

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Aus der

Interdisziplinären Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation

Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. A. R. Zander

**Beschleunigte und sichere Isolierung und Expansion humaner
mesenchymaler Stromazellen in Tierserum-freiem Medium für
die Transplantation und regenerative Medizin**

DISSERTATION

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

vorgelegt von:

Figen Cakiroglu

aus Neumünster

Hamburg 2009

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 23.7.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende/r: Prof. Dr. A.R. Zander

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. C. Lange

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. U. Schumacher

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1. Fragestellung	1
2. Einleitung	3
2.1. Allgemeine Einleitung	3
2.2. Ursprung und Charakterisierung hämatopoetischer Stammzellen	4
2.3. Ursprung mesenchymaler Stromazellen	6
2.4. Eigenschaften mesenchymaler Stromazellen	7
2.5. Charakterisierung mesenchymaler Stromazellen	10
2.6. Isolierung mesenchymaler Stromazellen	11
2.7. Therapeutische Verwendung mesenchymaler Stromazellen	11
2.8. Side population Stammzelle	13
2.9. Gewebeständige Stammzelle	14
2.10. Stammzellplastizität	14
2.11. Koloniebildungskapazität	16
3. Material und Methoden	17
3.1. Material	17
3.1.1. Untersuchungsmaterial	17
3.1.2. Zellkulturmedien	17
3.1.3. Lösungsmittel und Chemikalien	19
3.1.4. Plastikmaterial und Geräte	21
3.2. Methoden	22
3.2.1. Isolierung mesenchymaler Stromazellen aus dem Knochenmark	22
3.2.2. Zellkulturen in 6-Loch-Platte/CFU-F	23
3.2.3. Zellkulturen in 25 cm ² Flasche	23
3.2.4. Zellkulturen in 75 cm ² Flasche	24
3.2.5. Quantifizierung der Zellzahl	24
3.2.6. Osteogene Differenzierung	25
3.2.7. Adipogene Differenzierung	26
3.2.8. Chondrogene Differenzierung	26
3.2.9. Phänotypanalyse	28
3.2.10. Karyotypisierung	30

3.2.11. Genexpression	31
3.2.12. Plättchenlysat: Vergleich von unterschiedlichen Präparationen und Konzentrationen	32
3.2.13. Elektronische Datenverarbeitung	32
4. Ergebnisse	33
4.1. Spenderdaten	33
4.2. Isolation von MSZ	33
4.2.1. Zellmorphologie	35
4.2.2. Wachstum der Zellen	38
4.2.3. Trypsinieren der Zellkulturen	42
4.3. Differenzierungen	42
4.3.1. Osteogene Differenzierung	42
4.3.2. Adipogene Differenzierung	45
4.3.3. Chondrogene Differenzierung	47
4.4. Phänotypanalyse	49
4.5. Plättchenlysat: Standardisierung von Präparation und Konzentration	51
4.6. Karyotypische Analyse	52
4.7. Genexpressionsanalyse	54
5. Diskussion	58
6. Zusammenfassung	64
7. Literaturverzeichnis	66
8. Danksagung	81
9. Lebenslauf	82

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AMM	Adipogenic Maintenance Medium (adipogenes Erhaltungsmedium)
aq. dest.	deionisiertes destilliertes Wasser
α -MEM	alpha-Modified Essential Medium
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	Cluster of Differentiation
CFU-F	Colony-Forming Unit Fibroblast
d	Tage
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
EGF	Epidermal Growth Factor
evtl.	eventuell
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2
FKS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat
FS	Forward Scatter
g	Gramm
g	Erdbeschleunigungskonstante
GAG	Glykosaminoglykane
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GF	Gesichtsfeld
h	Stunde
HE	Hämalaun-Eosin

HLA	Histokompatibilitäts-Komplexe
hMSZ	humane mesenchymale Stromazellen
Ig	Immunglobulin
K	Kontrolle
KT	Kulturtag
KM	Knochenmark
MAPC	Multipotent Adult Progenitor Cells
min	Minute
MNZ	mononukleäre Zellen
MSZ	mesenchymale Stromazellen
Mio.	Millionen
n	Anzahl der Stichproben
NaCl	Natriumchlorid
O ₂	Sauerstoff
p	Signifikanzniveau
P 1-15	Passage 1-15
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PE	R-Phycoerythrin
PL	Plättchenlysate (platelet lysate)
PK	Primärkultur
P/S	Penicillin/Streptomycin
PRP	Platelet rich plasma
RT	Raumtemperatur
SCF	Stammzellfaktor
sec	Sekunde
SP	Side Population
SS	Side scatter
SD	Standardabweichung (standard deviation)

sog.	sogenannt
SZ	Stammzelle
Tab.	Tabelle
U	Unit
u.a.	unter anderem
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

1. Fragestellung

Mesenchymale Stromazellen (MSZ) wurden 1966 zum ersten Mal durch Friedenstein et al. beschrieben. Seitdem sind sie von erheblichem Interesse und eine große Anzahl von Studien wurde durchgeführt, um Funktion und Nutzen dieser Zellen *in vitro* und *in vivo* zu ergründen (Pittenger et al., 1999; Deans and Mosley, 2000; Fibbe and Noort, 2003). Es konnte in präklinischen (Kopen et al., 1999; Mahmood and Chopp, 2004; Petite et al., 2000; Lange et al., 2005B; Tögel et al., 2005; Jaquet et al., 2005) und klinischen (Horwitz et al., 1999; Le Blanc et al., 2004; Koc et al., 2000; Koc et al., 2002; Chen et al., 2004) Studien über neuronale Regeneration nach Degeneration, Osteogenesis imperfecta, Spender-gegen-Wirt-Krankheit, metabolische Erkrankungen, Knochen- und Knorpelkrankheiten sowie über Nieren- und Myokardinfarkt gezeigt werden, dass MSZ ein beträchtliches therapeutisches Potential besitzen.

Bis heute gehört zur etablierten Methode für die Expansion und Differenzierung von hMSZ die Nutzung von fötalem Kälberserum (FKS). Dieses Serum kann allerdings eine unerwünschte Quelle für xenogene Antigene sein und birgt die Gefahr der Kontamination mit tierischen Viren und Prionen sowie der Zoonose in sich. Der Kontakt mit tierischem Eiweiß kann außerdem anaphylaktische Reaktionen und lokale Entzündungen auslösen und zur Abstoßung der transplantierten Stammzellen führen (Selvaggi et al., 1997; Mackensen et al., 2000; Tuschong et al., 2002). Nach zellulärer Kardioplasie konnten sogar Arrhythmien festgestellt werden (Chachques et al., 2004). Obwohl FKS durch sequentielle Kultivierung von MSZ zuerst in FKS, darauf folgend in autologem oder heterologem Serum (Spees et al., 2004) bis zu 99,99% eliminiert werden kann, verbleibt ein gewisses Restrisiko. Deshalb wird aktiv nach Alternativen gesucht.

Um hMSZ für die klinische Anwendung nutzen zu können, gab es bisher mehrere Versuche, diese Zellen in FKS-freien Medien zu kultivieren, indem z.B. statt FKS humanes Serum zum Einsatz kam. In autologem Serum zeigte sich zumindest in den ersten Passagen im Vergleich zu FKS eine schnellere Proliferation ohne Verlust der typischen Eigenschaften des Phänotyps, der Beweglichkeit und der Differenzierungsfähigkeit *in vitro*, wo hingegen in allogenen humanem Serum Wachstumsstillstand und Absterben der Zellen resultierten (Shahdadfar et al., 2005; Mizuno et al., 2006; Stute et al., 2004). Yamaguchi et al. (2002) beobachteten eine bessere Expansion unter dem Zusatz von humanem AB-Serum oder autologem Serum bzw. Plasma, allerdings nur unter der zusätzlichen Gabe von Wachstumsfaktoren (bFGF-basic Fibroblast Growth Factor). Autologes oder allogenes Serum kann aber bisher nicht als gängiger Ersatz für FKS zur Anwendung kommen, da es nicht möglich ist, es in der benötigten Menge zu gewinnen.

Außerdem gibt es bis jetzt nur wenige nach GMP-produzierte Wachstumsfaktoren, von denen die meisten nicht von Nutzen sind.

Ergebnisse der letzten Zeit zeigen, dass humane Thrombozytenkonzentrate als ein sicherer Ersatz des tierischen Serums für die Expansion von hMSZ Verwendung finden können (Yamada et al., 2004; Doucet et al., 2005; Müller et al., 2006). Die daraus resultierenden hMSZ sind allerdings noch nicht vollständig charakterisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Bedingungen für eine Serum-freie Kultivierung von hMSZ intensiv untersucht. Dabei kam Plättchenlysate (PL) als Ersatz für und im Vergleich zu FKS zur Anwendung. Von besonderem Interesse waren dabei das Wachstums- und Differenzierungsverhalten der unter diesen Bedingungen kultivierten Zellen. Die Ergebnisse wurden zusammengetragen und einander gegenübergestellt.

2. Einleitung

2.1. Allgemeine Einleitung

Die Anwendung von embryonalen Stammzellen in der Forschung und in der Klinik ist sowohl mit ethischen als auch mit rechtlichen und moralischen Bedenken verbunden. Zwar besitzen diese Zellen ein hohes Expansions- und Differenzierungspotential, aber sie sind schwierig zu gewinnen und mit ihrer Verwendung ist das Risiko der Bildung von Teratokarzinomen (Erdö et al., 2003) und die Gefahr der Abstoßungsreaktion beim Empfänger (Robertson, 2001) verbunden. Außerdem werden während der Differenzierung der embryonalen Stammzellen Histokompatibilitäts-Komplexe (HLA) des Spenders entwickelt, die eine lebenslange und mit vielen unerwünschten Nebenwirkungen verbundene Immunsuppression erforderlich machen.

Als Alternative kommen die multipotenten, adulten humanen Stammzellen in Betracht. Diese können relativ einfach aus unterschiedlichen Geweben gewonnen und in ausreichender Menge expandiert werden. Zudem wird keine Immunsuppression benötigt.

Als Stammzellen werden dabei diejenigen Zellen bezeichnet, welche die Fähigkeit besitzen, sich durch Zellteilung unbegrenzt zu replizieren und welche gleichzeitig in der Lage sind, sich in verschiedene Gewebe zu differenzieren. Die Zellerneuerung kann durch eine symmetrische Teilung erfolgen, was zu dem Ergebnis führt, dass beide Tochterzellen mit den Eigenschaften einer Stammzelle ausgestattet sind. Die andere Möglichkeit stellt die asymmetrische Teilung dar, aus der eine Stammzelle und eine undifferenzierte Progenitorzelle hervorgehen. Progenitorzellen unterscheiden sich von Stammzellen dadurch, dass sie eine eingeschränkte Selbstteilungskapazität besitzen und bereits Linien determinierte Vorläuferzellen darstellen. Daher können Stammzellen in verschiedenen zellulären Phänotypen auftreten. Sie verharren in ihrem undifferenzierten Stadium, bis sie durch intrinsische und extrinsische Faktoren zur Differenzierung stimuliert werden.

Eine Möglichkeit zur Einteilung von Stammzellen stellt ihr Differenzierungspotential (Tab. 1) dar. Dabei werden als totipotente Stammzellen diejenigen bezeichnet, welche die Fähigkeit besitzen, alle Zell- und Organtypen bis hin zu einem eigenständigen Organismus hervorzubringen. Sie sind also in der Lage, eine Nachkommenschaft zu erzeugen, die alle embryonalen und extraembryonalen Zelltypen einschließt. Die befruchtete Eizelle ist als bekannteste totipotente Stammzelle anzusehen, welche ihre Totipotenz bis hin zum 8-Zellstadium behält. Anschließend spricht man von pluripotenten embryonalen Stammzellen, aus denen zwar noch alle Gewebe des

Körpers entstehen können, aber diese Zellen besitzen nicht mehr das Potential, sich zu einem eigenständigen Organismus zu entwickeln.

Differenzierungspotential	Vorkommen	Eigenschaften
Totipotenz	Zygote (Blastomere) bis zum 8-Zell-Stadium	Möglichkeit der Differenzierung in jegliche Körperzelle bis hin zum selbständigen Organismus
Pluripotenz	Embryonale Stammzelle der Blastozyste, embryonale Keimzelle in Gonaden, embryonale Karzinomzelle z.B. im Teratokarzinom	keine komplette Entstehung eines Organismus möglich, jedoch die Differenzierung in zahlreiche Zelltypen
Multipotenz	Gewebespezifische Stammzellen: Hämatopoetische SZ Muskel-SZ Leber-SZ Neuronale SZ Retinale SZ	determiniert, begrenzt selbsterneuernd; Fähigkeit, eine begrenzte Zahl anderer Gewebe zu bilden (evtl. Transdifferenzierung in jeweils andere Gewebetypen möglich)

Tab. 1: Differenzierungspotential von Stammzellen

Im weiteren Verlauf der Embryogenese verlieren die Stammzellen zunehmend ihr Differenzierungspotential, so dass sog. fetale und adulte Stammzellen entstehen. Adulte Stammzellen sind postnatalen Ursprungs und befinden sich in reifem Gewebe. Man konnte sie bisher in ca. 20 Organen bzw. Organsystemen nachweisen (u.a. im Blut, im Knochenmark). Dort verbleiben sie lebenslänglich und produzieren organspezifische Ersatzzellen.

Im Folgenden wird auf die Herkunft, die Eigenschaften, die Isolierung, die Kultivierung, die Charakterisierung und die klinische Verwendung von adulten Stammzellen eingegangen.

2.2. Ursprung und Charakterisierung hämatopoetischer Stammzellen

Die adulte hämatopoetische Stammzelle entdeckten McCulloch und Till 1963 im Mausmodell. Sie bestrahlten Mäuse mit einer normalerweise letalen Dosis und transplantierten anschließend

murines Knochenmark. Dieses führte zur vollständigen Rekonstitution des gesamten Blutsystems der Mäuse.

Man kann die hämatopoetische Stammzelle aus unterschiedlichen hämatopoetischen Organen isolieren. Zu diesen gehört die fetale Leber, das Nabelschnurvenenblut, adultes Knochenmark und durch Wachstumsfaktoren mobilisiertes peripheres Blut. Im menschlichen Knochenmark werden aus hämatopoetischen Stammzellen pro Tag ca. 10^{12} hämatopoetische Zellen gebildet, was etwa 1 kg entspricht.

Das klassische Modell der Hämatopoese geht von einem hierarchischen System aus, an dessen Spitze multipotente hämatopoetische Stammzellen stehen. Diese bringen myeloide und lymphoide Stammzellen hervor und im weiteren Verlauf entstehen über mehrere Zwischenstufen alle ausgereiften Zellen des hämatopoetischen Systems (Abb. 1).

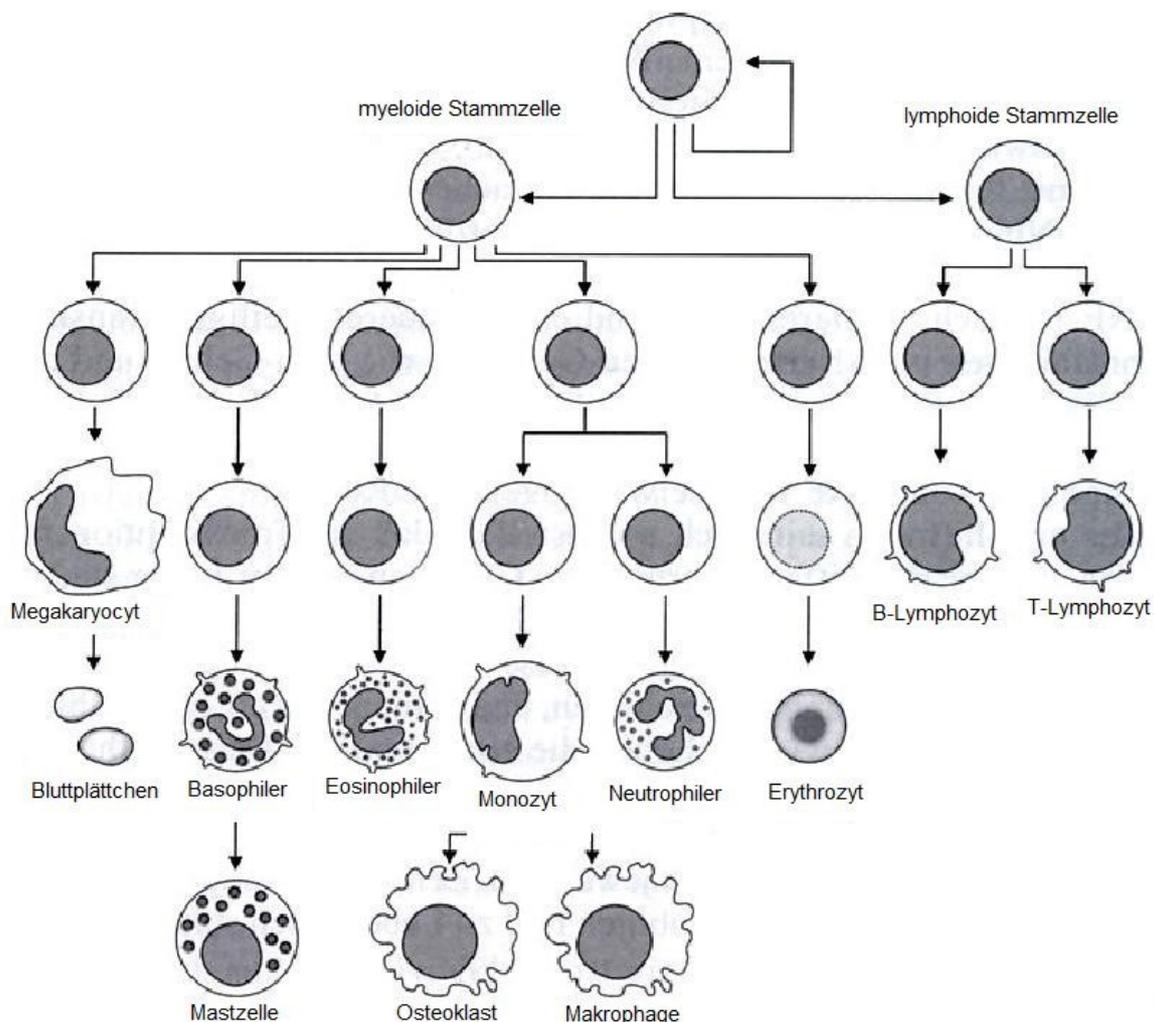


Abb. 1: Hierarchisches System der Hämatopoese. Aus multipotenten hämatopoetischen Stammzellen gehen myeloide und lymphoide Stammzellen hervor. Diese können über mehrere Differenzierungszwischenstufen die verschiedenen Blutzelltypen bilden. (verändert aus: Entwicklungsbiologie. Wolpert, Lewis. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag; 1999)

Die Charakterisierung humaner hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen erfolgt über Oberflächenantigene. Hämatopoetische Stammzellen exprimieren die allermeisten Oberflächenmoleküle nicht, welche auf ausgereiften hämatopoetischen Zellen zu finden sind und daher auch als linienspezifische Marker bezeichnet werden. Allerdings kann das Vorhandensein des Antigens CD34 nachgewiesen und somit zur Identifizierung von frühen hämatopoetischen Stammzellen herangezogen werden, da dessen Expression bei der Ausreifung und Differenzierung der Zellen herunterreguliert wird. Die genaue Funktion von CD34 ist nicht bekannt, ebenso handelt es sich bei diesem Antigen um keinen spezifischen Stammzellmarker, da es auch auf der Oberfläche reifer Endothelzellen und Fibroblasten zu finden ist. Somit wird ein weiterer Marker für die exakte Charakterisierung benötigt, der hämatopoetische Leukozytenmarker CD45.

2.3. Ursprung mesenchymaler Stromazellen

Das Vorhandensein von Stammzellen in nicht-hämatopoetischen Geweben konnte erstmals durch die Untersuchungen des deutschen Pathologen Cohnheim vor 130 Jahren vermutet werden (Cohnheim, 1867). Cohnheim injizierte unlöslichen Anilin-Farbstoff in die Venen von verletzten Tieren und beobachtete die Wundheilung. Im Wundherd konnte er erkennen, dass nicht nur entzündungsassoziierte Zellen den Farbstoff enthielten, sondern auch solche mit fibroblastoide Morphologie. Daher schlussfolgerte er, dass zumindest einige der am Wundheilungsprozess beteiligten Zellen ihren Ursprung in der Blutbahn oder im Knochenmark haben müssten. Diese fibroblastenartig wachsenden Zellen des Knochenmarks identifizierten 1966 Friedenstein et al. Bei der Kultivierung *in vitro* wuchsen die Zellen adhärent auf Plastikoberflächen und blieben undifferenziert. Sie waren in der Lage, sich in Zellen des Stütz- und Bindegewebes differenzieren zu lassen (Friedenstein et al., 1966).

Die von Friedenstein erstmals beschriebene multipotente Stammzelle aus dem Stroma des Knochenmarks wurde später intensiv untersucht. Dabei unterschieden sich die Isolierungs- und Kultivierungsbedingungen der verschiedenen Arbeitsgruppen voneinander: nach Caplan werden MSZ aus einem Percoll bzw. Ficoll-Gradienten gewonnen und unter Zuhilfenahme ihrer Plastikadhärenz im Standardmedium (DMEM mit Zusatz von 10% FKS) kultiviert (Caplan, 1991); mesenchymale Progenitorzellen (MPZ) nach Prockop et al. werden aus einem Ficoll-Gradienten durch ihre Plastikadhärenz selektioniert und in α -MEM mit 20% FKS kultiviert (Prockop, 1997; Colter et al., 2000); Stro-1+ Zellen nach Simmons, werden anhand des Stro-1 Oberflächenmarkers mittels Durchflusszytometrie isoliert (Simmons und Torok-Storb, 1991; Gronthos et al., 1994; Simmons et al., 1994); Verfaillie et al. identifizierten die Multipotent Adult

Progenitor Cells (MAPC). Diese können sowohl durch die Depletion der CD45+ und Glycophorin A+ Zellen als auch durch ihre Kultivierung in einem spezifischen Medium in mit Fibronectin-beschichteten Kulturflaschen selektiert werden. Sie scheinen im Knochenmark in deutlich geringerer Frequenz vorzukommen als MSZ. MAPC wird die Fähigkeit zugesprochen, ohne Einbußen des Differenzierungspotenzials nahezu unbegrenzt in vitro expandiert werden zu können (Reyes und Verfaillie, 2001; Verfaillie et al., 2003).

Viele Studien deuten darauf hin, dass es sich bei den untersuchten Zellen möglicherweise um gleiche Zellen mit ähnlichem Differenzierungsverhalten handelt, aber trotzdem gibt es bis jetzt keine klare Definition und eindeutige Charakterisierung humaner MSZ. Daher kann man nicht genau unterscheiden, ob es sich bei den in den Studien untersuchten Zellen tatsächlich um Stammzellen oder um linienspezifische Progenitorzellen handelt. Unter anderem wird von einigen Forschungsgruppen der Terminus „marrow stem cell“ gleichgestellt mit „mesenchymal stem cell“ oder „mesenchymal progenitor cell“. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen im Hinblick auf die klinische Anwendbarkeit zu ermöglichen, gibt es Bestrebungen, die Kulturbedingungen zu standardisieren (Beresford und Owen, 1998).

Innerhalb des Knochenmarks existieren drei wesentliche zelluläre Systeme, die nach heutiger Erkenntnis keinen gemeinsamen Vorläufer im postnatalen Individuum besitzen: das hämatopoetische, das endotheliale und das Stromazellsystem, wobei die MSZ zum Stromazellsystem gezählt werden. Zurzeit stellt das Knochenmarkspirat die ergiebigste Quelle für MSZ dar. Man findet MSZ aber auch im Fettgewebe (Zuk et al., 2001), im Periost (Nakahara et al., 1991), in der Synovialmembran (De Bari et al., 2001), im Muskel (Bosch et al., 2000), in der Dermis (Young et al., 2001), im Nabelschnurblut (Erices et al., 2000) und im trabekulären Knochen (Noth et al., 2002).

2.4. Eigenschaften mesenchymaler Stromazellen

Adulten Stammzellen wird nach Caplan, Prockop, Simmons und Verfaillie et al. die Fähigkeit der Multipotenz zugeschrieben, da sie sich unter geeigneten Bedingungen entlang verschiedener Zell- und Gewebelinien zu differenzieren vermögen. So können aus postnatalem Knochenmark isolierte MSZ durch entsprechende Kultivierungsbedingungen angeregt werden, sich in eine Reihe mesodermaler und vermutlich auch ektodermaler und endodermaler Gewebetypen zu differenzieren (Abb. 2). Dazu zählen Knochen (Friedenstein et al., 1987; Beresford, 1989; Haynesworth et al., 1992b, 1997; Jaiswal et al., 1997; Pittenger et al., 1999), Knorpel (Lennon et al., 1996; Johnstone et al., 1998; Mackay et al., 1998; Pittenger et al., 1999), Sehnen und

stromales Bindegewebe (Young et al., 1998), Skelettmuskel (Saito et al., 1995; Ferrari et al., 1998), Herzmuskel (Makino et al., 1999; Fukuda, 2001), Fett (Dennis und Caplan, 1996; Pittenger et al., 1999), neuronales Gewebe (Azizi et al., 1998; Kopen et al., 1999), mesangiales Gewebe (Ito et al., 2001) Epithel von Leber, Lunge und Darm (Jiang et al., 2002, Reyes et al., 2002) und Endothel (Oswald et al., 2004).

