

**Isolation und Charakterisierung CD146-positiver muriner pankreatischer  
mesenchymaler Stromazellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Von Matthias Martin Simon Sommerer

Betreuer:

Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Kleeff, MHBA, FACS, FRCS

Gutachter:

Prof. Dr. Jonas Rosendahl, Halle (Saale)  
Prof. Dr. Tim Vilz, Bonn

Datum der Verteidigung: 20.01.2025

## Referat

Das pankreatische duktales Adenokarzinom (PDAC) ist die vierthäufigste krebsbedingte Todesursache in Deutschland. Ein Faktor für die schlechte Prognose ist die hohe Widerstandsfähigkeit des Tumors gegenüber äußerer Einflüsse aufgrund seiner Mikroumwelt (TME). Die genaue Funktion der TME des PDAC ist noch nicht vollständig verstanden. Verschiedene Zelltypen werden der TME zugeschrieben. Diese beinhaltet Zellen des Immunsystems, pankreatische Stellatumzellen und sogenannte cancer-associated fibroblasts (CAF). Verschiedene Zelltypen können sich zu CAFs differenzieren, hierzu zählen Perizyten, Endothelzellen und Mesenchymale Stammzellen (MSC). Zielstellung der Arbeit ist die Erarbeitung einer Methode zur Isolation und eine Klassifikation von MSC aus dem murinen Pankreas ohne den Einfluss der adhärenz Zellkultur.

Die Zellen wurden aus den Pankreata von 8 Wochen alten C57bl/6j Mäusen isoliert, mit CD146- und CD45-Antikörpern markiert und per Durchflusszytometer in drei Gruppen sortiert. Von den sortierten Proben wurden direkt die RNA isoliert oder aber die Zellen in Kultur genommen. Eine poly-A RNA-Sequenzierung der Subgruppen wurde durchgeführt. Hierbei wurde aufgrund der Expressionsprofile der Oberflächenmarker die Annahme in der nur CD146 positiven Subpopulation MSC isoliert zu haben erhärtet. In einer folgenden Cell Type enrichment Analyse konnte ein vor allem mit hämatopoetischen Stammzellen und Endothelzellen einhergehendes Expressionsprofil für die vermutete MSC-Population generiert werden. In der durchgeführten Genset-Analyse lässt sich vor allem ein stromaler sowie endothelialer Status der CD146+/CD45-Zielfraktion zuordnen. Aufgrund der Ergebnisse in der Zellkultur konnten keine Differenzierungsversuche zur Einschätzung des Differenzierungspotentials durchgeführt werden. Auffällig während der gesamten Experimente zeigte sich ein weitestgehend mit der Zielpopulation und MSC-Kriterien übereinstimmendes Verhalten der CD146-/CD45-Population. Diese Zellen ließen sich problemlos kultivieren. In einer Re-Sortierung nach der Kultivierung, zeigte sich eine unerwartete Expression von CD146.

Insgesamt konnte für keine der isolierten Populationen bestätigt werden, dass es sich sicher um MSC handelt. Dennoch ist es gelungen sowohl eine CD146+/CD45-mesenchymale pankreatische stromale Zellpopulation als auch eine CD146-/CD45-pankreatische stromale Zellpopulation zu isolieren. Die Übertragbarkeit des Experiments auf genetisch veränderte Mausmodelle wurde dargestellt.

Sommerer, Matthias: Isolation und Charakterisierung CD146-positiver muriner pankreatischer mesenchymaler Stromazellen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 78 Seiten, Erscheinungsjahr 2025

## I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	
II.	Abkürzungen und Symbole	
1.	Einleitung	1
1.1.	Das pankreatische duktales Adenokarzinom	1
1.2.	Tumormicroenvironment (Tumorumwelt)	1
1.3.	Mesenchymale Stammzellen	2
1.4.	CD146	6
2.	Zielstellung	9
3.	Material und Methodik	10
3.1.	Materialien	10
3.1.1.	Laborgeräte	10
3.1.2.	Verbrauchsmaterial	11
3.1.3.	Chemikalien und Reagenzien	12
3.1.4.	Kits	14
3.1.5.	Medien	14
3.1.6.	Antikörper	15
3.1.7.	Lösungen	15
3.1.8.	Biologisches Material	16
3.2.	Methoden	18
3.2.1.	Gewebsgewinnung	18
3.2.2.	Nycodenz-Dichtezentrifugation	18
3.2.3.	Neue Zellisolationmethode	20
3.2.4.	FACS	22
3.2.5.	Zellkultur	23
3.2.6.	RNA-Isolation	24
3.2.7.	Vermessung der RNA	25
3.2.8.	mRNA-Sequenzierung	26
3.2.9.	Daten-Analyse durch Novogene	28
4.	Ergebnisse	30
4.1.	Durchflusszytometrie	30
4.2.	Zellisolation anhand der Nycodenz-Dichtezentrifugation	32
4.3.	Zellisolation anhand der Neuen Methode	35
4.4.	Re-Sortierung kultivierter CD146-/CD45- negativer Zellen	42
4.5.	RNA- Isolation aus KC- und CRE-Mausmodellen	43
4.6.	RNA-Vermessung	44
4.7.	mRNA-Sequenzierung	45
4.8.	Enrichment Analysen	53
5.	Diskussion	60
5.1.	Gewebsgewinnung und Methodenvergleich	60
5.2.	Zellkultur	61
5.3.	mRNA-Sequenzierung	62
5.4.	Isolation pankreatischer mesenchymaler Stromazellen	63
6.	Zusammenfassung	66
7.	Literaturverzeichnis	69
8.	Thesen	76
9.	Anhang	77
III.	Selbstständigkeitserklärung	
IV.	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
V.	Danksagung	

## II. Abkürzungen und Symbole

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Aqua monodest.	Einfach Destilliertes Wasser
BSA	Bovine Serum Albumin
CAF	Cancer-associated fibroblast
CD	Cluster of Differentiation
CFU-F	colony forming unit fibroblasts
Clean reads	saubere gelesene Fragmente
CRE	Mausmodell Pdx-1-Cre
E	Extinktion
ES	Enrichment Score
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FBS	fetales Rinderserum (Fetal Bovine Serum)
FPKM	Fragments per Kilobase/Million
FSC	Forward Scatter (Zellgröße)
g	Gramm
GBSS	Geys Balanced Salt Solution
GC-Anteil	Prozentsatz an Guanin und Cytosin der sauberen Daten
GSEA	Gen-Set-Enrichment-Analyse
h	Stunde

ISCT	International Society for Cellular Therapy
KC	Mausmodell K-ras <sup>LSL.G12D/+</sup> ;Pdx-1-Cre
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MSC	Mesenchymale Stammzelle (Mesenchymal Stem Cell)
NES	normalisierter Enrichment Score
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NN	CD146 negative und CD45 negative Zellen
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (Phosphat-buffered Saline)
PCA	Principal Component Analyse
PN	CD146 positive und CD45 negative Zellen
PP	CD146 positive und CD 45 positive Zellen
PSC	pankreatische Stellatumzellen
Raw reads	gelesene Fragmente nach PCR die nicht aufgereinigt wurden
RNA	Ribonucleinsäure
RPKM	Reads pro Kilobasen der Exons pro Millionen kartierte reads
Sek	Sekunde
Shh	Sonic Hedgehog
S.	Seite

SSC	Side Scatter (Granularität)
Wtnn	kultivierte CD146 negative und CD45 negative Zellen
xG	g-Wert/ Vielfaches normaler Erdbeschleunigung

## **1. Einleitung**

### **1.1. Das pankreatische duktale Adenokarzinom**

Das pankreatische duktale Adenokarzinom geht generell bei Stellung der Diagnose mit einer schlechten Prognose einher. Während für alle neu aufgetretenen Krebserkrankungen im Zeitraum 2009 bis 2015 in den USA die durchschnittliche 5-Jahres Überlebensrate bei 67% lag, lag die 5-Jahres Überlebensrate des Pankreaskarzinoms bei 9%<sup>1</sup>. Auf Deutschland bezogen liegt die relative 5JÜR ebenfalls bei 9%. Hier gab es im Jahr 2016 492.090 Krebsneuerkrankungen mit 229.827 Todesfällen. Das Pankreaskarzinom machte hiervon 18.370 Neuerkrankungen und 18.052 Todesfälle aus. Es zählt sowohl bei Männern als auch bei Frauen zu der 4.häufigsten Krebstodesursache<sup>2</sup>. Ein Grund für die schlechte Prognose ist der häufig asymptomatische Verlauf in den frühen Erkrankungsstadien und die häufig erst späte Diagnosestellung und Behandlung<sup>1,3</sup>. Über 50% der nach UICC Stadien klassifizierten Pankreaskarzinome liegen sowohl bei Männern als auch bei Frauen im Stadium IV vor<sup>2</sup>.

### **1.2. Tumormicroenvironment (Tumorumwelt)**

Eines der Hauptaugenmerke der aktuellen Forschung bezüglich des PDAC dreht sich um das Tumormicroenvironment. Diese besteht aus Cancer-associated fibroblasts (CAF), Immunzellen und Endothelzellen. Diese Zellen bilden und schütten inflammatorische Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren aus und bilden somit eine komplexe Extrazellulärmatrix<sup>4</sup>. Die Extrazellulärmatrix und die stromalen Komponenten des PDAC stehen so stark im Fokus, da diese bis zu 90% der Tumormasse ausmachen können, ein hypoxisches Tumormicroenvironment schaffen können<sup>3</sup>, eine physikalische und metabolische Barriere der Wirksamkeit der Chemotherapeutika sein können<sup>5</sup> und dennoch bei Depletion von CAFs eine Förderung des Tumorwachstums induzieren können<sup>6</sup>. Andererseits führt zum Beispiel die Depletion des Sonic Hedgehog (Shh) Signalwegs, der bei Aktivierung für ein desmoplastisches fibroblastenreiches Stroma sorgt, zu einer besseren Aufnahme von Gemcitabin in KPC-Mäusen<sup>7,8</sup>.

Um ein besseres Verständnis über das Tumormicroenvironment zu erlangen und hiermit Chancen zur besseren Therapie des PDAC zu generieren, werden vor allem CAFs genau untersucht. Als CAFs bezeichnet man aktivierte Fibroblasten die sich in dem Tumormicroenvironment befinden und sich von ihrer Aktivität, Form und Funktion von

inaktiven Fibroblasten unterscheiden <sup>9</sup>. In der Literatur bestehen diverse Angaben für Progenitorzellen von CAFs. Diese können sich zum Beispiel aus Stellatumzellen (PSC), Fibroblasten, Adipozyten, Endothelzellen, Perizyten und aus mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark oder aus dem Fettgewebe differenzieren <sup>10-15</sup>. Wohingegen die Oberflächenmarker für PSC bereits relativ gut erforscht sind, hierbei handelt es sich um Desmin, glial fibrillary acidic protein (GFAP) und Acetylcholinrezeptoren, so ist dies bei MSC nicht eindeutig. Je nach Gewebeerzeugung scheinen MSC unterschiedliche Oberflächenmarker zu haben. Sunami et al. präsentieren eine Übersicht, in der Oberflächenmarker für CAFs generiert aus PSC und MSC aus unterschiedlichen Geweben aufgelistet wurden <sup>4</sup>. Es handelt sich hierbei um MSC generiert bei Magenkarzinom, Brustkrebs, Pankreaskarzinom und Ovarialkarzinom <sup>16-19</sup>. Je nach Gewebe zeigen sich unterschiedliche signifikante Marker. Die entsprechenden Marker für die Pankreaskarzinom-MSK sind GM-CSF, CD44+, CD73+, CD90+, CD49α+ <sup>18</sup>. Die MSC aus dem Pankreaskarzinom fördern das Wachstum des Tumors, die Invasion in das umliegende Gewebe und die Metastasierung. Sie sezernieren den Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) und die Zellen des Pankreaskarzinoms exprimieren den entsprechenden GM-CSF-Rezeptor. Dieses Zusammenspiel sorgt und ist notwendig für Invasions- und Metastasierungsprozesse <sup>18</sup>.

Aufgrund des Einflusses von MSC auf das Tumormicroenvironment und auf die Metastasierungs- sowie Invasionsfähigkeit des Pankreaskarzinoms, gilt es noch mehr über den Ursprung mesenchymaler Stammzellen im Pankreas herauszufinden

### **1.3. Mesenchymale Stammzellen**

Mesenchymale Stammzellen sind aktuell und seit mehreren Jahrzehnten ein sich schnell entwickelndes Feld in der medizinischen Forschung. Sie zählen zu den adulten multipotenten Stammzellen <sup>20,21</sup>.

Die ersten Nennungen Mesenchymaler Stammzellen stammen aus dem Knochenmark von Mäusen. Hierbei wurden Zellen isoliert die adhären auf Plastikoberflächen wuchsen und spindelförmige Kulturen formten <sup>22</sup>. Diese wurden anfangs als Colony Forming Unit Fibroblasts (CFU-F) bezeichnet. Aufgrund ihres Potentials sich in Zellen des mesenchymalen Ursprungs zu differenzieren, hierzu zählen Zellen die in der Embryonalentwicklung aus dem Mesoderm abstammen wie zum Beispiel Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten, wurde neben den CFU-F der Begriff mesenchymale Stammzellen (MSC) geprägt <sup>23</sup>. In den folgenden Jahren wurden MSC nicht nur aus dem Knochenmark von Mäusen isoliert, sondern auch aus menschlichem Gewebe sowie aus

anderen Organsystemen <sup>24</sup>. Es wurden MSC aus dem Nabelschnurblut <sup>25-27</sup>, aus Fettgewebe <sup>28-30</sup>, weiterhin aus dem Knochenmark <sup>28</sup>, aus dem perivaskulärem Gewebe <sup>31</sup> und auch aus verschiedenen anderen Geweben isoliert. Da Silva Mereilles et.al beschreiben sogar, dass nach ihren Ergebnissen MSC-Populationen oder MSC ähnliche Zellen in kultivierbaren Population aus nahezu jedem post-natalem Organ gefunden werden können. Sie nennen hierbei Gehirn, Milz, Leber, Niere, Lunge, Knochenmark, Muskulatur, Thymus und das Pankreas und vermuten einen perivaskulären Ursprung als Nische für MSC <sup>32</sup>.

Genauso wie es bei dem Ursprungsgewebe für mesenchymale Stammzellen mehrere Möglichkeiten gibt, so gibt es auch viele unterschiedliche Protokolle zum Isolieren mesenchymaler Stammzellen. Um bei der daraus resultierenden Diversität der mesenchymalen Stammzellpopulationen eine gewisse Struktur vorzugeben, wurden von der International Society for Cellular Therapy (ISCT) minimale Kriterien erstellt um eine Zelle als mesenchymale Stammzelle zu klassifizieren. Hierzu zählen ein plastikadhärentes Wachstum, die Expression spezifischer Oberflächenmarker im FACS und die Fähigkeit in Adipozyten, Osteoblasten und Chondroblasten zu differenzieren <sup>33</sup>. Im FACS müssen 95% der Zellen die Oberflächenmarker CD105 (thymus cell antigen), CD73 (Endoglin) und CD90 (5'nucleotidase, ecto/ NT5e) exprimieren. Die Oberflächenmarker CD45 (leucozyte common antigen), CD34 (hematopoietic progenitor cell antigen), CD14 (monocyte differentiation antigen), CD11b (Integrin alpha M), CD79a (B-Cell antigen receptor complex-associated protein beta chain) oder CD19 (B-Lymphocyte cell surface antigen) müssen abwesend sein. Mit diesem minimalen Kriterien sollte ein Standard zur Definition mesenchymaler Stammzellen geschaffen werden <sup>33</sup>.

Das Klassifikationsmodell weist aber einige Limitationen auf, die auch durch die ISCT festgestellt wurden. Hierbei wurde explizit auf die Beschränkung der Vorgaben auf humane MSC verwiesen. Die Oberflächenmarker sind für humane MSCs bestätigt und treffen eventuell nicht vollständig auf MSC murinen oder anderen nicht humanen Ursprunges zu <sup>33</sup>. Zusätzlich gibt es auch einige Unklarheiten in der Literatur über die tatsächlich vorhandenen Oberflächenmarker. So wird zum Beispiel CD34 als negativer Marker für MSC geführt, wohingegen einige Studien gerade auf CD34 als Isolationsmarker hinweisen <sup>34-36</sup>. Der von Kolf et al. als bekannteste Marker für die Isolation von MSC beschriebene Oberflächenantikörper Stro-1 <sup>37</sup>, wurde anhand von CD34 positiven Zellen gewonnen <sup>38</sup>. Im entsprechenden Review von Kolf et al. werden die Oberflächenmarker für MSC reevaluiert und nach ihrem Erscheinen und ihrer Anwendung in weiteren Studien gelistet. Hierbei werden einige Unterschiede deutlich. Zum Beispiel scheint CD34 vor allem bei humanen MSC ein selten vorhandener Marker

zu sein, wohingegen er bei MSC murinen Ursprunges sowohl vorhanden, als auch nicht vorhanden sein kann. Derartige Unterschiede werden auch bei anderen Oberflächenmarkern deutlich.

Zusammenfassend gibt es je nach Organismus oder Organsystem keinen einzelnen eindeutigen Oberflächenmarker, der spezifisch für MSC ist und je nach Untersuchungsmethode oder Ursprungsgewebe der Zellen, können die Oberflächenmarker variieren.

Die meisten als MSC klassifizierten Zellen werden aufgrund ihrer Plastikadhärenz gewonnen<sup>20</sup>. Nach klassischen Gewebegewinnungsmethoden, diese unterscheiden sich je nach Ursprungsgewebe, werden die Zellen falls notwendig mechanisch und enzymatisch aus ihren Zellverbunden gelöst und anschließend kultiviert<sup>28,39-41</sup>.

Nach mehrfachem Passagieren der Zellen und gegebenenfalls Entfernen der nicht adhären wachsenden hämatopoetischen Zellen durch Waschschriffe, werden die Zellen nach Ablösung von der Oberfläche, anhand ihrer Oberflächenmarker im FACS exemplarisch überprüft oder sortiert. Anschließend oder alternativ werden verschiedene Differenzierungsversuche durchgeführt. Klassischerweise beinhalten diese die adipogene, chondrogene und oder die osteogene Zelldifferenzierung und Bestätigung dieser durch Färbemethoden<sup>24,26,28,29,42-47</sup>. Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft sind an MSC viele weitere Differenzierungsversuche durchgeführt worden, sodass zusätzlich zu den drei Grunddifferenzierungen noch andere hinzugekommen sind. Beispiele dafür sind Differenzierungen in Myozyten, Kardiomyozyten, pankreatische Zellen<sup>46-48</sup>, vor allem im endokrinen Bereich, und Nervenzellen. Einen guten Überblick über die verschiedenen Differenzierungen, Ursprungsgewebe für MSC und die klassische Isolationsmethode liefert das Review von Ullah et al.<sup>49</sup>.

Diese Art der Isolation, eine in vitro Methode<sup>50</sup>, ist aktuell die am weitesten verbreitete und die sicherste Variante um MSC zu gewinnen. Mit in vitro Methode ist gemeint, dass der MSC-Status erst nach adhärenter Zellkultur evaluiert wird. Diese Methode hat aber auch gewisse Nachteile. Die Bestimmung der MSC läuft im Rückschlussverfahren, sodass nach Differenzierungsversuchen oder nach Oberflächenmarkerbestimmung einzelner Kulturen im Nachhinein davon ausgegangen wird, dass die Zellpopulation aus MSC besteht oder diese enthält. Hierbei offenbart sich das nächste Problem bezüglich der Reinheit der Population. Häufig besteht bereits direkt nach Isolation der Zellen eine gewisse Heterogenität in den Populationen<sup>50</sup>. Hämatopoetische Zellen werden meist erfolgreich entfernt, aber je nach Ursprungsgewebe besteht die stromale Zellpopulation nicht nur aus MSC. Exemplarisch im Knochenmark besteht die stromale Zellpopulation aus MSC, Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen, glatten Muskelzellen und fraglich auch Osteoblasten<sup>51</sup>. All diese Zellen können primär plastikadhären wachsen und

potenziell optisch ähnlich den MSC in der Zellkultur erscheinen. Die meist heterogene MSC-Zellpopulation besteht in der Regel aus optisch unterschiedlichen Zelltypen. Sie reicht hierbei von kaum spindelförmigen bis zu großen polygonalen Zellen, die teilweise konfluierend wachsen, dicht gepackt sind und annähernd kubisch erscheinen <sup>50</sup>. In anderen Fällen wird ein eher fischzugartiges Muster bei Konfluenz beschrieben. Prokop et al. haben in den MSC-Populationen drei unterschiedliche MSC-Subtypen beschrieben. Der erste Typus ist die klassische bekannte spindelförmige MSC-Zelle die teilweise bipolare Ausläufer ausbildet. Daneben wurden große polygonale Zellen entdeckt, die eine sehr geringe Teilungsaktivität haben und kleine 50µm große Zellen, die sich schnell selbst erneuern und deshalb RS-Zellen genannt werden (rapidly self-renewing) <sup>52</sup>. Eine weitere optisch morphologische Fähigkeit die für MSC-Populationen beschrieben ist, ist die Fähigkeit bei geringer Aussaatdichte bis teilweise zu einzelnen Zellen dennoch proliferierende Kolonien zu bilden, die sich auch differenzieren können <sup>22,52-55</sup>. Sekiya beschreibt außerdem ein erhöhtes Wachstum und gesteigerte Zellteilung in der Peripherie der Kulturen, wohingegen in den Zentren der Populationen die Zellteilung zwar langsamer verläuft aber die Differenzierung stattfinden <sup>55</sup>.

Mit zunehmender Anzahl der Passagierungen und zunehmender Dauer der adhärennten Zellkultur besteht ein Risiko für Veränderungen der Populationen. Diese Veränderungen könnten einen grundsätzlichen Einfluss auf unser Verständnis über MSC, ihre fundamentale Natur und ihr tatsächliches Potential nehmen <sup>50</sup>. Ein Beispiel ist die vermutete Veränderungen von initial CD34 positiven MSC zu CD34 negativen MSC nach adhärenter Zellkultur und mehreren Passagierungen <sup>34,56,57</sup>. Im Gegensatz zu der in vitro Klassifizierung von MSC gibt es relativ wenige Informationen über das in vivo Verhalten von MSC <sup>50</sup>.

Um derartige Artefakte zu vermeiden und potenzielle Effekte der Plastikadhärenz auszuschließen, wäre es notwendig eine Methode zu entwickeln, anhand derer MSC separiert werden können und erst nach ihrer Bestätigung kultiviert werden. Ein Beispiel einer solchen Methode ist die von Crisan et al. Der Arbeitsgruppe gelang es, bei ihrem Versuch eine perizytäre Zellpopulation aus unterschiedlichen Geweben inklusive des humanen Knochenmarks und Pankreas zu isolieren und hierbei eine Zellpopulation mit MSC-Phänotyp und Differenzierungspotential zu gewinnen <sup>31</sup>. Hierbei wurde, nach der Gewebsgewinnung und lösen der Zellen aus ihren Verbänden, eine Zellsortierung anhand der Oberflächenmarker CD146 positiv und CD45, CD34 und CD56 negativ durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen kultiviert.

Einen weiteren Ansatz dafür liefern die Methoden von Lützkendorf und Müller et al. (persönliche Kommunikation). In ihren Experimenten versuchen sie mit Hilfe von Zellsortierung über ein Durchflusszytometer anhand des positiven Oberflächenmarkers

CD146 und der negativen Sortierung für CD45 und HLA-DR aus humanem Knochenmark eine nicht in vitro kultivierte Population an MSC zu gewinnen und diese auf RNA-Ebene und in Differenzierungsversuchen zu klassifizieren. Aktuell kämpft diese Methode vor allem mit den geringen resultierenden Zellzahlen in der nicht durch Zellkultur vervielfältigten Population.

Dieses grundsätzliche Modell haben wir auf murine Pankreata übertragen und hoffen in diesem Rahmen nicht nur eine MSC-Population aus dem Pankreas von 8 Wochen alten C57bl/6j Mäusen zu isolieren, sondern ihren in vivo Zustand in einer RNA-Sequenzierung zu evaluieren.

#### **1.4. CD146**

CD146, alternativ auch als MCAM oder Mel-CAM bezeichnet, wurde 1987 von Lehmann et al. erstmalig auf Melanomen und hauptsächlich auf deren metastatischen Läsionen entdeckt <sup>58</sup>. MCAM steht für melanocyte cell adhesion molecule. Es zählt zu den Adhäsionsproteinen der Immunglobulin Superfamilie und wird als integrales Glykoprotein der Zellmembran klassifiziert <sup>59,60</sup>. Die Arbeitsgruppe um Johnson et al. entdeckten, dass sich CD146 auf Endothelzellen von Blutgefäßen befindet, die in primäre und metastatische Läsionen maligner Melanome einwachsen oder sich dort bereits befinden. Dies war der erste Hinweis für eine CD146 assoziierte Metastasierung <sup>61,62</sup>.

Das CD146 Gen ist beim Menschen auf Chromosom 11 und bei Mäusen auf Chromosom 9 lokalisiert <sup>63</sup>. Sowohl die Gen-Sequenz von CD146, zu 76,2% identisch <sup>64</sup>, als auch die Proteinzusammensetzung ist zwischen Mäusen und Menschen sehr ähnlich <sup>65</sup>. Aufgrund von alternativen Splicevarianten gibt es eine kurze und lange Isoform <sup>66</sup>. Die dritte Isoform wird als löslich bezeichnet ist im Gegensatz zu den anderen beiden Varianten nicht an der Zellmembran, sondern im Zytosol zu finden <sup>67</sup>. Die Promotorregion des humanen CD146 wird umgeben von mehreren Konsensussequenzen mit Sequenzmotiven für die Transkriptionsfaktoren SP1, AP-2 und CREB <sup>68,69</sup>. Aufgrund der existenziellen Bedeutung des AP-2 in der Embryonalentwicklung und den mehreren vorhandenen Bindungsstellen nahe des Promotor wird während der Embryonalentwicklung eine Hochregulierung des CD146 vermutet <sup>65</sup>.

Bisher wurde CD146 auf mehreren Zellen bestätigt. Es befindet sich auf Zellen des vaskulären Systems, hierzu zählen Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Perizyten <sup>31,70-73</sup>. Die generelle Verbreitung im vaskulären Systems in der Embryonalentwicklung und der Einfluss von CD146 auf die Angiogenese wurde an Zebrafischen nachgewiesen <sup>74,75</sup>. Hierbei besteht ein deutlicher Zusammenhang, sodass bei einem Knockout von CD146 die Vaskularisation stark gehindert wird und schlecht entwickelte intersomitische

Gefäße ausgebildet werden. Eine Überstimulation hingegen führt zu einer deutlichen Induktion der Angiogenese.

Auf ungefähr 1% der mononukleären Blutzellen kann CD146 ebenfalls nachgewiesen werden, auch auf T-, B- und NK Zellen <sup>76</sup>. In verschiedenen Krebserkrankungen wurde die Anwesenheit von CD146 beobachtet. Beispiele dafür sind das maligne Melanom, Brustkrebs, Leukämie, Nierenzellkarzinom, Lungenkarzinom, Pleuramesotheliom und das Prostatakarzinom <sup>77-86</sup>. Höhere Expressionslevel gehen, der Umfang der Komplikationen ist abhängig von der Tumorentität, mit einer erhöhten Neigung zur Bildung von Metastasen, verstärkter Angiogenese, erhöhter Rezidivrate, stärkere Invasion des umliegenden Gewebes und/oder mit einem schlechterem Outcome einher <sup>65</sup>. In der Embryonalentwicklung wurde die Existenz von CD146 ebenfalls festgestellt. So wurde bei Hühnern ein erhöhtes Expressionslevel von CD146 im Trachealepithel in der frühen embryonalen Phasen festgestellt, dass in der späteren Embryonalphase und nach dem Schlüpfen aus dem Ei nicht mehr nachzuweisen war <sup>87</sup>. Ein weiterer Nachweis für CD146 wurde im Immunsystem erbracht. Im Gewebe des Thymus wird von fast allen Elementen der Microenvironment CD146 exprimiert. Ihm wird eine wichtige Rolle in der Erhaltung der Architektur des Thymus sowie in der Transmembranmigration und der Homingfunktion für Lymphozyten zugeschrieben <sup>88</sup>. Zusätzlich besteht ein positiver Zusammenhang für proinflammatorische Reaktionen und einem stark exprimierten CD146 <sup>65</sup>. Dieser Zusammenhang wurde bei verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen bestätigt. Beispiele sind die idiopathische Myopathie <sup>89</sup>, chronisch entzündetes Gewebe <sup>71</sup>, Rheumatoide Arthritis <sup>90</sup>, COPD <sup>91</sup> und Multiple Sklerose <sup>92,93</sup>. Die Relevanz von CD146 zu dieser Arbeit besteht darin, dass es neben seinen anderen schon aufgeführten Lokalisationen auch von Mesenchymalen Stammzellen exprimiert wurde. Die erstmalige Identifizierung von CD146 als möglichen Marker für MSC erfolgte im Jahre 2003. Shi et al. untersuchten Knochenmark-MSC (KM-MSC) und Zahnpulpa-MSC auf perizytäre Marker, um einen Rückschluss auf die Ursprungsnische von MSC schließen zu können. Sie isolierten aus beiden Geweben mit magnetischer Zellsortierung eine vermutete MSC-Population aus Stro-1 positiven Zellen und diese wurden auf ihre vaskulären Oberflächenantigenen untersucht. Im Gegensatz zum vWF, der von den Stro-1 positiven MSC-Populationen nicht exprimiert wurde, wurden CD146 und alpha-SMA exprimiert. Sie stellten die Vermutung auf, dass adulte MSC ihren Ursprung in der perivaskulären Nische haben und CD146 ein Marker für MSC sein könnte <sup>94</sup>. Aufgrund von höherer CD146 Expression auf humanen Umbilicalvenen perivaskulärer Zellen im Vergleich zu humanen KM-MSC, wurden die perivaskulären Zellen mit KM-MSC verglichen. Es stellte sich heraus, dass die perivaskulären Zellen eine höhere Proliferationsrate als KM-MSC hatten und ebenfalls zur Differenzierung in

Adipozyten, Chondro- und Osteoblasten fähig waren. Bei den perivaskulären Zellen wurde ein höheres Level von CD146 im Vergleich zu den KM-MSK festgestellt <sup>95</sup>. Es wurden sowohl die Rückschlüsse getroffen das perivaskuläre humane Umbilicalvenenzellen möglicherweise potentere MSK sind als auch das CD146 ein Marker für MSK sein könnte. Unterstützt wurde diese Überlegung durch den Nachweis, dass CD146 positive Perizyten und MSK ein ähnliches funktionelles und Gen-Expressionsprofil haben <sup>45,65</sup>. Weitere Untersuchungen bestätigten nicht nur die Differenzierungsfähigkeit von CD146 MSK <sup>95-97</sup>, sondern auch die Möglichkeit zur Isolation dieser aus unterschiedlichen Geweben, inklusive des humanen Pankreas <sup>31</sup>. Russel et al. gehen davon aus, dass eine höhere CD146 Expression im FACS mit einem höheren trilinearen Differenzierungspotential einhergeht <sup>98</sup>.

