

Der Einfluss von extrazellulären Faktoren auf humane mesenchymale Stromazellen

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Tanja Seeger
aus Göppingen

Tübingen
2016

Inhaltsverzeichnis

Contributions	IV
----------------------------	-----------

Abkürzungsverzeichnis	V
------------------------------------	----------

1 Einleitung	1
---------------------------	----------

1.1 Stammzellen	1
1.2 Adulte humane Stammzellen	1
1.3 Hämatopoetische Stammzellen und ihre Nischen im Knochenmark	2
1.3.1 Die zellulären Komponenten der Stammzellnischen	4
1.3.2 Die Rezeptoren und sezernierten Faktoren der Stammzellnischen	7
1.3.3 Die Mechanismen der Stammzellmobilisierung	8
1.4 Die Extrazelluläre Matrix in der Stammzellnische	10
1.4.1 Laminine und ihre Rezeptoren	11
1.5 Mesenchymale Stromazellen (MSC)	14
1.5.1 Der Einfluss der Substratelastizität auf MSC	16
1.5.2 MSC als Bestandteil regenerativer Therapien	18
1.6 Fettgewebe und adipogene Differenzierung	22
1.7 Knochen und osteogene Differenzierung	23
1.8 Knorpel und chondrogene Differenzierung	25
1.9 Muskeln, glattmuskuläre Differenzierung und der Sphinkter	28
1.10 Zielsetzung	34

2 Material und Methoden	37
--------------------------------------	-----------

2.1 Materialien	37
2.1.1 Geräte und Software	37
2.1.2 Rekombinante Proteine	38
2.1.3 Humane Gewebeproben	38
2.1.4 Gewebeproben von Mini-Schweinen	38
2.2 Zellbiologische Methoden	39
2.2.1 Allgemeine Zellkultivierung	39
2.2.2 Kryokonservierung und das Auftauen von Zellen	39
2.2.3 Die Isolierung und Kultivierung von humanen MSC	40
2.2.4 Die Isolierung und Kultivierung von primären Osteoblasten	41
2.2.5 Die Isolierung von primären hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPC)	42
2.2.6 Die Kultivierung humaner Zelllinien	42
2.2.7 Einzelzellklonierung von kmMSC	43
2.2.8 Die Kultivierung von Zellen auf Kammerobjektträgern	43
2.2.9 Der Einfluss der Zelldichte auf die myogene Differenzierung	43
2.2.10 Der Einfluss der Substratelastizität auf die Adhäsion	43
2.2.11 Die myogene, adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung	44
2.2.12 Die Herstellung von konditioniertem Medium	44

2.2.13	Der Vergleich der Sphäroid-Bildung in <i>hanging drops</i>	44
2.3	Molekularbiologische und immunologische Methoden	45
2.3.1	Durchflusszytometrie	45
2.3.2	RNA-Isolierung	46
2.3.3	c-DNA-Synthese	46
2.3.4	Verwendete Primer	47
2.3.5	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	49
2.3.6	Quantitative RT-PCR	49
2.3.7	Die Herstellung von Gefrierschnitten	51
2.3.8	Die adipogene, osteogene und chondrogene Nachweisfärbung	51
2.3.9	Die Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung	52
2.3.10	Die Hämatoxylin-Eosin Färbung	53
2.3.11	Ultrafiltration und Immunpräzipitation des konditionierten Mediums	53
2.3.12	Die Herstellung von Zelllysaten	54
2.3.13	Western Blot Analyse	54
2.4	Funktionelle Analysen	57
2.4.1	Zellproliferation unter Einfluss von rekombinantem Laminin	57
2.4.2	Differenzierung unter Einfluss von rekombinantem Laminin	57
2.4.3	Adhäsion an rekombinantes Laminin	57
2.4.4	Rasterkraftmikroskopie (AFM)	58
2.4.5	Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie (SICM)	68
2.5	Statistische Auswertung	70
3	Ergebnisse	72
3.1	Die Charakterisierung der MSC	72
3.1.1	Die Charakterisierung von kmMSC und iMSC#3	72
3.1.2	Das Differenzierungspotential von kmMSC Einzelzellklonen	76
3.1.3	Der Einfluss der Zellquelle auf das Differenzierungspotential	77
3.2	Der Einfluss der Laminine und ihrer Rezeptoren auf kmMSC und iMSC#3	80
3.2.1	Die Spezifität und die Kreuzreaktivität der Laminin-Antikörper	80
3.2.2	Das Laminin-Expressionsmuster im Sphinkter	81
3.2.3	Die Expression der Laminine	84
3.2.4	Die Expression der Integrine	90
3.2.5	Der Einfluss von rekombinantem Laminin auf die Proliferation	95
3.2.6	Der Einfluss der Differenzierung auf die Adhäsion an rekombinante Laminin-Isoformen	97
3.2.7	Der Einfluss von rekombinantem Laminin auf die Differenzierung	102
3.3	Der Einfluss von biophysikalischen Faktoren auf kmMSC und iMSC#3	107
3.3.1	Der Einfluss des Differenzierungsmediums auf die Zellelastizität	107
3.3.2	Der Einfluss der Substratelastizität auf die Adhäsion	108
3.3.3	Der Einfluss der Zelldichte auf die myogene Differenzierung	112
3.4	Der Einfluss der adrenergen Stimulation auf Nischenzellen und ihre Interaktion mit HSPC	115
3.4.1	Die Expression von adrenergen Rezeptoren von Nischenzellen	116
3.4.2	Der Einfluss von Clenbuterol auf die Morphologie der Nischenzellen	116
3.4.3	Der Einfluss von Clenbuterol auf die Adhäsion von HSPC	119
4	Diskussion.....	121

4.1	Die Charakterisierung von MSC	121
4.2	Laminine und Integrine in kmMSC und iMSC#3	128
4.2.1	Die myogene Differenzierung	131
4.2.2	Die adipogene Differenzierung	133
4.2.3	Die osteogene Differenzierung	136
4.3	Der Einfluss von biophysikalischen Faktoren auf MSC	138
4.3.1	Der Einfluss des Differenzierungsmediums auf die Zellelastizität	138
4.3.2	Der Einfluss der Substratlastizität auf die Adhäsion	140
4.3.3	Der Einfluss der Zelldichte auf die myogene Differenzierung	141
4.4	Der Einfluss der adrenergen Stimulation auf Nischenzellen und HSPC	142
5	Zusammenfassung	148
6	Summary	150
7	Anhang	152
8	Literaturverzeichnis.....	153
9	Wissenschaftliche Beiträge	185
10	Lebenslauf.....	186