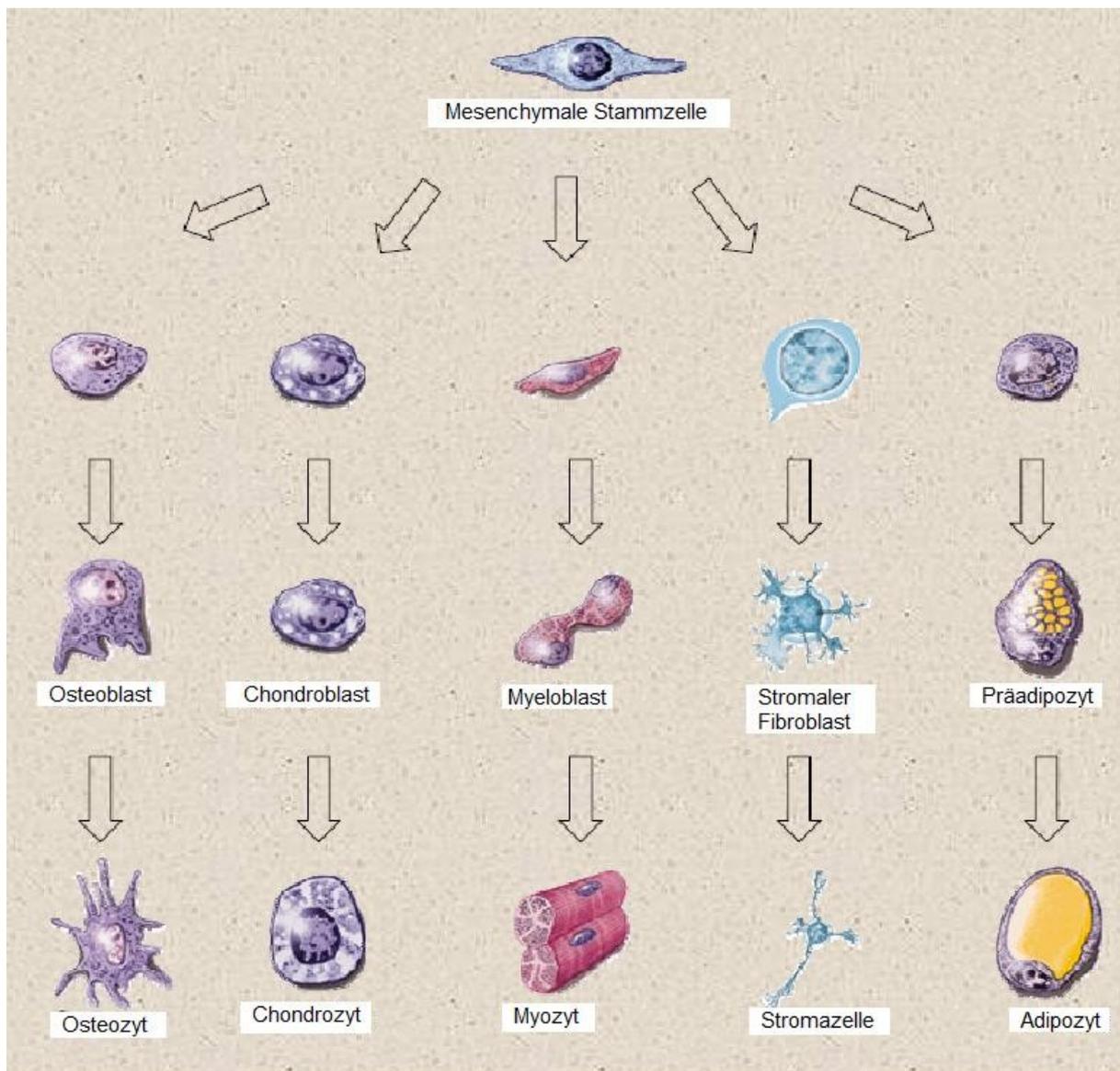


Abb. 2: Mesodermales Differenzierungspotential von mesenchymalen Stammzellen. Dargestellt sind Differenzierungslinien von hMSZ (verändert aus: Mesenchymal stem cells of human adult bone marrow. Pittenger Mark und Marshak Daniel in: Stem cell biology. Marshak Daniel, Gardner Richard und Gottlieb Daniel, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001)

MSZ können das gesamte Leben lang im Körper nachgewiesen werden. In der Regel zeigen sie nach Untersuchungen von Prockop et al. in Kultur meistens einen Wachstumsverlauf, der mit einer lag-Phase beginnt, gefolgt von einer Phase mit rapidem, exponentiellem Wachstum, welches

in einer stationären Phase, in der die Proliferationsrate gegen Null geht, endet (Bruder et al., 1997; Sekiya et al., 2002).

Auch die MSZ sind einem Alterungsprozess unterworfen. Dieser spiegelt sich u.a. in der Abnahme der Telomerlänge wider. So kann man eine annähernd exponentielle Abnahme der Anzahl von MSZ mit dem Alter des Untersuchten beobachten. Findet man beim Neugeborenen noch etwa 10^2 MSZ pro 10^6 kernhaltige Zellen, so sind es beim Fünfzigjährigen nur noch etwa 2 pro 10^6 (Caplan, 1994). Daneben ist die Anzahl der MSZ auch abhängig vom Ort der Entnahme und dem Bestehen und Stadium einer systemischen Erkrankung (Majors et al., 1997).

Bei Untersuchungen des Zellzyklus konnte aufgezeigt werden, dass sich ca. 20% der Zellen in einem Ruhezustand befinden (Colter et al., 2001). Nach Prockop et al. weisen adulte hMSZ ein großes Expansionspotential und eine Verdopplungszeit von 33 Stunden und weniger auf. Ungewöhnlich für Stammzellen ist allerdings die Tatsache, dass trotz der großen Expansionsraten von Langzeitkulturen hMSZ eine endliche Teilungsfähigkeit besitzen. Untersuchungen von Bruder et al. (1997) zeigten, dass bei der Kultivierung von MSZ nach Caplan et al. nach durchschnittlich 38 Verdopplungen der Zellpopulation die ersten Anzeichen eines Alterungsprozesses eintraten. Dieser machte sich u.a. durch verlangsamtes Wachstums- und Teilungsverhalten deutlich. Allein die MAPC von der Arbeitsgruppe um Verfaillie zeigten nach mehr als 120 Verdopplungen der Zellpopulation noch keine reduzierte Teilungsfähigkeit und keinen Verlust der Differenzierbarkeit und somit keine Anzeichen einer beginnenden Zellalterung. Ob es sich bei MAPC um komplett andere Zellen als bei MSZ handelt oder ob MAPC eine besonders frühe und unreife Subfraktion innerhalb der mesenchymalen Stammzellen darstellen, ist bis jetzt unklar.

Auf den Alterungsprozess der MSZ nehmen unterschiedliche Kultivierungsbedingungen in vitro Einfluss. So spielt die Dichte der Aussaat in den Kulturflaschen eine wesentliche Rolle. Wenn die aus dem Knochenmark isolierten MSZ in einer sehr geringen Dichte von 1–10 Zellen/cm² ausgesiedelt werden, kann man die Entstehung von monoklonalen Zellen beobachten (Kuznetsov et al., 1997; Reyes et al., 2001; Colter et al., 2000, 2001). In solchen Kolonien befinden sich morphologisch heterogene Zellen. Diese können eingeteilt werden in kürzere, sich schnell teilende, und längere, sich langsamer teilenden Zellen. Bei niedriger Zelldichte überwiegen die kürzeren Zellen mit der höheren Teilungs- und Differenzierungskapazität. Umgekehrt ist ein Überwiegen der langen, mehr ausgereiften und langsamer proliferierenden Zellen bei hoher Zelldichte zu beobachten (Di Girolamo et al., 1999; Colter et al., 2000, 2001; Sekiya et al., 2002). Ein weiterer Vorteil der verdünnten Aussaat ist die Tatsache, dass der relative Anteil der sich seltener teilenden, partiell differenzierten Zellen mit der Anzahl der Passagen abnimmt. Man nimmt an, dass parakrine Faktoren, welche die Differenzierung fördern, bei einer höheren

Anfangszelldichte schneller akkumulieren, was dann zur Drosselung der Proliferationsrate führen könnte. Die Folge wäre nicht nur eine geringere Endzellzahl, sondern auch eine Erhöhung der Heterogenität der Zellpopulation hinsichtlich des Differenzierungsstatus der einzelnen Zellen.

Als weiterer auf die Zellalterung Einfluss nehmender Kultivierungsfaktor ist eine spezielle Oberflächenbehandlung der Kulturplatten oder Kulturflaschen anzusehen, durch die eine Verlängerung der Lebensspanne der MSZ erfolgen kann (Matsubara et al., 2004).

In mehreren Studien wurde versucht, die mitogene Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren wie FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) und EGF (Epidermal Growth Factor) zu nutzen, um die Proliferationsrate maximal zu steigern (Bianchi et al., 2003; Gruber et al., 2004). Allerdings beeinflussen proliferationsstimulierende Wachstumsfaktoren häufig auch das Differenzierungspotenzial. Ob dieser Nebeneffekt erwünscht ist, müsste im Einzelfall überprüft werden.

2.5. Charakterisierung mesenchymaler Stromazellen

In einem Knochenmarkspirat ist auch nach Abtrennung von Erythrozyten und hämatopoetischen Stammzellen noch keine homogene Zellpopulation von hMSZ zu finden. Eher muss man damit rechnen, ein Gemisch aus Stammzellen unterschiedlicher Herkunft und Funktion zu erhalten (Colter et al., 2001). Denn die verschiedenen Differenzierungszustände werden nicht nur nacheinander durchlaufen, sondern existieren auch stets gleichzeitig nebeneinander. Daher ist davon auszugehen, dass sich in einem gegebenen Knochenmarkspirat neben den eigentlichen Stammzellen auch die verschiedenen Zwischenstufen auf den unterschiedlichen Differenzierungswegen zu den Zielzellen vorfinden. Der Anteil der jeweiligen Progenitorzellen hängt dabei vom individuellen Zustand des Spenderorganismus zum Zeitpunkt der Entnahme des Aspirats ab (Phinney et al., 1999). So zeigten Untersuchungen von Zuk, dass im Durchschnitt nur etwa ein Drittel der gewonnenen hMSZ ein Entwicklungspotenzial Richtung Adipo-, Osteo- und Chondrogenese aufweist (Zuk et al., 2002).

Mit der Möglichkeit zur reproduzierbaren Anreicherung oder Isolierung mesenchymaler Stromazellen entsteht die Notwendigkeit einer leistungsfähigen Methode zur Zellidentifizierung. In den letzten Jahren jedoch ist es trotz intensiver Forschung noch nicht gelungen, eindeutige hochspezifische Oberflächenantigene für diese Fragestellung zu finden. Zurzeit kann man sich Antigene, welche auf hämatopoetischen Stammzellen und Leukozyten vorkommen, insbesondere CD34 bzw. CD45, zum Nachweis der Abwesenheit dieser Zelltypen zur Hilfe nehmen. Ebenso ist es möglich, eine Kombination aus positiven Markern bei routinemäßigen Kontrollen einzusetzen.

Dazu zählen u.a. CD90 (Thy1), ein Thymozyten-Antigen, und CD105 (Endoglin), ein Rezeptor für den Wachstumsfaktor TGF- β 1 (Barry et al., 1999; Simmons and Torok-Storb, 1991).

Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung der MSZ ist die positive Immunselektion durch den monoklonalen Antikörper Stro-1 nach Simmons (Simmons und Torok-Storb, 1991; Simmons et al., 1994). Die auf diese Weise isolierten MSZ sind in der Lage, sich in verschiedene Gewebetypen wie z.B. in Stromazellen, Gefäßmuskelzellen, Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten zu differenzieren (Dennis et al., 2002).

Außerdem sind humane MSZ auch über die Expression des Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktors (G-CSF), des Stammzell-Faktors (SCF), des Makrophagen-stimulierenden Faktors (MSF), der Interleukine 6 und 11 und durch ein cDNA-Array identifizierbar.

2.6. Isolierung mesenchymaler Stromazellen

Die Beckenkammaspiration gilt als klinisch etabliertes Standardverfahren und stellt hinsichtlich seiner zellulären Zusammensetzung unter geeigneten Bedingungen eine nahezu jederzeit reproduzierbare Quelle für die Gewinnung von Knochenmark dar. Aus dem so erhaltenen Knochenmarkaspirat werden durch Fraktionierung mit Hilfe eines Dichtegradienten wie Ficoll oder Percoll hMSZ isoliert und in einer standardisierten Zelldichte kultiviert. Nach Caplan et al. können die so gewonnenen Zellen bis zu über 40 mal passagiert werden ohne ihre Multipotenz entlang der mesenchymalen Linie zu verlieren, obwohl ihre Wachstumsrate reduziert ist. Technisch wäre es möglich, in einem 10% FKS-haltigem Medium 50-376 Mio. humane MSZ aus 10 ml Knochenmarkaspirat eines erwachsenen Spenders zu gewinnen (Pittenger et al., 1999).

Die Zahl der aus dem Knochenmarkaspirat gewonnenen hMSZ kann verschiedenen Untersuchungen zu Folge zwischen 1 in 10^4 und 1 in 10^6 mononukleären Zellen (MNZ) liegen. Für eine genauere Bestimmung der Anzahl von hMSZ, kann z.B. der Colony-Forming Unit Fibroblast-Assay herangezogen werden. Mit Hilfe dieses Assays ist es möglich, adhärenz Zellpopulationen über individuelle Foci bzw. Kolonien, die jeweils von einer einzigen Vorläuferzelle abstammen, zu identifizieren und quantifizieren.

2.7. Therapeutische Anwendung mesenchymaler Stromazellen

Der therapeutische Nutzen mesenchymaler Stromazellen wurde in den letzten Jahren intensiv durch Anwendung an Tieren untersucht. Es entstanden Kleintiermodelle, v.a. an Kaninchen, Maus

und Ratte (Zander et al., 2002), und Großtiermodelle, v.a. an Hund, Schwein und Schaf. Die dadurch erhaltenen Ergebnisse wiesen auf eine vielfältige therapeutische Nutzbarkeit hin.

Tissue Engineering

Viele Menschen leiden unter degenerativ bedingten Knochen- und Knorpelerkrankungen, sowie solchen, die nach Frakturen, rekonstruktiven Eingriffen oder Tumorexzisionen entstanden sind. Daher ist eine mögliche Reparatur von Knochen und Knorpel von großem Interesse. Der Einsatz humaner, adulter Stammzellen gewinnt in diesem Bereich immer mehr an Bedeutung, da sie mit ihrer hohen Proliferationskapazität und ihrer Möglichkeit zur Differenzierung in verschiedene mesenchymale Gewebe die idealen Ausgangszellen für die Konstruktion biotechnologisch hergestellten Knochenersatzes zu sein scheinen.

In einem präklinischen Großtiermodell an segmentalen Defekten am Hund konnte gezeigt werden, dass autologe MSZ isoliert, in vitro expandiert und mit einem porösen Kalziumphosphatträger kombiniert die Reparatur eines Femurdefektes von kritischer Größe positiv beeinflussten. Ebenso ist die Reparatur von Gelenkknorpeldefekten unter Verwendung natürlicher und synthetischer Trägermaterialien am Tier bereits beschrieben (Wakitani et al., 1994; Caplan et al., 1997).

Transplantation

Erste klinische Erfahrungen mit MSZ liegen in der Knochenmarktransplantation vor. Es wurde beobachtet, dass adulte humane MSZ durch Sekretion von Zytokinen wie TGF- β die Proliferation von T-Lymphozyten und die zellvermittelte Lympholyse zytotoxischer Lymphozyten hemmen (Di Nicola et al., 2002) und somit immunsuppressive Eigenschaften besitzen (Bartholomew et al., 2002). Diese spielen vor allem im Bereich der allogenen Knochenmarktransplantation eine wichtige Rolle. So ist es z.B. bei der Transplantation hämatopoetischer Stammzellen möglich, durch gleichzeitige Verabreichung von MSZ eine Spender-gegen-Wirt-Reaktion abzuschwächen oder sogar teilweise zu verhindern (Frassoni et al., 2002). Le Blanc et al. (2004) konnten in einer Einzelfallbeschreibung zeigen, dass eine intravenöse Gabe von MSZ bei therapierefraktärer Spender-gegen-Wirt-Reaktion Grad IV nach einer haploidenten Stammzelltransplantation eine heilende Wirkung hatte.

Bedingt durch eine verringerte Immunreaktion (Sturgeon et al., 2002) führte die Gabe von MSZ in Tierexperimenten auch zu einer Verlängerung des Überlebens von allogenen Hauttransplantaten. Der diesen Ergebnissen zu Grunde liegende Mechanismus ist nicht vollständig aufgeklärt, jedoch geht man davon aus, dass das Fehlen des Haupthistokompatibilitätskomplexes II (MHC II) und kostimulatorischer Moleküle dabei eine Rolle spielt.

Gentherapie

MSZ können auch im Bereich der Gentherapie Anwendung finden. Dabei werden retrovirale Vektoren in die Zellen eingebracht, um die Bildung bestimmter Substanzen zu initiieren. Die Fähigkeit von MSZ, sich in ein Zielgewebe zu integrieren und dort in ein funktionelles Gewebe zu differenzieren, zeigt ihr Potential als Träger eines therapeutischen Gens und als Quelle zur dauerhaften oder transienten Ausschüttung eines Therapeutikums. So konnte in klinischen Studien der Erbkrankheit Osteogenesis imperfecta nach der Transplantation von MSZ eine Zunahme der Knochendichte, ein Anstieg der Wachstumsgeschwindigkeit und ein Rückgang der Frakturhäufigkeit beobachtet werden (Horwitz et al., 1999; 2001).

Eine intravenöse Gabe von MSZ führte bei Patienten mit metachromatischer Leukodystrophie zur signifikanten Besserung der Nervenleitgeschwindigkeit. Bei Patienten mit Hurler-Pfaundler-Krankheit zeigte sich nach der Infusion von MSZ eine langsam zunehmende Knochendichte (Koc et al., 2002).

Die Arbeitsgruppe um Chuah (Chuah et al., 2000) konnte im Kleintiermodell demonstrieren, dass mit Hilfe von MSZ eine Gentherapie der Hämophilie A angestrebt werden kann. Sie führten eine Infusion von MSZ, die mit einem retroviralen Vektor für Faktor VIII versehen waren, durch. So war es möglich, eine Produktion von Faktor VIII in einem therapeutischer Spiegel zu erreichen.

Die vorliegenden Ergebnisse, welche die vielfältige Einsetzbarkeit von MSZ in der Klinik andeuten, scheinen vielversprechend zu sein. Es bleiben aber Fragen offen, die u.a. die Halbwertszeit und Menge der in vivo produzierten Proteine, die Sicherheit der viralen Vektoren und die immunologische Antwort auf die viralen Proteine betreffen. Daher ist eine weitgehende Aufklärung des Wachstums- und Differenzierungsverhaltens dieser multipotenten Zellen erforderlich. Mit diesen Fragen beschäftigen sich zur Zeit viele Arbeitsgruppen sehr intensiv. So deuten Ergebnisse von Prockop et al. darauf hin, dass die Gewebe- und Zellreparaturen mit MSZ u.a. auch durch Zellfusionen möglich sein könnten (Prockop et al., 2003). Bis vor kurzem wurde noch angenommen, dass diese Reparaturen im Wesentlichen durch das Erzeugen eines Milieus, welches die Regeneration der endogenen Zellen fördert, erfolgen oder auf der Transdifferenzierung beruhen.

2.8. Side population Zellen

Diese Zellen erhielten ihren Namen dadurch, dass sie bei der Analyse mittels Durchflusszytometrie eine separate Population an der Seite der Hauptpopulation bilden. Sie sind

charakterisiert durch das effektive Ausschleusen des Farbstoffes Hoechst 33342 oder Rhodamin und weisen eine hohe Anreicherung an Langzeit-Stammzellen auf.

Verglichen mit unfraktioniertem KM zeigten SP-Zellen eine etwa 200fach gesteigerte CFU-Kapazität. Im Transplantationsversuch konnten SP-Zellen das KM letal bestrahlter Mäuse mit hämatopoetischen Zellen aller Reihen repopulieren (Goodell, Brose et al. 1996). SP-Zellen wiesen somit klassische Charakteristika von SZ auf.

Neben dem Knochenmark sind SP-Zellen in fast allen Geweben zu finden. Diese Tatsache wirft die Diskussion auf, dass die SP-Zelle identisch mit der gewebeständigen Stammzelle sein könnte. Ein Erklärungsversuch für das Vorkommen der SP-Zelle in den Geweben wäre, dass diese Zellen aus dem Knochenmark in die Gewebe einwandern.

2.9. Gewebeständige Stammzelle

Hierzu zählen die hepatische Stammzelle, die kardiale Stammzelle, die pankreatische Stammzelle, die Skelettmuskelstammzelle, die Stammzelle der Haut und des intestinalen Epithels. Sie bilden einen Proliferationspool und dienen u.a. dazu, bei Gewebeverletzungen das nekrotische Gewebe zu ersetzen.

2.10. Stammzellplastizität

Bis vor wenigen Jahren nahm man an, dass multipotente Stammzellen eines bestimmten Gewebes einem hierarchischen Differenzierungsweg folgend nicht dazu fähig wären, Zellen eines anderen Gewebes zu erzeugen. In einer Reihe von Studien konnte aber gezeigt werden, dass beispielsweise Knochenmarkszellen nach Transplantation zu einem unterschiedlichen Ausmaß in nicht hämatopoetischen Geweben des Empfängers zu finden sind. Dieser Vorgang, welcher mit dem Verlust von gewebespezifischen Eigenschaften und der Ausbildung von Kennzeichen eines anderen Gewebes einhergeht, wird als Transdifferenzierung bezeichnet. Derartige Beobachtungen wurden mit dem Phänomen der Stammzellplastizität erklärt.

Dabei wird als Stammzellplastizität die Fähigkeit von gewebespezifischen Stammzellen bezeichnet, eine Nachkommenschaft zu erzeugen, die Eigenschaften eines anderen Gewebetyps besitzt. So wurde im Tiermodell nachgewiesen, dass aus Neuronen oder Muskelzellen Blutzellen entstehen und dass Hautzellen zu Nervenzellen transdifferenzieren können. Die Ursachen der hohen Plastizität adulter gewebespezifischer Stammzellen sowie die Mechanismen ihrer

Transdifferenzierung in andere Zelltypen sind noch nicht bekannt. Man geht davon aus, dass die Stammzellen in ihrer Mikroumgebung durch spezifische Proteine reprogrammiert werden können (Watt und Hogan, 2000).

Theoretisch verfügt die Stammzelle über mehrere Möglichkeiten, ihr linienspezifisches Verhalten zu verändern (siehe Abb. 3).

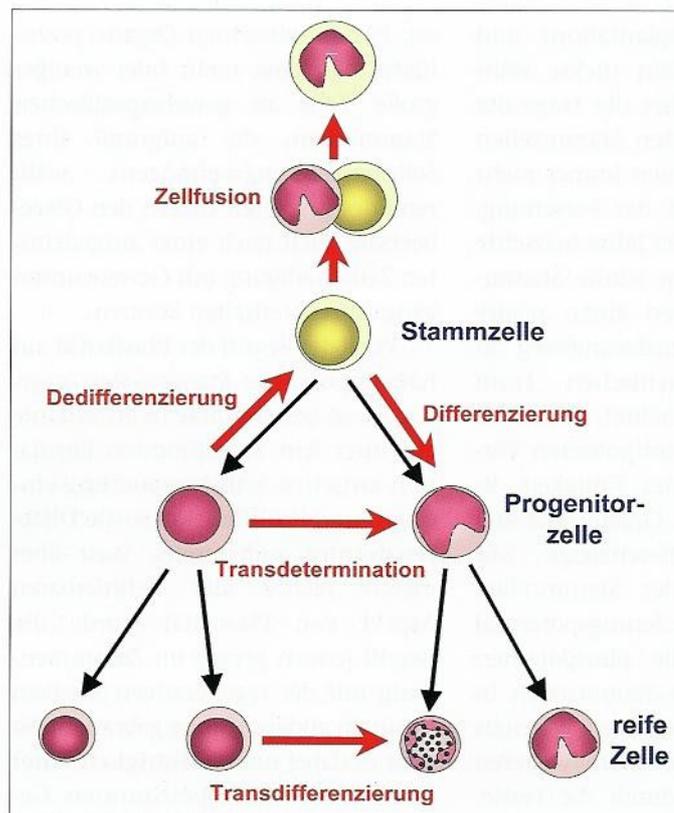


Abb. 3: Mögliche Mechanismen der Stammzellplastizität (aus Fragen und Antworten zur hämatopoetischen Stammzelle von R. Haas/R. Kronenwett)

Eine Alternative wäre die Transdetermination, bei der eine Zelle, die für einen bestimmten Differenzierungsweg vorprogrammiert ist, auf den Differenzierungsweg einer anderen Zelle umspringt und reife Zellen dieses neuen Gewebetyps produziert. Auch könnte die Plastizität über eine Dedifferenzierung erklärt werden. Dabei fällt die Stammzelle oder Progenitorzelle auf ein früheres Differenzierungsniveau zurück und kann eine neue Entwicklungsrichtung einschlagen.

Andere Studien erklären Plastizitätsphänomene mit Zellfusionen. Hierbei gelangt der Zellkern einer reifen, liniendeterminierten Zelle in eine Stammzelle, wodurch ein neues genomisches Repertoire zur Verfügung steht. Die so entstehenden Heterokaryone sind in der Lage, sich weiter zu teilen und zuvor stumme Gene zur Expression zu induzieren. Bisher weisen Untersuchungen

darauf hin, dass transplantierte hämatopoetische Zellen im Empfänger mit Neuronen, Herzmuskelzellen und Leberzellen fusionieren könnten.

Einige der oben aufgeführten Ergebnisse wurden durch neuere Untersuchungen angezweifelt, konnten nicht reproduziert und mussten sogar teilweise revidiert werden, so dass die Frage der Plastizität von MSZ bisher nicht eindeutig beantwortet werden kann. Auf diesem Gebiet werden noch intensiv Forschungsarbeiten durchgeführt.

2.11. Koloniebildungskapazität

Stammzellen sind in der Lage, in geeigneten Kulturmedien zu Kolonien differenzierter Progenitorzellen auszuwachsen. Hierzu wird eine Einzelzellsuspension von zu analysierenden Zellen in einem durchsichtigen, semisoliden Medium wie Methylzellulose immobilisiert. Da diese Zellen weder durch Sedimentation noch durch Migration ihre Position verändern können, ist es möglich, die Proliferationseigenschaften der klonalen Abkömmlinge dieser Zellen zu beobachten. Indem man dem Medium Wachstumsfaktoren zusetzt, kann man die Differenzierung der Zellen in unterschiedliche Richtungen induzieren und somit auch diese Eigenschaft untersuchen. Die entstehenden Kolonien sind makroskopisch sichtbare Anhäufungen von Vorläuferzellen und ihrer Nachkommen. Anhand der Anzahl der Kolonien, die als *colony forming units* (CFU) angegeben wird, ist es möglich festzustellen, wie viele proliferationskompetente Progenitoren in der ausgesäten Zellpopulation vorhanden waren. Bei mesenchymalen Stammzellen werden diese Kolonien CFU-fibroblastic (F) genannt und aus einer kolonalen Ansammlung von mehr als 30-50 Zellen gebildet.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Untersuchungsmaterial

Nach vorheriger, detaillierter Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der gesunden Probanden gemäß der Richtlinien der Hamburger Ethikkommission, erfolgte die Entnahme von Knochenmark bei 8 Probanden operativ im Rahmen einer Knochenmarkspende und bei 3 Probanden ambulant durch Beckenkammaspiration nach Lokalanästhesie in der Klinik für Stammzelltransplantation der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf.

Die Entnahme von Knochenmarkspiraten ist ein klinisch etabliertes Standardverfahren und stellt hinsichtlich der zellulären Zusammensetzung unter geeigneten Bedingungen eine nahezu jederzeit reproduzierbare Quelle zur Gewinnung von hMSZ dar.