## 2. Zielstellung

Mesenchymale Stammzellen können aus verschiedenen unterschiedlichen Geweben des Körpers isoliert werden<sup>32</sup>. Die Isolation von multipotenten Perizyten aus dem murinen Pankreas mit Differenzierungs- und Stammzellpotential ist bereits gelungen<sup>31</sup>. MSC oder CAFs die sich aus MSC bilden, gehören zur Tumormicroenvironment des PDAC<sup>4</sup>. Es besteht ein gesicherter Einfluss von MSC auf das Wachstum und die Invasionsfähigkeit von Pankreaskarzinomen<sup>18</sup>. Ein relevanter Oberflächenmarker zur Spezifizierung von MSC ist CD146<sup>94</sup>.

Ziel der Arbeit ist die Entwicklung und Bestätigung einer Methode zur Isolation Mesenchymaler Stammzellen aus dem murinen Pankreas. Hierbei soll mit einer Zellsortierung anhand der Oberflächenmarker CD146 und CD45 eine MSC-Population kultiviert und auf ihre Eigenschaften mittels einer mRNA-Sequenzierung untersucht werden.

Sollte die Isolation von MSC aus dem murinen Pankreas gelingen, so kann in weiteren Projekte versucht werden, eine MSC-Population aus genetisch veränderten Mausmodellen zu isolieren und ihren Status und Einfluss auf das Tumorwachstum von PDAC zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu analysieren.

### 3. Material und Methodik

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Laborgeräte

Analysenwaage ABJ220-4NM	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Axiocam 503 color	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Biofuge primo R	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA
Centrifuge 5427 R (Tischzentrifuge)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Cimarec i Poly 15 Multipoint Rührer	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA
FACS Aria	BD Bioscience, San Jose, USA
Flockeneisbereiter AF 100 AS-E	Scotsman Europe-Frimont S.p.A. , Frimont, Italien
Gefrierschrank -80°C Herafreeze	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA
Gefrierschrank -80°C VWR 400 86	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
gentleMACS Octo Dissociator with Heaters	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
HERASafe HS 12 Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA
IKA Schüttler Vortex 2S000	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Inkubator (Brutschrank)	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Kühlschrank 4°C	Philipp Kirsch GmbH, Willstätt-Sand, Deutschland
Kühlschrank comfort -20°C	Liebherr, Kirchdorf an der Iller, Deutschland
Kühlschrank mediline -20°C	Liebherr, Kirchdorf an der Iller, Deutschland
Kühlschrank öko super -20°C	Liebherr, Kirchdorf an der Iller
Kühlschrank profiline 4°C	Liebherr, Kirchdorf an der Iller; Deutschland

Magnet Komet 15/30/50	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Multifuge X3R Centrifuge	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA
Nanodrop One	Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA
NeoVaq Maxi Absaugsystem regelbar	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Tischabzug Typ TA 1500x900	Waldner Laboreinrichtungen, Wängen, Deutschland
Tischzentrifuge Labnet Force 7	Labnet, Corning Incorporated, New York, USA
Vortex Gene 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Wasserbad	Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, Deutschland
Wasserbad Schüttelvorrichtung	Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, Deutschland

### 3.1.2. Verbrauchsmaterial

5ml Rundbodenröhrchen, Polypropylen	Falcon, Corning Incorporated, New York, USA
6/24 Well Cell Culture Plate	Cellstar, Greiner bio one, Frickenhausen
Cell culture Flasks 25/75/150cm <sup>2</sup> , 50/250/550ml, PS, redv filter cap, sterile	Cellstar, Greiner bio one, Frickenhausen
Einmalhandschuhe Nitril white L	Vasco, Braun, Northamptonshire, UK
Einwägschalen	
Einweg Skalpelle	Servoprax GmbH, Wesel, Deutschland
Glaspasteurpipetten (225mm)	Brand GmbH + Co, Wertheim, Deutschland
gentleMACS C Tubes	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Löffel	
Petri dish 94x16, with vents, with logo,	Greiner bio one, Frickenhausen,

heavy version, steril Pinzette	Deutschland
Pipettenspitzen, Filter 10/100µl, PCR clean/sterile	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pre-Separation Filters, 30µm	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Safe-Lock Tubes 1,5ml/2ml	1000 Eppendorf Tubes, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten 2/5/10/25ml	Cellstar, Greiner bio one, Frickenhausen, Deutschland
Sterile Spritze 20ml Luer-lok Plastipak	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA
Sterile Syringe Filter 0,2µm Cellulose Acetate	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tubes, 15/50ml, PP, graduated, conical bottom, blue screw cap, sterile	Cellstar Tube, Greiner bio one, Frickenhausen, Deutschland
VWR LAB Marker Fine Tip	VWR Scientific, San Francisco
Zellsieb 100µm	Falcon, Corning Incorporated, Corning, USA

### 3.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Accutase Cell Dissociation Reagent	Gibco, StemPro, Life Technologies Limited, Paisley
Amphotericin B	
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CaCl <sub>2</sub> (Calciumchlorid)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Collagenase P (100mg/ml GBSS)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> (Glucose)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dapi, Dihydrochlorid (10mg)	Calbiochem, EMD Biosciences, San Diego, USA
DMEM low Glucose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

DNase 1 (100mg/ml Wasser)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol 70%, vergällt	Walter cup GmbH+Co KG, Kiel, Deutschland
Ethylendiaminetetraacetid acid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
F12	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
FBS Superior 500ml	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Gibco, Life Technologies Limited, Paisley, UK
KCl (Kaliumchlorid)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kaliumdihydrogenphosphat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2	Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mesenchymal Stem Cell SupplementMix	Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (Magnesiumchloridhexahydrat)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
MgSO <sub>4</sub> (Magnesiumsulfat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaHCO <sub>3</sub> (Natriumhydrogencarbonat)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Dinatriumhydrogenphosphat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nycodenz AG	Axis Shield, Gen Group, San Jose, USA
PBS w/o Ca <sup>2+</sup> w/o Mg <sup>2+</sup> low endotoxin	Biochrom GmbH, Berlin
Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep)	Gibco, Life Technologies Limited, Paisley, UK

Pronase (100mg/ml Wasser)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
TRIzol Reagent	Ambion by life technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA
Trypsin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

#### **3.1.4. Kits**

DirektZol RNA MicroPrep	Zymo Research Corp., Irvine, USA
-------------------------	----------------------------------

- Collection Tubes
- Direct-zol RNA PreWash
- DNA Digestion Buffer
- DNase I
- DNase/RNase-Free Water
- RNA Wash Buffer
- Tri Reagent
- Zymo-Spin IC Columns

Spleen Dissociation Kit	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
-------------------------	---

- Buffer S (20x Stock Solution)
- Enzyme D (lyophilized powder)
- Enzyme A (lyophilized powder)

#### **3.1.5. Medien**

PSC-Medium (490ml):

- 40% DMEM low Glucose (200ml)
- 40% F12 (200ml)
- 16% FBS (80ml)
- 1% Pen-Strep (5ml)
- 1% Amphotericin (5ml)

MSC-Medium (500ml):

- Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2 (450ml)

- Mesenchymal Stem Cell SupplementMix (50ml)
- 1% Pen-Strep (5ml)
- 1% Amphotericin (5ml)

#### Hämatoonko-Medium

- DMEM low Glucose (500ml)
- 1% Pen-Strep (5,6ml)
- 10% humanes Plättchenlysate (55ml)
- Heparin 1 I.E./ml (1,1ml)

### 3.1.6. Antikörper

CD45-FITC, mouse (REA737)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD146 (LSEC)-PE, mouse (REA1064)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland

### 3.1.7. Lösungen

#### FACS-Puffer:

- PBS (pH 7,2)
- 0,5% BSA
- 2mM EDTA:

#### Geys Balanced Salt Solution (mit Salz/ohne Salz)

- Aqua dest: 500ml
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ : 0,105g
- $MgSO_4$ : 0,0171g
- KCl: 0,185g
- $KH_2PO_4$ : 0,015g
- $Na_2PO_4$ : 0,0598g
- $NaHCO_3$ : 0,5g
- $C_6H_{12}O_6$ : 0,5g
- NaCl: 3,5g (nur bei mit Salz hinzufügen)
- $CaCl_2$ : 0,1126g

#### Nycodenz-Lösung 1: Enzymmix

- GBSS 20ml/30ml
- Collagenase P 50µl/75µl (0,0025%)
- Pronase 20µl/30µl (0,001%)
- DNase 1ml/1,5ml (5%)

#### Nycodenz-Lösung 2: GBSS 0,3% BSA

- GBSS 10ml
- BSA 30mg

#### Nycodenz-Lösung 3: GBSS 28,7% Nycodenz

- GBSS ohne NaCl 5ml
- Nycodenz AG 1,435g

#### Verdauungspuffer:

- HBSS 20ml/30ml
- Collagenase P 50µl/75µl (0,0025%)
- Pronase 20µl/30µl (0,001%)
- DNase 1ml/1,5ml (5%)

### 3.1.8. Biologisches Material

Maus C57Bl/6J, 8 Wochen alt, männlich  
weiblich

Charles River Laboratories, Wilmington und  
USA

Zentrum für Medizinische Grundlagen-  
forschung, Halle (Saale), Deutschland

Maus K-ras<sup>LSL.G12D/+</sup>;Pdx-1-Cre(KC),  
8 Wochen alt, männlich und weiblich

Zentrum für Medizinische Grundlagen-  
forschung, Halle (Saale), Deutschland

Maus Pdx-1-Cre(CRE),  
8 Wochen alt, männlich und weiblich

Zentrum für Medizinische Grundlagen-  
forschung, Halle (Saale), Deutschland

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. Gewebsgewinnung**

Die Gewinnung von Pankreata aus C57Bl/6J-Mäusen wurde Anhand der Meldung zur Tötung von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken K2aM3 mit dem Titel „Pankreas-Fibroblasten in der Pankreaskarzinogenese“ durchgeführt. Die Gewinnung von Pankreata aus K-ras<sup>LSL.G12D/+</sup>;Pdx-1-Cre(KC) und Pdx-1-Cre (CRE) Mäusen wurde Anhand der Genehmigungsnummer des Landesverwaltungsamtes Sachsen-Anhalt MLU 2-1348 durchgeführt. Tiergerechte Tötung und Organentnahme wurden von erfahrenen Experimentatoren durchgeführt.

Zur Gewinnung der murinen Pankreata wurden die Mäuse per Genickbruch getötet. Um eine bakterielle Kontamination des Gewebes zu vermeiden, wurden sie mit 70-prozentigem Ethanol besprüht. Die Bauchhöhle sowie der Thorax wurden über einen Längsschnitt eröffnet, um zu dem intraperitoneal gelegenen Pankreas zu gelangen. Das Pankreas ist bindegewebig an der Milz fixiert. Über die Milz wurde das Pankreas lokalisiert. Mit einer Präparationsschere oder einem Skalpell und einer Pinzette wurde das Pankreas von der Milz und dem Fettgewebe gelöst. Zur weiteren Verarbeitung wurde das Pankreas in einem 50ml Falcon in HBSS gewaschen und auf Eis gelagert zur sterilen Werkbank transportiert.

### **3.2.2. Nycodenz-Dichtezentrifugation**

Die Nycodenz-Dichtezentrifugation ist eine Methode um Zellen, subzelluläre Organellen und Membranen oder Viren nach ihrer Dichte vom restlichen Gewebe zu separieren. Im Vergleich zu anderen Lösungen (z.B. Metrimazide oder Percoll-Lösung) sei die Nycodenz-Lösung weniger toxisch, Hitze beständiger und erhält eine normale Zellmorphologie bei der Separation.

Die Methode zur Isolation von Stellatumzellen aus dem Pankreas wurde von Apte et.al. nach dem initialen Protokoll von Schäfer et al. zur Isolation von Stellatumzellen aus der Leber abgewandelt<sup>99,100</sup>.

Um die Nycodenz-Dichtezentrifugation durchzuführen, müssen drei verschiedene Lösungen mit einer unterschiedlichen Dichte hergestellt werden. Dafür wird GBSS, Gey's balanced salt solution benötigt. Zur Herstellung von GBSS müssen verschiedene Substanzen genau eingewogen werden (siehe 3.1.7 GBSS) und in destilliertem Wasser gelöst werden. Je nachdem ob das GBSS Kochsalz oder nicht enthalten soll, wird dieses beigefügt oder nicht. Im letzten Schritt der Herstellung muss der Lösung Calcium-Chlorid hinzugefügt werden. Hierfür wird die Menge an Calciumchlorid in 2ml bidestilliertem

Wasser gelöst. Anschließend wird diese Lösung tröpfchenweise den GBSS-Behältern hinzugefügt, um ein Ausfallen der Substanzen zu verhindern. Das GBSS wird anschließend bis zur Verwendung gekühlt gelagert.

Mithilfe des GBSS müssen drei verschiedene Lösungen hergestellt werden. Die erste Lösung ist der Enzymmix. Sie besteht für 20ml GBSS, 0,02% Pronase (20µl) , 0,05% Collagenase P (50µl) und 0,1% DNase (1ml). Die zweite Lösung ist GBSS mit 0,3% BSA. Hierbei werden 10ml GBSS 30mg BSA hinzugegeben. Die dritte Lösung ist GBSS mit 28,7% Nycodenz. Hierbei werden 1,435g Nycodenz in 5ml GBSS ohne NaCl Beisatz vermischt.

Nach Vorbereitung der benötigten Lösungen kann mit der Entnahme des Pankreas wie in 3.2.1. beschrieben begonnen werden.

Ist das Mauspankreas in der sterilen Werkbank angekommen, wird es aus dem 50ml Falcon in eine saubere Petrischale übernommen. Um das Pankreas grob vom HBSS zu trennen, wird das Gewebe mit einer Pinzette in eine weitere auf einer Kühlplatte positionierten Petrischale übernommen. Das Pankreas wird auf Verunreinigungen inspiziert und bei Bedarf werden andere Organ- oder Gewebstücke entfernt. Mit einem Skalpell und einer Pinzette wird das Gewebe nun gründlich zerkleinert, sodass die einzelnen Gewebbrocken kleiner als 2mm<sup>3</sup> sind. Das zerkleinerte Gewebe wird anschließend mit der Pinzette in ein 50ml Falcon übernommen das den Enzymmix enthält. Der Enzymmix ist bereits auf eine Temperatur von 37°C im Wasserbad vorgeheizt. Der Enzymmix wird 40 Minuten im Wasserbad platziert. Alle 5 Minuten wird das Falcon vorsichtig und gründlich geschwenkt. Alternativ kann eine Schwenk- oder Rüttelvorrichtung benutzt werden. Nach Ablauf der 40 Minuten wird das Falcon aus dem Wasserbad entnommen und wieder unter der sterilen Werkbank platziert. Die entstandene GBSS-Pankreas-Suspension wird nun gefiltert. Hierzu wird ein 100µm-Filter auf einen weiteren Falcon platziert. Danach wird vorsichtig die Suspension auf den Filter pipettiert. Um etwaige Rückstände im ersten Falcon zu vermeiden, wird es mit 5ml HBSS gespült und die Flüssigkeit ebenfalls durch den Filter pipettiert. Anschließend wird die filtrierte Suspension bei 450xG für 6 Minuten und mit einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Der nach der Zentrifugation entstehende Überstand wird nach der Zentrifugation abgesaugt. Das übrig gebliebene Zellpellet wird durch vorsichtiges Pipettieren in 5-10ml GBSS resuspendiert und erneut unter den vorher genannten Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wird erneut verworfen.

Folgend beginnt die Aufschichtung des Dichtegradienten. Das Zellpellet wird in 4,75ml GBSS mit 0,3% BSA resuspendiert. Zu der Suspension werden nun 4ml GBSS mit 28,7% Nycodenz geben und einmalig vermischt. Mit einer 1000µl Pipette werden durch vorsichtiges Heruntergleiten an der Falconwand 3ml GBSS mit 0,3% BSA auf die

bestehende Suspension geschichtet. Anschließend wird die Probe für 20 Minuten bei 1400xG und 4°C unter Ausschaltung der Rotorbremse zentrifugiert. Innerhalb der 20 Minuten wird ein neues 50ml Falcon mit 15ml GBSS vorbereitet. Nach der Zentrifugation wird die Probe zurück unter der sterilen Werkbank platziert. Es sollte sich nun eine Schichtung in dem entsprechenden Falcon ausgebildet haben. Auf dem Boden des Falcons befindet sich ein Zellpellet. Oberhalb des Zellpellets befindet sich die vermischte Schicht aus GBSS mit 0,3% BSA und GBSS mit 28,7% Nycodenz und darüber befindet sich die Schicht aus GBSS mit 0,3% BSA. Zwischen den beiden Schichten sollte sich eine weitere Schicht ausgebildet haben. In dieser Schicht befinden sich flockige, weiße Zellkonglomerate. Diese Schicht wird auch „fluffy layer“ genannt. In ihr befinden sich fibroblastoide Zellen und vor allem die Pankreas-Stellatumzellen. Es werden durch vorsichtiges Pipettieren die Zellen aus der Zwischenschicht entfernt und in das vorbereitete neue Falcon übernommen. Das neue Falcon wird anschließend für 7 Minuten bei 450xG und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Probe in 50µl FACS-Puffer resuspendiert und für das FACS weiter präpariert.

### **3.2.3. Neue Zellisolationsmethode**

Der weitere Ablauf beschreibt die Zellisolationsmethode für die C57Bl/6J-Mäuse. Um einzelne Zellen aus den entnommenen Pankreata herauszulösen, werden diese zunächst unter sterilen Bedingungen in einer von unten gekühlten Petrischale mit Skalpell und Pinzette in möglichst kleine Teile zerschnitten. Das zerschnittene Gewebe wird in ein 50ml Falcon mit 20ml des auf 37°C im Wasserbad erwärmten Verdauungspuffer (HBSS + 0,0025% Collagenase + 0,001% Pronase + 5% DNase) übernommen. Schlecht lösliche Zellreste auf der Petrischale werden in 2-3ml des Verdauungspuffers resuspendiert und ebenfalls in das 50ml Falcon übernommen. Das Falcon wird für eine halbe Stunde bei 37°C im Wasserbad platziert und alle 5 Minuten manuell geschwenkt. Alternativ kann auch eine in das Wasserbad eingesetzte Schüttelvorrichtung benutzt werden. Durch die Enzyme wird das Gewebe angedaut und einzelne Zellen lösen sich aus dem Zellverbund. Nach Ablauf der 30 Minuten wird das Falcon aus dem Wasserbad genommen und in der sterilen Bank platziert. Dort wird die Zellsuspension durch einen 100µm Filter, der einem neuen 50ml Falcon aufliegt, gegossen. Für etwaige Rückstände im ersten Falcon, wird dieses mit 20ml FBS-haltigem Medium, vorzugsweise PSC-Medium, gespült und ebenfalls durch den Filter in das neue Falcon gegossen. Um die Zellen von den Resten des Verdauungspuffers zu trennen, wird das neue Falcon bei 450xG und 4°C für 10min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand verworfen und die Zellen in 10ml FACS-Puffer oder

HBSS resuspendiert. Davon werden zweimal 10µl entnommen, um die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer zu bestimmen. Während des Zählens wird die Zellsuspension bei 450xG und 4°C für 10min erneut zentrifugiert. Der Überstand wird wieder verworfen. Anschließend wird die Probe für das FACS vorbereitet.

Für die Mäuse der genetischen Sorte K-ras<sup>LSL.G12D/+</sup>;Pdx-1-Cre(KC) und der Sorte Pdx-1-Cre(CRE) wurde eine andere Isolationsstrategie verwendet. Vor allem da weniger Versuchstiere zur Verfügung standen, wurde nach einer effizienteren Zellisolationsmethode gesucht.

Hierbei zeigte sich die Isolation einzelner Zellen mit Hilfe des gentleMACS Systems und dem Spleen Dissociation Kit mouse von Miltenyi Biotech als erfolgsversprechend.

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben werden die Pankreata aus den Transportfalcons auf eine Petrischale übernommen, um sie von der Transportflüssigkeit grob zu trennen. Im nächsten Schritt werden die Pankreata in ein vor der Gewebsgewinnung vorbereitetes gentleMACS C Tube übernommen. Dieses Tube enthält einen Enzymmix aus 2,4ml einfachem Buffer S, 50µl Enzym D und 15µl Enzym A. Das C Tube wird fest verschlossen und umgekehrt auf dem vorgewärmten gentleMACS Dissociator positioniert. Nun wird das Dissoziationsprogramm m\_spleen\_02 gestartet. Hierbei werden die Pankreata unter großer Geschwindigkeit durch den drehenden Rotor des gentleMACS für 2min zerkleinert. Anschließend wird das Programm 37C\_m\_SDK\_1 aktiviert. Hierbei werden für weitere 15min die Pankreata unter langsamer kontinuierlicher Bewegung des Rotors dem enzymatischem Verdau ausgesetzt. Um nach der Gewebdissoziation alle Zellen zu sammeln, wird die Probe kurz abzentrifugiert. Nun wird die Probe resuspendiert und mit einer 1000µl-Pipette auf den auf einem neuen 50ml-Falcon platziertem Pre-Separation Filter pipettiert. Der Pre-Separation Filter hat eine Porengröße von 30µm. Anschließend wird der Filter mit 7,5ml Buffer S gewaschen. Der Filter kann nun verworfen werden.

Die gefilterte Probe wird nun bei 300xG bei 4°C für 10min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt. Nun werden die Zellen in 10ml FACS-Puffer übernommen und resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl werden nun 10µl entnommen und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Während des Zählens wird die Zellsuspension bei 450xG und 4°C für 10min erneut zentrifugiert. Der Überstand wird wieder verworfen. Bis zur weiteren Verarbeitung wird die Probe bei 4°C gekühlt gelagert.

### 3.2.4. FACS

FACS, auch Durchflusszytometrie genannt, steht für fluorescence activated cell sorting. Mit dieser Methode wird es ermöglicht Zellen, nach Größe, Granularität und Fluoreszenzeigenschaften aufzutrennen.

Grundprinzip des FACS ist, dass die Elektronen eines bestimmten Stoffes, des sogenannten Lasermediums, durch Energiezufuhr von außen angeregt werden und in eine höhere energiereichere Umlaufbahn kommen. Beim Verlassen dieser energiereicheren Umlaufbahn, was durch eine Lichtquelle erzwungen werden kann, werden Lichtquanten frei. Durch die stimulierte Emission kommt es unter weiterer Verstärkung dieses Effektes zur Aussendung eines Lasers. Laser haben einen hohen Grad an Kohärenz, sind stark gebündelt und besitzen jeweils eine charakteristische nahezu konstante Wellenlänge. Der Laser wird in einem Durchflusszytometer auf eine Messküvette gerichtet. Durch diese laufen die Zellen. Trifft der Laser auf die Zellen wird das Licht sowohl gestreut als auch reflektiert und über Detektoren wieder aufgefangen. Das ermöglicht die Analyse der Parameter FSC und SSC. Das sind die Parameter zum Ermitteln der Größe und Granularität der Zellen. Zusätzlich werden die über Antikörper an spezifische Oberflächenmarker der zu untersuchenden Zellen gebundenen Fluorochrome stimuliert. Dadurch emittieren Sie ebenfalls Licht. Dieses Licht kann über das exakte Zusammenspiel von Filtern, Spiegeln und Detektoren aufgefangen und bestimmten Wellenlängenbereichen und damit Farbspektren zugeordnet werden.

Ausgewertet werden die so gewonnene Daten meist in graphischen Darstellungen in Form von Diagrammen. Die in dieser Arbeit genutzten Formen der Darstellung der FACS-Ergebnisse sind das Dot-Plot und das Konturplot.

Sollen die Zellen nicht nur vermessen werden, sondern nach der Vermessung noch für weitere Experimente zur Verfügung stehen, müssen die Zellen sortiert werden. Normalerweise wird die Probe, die durch das FACS läuft, über ein Schlauchsystem in einen Abfallbehälter geleitet. Beim Sortieren werden die Zellen in einen in Schwingung versetzten Schlauch geleitet. Dieser Schlauch sorgt dafür, dass die Flüssigkeit und damit die Zellen tröpfchenweise und somit einzeln abgegeben werden. Um die einzelnen Zellen nach ihren im FACS bestimmten Eigenschaften zu sortieren, werden die Zellen, je nachdem zu welcher Population sie gehören, positiv oder negativ geladen und über ein elektrostatisches Feld ladungsabhängig in ihre zugehörigen Auffangröhrchen abgelenkt.

Die, wie in den vorbestehenden Kapiteln beschrieben, isolierten Zellen müssen für das FACS als erstes gefärbt werden. Die benötigte Menge an Antikörpern und FACS-Puffer wird anhand der in der Neubauer-Zählkammer bestimmten Zellzahl errechnet.

Das Zellpellet wird pro  $10^6$  Zellen in 100 $\mu$ l FACS-Puffer durch vorsichtiges auf und ab pipettieren resuspendiert. Ist das Pellet gelöst, werden jeweils 2 $\mu$ l des mit FITC gelabelten CD45 Antikörper und des mit PE gelabelten CD146 Antikörper pro  $10^6$  Zellen hinzugegeben. Die Zellsuspension wird 10min gekühlt und lichtgeschützt mit den Antikörpern inkubiert. Zum Waschen der nichtgebundenen Antikörper werden 5ml FACS-Puffer hinzugegeben und die Zellsuspension bei 450xG und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird erneut verworfen und das Pellet wird in 1,5ml FACS-Puffer resuspendiert. Zusätzlich werden 1,5 $\mu$ l DAPI hinzugegeben, um bei der Durchflusszytometrie die toten von den lebenden Zellen unterscheiden zu können. Die Zellsuspension wird aus dem 50ml Falcon in ein 5ml Falcon übernommen, das für die Durchflusszytometrie geeignet ist. Die Zellen werden auf Eis gekühlt und lichtgeschützt zum Durchflusszytometer transportiert.

Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit der Durchflusszytometrie zu erreichen, wurden die Zellen bei jedem Durchlauf auf exakt die gleiche Weise vorbereitet und das FACS wurde auf die Zellen und die einzelnen Antikörper eingestellt.

Das bedeutet es wurde als erstes eine Population der Zellen ohne die Zugabe eines Antikörpers eingelesen und nach Forward- und Side-Scatter geeignet im Graphen positioniert. Danach wurden Proben, die jeweils nur mit einem Antikörper gefärbt wurden, eingelesen, um die Intensität der Fluoreszenz einzustellen.

Um nun die Zellen zu sortieren, wurden drei Sets bestimmt.

Set 1: CD146+ CD45- (+/-)

Set 2 (Kontrollgruppe 1): CD146+ CD45+ (+/+)

Set 3 (Kontrollgruppe 2): CD146- CD45- (-/-)

Wie oben beschrieben wurden die mit beiden Antikörpern und DAPI versetzten Zellen zum Sortieren benutzt. Jedes Set an Zellen wurde in ein separates 5ml Falcon mit 0,5ml vorgelegtem Medium sortiert. Nach dem Sortieren wurden die Zellen entweder direkt in Kultur genommen oder für die Gewinnung von RNA vorbereitet.

