologen: Carsten Köpke für sein Engagement bei der Arbeit mit den Versuchstieren, seinem Organisationstalent und für jedes aufmunternde und anregende Gespräch. Susanne Feldhaus, die wie eine gute Mutter über allem gewacht hat. Vielen Dank für die Hilfe beim Präparieren, Organisieren, Färben, Pipettieren, Einkaufen, Mikroskopieren, Dokumentieren und ganz besonders auch für jede Schelte, jede Minute offenes Ohr, den gemeinsamen Kampf mit der Cryotonne, gegen verbummelte Schlüssel und vieles was nicht in Worte gefasst werden kann. Daniel Wicklein, für die lange Zeit am FACS und die vielen Tipps und Tricks. Frau Dorothee Köhler für Deutschlandfunk, die Hilfe am Cryostaten und Tipps in Sachen Mode und Kultur. Frau Renate Gehrke und Christine Knies für ihre stoische Hilfe bei der Immunhistochemie. Kathrin Stübke für ihre Hilfe bei der PCR und Nina Kesel für stets freundliche Aufnahme in ihr Büro.

Ich danke Frau PD Dr. Claudia Lange für Beratung und Hilfe in Sachen „Stammzellen-Aufzucht und Hege“, sowie für das kritische Hinterfragen der Ergebnisse, das Bahnen vieler Ideen und die Hilfe bei den Differenzierungstests.

Herrn Dr. rer. nat. Reimer danke ich für Einführung und Hilfe am LSM.

Ich danke Herrn Dr. Ittrich bei der Unterstützung in strukturellen Fragen. Herrn Michael Kaul danke ich für den Beistand im weiten Feld der MR-Physik und Auswertesoftware.

Ich danke meinen Freunden für ihre Geduld und ihre Hilfe in allen Phasen und Situationen dieses Projektes. Vor allem möchte ich Nuno Ramos Leal für die unzählbaren Telefonate, Aufmunterungen, Lebensweisheiten und seine feste Freundschaft danken.

Für Korrektur, akribische Formatierungshilfe, Urlaub, gutes Essen und feuchte Schultern danke ich Sebastian Fiebig, Ulrike Beinschob und Hanna.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich über die ganze Zeit so gut getragen und versorgt hat, vor allem meiner Mutter Beate für jedes Einsammeln zu jeder noch so unmöglichen Stunde.



## 7.4 Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

<b>Geburtsdatum</b>	30. Juni 1986
<b>Geburtsort</b>	Hamburg
<b>Familienstand</b>	ledig
<b>Eltern</b>	Thorsten Salamon, Arzt Beate Salamon (geb. Hennig), Ärztin
<b>Geschwister</b>	Sebastian (16 Jahre) Marie-Kristin (14 Jahre) Mathias (10 Jahre)
<b>Staatsangehörigkeit</b>	deutsch

### Ausbildungsdaten

---

<b>Grundschule</b>	1992–1996 Katholische Grundschule Böhmestraße
<b>Gymnasium</b>	1996–2005 Besuch der Sankt-Ansgar-Schule
▪ <b>Schulsprecher</b>	Juli 2000 – Juli 2002
▪ <b>Auslandsaufenthalt</b>	Juli 2002 – Juni 2003 Besuch der Jay County High School, Indiana
▪ <b>High School Abschluss (Diploma)</b>	Juni 2003, Abschlussredner
▪ <b>Fremdsprachen</b>	Sehr gut Englisch, Latinum
▪ <b>Abitur</b>	2005 (Note 1,2)
<b>Studium der Humanmedizin</b>	Oktober 2005 bis 2011 an der Universität Hamburg
▪ <b>Tätigkeit als Pflegehelfer</b>	Berufsgenossenschaftliches Unfallkrankenhaus Hamburg Boberg, 23. 10. 2006 – 30. 9. 2009
▪ <b>Erste ärztliche Prüfung</b>	September 2007 (Note 2,0)
▪ <b>Erster klinischer Block</b>	Oktober 2007
▪ <b>Famulaturen</b>	▪ Dr. med. Peter Will, Praxis für Pädiatrie ▪ Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf ▪ Unfallchirurgie des Berufsgenossenschaftlichen Unfallkrankenhauses Hamburg Boberg ▪ Gastroenterologische Intensivstation des Universitätsklinikums Heidelberg
▪ <b>Wahlfach</b>	Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
▪ <b>Wahl-Tertial im Praktischen Jahr</b>	Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

▪ **Chirurgie-Tertial im Praktischen Jahr** Krankenhaus Reinbek, St. Adolf-Stift

▪ **Innere-Tertial im Praktischen Jahr** Bethesda Krankenhaus Bergedorf

#### **Stipendien**

▪ **Stipendiat der deutschen Röntgengesellschaft** 91. Deutscher Röntgenkongress 12.–15. 5. 2010

▪ **Stipendiat der Werner Otto Stiftung** 1. 11. 2009 – 30. 10. 2010

#### **Ehrenamtliche Tätigkeit**

---

**Kirchliches Engagement** Vorsitzender des Pfarrgemeinderates der Katholischen Pfarrgemeinde St. Joseph, Wandsbek

#### **Doktorarbeit**

---

**Zeitraum** Januar 2007 bis 2011

**Titel** Untersuchung des Migrationsverhaltens multipotenter mesenchymaler Stromazellen in Selektin-defizienten Mäusen mit Magnetresonanztomographie und Histologie  
Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie, Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Hamburg, den 24. Juli 2011

## **7.5 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Johannes Martin Salamon