3.1.2. Zellkulturmedium

Kulturmedium:

Medium 1 (M1):

DMEM-LG (Dulbecco's Modified Eagle Medium/low glucose, Gibco, Karlsruhe, Deutschland), enthält bereits 1% Glutamin

- Zusätze:

1% Penicillin/Streptomycin (P/S; Gibco, Karlsruhe, Deutschland),

10% fötales Kälberserum (FKS; BioWhittaker, Apen, Deutschland)

Medium 2 (M2):

α -MEM:

- Zusätze:

1% Glutamin (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

1% Penicillin/Streptomycin (P/S; Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

10% fötales Kälberserum (FKS; BioWhittaker, Apen, Deutschland)

Medium 3 (M3):

α -MEM

- Zusätze:

1% Glutamin (Gibco, Karlsruhe, Deutschland),

1% Penicillin/Streptomycin (P/S; Gibco, Karlsruhe, Deutschland),

10 IU Heparin (Roche, Grenzach-Wylen, Deutschland, 5000 IU/ml) per
5 ml Medium,

5% Thrombozytenkonzentrat (platelet lysate/PL)

Medium 4 (M4):

LP02 (low protein medium for adherent cells; MacoPharma, Langen, Deutschland)

- Zusätze:

10 IU Heparin (Roche, Grenzach-Wylen, Deutschland, 5000 IU/ml) per
5 ml Medium,

5% Thrombozytenkonzentrat (platelet lysate/PL)

Fötale Kälberserum

Das fötale Kälberserum (500 ml) wurde nach dem Kauf bei -20°C gelagert, vor Anwendung aufgetaut und aliquotiert. Danach erfolgte eine Weiterlagerung bei -20°C. Zur Verwendung in der Zellkultur wurde ein einzelnes Aliquot aufgetaut und dem Medium zugesetzt.

Bei dem verwendeten FKS handelt es sich um eine Charge, welche zuvor mit humanen MSZ selektioniert wurde. Die Charge, welche die beste Expansion, Differenzierung (adipogen, osteogen und chondrogen) und den benötigten Phänotyp an humanen MSZ erreichte, wurde ausgewählt und für alle weiteren Untersuchungen eingesetzt.

Plättchenreiches Plasma (PRP)

Für die Herstellung des Platelet lysate (PL) dienten entweder gepoolte Thrombozytenkonzentrate, die für die Anwendung am Menschen bestimmt waren (produziert in der Blutbank der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf, aus 5 Spendern) oder 7-13 gepoolte Buffy coats mit einer Plättchenkonzentration von $1,2-1,9 \times 10^9$ /ml. Letztere wurden bei $200 \times g$ für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde großzügig ohne Kontamination von Erythrozyten abgenommen und das Sediment diente als plättchenreiches Plasma (PRP = platelet rich plasma). Nach Aliquotieren in 1,5 und 2 ml Eppendorfröhrchen, wurde das PRP bei -80°C eingefroren und unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut. Nach Zentrifugation der Eppendorfröhrchen für 10 Minuten

bei 4000 x g wurde der Überstand ohne Kontamination durch Plättchenmembran-Reste abgenommen und für die Zellkultur verwendet (= Plättchenlysat/PL).

Einmal aufgetautes PRP wurde nicht noch einmal eingefroren, sondern nach Entnahme der notwendigen Menge entsorgt.

3.1.3. Lösungsmittel und Chemikalien

Dichtegradient:

- Percoll

Dichte: 1,068 g/ml

Waschmedium / Lösungsmittel:

- Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

- 0,25 % Trypsin-EDTA (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

- 100% Ethanol (Merck, Deutschland)

- Aqua dest. (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland)

Osteogene Induktions- und Färbesubstanzen:

- Dexamethason (Fluka, Buchs/Schweiz; 3,92 mg auf 10 ml aq. dest. = 10^3 M, 1:100

Verdünnung in entsprechendem Medium = 10^5 M)

- 5 mM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat (= AsAP, Sigma, Deisenhofen/Deutschland; 1,45 g auf 10 ml aq. dest. = 500 mM, 1:100 Verdünnung in entsprechendem Medium = 5 mM)

- 1 M β -Glycerophosphat (Sigma, Steinheim/Deutschland; 2,16 g auf 10 ml aq. dest. = 1 M)

- 4% Formaldehyd (Merck, Darmstadt/Deutschland; 4 ml der 37%igen Lösung auf 33 ml PBS verdünnt)

- 6% Silbernitrat (Merck, Darmstadt/Deutschland; 0,6 g auf 10 ml aq. dest.)

- Hämalaun (Merck, Darmstadt/Deutschland; Mayers Hämalaunlösung)

- Paraffinöl

Adipogene Induktions- und Färbesubstanzen

- 100 μ M Dexamethason (Fluka, Buchs/Schweiz; 3,92 mg auf 100 ml aq. dest. = 10^4 M)

- 10 mM Isobutylmethylxanthine (Fluka, Buchs/Schweiz; 222,3 mg auf 100 ml

Medium = 100 nM, kurz erhitzen, bei 37°C auftauen bis Lösung klar ist)

- 50 mM Indomethazin (Fluka, Buchs/Schweiz; 178,9 mg auf 10 ml Ethanol = 50 mM)

- 10 mg/ml Insulin (Sigma, Steinheim/Deutschland; aus Pankreas vom Rind, 27 USP units/mg)
- 10% Formalin (Merck, Darmstadt/Deutschland; 10 ml der 37%igen Lösung auf 27 ml PBS)
- Oil red-B (Chroma; Sudan-Rot B, 0,2-0,3 g in 100 ml 70%igem, heißem Ethanol gelöst, geschüttelt und danach 24 Stunden bei 60°C aufbewahrt, anschließend erkalten gelassen und filtriert)
- Paraffinöl

Chondrogene Induktions- und Färbesubstanzen

- 2%ige Alginat-Lösung (Sigma, Steinheim/Deutschland; Alginic acid, low viscosity, 1 g auf 50 ml 0,9% NaCl unter starkem Schütteln bei 37°C auflösen, sterilisieren durch Autoklavieren für 20 min bei 121°C oder Filtrieren durch 0,22 µM-Filter)
- 0,1 M CaCl₂ (Merck, Darmstadt/Deutschland; 1,47 g CaCl₂ auf 100 ml aq. dest., sterilfiltrieren)
- 10% Formalin (10 ml der 37%igen Lösung auf 27 ml PBS)
- Alcian-Blau-Lösung
 - a) 50 mg Alcian-Blau 8 GX (Sigma, Steinheim/Deutschland) in 50 ml 0,9% NaCl plus 6 ml konzentrierte Essigsäure, pH 1,5)
 - b) 4 g MgCl₂ (Fluka, Buchs/Schweiz) in 50 ml 0,9% NaCla und b mischen; 3 Tage stehen lassen und vor Gebrauch immer durch einen 0,45 µm-Filter filtrieren
- 2% Essigsäure (2 ml konzentrierte Essigsäure mit 98 ml aq. dest. mischen)
- Ethanolische Lösungen:
 - 30% Ethanol: 30 ml abs. Ethanol + 70 ml aq. dest.
 - 50% Ethanol: 50 ml abs. Ethanol + 50 ml aq. dest.
 - 70% Ethanol: 70 ml abs. Ethanol + 30 ml aq. dest.
 - 90% Ethanol: 90 ml abs. Ethanol + 10 ml aq. dest.
- Xylol (Merck, Darmstadt/Deutschland)
- Entellan (Merck, Darmstadt/Deutschland)

Antikörper für die Durchflusszytometrie:

- Maus IgG1, FITC markiert
- Maus IgG1, PE markiert

- anti-human CD34, PE markiert (Becton Dickinson-Biosciences/Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
- anti-human CD45, PE (Beckman Coulter-Biomedical Research, Krefeld, Deutschland)
- anti-human CD59, FITC (Heidelberg, Deutschland)
- anti-human CD90, FITC markiert (Beckman Coulter-Biomedical Research, Krefeld, Deutschland)
- anti-human CD105, FITC markiert (Serotec, Eching, Deutschland)

3.1.4. Plastikmaterial und Geräte

- 6-Loch-Platten (Cellstar®) (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
- 96-Loch-Platten
- 25 cm² Zellkulturflaschen (BD Falcon®, BD Biosciences – Labware Europe, Le Pont De Claix,
- 75 cm² Zellkulturflaschen (Cellstar®) (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
- Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml; Falcon®, BD-Labware Europe, Le Pont De Claix, Frankreich)
- Eppendorf Tubes (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
- Neubauer-Zählkammer
- Pipettierhilfen
- Sterilbank
- Brutschrank
- Laborwaage
- Zentrifuge
- Mikroskop
- Digitalkamera
- Wasserbad
- Durchflusszytometer Calibur, Becton Dickinson, mit CellQuest Software
- Kühlschränke
- Glasobjektträger und Deckgläser
- Vortexer

3.2. Methoden

3.2.1. Isolierung mesenchymaler Stromazellen

Das frisch gewonnene Knochenmark wurde 1:1 mit PBS verdünnt und mit Hilfe des Dichtegradienten Percoll mit einer Dichte von 1,068 g/ml durch Zentrifugation bei 800 x g und 20°C für 20 min ohne Bremsfunktion aufgetrennt. Bei dieser Art der Dichtegradientenzentrifugation sammeln sich die mononukleären Zellen einschließlich MSZ in der Interphase an, während Knochenstückchen, Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte am Boden des Röhrchens sedimentieren (Abb. 4).

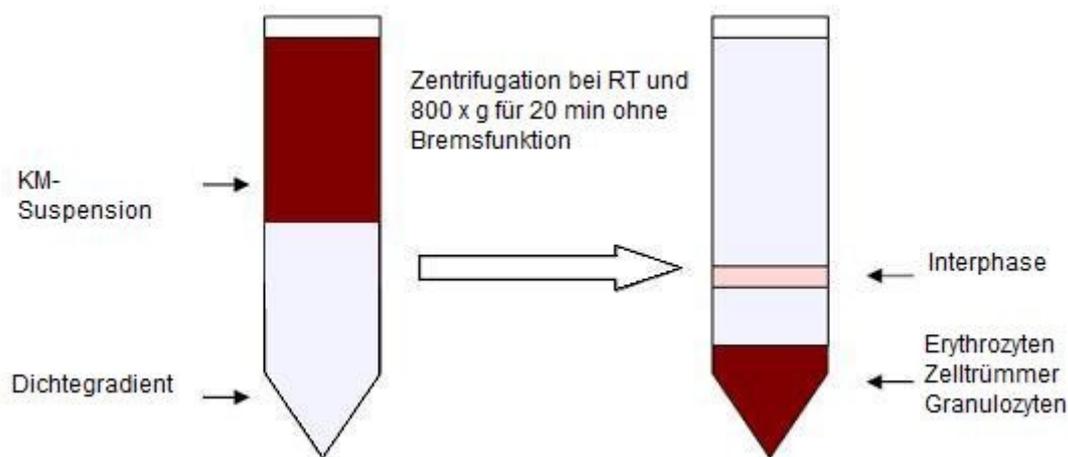


Abb. 4: Isolierung von MNZ durch Dichtegradientenzentrifugation. Der Dichtegradient wird mit KM-Suspension vorsichtig überschichtet und ohne Bremsfunktion zentrifugiert. Die Fraktion der MNZ positioniert sich in der Interphase oberhalb des Dichtegradienten, während Partikel mit höherer Dichte am Boden des Gefäßes sedimentieren.

Die MNZ wurden anschließend mit einer Pipette aus der Interphase abgesaugt und in ein 50 ml Röhrchen gegeben. Nach Zugabe von PBS erfolgte eine 7 min lange Zentrifugation bei 400 x g und 20°C erneut ohne Bremsfunktion. Der Überstand wurde abgekippt und in DMEM (serumfrei) aufgeschwemmt. Nachdem das Sediment und das Medium mit der Pipette resuspendiert wurden, erfolgten die Bestimmung der Zellzahl und das Aussäen in die jeweiligen Zellkulturgefäße.

In der Literatur findet man verschiedene Verfahren, mit denen versucht wurde, eine größere Homogenität in der Zellpopulation der mesenchymalen Stromazellen zu erreichen (Baksh et al., 2003; Mareschi et al., 2001). So wurde von Hung et al. der Einsatz eines Siebes vorgeschlagen, um die hMSZ mit hohem Proliferations- und Differenzierungspotenzial anhand ihrer Größe

abzutrennen (Hung et al., 2002). Andere haben versucht, eindeutige Marker für die geeigneten undifferenzierten hMSZ zu finden, um sie mit Hilfe eines Zellsorters auszusortieren (Van Vlasselaer et al., 1994; Waller et al., 1995; Zohar et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit wird davon Gebrauch gemacht, dass der im Knochenmark enthaltene Anteil von hMSZ auf Zellkulturplastik adhäriert, während die Masse der restlichen Zellen in Suspension verbleibt und dadurch mit jedem Medienwechsel langsam ausgedünnt wird. Während der ersten Medienwechsel wurden die Zellkulturen außerdem gründlich mit PBS gewaschen, um möglichst frühzeitig viele nicht-hMSZ zu entfernen.

3.2.2. Zellkulturen in der 6-Loch-Platte

Durch den Colony-Forming Unit Fibroblast-Assay (CFU-F-Assay) werden adhärente Zellpopulationen über individuelle Kolonien, die jeweils von einer einzigen Vorläuferzelle abstammen, quantifiziert. Die CFU-F Aktivität wurde an jedem Spender-KM in allen vier Medien nach der Methode von Castro-Malaspina (Castro-Malaspina et al., 1980) getestet. Dazu wurden die MNZ in 6-Loch-Platten mit je 3 ml des entsprechenden Mediums in Konzentrationen von 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 und 10^6 Zellen/Loch ausgesät. Die Inkubation erfolgte bei 37°C , 5 vol% CO_2 und einer Luftfeuchtigkeit von mindestens 95%. Nach 2-3 Tagen wurden nichtadhärente-Zellen mit PBS ausgewaschen und ein Mediumwechsel fand statt. Als die Inkubationszeit 14 Tage erreicht hatte, wurden die Wells erneut mit PBS gewaschen und anschließend 5 Minuten mit Methanol fixiert. Danach erfolgte eine Färbung mit 1%iger Kristallviolett-Lösung erneut für 5 Minuten. Schließlich wurde die Kristallviolett-Lösung mit Leitungswasser runtergewaschen und die Platte luftgetrocknet. Unter einem Mikroskop wurden die Kolonien mit mind. 50 Zellen gezählt.

3.2.3. Zellkulturen in 25 cm² Flaschen

Die Kultivierung der MSZ fand nach Caplan et al. statt. Es wurden 4 T25-Flaschen mit jeweils 1×10^7 Zellen/5 ml von einem der vier verschiedenen oben aufgezählten Medien M1-M4 gefüllt. Diese Medien ermöglichen eine Expansion der Zellen unter Bedingungen, welche keine Differenzierung der Zellen induziert. Alle Zellkulturen wurden im Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37°C , 5 vol% CO_2 und einer Luftfeuchtigkeit von mindestens 95% inkubiert. In der Regel wurde das Medium während der gesamten Kultivierungszeit alle 3 Tage ausgetauscht. Das Auftauen von PL und FKS erfolgte jeweils frisch vor dem Zusetzen in das entsprechende

Medium. Am Kulturtag (KT) 3 der Primärkultur (PK) fand der erste Medienwechsel statt. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellkulturen als P0 bezeichnet.

Vor dem Mediumwechsel wurden die Platten leicht geschwenkt, so dass sich die am Boden abgesetzten Rundzellen lösten und so beim Wechsel des gesamten Kulturmediums fast vollständig entfernt werden konnten. Das alte Medium wurde mit sterilen Pipetten abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Mit dem Austausch des Mediums war auch ein Entfernen aller bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht adhärenen MSZ verbunden. Nach zwei bis drei Wochen erhielt man dadurch einen homogenen, konfluenten Monolayer von MSZ. Bei 90-95%iger Konfluenz der MSZ wurde das Kulturmedium entnommen. Anschließend erfolgten das Waschen der Zellkulturen mit PBS und die Inkubation mit 0,25% Trypsin-EDTA über 5 min bei 37°C im Brutschrank. Unter dem Mikroskop wurde kontrolliert, ob sich die Zellen von der Plastikfläche gelöst hatten. Die Trypsinreaktion wurde durch den Zusatz des jeweiligen Kulturmediums gestoppt. Um eine Adhäsion der MSZ an der Oberfläche des Röhrchens zu verhindern wurde die erhaltene Zellsuspension auf Eis gelagert. Nach einer Resuspension der Zellen mit dem Medium erfolgte die Zellzählung, wobei zur Bestimmung der Zellzahl die Neubauer-Kammer Gebrauch fand. Es folgte die Aussaat der so erhaltenen Zellen mit einer Zellzahl von ca. 500 MSZ/cm² in 25 cm²-Kulturflaschen auf 5 ml Kulturmedium, um gleiche Ausgangsbedingungen für die nun als P1 bezeichneten MSZ zu schaffen. Sowohl das Wechseln des Zellkulturmediums als auch das Passagieren der Zellen erfolgten unter einer Arbeitsbank, welche durch einen kontinuierlichen laminaren Luftstrom ein steriles Arbeiten ermöglichte.

3.2.4. Zellkulturen in 75 cm² Flaschen

Ab P5 wurde parallel zu jeder T25-Kultur mit 75 cm²-Kulturflaschen gearbeitet, in denen sich 15 ml des entsprechenden Mediums befanden. Die Behandlung erfolgte analog zu den T25-Kulturflaschen und die hierbei kultivierten Zellen sind für die Bestimmung der Oberflächenmarker eingesetzt worden.

3.2.5. Quantifizierung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypan-Blau Färbelösung in einem Loch einer 96-Loch-Platte 1:10 verdünnt, um den Anteil vitaler Zellen zu ermitteln. Die

Anzahl der toten Zellen wurde separat festgehalten. Eine Neubauerzählkammer diente der Auszählung. Die Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{\text{Zellzahl (4 Großquadrate)}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10'000$$

3.2.6. Osteogene Differenzierung

Die osteogene Differenzierung (Jaiswal 1997, modifiziert) erfolgte in 24-Loch-Platten mit MSZ der 6. Passage in jeweils 3 Wells pro Fragestellung, weitere 2 Wells dienten als Kontrolle.

Mit einer Präzisionswaage (Mettler, Deutschland) wurden die osteogenen Induktionssubstanzen eingewogen, unter Verwendung von PBS in Lösung gebracht und vor dem Aliquotieren mit einem 0,22 µm Filter (Merck, Bruchsal Deutschland) steril filtriert. Zum Medienwechsel wurden die bei -20°C gelagerten Stammlösungen frisch aufgetaut. Die Endkonzentration im Medium (osteogenes Induktionsmedium) wurde durch eine Verdünnung der Stammlösungen im Verhältnis von 1:100 erreicht.

Die Induktionssubstanzen Ascorbinsäure, β-Glyzerophosphat und Dexamethason wurden dem DMEM unter Zusatz von PRP bzw. FKS ab dem Tag der Aussaat hinzugefügt. Am KT 21 erfolgte die Färbung nach von Kossa. Mit dieser Färbung wird die Bildung einer mineralisierten Matrix nachgewiesen. Das in Carbonaten und Phosphaten der Matrix gebundene ungelöste Kalzium wird durch Silberionen ausgetauscht und zu metallischem Silber reduziert. Kalziumhaltige Zonen färben sich braun-schwarz und lassen so deutlich den Grad der Mineralisierung erkennen. Dafür wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums und einem Waschgang mit PBS mit 4% Formaldehyd für 10 min inkubiert und fixiert. Das Fixierungsmittel wurde anschließend mit aq. dest. ausgewaschen. Nachdem die Platte luftgetrocknet war, erfolgte die Färbung mit 6% Silbernitratlösung für 10 min unter Einwirkung von energiereichem UV-Licht. Die Platte wurde danach erneut mit aq. dest. gewaschen und 1 min mit Hämalaun gegengefärbt. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschgang mit aq. dest. und das Einbetten in Paraffinöl. Die Ergebnisse wurden mikroskopisch ausgewertet und fotografisch festgehalten.

3.2.7. Adipogene Differenzierung

Die adipogene Differenzierung (nach Pittenger et al., 1999) erfolgte an Zellkulturen der 6. Passage jeweils in 3 Wells pro Fragestellung, weitere 2 Wells dienten als Kontrolle.

Die adipogenen Induktionssubstanzen wurden mit einer Präzisionswaage (Mettler, Deutschland) eingewogen und Methylisobutylxanthin wurde im Medium, Indomethazin unter Verwendung von 100% Ethanol in Lösung gebracht. Dexamethason konnte in aq. dest. gelöst werden. Vor dem Aliquotieren wurden die Stammlösungen, Insulin ausgenommen, mit einem 0,22 µm Filter steril filtriert, bei -20°C gelagert und zum Medienwechsel jeweils frisch aufgetaut.

Es wurde zwischen adipogenem Induktionsmedium (AIM), welches sich aus Dexamethason, Methylisobutylxanthin, Indomethazin und Insulin zusammensetzt und adipogenem Erhaltungsmedium (AEM), das nur aus Insulin besteht, unterschieden. Aufeinander folgend wurden die Zellkulturen für 2 bis 3 Tage mit AIM und einen Tag mit AEM inkubiert. Die entsprechenden Substanzen wurden den vier verschiedenen Medien mit PRP bzw. FKS hinzugefügt.

Zum Nachweis intrazellulärer Fettvakuolen erfolgte am 21. KT die Durchführung des adipogenen Assays. Nach einem Waschgang mit PBS wurden die Zellen in 10% Formaldehyd für 10 min inkubiert und fixiert. Die Zellen wurden dann mit 50% Ethanol kurz gewaschen und anschließend für 15-30 min mit Sudan-Rot B gefärbt, wobei 10 ml der Lösung mit 1 ml aq. dest. vor der Verwendung gemischt wurden, zur Verbesserung der Färbekraft. Ein erneuter kurzer Waschgang erfolgte darauf mit 50% Ethanol. Vor dem abschließenden Waschgang mit Leitungswasser und aq. dest. wirkte Hämalaun als Kerngegenfärbung für 5 min ein. Das Einbetten in Paraffinöl bildete den Abschluss des Färbeprozesses. Der Nachweis der Adipogenese erfolgte mikroskopisch und wurde fotografisch dokumentiert.

3.2.8. Chondrogene Differenzierung

Die chondrogene Differenzierung von MSZ (mod. nach Shakibaei, 1997) ist von einer Vielzahl von Faktoren, einschließlich der Parameter Zelldichte, Zelladhäsion und Zusatz von Wachstumsfaktoren, abhängig (Johnstone et al., 1998). Als Kriterium für die Differenzierung wurde die Fähigkeit zur Bildung von Glykosaminoglykanen (GAG) herangezogen, welche durch eine Alcian-Blaufärbung erfasst werden kann. Die Einbettung von Zellen in Alginate-Gel in höherer Dichte hatte das Ziel, die Zellen räumlich zueinander zu bringen und dadurch Zell-Zell-Kontakte zu ermöglichen.

Der Differenzierungsansatz erfolgte an Zellkulturen der 6. Passage. Dafür wurden die Zellen nach dem Trypsinieren und der Zellzählung abzentrifugiert (5 min, 400 x g) und anschließend in einer Konzentration von $1,5 \times 10^6/\text{ml}$ in einem Eppendorfer Röhrchen in Alginat aufgenommen. Die so entstandene Zellsuspension wurde gut durchmischt und in eine 6-Loch-Platte in 0,1 M CaCl_2 als Tropfen gegeben. Beim Eintropfen in den Calcium-Puffer polymerisiert Alginat, so dass sich Alginatkügelchen (*Beads*) bildeten (Abb. 5).

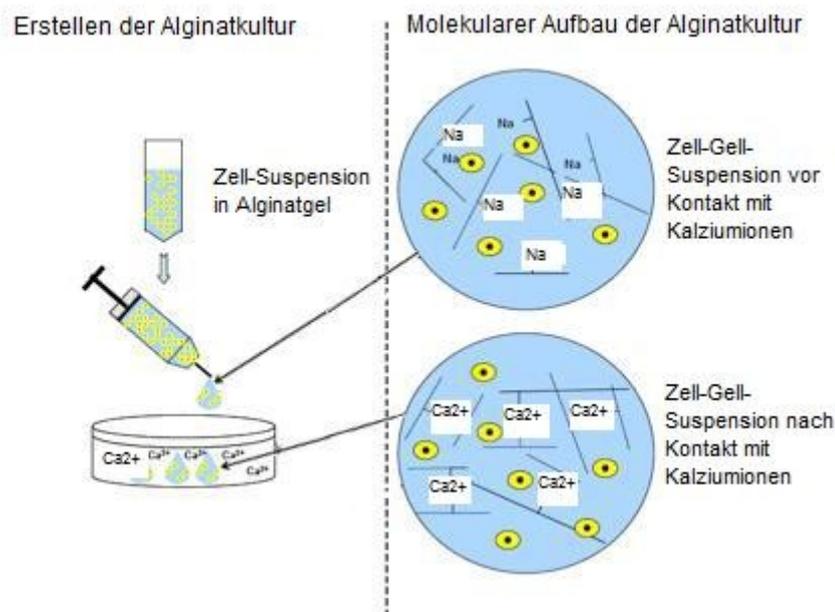


Abb. 5: Schematische Darstellung der Alginatkulturen. hMSZ werden vom Boden der Kulturflaschen enzymatisch abgelöst und in einem bestimmten Verhältnis mit Alginatgel vermischt. Diese Zell-Gel-Suspension wird mit Hilfe einer Pipette tropfenweise in eine CaCl_2 Lösung gegeben, worin die Polymerisation erfolgt. Die Abbildung zeigt den molekulären Aufbau der Alginatsuspension vor und nach der Polymerisation.

Nach 10 minütiger Gelierung bei Raumtemperatur erfolgte eine dreimalige Waschung mit 0,15 M NaCl und eine zweimalige mit dem entsprechenden Medium. Zum Abschluss wurden 3 ml Medium zur weiteren Kultivierung der Alginatkugeln hinzugegeben und die Platte für 7 Tage bei 37°C , 5 vol% CO_2 und einer Luftfeuchtigkeit von mindestens 95% im Brutschrank inkubiert. Ein Mediumwechsel war in der Zeit ein- bis zweimalig nötig.

Nach Ablauf der 7 Tage wurde eine Alcian-Blau-Färbung durchgeführt. Dazu war es nötig, die Alginatkugeln für eine Stunde in 10% Formalin zu fixieren und anschließend für 5 min in 2% Essigsäure zu waschen. Für 24 h mussten die Alginatkugeln in der Alcianblaulösung verbleiben. Danach wurden sie dreimal in aq. dest. gewaschen und in einer aufsteigenden Reihe jeweils 10 min in Ethanollösungen dehydriert. Diese Lösungen enthielten 30%, 50%, 70% und 90% Ethanol. Als Nächstes erfolgte die Dehydrierung in Xylol für 5-10 min. Zum Schluss wurden die Kugeln einzeln aus dem Xylol herausgeholt und mit Entellan zwischen einem Mikroskopierglas und einer

Deckplatte unter leichtem Druck eingebettet. Die Auswertung der Ergebnisse wurde mikroskopisch durchgeführt, die Dokumentation erfolgte fotografisch.

3.2.9. Phänotypanalyse

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Emission optischer Signale seitens der Zelle, während sie einen Laserstrahl passiert (siehe Abb. 6).