### **3.2.5. Zellkultur**

Die im FACS sortierten Zellen wurden, je nach Zellzahl, unter sterilen Bedingungen in 24-/6-Well-Platten oder T25-Zellkulturflaschen mit unterschiedlichen Medien bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden alle 2 Tage mikroskopisch begutachtet und zu bestimmten Zeitpunkten photographisch dokumentiert.

Mediumwechsel wurden alle 2 bis maximal 3 Tage durchgeführt, durch Absaugen des alten Mediums und Zugabe von frischem im Wasserbad auf 37°C angewärmten Medium

in einer für das Kulturgefäß entsprechenden Menge (1ml-1,5ml bei 24-Well-Platten bis 20-25ml bei T175-Zellkulturflaschen).

Bei zunehmender Konfluenz der einzelnen Kulturen wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin passagiert. Bei über 70% Konfluenz wurden die Zellen in das nächstgrößere Kulturgefäß passagiert. Für das Passagieren mit Trypsin wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und danach das Zellkulturgefäß mit HBSS gewaschen. Das HBSS wurde erneut abgesaugt und das Zellkulturgefäß mit auf 37°C erwärmtem Trypsin bedeckt. Die Kultur wurde 3-8min im Brutschrank mit Trypsin inkubiert und nach einem dosiertem Handkantenschlag gegen das Kulturgefäß mikroskopisch auf Ablösung überprüft. Bei ausreichender Ablösung der Zellen wurde die Wirkung des Trypsins unter sterilen Bedingungen mit der doppelten Menge an FBS-haltigem Medium inhibiert. Die Zellsuspension wurde daraufhin in ein 50ml Falcon übernommen und zum Entfernen des Trypsins bei 450xG und Raumtemperatur für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde entsorgt und das Pellet in einer für das neue Kulturgefäß entsprechenden Menge an Medium resuspendiert. Daraufhin wurden die Zellen in das neue Kulturgefäß übernommen und erneut bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Einmalig erfolgte nach Zellkultur die erneute Sortierung der kultivierten Zellen im Durchflusszytometer. Nach standardisiertem Ablösen der Zellen mittels Trypsin und der entsprechenden Waschschriffe erfolgte die Zellzahlbestimmung mittels einer Neubauer-Zählkammer. Anschließend erfolgte die Markierung der Zellen mittels Antikörper wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben und folgend die entsprechende Aufteilung der Zellen in die 3 Gruppen.

### **3.2.6. RNA-Isolation**

Die nach der Durchflusszytometrie gewonnenen Zellsuspensionen wurden aus den 5ml Falcons in 2ml Eppendorftubes übernommen. Diese wurden bei Raumtemperatur und 450xG für 5-10min zentrifugiert. Dieser Schritt separiert die Zellen von dem Medium. Nach der Zentrifugation wurde das Medium vorsichtig abgesaugt. Das verbleibende Pellet wurde in 500µl Trizol resuspendiert und für 5min inkubiert. Das Trizol lysiert die Zellen. Danach wurde die 500µl Suspension auf zwei 2ml Eppendorftubes zu je 250µl aufgeteilt. Zu jedem Tube wurden 250µl Ethanol hinzugegeben und die Suspension durch vorsichtiges Pipettieren gründlich vermischt. Die Suspensionen wurden nun jeweils in eine eigene Zymo-Spin IC Column, die in Collection Tubes standen, pipettiert und bei 16.000xG und Raumtemperatur für 1min zentrifugiert. Die Durchflüsse wurden verworfen und die Säulen mit 400µl RNA Wash Buffer und einer erneuten Zentrifugation gewaschen. Dann wurden je 5µl DNase I und 35µl DNA-Digestion-Buffer vermischt und

auf die Säulen pipettiert. Die Inkubationszeit betrug 15min bei Raumtemperatur. Folgend wurden zweimal, mit 400µl Direct-zol RNA Pre Wash, die Säulen gespült und bei 16.000xG und Raumtemperatur für je 1min zentrifugiert. Die Durchflüsse wurden verworfen. Der letzte Waschschrift erfolgte mit der Zugabe von je 700µl RNA Wash Buffer zu den Säulen und mit einer anschließenden zweiminütigen Zentrifugation bei Raumtemperatur und 16.000xG. Bei vollständiger Entfernung des Wash Buffers aus den Säulen und Entfernung der Durchflüsse, konnte nun die RNA mit der Zugabe von je 12µl DNase/RNase-freiem Wasser zu den Säulen und einer erneuten Zentrifugation, bei Raumtemperatur und 16.000xG für 1min, ausgespült werden. Die Durchflüsse mit der RNA wurden aufgefangen und in ein 2ml Eppendorftube übernommen. Die RNA wurde bei -80°C bis zur Vermessung eingefroren.

### **3.2.7. Vermessung der RNA**

Für die Vermessung der RNA wurden die bei -80°C zwischengelagerten Proben vorsichtig wieder aufgetaut und mit einer Tischzentrifuge anzentrifugiert. Die Proben wurden gekühlt zum NanoDrop One transportiert. Der NanoDrop One, ein Spektralphotometer, wurde für die Mikrovolumenanalyse von aufgereinigten Nukleinsäuren und Proteinen entwickelt und misst RNA bis zu einer unteren Nachweisgrenze von 1,6ng/µl.

Nach Auswahl der Registerkarten Nukleinsäuren und RNA sowie einer Reinigung der Messplätze wurden, um eine Leerprobe zu bestimmen, 1-2µl RNase freies Wasser auf den unteren Messplatz pipettiert und vermessen. Nach der Leerprobe wurden die Messplätze erneut mit einem Labortuch gereinigt. 1-2µl der zu vermessenden Probe wurden nun auf den Messplatz pipettiert und durch Senken des Gerätearms vermessen. Wurden mehrere Proben nacheinander vermessen, so wurden die Messplätze nach jeder Probe gereinigt.

Nach Beendigung der Messungen wurden die durch den NanoDrop erhobenen Daten auf ein USB-Speichergerät übertragen und durch Microsoft Excel dargestellt.

Die RNA-Proben wurden nach der Vermessung erneut bei -80°C eingefroren.

Mit Hilfe des NanoDrop wurden der Nukleinsäuregehalt der Proben in ng/µl und die Reinheitsverhältnisse der korrigierten Extinktionen bei 260nm zu 280nm sowie 260nm zu 230nm erhoben. RNA-Proben werden in der Regel bei einem E260/280-Reinheitsverhältnis von 1,8-2,2 als rein angesehen.

### 3.2.8. mRNA-Sequenzierung

Die RNA für die erste Sequenzierung wurde aus jeweils 8 gepoolten Wildtyp-Mäuse-Pankreata nach den unter den Punkten 3.2.3., 3.2.4. und 3.2.6. beschriebenen Protokollen isoliert und anschließend wie unter Punkt 3.2.7. beschrieben vermessen.

Die RNA für die zweite Sequenzierung setzte sich aus verschiedenen Maus-Proben zusammen. Hierzu gehörte eine Zellgruppe aus 8 gepoolten Wildtyp-Mäuse-Pankreata, zwei mit dem gentleMACS aufgearbeitete KC-Maus-Pankreata, zwei mit dem gentleMACS aufgearbeitete Cre-Maus-Pankreata und drei kultivierten negativ/negativ Populationen aus der dritten Passage.

In RNase freiem destilliertem Wasser wurden die einzelnen Proben in 2ml Eppendorf-Tubes übernommen. Diese wurden anschließend mit Parafilm versiegelt und bis zum Transport bei -80°C gelagert.

Insgesamt wurden 19 Proben an die Firma Novogene verschickt. Die Anzahl der 19 Proben ergibt sich aus den 3 Sets der Sortierung des FACS und der viermaligen Wiederholung des Isolationsversuchs, aus 3 kultivierten und nach Zellkultur erneut sortierten doppelt-negativen Zellpopulation und aus exemplarisch beigefügten Proben aus KC- und CRE-Mausmodellen. Die Benennung und Qualität der Proben wird in Tabelle 1 gezeigt.

**Tabelle 1.**

Übersicht der an Novogene verschickten Proben mit Probenname, Bearbeitungsname durch Novogene sowie Vermessungsdatum

Mausgruppe	Sortierungsgruppe	Probe	RNA in ng/uL	Mykroliter	RNA gesamt (ng)
1 (8 Tiere)	pp	pp1	25,059	30	751,77
1 (8 Tiere)	pn	pn1	2,586	30	77,58
1 (8 Tiere)	nn	nn1	13,144	24	315,456
3 (8 Tiere)	pp	pp3	24,819	30	744,57
3 (8 Tiere)	pn	pn3	4,36	30	130,8
3 (8 Tiere)	nn	nn3	60,138	30	1804,14
4 (8 Tiere)	pp	pp4	27,223	30	816,69
4 (8 Tiere)	pn	pn4	2,671	30	80,13
4 (8 Tiere)	nn	nn4	39,899	30	1196,97
5 (8 Tiere)	pp	pp5	10,137	30	304,11
5 (8 Tiere)	pn	pn5	5,262	30	157,86
5 (8 Tiere)	nn	nn5	34,389	30	1031,67
WTnn (kultivierte Zellen)	WTnn	WTnn2	722,715	90	65.044,35
WTnn (kultivierte Zellen)	WTnn	WTnn3	589,126	90	53021,34
WTnn (kultivierte Zellen)	WTnn	WTnn4	635,585	90	57202,65
KC	KCpn	KCpn	3,157	30	94,71
KC	KCnn	KCnn	9,180	30	275,40
CRE	CREpn	CREpn	2,702	30	81,06
CRE	CREnn	CREnn	5,841	30	175,23

Der Versand an Novogene erfolgte durch TNT. Das Paket wurde mit rund 10kg Trockeneis gefüllt, um ein Auftauen der Proben während des Transportes zu verhindern. Nach Ankunft der Proben wurde dort ein Qualitätscheck durchgeführt. Dieser beinhaltet die Überprüfung der Degradierung und Kontamination der RNA mit 1% Agarose-Gels, der Reinheit mit dem Spektrophotometer NanoPhotometer von Implen aus Californien, sowie der RNA-Integrität und Menge mit dem RNA Nano 6000 Assay Kit für das Bioanalyzer 2000 System von Agilent Technologies aus Californien.

Der nächste Schritt ist die sogenannte „Library Preparation“. Für die RNA Präparation wurden bis 1µg RNA pro Probe als Material genommen. Die Sequenzierungsbibliothek wurde mit Hilfe des NEBNext Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina aus Nebraska nach den Empfehlungen des Herstellers erstellt und Index-Codes wurden jeder Sequenz hinzugefügt. Anschließend wurde aus der gesamten RNA der Proben die mRNA durch die Verwendung von poly-T oligo-attached magnetic beads gereinigt isoliert. In NEBNext First Strand Synthesis Reaction Buffer wurde durch zweiwertige Kationen unter erhöhter Temperatur fragmentiert. Die Einzelstrang cDNA-Synthese erfolgte durch zufällige hexamer primer und M-MuLV Reverse Transkriptase (RNase H-). Mit Hilfe von DNA Polymerase I und RNase H wurde aus den cDNA-Einzelsträngen Doppelstrang-DNA synthetisiert. Die verbleibenden Strangüberstände wurden durch Exonucleasen und Polymerasen in blunt ends umgewandelt. Nachdem die 3'-Enden der DNA-Fragmente adenyliert wurden, wurden NEBNext Adaptor with hairpin loop structure ligiert um die Hybridisierung der DNA vorzubereiten. Durch das AMPure XP System von Beckman Coulter aus Beverly (USA) wurden die cDNA-Fragmente auf Abschnitte von 150-200 Basenpaaren gereinigt. Dann wurden 3µl USER Enzyme aus Nebraska (USA) zu der größe selektierten und adaptorligierten cDNA hinzugegeben und 15 Minuten bei 37°C und anschließend 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde die PCR mit Phusion High Fidelity DNA Polymerase, Universal PCR Primern und Index (X) Primern durchgeführt. Zum Schluss wurden die PCR Produkte mit dem AMPure XP System aufgereinigt und die Qualität der Library wurde mit dem Agilent Bioanalyzer 2100 System bewertet.

Das clustern der Indexcodierten Proben wurde auf einem cBot Cluster Generation System mit dem PE Cluster Kit cBot-HS von Illumina nach der Anleitung der Hersteller durchgeführt. Nach der Generation der Cluster wurden die präparierten Datenbibliotheken auf einer Illumina Plattform sequenziert und paired-end reads wurden generiert.

### 3.2.9. Daten-Analyse durch Novogene

Als erster Schritt der Daten-Analyse wurde erneut eine Qualitätskontrolle durchgeführt. Die Rohdaten an gelesenen Fragmenten (raw reads) des FASTQ Format wurden mit Novogene-eigenen Protokollen prozessiert. In diesem Schritt wurden saubere gelesene Fragmente (clean reads) generiert. Reads mit Sequenzen des Adapters oder poly-N sowie Reads mit niedriger Qualität wurden entfernt. Gleichzeitig wurden die Q20-, Q30-Werte und GC-Anteile der clean reads ermittelt. Alle weiteren Analysen basierten auf clean reads hoher Qualität.

Das zuordnen der Proben zum entsprechenden Referenzgenom wurde mit Hilfe von Downloads des Referenzgenoms und der gene-model-annotation-Dateien von Webseiten Genom Browsern (NCBI/UCSC/Ensembl) durchgeführt. Durch die HISAT2 Software wurden clean reads mit paarigen Enden im Referenzgenom kartiert. HISAT2 benutzt ein großes Set an kleinen GFM-Indizes die im Kollektiv das gesamte Genom abdecken. Diese kleinen Indizes, auch lokale Indizes genannt, ermöglichen in Kombination mit verschiedenen Anlagerungsstrategien, ein schnelles und akkurates Einordnen der sequenzierten gelesenen Fragmente.

In der Regel werden bei RNA-Sequenzierungsstudien neue Gene und Transkripte entdeckt. Um bei den RNA-Proben neue Gene herauszufiltern, wurde die Cufflinks Reference Annotation Based Transcript (RABT) Methode benutzt, um aus jeder im Kartierungsschritt generierten bam Datei das Set an Transkriptisoformen herauszufiltern. Mit Hilfe des Programms Cuffcompare konnten die Cufflink Sammlungen mit den Referenz-Annotations-Dateien verglichen werden und ermöglichten das Herausfiltern neuer Gene, gegenüber bekannten Genen. Die Cuffcompare Klassen markiert mit einem u, stehen für potentielle neue Gene. Klassen die mit den Buchstaben j, u, i, o und x markiert sind, stehen für potentiell neue Isoformen von Genen.

Für die Quantifizierung, also die Anzahl der reads die einem Gen zugeordnet werden konnten, wurde HTSeq benutzt. Dies beinhaltet bekannte und neue Gene. Anschließend wurde die RPKM (reads per kilobase per million) jedes Gens, basierend auf der Länge der Gene und der gezählten reads, die zu dem entsprechenden Gen kartiert wurden, ermittelt. Der Wert setzt den Effekt der Sequenzierungstiefe und Genlänge ins Verhältnis zu den ermittelten gezählten Reads pro Gen und ist gegenwärtig die am weitesten verbreitete Methode um das Expressionslevel eines Gens abzuschätzen.

Der nächste Schritt ist die Analyse der differentiellen Expression der einzelnen Proben. Dafür wurden vor der Analyse die gezählten reads pro Probe durch das Programm

edgeR durch einen skalierenden, normalisierten Faktor adjustiert. Die differentielle Expressionsanalyse von zwei Zuständen wurde mit dem DEGseq R Paket durchgeführt. Mit der Benjamini- und der Hochbergmethode wurden die p-Werte adjustiert. Der korrigierte p-Wert von 0,005 und der Betrag des  $\log_2^{\text{(Fold Change)}}$  von 1 wurden als Schwelle für signifikante differentielle Expression gesetzt.

Um unter den signifikanten exprimierten Genen gemeinsame Funktionen zu entdecken, wurde mit Hilfe von biologischen Ontologien Anreicherungsanalysen durchgeführt. Dafür wurden zwei verschiedene Ontologien benutzt. Die erste, die sogenannte Gene Ontology (GO), ordnet Gene ihren biologischen Prozessen, Molekularen Funktionen und zellulären Komponenten einer direkten azyklischen graphischen Struktur zu. Eingerichtet wurde die GO-Anreicherungsanalyse mit dem GSeq R package. Damit wurden Genlängenbias korrigiert. Bei einem korrigierten p-Wert von unter 0,05 wurden die differentieell exprimierten Gene als signifikant angereicherte Begriffe in der GO definiert. Die zweite Ontologie, die Kyoto Enzyklopädie der Gene und Genome (KEGG), ordnet Gene Abläufen zu. Die KEGG ist eine Datenbank mit Hilfe derer Funktionen und Anwendungen des biologischen Systems, wie zum Beispiel Funktionen der Zelle, des Organismus und des Ökosystems verständlich gemacht werden. Dies basiert auf dem Level von molekularen Informationen, vor allem auf groß angelegten Datensets die durch Genomsequenzierungen und andere experimentelle Technologien mit hohem Durchsatz entstehen. Mit der KOBAS Software wurde die statistische Anreicherung differentieell exprimierter Gene in KEGG Abläufen getestet.

Eine Analyse für alternatives Spleißen wurde mit der rMATS Software durchgeführt. Das ist eine statistische Methode für die Entdeckung von Spleißvarianten replizierter RNA-Sequenzierungsdaten. Die Software entdeckt alternative Spleißvarianten im Verhältnis zu üblichen alternativen Spleißmustern und berechnet den p-Wert und den FDR für differentielles Spleißen. Dies beinhaltet das Auslassen von Exons, alternative Spleißvarianten am 5' Ende (A5SS = A5' splice site) sowie am 3' Ende (A3ss = A3' splice site), beidseits ausgeschlossene Exons (MXE = mutually exclusive exons) und zurückgehaltene Introns (RI = retained introns).

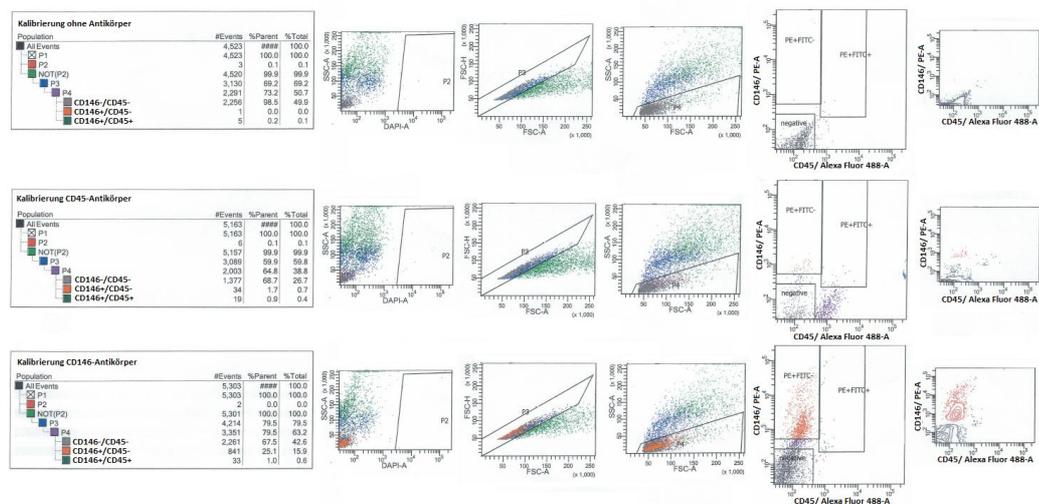
Abschließend wurde eine Mutationsanalyse durchgeführt. Picard- und Samtools wurden benutzt um duplizierte reads zu sortieren und markieren. Außerdem wurden die bam alignment Ergebnisse der einzelnen Proben neu geordnet. Danach wurde der HaplotypeCaller der GATK Software angewendet, um eine Variantenentdeckungsanalyse durchzuführen. Die daraus entstehenden VCF-Dateien wurden mit GATK Standardfiltermethoden und anderen Parametern (cluster 3, WindowSize: 35; QD < 2.0 or FS > 30.0) gefiltert. Die gefilterten Dateien wurden mit Annovar bearbeitet und funktionellen Genvarianten verschiedener Genome zugeordnet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Durchflusszytometrie

Die FACS-Analyse und Sortierung der isolierten Zellen wurde für jede Zellgruppe durchgeführt. Für die Versuche der Mäuse des Nycodenzversuches wurden voreingestellte Gates verwendet. Für die weiteren Versuche wurde eine Kalibrierung des FACS durchgeführt. Hierfür wurden als erstes Zellen der aufgearbeiteten Pankreata ohne Zugabe von fluoreszierenden Antikörpern vermessen. Anschließend wurden nur mit dem CD45-FITC-gelabelten Antikörper gekoppelte Zellen und nur mit dem CD146-PE-gelabelten Antikörper gekoppelte Zellen auf ihre Emissionsspektren für PE und FITC untersucht. Hierbei ließen sich die Populationen sauber trennen (Abbildung 1).

Die Gatingstrategie kann anhand von Abbildung 2 nachvollzogen werden. Als erstes wurde das Gate P1 festgelegt. Dieses beinhaltete alle Zellen oder so genannte Ereignisse die vom Durchflusszytometer detektiert wurden. Aus dieser Gruppe spaltete sich das Gate P2 ab, dass alle mit DAPI-positiv gefärbten Zellen ab einer Intensität von über  $10^3$  einschloss. Hierdurch wurden die toten Zellen herausgefiltert, da DAPI an Bestandteile des Zellkerns bindet und dies nur bei Membrandefekten möglich ist. Fortgefahren wurde mit allen Zellen, die nicht im Gate P2 eingeschlossen waren. Das Gate P3 teilte die Zellen nach FSC-A und FSC-H auf, also Oberflächengröße



**Abbildung 1**

Kalibrierung des Durchflusszytometers

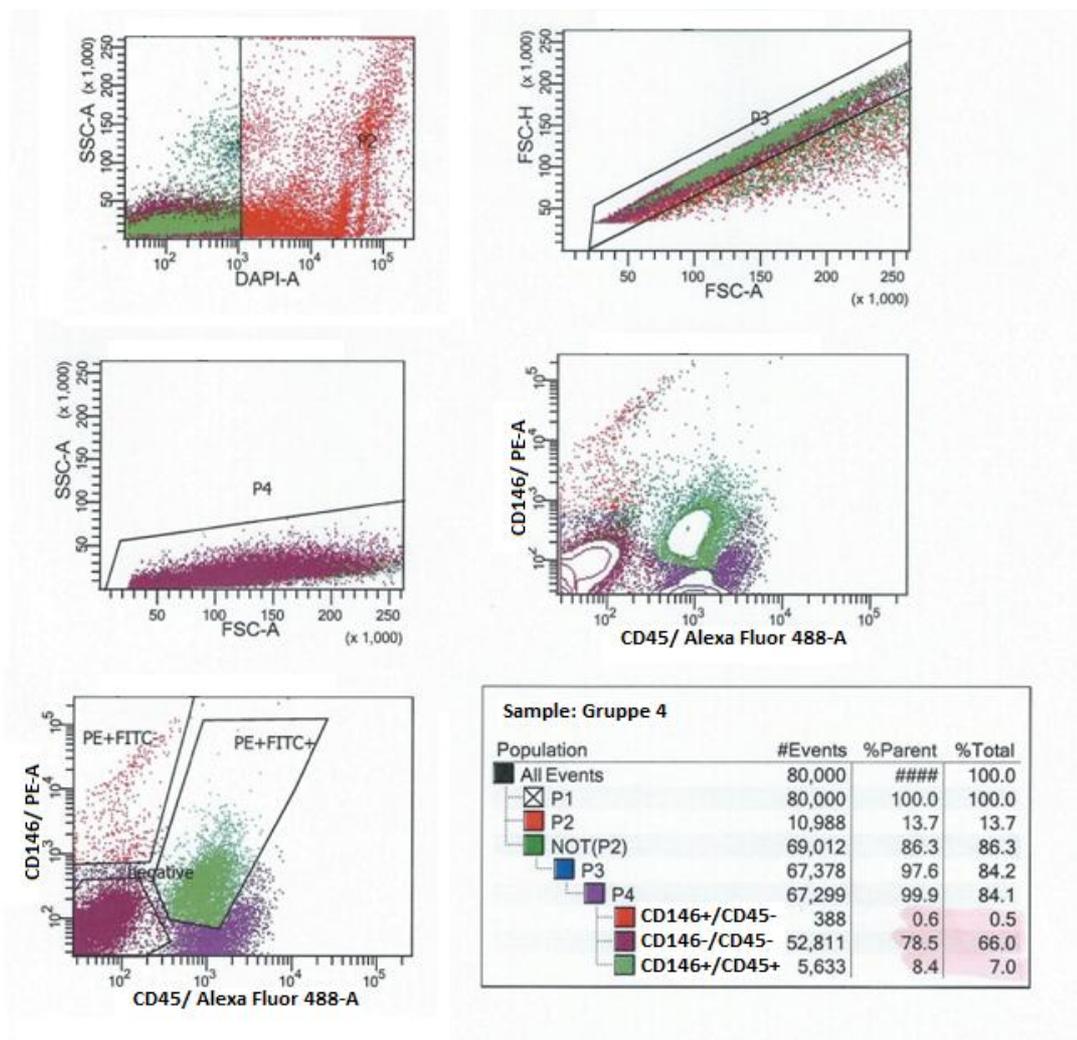
Reihe 1: Kalibrierung ohne Antikörper

Reihe 2: Kalibrierung des CD45-Antikörpers

Reihe 3: Kalibrierung des CD146-Antikörpers

und Höhe der Zellen. Dieser Schritt wurde durchgeführt, um einzelne Zellen von Duplets oder Zellkonglomeraten unterscheiden zu können. Das Gate P4 sortierte die Zellen nach FSC-A und SSC-A, also der Zelloberfläche im Verhältnis zu ihrer Granularität. Aus P4 wurden anschließend die entscheidenden drei Gates gebildet. Hierbei wurden die mit Antikörpern beladenen Zellen anhand ihrer Emissionsspektren den Farbbereichen von PE und FITC zugeordnet. Anhand dieser Aufteilung können die drei Gruppen CD146+/CD45- (PE-positiv/FITC-negativ), CD146-/CD45- (PE-negativ/FITC-negativ) und CD146+/CD45+ (PE-positiv/FITC-positiv) bestimmt werden.

Anhand der neuen Methode wurden folgend mehrere Mauspankreatata zu einem Ansatz kombiniert. Es entstanden Versuche mit je 2, 4 und 8 Tieren pro Ansatz. Hierbei ließ sich



**Abbildung 2**

Exemplarische Darstellung der Gatingstrategie

Reihe 1: Aufteilung anhand von DAPI und SSC-A, tote Zellen in P2 und rot markiert (links); Aufteilung anhand von FSC-H und FSC-A, Zielgruppe in P3-Gate eingeschlossen (rechts)

Reihe 2: Aufteilung anhand SSC-A und FSC-A, Zielgruppe in P4-Gate eingeschlossen (links); Density-Plot der Sortierung nach CD146 und CD45 (rechts)

Reihe 3: Dot-Plot der Sortierung der Zellen und Aufteilung in die Subgruppen (links); Tabellarische Übersicht des gesamten Sortierungsprozesses mit Bildung prozentualer Anteile gegenüber der Vorläuferpopulation (parent) oder der gesamten Population (total) (rechts)

ein Anstieg der isolierten Zellzahlen sowohl makroskopisch bei der Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer als auch nach Ausgabe der Zellzahlen durch das Durchflusszytometer evaluieren.

Der erste Isolationsversuch anhand der neuen Methode für die FACS-Analyse beinhaltete die Gruppen T1-6. Hierbei wurden die Pankreata von zwei Mäusen pro Ansatz eingesetzt. Die Zellzahlen bei Bestimmung in der Neubauer-Zählkammer lagen durchschnittlich bei 2.348.300 Zellen pro Ansatz. Der Anteil an toten Zellen nach der Isolation bis zur Auftrennung im Zellsortierer lag im Durchschnitt bei 23,76%.

#### 4.2. Zellisolation anhand der Nycodenz-Dichtezentrifugation

Der erste Versuch aus murinen Pankreata Mesenchymale Stammzellen zu isolieren erfolgte mit der Nycodenz-Dichtezentrifugationsmethode. Hierbei wurden die Pankreata von insgesamt 6 Mäusen entnommen und einzeln für die FACS-Analyse vorbereitet (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2**

Auflistung der Mäuse für den ersten Versuch der Isolation mit der Nycodenz-Dichtezentrifugation mit Identifikationsnummer, Geschlecht, Lebensalter und Gewicht

Tier	Identifikationsnummer	Geschlecht	Alter in Wochen	Gewicht in Gramm
C57Bl/6J 1	058849	weiblich	20	26,12
C57Bl/6J 2	058850	weiblich	20	24,01
C57Bl/6J 3	060024	weiblich	15	26,74
C57Bl/6J 4	059131	weiblich	19	26,45
C57Bl/6J 5	059131	weiblich	19	26,98
C57Bl/6J 6	059120	männlich	19	30,37

Aufgrund vorangegangener Versuche der Nycodenz-Dichtezentrifugation an C57Bl/6J-Mäusen in unserer Arbeitsgruppe wurden in der zu entnehmenden Zellschicht unter eine Millionen Zellen erwartet, sodass auf eine Zellzählung vor der Sortierung verzichtet wurde. Entsprechend wurden jeweils 2µl, die entsprechende Menge für 10<sup>6</sup> Zellen, der benötigten Fluorochrom-gekoppelten-Antikörper verwendet.

Die FACS-Analyse ermöglichte die Aufteilung der einzelnen Proben in die drei Gruppen CD146+/CD45-, CD146-/CD45- und CD45+. Der prozentuale Anteil toter Zellen vor der Sortierung durch die positive Kernfärbung für DAPI wurde bei dieser Methode noch nicht erhoben.

Aufgrund einer fehlerhaften Einstellung der Gates, wurde bei der Einteilung der Untergruppen anstelle CD146+/CD45+ die Untergruppe CD45+ gebildet. Aufgrund dessen ist dieser Versuch bezogen auf diese spezifische Population nur bedingt

vergleichbar. Die restliche Gatingstrategie entsprach dem oben beschriebenen Standard.

Der prozentuale Anteil toter Zellen der einzelnen Fraktionen wurde bei der Nycodenz-Methode noch nicht erhoben.

Aufgrund der geringen Zellausbeute, vor allem in der Zielfraktion wurde auf eine Reinheitsuntersuchung der Sortierung verzichtet und die Zellen anschließend direkt kultiviert.

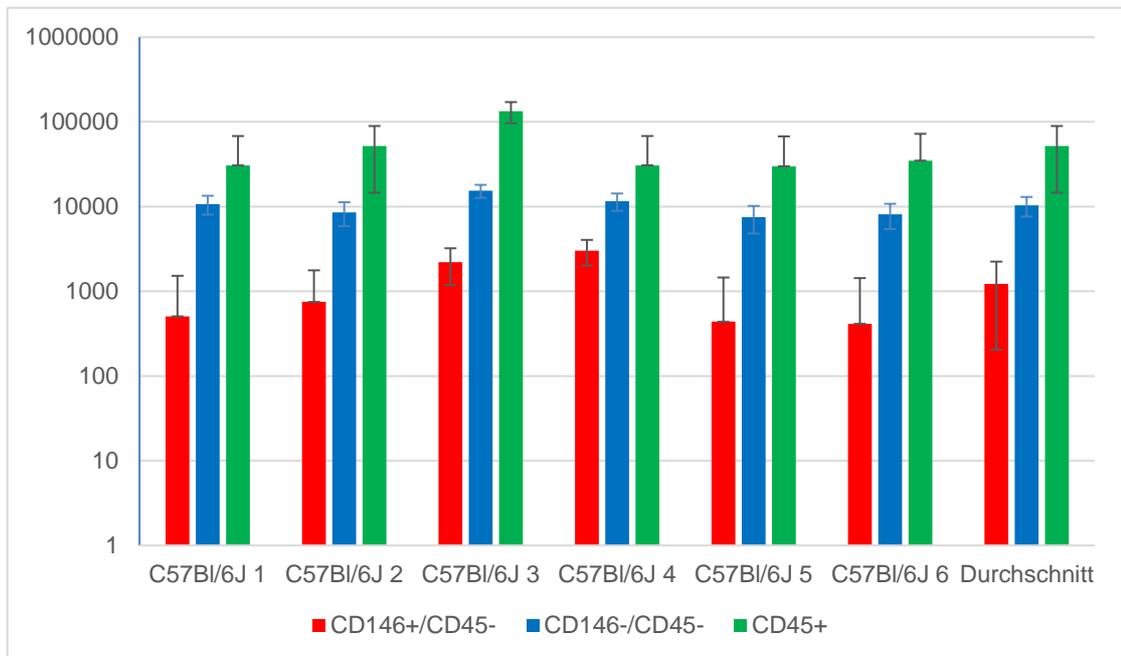
Für die sortierten, einzelnen Untergruppen wurden die Zellzahlen bestimmt (siehe Tabelle 3, Abbildung 3). Hierbei stellte sich eine Aufteilung mit einem Maximum der Zellen in der einfach CD45 positiven Fraktion dar. In dieser schwanken die Zellzahlen zwischen 29.900 und 134.000. Die CD146+/CD45- Gruppe zeigte eine deutlich geringere Zellzahl in einem Bereich von 414 bis 3026. Die CD146-/CD45- negative Gruppe brachte zwischen 7.500 und 15.387 Zellen hervor.

Nach der Sortierung wurden die Zellgruppen in 6-Well-Platten mit PSC-Medium übernommen. In der CD146+/CD45- Zellfraktion fanden sich nur vereinzelt Zellen. Sie bildeten im Verlauf kleine Kolonien aus unter 10 Zellen und es war nicht möglich sie zu passagieren oder zu expandieren. Einzig die Zellen von C57Bl/6J 3 ließen sich einmalig aus einer 6-Well-Platte in eine T25-Flasche passagieren. Die initial runden Zellen mit unter 50µm Durchmesser zeigten eine unterschiedliche Morphologie. Nach dem Anwachsen an das Kulturgefäß bildeten sie einzelne Zellgruppen mit 200 bis zu 500µm großen, runden und teilweise mehrkernig imponierenden Zellen. Im Zellkernbereich waren sichtbare Chromatinverdichtungen erkennbar. Sie bildeten teilweise Ausläufer. Der andere Typus Zelle, vor allem in der passagierbaren Untergruppe, hatte einen eher länglichen Phänotyp, mit bipolaren Ausläufern und einer Zellgröße von bis zu über 200µm. Die stark konfluent wachsenden Zellen in dieser Gruppe bildeten ein fischzugartiges Muster.

**Tabelle 3**

Darstellung der Zellzahlen für die Subpopulation der einzelnen Mäuse nach der Sortierung durch das FACS.

Maus	CD146+/CD45-	CD146-/CD45-	CD45+
C57BI/6J 1	506	10737	30634
C57BI/6J 2	750	8571	52000
C57BI/6J 3	2204	15387	134000
C57BI/6J 4	3026	11600	30700
C57BI/6J 5	438	7500	29900
C57BI/6J 6	414	8110	34900
Durchschnitt	1.223	10.318	52.022
Varianz	1,036*10 <sup>6</sup>	7,230*10 <sup>6</sup>	1,402*10 <sup>9</sup>
Standardabweichung	1.018,31	2.688,94	37.450,00

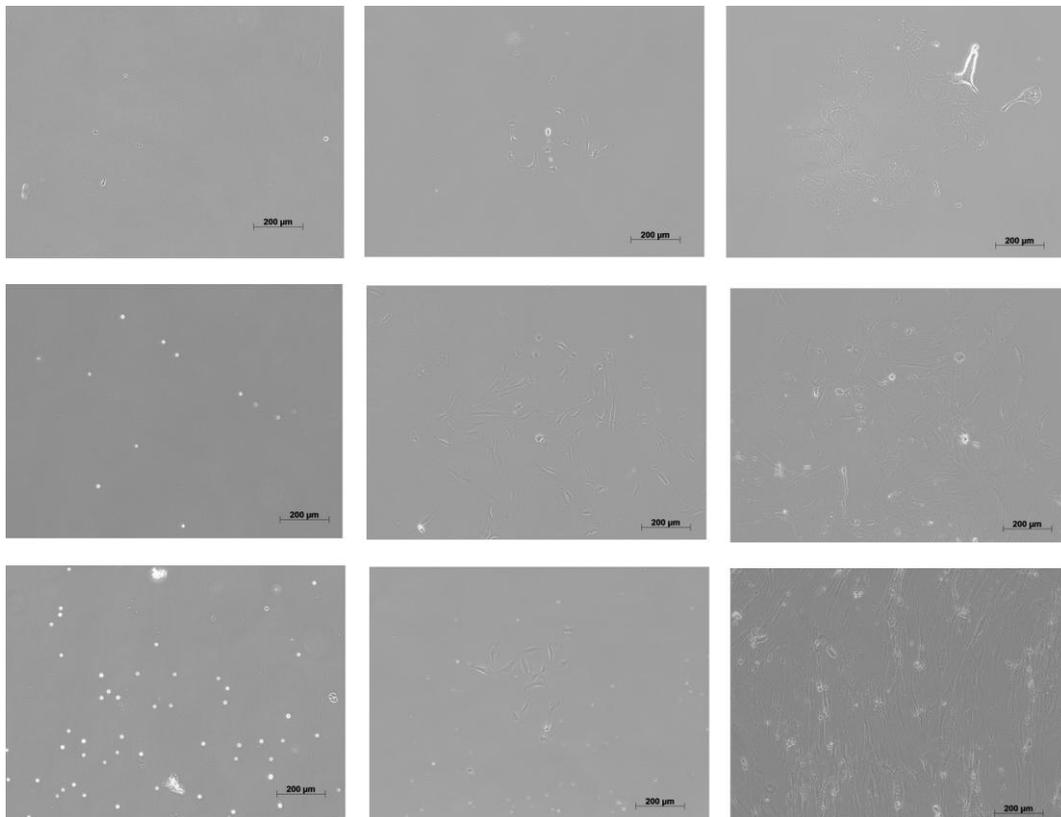


**Abbildung 3**

Graphische Darstellung der Zellverteilung für die Subpopulationen der einzelnen Mäuse. Logarithmische Skalierung. Das Fehlerintervall entspricht der Standardabweichung.

Die CD146-/CD45- Populationen zeigten insgesamt das beste Wachstum aller drei Gruppen. Sie bildeten adhärent wachsende, vor allem rundliche mit länglichen Ausläufern wachsende Zellen, deren Zellkerne gut abgrenzbar waren. Bei größerer Konfluenz verwandelte sich das rundliche Erscheinungsbild eher in eine längliche Form und bildete auch hier fischzugartige Muster. Die Zellgröße befand sich in einem Bereich von 100 bis 500µm. Insgesamt ließen sich alle Zellreihen mehrfach passagieren, teilweise bis zur achten Passage.

Die CD45+ Populationen ließen sich teilweise bis Passage 2 und 3 kultivieren. Sie zeigten in ihrer Morphologie ein ähnliches Erscheinungsbild wie die doppelt negativen Populationen. Neben den CD146-/CD45- ähnlichen Zellen, fanden sich kleine runde Zellen. Diese ähnelten morphologisch stark Erythrozyten (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4**

Morphologie und Wachstum der kultivierten Populationen in Aufnahmen mit dem Phasenkontrastmikroskop nach Isolation mit der Nycodenz-Dichtezentrifugation; 100x Vergrößerung  
 Reihe 1 von links nach rechts CD146+/CD45- an Tag 1, Tag 5, Tag 15  
 Reihe 2 von links nach rechts CD146-/CD45- an Tag 1, Tag 5, Tag 15  
 Reihe 3 von links nach rechts CD45+ an Tag 1, Tag 5, Tag 15

### 4.3. Zellisolation Anhand der neuen Methode

Um Ursachen des schlechten Zellwachstums in der Zielfraktion zu beseitigen und die Ausbeute zu optimieren, wurden verschiedene Änderungen im Vergleich zu der Nycodenz-Methode unternommen.

Initial wurden hierbei zwei Ansätze verfolgt. Auf der einen Seite wurde versucht die potenzielle Ausbeute pro Gruppe zu erhöhen, indem mehrere Pankreata zu einem Ansatz kombiniert wurden. Hierbei wurden im Verlauf Gruppenstärken von je 2, 4 und 8 Mäusen gebildet. Die andere Seite verfolgte die Verbesserung der Isolationsmethode. Hierbei stießen wir auf eine Methode zur Isolation von perivaskulären MSC aus dem murinen Pankreas<sup>31</sup>. Hierbei wurde auf den Zwischenschritt einer Dichtezentrifugation

verzichtet. In weiteren Studien ließ sich ein ähnliches vorgehen, zum Isolieren mesenchymaler Stammzellen aus unterschiedlichen Geweben ableiten <sup>45,101,102</sup>. An diese Methoden angelehnt, wurde bei der neuen Methode ebenfalls auf das Durchführen der Dichtezentrifugation verzichtet. Weiterhin behaltene Schritte sind sowohl die mechanische Dissektion der Pankreata als auch die Einwirkung von Enzymen. Der Enzymmix der Nycodenzmethode wurde weiterhin verwendet, da er eine suffiziente Auftrennung des Gewebes gewährleistete.

Die erste Versuchsreihe mit der neuen Isolationsmethode, wurde mit insgesamt 6 C57Bl/6J Mäusen durchgeführt, die in Gruppen mit je 2 Tieren aufgeteilt wurden (Siehe Tabelle 4).

Vor der Durchflusszytometrie und Zellsortierung, wurden die Zellzahlen in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und die entsprechenden Antikörpermengen hinzugegeben.

Die FACS-Analyse ermöglichte die Aufteilung der einzelnen Proben in die drei Gruppen CD146+/CD45-, CD146-/CD45- und CD146+/CD45+. Durch die Färbung mit DAPI wurde der prozentuale Anteil an toten Zellen vor der Sortierung ermittelt. Dieser liegt bei durchschnittlich 23,76% (siehe Tabelle 5 und Abbildung 5)

Die Zellen wurden nach der Sortierung in ihre Untergruppen entsprechend ihren Zellzahlen in Kulturgefäße übernommen. Die Gruppen unter  $10^5$  Zellen wurden in 24-Well-Platten und die Gruppen mit über  $10^5$  Zellen in 6-Well-Platten ausgesät.

Die Kultivierung der CD146+/CD45- Populationen gestaltete sich erfolgreicher als in dem vorangegangenen Versuch. Die Zielfraktion ließ sich einmalig passagieren. Die

**Tabelle 4**

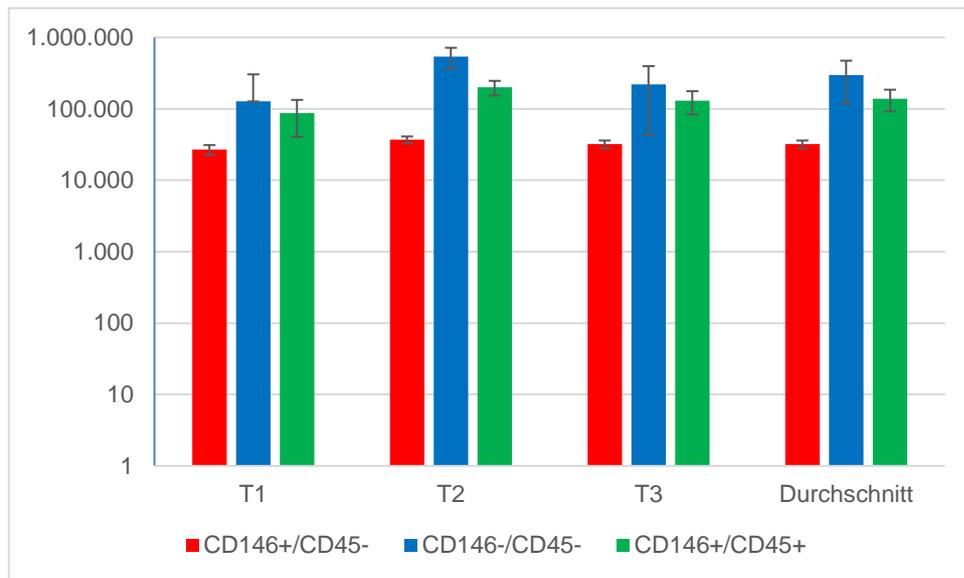
Auflistung der Mäuse für den ersten Versuch der Isolation mit der neuen Methode mit Identifikationsnummer, Geschlecht, Lebensalter, Gewicht und Zuordnung zur Versuchsgruppe

Tier	Identifikationsnummer	Geschlecht	Alter in Wochen	Gewicht in Gramm	Gruppe
C57Bl/6J 7	M08482	weiblich	8	13,7	T1
C57Bl/6J 8	M08479	männlich	8	27,6	T1
C57Bl/6J 9	M08481	weiblich	8	18,6	T2
C57Bl/6J 10	M08478	männlich	8	24,5	T2
C57Bl/6J 11	M08480	weiblich	8	16,8	T3
C57Bl/6J 12	M08477	männlich	8	20,2	T3

**Tabelle 5**

Bestimmung der Zellzahlen vor und nach der Zellsortierung anhand des FACS. Angabe von Durchschnitt, Varianz und Standardabweichung. Ermittlung des Anteils an toten Zellen nach der Isolation durch das FACS

Gruppe	Zellzahl vor Sortierung	Tote Zellen in %	CD146+/CD45-	CD146-/CD45-	CD146+/CD45+
T1	2.375.000	31,8	27.000	127.000	87.000
T2	3.500.000	16,7	37.000	540.000	200.000
T3	1.170.000	22,8	23.000	220.000	130.000
<b>Durchschnitt</b>	2.348.333,333	23,76	32.000	259.000	139.000
<b>Varianz</b>	$9,051 \cdot 10^{11}$		$1,666 \cdot 10^7$	$4,634 \cdot 10^{10}$	$2,17 \cdot 10^9$
<b>Standardabweichung</b>	951.405,393		4.082,483	215.287,405	46.568,945



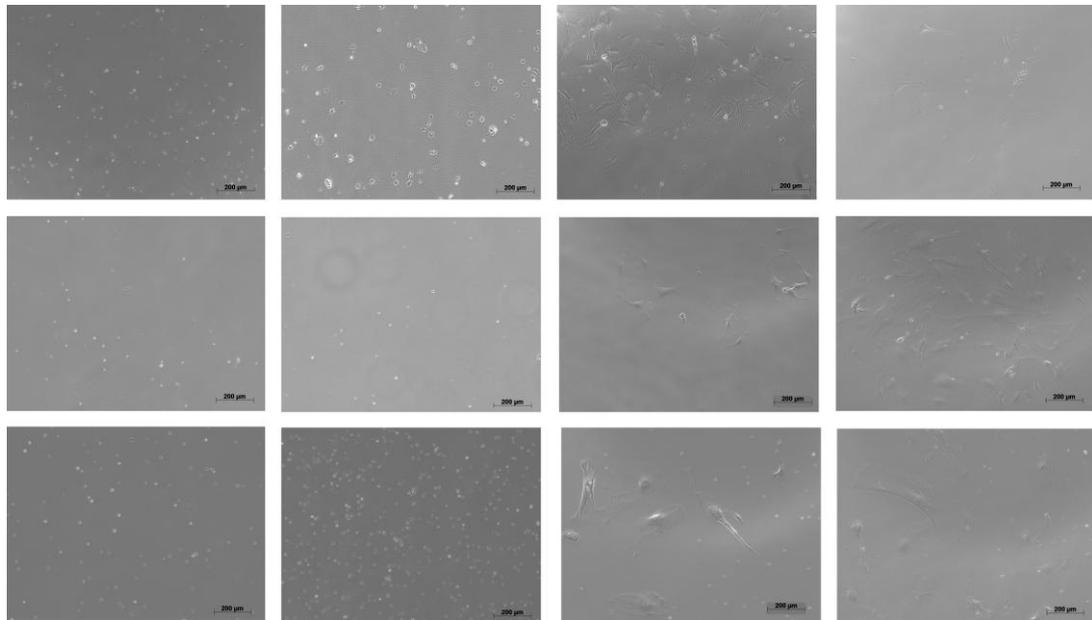
**Abbildung 5**

Graphische Darstellung der Zellverteilung für die Subpopulationen der Gruppen T1, T2, T3 und des Durchschnittes mit logarithmischer Skalierung. Das Fehlerintervall entspricht der Standardabweichung.

Zellen zeigten einen ähnlichen Verlauf im Wachstum wie zuvor. Dennoch waren zu Beginn deutlich mehr etwa 100µm große Zellen zu sehen, mit einem teils triangulären bis runden Aussehen. Zwischen diesen Zellen fanden sich auch vereinzelt längliche Zellen, die bipolare Ausläufer bildeten. Vereinzelt und mit zunehmender Kultivierungsdauer zeigten sich über 200µm große Zellen, die eine eher rechteckige Form annahmen und an ihren Seiten mehrere Ausläufer ähnlich den bipolaren Zellen zeigten. Im Kulturverlauf bildeten die bipolaren Zellen längliche Fortsätze aus und entwickelten Zell-Zell-Kontakte. Die meisten Zellen waren am Rand des Kultivierungsgefäß zu finden. Nach der Passagierung bildeten die Zellen erneut über ihre länglichen Fortsätze Zell-Zell-Kontakte aus. Insgesamt gab es aber keinen deutlichen Anstieg des Wachstums, sodass die Kultivierung nach einmaliger Passage beendet wurde.

Die CD146-/CD45- Populationen waren überraschenderweise in diesem Kultivierungsversuch so gut wie nicht überlebensfähig in der Zellkultur. Vom Phänotyp und Verlauf glichen die wenigen angewachsenen Zellen den einfach CD146-positiven.

Die CD146+/CD45+ Populationen zeigten initial wie bei der Nycodenz-Methode ein leicht heterogenes Bild mit den erythrozytär anmutenden Zellen und den Zellen die eher einem fibroblastoiden Phänotyp entsprachen. Auch hier gestaltete sich die Kultivierung schwierig und die Zellen ließen sich nicht passagieren. (Siehe Abbildung 6)



**Abbildung 6**

Morphologie und Wachstum der kultivierten Populationen unter Phasenkontrastmikroskopie, 100-Fache Vergrößerung

Reihe 1 von links nach rechts CD146+/CD45- an Tag 1, Tag 2, Tag 10, Tag 13

Reihe 2 von links nach rechts CD146-/CD45- an Tag 1, Tag 2, Tag 10, Tag 13

Reihe 3 von links nach rechts CD146+/CD45+ an Tag 1, Tag 2, Tag 10, Tag 13

**Tabelle 6**

Auflistung der Mäuse für den zweiten Zellkulturversuch mit der neuen Isolationsmethode. Angabe von Identifikationsnummer, Geschlecht, Lebensalter, Gewicht und Zuordnung zur Versuchsgruppe.

Tier	Identifikationsnummer	Geschlecht	Alter in Wochen	Gewicht in Gramm	Gruppe
C57BI/6J 13	M08950	weiblich	8	16,73	M1
C57BI/6J 14	M08951	weiblich	8	17,69	M1
C57BI/6J 15	M08942	männlich	8	23,87	M1
C57BI/6J 16	M08943	männlich	8	24,16	M1
C57BI/6J 17	M08952	weiblich	8	17,67	M2
C57BI/6J 18	M08953	weiblich	8	17,29	M2
C57BI/6J 19	M08944	männlich	8	24,07	M2
C57BI/6J 20	M08945	männlich	8	24,49	M2
C57BI/6J 21	M08954	weiblich	8	17,81	M3
C57BI/6J 22	M08947	weiblich	8	18,18	M3
C57BI/6J 23	M08946	männlich	8	24,48	M3
C57BI/6J 24	M08955	männlich	8	19,39	M3
C57BI/6J 25	M08948	weiblich	8	18,63	M4
C57BI/6J 26	M08949	weiblich	8	19,09	M4
C57BI/6J 27	M08956	männlich	8	22,79	M4
C57BI/6J 28	M08957	männlich	8	18,53	M4

Um die Zellkultur nach Isolation mit der neuen Methode zu optimieren, wurde das Medium gewechselt. Von dem bisher eingesetzten PSC-Medium wurde auf das MSC-Medium der Firma Promocell aus Heidelberg gewechselt. Zusätzlich wurde die Zahl der Mäuse auf insgesamt 4 pro Ansatz erhöht (Siehe Tabelle 6)

Nach erneuter Isolation der Zellen wurden die Zellzahlen mikroskopisch bestimmt und die notwendigen Antikörpermengen zur Zellsortierung an diese angepasst. In der FACS-Analyse ließen sich die Zielpopulationen darstellen und die Aufteilung der Gruppen in CD146+/CD45-, CD146-/CD45- und CD146+/CD45+ vornehmen. Entsprechend der verdoppelten Anzahl an eingesetzten Mauspankreatata pro Ansatz im Vergleich zum Vorversuch, konnten auch die durchschnittlichen Zellzahlen, mit Ausnahme in den CD146+/CD45- Fraktionen, mindestens verdoppelt werden. Die eigentlich Zielfraktion blieb anhand ihrer Zellzahlen nahe dem Bereich des vorangegangenen Versuchs (siehe Tabelle 7).

Der Beginn der Kultivierung erfolgte direkt im Anschluss an die Sortierung der Zellen. Die doppelt negativen Kulturen wurden wegen ihrer hohen Zellzahlen in T25-Flaschen ausgesät. Die anderen beiden Populationen wurden in 6-Well-Platten kultiviert. Alle 3 Subpopulationen wurden mit MSC-Medium kultiviert.

Die CD146+/CD45- Fraktionen bildeten in allen 4 Ansätzen vereinzelte Kolonien aus. Diese bestanden aus adhärent wachsenden Zellen, die vom optischen Phänotyp den Zellen in den vorangegangenen Versuchen in der entsprechenden Population glichen. Hinsichtlich Passagierung und Expansion gestaltete sich der Umgang mit der Zellfraktion erneut schwierig. Es formten sich einzeln in zentralen Bereichen der Zellkulturgefäße Kolonien aus unter 100 Zellen. In den Randbereichen schienen die Zellen etwas bessere Bedingungen für das adhärente Wachstum zu haben, da sich hier teilweise deutlichere und aus mehr Zellen bestehende Kolonien formten. Aufgrund von teilweise stark konfluentem Zellwachstum in den Randbereichen, wurde nach über 10 Tagen in Kultur der versucht diese Zellen zu passagieren. Trotz des neuen Mediums war die

**Tabelle 7**

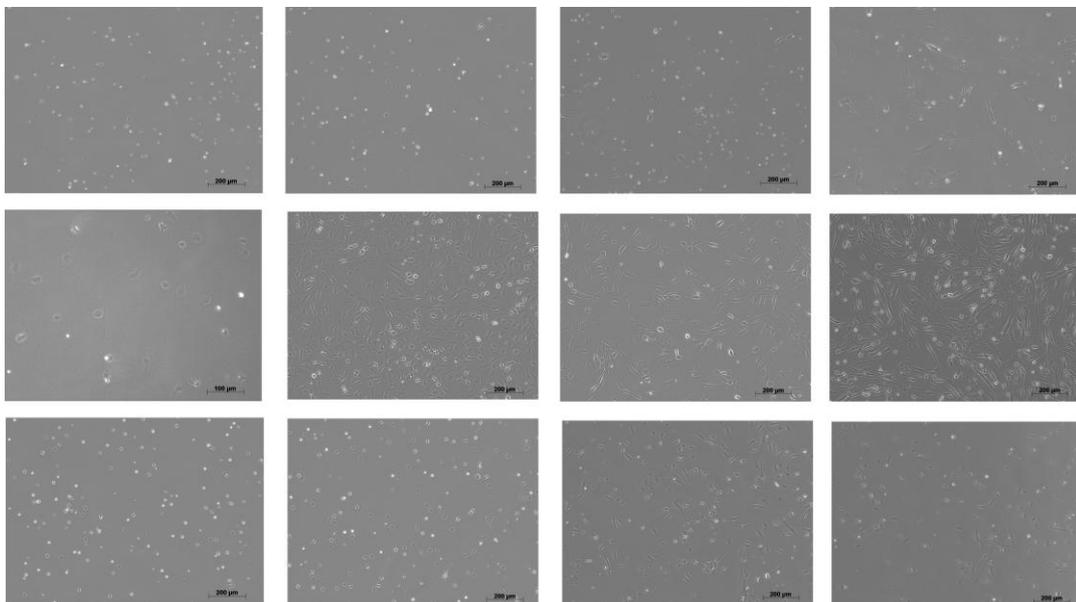
Bestimmung der Zellzahlen vor und nach der Zellsortierung anhand des FACS. Angabe von Durchschnitt, Varianz und Standardabweichung. Ermittlung des Anteils an toten Zellen nach der Isolation durch das FACS

Gruppe	Zellzahl vor Sortierung	Tote Zellen in %	CD146+/CD45-	CD146-/CD45-	CD146+/CD45+
<b>M1</b>	6.150.000	6,6	22.000	1.000.000	250.000
<b>M2</b>	9.825.000	16,8	46.000	530.000	360.000
<b>M3</b>	5.350.000	27,3	34.000	928.000	400.000
<b>M4</b>	5.025.000	36,0	28.000	420.000	370.000
<b>Durchschnitt</b>	6.587.500	22	32.500	719.500	345.000
<b>Varianz</b>	3,661*10 <sup>12</sup>	122,967	7,875*10 <sup>7</sup>	6,194*10 <sup>10</sup>	3,225*10 <sup>9</sup>
<b>Standardabweichung</b>	1.913.480,141	11,044	8.874,12	248.878,99	56789,083

Passagierung nicht möglich, da nach vollständiger Ablösung der Zellen aus dem alten Kulturgefäß, in dem neuen Gefäß keine weiteren Zellen anwuchsen.

Die CD146-/CD45- Fraktionen wuchsen hingegen problemlos. Die Zellen ließen sich bis in Passage 5 kultivieren und konnten auf mehrere T175-Kulturflaschen aufgeteilt werden. Wie schon in den vorherigen Abläufen beschrieben, hatte diese Zellfraktion vor allem ein initial rundlich, trianguläres Wachstumsmuster dass sich optisch bei zunehmender Konfluenz und Passage in ein eher längliches, bipolares Zellmuster umgewandelt hat. Bei starker Konfluenz der Zellen, meist kurz vor der Passagierung, bildet sich ein fischzugartiges Muster aus.