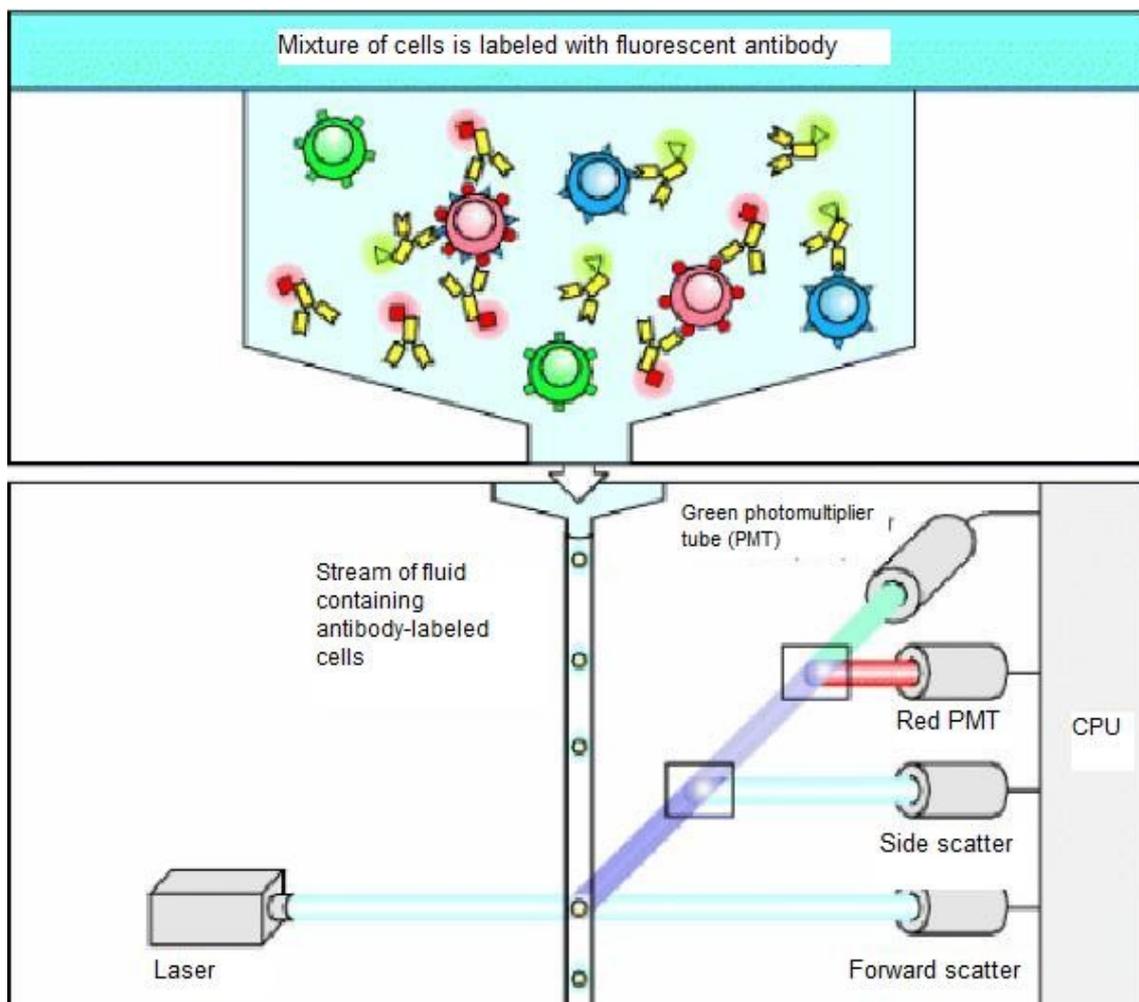


Abbildung 6: Prinzip der Durchflusszytometrie. Mit fluoreszierenden Antikörpern markierte Zellen werden in einer Trägerflüssigkeit vereinzelt an einem Laser vorbeigeführt. Die Analyse des refraktierten Laserlichtes ermöglicht Aussagen über Größe (*forward scatter*) und Granularität (*side scatter*) der Zellen und der an diese gebundenen Fluoreszenz-markierten Antikörper. (aus: Immunobiology. Janeway, Charles A.; Travers, Paul; Walport, Mark; Shlomchik, Mark. New York and London: Garland Publishing; 2001)

Hierfür werden die sich in einer Suspension befindenden Zellen in einem FACS-Röhrchen unter die Stahlkapillare des Durchflusszytometers gesteckt. Durch Überdruck wird die Suspension

durch die Kapillare gesaugt und die Zellen passieren einzeln einen Laser. Trifft der Laserstrahl eine Zelle, kommt es zur Streuung des Laserlichts und zur Aussendung von Fluoreszenzlicht.

Das Streulicht ermöglicht eine Aussage über Größe, intrazelluläre Bestandteile (Granularität) sowie Fluoreszenzintensität der Einzelzelle. Vom optischen System des Gerätes können diese physikalischen Parameter mit Hilfe von Photodetektoren erfasst, in elektrische Signale transformiert und gegebenenfalls verstärkt werden. Die Zellen können somit in Subfraktionen untergliedert und gezählt werden. Hierzu dienen zwei Parameter: das Vorwärtsstreulicht FSC (*Forward Scatter*) dient als Maß für die Zellgröße und wird durch Beugung des Lichts hervorgerufen, das Seitwärtsstreulicht SSC (*Side Scatter*) wird durch Brechung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Granularität, Membranfaltung und die äußere Form der Zelle. Kanäle verschiedener Emissionsspektren erlauben die Erfassung von Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichen Extinktions- und Emissionsmaxima (Tab. 2). Mit Hilfe von Dotplot-Diagrammen können bestimmte Regionen, welche viele Zellaggregate und Zelltrümmer enthalten, von der Auswertung ausgeschlossen werden.

Fluorophor	Extinktionsmaximum nm	Emissionsmaximum nm
Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)	495	519
R-Phycoerythrin (PE)	480,565	578

Tab. 2: Fluorophore und ihre Extinktions- und Emissionsmaxima.

Die Bestimmung der Oberflächenmarker erfolgte mittels Durchflusszytometrie an frisch trypsinierten MSZ der 6. Passage, welche aus den T75 gewonnen wurden. Nach dem Trypsinieren der Zellen wurden diese in 7 Eppendorfröhrchen so aliquotiert, dass in jedem Röhrchen eine Zellzahl von 1×10^2 enthalten war. Dann erfolgte 4 Minuten eine Zentrifugation bei $300 \times g$. Der entstandene Überstand wurde abgekippt, zum Zellsediment wurden $500 \mu\text{l}$ FACS-Puffer hinzugegeben. In jedes Röhrchen wurde $1 \mu\text{g}$ von jeweils einem Antikörper gegeben. Der Inhalt der Eppendorfröhrchen wurde unter Zuhilfenahme eines Vortexers gut durchmischt, mit Aluminium-Folie abgedeckt und somit im Dunkeln und bei Raumtemperatur für 30 min stengelassen. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Röhrchen mit FACS-Puffer aufgefüllt und bei $300 \times g$ für 4 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgekippt, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Nach Zugabe von neuem Puffer und Durchmischung am Vortexer, erfolgte eine erneute Zentrifugation bei $300 \times g$ für 4 min. Auch

jetzt wurde der Überstand abgekippt. Nach Durchmischung mit Puffer wurden die Zellsuspensionen in FACS-Röhrchen umgefüllt und es erfolgte die FACS-Analyse.

Getestet wurden die Marker CD34, CD45, CD59, CD90, CD105 unter Hinzuziehung der entsprechenden Isotypen. Die Analyse wurde mit dem Durchfluss-Zytometer FACScan und der Software CellQuest der Firma Becton Dickinson (Becton Dickinson GmbH Biosciences/Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

3.2.10. Karyotypisierung

Drei Zellpräparate wurden nach ihrer Kultivierung über 6 Passagen in PL-reichem Medium für 16 Stunden in Colchicin inkubiert, anschließend 20 min in 0,075 M KCl gegeben, in Methanol-Essigsäure (3:1) fixiert und für die Durchführung von GTG-Banden und M-FISH verwendet (Lange et al., 2007).

Multiplex-Fluoreszenz in situ Hybridisierung (M-FISH)

Die M-FISH-Technik ermöglicht die Darstellung aller 24 menschlichen Chromosomen simultan in verschiedenen Farben. Die Methode basiert auf einer kombinatorischen Markierungsstrategie, wobei unter Verwendung von 5 bzw. 7 unterschiedlichen Fluorochromen jedes Chromosom anhand der festgelegten Einzelfarbe bzw. Farbkombination identifiziert werden kann.

Im Wesentlichen besteht M-FISH aus folgenden Schritten (Azofeifa et al. 2001): Es werden 5 bzw. 7 DNA-Pools (für jedes Fluorochrom ein Pool) hergestellt. Die 24 DNA-Sonden werden in diese verschiedenen Pools aufgeteilt und mit den Fluorochromen kombinatorisch markiert. Anschließend werden diese Pools in einer DOP-PCR amplifiziert. Die DNA-Sonden im Pool werden mittels DOP-PCR mit Fluorochromen markiert und anschließend auf fixierte Chromosomenpräparate hybridisiert. Nach geeigneter Inkubationszeit werden die nicht-hybridisierten Sonden durch mehrere Wasch-Schritte entfernt und gleichzeitig die Haptene Biotin und Digoxigenin über Antikörper nachgewiesen. Die Metaphasen werden mit einer CCD-Kamera aufgenommen und mit einer speziellen Bildanalyse-Software (in diesem Fall mit MetaSystems Isis software package von MetaSystems) ausgewertet. Dabei wird durch Überlagerung der Einzelkanalbilder ein Gesamtbild erzeugt.

Diese farbige Darstellung der Chromosomen ermöglicht den Nachweis von chromosomalen Veränderungen, die mit den konventionellen Färbungen nicht eindeutig identifiziert werden können (z.B. von Markerchromosomen und kryptischen Translokationen und Insertionen).

M-FISH wurde ausgeführt, indem das 24Xyte color kit für humane Chromosomen (MetaSystems Altlussheim, Deutschland) den Empfehlungen des Herstellers folgend zur Anwendung kam. Als Fluorchrome dienten DEAC, FITC, Spectrum Orange, Texas Red und Cy5. Die DNA wurde mit Hilfe von 4,6-Diamino-2-Phenylindole dargestellt.

G-Banden

Bei dieser Technik wird vor der Färbung mit Giemsa, einem DNA-bindenden chemischen Farbstoff, das Chromatin kontrolliert denaturiert und/oder enzymatisch abgebaut (Trypsin). Die durch die Färbung resultierenden dunklen Banden in den Chromosomen werden als G-Banden bezeichnet und markieren Bereiche stark kondensierter, spät replizierender und transkriptionell inaktiver DNA. Im Gegensatz dazu werden die hellen Banden als G-negativ bezeichnet und markieren Abschnitte der DNA, die früh replizieren und transkriptionell aktiv sind. Insbesondere intrachromosomale Veränderungen wie Insertionen und Inversionen können über G-Banden identifiziert werden.

Ein Minimum von 25 Zellen wurde analysiert bei einem Band-Level von annähernd 350-450. Die Karyotypen wurden nach den Empfehlungen der ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature) von 1995 beschrieben.

3.2.11. Genexpression

Drei MSZ-Präparate wurden über drei Passagen in den Medien M1 und M4 kultiviert, um für die Analyse der Genexpression Verwendung zu finden. Anschließend wurde hochqualitative RNA isoliert, indem das Invisorb spin cell RNA mini kit (Invitex, Berlin, Deutschland) nach den Empfehlungen des Herstellers zur Anwendung kam. RNA wurde zu cRNA amplifiziert und mit Biotin-UTP dem CodeLink UniSetHuman 20K I Bioarray Protokoll (GE Healthcare/Amersham, Freiburg, Germany) entsprechend markiert. Von dieser cRNA wurden 10 µg über Nacht zu Codelink 20K Chips hybridisiert, sorgfältig gewaschen und angefärbt mit Cy5-Streptavidin. Microarrays wurden auf einem Affymetrix 428 Scanner gescannt und mit der Codelink Expression Software v4.1 quantifiziert. Die Datenanalyse erfolgte mit der statistischen Open-Source Software R.

3.2.12. Plättchenlysat: Vergleich von unterschiedlichen Präparationen und Konzentrationen

Wie auch im entsprechenden Paper der Arbeitsgruppe Lange (Lange et al., 2007) nachzulesen ist, wurden nach Zufallsprinzip drei Spender ausgewählt, um eine Zellkultivierung bis zur 6. Passage durchzuführen. Dabei kam das LP02 als Grundmedium zur Anwendung. Diesem wurden drei verschiedene PL-Präparate 5%ig hinzugefügt. Jedes dieser Präparate wurde aus einer unterschiedlichen Anzahl (7-10) von Buffy coats hergestellt, die auch durch unterschiedliche Plättchenkonzentrationen ($1,2-1,9 \times 10^9/\text{ml}$) gekennzeichnet waren.

Um die PL-Präparate für die Anwendung zur Expansion von hMSZ zu optimieren und zu standardisieren, wurden entweder verdünnte oder unverdünnte Plättchenkonzentrationen von 1,5, 1,0, 0,75 und $0,5 \times 10^9/\text{ml}$ verwendet. Die Aufbewahrung dieser Präparate erfolgte bei -80°C .

Bei der Anwendung von PL in Kombination mit LP02 entstand eine Schicht von fein granulierten Ablagerungen in den Kulturgefäßen. Um diese Ablagerungen zu vermindern, wurde das PL bei $900 \times \text{g}$ oder $8000 \times \text{g}$ zentrifugiert, bevor es dem Medium beigefügt wurde. Der Einfluss dieser Zentrifugation auf die Ausbildung von Ablagerungen und die Zellexpansion wurde über eine Zeitspanne, die bis zur 5. Passage reichte, untersucht und die gewonnenen Ergebnisse wurden untereinander verglichen.

3.2.13. Elektronische Datenverarbeitung

Alle Daten wurden mit Hilfe des Textverarbeitungsprogramms 'Microsoft Word, Version XP', den Tabellenverarbeitungsprogrammen 'Microsoft Excel, Version XP' und SPSS kalkuliert und grafisch aufbereitet. Für die statistische Auswertung fand der Student's T-Test Anwendung. P-values $< 0,02$ wurden als signifikant gewertet.

Die digitalen Aufnahmen wurden mit dem Grafikbearbeitungsprogramm 'Adobe Photoshop 6.0' verwaltet und bearbeitet.

4. Ergebnisse

4.1. Spenderdaten

Für die vorliegende Arbeit wurden von insgesamt 11 gesunden Spendern im Alter von 20 bis 65 Jahren ca. 5 ml Knochenmarkspirat verwendet. Die unten aufgestellte Tabelle zeigt die wichtigsten Spenderdaten.

Spender	Geschlecht	MNZ/ml KM
JB	♂	$8,47 \times 10^7$
OC	♀	$5,99 \times 10^7$
JR	♂	$3,8 \times 10^7$
SY	♀	$1,94 \times 10^7$
VJ	♀	$6,4 \times 10^8$
SS	♀	$6,44 \times 10^7$
DS	♂	$4,88 \times 10^7$
SB	♂	$8,85 \times 10^7$
LS	♀	$4,7 \times 10^7$
DT	♂	$5,58 \times 10^7$
KM	♂	$1,4 \times 10^8$

Tabelle 3: Spenderdaten mit Geschlecht, und Anzahl der hMSZ/ml KM

4.2. Isolation der MSZ

Von einigen Autoren ist schon gezeigt worden, dass Art und Menge der gewonnenen Zellen von der Isolierungsmethode beeinflusst werden (Lange et al., 2005). Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden mit der am häufigsten verwendeten Methode gewonnen: Auftrennung über einen Ficoll-Gradienten mit anschließender Selektion der Zellen durch Adhärenz an die Plastikoberfläche üblicher Zellkulturgefäße. Wir verglichen die Isolation von MSZ und ihre CFU-F-Aktivität unter verschiedenen Kulturbedingungen, welche durch die Anwendung unterschiedlicher Medien zustande kamen. Wie in Abb. 7 verdeutlicht, rief allein ein Zusatz, in diesem Fall von FKS oder PL, in das Grundmedium einen signifikanten Unterschied in der Isolation der MSZ aus dem Knochenmark hervor.

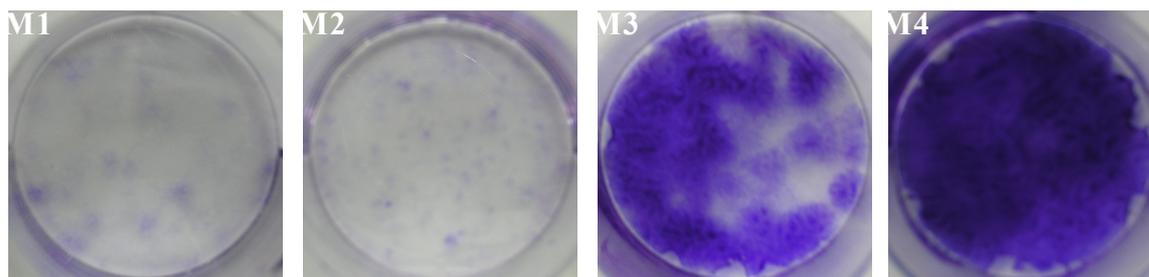


Abb. 7: Isolation von MSZ in FKS- oder PL- haltigen Medien. Die Zellen wurden in einer Menge von 1×10^5 ausgesät und 14 Tage in den wie unter Material und Methoden beschriebenen Medien M1-M4 kultiviert. Darauf folgte die Färbung mit Kristallviolett. Das anhand der Abbildung dargestellte Ergebnis ließ sich auch bei den 10 weiteren Spendern reproduzieren.

In Medien mit PL-Zusatz entstanden sowohl größere Zellkolonien als auch höher Koloniezahlen (Tab. 4).

	M1	M2	M3	M4
Mittelwert \pm SD	233 ± 77.3	$414,8 \pm 96.9$	$1181 \pm 243.5^*$	$1604 \pm 440.7^{**}$
p-value			0.014 (M2/M3)	0.015 (M1/M4)

Tab. 4: Verbesserte Isolation von hMSZ in PL-haltigem Medien. Statistische Analyse des Wachstums von CFU-F in den Medien 1-4 von 11 verschiedenen Spendern. MW \pm SA von CFU-F wurden für 10^7 ausgesäte Zellen berechnet. * $p < 0,02$ für M2/M3; ** $p < 0,02$ für M1/M4;

So resultierte aus einer Zugabe von PL anstatt von FKS in α -MEM eine Erhöhung der Koloniezahl um das 2,8fache. Beim Vergleich der Koloniezahlen in den Medien LP02 + PL und DMEM + FKS fällt sogar ein Unterschied um den Faktor 6,9 zu Gunsten von LP02 + PL auf. Hier muss noch angemerkt werden, dass in PL schon bei einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen/ml Loch-Kolonien entstanden, wohingegen bei derselben Dichte im Standardmedium keine Kolonien zu finden waren.

Auch war ein Unterschied in der Geschwindigkeit der Koloniebildung zu sehen. Während sich in PL-haltigen Medien schon ab dem 3. KT die Entstehung vieler kleiner Kolonien in der Größe von 5 bis 10 Zellen zeigte, benötigten die in FKS-haltigen Medien kultivierten Zellen in etwa doppelt so lang. Morphologische Unterschiede zwischen den Zellkulturen der jeweiligen Medien ließen sich nicht feststellen.

4.2.1. Zellmorphologie

Nachfolgend werden die lichtmikroskopisch beobachteten Veränderungen der hMSZ im Laufe der Kulturführung über mehrere Passagen beschrieben.

Adhärente hMSZ in T25-Flaschen wurden bei 40- und 100-facher Vergrößerung in Phasenkontrastmikroskopie mit einer Digitalkamera fotografiert.

In der frühen Phase der Kultur, also während P0, war das Auftreten kugeliger Zellen unterschiedlicher Größe auffällig. Diese bildeten häufig unterschiedlich große Zellkluster. Daneben waren große, längliche Zellen zu erkennen, welche im weiteren Verlauf der Kultivierung von einzelnen „Spots“ ausgehend zu flächigen, parallel wachsenden, straßenförmigen Monolayern auswuchsen. Dieses Erscheinungsbild (in Abb. 8 a-d ist die repräsentative Morphologie primärer hMSZ in P0 dargestellt) ist als charakteristische Zellmorphologie von hMSZ anzusehen, welche in dieser Form schon von einigen Arbeitsgruppen beschrieben wurde. Die erwähnten „Spots“ sind mit den in der Literatur dargestellten CFU-Fs gleichzusetzen. Nach den ersten Medienwechseln verminderte sich die Anzahl der runden Zellen und insgesamt wurde das Erscheinungsbild in den Kulturflaschen einheitlicher.

Zellkulturen mit FKS-Zusatz

Die MSZ stellten sich als lange, schlanke Zellen mit schmalen Ausläufern dar. Sie waren im Vergleich zu den Zellen des anderen Serumzusatzes aber kürzer und etwas breiter und zeigten in den späteren Passagen zum Großteil kürzere und dickere Ausläufer (Abb. 8a und b). Zellen in α -MEM wiesen eine flachere Morphologie im Vergleich zu Zellen in DMEM oder LP02 auf.

Zellkulturen mit PL-Zusatz

Die MSZ waren schlanke Zellen mit langen Ausläufern. Die dichte, nahezu parallele Anordnung dieser spindelförmigen Zellen ließ kaum die Morphologie der einzelnen Zelle erkennen. Schon in den ersten Passagen zeigte sich, dass diese Zellen morphologisch schlanker und länger waren als die Zellen in FKS (Abb. 8c und d). Diese Morphologie war in den Kulturen mit LP02 als Grundmedium sogar ausgeprägter zu erkennen und hielt bis in die späten Passagen an. So zeigten die Zellen in LP02 sogar in Passage 11 eine spindelförmige Morphologie (Abb. 10). Außerdem war zu beobachten, dass mit zunehmender Zelldichte die durchschnittlichen Zellvolumina abnahmen.

Der Gebrauch von PL in Kombination mit LP02 führte zur Ausbildung einer Schicht aus fein granulierten Ablagerungen über den Zellen, die sich von Passage zu Passage noch verdichtete.

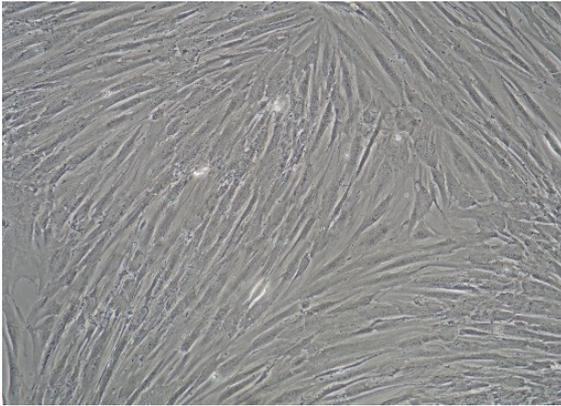


Abb. 8a: Frühe Zellmorphologie von hMSZ in P0 und M1: lange, schlanke Zellen mit schmalen Ausläufern

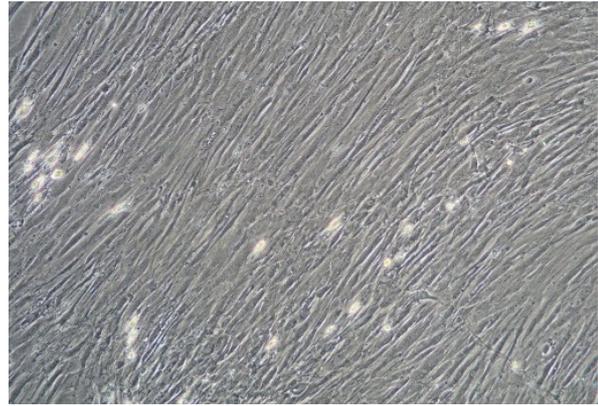


Abb. 8b: Frühe Zellmorphologie von hMSZ in P0 und M2: lange, schlanke Zellen mit schmalen Ausläufern; im Unterschied zu Zellen der anderen Kulturmedien flachere Morphologie

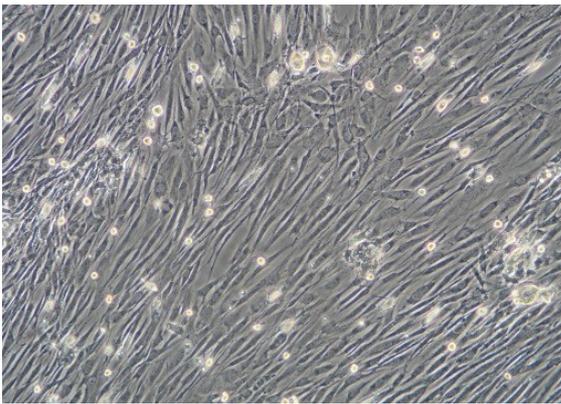


Abb. 8c: Frühe Zellmorphologie von hMSZ in P0 und M3: schlanke Zellen mit langen Ausläufern

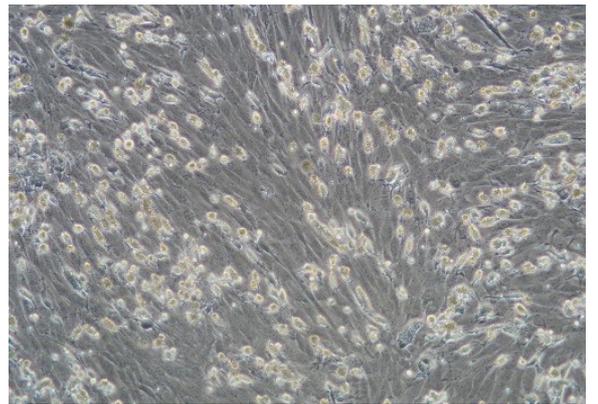


Abb. 8d: Frühe Zellmorphologie von hMSZ in P0 und M4: granulierte Ablagerungen zu erkennen

Abb. 8a-d: Repräsentative, spindelförmige Morphologie von hMSZ in den vier unterschiedlichen Medien M1-M4 in der frühen Passage (P0).

Dargestellt sind Zellen, die wie unter Material und Methoden beschrieben, in den Medien M1-M4 kultiviert worden sind. Die Aufnahmen erfolgten bei Konfluenz. Die Ergebnisse stehen repräsentativ als Beispiel für 11mal wiederholt erhaltene Ergebnisse zum Zeitpunkt P0. (40fache Vergrößerung)

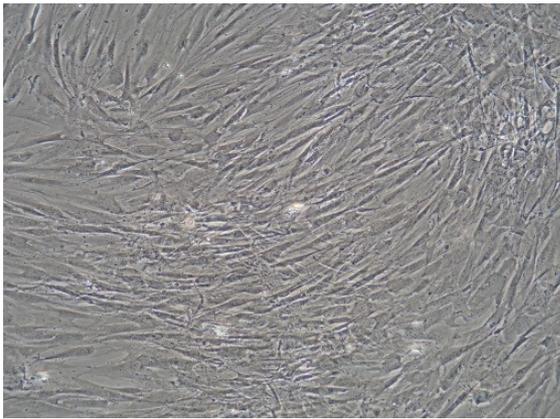


Abb. 9a: Späte Zellmorphologie von hMSZ in P5 und M1: in späten Passagen zeigen sich kürzere und dickere Ausläufer

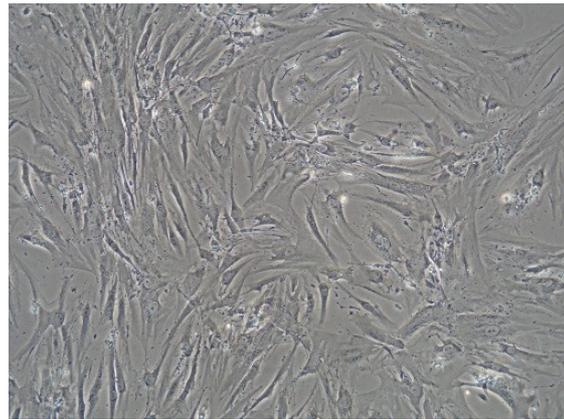


Abb. 9b: Späte Zellmorphologie von hMSZ in P5 und M2: keine parallele Zellanordnung zu erkennen, teilweise ziemlich verbreiterte Zellen mit kurzen, dicken Ausläufern

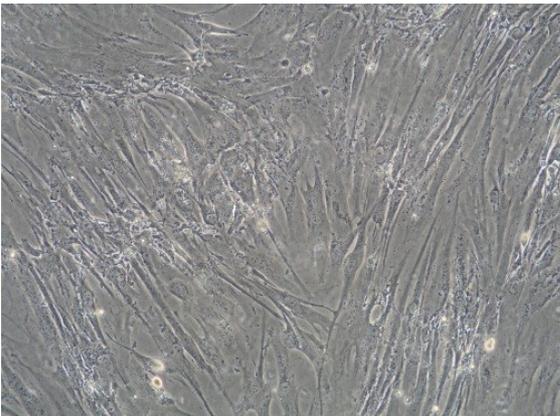


Abb. 9c: Späte Zellmorphologie von hMSZ in P6 und M3: weitgehend erhaltene parallele Anordnung der schlanken Zellen.