Die CD146+/CD45+ Fraktionen zeigten in der Kultur unterschiedliche Zelltypen. Der Großteil der vorhandenen Zellen schien aus 50µm großen runden Zellen zu bestehen, die sich weder weiter teilten noch in der Größe oder Länge zu wachsen schienen. Der zweite Zelltypus beinhaltete Zellen mit mehreren sternförmig vom Zellkern abgehenden Ausläufern. Mit Zunahme der Kulturdauer ähnelten die mit sternförmigem Wachstum beginnenden Zellen optisch dem Haupttypus der anderen beiden Zellreihen. Der Versuch die beiden unterschiedlichen Zelltypen von der Plastikoberfläche zu lösen, schlug fehl und somit konnten keine Passagierungen durchgeführt werden (siehe Abbildung 7).



#### **Abbildung 7**

Morphologie und Wachstum der kultivierten Populationen unter Phasenkontrastmikroskopie, exemplarisch aus der Gruppe M2, 100-Fache Vergrößerung

Reihe 1 von links nach rechts CD146+/CD45- an Tag 1, Tag 3, Tag 6, Tag 10

Reihe 2 von links nach rechts CD146-/CD45- an Tag 1, Tag 3, Tag 7, Tag 10

Reihe 3 von links nach rechts CD146+/CD45+ an Tag 1, Tag 3, Tag 6, Tag 10

Ein direkter Vergleich der Zellzahlen zwischen der Nycodenz-Methode und der neuen Methode kann in Tabelle 8 nachvollzogen werden. In allen Zellfraktionen lässt sich im Vergleich zu der Nycodenz-Methode ein Anstieg der Zellzahlen beobachten. In der Zielfraktion lässt sich ein Anstieg der Zellzahl zwischen 564% und 1208% erheben. In der doppelt negativen Fraktion zeigt sich ebenfalls ein deutlicher Anstieg der Zellzahlen auf 1155 – 1643%. Lediglich in der CD146+/CD45+ Zellfraktion zeigt sich ein eher geringer Anstieg der Zellzahlen auf 33,60-65,80%.

**Tabelle 8**

Zellzahlvergleich der Durchschnittswerte pro Maus gerechnet zwischen der Nycodenz-Methode und der neuen Methode mit jeweils 2 oder 4 Tieren pro Versuch. Zellzahl vor Sortierung und der prozentuale Anteil toter Zellen wurden in der Nycodenz-Methode nicht erhoben. Es zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Zellzahlen sowohl in der CD146+/CD45- als auch in der CD146-/CD45- Zellfraktion. In der CD146+/CD45+ Fraktion kann nur ein geringer Anstieg der Zellzahlen im Vergleich der Methoden untereinander erfasst werden.

Methoden	Zellzahl vor Sortierung	Tote Zellen in %	CD146+/CD45-	CD146-/CD45-	CD146+/CD45+
Nycodenz (1 Maus)	x	x	1.223	10.318	52.022
Neu (2 Mäuse)	1.174.167	23.76	16.000	129.500	69.500
Zellanstieg in Prozent (Vgl. Zu Nycodenz)			1208,26%	1155,09%	33,60%
Neu (4 Mäuse)	1.646.875	22	8.125	179.875	86.250
Zellanstieg in Prozent (Vgl. Zu Nycodenz)			564,35%	1643,31%	65,80%

Für die zur RNA-Sequenzierung zu gewinnende RNA wurden erneut Zellen nach der neuen Methode isoliert. Hierfür wurden je 8 Mauspankreatata zu einem aufzuarbeitendem Ansatz zusammengenommen. Insgesamt wurden hierfür 5 Ansätze gebildet. Diese Gruppen wurden nach den Nummern S1-5 bis aufgeteilt. Aufgrund einer verlängerten Inkubationszeit mit den zur enzymatischen Auftrennung des Gewebes verwendeten Enzymen, konnte die Gruppe 2 bei deutlich erhöhten abgestorbenen Zellen in der Durchflusszytometrie für weitere Versuche nicht verwendet werden. Im Folgenden wird sich daher nur auf die Gruppen S1, S3, S4 und S5 bezogen. Aufgrund der großen Menge an verwendeten Mauspankreatata zeigt sich insgesamt eine deutlich erhöhte Ausbeute an Zellen. Die gesamte Spannweite an gewonnenen Zellen liegt zwischen 10.400.000-21.825.000 pro Sequenzierungsgruppe. Die Verteilung der Zellzahlen der einzelnen Sortierungsgruppen ist kongruent mit den aus den vorangegangenen Zellisolationen nach der neuen Methode (Siehe Tabelle 9).

**Tabelle 9**

Bestimmung der Zellzahlen vor und nach der Zellsortierung anhand des FACS. Angabe von Durchschnitt, dem Durchschnitt an Zellzahlen pro einzelner Maus, Varianz und Standardabweichung. Ermittlung des Anteils an toten Zellen nach der Isolation durch das FACS

Gruppe	Zellzahl vor Sortierung	tote Zellen in %	CD146+/CD45-	CD146-/CD45-	CD146+/CD45+
S1	21.825.000,00	12,9%	349.200,00	14.491.800,00	2.051.550,00
S3	10.400.000,00	10,9%	83.200,00	6.229.600,00	1.019.200,00
S4	10.175.000,00	13,7%	50.875,00	6.715.500,00	712.250,00
S5	20.450.000,00	13,4%	613.500,00	10.470.400,00	1.758.700,00
Durchschnitt	15.712.500,00	12,725%	274.193,75	9.476.825,00	1.385.425,00
Durchschnitt pro Maus	1.964.062,5	X	34.274,22	1.184.603,12	173.178,13
Varianz	2,9.67*10 <sup>13</sup>	0,012%	5,178*10 <sup>10</sup>	1,108*10 <sup>13</sup>	2,926*10 <sup>11</sup>
Standardabweichung	5.447.318,72	1,092%	227.543,70	3.328.158,33	540.911,75

#### 4.4. Re-Sortierung kultivierter CD146-/CD45- negativer Zellen

Die einzige Zellpopulation die suffizient in der Zellkultur anwuchs und sich zusätzlich passagieren ließ, war die CD146-/CD45- Zellpopulation. Aufgrund ihrer Morphologie, die nach der gängigen Beschreibung von MSC ebenfalls als eine mögliche Ursprungspopulation für MSC in Frage kommt, erfolgte die genauere Betrachtung der Zellpopulation.

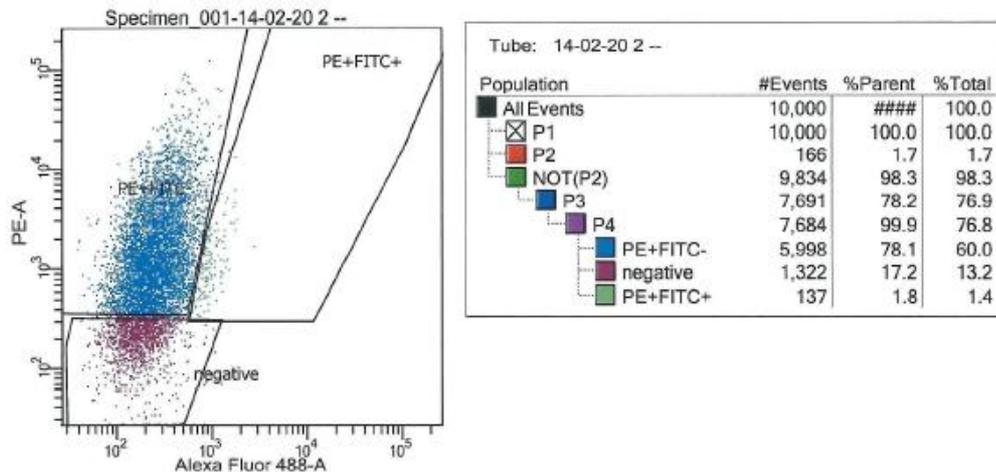
Nach der dritten Passage der Kulturen M1-/-, M2 -/-, M3-/- und M4-/- erfolgte der erneute Versuch die kultivierten Zellen nach ihren Oberflächenmarkern zu sortieren. Nach Ablösen der Zellen von der Kulturoberfläche konnten zwischen 2.325.000 und 5.025.000 Zellen gewonnen werden. Nach einem Waschschrift zum Entfernen des Trypsins wurden von jeder Probe 1/10 an Zellen entnommen (200.000-500.000 Zellen) und nach dem Protokoll aus 3.2.4. mit den Antikörpern für CD146, CD 45 und DAPI markiert. Anschließend erfolgte die erneute Sortierung.

Der Anteil toter durch das FACS detektierter Zellen betrug durchschnittlich 3,225%. Überraschenderweise war der Großteil der sortierten Zellen in der CD146+/CD45- negativen Fraktion anzufinden (siehe Tabelle 10, Abbildung 8). Bei allen Populationen waren dies durchschnittlich 59,429% der gesamten Zellen. In dem CD146-/CD45- Ursprungscluster der Zellen wurden durchschnittlich nur noch 11,935% zugeordnet. Der Anteil an doppelt positiven Zellen betrug durchschnittlich nur 2,021%.

**Tabelle 10**

Bestimmung der Zellzahlen vor und nach der Zellsortierung anhand des FACS. Angabe von Durchschnitt, dem Durchschnitt an Zellzahlen pro einzelner Maus, Varianz und Standardabweichung. Ermittlung des Anteils an toten Zellen nach der Isolation durch das FACS

Gruppe	Zellzahl vor Sortierung	tote Zellen in %	CD146+/CD45-	CD146-/CD45-	CD146+/CD45+
M1-/-	200.000,00	3,9%	121.000,00	2.800,00	2.200,00
M2-/-	500.000,00	1,7%	300.000,00	66.000,00	7.000,00
M3-/-	400.000,00	1,3%	242.400,00	54.800,00	5.600,00
M4-/-	300.000,00	6,0%	168.600,00	43.500,00	13.500,00
<b>Durchschnitt</b>	350.000,00	3,225%	208.000,00	41.775,00	7.075,00
<b>Varianz</b>	1,250*10 <sup>10</sup>	0,035%	4,692*10 <sup>9</sup>	5,696*10 <sup>8</sup>	1,681*10 <sup>7</sup>
<b>Standardabweichung</b>	111.803,40	1,883%	68.499,489	23.866,962	4.099,619



**Abbildung 8**

Exemplarisch die Darstellung des DotPlot der Sortierung der Gruppe M2-/- nach Kultur mit der entsprechenden Gating-Strategie

Die RNA der kultivierten Zellen wurde in einem separatem Schritt isoliert. Für die entsprechenden Ergebnisse wird auf das Kapitel 4.6. RNA-Vermessung verwiesen.

#### 4.5. RNA- Isolation aus KC- und CRE-Mausmodellen

Zur Überprüfung ob mit der neu eingeführten Methode ebenfalls Zellen aus genetisch Veränderten Mausmodellen isoliert werden können, wurden Dank der freundlichen Bereitstellung unserer Kollegen der Klinik für Gastroenterologie je zwei 10 Wochen alte Mäuse des KC-Mausmodells und des CRE-Mausmodells zur Verfügung gestellt. Aufgrund der zu erwartenden geringen Zellmenge in der Zielfraktion wurde erneut nach einer Möglichkeit zur Optimierung der Zellausbeute gesucht. Hierbei zeigte sich die

Erfahrung von Kollegen unseres Labors mit dem Gentle-MACS-System als hilfreich. Die Gewinnung der Pankreata erfolgte nach dem standardisiertem Vorgehen. Anschließend wurden der Schritt der mechanischen und enzymatischen Gewebedissoziation durch das GentleMacs-System mithilfe des Spleen-Dissociation-Kits durchgeführt. Danach erfolgten Waschschrte und Beladung der Zellen mit den Antikörpern nach dem in 3.2.4. beschriebenen Protokoll. In der anschließenden Sortierung konnten, wie in den vorangegangenen Varianten, alle drei Subpopulationen isoliert werden.

Nach der Gewebedissoziation zeigten sich sehr hohe Zahlen der insgesamt gewonnenen Zellen. Es wurden an die 10.000.000 Zellen pro Mausmodell und 5.000.000 Zellen pro Maus isoliert. Dennoch scheint der Anteil an abgestorbenen Zellen im Vergleich zur händischen Gewebedissoziation erhöht. Die Verteilung der einzelnen Zellen in den drei Subgruppen ist ähnlich zu den Vorversuchen. Auffällig ist aber ein deutlich niedriger Anteil an Zellen in der CD146+/CD45+ Fraktion (Tabelle 11).

**Tabelle 11**

Bestimmung der Zellzahlen vor und nach der Zellsortierung anhand des FACS. Ermittlung des prozentualen Anteils an toten Zellen nach der Isolation durch das FACS

Gruppe	Zellzahl vor Sortierung	tote Zellen in %	CD146+/CD45-	CD146-/CD45-	CD146+/CD45+
KC1	9.875.000,00	35,7%	52.000,00	4.000.000,00	5.000,00
CRE1	10.650.000,00	36,4%	75.500,00	5.300.000,00	6.550,00

#### 4.6. RNA-Vermessung

Die Vermessung der RNA erfolgte über den Nanodrop One von Thermo Fischer Scientific. Die erstmalige RNA-Analyse erfolgte mit jeweils drei Proben aus je zwei Mäusen. Die gewonnenen Mengen der RNA in den einzelnen Subgruppen waren gering. Am ehesten aufgrund von geringen Zellzahlen zur Gewinnung der RNA ohne vorangehende Kultivierung der einzelnen Population war die Ausbeute der gewonnen RNA zu erwarten gering.

Um die Menge an isolierter RNA für eine folgend suffiziente mRNA-Sequenzierung zu erhöhen, wurde aus den kombinierten Pankreata von je acht Mäusen die einzelnen Subgruppen mit der neuen Methode isoliert und anschließend vermessen.

Zusätzlich erfolgte die RNA-Isolation aus zwei KC-Mäusen sowie von zwei CRE-Mäusen.

**Tabelle 12**

Daten der RNA-Vermessung mittels Nanodrop aller zu sequenzierenden Proben. Angabe des Nukleinsäuregehalts, der Emissionsspektren sowie der Gesamtmenge an gewonnener Nukleinsäure

Proben-name	Nukleinsäure-gehalt (ng/uL)	A260/A280	A260/A230	A260	A280	Mykroliter	Gesamtmenge Nukleinsäure (ng)
pp1	25,059	1.852	1.797	0.626	0.338	30	751,77
pn1	2,586	1.507	0.523	0.065	0.043	30	77,58
nn1	13,144	1.758	1.048	0.329	0.187	24	315,456
pp3	24,819	1.869	1.390	0.620	0.332	30	744,57
pn3	4,36	1.423	0.777	0.109	0.077	30	130,8
nn3	60,138	1.917	1.980	1.503	0.784	30	1804,14
pp4	27,223	1.887	1.189	0.681	0.361	30	816,69
pn4	2,671	1.519	0.625	0.067	0.044	30	80,13
nn4	39,899	1.951	1.894	0.997	0.511	30	1196,97
pp5	10,137	1.812	1.572	0.253	0.140	30	304,11
pn5	5,262	1.600	0.732	0.132	0.082	30	157,86
nn5	34,389	1.880	1.283	0.860	0.457	30	1031,67
KC1-/-	9,18	1.828	0.127	0.229	0.126	30	275,4
KC1+/-	3,157	1.704	0.245	0.079	0.046	30	94,71
CRE1-/-	5,841	1.692	1.576	0.146	0.086	30	175,23
CRE1+/-	2,702	1.433	0.873	0.068	0.047	30	81,06
WTnn2	722,715	2,043	2,189	18,068	8,842	90	65.044,35
WTnn3	589,126	2,02	2,213	14,728	7,292	90	53021,34
WTnn4	635,585	2,018	2,211	15,89	7,874	90	57202,65

Ebenfalls RNA-isoliert wurde aus den kultivierten Zellen der Gruppen M2-M4. Die Verteilung der isolierten RNA lässt sich in Tabelle 12 nachvollziehen. Auffällig ist der Qualitätsabfall der Reinheit der RNA in den CD146+/CD45- Populationen (pn1, pn3, pn4, pn5, KC1+/-, CRE1+/-). Dieser ist am ehesten auf die geringe isolierte Menge an RNA zurückzuführen die am wahrscheinlichsten aus den geringen isolierten Zellmengen resultierte. Dies ist sowohl an der gesamt gewonnenen Menge an Nukleinsäure ersichtlich als auch am ermittelten Nukleinsäure / $\mu$ l -Gehalt.

#### 4.7. mRNA-Sequenzierung

Die initiale mRNA-Sequenzierung erfolgte durch die Firma Novogene als Poly-A Sequenzierung. Da die gesamten Proben in zwei Anläufen an die Firma Novogene gesendet wurden, erfolgte eine Zusammenführung der Daten durch unseren Kollegen des Helmholtz Proteinentrums Halle Herrn Dr. rer. nat. Markus Glaß. Anhand der zusammengeführten Rohdaten wurde eine erneute Analyse vorgenommen.

In sowohl der Sequenzierung durch die Firma Novogene als auch durch unseren Kollegen wurde initial die Qualität der Daten geprüft. Nachdem alle Proben den Qualitätscheck erfolgreich passiert haben, erfolgte nun die Zuordnung der generierten Reads zum Mausgenom Mus\_musculus.GRCm38.100.gtf.

Anschließend erfolgte die Überprüfung der sogenannten RawReads auf ihre Verteilung (Abbildung 9 und Tabelle 13). Insgesamt konnten 18-25\*10<sup>6</sup> Reads pro Probe generiert werden. Hiervon konnten bei allen 80-90% dem Mausgenom zugeordnet werden. Nur die Proben des Cre-Mausmodells und die Probe nn1 wiesen niedrigere Werte auf, wobei die Probe nn1 deutlich aus allen Proben herausfällt.

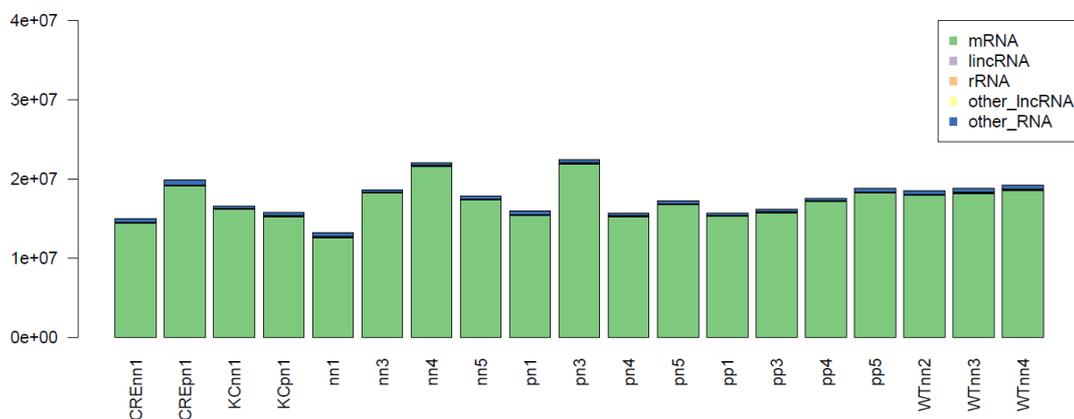
Für die weitere Datenanalyse wurde mit allen Proben fortgefahren und es erfolgte eine Analyse der Genexpression. Um die Proben miteinander zu vergleichen wurden verschiedene Korrelationsindizes berechnet. Anhand der proteincodierenden zugeordneten Reads erfolgte über die FPKM-Werte die Darstellung der Korrelation der einzelnen Proben zueinander in einer Pearson-Correlation (Abbildung 10). Hier zeigte sich vor allem ein gutes Clustering der Kultivierten negativen Zellen sowie der positiv/positiven Fraktionen. Sowohl in der negativ/negativen als auch in der

**Tabelle 13**

Die Verteilung der generierten Raw Reads der Sequenzierung mit dem Anteil der erfolgreich dem Mausgenom zugeordneten Reads als Zahl und in Prozent sowie der Anteil an nicht zuzuordnenden als Zahl und in Prozent.

Sample	CREm	CREpn	KCm	KCpn	nn1	nn3	nn4	nn5	pn1	pn3	pn4	pn5	pp1	pp3	pp4	pp5	WTm2	WTm3	WTm4
total alignments	1.98E+07	2.53E+07	1.93E+07	1.98E+07	2.21E+07	2.17E+07	2.54E+07	2.13E+07	1.92E+07	2.77E+07	1.89E+07	2.05E+07	1.93E+07	1.97E+07	2.07E+07	2.28E+07	2.19E+07	2.36E+07	2.19E+07
successfully assigned	1.55E+07	1.93E+07	1.68E+07	1.59E+07	1.93E+07	1.97E+07	2.21E+07	1.79E+07	1.66E+07	2.24E+07	1.97E+07	1.73E+07	1.57E+07	1.62E+07	1.79E+07	1.88E+07	1.85E+07	1.88E+07	1.92E+07
n%	78.7%	78.8%	85.9%	80.5%	88.0%	89.0%	87.0%	83.4%	83.5%	81.0%	83.0%	84.4%	81.3%	82.3%	85.1%	83.2%	87.0%	87.7%	87.5%
Unassigned_Unmapped	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Unassigned_Read_Type	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Unassigned_Singleton	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Unassigned_MappingQuality	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Unassigned_Chimer	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Unassigned_FragmentLength	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Unassigned_Overlap	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Unassigned_MultiMapping	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Unassigned_Secondary	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Unassigned_NonSp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Unassigned_NonFus	8.32E+05	2.47E+05	1.35E+05	2.89E+05	7.22E+05	1.05E+06	2.18E+05	1.39E+05	1.93E+05	4.17E+05	2.39E+05	1.93E+05	2.59E+05	2.24E+05	2.09E+05	2.28E+05	1.62E+05	1.66E+05	1.69E+05
n%	4.2%	9.8%	7.2%	14.3%	32.6%	4.8%	8.6%	6.1%	8.3%	15.1%	12.6%	9.3%	13.0%	11.3%	10.1%	10.4%	7.6%	7.8%	7.7%
Unassigned_Overlapping_Length	3.74E+06	2.83E+06	1.34E+06	1.02E+06	1.72E+06	1.20E+06	1.19E+06	2.24E+06	1.57E+06	1.09E+06	8.29E+05	1.39E+06	3.75E+05	1.29E+06	9.99E+05	1.43E+06	3.52E+05	9.75E+05	1.09E+06
Unassigned_Antibody	19.1%	11.8%	6.5%	5.2%	7.8%	5.5%	4.3%	10.5%	8.2%	3.9%	4.4%	6.3%	5.1%	6.5%	4.8%	6.3%	4.5%	4.6%	4.8%

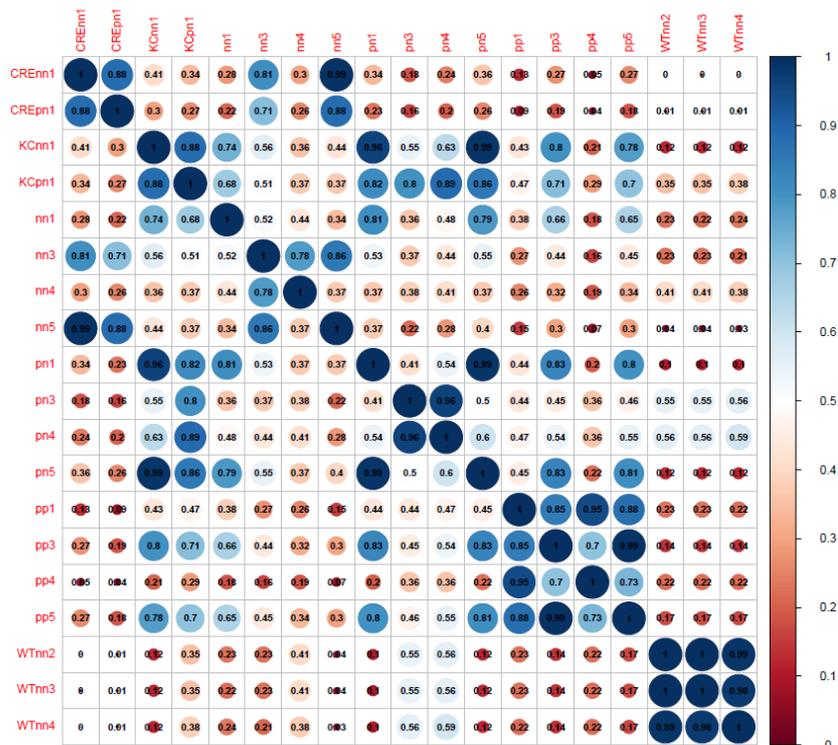
**Raw read count distribution**



**Abbildung 9**

Graphische Darstellung der Verteilung der Raw reads der einzelnen Proben und welchem RNA-Typus diese zugeordnet werden. Es zeigt sich ein weitgehend konsistentes Verteilungsmuster mit einem zu erwartendem Großteil an mRNA in allen Proben.

positiv/negativen Zielfraktion zeigten sich Unterschiede der Populationen untereinander. Die Proben Pn3/4 korrelieren sehr gut miteinander und die Proben pn1/pn5 korrelieren sehr gut miteinander. Der Korrelationsindex von pn1/5 zu pn3/4 zeigt zwar eine gute Korrelation auf, ist aber dennoch etwas geringer als in den anderen Proben. Diese Verteilung spiegelt sich auch ähnlich bei den negativ/negativen Population wieder. Dies könnte mit einer möglichen unsauberen Auftrennung im Bereich der Untergruppenbildung nach Sortierung im FACS einhergehen. Bezüglich der KC- und CRE-Mausproben lässt sich feststellen, dass diese untereinander sehr gut korrelieren sowie etwas inkonsistent mit den negativ/negativen als auch mit den positiv/negativen Zellpopulationen. Aufgrund der Tatsache, dass diese Proben jeweils nur einmalig erhoben wurden, ist ihre wissenschaftliche Aussagefähigkeit stark eingeschränkt. Im Vergleich zur Pearson-Correlation erfolgte ebenfalls eine Principal Component Analyse. Hier zeigt sich ein deutlich bessere Aufteilbarkeit der einzelnen Proben zu ihren Subgruppen. Lediglich die Probe nn1 clustert weit entfernt von den anderen Proben der Gruppe CD146-/CD45-. Im Vergleich zur Pearson-Correlation zeigt sich ein homogeneres Clustern der CD146+/CD45- und der CD146-/CD45- Proben (Abbildung 11). Dieser Schluss lässt sich ebenfalls aus der graphischen Darstellung der Heatmap

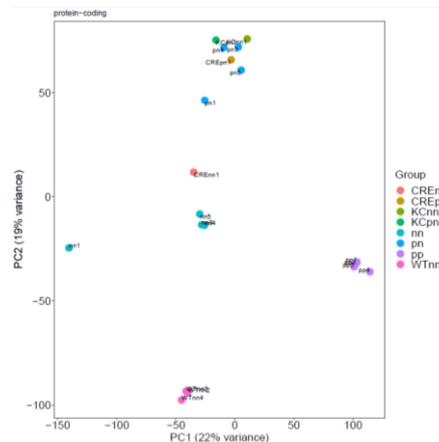


**Abbildung 10**

Pearson-Correlation der Sequenzierten Proben mit Angabe des Korrelationsindexes von 0-1. Ein Korrelationsindex von 1 spricht für eine Korrelation von 100%, 0 für eine Korrelation von 0%

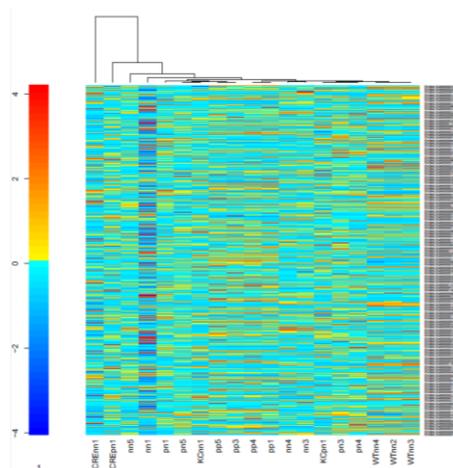
ziehen. Hier scheint die Gruppe nn1 ein wesentlich anderes Expressionsprofil im Bereich der proteinkodierenden Gene zu haben als alle anderen untersuchten Proben (Abbildung 12).

Zusammenfassend ist das Clustering der Proben nicht konsistent in den einzelnen Untersuchungsvarianten. Im Hinblick auf die Auftrennung der Population lässt sich aber feststellen, dass sowohl die CD146+/CD45+ Zellfraktion sowie die kultivierten CD146-/CD45- Proben sich sicher und eindeutig von den anderen Populationsgruppen unterscheiden und eine sichere Einteilung in diese vorgenommen werden kann. Im Hinblick auf die CD45- Fraktionen ist diese klare Trennung der einzelnen Populationen deutlich schwieriger und in den erhobenen Subgruppen inkonsistent zueinander. Dennoch erscheint es möglich, zum Beispiel Anhand der Principal Component Analyse die CD146-/CD45- Zellfraktion eindeutig von der CD146+/CD45- Zellfraktion zu trennen.



**Abbildung 11**

Principal Component-Analyse der sequenzierten Proben. Auffallend konsistentes Clustering aller Subgruppen mit Ausnahme der Population nn1.



**Abbildung 12**

Heatmap der exprimierten proteincodierenden Gene aller Sequenzierungsproben. Die Sortierung der Proben erfolgte nach Zugehörigkeitsdendrogramm der einzelnen Proben.

Diese Unschärfe bei der Auftrennung der pn- und nn-Gruppen zeigt sich auch an den einzelnen Proben der KC- und CRE-Mäusen. Dies könnte an einer zu niedrig gewählten Expression von CD146 zur Separation der Populationen liegen, oder aber an einer insuffizienter Auftrennung der Populationen anhand von CD146. Dennoch scheint auf die CD146-Expression und auf die generelle Expression von Oberflächenmarkern die adhärenzte Zellkultur einen deutlichen Einfluss zu haben. Die kultivierten CD146-/CD45-negativen Zellen unterscheiden sich in jedem Clustering deutlich von ihren ursprünglichen Vorläuferzellen.

Die Frage um welchen Zelltyp es sich bei den unterschiedlichen Populationen handelt, konnte mit den bisher erfolgten Analysen nicht beantwortet werden. Um einen Anhalt zu bekommen um welche Zellen es sich in der isolierten Population handeln könnte, wurde aus mehreren Studien und aus den Vorgaben des ISCT für mesenchymale Stammzellen versucht Signaturgene zu vergleichen.

Für die weiteren Vergleiche der Gensignaturen wurden die Daten der genetisch veränderten Mausmodelle nicht einbezogen, da diese aufgrund von jeweils nur einmaliger Durchführung eine geringe wissenschaftliche Aussagekraft haben.

Um einen Vergleichswert zu generieren ab welchem Expressionsniveau ein Oberflächenmarker vorhanden sein müsste, wurden die FPKM-Werte der Oberflächenmarker die zur Sortierung genutzt wurden, also CD146 und CD45, verwendet. Der niedrigste Durchschnittswert, bei dem einer der Oberflächenmarker in der Sortierung vorhanden ist, liegt bei einem FPKM von 1,797. Dieser Wert wurde für das Gen CD146 bei der CD45-positiven und CD146-positiven Fraktion bestimmt (Tabelle 14).

Als erste Vergleichsgene für Signaturgene von MSC wurden die Oberflächenmarker der bereits in der Einleitung erwähnten Minimalkriterien zur Klassifikation mesenchymaler Stammzellen des ISCT verwendet (Kapitel 1.3, Seite 3)<sup>33</sup>. Die Oberflächenmarker CD90, CD105 und CD73 sind positive Marker. Die Oberflächenmarker CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79B, CD19 sind negative Marker. Hierbei zeigt sich ein gemischtes Bild. Die CD146 positive und CD45 negative Zellfraktion sowie die CD146 negative und CD45 negative Zellfraktion sind positiv für 2 von 3 (CD90, CD105) Oberflächenmarkern die vorhanden sein sollten und negativ für 4 von 6 (CD45, CD11b, CD79B, CD19) Oberflächenmarker die nicht vorhanden sein sollten. Nur die kultivierte negativ-negative Population (WTnn) stimmt mit allen Oberflächenmarkern außer einem der MSC nach ISCT überein. Hier zeigen sich ebenfalls 2 von 3 (CD90, CD105) Oberflächenmarkern die vorhanden sein sollten positiv und 6 von 6 (CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79B,

CD19) Oberflächenmarker die nicht vorhanden sein sollten negativ. Die doppelt positive Zellfraktion ist für alle Oberflächenmarker außer CD73 positiv. Hieraus lässt sich bei den unterschiedlichen Populationen noch kein MSC-Status belegen, wobei die kultivierte doppelt negative Zellfraktion am ehesten dem Typus der MSC nach Maßgaben des ISCT entspricht.

**Tabelle 14**

FPKM-Werte (fragment per kilobase million) für die Genexpression von Signaturgenen von MSC nach den Empfehlungen des ISCT. Zusätzlich als Vergleichswerte die Oberflächenmarker die zur Sortierung der Zellen mittels Durchflusszytometer verwendet wurden.

MW = Mittelwert/Durchschnitt, STD = Standardabweichung, grün = Oberflächenmarker die vorhanden sein sollten, rot = Oberflächenmarker die nicht vorhanden sein sollten

Oberer Teil: Mesenchymale Stammzellen Oberflächenmarker nach ISCT2006)

Unterer Teil: Oberflächenmarker die für Sortierung durch FACS verwendet wurden

MSC-Oberflächenmarker (ISCT2006)	Gen	Chromosom	nn (MW)	nn (STD)	pn (MW)	pn (STD)	pp (MW)	pp (STD)	WTnn (MW)	WTnn (STD)
CD90 (thymus cell antigen 1)	Thy1	9	133,311	31,812	26,764	12,426	6,793	3,960	165,699	5,046
CD105 (endoglin)	Eng	2	45,433	2,961	234,311	99,937	21,788	1,182	31,008	4,085
CD73 (5' nucleotidase, ecto)	Nt5e/Cd73	9	0,492	0,0960	0,347	0,089	0,895	0,274	0,222	0,015
CD45 (protein tyrosine phosphatase, receptor type, C)	Ptpnc	1	0,432	0,3145	0,638	0,346	29,959	4,350	0,002	0,002
CD34 (hematopoietic progenitor cell antigen CD34)	Cd34	1	254,205	41,678	76,051	10,903	6,736	5,537	0,361	0,159
CD14 (monocyte differentiation antigen CD14)	Cd14	18	4,960	2,710	22,629	9,004	539,587	72,708	1,332	0,037
CD11b (integrin alpha M)	Itgam	7	0,352	0,245	0,942	0,751	56,396	9,392	0	0
CD79B (B-Cell antigen receptor complex-associated protein beta chain)	Cd79b	11	0,770	0,548	1,467	0,157	18,902	5,380	0	0
CD19 (B-lymphocyte surface antigen B4)	Cd19	7	0,274	0,205	0,996	0,302	9,961	3,061	0,005	0,007
FACS-Oberflächenmarker	Gen	Chromosom	nn (MW)	nn (STD)	pn (MW)	pn (STD)	pp (MW)	pp (STD)	WTnn (MW)	WTnn (STD)
CD146 (melanoma cell adhesion molecule)	Mcam	9	0,143	0,100	75,428	30,272	1,797	0,929	2,696	0,305
CD45 (protein tyrosine phosphatase, receptor type, C)	Ptpnc	1	0,432	0,314	0,638	0,346	29,959	4,350	0,002	0,002

In der Studie von Freeman et al. von 2015 wurden mit Hilfe von Single-Cell RNA-Sequenzierung mesenchymaler Stammzellen aus Knochenmark mehrere Signaturgene für murine MSCs detektiert. Hierbei sind Ly6a, CD9, CD44, Sdc4, Lamp2 positive Signaturgene mit einer hochregulierten Expression. Anep, Itgam, Eng, Nt5e, Pecam und Nanog sind Signaturgene mit einer herunterregulierten Expression. Einige Gene werden nach der Studie als möglich hoch- oder herunterregulierte Signaturgene gewertet. Hierbei handelt es sich um Pdgfra, CD80, CD34 und Tfrc<sup>103</sup>. Auffällig ist in dieser Auflistung vor allem das Gen Endoglin (CD105) sowie das Gen Nt5e, welche beide beim ISCT zu den definierenden positiven Oberflächenmarkern gehören. Im Vergleich zu den Signaturgenen von MSC zeigt sich in der Genexpression in dieser Arbeit ebenfalls eine nicht komplette Übereinstimmung mit den Signaturgenen nach der Studie von Freeman et al.. Auffällig ist das bei allen isolierten Subpopulationen die hochregulierten Gene für MSC ebenfalls positiv sind. Bei den herunterregulierten Genen für MSC treten jedoch Unterschiede auf. Sowohl bei der doppelt negativen Zellfraktion als auch bei der kultivierten doppelt negativen Zellfraktion sind 2 von 6 negativen Signaturgenen positiv. Bei der Zielfraktion, den positiv-negativen Zellen, sind 3 von 6 positiv. Auffällig ist hierbei, dass es sich vor allem um Gene handelt, die bei Perizyten und Endothelzellen positiv sind. Die doppelt positive Zellfraktion ist nur bei 2 von 6 negativen Signaturgenen ebenfalls negativ und damit am weitesten von Typus der mesenchymalen Stammzellen entfernt siehe Tabelle 15).

Ein weiterer Vergleich wird mit Signaturgenen nach der Arbeit von Sunami et al. durchgeführt<sup>4</sup>. In dieser Arbeit werden Signaturgene für MSC aus verschiedenen Geweben, CAFs und für Stellatumzellen aufgelistet. Hierbei stimmt die positiv-negative Zellfraktion vollständig mit den positiven Marker für von MSC abstammenden CAFs überein und exprimiert 4 von 5 positiven Marker für aus Fettgewebe isolierten MSC. Die Übereinstimmung mit den weiteren Zelltypen ist gering. Die negativ-negative Zellfraktion exprimiert ebenfalls alle Gene für von MSC abstammenden CAFs, allerdings exprimiert sie nur 3 von 5 Marker für MSC aus Fettgewebe. Die kultivierte negativ-negative Population stimmt ebenfalls mit 4 von 5 positiven Markern der MSC aus Fettgewebe überein (Siehe Tabelle 16).

**Tabelle 15**

FPKM-Werte (fragment per kilobase million) nach Freeman BT, Jung JP, Ogle BM (2015) Single-Cell RNA-Seq of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Reveals Unique Profiles of Lineage Priming ;

MW = Mittelwert/Durchschnitt, STD = Standardabweichung, grün = Oberflächenmarker mit hoher Expression in murinenMSC, rot = Oberflächenmarker mit niedriger Expression in murinenMSC, blau = variable Verteilung möglich/nicht eindeutig positiv oder negativ nach Sequenzierung zuzuordnen

mbm-MSC-Gene	Gen	Chromo-som	nn (MW)	nn (STD)	pn (MW)	pn (STD)	pp (MW)	pp (STD)	WTnn (MW)	WTnn (STD)
lymphocyte antigen 6 complex	Ly6a	15	732,304	177,395	311,335	88,537	25,740	17,439	23,593	2,349
CD9 antigen (Tetraspanin -29)	Cd9	6	40,855	12,732	88,054	9,631	24,009	4,885	23,727	4,635
CD44 (homing function and indian blood group system)	Cd44	2	5,064	0,500	5,001	0,716	32,401	5,225	29,539	3,711
syndecan 4	Sdc4	2	43,772	10,476	49,904	17,023	68,878	13,872	55,322	3,792
lysosomal-associated membrane protein 2	Lamp2	x	49,719	14,678	27,575	6,671	69,386	6,927	52,446	2,761
alanyl (membrane) aminopeptidase	Anpep	7	68,885	23,278	21,811	5,877	13,071	1,470	5,074	0,433
CD11b (integrin alpha M)	Itgam	7	0,352	0,245	0,942	0,751	56,396	9,392	0,000	0,000
CD105 (endoglin)	Eng	2	45,433	2,961	234,311	99,937	21,788	1,182	31,008	4,085
CD73 (5' nucleotidase, ecto)	Nt5e/Cd73	9	0,492	0,096	0,347	0,089	0,895	0,274	0,222	0,015
platelet/endothelial cell adhesion molecule 1	Pecam1	11	1,122	1,520	188,821	83,255	1,825	0,674	0,021	0,011
Nanog homeobox	Nanog	6	0,000	0,000	0,023	0,041	0,012	0,021	0,034	0,034
platelet derived growth factor receptor, alpha	Pdgfra	5	90,845	36,043	7,846	7,809	1,778	1,686	29,506	3,098
CD80 (T/B-lymphocyte activation antigen CD80/B7)	Cd80	16	1,047	0,437	0,425	0,286	9,895	1,149	16,489	0,274
CD34 (hematopoietic progenitor cell antigen CD34)	Cd34	1	254,205	41,679	76,051	10,903	6,736	5,537	0,361	0,159
transferrin receptor	Tfrc	16	0,600	0,374	4,480	0,265	32,936	1,351	4,544	0,239

**Tabelle 16**

FPKM-Werte (fragment per kilobase million) nach Sunami, Yoshiaki; Häußler, Johanna; Kleeff, Jörg (2020): Cellular Heterogeneity of Pancreatic Stellate Cells, Mesenchymal Stem Cells, and Cancer-Associated Fibroblasts in Pancreatic Cancer.

MW = Mittelwert/Durchschnitt, STD = Standardabweichung, grün = Oberflächenmarker die vorhanden sein sollten

Pancreatic stellate cell	Gen	Chromosom	nn (MW)	nn (STD)	pn (MW)	pn (STD)	pp (MW)	pp (STD)	WTnn (MW)	WTnn (STD)
desmin	Des	1	12,852	8,209	15,236	3,584	0,343	0,196	14,680	1,533
glial fibrillary acidic protein	Gfap	11	0,073	0,055	0,346	0,229	0,032	0,013	0,014	0,013
MSC-derived CAFs	Gen	Chromosom	nn (MW)	nn (STD)	pn (MW)	pn (STD)	pp (MW)	pp (STD)	WTnn (MW)	WTnn (STD)
interleukin 6	Il6	5	28,080	12,873	6,536	3,147	33,914	11,009	24,904	1,715
wingless-type MMTV integration site family, member 5A	Wnt5a	14	20,344	9,467	3,770	2,956	0,466	0,297	7,929	0,452
bone morphogenetic protein 4	Bmp4	14	13,651	2,767	6,677	3,974	0,508	0,344	0,013	0,019
Bone-marrow derived MSC	Gen	Chromosom	nn (MW)	nn (STD)	pn (MW)	pn (STD)	pp (MW)	pp (STD)	WTnn (MW)	WTnn (STD)
chemokine (C-C motif) ligand 5	Ccl5	11	0,299	0,280	0,137	0,203	77,399	38,209	0,446	0,071
Cancer-associated MSC (pancreatic cancer)	Gen	Chromosom	nn (MW)	nn (STD)	pn (MW)	pn (STD)	pp (MW)	pp (STD)	WTnn (MW)	WTnn (STD)
colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	Csf2	11	0,000	0,000	0,157	0,175	0,075	0,131	1,410	0,627
CD44 (homing function and indian blood group system)	Cd44	2	5,064	0,500	5,001	0,716	32,401	5,225	29,539	3,711
CD73 (5' nucleotidase, ecto)	Nt5e/Cd73	9	0,492	0,096	0,347	0,089	0,895	0,274	0,222	0,015
CD90 (thymus cell antigen 1)	Thy1	9	133,311	31,812	26,764	12,426	6,793	3,960	165,699	5,046
integrin alpha 4	Itga4	2	0,171	0,201	0,152	0,070	0,610	0,247	12,823	2,075
Adipose-derived MSC	Gen	Chromosom	nn (MW)	nn (STD)	pn (MW)	pn (STD)	pp (MW)	pp (STD)	WTnn (MW)	WTnn (STD)
actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	Acta2	19	0,586	0,361	85,755	34,553	1,230	0,766	346,822	70,538
vascular endothelial growth factor A	Vegfa	17	39,202	16,717	35,881	7,026	7,454	2,770	106,341	8,988
fibroblast activation protein	Fap	2	18,917	2,861	2,854	2,443	0,588	0,234	3,456	0,185
S100 calcium binding protein A4	S100a4	3	2,363	3,624	0,196	0,156	6,701	3,290	0,690	0,566
chondroitin sulfate proteoglycan 4	Cspg4	9	0,424	0,127	6,175	2,460	0,028	0,027	8,222	0,541

#### 4.8. Enrichment Analysen

Da zwar bisher die Aufteilung in verschiedene Subgruppen suffizient erfolgt ist, aber noch keine eindeutige Zuordnung des Zelltypus erfolgen konnte, wurde nach weiteren Möglichkeiten der Zellbestimmung gesucht. Hierfür wurden eine Zelltyp-Enrichment-Analyse sowie eine Gen-Set-Enrichment-Analyse durchgeführt. Die Zelltyp-Enrichment Analyse erfolgte über die Plattform xCell. Bei der Plattform xCell handelt es sich um ein



Zellen war die Anreicherung im Bereich der MSC nicht signifikant. Die höchsten ES im Bereich von 0,814 bis 1,081 in der positiv-negativen Zielfraktion wurden für das Profil der Hämatopoetischen Stammzellen generiert. Weitere signifikante Anreicherungen zeigten sich bei den Profilen für Endothelzellen, Fibroblasten, Pericyten, Astrozyten, Epithelzellen, Chondrozyten, Mesangiumzellen, Neurone (außer pn3) und Keratinozyten (Auflistung in absteigender Reihenfolge). Eine eindeutige Identifizierung der Pn-Populationen als MSC ist somit nicht möglich. Vielmehr scheint es sich um eine am ehesten stromale Mischpopulation zu handeln. Interessanterweise zeigen die Zellen ähnliche Profile von stromalen Zelltypen und von potentiellen Differenzierungsmöglichkeiten von MSC wie zum Beispiel von Chondrozyten. Nach der Zellisolationmethode ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei der pn Fraktion am ehesten, wie es der ES impliziert um hämatopoetische Stammzellen handelt.

Die negativ-negativen Populationen haben die höchsten signifikanten Anreicherungen für Fibroblasten mit einem ES zwischen 0,441 und 0,543. Zusätzlich gibt es signifikante Anreicherungen im Bereich der Pericyten, Präadipozyten, glatten Muskelzellen und hämatopoetische Stammzellen, sowie sehr geringe aber signifikante Anreicherungen für Astrozyten, Chondrozyten, Plasmazellen, Neurone, Skelettmuskulatur und Melanozyten. Nach dem bisherigen Verhalten der Zellen und dem Phänotyp in der Zellkultur, ist die höchste Anreicherung für fibroblastoide Zellen nachvollziehbar.

Die positiv-positive Zellfraktion erzielt einen ES von 1,855 bis 2,047 für unreife dendritische Zellen und zusätzlich signifikante Anreicherungen nahe einem ES von 1 für konventionelle dendritische Zellen, Monozyten und verschiedene Typen von B-Zellen. Weiter signifikante Anreicherungen aber mit einem ES von unter 0,5 werden für Pericyten, NK-Zellen, basophile Granulozyten, Mast-Zellen, plasmazytoide dendritische Zellen, Myeloische Progenitorzellen, neutrophile Granulozyten, Macrophagen, Plasmazellen und gamma-delta T-Zellen erzielt. Hiermit zeigt sich eine deutliche Anreicherung vor allem in lymphoiden Zellreihen, mit einem eindeutigem Maximum bei antigenpräsentierenden dendritischen Zellen. Dieses Clustering stimmt mit der Sortierung nach dem Oberflächenmarker CD45 (lymphocyte common antigen) sehr gut überein.

Die kultivierten negativ-negative Populationen hat ihren höchsten signifikanten ES für Fibroblasten. Dieser liegt je Population zwischen 0,408 und 0,438. Weitere signifikante Anreicherungen aller WTnn-Populationen bestehen für Pericyten, glatte Muskelzellen und Astrozyten. Geringere signifikante Anreicherungen wurden bei Präadipozyten, Th2-Zellen, Plasmazellen, gewöhnlichen lymphoiden Vorläuferzellen, Neuronen und CD4+-T-Zellen festgestellt. Mit den optischen Ergebnissen der Zellkulturversuche stimmt die höchste Anreicherung in xCell bei einem fibroblastoidem Zelltypus überein.

Zusammenfassend kann keine Population eindeutig dem Typus einer mesenchymalen Stammzelle anhand der durchgeführten Enrichment Analyse zugeordnet werden. Eindeutig gezeigt wurde, dass es sich bei den PP-Populationen am ehesten um Zellen lymphoiden Ursprunges handelt. Bei allen anderen Populationen lässt sich am ehesten auf einen stromalen Zelltypus schließen, wobei die NN- und die WTnn-Population am ehesten einem fibroblastoiden Zelltypus entsprechen. Die Pn-Zellfraktion ist nach xCell am ehesten einem hämatopoetischen Stammzelltypus sowie einem stromalen Zelltypus zuzuordnen. Der hämatopoetische Stammzelltypus ist in diesem Rahmen schwer zu interpretieren. Interessanterweise bestehen für die Pn-Zellfraktionen verhältnismäßig hohe Anreicherung im Bereich von Endothelzellen, die es bei den anderen stromalen Populationen nicht gibt.

Da mit der xCell-Methode zwar eine gewisse Richtung des Zelltypus vermutet aber nicht sicher klassifiziert werden konnte, erfolgte anschließend die bereits vorangehend erwähnte Gen-Set-Enrichment-Analyse.

Hierfür wurden die Zelltyp Signatursensets (Kollektion 8) von der Molecular Signature Database verwendet. Diese Datenbank enthält 671 spezifische Gensets für unterschiedlich Zelltypen<sup>105-107</sup>. Auch hier stammten die Daten von Untersuchungen an humanem Gewebe. Die einzelnen Signatursensetcluster wurden mittels Single-Cell Sequenzierungen bestimmt. Aufgrund der Diskrepanz des murinen und des humanem Genoms, erfolgte eine Homologisierung des Mausgenoms an das humane um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Nachteilig war hierbei, dass keine spezifische Signatur für mesenchymale Stammzellen unter den 671 Gensets vorhanden war. Dafür bestehen Signaturen mesenchymaler Stromazellen sowie verschiedene Zelltypen des Pankreas. Bei der GSEA wird die Anreicherung mittels eines normalisierten Enrichment Scores (NES) angegeben sowie einem p-Wert für die Signifikanz der Anreicherung. Die NES wurden bei dieser Form der Analyse jeweils im Vergleich zu einer anderen Zellpopulation gebildet. Aufgrund der Fülle an 671 Gensets unterschiedlicher Zelltypen die verglichen wurden, wurden jeweils die 5 Gensets mit dem höchsten NES und der höchsten Signifikanz der einzelnen Populationen verglichen, sowie die 5 Gensets mit dem höchsten NES und der höchsten Signifikanz, die das Wort Pankreas enthielten. Tabelle 17 listet jeweils die entsprechenden Top5 Gensets für alle Populationen im Vergleich zu den anderen Populationen auf.

Die höchsten signifikanten NES für die Pn-Populationen wurden gegenüber allen anderen Untergruppen bei Gensignaturen von Endothelzellen festgestellt. Im genaueren Vergleich zu der Nn-Population erfolgte zusätzlich noch ein Anreicherung für myeloischen Zellen. Im Vergleich zu der Pp-Population zeigte sich neben den Anreicherungen in endothelialen Profilen die höchste Anreicherung bei einem stromalem

Zelltypus. Gegenüber der Wtnn-Populationen zeigte sich ebenfalls die größte Anreicherung bei einem endothelialen Zelltypus. Zusätzlich zeigte sich erneut eine hohe Anreicherung bei einer myeloischen Zellsignatur und bei einer epithelialen Zellsignatur. Bezogen auf Pankreasspezifische Signaturen zeigten sich gegenüber allen anderen Population die höchsten NES für Zellsignaturen von Endothelzelle und myeloischen Zellen. Auffällig ist eine signifikante und hohe Anreicherung für duktaile Zellen im Vergleich zu allen anderen Population.

Die höchsten NES für die Nn-Population erzielten mit Ausnahme im Vergleich zur Wtnn-Population stromale sowie fibroblastoide Zellsignaturen. Im Vergleich zur Wtnn-Population zeigten sich erneut erhöhte NES bei myeloischen Zellsignaturen. Den höchsten NES der Nn-Populationen bezogen auf pankreasspezifische Signaturen im Vergleich zu den Pn- und Pp-Populationen zeigte mit Abstand eine stromale Signatur. Im Vergleich zur WTnn-Population wurde der höchste NES erneut bei einer myeloischen Zellsignatur erhoben.

Die Pp-Population erzielte ihre höchsten signifikanten NES im Vergleich zu allen anderen Population bei Zellsignaturen für Microglia, Makrophagen, Immunzellen und im Vergleich zur WTnn-Population bei einer myeloischen Zellsignatur. Bezogen auf pankreasspezifische Gensignaturen zeigte sich im Vergleich zu allen anderen Populationen bei einer myeloischen und anschließend lymphoiden Zellsignatur.

Die WTnn-Population zeigte vor allem Signaturen von proliferierenden Zellen (Granulosazellen, Stromazellen, Erythroblasten). Bezogen auf das Pankreas wurden die höchsten signifikanten NES bei einer stromalen Signatur generiert, mit deutlichen abfallenden Werten im Vergleich zu allen anderen signifikanten Zellsignaturen.

Zusammenfassend konnte man auch mit Hilfe der GSEA nicht eindeutig bestimmen um welchen Zelltypus es sich bei den einzelnen isolierten Populationen handelt. Eindeutig ist der lymphoide Ursprung der Pp-Population bei denen es sich am ehesten um Macrophagen beziehungsweise dendritische Zellen zu handeln scheint.

Sowohl die Nn-Populationen als auch die WTnn-Populationen bestanden vor allem aus stromalen Zellen, am ehesten aus Fibroblasten. Deutlich scheint eine Bereinigung der Zellkultur von myeloischen Zellen mit Zunahme der Kulturdauer stattgefunden zu haben. Auch bei den Pn-Populationen handelte es sich am ehesten um einen stromalen Zelltypus. Hier zeigten sich sowohl in der Analyse von xCell als auch in der Analyse der GSEA endotheliale Signaturen. Eine erfolgreiche Isolation von hämatopoetischen Stammzellen, wie es die Zelltypanalyse durch xCell schließen lässt, war unwahrscheinlich.

**Tabelle 17**

**Gen Set Enrichment Analyse**

Auflistung der top 5 angereicherten Gensets mit den höchsten Signifikanzen und dem niedrigstem p-Wert links. Auflistung der top 5 Gensets mit bezogen auf das Pankreas.