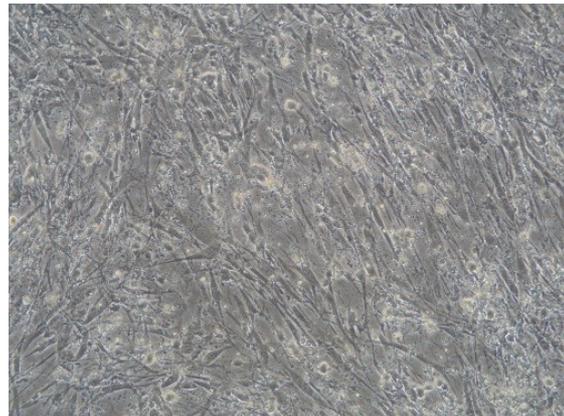


Abb. 9d: Späte Zellmorphologie von hMSZ in P7 und M4: Zellen sind immer noch sehr schlank und haben lange Ausläufer; durch Zunahme des granulierten Films über den Zellen erschwerte Beurteilbarkeit

Abb. 9a-d: Repräsentative, spindelförmige Morphologie von hMSZ in den vier unterschiedlichen Medien M1-M4 in der späten Passage (P5 oder später).

Die Fotos sind von Zellen, die wie unter Material und Methoden beschrieben, in den Medien M1-M4 kultiviert worden sind. Die Aufnahmen erfolgten bei Konfluenz und stehen als Beispiele für spätere Passagezeitpunkte. Die Fotos von M1 und M2 wurden in P5 angefertigt, wohingegen die späten Fotos von M3 und M4 in P6 oder P7 entstanden, weil diese Zellen innerhalb derselben Zeitspanne eine höhere Passagezahl erreichten. Die Ergebnisse sind repräsentativ als Beispiel für 11mal wiederholt erhaltene Ergebnisse. (40fache Vergrößerung)

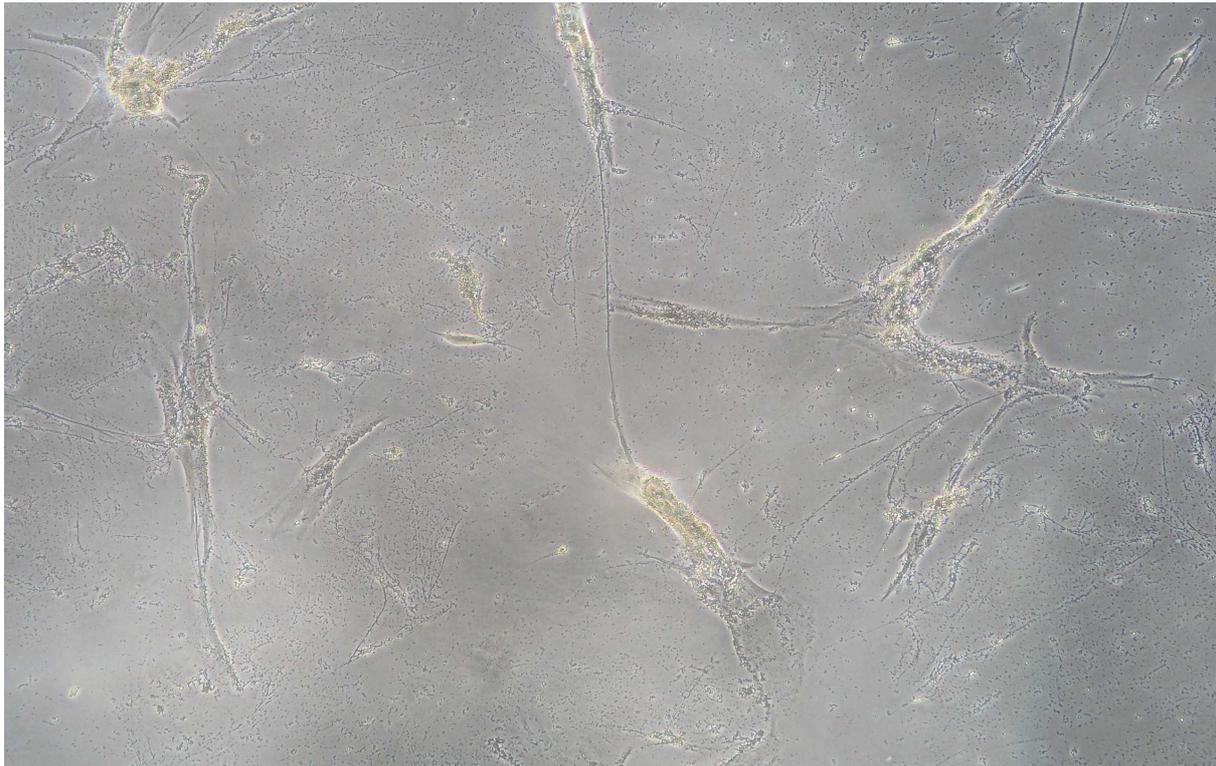


Abb. 10: Morphologie von hMSZ in M4 und einer sehr späten Passage (P11) :

Wie zu erkennen ist, behalten die hMSZ auch in P11 noch weitgehend ihre spindelförmige Morphologie bei. Sie sind jetzt jedoch größer. Durch den granulierten Zellfilm erscheint die Zellkulturflasche getrübt.
100fache Vergrößerung

4.2.2. Wachstum der Zellen

Um Aussagen über das Wachstum der in verschiedenen Kulturmedien gezüchteten Zellen treffen zu können, wurde bei allen Spendern nach jedem Trypsinieren eine Zellzählung durchgeführt. Anhand der so erhaltenen Zellzahlen wurden die kumulativen Zellzahlen berechnet.

Es zeigten sich beim Vergleich der Zellkulturen im selben Medium zwischen den unterschiedlichen Spendern deutliche Schwankungen der Zellzahlen (interindividuelle Variabilität). Auch waren signifikante Unterschiede beim Vergleich der Zellzahlen desselben Spenders aus den einzelnen Medien (intraindividuelle Variabilität) zu erkennen.

Die Zellkulturen mit FKS-Zusatz waren nicht in der Lage, die hohen Passagezahlen der Zellkulturen mit PL-Zusatz zu erreichen. Bei Zusatz von FKS war ein lineares Wachstum bis zur 3.-4. Passage zu beobachten, anschließend zeigte sich eine Wachstumsverlangsamung. Im Vergleich dazu erreichten Zellen der Kulturmedien mit PL in derselben Zeit schon die 6.-7. Passage. In Verbindung mit der Zellmorphologie erreichten Zellen der Medien mit PL-Zusatz eine weitaus höhere kumulative Zellzahl bis zum Wachstumsstillstand im Vergleich zu den

Zellkulturen in FKS-haltigen Medien. Am Ende jeder Passage war es möglich, mindestens doppelt so viele Zellen aus Medien mit PL-Zusatz zu gewinnen, als dies der Fall in FKS-haltigen Medien war (Abb. 11a und b). Bezeichnend ist, dass schon während der ersten Passagen aus den Medien unter dem Einfluss von PL signifikant mehr MSZ hervorgingen. Am Ende der Kultivierung konnte dieser Unterschied bis zu 10 log erreichen. Dieser Trend war bei jedem Spender zu beobachten, obwohl sich bei jedem Knochenmark Unterschiede im Wachstum zeigten.

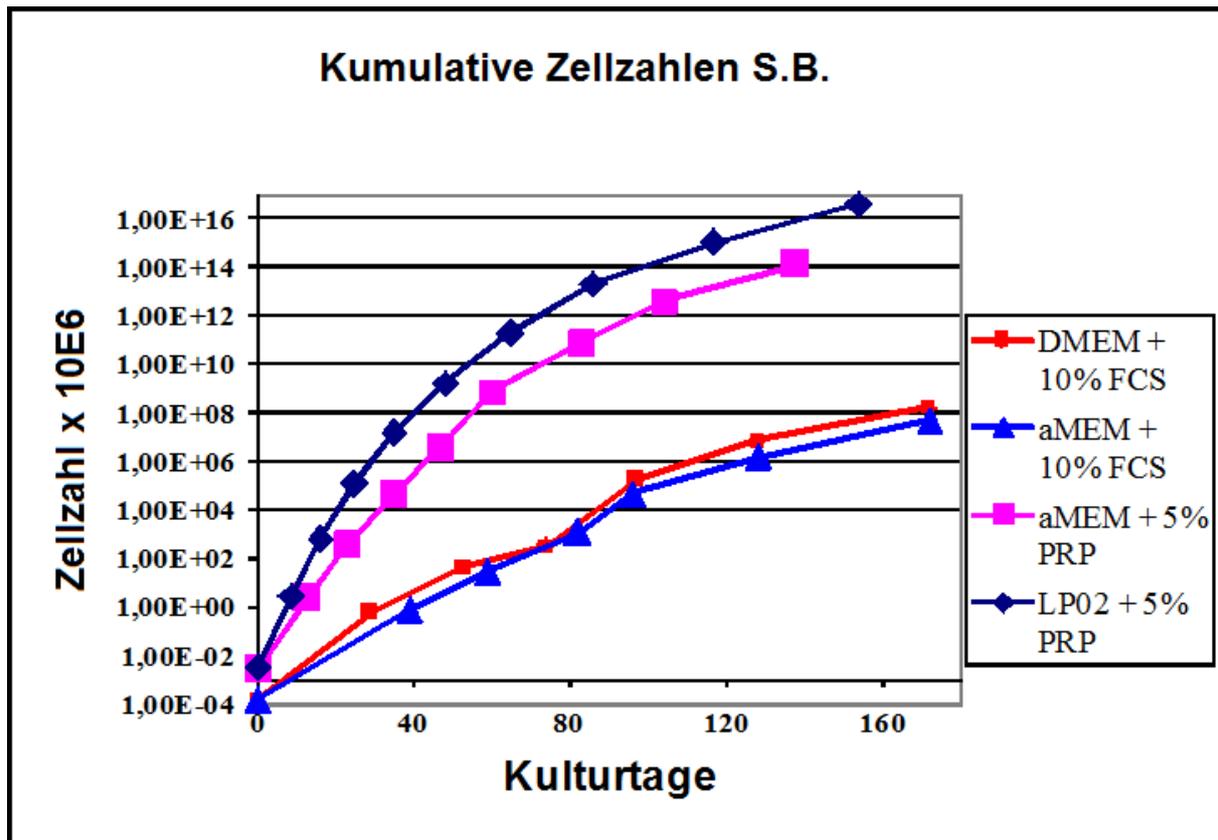


Abb. 11 a

Abb. 11 a und b: Wachstumskinetik von hMSZ in unterschiedlichen Medien. Die kumulativen Zellzahlen verdeutlichen jeweils ein Beispiel der in den verschiedenen Medien wie unter Material und Methoden beschrieben kultivierten Zellen. Jedes Symbol steht für einen Zeitpunkt des Trypsinierens. Es ist deutlich zu erkennen, dass bereits am Anfang der Kultivierung signifikant mehr Zellen aus den Medien mit Zusatz von PL gewonnen werden konnten.

Das anhand der Abbildungen dargestellte Ergebnis ließ sich auch bei den 9 weiteren Spendern reproduzieren.

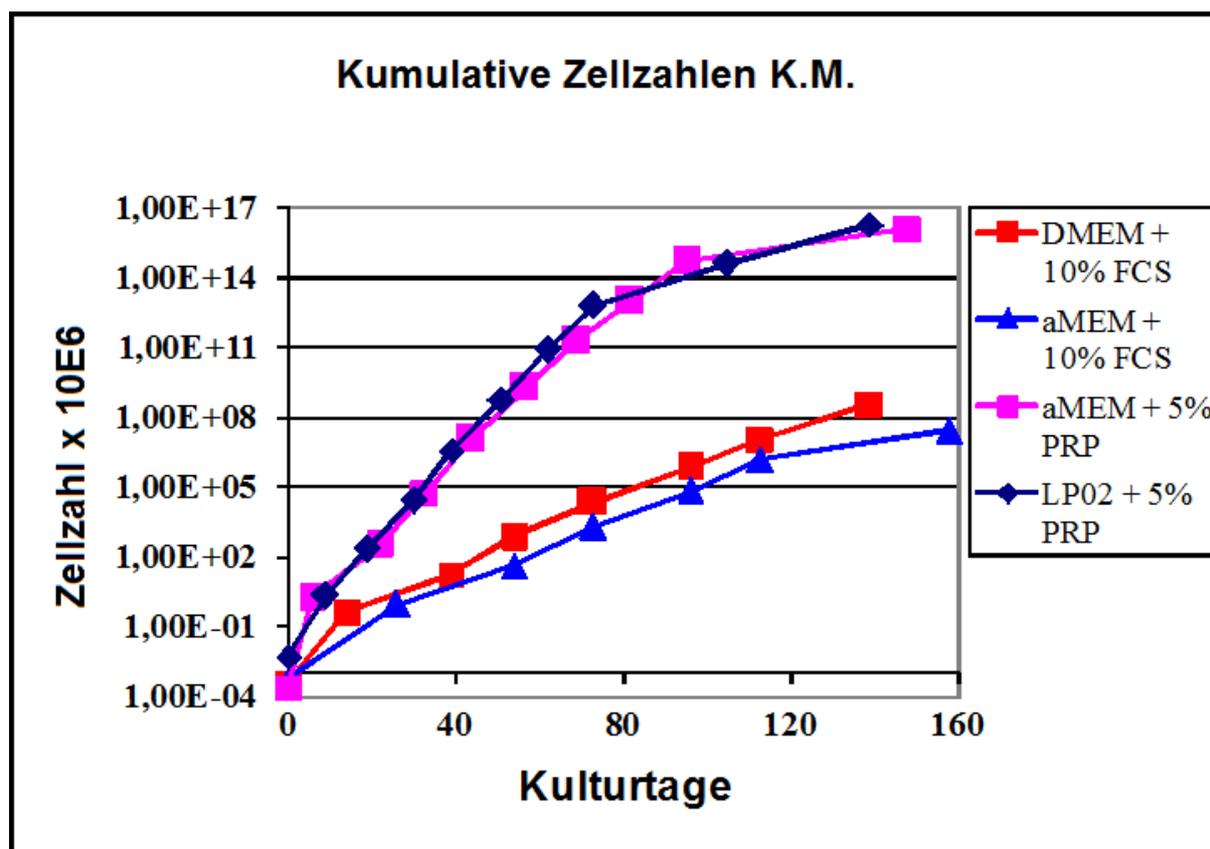


Abb. 11b

Vergleicht man bei den unterschiedlichen KM-Spender die Expansionszeit bis zum Wachstumsstillstand und die erreichte Zellzahl in jeder Spendergruppe im definierten Medium, ist zu erkennen, dass der Unterschied der MSZ-Zahl, welche aus 10^7 Zellen entstanden, in M1 im Vergleich zu M4 bis zu 10^9 Zellen erreichte (Tab. 5).

KM Spender	M1		M2		M3		M4	
	Zellzahl	Tage	Zellzahl	Tage	Zellzahl		Zellzahl	Tag e
1	nd	nd	4.2×10^{16}	245	1.5×10^{21}	166	1.7×10^{22}	160
2	2.7×10^{12}	206	3×10^{12}	206	6.6×10^{23}	160	7.7×10^{24}	164
3	1.7×10^{14}	242	1.6×10^{12}	208	1.1×10^{21}	209	2×10^{24}	209
4	3.8×10^{13}	198	nd	nd	4.8×10^{18}	146	1.8×10^{20}	139
5	1.1×10^{14}	151	8.9×10^{10}	191	3.8×10^{18}	131	1.7×10^{21}	131
6	2×10^{13}	163	2.2×10^{11}	168	8×10^{19}	146	2.6×10^{20}	127
7	3.8×10^{13}	188	8.6×10^{14}	161	1.9×10^{18}	135	2.9×10^{18}	136
8	1.7×10^{14}	172	4.6×10^{13}	172	1.2×10^{20}	138	4×10^{22}	154
9	1.9×10^{12}	181	2×10^{13}	181	2.1×10^{20}	135	1.5×10^{21}	162
10	1.4×10^{13}	153	3.9×10^{12}	168	6.7×10^{18}	115	1×10^{18}	140
11	5.4×10^{15}	164	2.3×10^{13}	158	1.1×10^{22}	148	1.6×10^{22}	139

Tab. 5: Charakteristisches Wachstum von hMSZ in unterschiedlichen Medien. Gezeigt werden die kumulativen Zellzahlen für alle 11 Spender-Zellpräparate. Kursiv sind die geringsten Zellzahlen innerhalb einer Mediumgruppe gezeigt, mit fetten Ziffern die maximal erreichten Zellzahlen, nd: nicht durchführbar

Das beschleunigte Wachstum der MSZ in Medien mit Zusatz von 5% PL äußerte sich außerdem in den Verdopplungszahlen (Abb.12). Während diese bei in FKS-haltigen Medien kultivierten Zellen ca. bei 30 lagen, erreichten die in Medien mit PL-Zusatz kultivierten MSZ Verdopplungszahlen von ca. 60.

Zellverdopplungen in unterschiedlichen Medien

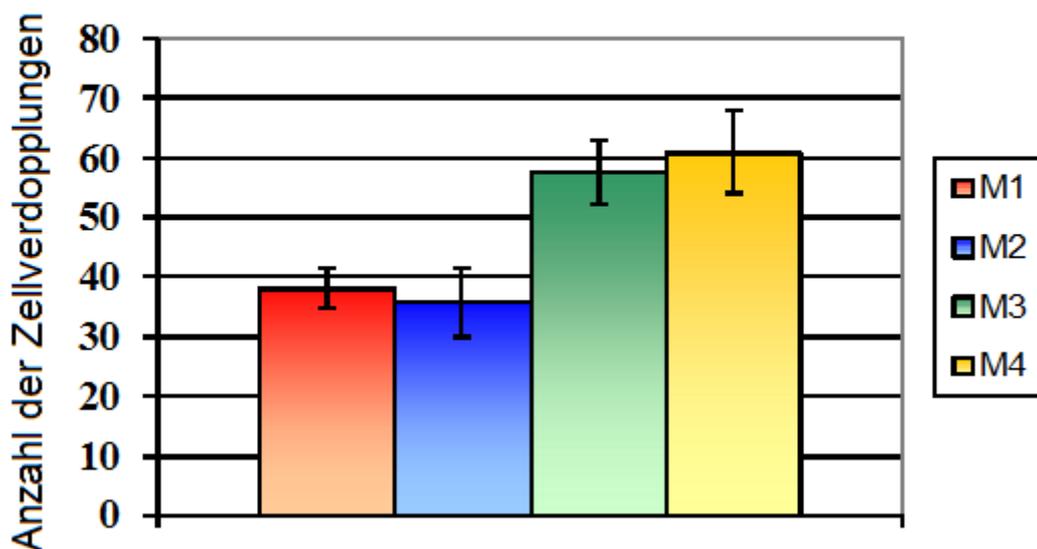


Abb. 12: Erhöhte Verdopplungszahlen in PL-haltigen Medien. Die Ergebnisse zeigen die (Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 11 Experimenten) summierten Verdopplungszahlen der 11 Experimente, die während der Kultivierungszeit in den Medien 1-4 wie unter Material und Methoden beschrieben, durchgeführt wurden. Hochsignifikante Unterschiede sind zu erkennen zwischen in PL- und in FKS-haltigen Medien kultivierten Zellen. Die Anzahl der Zellverdopplungen in PL-haltigen Medien übertrifft diejenige der FKS-haltigen um mehr als das 1,5fache.

Im direkten Vergleich der beiden PL-haltigen Medien lässt sich keine klare Aussage darüber treffen, in wie weit M4 als Kulturmedium dem M3 vorzuziehen ist, jedoch zeichnet sich tendenziell ab, dass 5% PL-haltiges LP02 dem 5% PL-haltigen α -MEM überlegen sein könnte.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass unter dem Zusatz von PL ein beschleunigtes Wachstum mit verkürzter Verdopplungszeit und eine erhöhten Anzahl von Verdopplungen bis zum Wachstumsstillstand zu verzeichnen sind.

4.2.3. Trypsinieren der Zellkulturen

Beim Trypsinieren war bei allen Zellkulturen mit PL im Vergleich zu den Zellkulturen mit FKS ein langsames Ablösen der adhären MSZ von der Oberfläche der T25- bzw. T75-Kulturflaschen zu beobachten. Das Ablösen der Zellen unter 10% FKS dauerte ca. 3 min und teilweise war ein abschließendes Klopfen der Flaschen auf dem Handteller erforderlich, um die zu diesem Zeitpunkt noch an der Oberfläche der Flaschen haftenden Zellen zu lösen. Bei den Zellen unter PL haftete ein Großteil der MSZ zu diesem Zeitpunkt des Trypsinierens noch an der Flaschenoberfläche, so dass hier die Inkubation in Trypsin 5 min lang erfolgte und anschließend fast immer ein Abklopfen erforderlich war.

4.3. Differenzierungen

Zur weiteren Bestätigung des multipotenten Charakters der isolierten Zellen wurden Standardprotokolle eingesetzt (Jaiswal et al., 1997; Pittenger et al., 1999; Shakibaei, 1997), um das Potenzial zur Differenzierung in Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten zu bestimmen. Damit eine direkte Vergleichbarkeit ermöglicht werden konnte, wurde die Induktionszeit der adipo-, osteo- und chondrogenen Differenzierungsansätze für alle Zellpräparationen konstant gehalten. Die Ergebnisse dienten als Qualitätskontrolle für alle weiteren Untersuchungen dieser Arbeit.

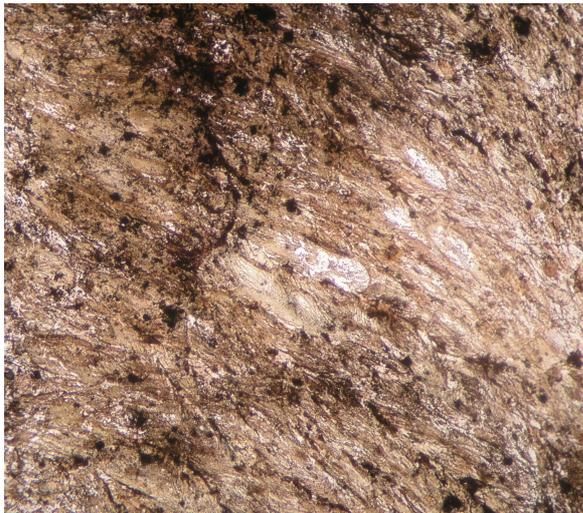
In P6 wurde die Differenzierungsfähigkeit aller MSZ in die drei erwähnten Zelllinien getestet. Dabei waren MSZ aller Kulturmedien in der Lage, sich auf diesen Differenzierungswegen zu entwickeln. Außerdem wurde bei MSZ der P10 erneut das Differenzierungspotential getestet. In Frage kamen dabei nur in PL-haltigem Medium kultivierte Zellen, da nur diese so hohe Passagen erreichten. Es zeigt sich auch bei den MSZ dieser späten Passage ein immer noch vorhandenes Differenzierungspotential in alle drei Zelllinien.

4.3.1. Osteogene Differenzierung

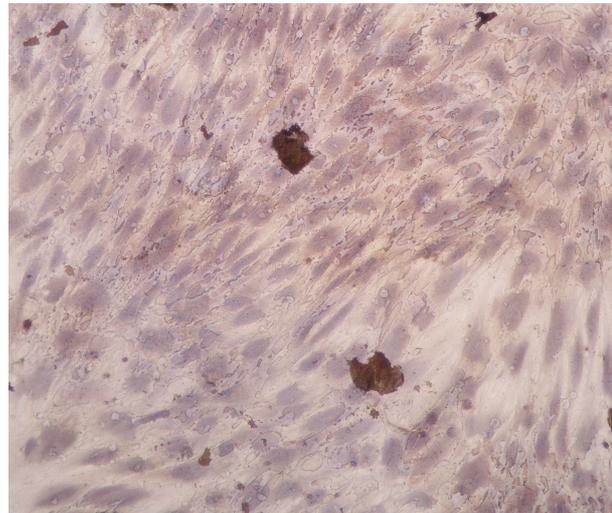
Humane MSZ, die in Kultur optimalen Konzentrationen von Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat ausgesetzt sind, nehmen eine kuboide Morphe an, zeigen eine erhöhte Enzymaktivität für Alkalische Phosphatase, exponieren osteoblastische Oberflächenantigene und lagern extrazellulär mineralisiertes Hydroxylapatit ab, ein Charakteristikum von Osteoblasten und

terminal differenzierten Osteozyten (Beresford et al., 1994; Cheng et al., 1994; Rickard et al., 1996; Jaiswal et al., 1997). Dexamethason fördert vor allem die Proliferation und unterstützt die Differenzierung (Bellows et al., 1990). Ascorbinsäure ist unter anderem für den Aktivitätsanstieg der Alkalischen Phosphatase verantwortlich und unterstützt die Produktion von Osteocalcin, einem Protein der Knochenmatrix, das Hydroxylapatit bindet (Liu et al., 1999).

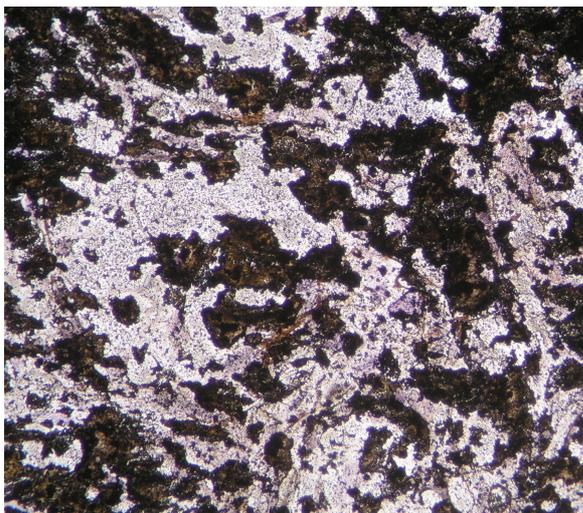
In der vorliegenden Versuchsreihe konnten unter Zugabe der osteogenen Induktionsmedien in P6 bei allen Zellkulturen extrazelluläre Calciumablagerungen beobachtet werden (Abb.13).