Farbkodierung zur Übersicht: pn=hellblau, nn=hellgrün, WTnn=grün, pp=rot

GSEA nn vs. pn top 5			GSEA nn vs. pn top 5 Pancreas		
Zelllinie	NES	p.adjust	Zelllinie	NES	p.adjust
TLA_FIBROBLAST_CELL	-8.815	5,73E-10	MP_MESENCHYMAL_STROMAL_CELL	-7,178	5,73E-10
CDHC3_FIBROBLAST_LIKE_CELL	-8,376	5,73E-10	MP_ALPHA_CELL	-3,878	1,04E-09
DFT_STROMAL_CELLS	-8,223	5,73E-10	DFF_STROMAL_CELLS	-3,645	5,44E-09
RSM_FBN1_FAP_CELLS	-7,930	5,73E-10	DFF_ENS_NEURONS	-3,254	9,51E-07
HBM_STROMAL	-7,809	5,73E-10	DFF_ISLET_ENDOCRINE_CELLS	-2,847	2,37E-05
DFCV_ENDOTHELIAL_CELLS	8,020	5,73E-10	MP_ENDOTHELIAL_CELL	6,864	5,73E-10
DFK_MYELOID_CELLS	7,288	5,73E-10	DFF_MYELOID_CELLS	6,687	5,73E-10
MMN_HENDO	7,554	5,73E-10	MP_DUCTAL_CELL	5,390	5,73E-10
DFAV_ENDOTHELIAL_CELLS	7,178	5,73E-10	DFF_DUCTAL_CELLS	5,466	5,73E-10
DFIMYELOID_CELLS	7,145	5,73E-10	DFPV_ENDOTHELIAL_CELLS	4,886	5,73E-10
GSEA nn vs. pp top five			GSEA nn vs. pp top 5 Pancreas		
HBM_STROMAL	-15,081	3,26E-10	MP_MESENCHYMAL_STROMAL_CELL	-7,601	3,26E-10
GLIACJ_IMMUNE_CELLS	-10,258	3,26E-10	MP_ALPHA_CELL	-4,465	3,26E-10
DFT_STROMAL_CELLS	-9,146	3,26E-10	DFF_MESOTHELIAL_CELLS	-3,667	7,90E-09
CDHC3_FIBROBLAST_LIKE_CELL	-9,136	3,26E-10	DFF_STROMAL_CELLS	-3,531	1,26E-08
DFK_STROMAL_CELLS	-8,474	3,26E-10	DFF_ENS_NEURONS	-3,653	1,31E-08
DFC_MICROGLIA	14,108	3,26E-10	DFF_MYELOID_CELLS	11,071	3,26E-10
HFR_MICROGLIA	13,166	3,26E-10	DFF_LYMPHOID_CELLS	7,546	3,26E-10
CDHC8_MACROPHAGE	12,931	3,26E-10	MP_DUCTAL_CELL	4,205	3,26E-10
BG_IMMUNE_CELLS	12,843	3,26E-10	MP_ENDOTHELIAL_CELL	3,169	2,65E-06
ZPFCMT_MICROGLIA	12,525	3,26E-10	DFPV_ENDOTHELIAL_CELLS	2,185	0,00379334
GSEA nn vs. WTnn top five			GSEA nn vs. WTnn top 5 Pancreas		
DFI_MYELOID_CELLS	-7,567	5,22E-10	DFF_MYELOID_CELLS	-7,053	5,22E-10
DFF_MYELOID_CELLS	-7,053	5,22E-10	DFF_ISLET_ENDOCRINE_CELLS	-5,498	5,22E-10
DFC_MICROGLIA	-6,840	5,22E-10	DFF_ACINAR_CELLS	-5,231	5,22E-10
HBM_STROMAL	-6,272	5,22E-10	MP_DELTA_CELL	-3,862	1,36E-09
DFL_HEPATOBLASTS	-6,139	5,22E-10	DFF_LYMPHOID_CELLS	-3,551	5,11E-08
HBM_ERYTHROBLAST	10,641	5,22E-10	MP_MESENCHYMAL_STROMAL_CELL	4,780	5,22E-10
TL_PROLIFERATING_BASAL_CELL	8,905	5,22E-10	MP_ACINAR_CELL	1,931	0,012519779
TL_PROLIFERATING_MACROPHAGE_CELL	7,808	5,22E-10			
FECTX_NSC_2	6,906	5,22E-10			
FOCL10_PUTATIVE_EARLY_ATRESIA GRANULOSA_CELL	6,703	5,22E-10			
GSEA pn vs. pp top five			GSEA pn vs. pp top 5 Pancreas		
HBM_STROMAL	-15,115	2,63E-10	MP_ENDOTHELIAL_CELL	-6,454	2,63E-10
GLIACJ_IMMUNE_CELLS	-11,805	2,63E-10	MP_MESENCHYMAL_STROMAL_CELL	-5,805	2,63E-10
DFCV_ENDOTHELIAL_CELLS	-10,760	2,63E-10	DFF_DUCTAL_CELLS	-5,253	2,63E-10
DFCEV_ENDOTHELIAL_CELLS	-10,457	2,63E-10	DFPV_ENDOTHELIAL_CELLS	-5,081	2,63E-10
FECTXB_ENDOTHELIAL	-9,402	2,63E-10	DFF_SMOOTH_MUSCLE_CELLS	-4,829	2,63E-10
DFC_MICROGLIA	15,019	2,63E-10	DFF_MYELOID_CELLS	10,966	2,63E-10
HFR_MICROGLIA	13,266	2,63E-10	DFF_LYMPHOID_CELLS	8,139	2,63E-10
CUIDHC8_MACROPHAGE	13,014	2,63E-10			
BG_IMMUNE_CELLS	12,633	2,63E-10			
ZPFCMT_MICROGLIA	12,602	2,63E-10			
GSEA pn vs. WTnn top five			GSEA pn vs. WTnn top 5 Pancreas		
MMN_HENDO	-8,824	4,22E-10	DFF_MYELOID_CELLS	-7,274	4,22E-10
DFCEV_ENDOTHELIAL_CELLS	-7,986	4,22E-10	MP_ENDOTHELIAL_CELL	-5,666	4,22E-10
DFI_MYELOID_CELLS	-7,732	4,22E-10	DFF_DUCTAL_CELLS	-5,439	4,22E-10
DFL_CILIATED_EPITHELIAL_CELLS	-7,495	4,22E-10	DFPV_ENDOTHELIAL_CELLS	-5,155	4,22E-10
ALC10_MVECS	-7,458	4,22E-10	DFF_ACINAR_CELLS	-4,780	4,22E-10
HBM_ERYTHROBLAST	10,342	4,22E-10	MP_MESENCHYMAL_STROMAL_CELL	7,161	4,22E-10
TL_PROLIFERATING_BASAL_CELL	9,470	4,22E-10	DFF_ENS_NEURONS	1,707	0,022116378
TL_PROLIFERATING_MACROPHAGE_CELL	8,928	4,22E-10			
FOCL10_PUTATIVE_EARLY_ATRESIA GRANULOSA_CELL	7,958	4,22E-10			
FOCL8_MATURE_CUMULUS GRANULOSA_CELL_2	7,583	4,22E-10			
GSEA pp vs. WTnn top five			GSEA pp vs. WTnn top 5 Pancreas		
DFCE_MICROGLIA	-12,675	4,94E-10	DFF_MYELOID_CELLS	-10,137	4,94E-10
BG_IMMUNE_CELLS	-11,310	4,94E-10	DFF_LYMPHOID_CELLS	-7,047	4,94E-10
DFI_MYELOID_CELLS	-10,676	4,94E-10	DFF_ACINAR_CELLS	-4,812	4,94E-10
GLI24WC11_PANETH_LIKE_CELL	-10,337	4,94E-10	MP_DUCTAL_CELL	-3,424	3,89E-08
HFR_MICROGLIA	-10,260	4,94E-10	DFF_ISLET_ENDOCRINE_CELLS	-3,441	2,14E-07
HBM_STROMAL	10,443	4,94E-10	MP_MESENCHYMAL_STROMAL_CELL	9,239	4,94E-10
MPM_STROMAL_CELL	9,239	4,94E-10	DFF_ENS_NEURONS	2,169	0,003312217
HBM_ERYTHROBLAST	8,528	4,94E-10	DFF_ENS_GLIA	1,909	0,011764936
TL_PROLIFERATING_BASAL_CELL	8,173	4,94E-10	DFF_STROMAL_CELLS	1,822	0,02014509
FOCL8_MATURE_CUMULUS GRANULOSA_CELL_2	7,497	4,94E-10	DFF_SMOOTH_MUSCLE_CELLS	1,663	0,03756021

Ob sich mesenchymale Stammzellen in den Pn-Zellpopulationen befanden, ist weder sicher zu bestätigen noch sicher auszuschließen.

## 5. Diskussion

### 5.1. Gewebsgewinnung und Methodenvergleich

Die Isolation der Zellen aus dem murinen Pankreas erfolgte nach verschiedenen Methoden in dieser Arbeit. Die ersten Versuche erfolgten nach der Nycodenz-Dichtezentrifugation. Mit dieser Methode wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits gute Erfolge bei der Gewebsauftrennung des murinen Pankreas gemacht und mit Hilfe dieser Methode konnten suffizient pankreatische Stellatumzellen, also Zellen die dem Stroma angehören, isoliert werden. Eine wissenschaftliche Evidenz, ob mithilfe der Nycodenz-Methode MSC aus dem murinen Pankreas isoliert werden können, gibt es nicht.

Aufgrund der sehr geringen Zellzahlen, die mit Hilfe der Nycodenz-Methode generiert wurden, und dem möglichen Heraussortieren der MSC-Population aus den über die Dichtezentrifugation isolierten Zellen, zeigte sich dieser Ansatz als nicht vielversprechend. Daher wurde nach Literaturrecherche eine Umstellung des Versuches durchgeführt und hierbei auf eine neue Methode zur Zellisolation gewechselt<sup>45,101,102</sup>. Gemein haben diese Studien alle, dass hierbei keine Dichtezentrifugation zur Isolation der MSC durchgeführt wurde. Ebenfalls haben diese Studien den Schritt der direkten Zellkultur nach der Gewebsgewinnung gemeinsam, ohne eine direkt durchgeführte Sortierung der Zellen nach Oberflächenmarkern. Demnach handelt es sich bei den gewonnenen Daten um Ergebnisse nach in vitro Kultivierung der Zellen. Die anschließende Verifizierung des Status als MSC erfolgt über und nach der Zellkultur.

Die neue Methode ist stark angelehnt an die Gewebsgewinnungsmethode von Crisan et al.<sup>31</sup> Anhand dieser Methode ist eine deutlich höhere Zellausbeute im Vergleich zur Nycodenz-Dichtezentrifugation generierbar gewesen. Allerdings bestehen hier ebenfalls gewisse Unterschiede. Das Ursprungsgewebe beider Versuche unterscheidet sich von humanen Gewebeproben bei Crisan et al. im Vergleich zu murinen Proben. Bei Crisan et al. wurden drei Oberflächenmarker zur negativen Selektion verwendet. Zu diesen Oberflächenmarkern zählen CD45, CD34 und CD56. CD34 sollte hierbei die Kontamination der primär perizytären Population durch Endothelzellen verhindern. CD56 sollte die Kontamination durch Myozyten vermeiden. Je mehr Oberflächenmarker zur Sortierung verwendet werden, desto sicherer kann man die Population als eine spezifische Zellpopulation eingrenzen. Allerdings schließt man hierbei weitere Zellen aus. Gerade der Oberflächenmarker CD34 ist umstritten, ob dieser als ein sicheres Ausschlusskriterium für das Vorhandensein von MSCs gilt<sup>34-36</sup>. Dieser Marker scheint auf verschiedenen Typen von Progenitorzellen zu finden zu sein<sup>108</sup>. Hierzu zählen zum Beispiel hämatopoetische Stammzellen, mesenchymale Stammzellen, epitheliale Progenitorzellen und Endothelzellen. Dieses Thema wird ebenfalls in einem neuen

Positionspapier des ISCT von 2019 erfasst und CD34 als möglicher positiver Marker für MSC festgestellt <sup>109</sup>. Bellagamba et al. vermuteten sogar eine höhere CD34-Expression für Zellen in vivo im Vergleich zu in vitro kultivierten Zellen <sup>110</sup>. Das ISCT vermutet, dass nach den Ergebnissen von Simmons et al. die negative Expression von MSC bezogen auf CD34 an der Plastikadhärenz in der Zellkultur liegen kann <sup>35,109</sup>. Grundsätzlich erscheinen hierbei beide Varianten sinnvoll zur möglichen Isolation von MSC. Sowohl mit CD34 als negativem Marker, als auch ohne diesen, scheint es möglich zu sein eine MSC-Population zu isolieren. Letztendlich war bei Crisan et al. allerdings das Ziel, Perizyten zu isolieren, die nach ihren Ergebnissen CD34 negativ sind<sup>31</sup>. Im diesem Rahmen bleibt es fraglich, ob zur suffizienten MSC-Isolation weitere Marker verwendet werden sollten.

Wenn auch nicht im biologischen Triplikate nachgewiesen, so scheint die Isolationsmethode mittels GentleMACS ein deutlicher Fortschritt im Vergleich zur Gewebsauftrennung nach der neuen Methode zu sein und ist für weitere Versuche definitiv in Betracht zu ziehen. Mit Hilfe des GentleMACS Spleen Dissociation Kits, war es möglich, mit jeweils nur zwei Mauspankreaten, ausreichend Zellen zu isolieren um anschließend genügend RNA für eine mRNA-Sequenzierung zu gewinnen. Mit der neuen Methode ist dies zwar ebenfalls möglich, allerdings wird hierfür die vierfache Menge an murinen Pankreaten benötigt, um eine ausreichende RNA-Menge in der CD146+/CD45- Fraktion zu generieren. Dies bietet ein deutliches Optimierungspotential. Im Hinblick auf die Sequenzierung scheint die Gewebsdissoziation mittels GentleMACS die weiteren Ergebnisse nicht zu beeinflussen. Ob das auch die Zellkultur betrifft, bleibt in weiteren Versuchen zu bestätigen. Auffällig ist jedoch ein höherer prozentualer Anteil an abgestorbenen Zellen, der im FACS detektiert wurde. Das spricht für eine höhere Belastung der Zellen bei der Isolation mittels GentleMACS.

## **5.2. Zellkultur**

Die Ergebnisse der Zellkultur sind schwierig einzuordnen. Auf der einen Seite erfüllen die CD146+/CD45- Population die Charakteristiken der Morphologie und des Plastikadhärenten Wachstums für MSC. Auf der anderen Seite ist ihr Wachstumsverhalten nicht einhergehend mit den gängigen Annahmen für MSC<sup>33</sup>. Die beschriebenen fischzugartigen Muster bei Konfluenz, waren in den CD146+/CD45- Populationen kaum nachzuvollziehen, da diese nur sporadisch größere Kolonien formten. Im Vergleich hierzu zeigte die CD146-/CD45- Population alle Kriterien des adhärennten Wachstums für MSC und bildeten fischzugartige Muster bei Konfluenz. Diese ließen sich ebenfalls mehrfach passagieren. Allerdings sollte nicht allein an der

Optik der Zellen in der Kultur festgestellt werden ob es sich um MSC handelt <sup>33</sup>. Differenzierungsversuche konnten aufgrund der geringen Zellzahlen in der Zielfraktion nicht durchgeführt werden, sodass das Differenzierungspotential der Zellen weder bestätigt noch negiert werden kann. Hierfür könnte erneut das GentleMACS-System in weiteren Versuchen Optimierungspotential bieten. Sollten nach der Isolation im GentleMACS-System und nach der Durchflusszytometrie die Zellen kultiviert werden, ist aufgrund der höheren Zellzahl die Wahrscheinlichkeit für ein plastikadhärentes Wachstum deutlich höher. Eventuell wäre dadurch möglich direkt nach der Durchflusszytometrie die Zellen in Differenzierungsmedium zu geben, um ihr Differenzierungspotential zu evaluieren.

Interessanterweise zeigten die CD146-/CD45- sortierten Populationen eine in vitro Differenzierung im Bereich des Oberflächenmarkers CD146, welcher nach Zellkultur exprimiert wurde. Dies könnte suggerieren, dass CD146 als positiver Marker für Zellen mit MSC-Potential sich erst in der adhärennten Zellkultur bildet. Mögliche Veränderungen durch die Zellkultur bei MSC wurden bereits angedeutet (Kapitel 5.1.)<sup>109</sup>. Umso wichtiger sollte es sein, MSC zu generieren die am ehesten dem in vivo Status entsprechen.

Im Bereich der CD146+/CD45+ Populationen zeigten sich ebenfalls vereinzelt Zellen mit bipolaren Ausläufern und fraglichem fibroblastoider Morphologie. Aufgrund von nahezu nicht nachvollziehbaren Zellteilung und keiner Bildung von Kolonien, wird hierbei nicht von mesenchymalen Stromazellen ausgegangen.

### **5.3. mRNA-Sequenzierung**

Neben den Eigenschaften in der Zellkultur sind ebenfalls die Präsentation von Oberflächenmarkern und das Gensignaturprofil relevant zur Klassifizierung von Zellen als MSC <sup>20,109</sup>. Hierfür erfolgte die Untersuchung der Zellen mittels mRNA-Sequenzierung. Die mRNA-Sequenzierung ermöglicht eine Aufteilung in die verschiedenen Subpopulationen. Vor allem eine klare Abgrenzung zu der pp-Zellfraktion und der WTnn-Population ist möglich. Bei der genauen Differenzierung zwischen der nn-Population und der pn-Population ist die Aufteilung und die Konsistenz der Population untereinander inhomogen. Eine Ursache hierfür kann die ungenaue Auftrennung anhand CD146 im FACS sein, wohingegen eine eindeutige und sichere Trennung der Populationen im Bereich CD45+ zu CD45- möglich war. Der Übergang und Grenzwert von CD146- zu CD146+ war unscharf und eine genaue Auftrennung dementsprechend erschwert. Aufgrund der unscharfen Auftrennung in positiv und negativ mittels CD146 allein, wäre es sinnvoll einen zweiten positiven Oberflächenmarker in die Sortierung mittels FACS einzubeziehen. Hierbei wäre zum Beispiel CD105 ein passender

Oberflächenmarker. Dieser wird zwar in beiden Populationen exprimiert, zeigt aber eine deutlich stärkere Expression in der CD146+ Population. Endoglin (CD105) gilt ebenfalls als positiver Oberflächenmarker für MSC.

Der nächste Versuch anhand der RNA-Sequenzierung den MSC-Status zu überprüfen erfolgte mit Hilfe von Signaturgenen. Mit dieser Methode können Gene und ihr Expressionsniveau mittels, in dieser Arbeit den FPKM, gemessen werden. Anhand eines Expressionslevels, sicher sagen zu können ob ein Gen wirklich exprimiert wird oder nicht, ist nicht möglich. Jedoch ist es, je größer der FPKM-Wert ist, umso wahrscheinlicher, dass eine Expression stattfindet. Mit Hilfe des über die Durchflusszytometrie gesicherten Vorhandenseins des Oberflächenmarkers CD146, wurde der niedrigste bestimmte Durchschnittswert als Grenzwert für das Vorhandensein oder nicht Vorhandensein von Genen gewertet. Der Wert lag bei einem FPKM von 1,797 für CD146 in der CD146+/CD45+ Population. Dieser gewählte Wert ist kritisch zu hinterfragen. Ob in dem Wertebereich zwischen dem gewähltem Grenzwert und dem höchstem gesichertem Wert für eine nicht vorhandene Expression, 0,143 FPKM für CD146 bei den NN-Populationen und 0,638 FPKM für CD45 bei den PN-Populationen, Gene exprimiert werden oder nicht, kann nicht sicher beurteilt werden. Zusätzlich ist eine Verallgemeinerung der Grenzwerte für CD146 auf alle untersuchten Gene möglich, aber nicht gesichert, sodass hierbei auch der Grenzwert bei anderen Genen in beide Richtungen verschoben sein könnten. Dennoch lässt sich ein grobes Bild der Oberflächenexpression mit Hilfe des gewählten Grenzwertes vermuten. Zur biologischen Sicherung des Vorhandenseins oder nicht Vorhandenseins anderer Oberflächenmarker oder Gene, müssten diese entweder durch die Durchflusszytometrie oder aber durch PCR-Analysen bestätigt werden. Aufgrund des geringen biologischen Materials in der Zielfraktion wurde auf diese Untersuchungen vorerst verzichtet. Anhand der Signaturgene konnte die Zellzugehörigkeit zu einer MSC-Population nicht gesichert werden.

#### **5.4. Isolation pankreatischer mesenchymaler Stromazellen**

Mit den Gesamtergebnissen der durchgeführten Experimente kann der Status der CD146+/CD45- Zellfraktion nicht sicher als mesenchymale Stammzellen bestätigt werden. Hierfür fehlt die Verifizierung des Differenzierungspotentials mittels Differenzierungsversuchen. Dennoch deuten viele der gewonnen Ergebnisse darauf hin, dass es sich um eine pankreatische mesenchymale Stromazellpopulation handeln könnte. Die minimalen Kriterien des ISCT geben eindeutig vor, welche Eigenschaften eine Zelle besitzen muss, um als mesenchymale Stammzelle bezeichnet zu werden.

Diese Kriterien bestehen aus plastikadhärentem Wachstum, der Expression spezifischer Oberflächenantigene und dem Differenzierungspotential in Osteoblasten, Chondroblasten oder Adipozyten<sup>33</sup>. Die entsprechenden positiven Oberflächenmarker sind CD105, CD90 und CD73. Die entsprechenden negativen Oberflächenmarker sind CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 und HLA-II.

In den durchgeführten Experimenten zeigte sich die CD146+/CD45- Zielfraktion im Wachstum plastikadhärent. In der Untersuchung der Oberflächenmarker via mRNA-Sequenzierung, zeigten sich sowohl CD105 und CD90 als positiv in ihren Genexpressionsprofilen. CD73 hingegen scheint negativ zu sein. Bezogen auf die Negativen Oberflächenmarker, trifft die Einteilung ebenfalls weitestgehend zu. Ausnahmen sind CD14 und CD34. Über die ambivalente Bedeutung von CD34 wurde bereits ausführlich gesprochen. Differenzierungsversuche wurden aufgrund der geringen Zellzahlen nicht durchgeführt. Zusammenfassend wurde der Status einer mesenchymalen Stammzellpopulation nach den Kriterien ISCT für keine der isolierten Populationen bestätigt.

Dennoch ist es möglich, dass es sich bei der CD146+/CD45- Zellfraktion zumindest um pankreatische mesenchymale Stromazellpopulation handelt, die das Potential besitzt, sich in andere Zelltypen zu differenzieren. Nicht auszuschließen ist eine unreine Population in der CD146+/CD45- Zielfraktion. Das suggerieren sowohl die Untersuchungen auf Signaturgene, die Untersuchung via xCell und die GSEA. Es bestehen starke Hinweise darauf, dass sich Zellen endothelialen und hämatopoetischen Ursprungs in der Zielfraktion befinden. Das keine sichere Zuordnung zu MSC in den beiden Enrichment-Analysen erfolgte, liegt am ehesten an der Verunreinigung der Population mittels Endothelzellen, die rein von ihrer Menge den größten Teil der Population bilden sollten, zum anderen daran, dass es bei der GSEA kein spezifisches Profil für MSC gab.

Interessanterweise zeigen sowohl die initial negativ/negative Population, als auch ihre kultivierte Population, in den meisten Untersuchungen nahezu ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die Oberflächenmarkerexpression oder auf den Zelltypus. Hierbei handelt es sich am ehesten um vor allem stromale/fibroblastoide Zellen. Zusätzlich ist bei den kultivierten negativen Zellen im Verlauf durch die Zellkultur eine erfolgreiche Bereinigung der Kultur von hämatopoetischen Zellen als auch von Zellen endothelialen Ursprungs erfolgt. Besonders interessant ist hierbei der Effekt der veränderten Oberflächenexpression von CD146 bei den negativ/negativen Populationen aus der Zellkultur. Das könnte auf ein gewisses Differenzierungspotential hinweisen, oder aber für eine Veränderung der Population durch Plastikadhärentes Wachstum sprechen.

Insgesamt besteht am gesamten Versuchsaufbau sowie an der Methode weiterhin Optimierungspotential. Es sollte eine Wiederholung der Zellkulturversuche mittels GentleMACS erfolgen, um höhere Zellkulturzahlen zu generieren und mit den isolierten Populationen Differenzierungsversuche durchführen zu können. Diese sollten sowohl in der CD146+/CD45- negativen Zellfraktion durchgeführt werden, als auch in der CD146-/CD45- Zellfraktion. Sollten sich die Zellen hierbei differenzieren, so ist sehr stark von dem Bestehen einer mesenchymalen Stammzellpopulation auszugehen. Sollte dies möglich sein, kann man das Experiment auf genetisch veränderte Mausmodelle übertragen.

Sollten die Differenzierungsversuche nicht durchführbar sein, so sollte die Sortierungsstrategie mittels FACS eventuell um weitere positive und negative Oberflächenmarker erweitert werden. Hiermit sollte es möglich sein, eine saubere MSC-Population zu generieren.

## 6. Zusammenfassung

Die 5 Jahres-Überlebensrate des PDAC in Deutschland liegt bei 9%<sup>2</sup>. 90% des Tumorgewebes können hierbei aus Extrazellulärmatrix und stromalen Komponenten bestehen<sup>3</sup>. Dies gehört zur Tumormicroenvironment. Wichtiger Bestandteil des Tumormicroenvironment sind Cancer-associated fibroblasts (CAF). Diese haben ihren Ursprung in Stellatumzellen (PSC), Fibroblasten, Adipozyten, Endothelzellen, Perizyten und aus mesenchymalen Stammzellen<sup>10-15</sup>. Die MSC aus dem Pankreaskarzinom fördern das Wachstum des Tumors, die Invasion in das umliegende Gewebe und die Metastasierung<sup>18</sup>. Um den Einfluss von MSC auf das PDAC weiter untersuchen zu können, wurde versucht eine Methode zu entwickeln, um MSC aus dem murinen Pankreas zu isolieren. Sollte die Methode Erfolg haben, wäre es möglich den Aufbau des Experimentes auf genetisch veränderte Mausmodelle zu übertragen.

Zur Isolation der Zellen wurde eine Gewebesauftrennung mit anschließender Zellsortierung mittels FACS, anhand der Oberflächenmarker CD146 und CD45 geplant. CD146 ist in mehreren Arbeiten als potentieller Oberflächenmarker für MSC aus unterschiedlichen Geweben festgestellt worden<sup>94</sup>.

Initial erfolgte die Gewebdissoziation mit Hilfe der Nycodenz-Dichtezentrifugation. Da die hierbei generierten Zellzahlen und auch die Ergebnisse in der Zellkultur, nicht ausreichend für weitere Versuche waren, erfolgte die Umstellung der Methode. Mit Hilfe der neuen Methode konnten suffizient höhere Zellzahlen generiert werden und somit ausreichend biologisches Material für Versuche in der Zellkultur und eine mRNA-Sequenzierung isoliert werden. In der Zellkultur gelang es die CD146+/CD45-Zielfraktion zu kultivieren, jedoch nicht zu passagieren. Demnach war keine Expansion für weitere Versuche in der Zellkultur möglich. Bei der CD146-/CD45- Fraktion erfolgte dies komplikationslos. Von der optischen Morphologie, entsprachen sowohl die Zielfraktion als auch die Vergleichsgruppe der Optik von Stromazellen und von möglichen MSC. Da unerwarteterweise die CD146-/CD45- Fraktion ausgesprochen gut wuchs, dem MSC-Phänotyp entsprach und häufig Zellen nach Kulturbedingungen auf MSC-Status untersucht werden<sup>28,39-41</sup>, erfolgte eine Re-Sortierung der Zellen mittels FACS. Überraschenderweise zeigte sich eine nun nahezu vollständig CD146+/CD45-Population. Diese Änderung der Oberflächenmarkerexpression wurde am ehesten als eine durch die Zellkultur induzierte Veränderung der Oberflächenmarker gewertet, könnte aber auch ein Anzeichen für eine Differenzierung der Zellen sein.

Anschließend erfolgte die mRNA-Sequenzierung der mit der neuen Methode isolierten Proben sowie exemplarisch der Proben, die mittels GentleMACS-System aus genetisch veränderten Mausmodellen isoliert wurden. Hierbei zeigte sich vor allem in der Principal

Component Analyse eine gute Aufteilung der Zellpopulationen in die verschiedenen Subpopulationen. In der Genexpressionsheatmap und in der Pearson-Correlation ist die Aufteilung in Subpopulation möglich, aber deutlich schwieriger. Vor allem im Bereich der CD146+/CD45- Populationen und der CD146-/CD45- Populationen ist diese Auftrennung unscharf. Dies spricht zum einen dafür, dass die Auftrennung anhand des Markers CD146 in saubere Populationen erschwert ist, zum anderen dafür, dass es sich um ähnliche Zellpopulationen handeln könnte.

Im Versuch mit Hilfe der Daten der RNA-Sequenzierung der Zielpopulation dem MSC-Status zuzuordnen, erfolgte der Vergleich der Genexpression von typischen MSC-Genen nach unterschiedlichen Studien<sup>4,33,103</sup>. Hierbei erfolgte nicht nur der Vergleich mit typischen Genen von MSC, sondern auch von typischen pankreatischen Stromazellen. Hierbei zeigte die Zielfraktion eine hohe, aber nicht komplette Übereinstimmung mit den typischen Signaturgenen von MSC. Interessanterweise zeigen sowohl die CD146-/CD45- Population als auch die WTnn-Population ein sehr ähnliches Expressionsprofil wie die Zielfraktion und zeigten ebenfalls eine hohe aber nicht komplette Übereinstimmung mit den Signaturgenen der MSC. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass es möglich ist aus den kultivierten Zellen MSC zu isolieren.

Anhand der durchgeführten Enrichment Analysen ließ sich ebenfalls nicht sicher der Zelltypus der einzelnen Fraktionen bestimmen, aber dennoch gut eingrenzen und gab einen Anhalt um welche Zelltypen es sich vermutlich handelte. Die Zielfraktion konnte man sowohl dem Status von hämatopoetischen Stammzellen als auch im Vergleich zu den anderen stromalen Populationen vor allem dem Status von Endothelzellen zuordnen. Im Vergleich zu den CD146+/CD45+ Zellpopulationen, zeigte sich eine sehr starke Anreicherung im Bereich von stromalen Zellen. Aufgrund der Ergebnisse wird vermutet, dass es sich um eine Mischpopulation, bestehend aus vor allem Endothelzellen, handelt, die aber ebenfalls MSC enthalten kann. Eine signifikante Anreicherung für ein MSC-Profil, konnte nur in der Population nn1 erzielt werden. Die CD146-/CD45- Zellpopulationen bestehen am ehesten aus pankreatischen Fibroblasten. Die Zellen der kultivierten CD146-/CD45- Zellpopulationen bestehen ebenfalls vorrangig aus Fibroblasten. Bei den CD45+ Zellfraktionen handelt es sich wie zu erwarten um Zellen lymphoiden Ursprunges, am ehesten um Makrophagen und dendritische Zellen.

Grundsätzlich konnte der MSC-Status der CD146+/CD45- Populationen nicht bestätigt werden. Die zur Definition als MSC von dem ISCT gestellten Kriterien werden nur teilweise erfüllt<sup>33</sup>. Dennoch ist es nicht sicher ausgeschlossen, dass es sich bei der isolierten Population um derartige Zellen handelt, da aufgrund des schlechten Wachstums in der Zellkultur keine Differenzierungsversuche durchgeführt werden

konnten. Solange dies nicht bestätigt ist, wird von die CD146+/CD45- Population als Mischpopulation aus Endothelzellen und pankreatischen mesenchymalen Stromazellen bezeichnet.

Mit weiteren Optimierungen der Zellzahlen für die Zellkultur, zum Beispiel Anhand von Auftrennung des Gewebes mittels GentleMACS, könnten im Verlauf Differenzierungsversuche durchgeführt werden.

Um eine sauberere Population zu erhalten, könnte man in möglichen Folgeversuchen die Oberflächenmarker zur Zellsortierung mittels FACS um weitere positive oder negative Marker erweitern.

Sollten die Differenzierungsversuche suffizient sein, könnte man den Versuchsaufbau auf genetisch veränderte Mausmodelle übertragen. Hierbei könnte man sowohl das Expressionsprofil CD146+/CD45- Zellen von Wildtypmäusen mit dem von Mäusen mit dem Pankreaskarzinomen vergleichen. Dadurch könnte der genauere Einfluss von MSC auf das Tumormicroenvironment untersucht werden und der Einfluss von MSC auf das Wachstum des PDAC.

## 7. Literaturverzeichnis

- 1 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA A Cancer J Clin*. 2020;70(1):7-30. doi:10.3322/caac.21590.
- 2 Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland | 2015/2016.
- 3 Kleeff J, Korc M, Apte M, et al. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16022. doi:10.1038/nrdp.2016.22.
- 4 Sunami Y, Häußler J, Kleeff J. Cellular Heterogeneity of Pancreatic Stellate Cells, Mesenchymal Stem Cells, and Cancer-Associated Fibroblasts in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(12). doi:10.3390/cancers12123770.
- 5 Sunami Y, Rebelo A, Kleeff J. Lipid Metabolism and Lipid Droplets in Pancreatic Cancer and Stellate Cells. *Cancers (Basel)*. 2017;10(1). doi:10.3390/cancers10010003.
- 6 Özdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, et al. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell*. 2014;25(6):719-734. doi:10.1016/j.ccr.2014.04.005.
- 7 Yauch RL, Gould SE, Scales SJ, et al. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature*. 2008;455(7211):406-410. doi:10.1038/nature07275.
- 8 Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science (New York, N.Y.)*. 2009;324(5933):1457-1461. doi:10.1126/science.1171362.
- 9 Pereira BA, Vennin C, Papanicolaou M, et al. CAF Subpopulations: A New Reservoir of Stromal Targets in Pancreatic Cancer. *Trends Cancer*. 2019;5(11):724-741. doi:10.1016/j.trecan.2019.09.010.
- 10 Sun Q, Zhang B, Hu Q, et al. The impact of cancer-associated fibroblasts on major hallmarks of pancreatic cancer. *Theranostics*. 2018;8(18):5072-5087. doi:10.7150/thno.26546.
- 11 Erkan M, Adler G, Apte MV, et al. StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut*. 2012;61(2):172-178. doi:10.1136/gutjnl-2011-301220.
- 12 Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Ragulan C, et al. Inter- and intra-tumoural heterogeneity in cancer-associated fibroblasts of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Pathol*. 2019;248(1):51-65. doi:10.1002/path.5224.
- 13 Biffi G, Tuveson DA. Diversity and Biology of Cancer-Associated Fibroblasts. *Physiol Rev*. 2021;101(1):147-176. doi:10.1152/physrev.00048.2019.
- 14 Huang X, He C, Hua X, et al. Oxidative stress induces monocyte-to-myofibroblast transdifferentiation through p38 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Transl Med*. 2020;10(2):e41. doi:10.1002/ctm2.41.
- 15 Miyazaki Y, Oda T, Mori N, Kida YS. Adipose-derived mesenchymal stem cells differentiate into pancreatic cancer-associated fibroblasts in vitro. *FEBS Open Bio*. 2020;10(11):2268-2281. doi:10.1002/2211-5463.12976.
- 16 Quante M, Tu SP, Tomita H, et al. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell*. 2011;19(2):257-272. doi:10.1016/j.ccr.2011.01.020.
- 17 Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007;449(7162):557-563. doi:10.1038/nature06188.
- 18 Waghray M, Yalamanchili M, Dziubinski M, et al. GM-CSF Mediates Mesenchymal-Epithelial Cross-talk in Pancreatic Cancer. *Cancer Discov*. 2016;6(8):886-899. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0947.
- 19 Strong AL, Pei DT, Hurst CG, Gimble JM, Burow ME, Bunnell BA. Obesity Enhances the Conversion of Adipose-Derived Stromal/Stem Cells into Carcinoma-

- Associated Fibroblast Leading to Cancer Cell Proliferation and Progression to an Invasive Phenotype. *Stem Cells Int.* 2017;2017:9216502. doi:10.1155/2017/9216502.
- 20 Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7(5):393-395. doi:10.1080/14653240500319234.
  - 21 Krampera M, Galipeau J, Shi Y, Tarte K, Sensebe L. Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy.* 2013;15(9):1054-1061. doi:10.1016/j.jcyt.2013.02.010.
  - 22 Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976;4(5):267-274. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/976387/>.
  - 23 Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641-650. doi:10.1002/jor.1100090504.
  - 24 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.).* 1999;284(5411):143-147. doi:10.1126/science.284.5411.143.
  - 25 Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells.* 2004;22(4):625-634. doi:10.1634/stemcells.22-4-625.
  - 26 Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology.* 2000;109(1):235-242. doi:10.1046/j.1365-2141.2000.01986.x.
  - 27 Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2001;7(11):581-588. doi:10.1053/bbmt.2001.v7.pm11760145.
  - 28 Wagner W, Wein F, Seckinger A, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 2005;33(11):1402-1416. doi:10.1016/j.exphem.2005.07.003.
  - 29 Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-228. doi:10.1089/107632701300062859.
  - 30 HAUNER H, SCHMID P, PFEIFFER EF. Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 1987;64(4):832-835. doi:10.1210/jcem-64-4-832.
  - 31 Crisan M, Yap S, Castella L, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 2008;3(3):301-313. doi:10.1016/j.stem.2008.07.003.
  - 32 Da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science.* 2006;119(Pt 11):2204-2213. doi:10.1242/jcs.02932.
  - 33 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905.
  - 34 Lin C-S, Ning H, Lin G, Lue TF. Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells? *Cytotherapy.* 2012;14(10):1159-1163. doi:10.3109/14653249.2012.729817.
  - 35 Simmons PJ, Torok-Storb B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood.* 1991;78(11):2848-2853. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1720038/>.

- 36 Kaiser S, Hackanson B, Follo M, et al. BM cells giving rise to MSC in culture have a heterogeneous CD34 and CD45 phenotype. *Cytotherapy*. 2007;9(5):439-450. doi:10.1080/14653240701358445.
- 37 Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(1):204. doi:10.1186/ar2116.
- 38 Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*. 1991;78(1):55-62. doi:10.1182/blood.V78.1.55.55.
- 39 Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant*. 1995;16(4):557-564.
- 40 Rotter N, Oder J, Schlenke P, et al. Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands. *Stem Cells Dev*. 2008;17(3):509-518. doi:10.1089/scd.2007.0180.
- 41 Gopurappilly R, Bhat V, Bhonde R. Pancreatic tissue resident mesenchymal stromal cell (MSC)-like cells as a source of in vitro islet neogenesis. *J Cell Biochem*. 2013;114(10):2240-2247. doi:10.1002/jcb.24572.
- 42 Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: Effects of dexamethasone and IL-1 $\alpha$ . *J. Cell. Physiol*. 1996;166(3):585-592. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199603)166:3<585:AID-JCP13>3.0.CO;2-6.
- 43 Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1998;16(2):155-162. doi:10.1002/jor.1100160202.
- 44 Owen M, Friedenstein AJ. Stromal Stem Cells: Marrow-Derived Osteogenic Precursors. In: Evered D, Harnett S, eds. *Ciba Foundation Symposium 136 - Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissues*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2007:42-60.
- 45 Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol*. 2008;36(5):642-654. doi:10.1016/j.exphem.2007.12.015.
- 46 Tang D-Q, Wang Q, Burkhardt BR, Litherland SA, Atkinson MA, Yang L-J. In vitro generation of functional insulin-producing cells from human bone marrow-derived stem cells, but long-term culture running risk of malignant transformation. *American journal of stem cells*. 2012;1(2):114-127. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22833839/>. Published April 28, 2012.
- 47 Gabr MM, Zakaria MM, Refaie AF, et al. Insulin-producing cells from adult human bone marrow mesenchymal stem cells control streptozotocin-induced diabetes in nude mice. *Cell Transplant*. 2013;22(1):133-145. doi:10.3727/096368912X647162.
- 48 Phadnis SM, Joglekar MV, Dalvi MP, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal cells differentiate and mature into endocrine pancreatic lineage in vivo. *Cytotherapy*. 2011;13(3):279-293. doi:10.3109/14653249.2010.523108.
- 49 Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep*. 2015;35(2). doi:10.1042/BSR20150025.
- 50 Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol*. 2004;32(5):414-425. doi:10.1016/j.exphem.2004.02.004.
- 51 Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2000;28(8):875-884. doi:10.1016/S0301-472X(00)00482-3.
- 52 Prockop DJ, Sekiya I, Colter DC. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. *Cytotherapy*. 2001;3(5):393-396. doi:10.1080/146532401753277229.

- 53 Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *British Journal of Haematology*. 1997;97(3):561-570. doi:10.1046/j.1365-2141.1997.902904.x.
- 54 Javazon EH, Colter DC, Schwarz EJ, Prockop DJ. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells*. 2001;19(3):219-225. doi:10.1634/stemcells.19-3-219.
- 55 Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Cui J-G, Prockop DJ. Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). *J Bone Miner Res*. 2004;19(2):256-264. doi:10.1359/JBMR.0301220.
- 56 Pontikoglou C, Deschaseaux F, Sensebé L, Papadaki HA. Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cell Rev and Rep*. 2011;7(3):569-589. doi:10.1007/s12015-011-9228-8.
- 57 Furness SGB, McNagny K. Beyond Mere Markers: Functions for CD34 Family of Sialomucins in Hematopoiesis. *IR*. 2006;34(1):13-32. doi:10.1385/IR:34:1:13.
- 58 Lehmann JM, Holzmann B, Breitbart EW, Schmiegelow P, Riethmüller G, Johnson JP. Discrimination between benign and malignant cells of melanocytic lineage by two novel antigens, a glycoprotein with a molecular weight of 113,000 and a protein with a molecular weight of 76,000. *Cancer research*. 1987;47(3):841-845. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3542195/>.
- 59 Lehmann JM, Riethmüller G, Johnson JP. MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(24):9891-9895. doi:10.1073/pnas.86.24.9891.
- 60 Johnson JP, Rothbacher U, Sers C. The progression associated antigen MUC18: a unique member of the immunoglobulin supergene family. *Melanoma research*. 1993;3(5):337-340. doi:10.1097/00008390-199310000-00006.
- 61 Johnson JP, Rummel MM, Rothbacher U, Sers C. MUC18: A Cell Adhesion Molecule with a Potential Role in Tumor Growth and Tumor Cell Dissemination. In: Compans RW, Cooper M, Koprowski H, et al., eds. *Attempts to Understand Metastasis Formation I*. 213/1. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1996:95-105.
- 62 Sers C, Riethmüller G, Johnson JP. MUC18, a melanoma-progression associated molecule, and its potential role in tumor vascularization and hematogenous spread. *Cancer research*. 1994;54(21):5689-5694. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7923217/>.
- 63 Kuske MD, Johnson JP. Assignment of the human melanoma cell adhesion molecule gene (MCAM) to chromosome 11 band q23.3 by radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet*. 1999;87(3-4):258. doi:10.1159/000015439.
- 64 Yang H, Wang S-W, Liu Z, et al. Isolation and characterization of mouse MUC18 cDNA gene, and correlation of MUC18 expression in mouse melanoma cell lines with metastatic ability. *Gene*. 2001;265(1-2):133-145. doi:10.1016/s0378-1119(01)00349-3.
- 65 Wang Z, Yan X. CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion. *Cancer Lett*. 2013;330(2):150-162. doi:10.1016/j.canlet.2012.11.049.
- 66 Kohama K, Tsukamoto Y, Furuya M, et al. Molecular cloning and analysis of the mouse gicerin gene. *Neurochem Int*. 2005;46(6):465-470. doi:10.1016/j.neuint.2004.12.006.
- 67 Bardin N, Francès V, Combes V, Sampol J, Dignat-George F. CD146: biosynthesis and production of a soluble form in human cultured endothelial cells. *FEBS Letters*. 1998;421(1):12-14. doi:10.1016/S0014-5793(97)01455-5.
- 68 Jean D, Gershenwald JE, Huang S, et al. Loss of AP-2 results in up-regulation of MCAM/MUC18 and an increase in tumor growth and metastasis of human melanoma cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(26):16501-16508. doi:10.1074/jbc.273.26.16501.

- 69 Mintz-Weber CS, Johnson JP. Identification of the elements regulating the expression of the cell adhesion molecule MCAM/MUC18. Loss of AP-2 is not required for MCAM expression in melanoma cell lines. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(44):34672-34680. doi:10.1074/jbc.M003812200.
- 70 Sweeney MD, Ayyadurai S, Zlokovic BV. Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat Neurosci*. 2016;19(6):771-783. doi:10.1038/nn.4288.
- 71 Middleton J, Americh L, Gayon R, et al. A comparative study of endothelial cell markers expressed in chronically inflamed human tissues: MECA-79, Duffy antigen receptor for chemokines, von Willebrand factor, CD31, CD34, CD105 and CD146. *J. Pathol*. 2005;206(3):260-268. doi:10.1002/path.1788.
- 72 Li Q, Yu Y, Bischoff J, Mulliken JB, Olsen BR. Differential expression of CD146 in tissues and endothelial cells derived from infantile haemangioma and normal human skin. *J. Pathol*. 2003;201(2):296-302. doi:10.1002/path.1443.
- 73 Bardin N, George F, Mutin M, et al. S-Endo 1, a pan-endothelial monoclonal antibody recognizing a novel human endothelial antigen. *Tissue Antigens*. 1996;48(5):531-539. doi:10.1111/j.1399-0039.1996.tb02666.x.
- 74 So J-H, Hong S-K, Kim H-T, et al. Gicerin/Cd146 is involved in zebrafish cardiovascular development and tumor angiogenesis. *Genes Cells*. 2010;15(11):1099-1110. doi:10.1111/j.1365-2443.2010.01448.x.
- 75 Chan B, Sinha S, Cho D, Ramchandran R, Sukhatme VP. Critical roles of CD146 in zebrafish vascular development. *Dev. Dyn*. 2005;232(1):232-244. doi:10.1002/dvdy.20220.
- 76 Elshal MF, Khan SS, Takahashi Y, Solomon MA, McCoy JP. CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood. *Blood*. 2005;106(8):2923-2924. doi:10.1182/blood-2005-06-2307.
- 77 Imbert A-M, Garulli C, Choquet E, Koubi M, Aurrand-Lions M, Chabannon C. CD146 expression in human breast cancer cell lines induces phenotypic and functional changes observed in Epithelial to Mesenchymal Transition. *PLoS One*. 2012;7(8):e43752. doi:10.1371/journal.pone.0043752.
- 78 Cavazzini F, Campioni D, Ferrari L, et al. Expression of the immunoglobulin superfamily cell membrane adhesion molecule Cd146 in acute leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016;90(3):247-256. doi:10.1002/cyto.b.21267.
- 79 Wragg JW, Finnity JP, Anderson JA, et al. MCAM and LAMA4 Are Highly Enriched in Tumor Blood Vessels of Renal Cell Carcinoma and Predict Patient Outcome. *Cancer research*. 2016;76(8):2314-2326. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1364.
- 80 Minato H, Kurose N, Fukushima M, et al. Comparative immunohistochemical analysis of IMP3, GLUT1, EMA, CD146, and desmin for distinguishing malignant mesothelioma from reactive mesothelial cells. *American Journal of Clinical Pathology*. 2014;141(1):85-93. doi:10.1309/AJCP5KNL7QTELLYI.
- 81 Kristiansen G, Yu Y, Schlüns K, Sers C, Dietel M, Petersen I. Expression of the cell adhesion molecule CD146/MCAM in non-small cell lung cancer. *Analytical Cellular Pathology*. 2003;25(2):77-81. doi:10.1155/2003/574829.
- 82 Sato A, Torii I, Okamura Y, et al. Immunocytochemistry of CD146 is useful to discriminate between malignant pleural mesothelioma and reactive mesothelium. *Mod Pathol*. 2010;23(11):1458-1466. doi:10.1038/modpathol.2010.134.
- 83 Zabouo G, Imbert A-M, Jacquemier J, et al. CD146 expression is associated with a poor prognosis in human breast tumors and with enhanced motility in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res*. 2009;11(1):R1. doi:10.1186/bcr2215.
- 84 Wu G-J, FU P, CHIANG C-F, HUSS WJ, GREENBERG NM, Wu M-WH. Increased expression of MUC18 correlates with the metastatic progression of mouse prostate adenocarcinoma in the TRAMP model. *Journal of Urology*. 2005;173(5):1778-1783. doi:10.1097/01.ju.0000154643.30048.2c.

- 85 Zeng G, Cai S, Wu G-J. Up-regulation of METCAM/MUC18 promotes motility, invasion, and tumorigenesis of human breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2011;11(1):113. doi:10.1186/1471-2407-11-113.
- 86 Feng G, Fang F, Liu C, Zhang F, Huang H, Pu C. CD146 gene expression in clear cell renal cell carcinoma: a potential marker for prediction of early recurrence after nephrectomy. *Int Urol Nephrol*. 2012;44(6):1663-1669. doi:10.1007/s11255-012-0255-4.
- 87 Tsukamoto Y, Taira E, Kotani T, et al. Involvement of gicerin, a cell adhesion molecule, in tracheal development and regeneration. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 1996;7(12):1761-1767. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8959345/>.
- 88 Seftalioğlu A, Karakoç L. Expression of CD146 adhesion molecules (MUC18 or MCAM) in the thymic microenvironment. *Acta Histochemica*. 2000;102(1):69-83. doi:10.1078/0065-1281-00544.
- 89 Figarella-Branger D, Schleinitz N, Boutière-Albanèse B, et al. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 and CD146: soluble levels and in situ expression of cellular adhesion molecules implicated in the cohesion of endothelial cells in idiopathic inflammatory myopathies. *The Journal of rheumatology*. 2006;33(8):1623-1630. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16881117/>.
- 90 Neidhart M, Wehrli R, Brhlmann P, Michel BA, Gay RE, Gay S. Synovial fluid CD146 (MUC18), a marker for synovial membrane angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 1999;42(4):622-630. doi:10.1002/1529-0131(199904)42:4<622:AID-ANR4>3.0.CO;2-Y.
- 91 Schulz C, Petrig V, Wolf K, et al. Upregulation of MCAM in primary bronchial epithelial cells from patients with COPD. *Eur Respir J*. 2003;22(3):450-456. doi:10.1183/09031936.03.00102303.
- 92 Flanagan K, Fitzgerald K, Baker J, et al. Laminin-411 is a vascular ligand for MCAM and facilitates TH17 cell entry into the CNS. *PLoS One*. 2012;7(7):e40443. doi:10.1371/journal.pone.0040443.
- 93 Dagur PK, Biancotto A, Wei L, et al. MCAM-expressing CD4(+) T cells in peripheral blood secrete IL-17A and are significantly elevated in inflammatory autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity*. 2011;37(4):319-327. doi:10.1016/j.jaut.2011.09.003.
- 94 Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*. 2003;18(4):696-704. doi:10.1359/jbmr.2003.18.4.696.
- 95 Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*. 2007;25(6):1384-1392. doi:10.1634/stemcells.2006-0709.
- 96 Sorrentino A, Ferracin M, Castelli G, et al. Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. *Exp Hematol*. 2008;36(8):1035-1046. doi:10.1016/j.exphem.2008.03.004.
- 97 Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007;131(2):324-336. doi:10.1016/j.cell.2007.08.025.
- 98 Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, Barrilleaux BL, Meyertholen KE, O'Connor KC. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells*. 2010;28(4):788-798. doi:10.1002/stem.312.
- 99 Apte MV, Haber PS, Applegate TL, et al. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut*. 1998;43(1):128-133. doi:10.1136/gut.43.1.128.
- 100 Schäfer S, Zerbe O, Gressner AM. The synthesis of proteoglycans in fat-storing cells of rat liver. *Hepatology*. 1987;7(4):680-687. doi:10.1002/hep.1840070411.

- 101 Jin L, Feng T, Zerda R, Chen C-C, Riggs AD, Ku HT. In vitro multilineage differentiation and self-renewal of single pancreatic colony-forming cells from adult C57BL/6 mice. *Stem Cells Dev.* 2014;23(8):899-909. doi:10.1089/scd.2013.0466.
- 102 Mathew E, Brannon AL, Del Vecchio A, et al. Mesenchymal Stem Cells Promote Pancreatic Tumor Growth by Inducing Alternative Polarization of Macrophages. *Neoplasia.* 2016;18(3):142-151. doi:10.1016/j.neo.2016.01.005.
- 103 Freeman BT, Jung JP, Ogle BM. Single-Cell RNA-Seq of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Reveals Unique Profiles of Lineage Priming. *PLoS One.* 2015;10(9):e0136199. doi:10.1371/journal.pone.0136199.
- 104 Aran D, Hu Z, Butte AJ. xCell: digitally portraying the tissue cellular heterogeneity landscape. *Genome Biol.* 2017;18(1):220. doi:10.1186/s13059-017-1349-1.
- 105 Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(43):15545-15550. doi:10.1073/pnas.0506580102.
- 106 Liberzon A, Subramanian A, Pinchback R, Thorvaldsdóttir H, Tamayo P, Mesirov JP. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics.* 2011;27(12):1739-1740. doi:10.1093/bioinformatics/btr260.
- 107 Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Systems.* 2015;1(6):417-425. doi:10.1016/j.cels.2015.12.004.
- 108 Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells.* 2014;32(6):1380-1389. doi:10.1002/stem.1661.
- 109 Viswanathan S, Shi Y, Galipeau J, et al. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy.* 2019;21(10):1019-1024. doi:10.1016/j.jcyt.2019.08.002.
- 110 Bellagamba BC, Grudzinski PB, Ely PB, Nader PdJH, Nardi NB, Da Silva Meirelles L. Induction of Expression of CD271 and CD34 in Mesenchymal Stromal Cells Cultured as Spheroids. *Stem Cells Int.* 2018;2018:7357213. doi:10.1155/2018/7357213.

## 8. Thesen

1. Es wurde eine neue Methode zur Isolation mesenchymaler stromaler Zellen aus dem murinen Pankreas entwickelt.
2. Eine gesichert mesenchymale Stammzellpopulation aus dem murinen Pankreas zu isolieren ist gescheitert. Dennoch ist eine Isolationsoptimierung anhand eines breiter aufgestellten Markierungspanels in weiteren Versuchen möglich.
3. Mit Hilfe des Oberflächenmarkers CD146 kann eine stromale Population aus dem murinen Pankreas isoliert werden, die potenziell MSC beinhalten könnte.
4. CD146 ist als alleiniger Oberflächenmarker und auch in Kombination mit CD45 nicht ausreichend, um sicher MSC aus dem murinen Pankreas zu isolieren und zu klassifizieren. Die hierdurch isolierten Zielzellfraktionen sind als Mischpopulationen zu betrachten.
5. Es verbleibt Optimierungspotential für die adhärente Zellkultur. Aufgrund der aktuell eingeschränkten Passagierbarkeit der isolierten Zielfraktionen lassen sich keine Differenzierungsversuche zur Bestätigung oder Negierung des mesenchymalen Stammzellpotentials in der CD146+/CD45- Zielfraktion durchführen.
6. Limitierende Faktoren für die eingeschränkten Ergebnisse in der Zellkultur könnten die erhöhte Belastung der Zellen durch die Durchflusszytometrie sowie die geringen hierbei in der Zielpopulation generierbaren Zellzahlen sein.
7. Die Re-Sortierung kultivierter Zellen hat gezeigt, dass die adhärente Zellkultur den Charakter und die Beurteilbarkeit sowie die Aussagekraft isolierter stromaler Zellen im Hinblick auf die Bedeutung und ihre Funktion in vivo verändert.
8. Um fälschliche Rückschlüsse aufgrund von Zellkulturartefakten zu vermeiden, sollte bei weiteren Versuchen der Ablauf einer Vorsortierung mittels Durchflusszytometrie mit Bestimmung des Zelltypus beibehalten werden.
9. Eine Übertragung der Methodik auf Mäuse des KC- sowie Cre-Mausmodells ist möglich. Hierdurch könnten Rückschlüsse auf mögliche Veränderungen der MSC-Populationen in der Tumormicroenvironment gezogen werden.

## 9. Anhang

### Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	26
○ Übersicht der an Novogene verschickten Proben	
Tabelle 2	32
○ Auflistung der Mäuse für den ersten Versuch der Isolation mit der Nycodenz-Dichtezentrifugation	
Tabelle 3	34
○ Darstellung der Zellzahlen für die Subpopulation der einzelnen Mäuse nach der Sortierung durch das FACS	
Tabelle 4	36
○ Auflistung der Mäuse für den ersten Versuch der Isolation mit der neuen Methode	
Tabelle 5	36
○ Bestimmung der Zellzahlen vor und nach der Zellsortierung anhand des FACS	
Tabelle 6	38
○ Auflistung der Mäuse für den zweiten Zellkulturversuch mit der neuen Isolationsmethode	
Tabelle 7	39
○ Bestimmung der Zellzahlen vor und nach der Zellsortierung anhand des FACS	
Tabelle 8	41
○ Zellzahlvergleich der Durchschnittswerte pro Maus gerechnet zwischen der Nycodenz-Methode und der neuen Methode	
Tabelle 9	42
○ Bestimmung der Zellzahlen vor und nach der Zellsortierung anhand des FACS	
Tabelle 10	43
○ Bestimmung der Zellzahlen vor und nach der Zellsortierung anhand des FACS	
Tabelle 11	44
○ Bestimmung der Zellzahlen vor und nach der Zellsortierung anhand des FACS	
Tabelle 12	45
○ Daten der RNA-Vermessung mittels Nanodrop aller zu sequenzierenden Proben	
Tabelle 13	46
○ Die Verteilung der generierten Raw Reads der Sequenzierung	
Tabelle 14	50
○ FPKM-Werte (fragment per kilobase million) für die Genexpression für Signaturgene von MSC nach den Empfehlungen des ISCT	
Tabelle 15	52
○ FPKM-Werte (fragment per kilobase million) nach Freeman BT, Jung JP, Ogle BM (2015)	
Tabelle 16	53
○ FPKM-Werte (fragment per kilobase million) nach Sunami, Yoshiaki; Häußler, Johanna; Kleeff, Jörg (2020):	
Tabelle 17	58
○ Gen Set Enrichment Analyse	

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	30
○ Kalibrierung des Durchflusszytometers	
Abbildung 2	31
○ Exemplarische Darstellung der Gatingstrategie	
Abbildung 3	34
○ Graphische Darstellung der Zellverteilung für die Subpopulationen der einzelnen Mäuse	
Abbildung 4	35
○ Morphologie und Wachstum der kultivierten Populationen in Aufnahmen mit dem Phasenkontrastmikroskop nach Isolation mit der Nycodenz-Dichtezentrifugation	
Abbildung 5	37
○ Graphische Darstellung der Zellverteilung für die Subpopulationen der Gruppen T1, T2, T3	
Abbildung 6	38
○ Morphologie und Wachstum der kultivierten Populationen unter Phasenkontrastmikroskopie	
Abbildung 7	40
○ Morphologie und Wachstum der kultivierten Populationen unter Phasenkontrastmikroskopie	
Abbildung 8	43
○ Exemplarisch die Darstellung des DotPlot der Sortierung der Gruppe M2/- nach Kultur mit der entsprechenden Gating-Strategie	
Abbildung 9	46
○ Graphische Darstellung der Verteilung der Raw reads der einzelnen Proben	
Abbildung 10	47
○ Pearson-Correlation der Sequenzierten Proben mit Angabe des Korrelationsindex von 0-1.	
Abbildung 11	48
○ Principal Component-Analyse der sequenzierten Proben	
Abbildung 12	48
○ Heatmap der exprimierten protienkodierenden Gene aller Sequenzierungsproben	
Abbildung 13	54
○ Heatmap der Zelltyp Anreicherungsanalyse via xCell	

### **III. Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten. Es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

---

Matthias Sommerer, 21.02.2025, Halle (Saale)

#### **IV. Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen beziehungsweise eine Promotion begonnen habe.

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

---

Matthias Sommerer, 21.02.2025, Halle (Saale)

## V. Danksagung

Ich möchte mich bei Allen bedanken, die mich bei der Anfertigung und Durchführung der Arbeit begleitet, unterstützt, motiviert und weitergebildet haben. Ohne euren tatkräftigen Einsatz wäre dies nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Wissenschaftlichen Mentoren. Hierbei möchte ich mich vor allem bei Prof. Dr. med Lutz P. Müller und Prof. Dr. Christoph Michalski bedanken, die mit ihren Ideen das Projekt initiiert haben und immer wieder neuen fachlichen und kreativen Input geliefert haben. Bei PD Dr. rer. medic. Bogusz Trojanowicz und Kathrin Hammje möchte ich mich für die Expertise und Unterstützung bei der Durchführung der Laborarbeiten, sowie für die stets angenehmen Kaffee- und Mittagspausen bedanken. Ebenfalls ein großer Dank gebührt Dr. rer. nat. Markus Glaß für das Fachwissen und die große Hilfe bei der Auswertung der Sequenzierungsdaten. Außerdem möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. med. Jörg Kleeff danken, für die Ausdauer, Begleitung und schlussendlich auch Korrektur der Arbeit.

Weiterer Dank gebührt ebenfalls meiner Frau und meiner Familie, die mich die gesamte Zeit unterstützt und motiviert haben die Arbeit fertigzustellen.