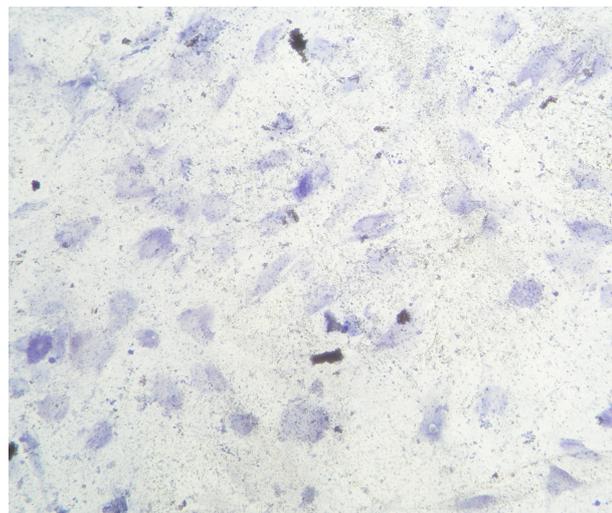
Osteogene Differenzierung in M1 P6



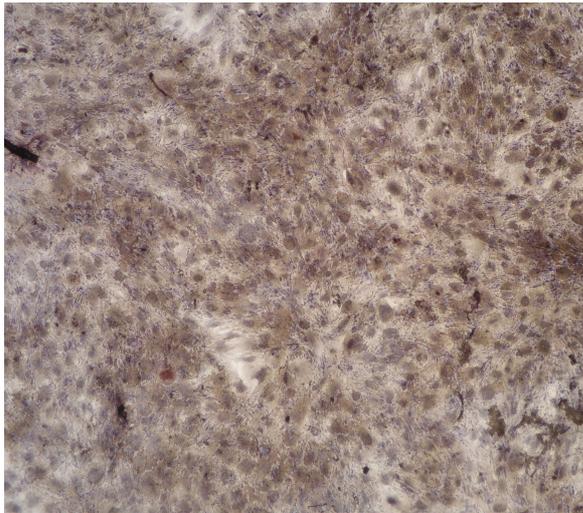
Kontrollkultur in M1 P6



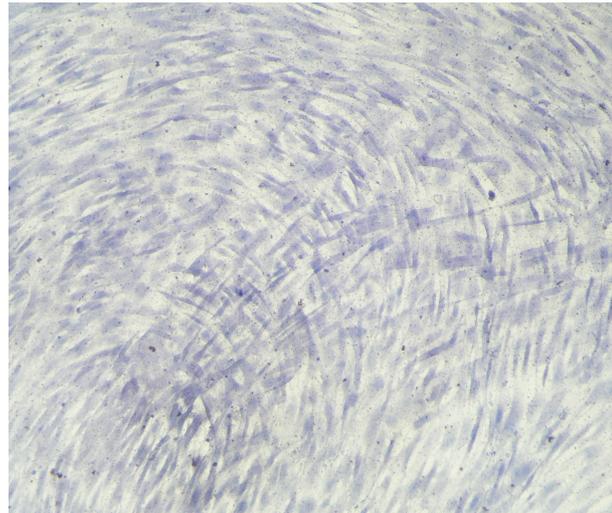
Osteogene Differenzierung in M2 P6



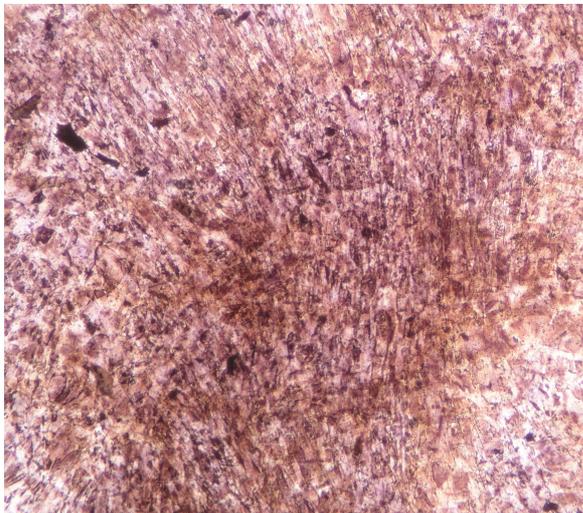
Kontrollkultur in M2 P6



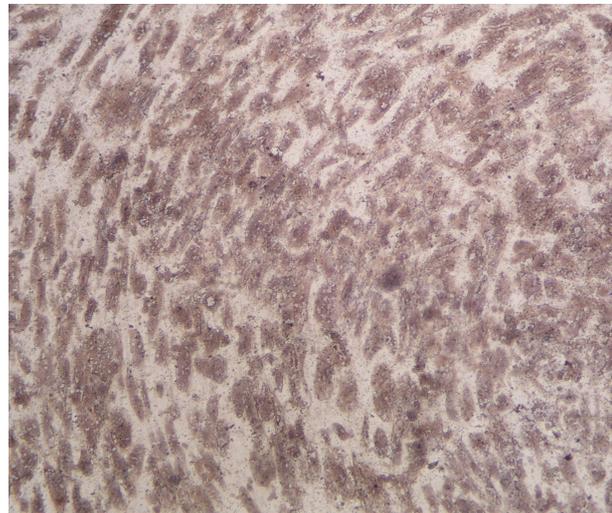
Osteogene Differenzierung in M3 P6



Kontrollkultur in M3 P6



Osteogene Differenzierung in M4 P6



Kontrollkultur in M4 P6

Abb. 13: Repräsentative Darstellung des osteogenen Differenzierungspotentials von hMSZ in P6. Die abgebildeten Fotos zeigen beispielhaft für jedes Medium M1-M4 die induzierte osteogene Differenzierung von hMSZ in der 6. Passage, rechts davon die jeweiligen nicht-induzierten Kontrollkulturen. Die Kultivierung und Induktion erfolgte wie unter Material und Methoden beschrieben. Beweisend für die erfolgte osteogene Differenzierung sind die mit Silbernitrat angefärbten Calciumpräzipitate.
100fache Vergrößerung

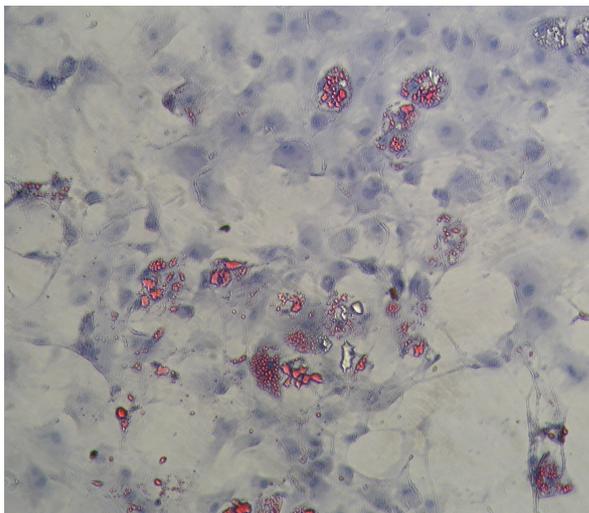
Die osteogene Stimulation beeinflusste hMSZ sowohl in ihrer Morphologie als auch in ihrem Wachstumsmuster sehr stark. Die Zellen verloren ihre Spindelform und breiteten sich flächiger aus. Dadurch entstand bei den meisten Zellen ein kuboides Aussehen. Bezüglich des Wachstumsmusters lagerten sich hMSZ unter Stimulation in Subkonfluenz zu kleinen Zellhaufen zusammen.

Ab dem KT 11 konnte bei den MSZ, die unter dem Zusatz von 10% FKS kultiviert wurden, die Bildung von extrazellulären Calciumvesikeln beobachtet werden. In den Medien mit PL-Zusatz waren erst nach längerer Kultivierung die ersten Calciumablagerungen sichtbar.

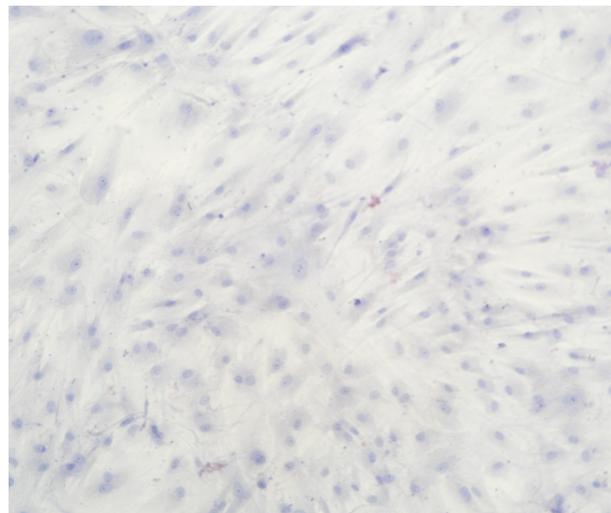
Die Zellen, die in P6 ohne den Zusatz von osteogenen Induktionssubstanzen kultiviert wurden (Kontrollen), zeigten die gleiche Morphologie wie in den Kulturflaschen der entsprechenden Passage. Sie waren im Vergleich zu den osteogen stimulierten Zellen deutlich schlanker und wiesen längere Ausläufer auf.

4.3.2. Adipogene Differenzierung

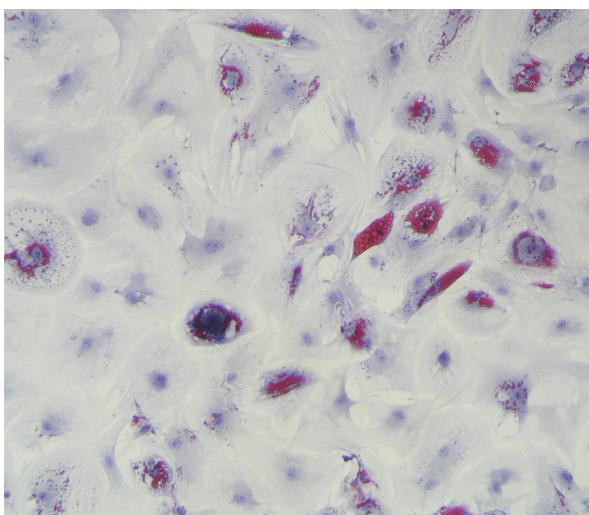
Die Bildung von intrazellulären, fetthaltigen Vakuolen war unter Zugabe von adipogenen Induktionsmedien bei allen Zellkulturen in P6 zu erkennen (Abb.14).



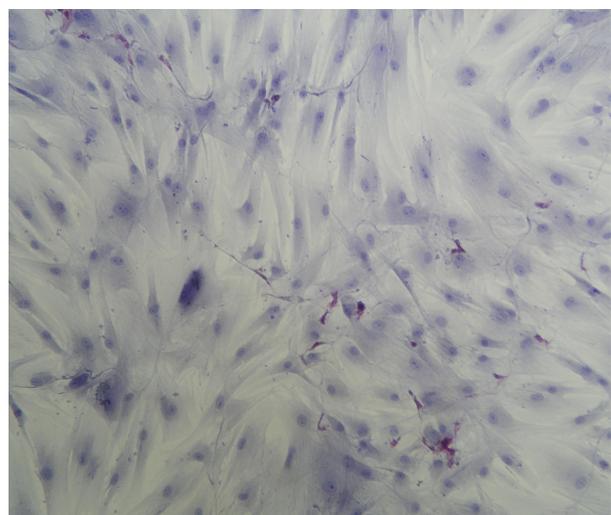
Adipogene Differenzierung in M1 P6



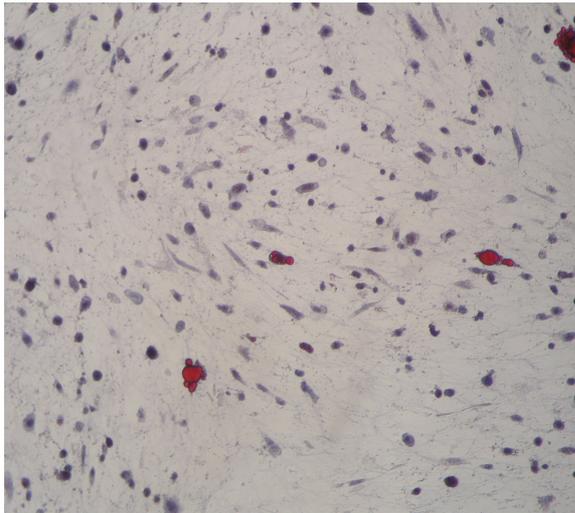
Kontrollkultur in M1 P6



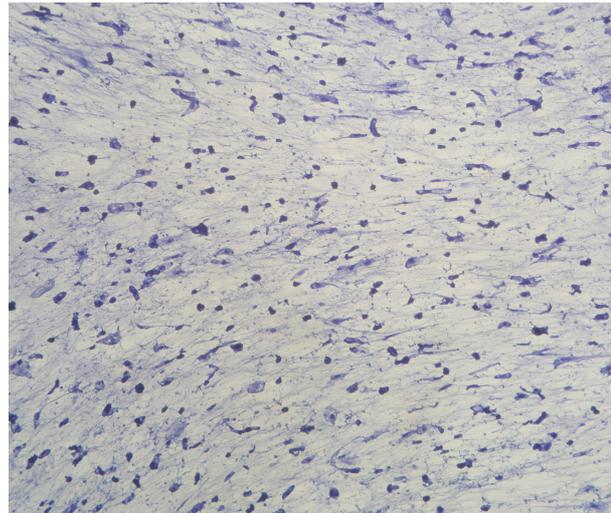
Adipogene Differenzierung in M2 P6



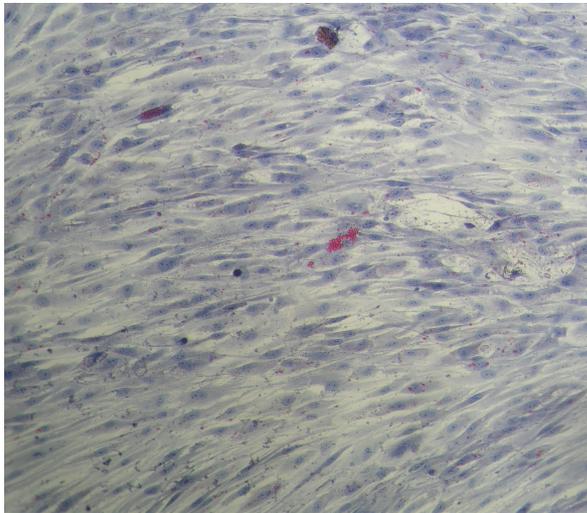
Kontrollkultur in M2 P6



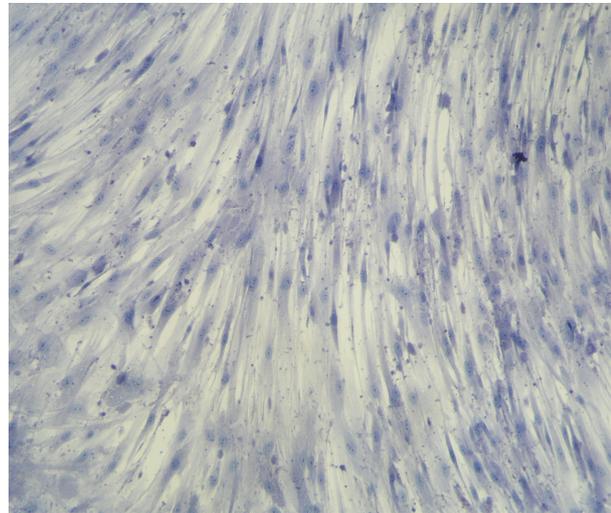
Adipogene Differenzierung in M3 P6



Kontrollkultur in M3 P6



Adipogene Differenzierung in M4 P6



Kontrollkultur in M4 P6

Abb. 14: Repräsentative Darstellung des adipogenen Differenzierungspotentials von hMSZ. Die abgebildeten Fotos zeigen beispielhaft für jedes Medium M1-M4 die induzierte adipogene Differenzierung von hMSZ in der 6. Passage. Die Zellen wurden wie unter Material und Methoden beschrieben kultiviert und durch Zusatz von Induktionssubstanzen wurde die Differenzierung ausgelöst. Beweisend für die erfolgte adipogene Differenzierung sind die mit Sudan-Rot angefärbten Fettvakuolen. Auf der rechten Seite sind die jeweiligen nicht-induzierten Kontrollkulturen abgebildet.
100fache Vergrößerung

Bei den Zellkulturen mit 10% FKS konnte man bereits in der ersten Kulturwoche, einige Tage nach der ersten Zugabe von adipogenen Induktionsmedien, die Entstehung von Fettvakuolen beobachten, deren Anzahl und Größe sehr verschieden war. Sie befanden sich hauptsächlich in den Randgebieten der Plattenlöcher, wobei es sich um viele große, zu Gruppen formierte Vakuolen handelte.

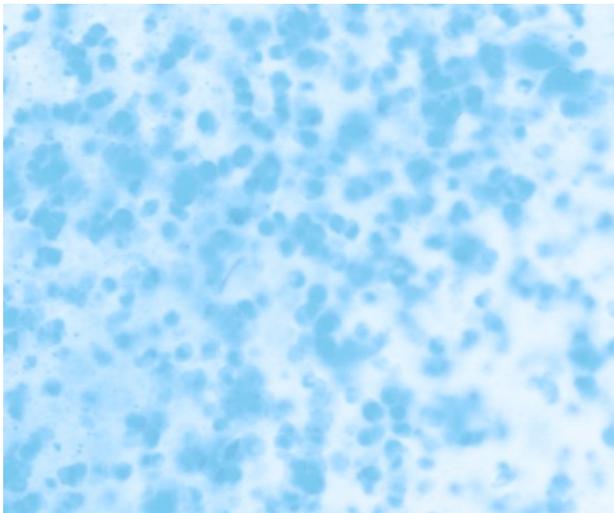
Bei 5% PL bildeten sich zu dieser Zeit zunächst nur wenige kleine oder gar keine Vakuolen. Auch Ansammlungen großer Vakuolen waren vereinzelt zu finden.

Gleichzeitig mit der Entstehung der Fettvakuolen kam es, wie es auch bei den osteogen induzierten Zellen der Fall war, zu einer Formveränderung der Zellen ins Kuboide, d.h. die Zellen wurden insgesamt breiter und kürzer und ihre Ausläufer verloren auch an Länge.

Die Zellen aus den Kontrollkulturen, welche ohne den Zusatz von adipogenen Induktionssubstanzen kultiviert wurden (Kontrollen), zeigten die gleiche Morphologie wie in den Kulturflaschen der entsprechenden Passage.

4.3.3. Chondrogene Differenzierung

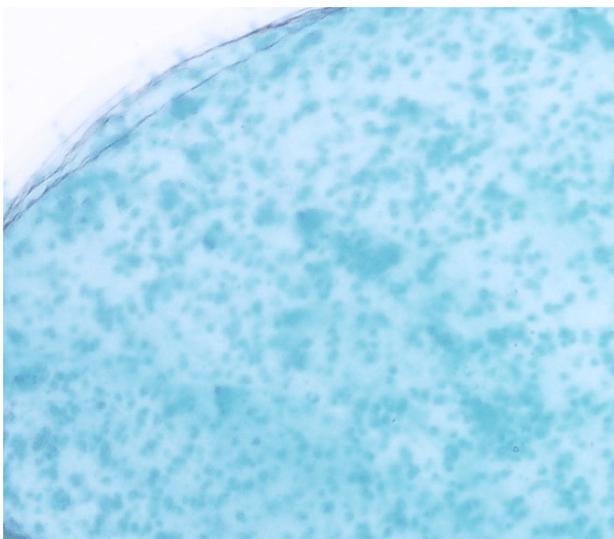
Die Bildung von Glykosaminoglykanen konnte bei allen induzierten Zellkulturen in P6 nachgewiesen werden (Abb. 15).



Chondrogene Differenzierung in M1 P6



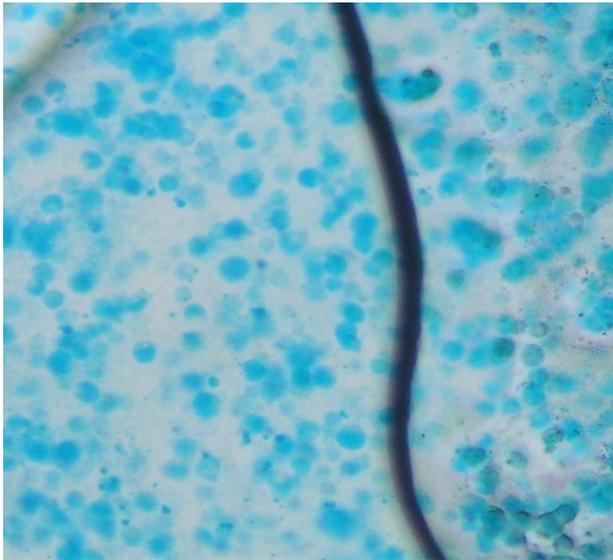
Kontrollkultur M1 P6



Chondrogene Differenzierung in M2 P6



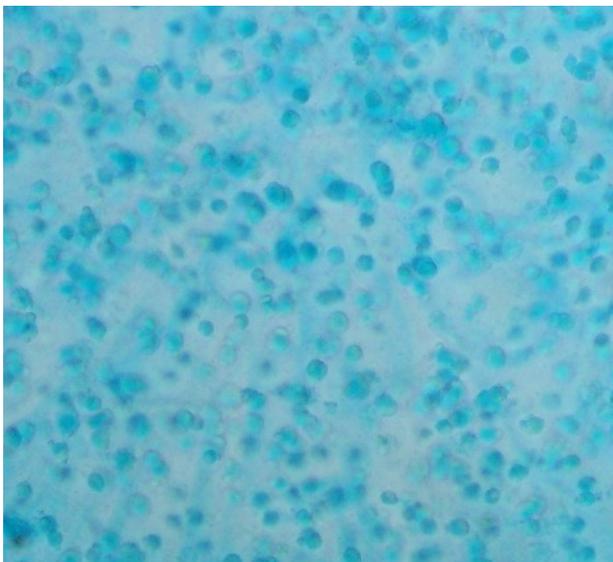
Kontrollkultur in M2 P6



Chondrogene Differenzierung in M3 P6



Kontrollkultur in M3 P6



Chondrogene Differenzierung in M4 P6



Kontrollkultur in M4 P6

Abb. 15: Repräsentative Darstellung des chondrogenen Differenzierungspotentials von hMSZ. Die abgebildeten Fotos zeigen beispielhaft für jedes Medium M1-M4 die induzierte chondrogene Differenzierung von hMSZ in der 6. Passage. Die Kultivierung und Induktion der Differenzierung wurde wie unter Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Beweisend für die erfolgte chondrogene Differenzierung sind die mit Alzianblau angefärbten Proteoglykane. Auf der rechten Seite sind die jeweiligen nicht-induzierten Kontrollkulturen abgebildet.
100fache Vergrößerung

Da es erst möglich war, GAG nach der Färbung festzustellen, kann an dieser Stelle keine Aussage darüber gemacht werden, wann es zur Ausbildung der ersten GAG kam und ob zeitliche Unterschiede in der Ausbildung von GAG in den unterschiedlichen Medien bestanden.

Unter dem Mikroskop war zu beobachten, dass die Zellen einen intensiver gefärbten perizellulären Hof bildeten. Dieser Hof weist auf die Existenz des so genannten Chondrons hin.

Die Zellen aus den Kontrollkulturen, welche ohne den Zusatz von chondrogenen Induktionssubstanzen kultiviert wurden (Kontrollen), zeigten keine Anfärbarkeit mit Alzianblau und somit keinen Nachweis von GAG.

4.4. Phänotypanalyse

Die Bestimmung der Oberflächenmarker CD34, CD45, CD59, CD90, CD105, MHC-Klasse I und MHC-Klasse II erfolgte in P6. Zu diesem Zeitpunkt hatten die in FKS kultivierten Zellen bereits ihre Proliferationsrate verlangsamt. Trotzdem war es möglich die Mehrzahl aller MSZ klar von hämatopoetischen Zellen durch das Fehlen der hämatopoetischen Marker CD34 und CD45 abzugrenzen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Bestimmung der Oberflächenmarker an den Zellkulturen der Passage 6 aus den T75-Flaschen dargestellt. Sie geben Aufschluss darüber, inwieweit das Spektrum der exprimierten Oberflächenmarker unter dem Zusatz von FKS und PL übereinstimmt. Alle getesteten Zellkulturen reagierten mit graduellen Unterschieden positiv auf CD59, CD90, CD105 und zeigten eine negative Reaktion auf CD34 und CD45. Deshalb kann daraus geschlossen werden, dass die gewählte Isolations- und Kulturmethode geeignet ist, mesenchymale Stammzellen in hoher Qualität und Quantität anzureichern.

Aus der folgenden Tabelle (Tab. 6) sind die Ergebnisse der Bestimmung der Oberflächenmarker an den Zellkulturen der Passage 6 zu entnehmen.

	CD59	CD90	CD105	CD45	CD34
M1	92.3 ± 3.9	79.3 ± 9.2	78.3 ± 7.5	0.2 ± 0.3	0.2 ± 0.3
M2	88.7 ± 9.0	85.4 ± 5.4	80.1 ± 8.5	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.3
M3	83.8 ± 8.5	85.3 ± 8.6	76.9 ± 8.6	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.3
M4	88.5 ± 5.3	88.6 ± 6.7	78.2 ± 8.1	0.2 ± 0.3	0 ± 0.1

Tab. 6: Der Phänotyp von hMSZ bleibt nach Kultivierung in FKS-freien Medien erhalten. Eine FACS Analyse wurde an Zellen der Passage 6 durchgeführt, welche in den Medien M1-M4 wie unter Material und Methoden beschrieben kultiviert wurden. Gezeigt werden MW ± SD der Expression der untersuchten Oberflächenantigene von 11 Experimenten.

Während in den ersten Passagen 95-98% aller Zellen CD59, CD90 und CD105 exprimierten, waren in den späten Passagen nur noch 77-92% von in allen vier Medien kultivierten Zellen positiv für diese Antigene.

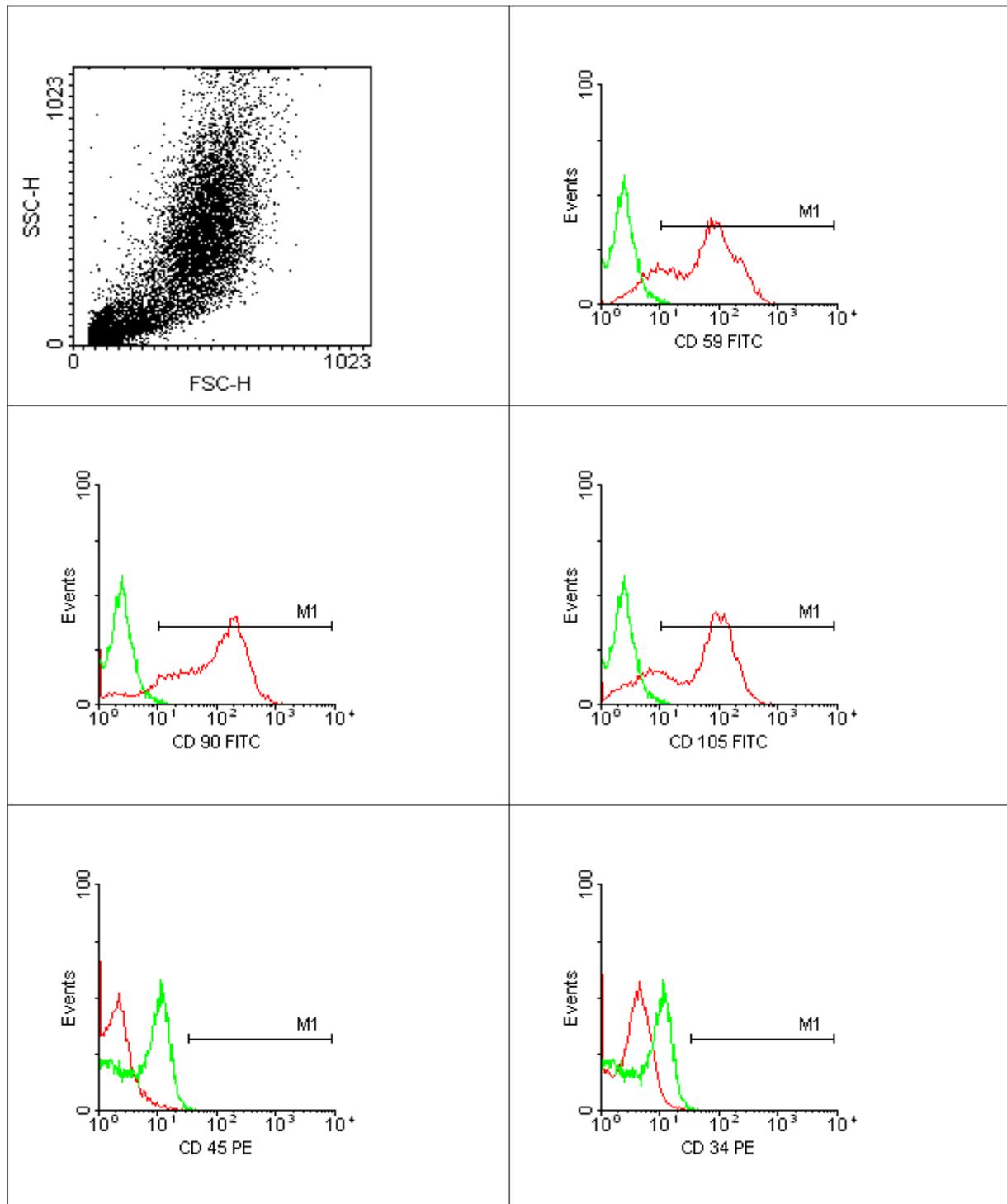


Abb. 16: Grafische Darstellung der Expression von Oberflächenmarkern auf Zellkulturen der Passage 6 des Spenders OC in den Kulturmedien M1-M4

Die Verteilung der aufgezeichneten Ereignisse (Gate R1) ist jeweils in der rechten oberen Grafik dargestellt. Bei allen anderen Grafiken wird die Expression der getesteten Antigene (mit Hilfe FITC- bzw. PE- markierter Antikörper) (x-Achse) der Zahl der gemessenen Ereignisse (y-Achse) gegenübergestellt. Dabei wird die unspezifische Isotyp-Kontrolle grün und die Abfrage des CD-Antigens rot abgebildet. Die mit einer waagerechten Linie versehenen Markierungen geben den Anteil (in Prozent) der Zellen an, die den getesteten Oberflächenmarker exprimieren. Die Ergebnisse stehen repräsentativ für alle Spender.

4.5. Plättchenlysat: Standardisierung von Präparation und Konzentration

Für eine zukünftige klinische Anwendung von kultivierten Zellen wird ein standardisiertes Medium notwendig sein. In diesem Zusammenhang haben wir bei MSZ von 3 Spendern getestet, in welcher Anzahl optimalerweise Thrombozytenkonzentrate gepoolt werden sollten. Ebenso wurde der Einfluss der Konzentration von Plättchen im Plättchenlysat auf die Zellexpansion untersucht. Die verwendeten Thrombozytenkonzentrationen waren $1,46 \times 10^9/\text{ml}$ in PL1, $1,2 \times 10^9/\text{ml}$ in PL2 und $1,9 \times 10^9/\text{ml}$ in PL3.

Es zeigte sich eine beschleunigte Expansion beim Hinzufügen von PL, welches durch das Poolen einer Höheren Anzahl von PRP hergestellt worden war (Abb.18). Darüber hinaus kann man der Abbildung 17 den Einfluss unterschiedlicher Plättchenkonzentrationen auf die Zellverdopplungszahlen entnehmen. Abgesehen von einer Ausnahme sind in den restlichen Fällen die Expansionsraten in PL mit einer Thrombozytenkonzentration von $1,5 \times 10^9/\text{ml}$ vergleichbar hoch oder sogar höher als in der Anfangskonzentration, die zwischen $1,6$ und $1,9 \times 10^9/\text{Thrombozyten/ml}$ lag. Eine weitere Verringerung der Plättchenkonzentration ging mit einer verminderten Expansion von MSZ in den untersuchten 6 Passagen einher.

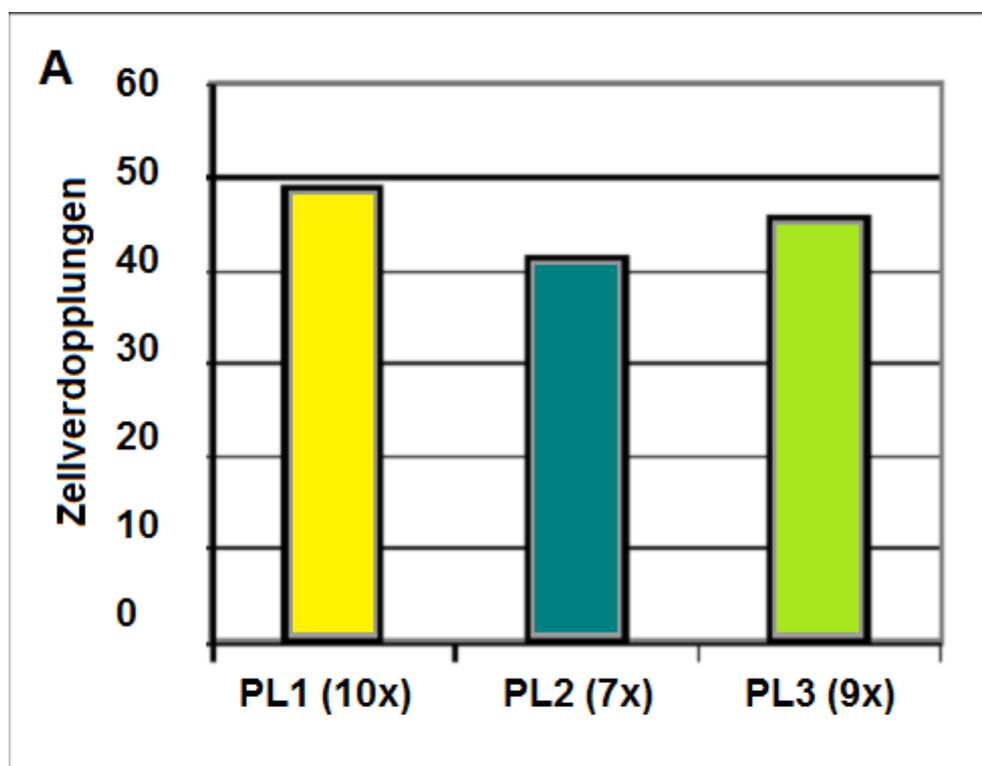


Abb. 17 A

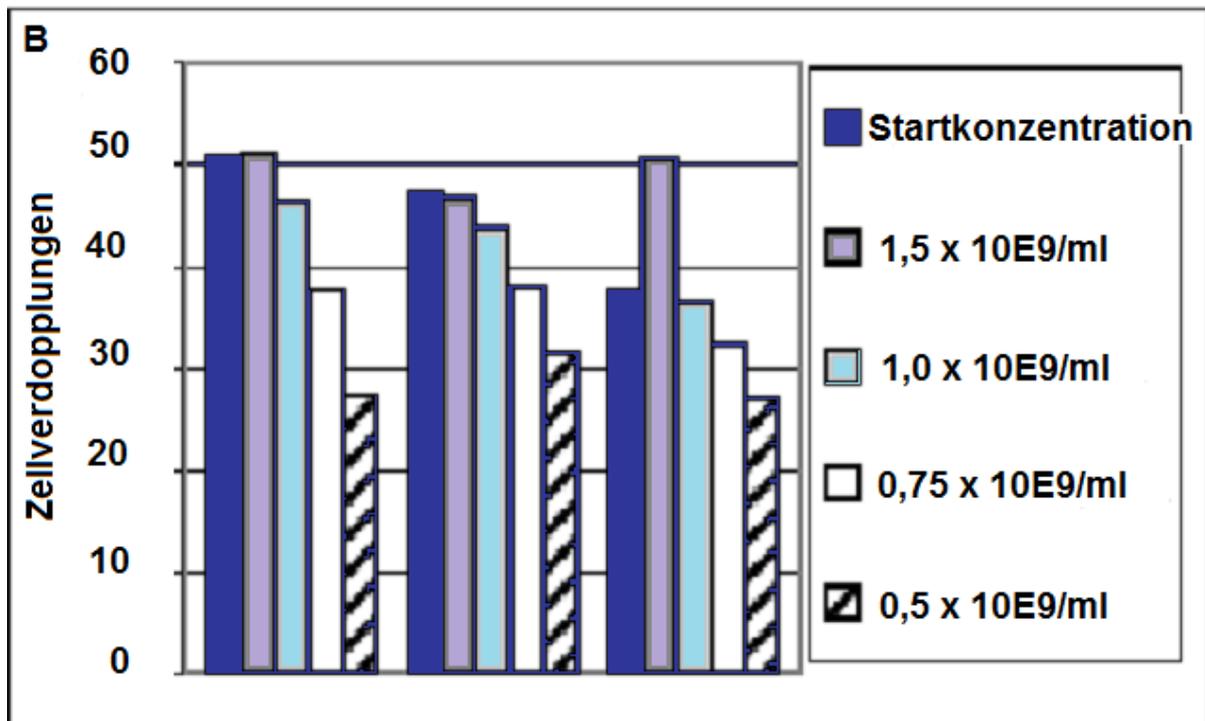


Abb. 17: Zellverdopplungszahlen in Abhängigkeit von der Qualität von PL. Dazu wurden MSZ über 6 Passagen in 5% PL-haltigem LP02 Medium kultiviert. (A) zeigt den Einfluss der Anzahl von gepoolten Thrombozytenkonzentraten auf die Zellverdopplungszahlen von hMSZ, in Klammern sind die Anzahl der gepoolten Plättchenkonzentrate angegeben.

(B) sind die Zellverdopplungszahlen abhängig von der Plättchenkonzentration im PL zu entnehmen, wobei die Startkonzentration bei $1,6-1,9 \times 10^9$ /Thrombozyten/ml lag; abgebildet sind 3 von 5 durchgeführten Experimenten.

Die Bildung von granulären Ablagerungen, welche sich v.a. in den mit LP02 und PL behandelten Kulturen zeigte, erschwerte die Beurteilung der Zellen unter dem Mikroskop und könnte eventuell für die Langzeitexpansion von Bedeutung sein. In unserer Versuchsreihe haben wir allerdings keine negative Auswirkung dieser Präzipitate auf das Zellwachstum feststellen können.

Es wurde untersucht, ob eine verstärkte Zentrifugation des PL nach dem Auftauen die granulären Ablagerungen verringern könnte. Nach einer Zentrifugation mit $8000 \times g$ anstelle von $900 \times g$ kam es zu einer geringen aber nicht signifikanten Verringerung der granulären Präzipitate. Auch im Vergleich der Expansionsraten zeigte sich über einen Zeitraum von 5 Passagen kein signifikanter Unterschied, so dass sich die Zentrifugation von PL mit $8000 \times g$ nicht als bessere Methode erwiesen hat.

4.6. Karyotypische Analyse

Bei der Expansion von hMSZ in dem FKS-freien Medium M4 über 6 Passagen entstanden Zellen mit normalem Karyotyp. Weder bei M-FISH (Abb.18a) noch beim GTG-banding (Abb. 18b)

konnten irgendwelche genomischen Aberrationen festgestellt werden. Deshalb kann man daraus schließen, dass sich die Kultivierung von hMSZ in PL-reichen Medien als sicheres Verfahren zur Zellexpansion anbietet.

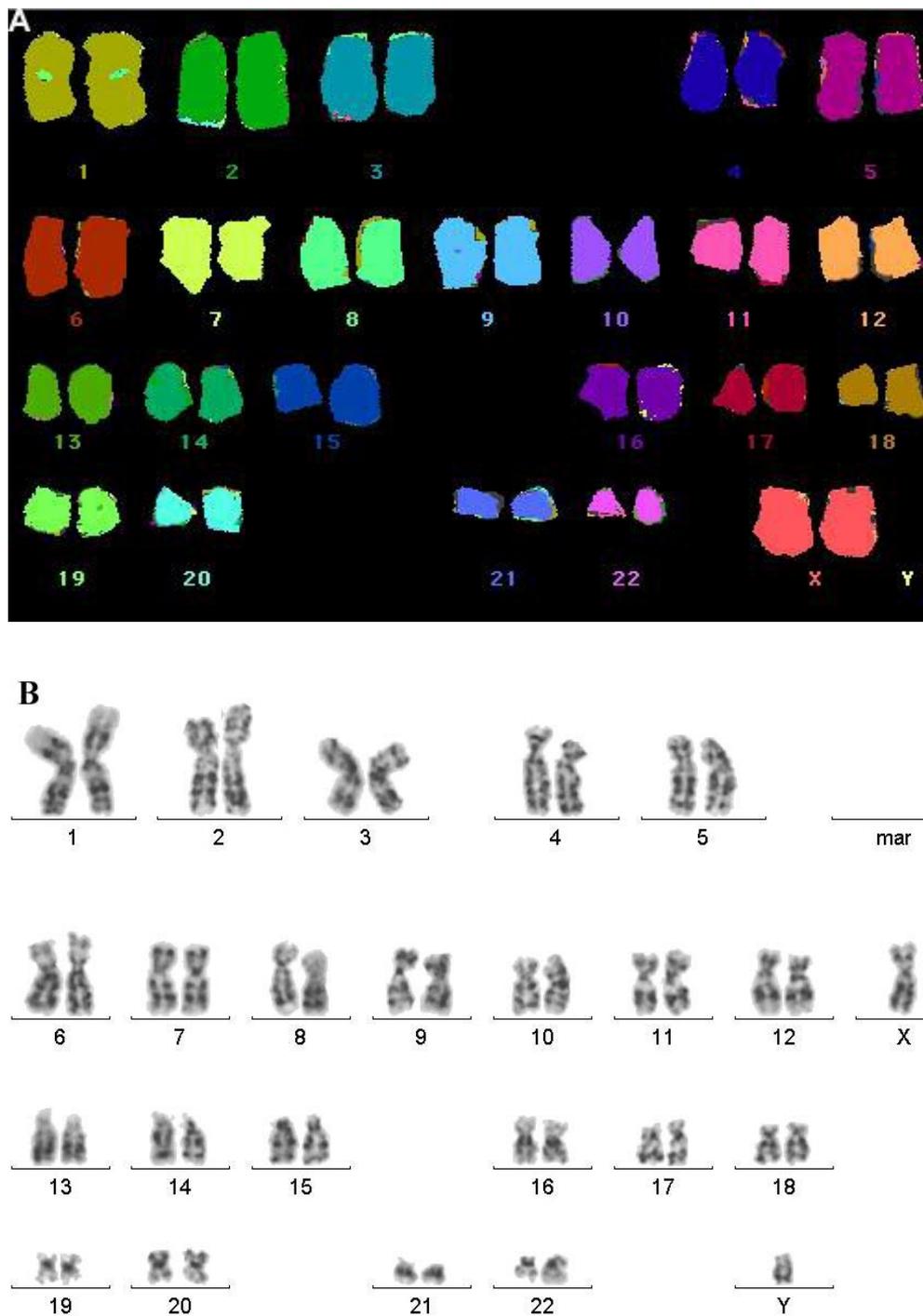


Abbildung 18: hMSZ zeigen nach verlängerter Expansion einen normalen Karyotyp.

Über 6 Passagen in PL-haltigem Medium kultivierte hMSZ wurden verwendet für das Multicolourkaryotyping nach FISH (M-FISH) und GTG-banding. Dargestellt ist (A) das Ergebnis einer M-FISH Analyse an einem weiblichen Spender und (B) ein G-banding an Zellen von einem männlichen Spender.

4.7. Genexpressionsanalyse

Parallel zu den hier vorgestellten Arbeiten wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt. Diese unterstützten die Hypothese, dass MSZ in PL-haltigen Kulturmedien schneller proliferieren (Lange et al., 2007).

Die Auswertung mit Hilfe der Datenbanken für GO terms (Gene Ontology), BioCarta und KEGG pathways (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genoms) zeigten interessante Ergebnisse der Genexpression auf: (I) Gene aus Genfamilien, welche mitverantwortlich sind für die Differenzierung und Entwicklung der Zelle (Abb. 19A), für die Zelladhäsion und die Interaktion von extrazellulären Matrixrezeptoren, für die TGF-Signalübermittlung (Abb. 19B) und die Thrombospondin-1 (TSP-1) induzierte Apoptose (Abb. 19C) wurden herunterreguliert. Im Gegensatz dazu kam es zu einer Hochregulierung von Genen aus Genfamilien, die einen Einfluss haben auf den Zellzyklus (Abb. 19D), die DNA-Replikation und den Purinmetabolismus. Ebenso konnte gezeigt werden, dass auch Zellen herunterreguliert wurden, die eine Rolle spielen im Fettsäurestoffwechsel (Abb. 19E) und beim Majorhistabilitätskomplex (MHC) der Klasse I und II (Abb. 19F), welcher für die T-Zell-Aktivierung mitverantwortlich ist.

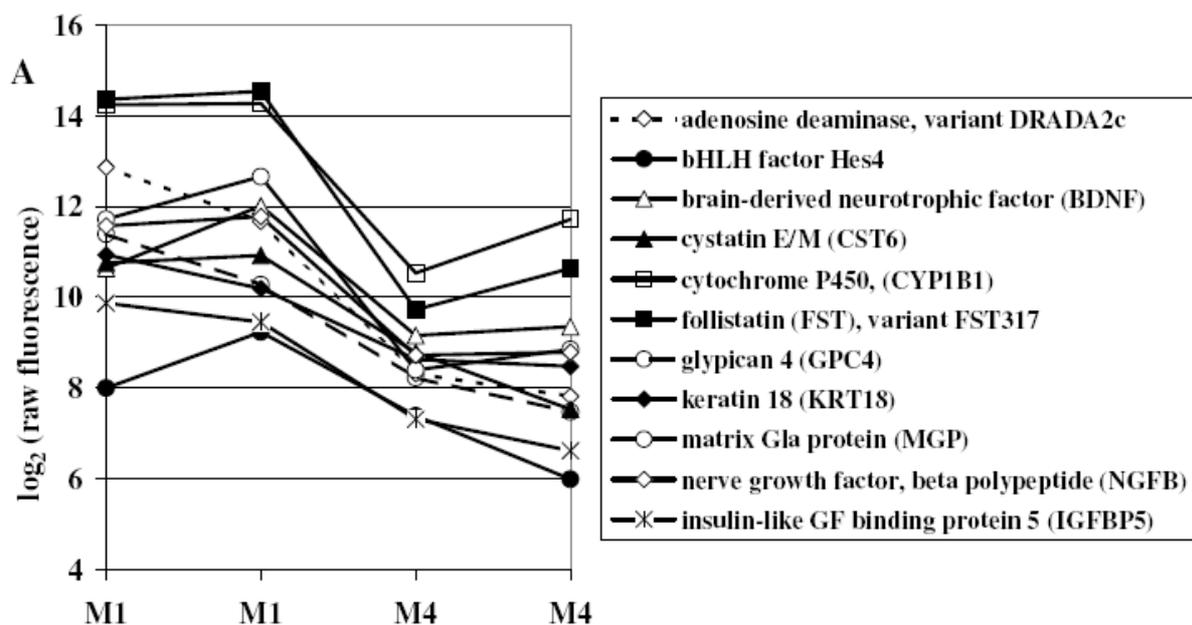
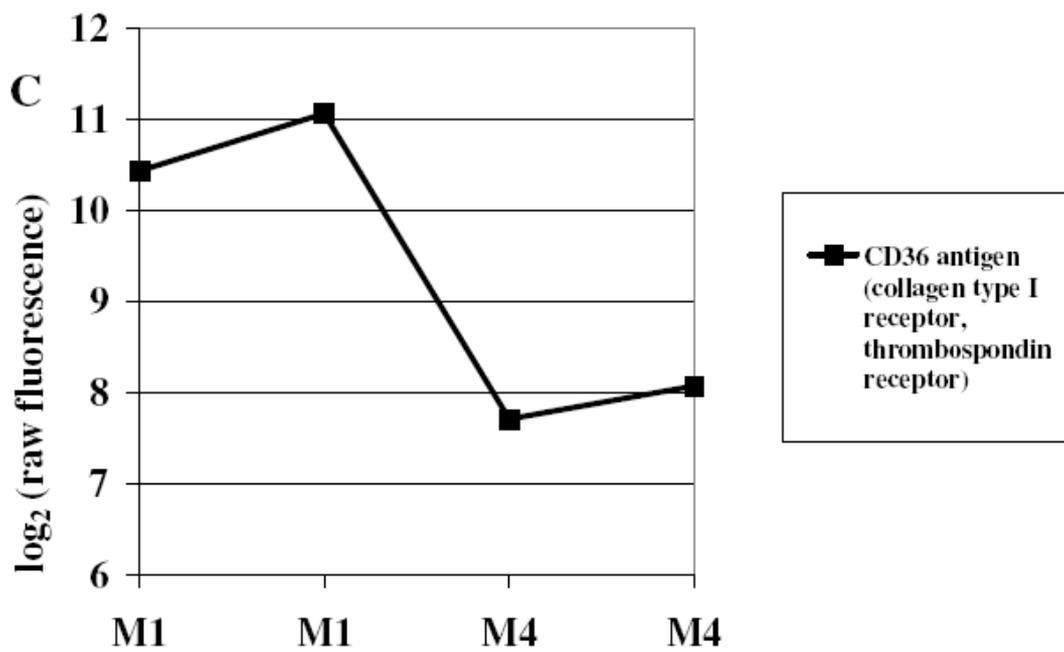
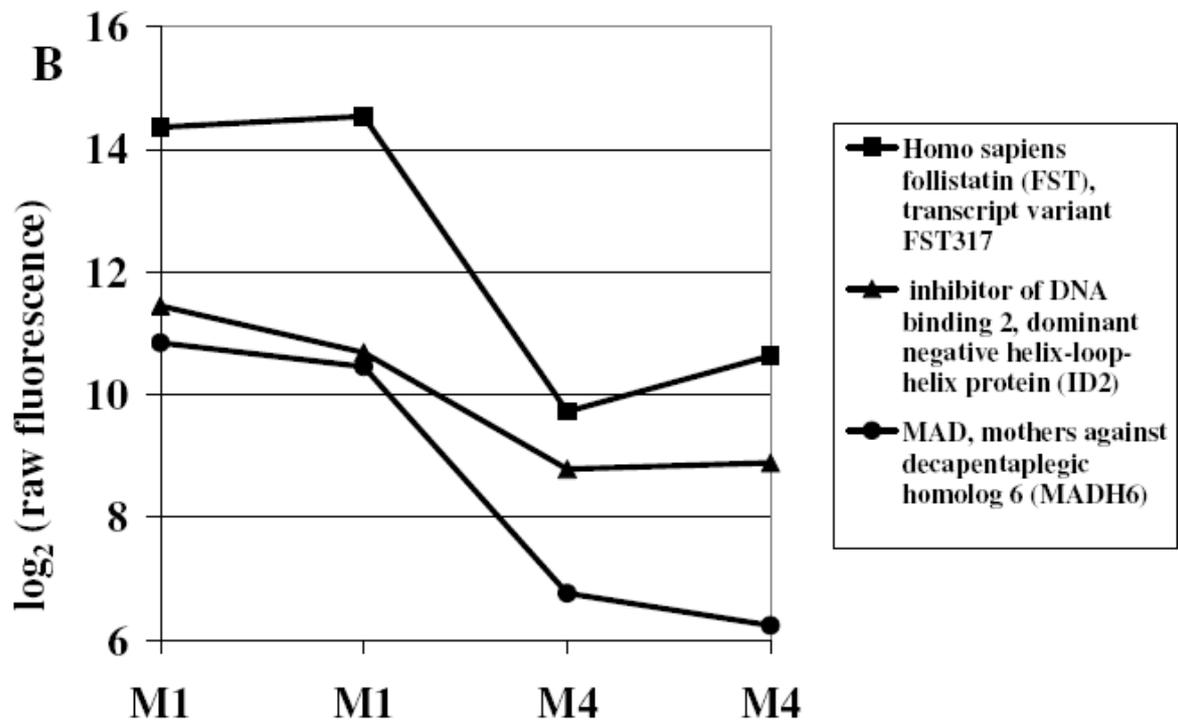
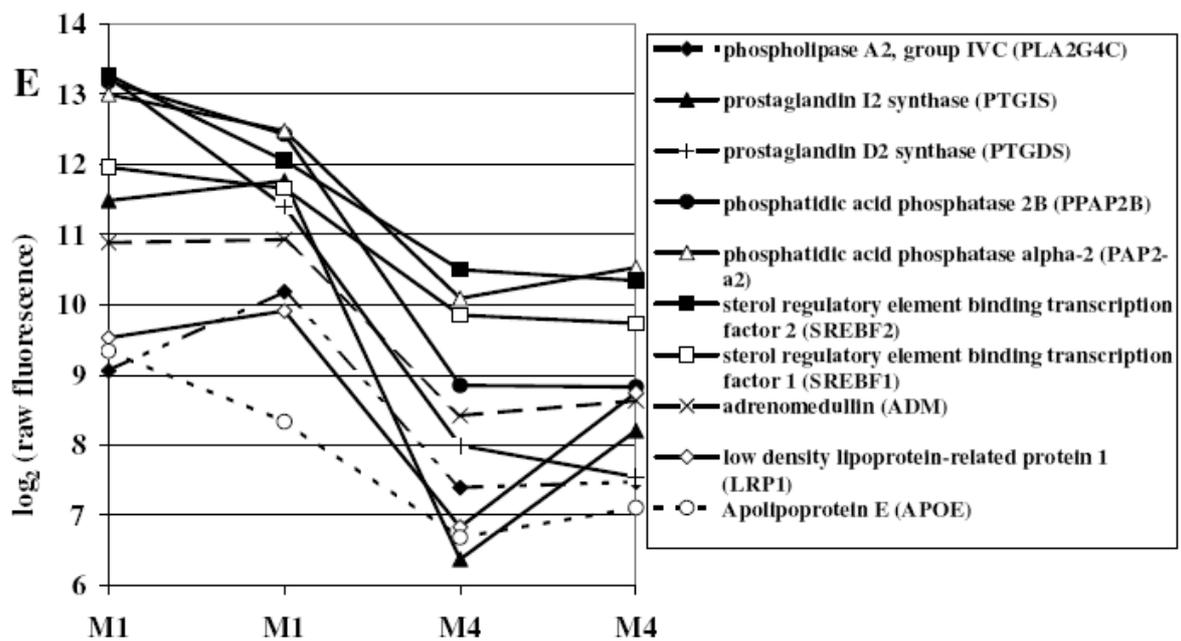
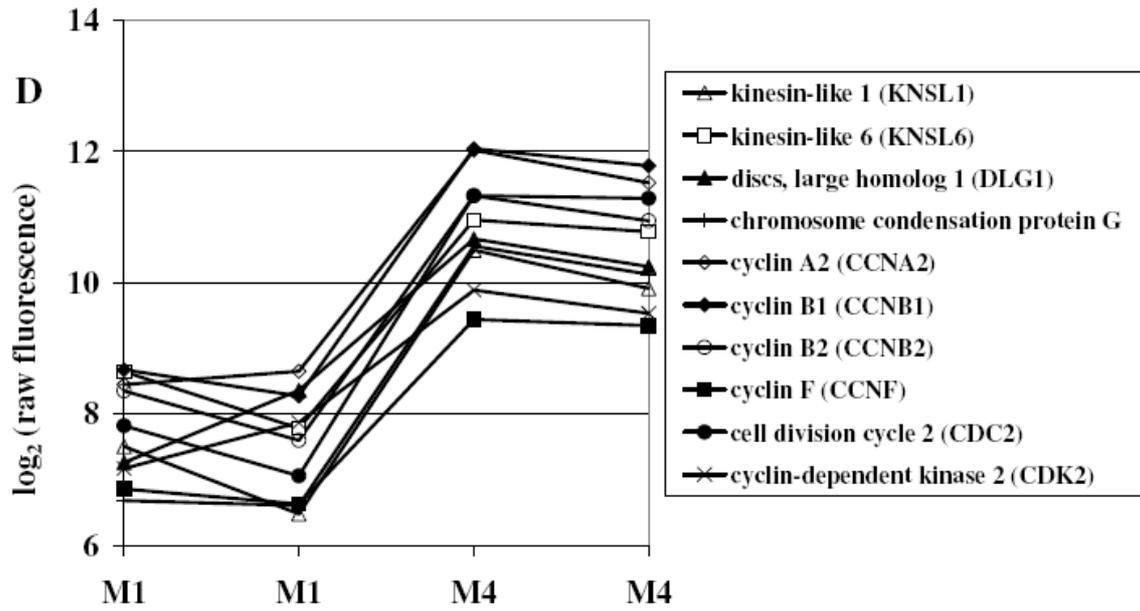


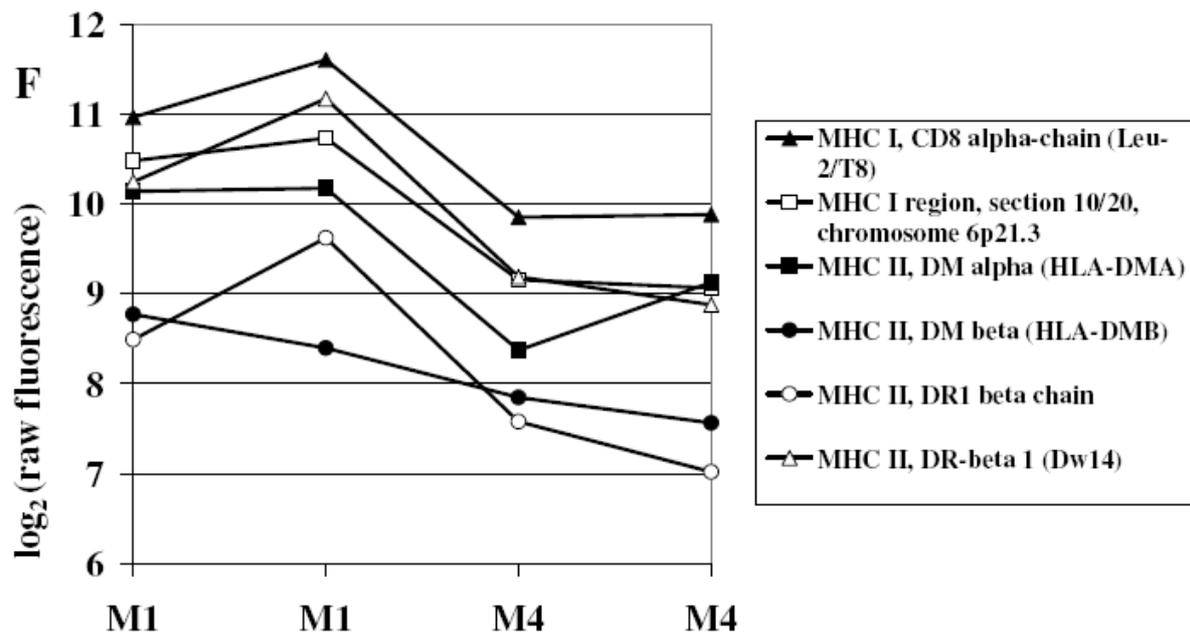
Abb. 19: Die Profile unterschiedlicher Gene unterstützen die Beobachtung des beschleunigten Wachstums in PL-haltigen Medien.

Genexpressionsraten ausgewählter Gene sind dargestellt in log₂. Diese Gene spielen eine kritische Rolle in (A) Differenzierung/Entwicklung, (B) im TGF- β Signalweg, (C) bei der Thrombospondin-1 induzierte Apoptose, (D) im Zellzyklus, (E) beim Fettsäuremetabolismus und (F) bei der Antigenpräsentation durch MHC.

(für zwei hMSZ-Präparate, die im Medium M1 und zwei, die im Medium M4 kultiviert worden sind)







5. Diskussion

Auf Grund ihres Differenzierungspotentials und der Möglichkeit, sie relativ einfach zu gewinnen und in vitro zu expandieren wird von vielen Arbeitsgruppen die potentielle therapeutische Anwendung mesenchymaler Stromazellen in der regenerativen Medizin diskutiert. Es hat sich gezeigt, dass sowohl autologe als auch allogene MSZ angewandt werden können, ohne dass es zu einer signifikanten Immunreaktionen kommt (Poh et al., 2006; Ringden et al., 2006; Dai et al., 2005).

Ein wichtiges Ziel bei der Expansion in großem Ausmaß sollte die Vermeidung der Anwendung tierischer Proteine sein. Die Expansion und Differenzierung von MSZ in FKS-haltigen Medien für das Tissue-Engineering stellt zurzeit eine etablierte Methode dar (Haynesworth et al., 1992a; Prockop, 1997), welche in Deutschland allerdings weitgehend verboten ist. Nur in besonderen Fällen kann der Einsatz aus FKS-haltigen Medien gewonnener Zellen erfolgen. Daher besteht ein großes Interesse an der Entwicklung eines Kulturmediums, welches keine tierischen Proteine enthält.

Diskussion der Ergebnisse zur Gewinnung und Expansion von MSZ

Für große klinische Versuche, bei denen allogene MSZ für eine hohe Anzahl von Empfängern zur Verfügung stehen sollen, werden große Mengen an Zellen desselben Spenders benötigt. Diese Zellen müssen aus einem kleinen Volumen von Knochenmark gewonnen werden. Zwar gilt die Verwendung von autologem Serum von einem Knochenmarkspender als zuverlässig und sicher, zumindest für eine kleine Anzahl von Passagen (Shahdadfar et al., 2005; Mizuno et al., 2006; Kobayashi et al., 2005; Stute et al., 2004) und für kleinere klinische Studien auf Single-Patient Basis (Dimarkis und Levicar, 2006), aber sie stellt keine realistische Alternative in der Stammzelltherapie dar. Bei einer Blutspende von 500 ml können maximal 200 ml Serum gewonnen werden, woraus, bei einem Anteil von 10% humanem Serum, 2 l Kulturmedium hergestellt werden kann. Diese Menge von Kulturmedium ist höchstens für eine Zellexpansion über 2-3 Wochen ausreichend. Und die in dieser Zeit erhaltene Anzahl von MSZ ermöglicht, bei dem Gebrauch von $1-3 \times 10^6$ Zellen/kg KG, nur eine 1-2malige Anwendung.

Allogenes humanes Serum ist keine Alternative, da MSZ unter seinem Zusatz ein verzögertes Wachstum und ein Absterben nach max. 6 Wochen (Spees et al., 2004; Shahdadfar et al., 2005) zeigen. Aus all diesen Gründen wurde in dieser Arbeit untersucht, ob es möglich ist, aus dem

Knochenmark isolierte hMSZ Kälberserum-frei, unter dem Zusatz von PL in für die klinische Anwendung ausreichenden Mengen zu expandieren.

Plättchenkonzentrate sind in der klinischen Anwendung beim Menschen zur Unterstützung der Knochen- und der Weichteilheilung weit verbreitet und ermöglichen eine beschleunigte Knochenheilung (Lucarelli et al., 2003). Auf die Untersuchung von PL, welches aus PRP (Platelet rich plasma) gewonnen wird, ist ein Schwerpunkt gelegt, da es in vitro eine fördernde Wirkung auf stromale Zellen hat und als Zusatz von Knochentransplantaten dienen könnte, um die Qualität und Quantität von sich neu bildendem Knochenmark zu erhöhen (Lucarelli et al., 2003; Gruber et al., 2004).

PRP enthält 7 wesentliche Wachstumsfaktoren, die aktiv von den Plättchen sezerniert werden: PDGF (platelet derived growth factor)- $\alpha\alpha$, $-\beta\beta$, $-\alpha\beta$, TGF- β 1 (transforming growth factor) und $-\beta$ 2, VEGF (vascular endothelial growth factor) und EGF (epidermal growth factor) (Marx et al., 1998; Marx 2004). Die Wachstumsfaktoren PDGF, TGF, EGF, und FGF (fibroblast growth factor) wurden als Mitogene für MSZ beschrieben (Deans and Mosely, 2000) und die meisten oder sogar alle von ihnen werden von Plättchen ausgeschüttet.

Ein Grund für die erhöhte Produktionsrate von MSZ in PL-haltigen Medien dieser vorliegenden Versuchsreihe könnte das hohe Angebot an den u.a. weiter oben erwähnten Wachstumsfaktoren sein. Desweiteren würde für den Gebrauch von PL-sprechen, dass Thrombozytenkonzentrate im klinischen Alltag bereits regelmäßig hergestellt und angewendet werden und dass die Bedingungen für eine sichere und gut kontrollierte Quelle für Wachstumsfaktoren hierbei zutreffen.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass multipotente hMSZ aus Knochenmarkaspiraten adulter Spender isoliert und in PL-haltigen Medien expandiert werden können. Die Kultivierung der MSZ erfolgte sowohl auf 6-Loch-Platten als auch in T25- und T75-Kulturflaschen. Ein Unterschied bezüglich des Wachstumsverhaltens und der Zellmorphie abhängig vom Kultivierungsraum war dabei nicht zu beobachten. Es fiel lediglich auf, dass sich die adhärenenten MSZ unter der Gabe von Trypsin beim Zusatz von FKS schneller von der Oberfläche ablösten als beim Zusatz von PL. Möglicherweise lässt sich diese Beobachtung mit der Ausbildung eines granulären Präzipitatfilms über den Zellkolonien in Medien mit Zusatz von PL erklären. Das schnellere Ablösen der MSZ hatte keine Auswirkungen auf das weitere Wachstum und das Differenzierungsverhalten.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist es möglich, das Protokoll für die Expansion von hMSZ in PL-haltigem Medium (Yamada et al., 2004; Doucet et al., 2005; Müller et al., 2006) zu

unterstützen und zu verbessern. So zeigten sich schon während der Isolation von hMSZ in PL-haltigen Medien nicht nur größere Kolonien von CFU-F, wie sie von Doucet et al. beschrieben waren (Doucet et al., 2005), sondern auch eine signifikant höhere Anzahl an Kolonien. Dies trifft besonders auf das GMP-produzierte Medium LP02 zu, welches eine gute Basis für zukünftig GMP-kompatible klinische Produktionen von MSZ darstellen könnte. In PL-haltigem LP02 kultivierte hMSZ waren erstaunlicherweise von einer langgestreckten, fibroblastenartigen Morphologie (Abb. 8d). Diese war mit einer erwähnenswert höheren Zellzahl als im Standardmedium verbunden, trotz identischer Oberflächenbedingungen. So sind die Verdopplungszahlen in M4 nahezu doppelt so hoch wie in M1, was schon nach 5 Wochen und in der folgenden Zeit zu beträchtlich höheren kumulativen Zellzahlen führte (Abb. 12). Daraus ist zu schließen, dass während einer identischen Expansionsphase höhere, potentiell therapeutische Dosen durch den Gebrauch von M4 als durch die Anwendung von Standardmedium gewonnen werden können. Außerdem muss bedacht werden, dass rekombinante Wachstumsfaktoren zur Beschleunigung des Wachstums von MSZ nicht als GMP-Produkte erhältlich sind, was auch für den Einsatz von PL-haltigen Medien spricht, die ja bereits Wachstumsfaktoren enthalten.

Bemerkenswert ist, dass die Expansionsrate von MSZ durch das Poolen einer größeren Anzahl von PRPs optimiert werden kann (Abb. 18). Es konnte vorher gezeigt werden, dass jedes PRP eine bestimmte Anzahl an mitogenen Zytokinen ausschüttet. Die Menge an PDGF- $\alpha\beta$ z.B. kann zwischen 35-133 ng/ml variieren (Marx, 2004). Von den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich ableiten, dass eine Mindestanzahl von 10 PRP bei der Herstellung von PL nötig ist, um die in einigen PRP-Präparaten enthaltene geringere Menge an Wachstumsfaktoren auszugleichen. Erst dadurch wird der Gebrauch des Kulturmediums zuverlässiger. Ebenso zeigte die Titration von Plättchenkonzentraten, dass eine minimale Schwelle für die Zytokinmenge vorhanden ist, nach deren Überschreitung die optimale MSZ-Expansion erfolgt. Durch noch größere Mengen an Wachstumsfaktoren kann die Expansionsrate allerdings nicht mehr gesteigert werden.

Kürzlich wurde gezeigt, dass aktivierte Plättchen relativ schnell SDF-1 (stroma-derived factor 1) aus intrazellulären Speichern sezernieren (Massberg et al., 2006), ein Zytokin, welches die Migration von Progenitorzellen und den Homing-Prozess beeinflusst, indem es über den Rezeptor CXCR-4 reagiert. Aus diesem Grund könnte beim Gebrauch von PL die Motilität von hMSZ für die in vivo Anwendung bewahrt werden (Kobayashi et al., 2005).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass es das hier vorgestellten Protokoll ermöglicht, abhängig vom Spender innerhalb von 6 Passagen bis zu 10^{16} - 10^{20} hMSZ aus einem kleinen Volumen an Knochenmark zu erhalten. Dafür wären 10-11 Wochen nötig, in denen eine solide Grundlage für Zellpräparation für allogene Zelltherapie gelegt werden könnte.

Diskussion der Ergebnisse zur Differenzierung

Die aus dem Knochenmark gewonnenen MSZ sind in der Lage, sich in eine Vielzahl von mesenchymalen Zelllinien zu differenzieren. Um die Multipotenz von kultivierten hMSZ zu demonstrieren, wurden die Differenzierungen in die adipo-, osteo- und chondrogenen Zelllinien untersucht. MSZ aller Kulturmedien waren in der 6. Passage in der Lage, sich auf diesen Differenzierungswegen zu entwickeln. Außerdem wurde bei MSZ der P10 erneut das Differenzierungspotential getestet. In Frage kamen dabei nur in PL-haltigen Medien kultivierte Zellen, da nur diese so hohe Passagen erreichten. Auch bei diesen war das Differenzierungsvermögen in alle drei Zelllinien erhalten. Besonders die Fähigkeit zur chondrogenen Differenzierung war bei sehr lange kultivierten Zellen erhalten oder sogar gesteigert. Diese Ergebnisse stimmen überein mit den Beobachtungen von Doucet et al. (Doucet et al., 2005) und von Müller et al. (Müller et al., 2006)

Gemeinsam hatten die Zellen der jeweiligen Kulturmedien, dass unter dem Zusatz der osteogenen oder adipogenen Induktionssubstanzen eine Veränderung der Zellmorphologie zu beobachten war. Aus den vormals langgestreckten, schlanken Zellen wurden innerhalb weniger Tage deutlich kürzere, flächigere Zellen, die größtenteils eine kuboide Gestalt annahmen.

Es ist wichtig zu erwähnen, dass die Anzahl der Passagen an sich nicht charakteristisch ist für die Differenzierungsfähigkeit, sondern immer in Zusammenhang mit der Aussaatdichte nach dem Trypsinieren betrachtet werden muss. Während des gesamten Versuchs wurde mit einer Aussaatdichte von 500 Zellen/cm² gearbeitet, wohingegen Doucet et al. (Doucet et al., 2005) und andere Arbeitsgruppen 1-6 x 10³ Zellen/cm² aussäten. Mathematisch betrachtet müssen sich in geringerer Dichte ausgesäte Zellen etwa 1-3,5 mal häufiger teilen als in höheren Dichten ausgesäte, was im Vergleich zu Zellen derselben Passagen von anderen Autoren zu einer höheren Aktivität der Proliferation und einem höheren Alter führt.

Die Ergebnisse der Adipogenese in dieser Arbeit unterscheiden sich von den bereits veröffentlichten Ergebnissen (Doucet et al., 2005; Müller et al., 2006). In PL-reichen Medien war eine Zeitverschiebung bei der Bildung von Fettvakuolen und eine geringere Anzahl von Zellen, die sich in Adipozyten umwandeln, zu beobachten. Als Grund für diese Diskrepanz könnte der spätere Ansatz zur Differenzierung sein (P2 versus P6), was schon an sich zu verringerter adipogener Differenzierung führt. Die Beobachtungen stimmen überein mit den Ergebnissen der Genexpression, welche eine Herunterregulierung von Genen zeigt, die am Fettsäuremetabolismus beteiligt sind. Dazu zählen der Sterol regulierendes Element bindender Transkriptionsfaktor 2 (SREBF2), welcher die adipogene Differenzierung fördert, und Apolipoprotein E (ApoE).

Letzteres wurde als essentielles Protein für den normalen Katabolismus von triglyzeridreichen Lipoprotein-Bestandteilen beschrieben (van den Elzen et al., 2005). Daher könnte eine Herunterregulierung von diesen Proteinen ein Grund für die zeitverzögerte Akkumulation von Fettvakuolen in PL-haltigen Kulturmedien sein.

Diskussion der Ergebnisse aus der Bestimmung von Oberflächenmarkern

An Zellen der 6. Passage, die in den vier unterschiedlichen Medien mit Zusatz von FKS oder PL kultiviert wurden, fand mittels Durchflusszytometrie die Bestimmung von verschiedenen Oberflächenmarkern statt. Ausgewählt wurden Markerproteine, die den immunologischen Phänotyp von MSZ des Knochenmarks (MSZ nach Caplan et al.) widerspiegeln, welche unter dem Zusatz von 10% FKS kultiviert wurden (Haynesworth et al., 1992a; Barry et al., 1999; Pittenger et al., 1999; Wexler et al., 2003).

Die Durchführung von FACS-Untersuchungen ergab in den kultivierten Zellen unter dem Zusatz von PL und FKS ein einheitliches Bild hinsichtlich ihrer SSC und FSC Verteilung. Die Bestimmung der Oberflächenantigene zeigte das hohe Vorhandensein der für mesenchymale Stammzellen typischen Oberflächenmarker CD59, CD90 und CD105 unter gleichzeitigem Ausschluss der hämatopoetischen Marker CD34 und CD45 und MCH II (HLA Klasse II).

Die MHC II-abhängige Immunantwort ist für die Immunabwehr von zentraler Bedeutung. Das Fehlen von HLA-Antigenen auf MSZ lässt darauf schließen, dass der Kontakt mit MSZ keine Proliferation von Lymphozyten und keine zellvermittelte Lympholyse durch zytotoxischer Lymphozyten hervorruft (Di Nicola et al., 2002). MSZ sind somit nicht immunogen und zeigen sogar immunsuppressive Eigenschaften (Bartholomew et al., 2002; Le Blanc et al., 2003, 2004).

Diskussion der Ergebnisse der Genexpression

Die Beobachtung, dass die in PL-haltigem M4 kultivierten Zellen schneller expandieren, wird durch Genexpressionsergebnisse untermauert (Abb. 21).

Proteine, wie z.B. Zyklone und die Zyklin-abhängigen Kinase (Cdk) sind essentiell für die Progression des Zellzyklus. Die für diese Proteine codierende mRNA wurde in den Genexpressionsanalysen als hochreguliert nachgewiesen. Dieser Umstand reflektiert damit die in der Zellkultur erhöhten Zellzahlen. Im Gegensatz dazu waren Gene, die u.a. für Insuline-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) und Nerve growth factor beta-polypeptid (NGFB)

kodieren und für die Differenzierung und Entwicklung der Zelle mitverantwortlich sind, herunterreguliert. Diese Tatsache erklärt wiederum die beschleunigte Expansion von hMSZ ohne den Verlust ihrer Multipotenz.

Die verzögerte adipogene Differenzierung der in PL-haltigen Medien expandierter hMSZ spiegelt sich, wie bereits weiter oben erwähnt, ebenfalls in der Genexpression dieser Zellen wieder. Es war eine Herunterregulierung von Genen erkennbar, welche die adipogene Differenzierung fördern, wie z.B. ApoE und SREBF2.

Die Beeinflussung der Genexpression scheint dabei von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auszugehen, die von Plättchen freigesetzt werden. Darauf deutet jedenfalls die Abhängigkeit der Wachstumsunterschiede, die vielmehr von dem Zusatz (FKS oder PL) der Kulturmedien als von den Kulturmedien selbst ausgeht.

Ein wichtiger Punkt bei der Anwendung von in vitro kultivierten Zellen ist ihre genomische Stabilität. An Mäuse-MSZ wurden bereits wiederholte Male chromosomale Abnormalitäten beschrieben (Miura et al., 2006). Für humane MSZ ist die spontane Transformation eher ungewöhnlich. Aber eine Expansion über einen Zeitraum von 4-5 Monaten scheint auch bei hMSZ zu spontanen Transformationen zu führen (Rubio et al., 2005). Auch wenn dieser Fall eher selten sein sollte, ist für den therapeutischen Einsatz von kultivierten Zellen ein gewisser Grad an Sicherheit Voraussetzung.

Nach dem Kultivierungsprotokoll dieser Arbeit sind innerhalb von sechs Passagen hohe Zellzahlen zu erreichen. Die so kultivierten Zellen wiesen alle einen normalen Karyotypen auf und würden daher als sichere Zellpräparate gelten. Man könnte also nach den Ergebnissen dieser Arbeit die Expansionszeit auf 6 Passagen begrenzen, was eine Kultivierung von 12 Wochen nicht überschreiten würde. In dieser Zeit wäre die Gewinnung von einer ausreichenden Anzahl von Zellen mit normalem Karyotyp für den Einsatz in größeren klinischen Studien möglich.

6. Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurde durch intensive Untersuchungen an hMSZ bekannt, dass diese Zellen ein großes therapeutisches Potential besitzen und gut zu expandieren sind. Das Bestreben, diese Zellen in verschiedenen Anwendungsgebieten der Medizin zu nutzen, nimmt zu. Die Expansion der hMSZ erfolgte standardmäßig unter dem Zusatz tierischer Seren. Die Kontamination mit tierischen Proteinen während der Kultivierung verbietet in Deutschland und einigen anderen Ländern die nachfolgende Transplantation am Menschen. Diese Limitierung der Einsetzbarkeit in der Klinik kann mit dem Verzicht auf tierisches Eiweiß vermindert werden. Für den klinischen Einsatz von in vitro kultivierten MSZ ist es zwingend erforderlich, das Risiko der Übertragung von Krankheitserregern, Prionen und die Gefahr einer überschießenden Immunreaktion durch den Kontakt mit tierischem Fremdeiweiß ganz auszuschließen oder deutlich zu minimieren.

In der vorliegenden, experimentellen Arbeit wurde die Qualität verschiedener Kulturmedien (M1-M4) bezüglich der Gewinnung, der Expansion und der osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierbarkeit von adulten mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarkes vergleichend untersucht. Die nach dem vorliegenden Protokoll kultivierten Zellen wiesen alle die in dem internationalen Konsens definierten charakteristischen Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen auf wie: a) Plastikadhärenz, b) fibroblastoide Morphologie, c) definierter Phänotyp von Antigenen und d) adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierbarkeit als Zeichen ihrer Multipotenz. In der 6. Passage wurden weiterhin zytogenetisch normale Zellen vorgefunden, die auch ihre Eigenschaft, die allogene Reaktion der T-Zellen zu unterdrücken, beibehielten.

Außerdem zeigten die Genexpressionanalysen von PL-haltig kultivierten Zellen hohe mRNS-Level von Genen, die eine Rolle in der Regulation von Zellzyklus und DNS-Replikation spielen. Auch ließ sich eine Herunterregulierung der Gene erkennen, die verantwortlich sind für die Entwicklung und Differenzierung der Zelle. Durch diese Ergebnisse wird die beschleunigte Expansion von hMSZ ohne Verlust der Multipotenz in PL-haltigen Medien gestützt.

Zusammengefasst erlaubt dieses GMP-kompatible Protokoll eine sichere und beschleunigte Expansion von hMSZ, welche für die therapeutische Anwendung im Bereich von Zell- und Gewebeersatz von Interesse sein könnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Kultivierung von hMSZ ohne FKS durchführbar ist und darüber hinaus mehrere Vorteile mit sich bringt. Der Ersatz von FKS durch PL führt regelmäßig zu einem beschleunigten MSZ-Wachstum. Im Vergleich zu in FKS-haltigem Medium kultivierten Zellen erreichen die Zellzahlen in PL-reichem Medium einen weitaus höheren Wert. Das Grundmedium scheint kein entscheidender Faktor zu sein, aber trotzdem sollte ein GMP-

produziertes Grundmedium die erste Wahl darstellen. Als Standard könnte ein Medium dienen, welches, 5 % PL enthält, wobei das PL aus $1,5 \times 10^9$ Plättchen/ml gewonnen werden sollte. Die Kultivierung mit PL ist sicher und führt zum Erhalt von Zellen mit normalem Karyotyp, zumindest bis Passage 6.

Abschließend legt die vorliegende Arbeit nahe, den Gebrauch von FKS in Kulturmedien, aus welchen in der Klinik anwendbare Zellen gewonnen werden sollen, zu unterlassen, um sichere, therapeutisch nutzbare Zellen aus kleinen Knochenmarkvolumina zu erhalten.

7. Literaturverzeichnis

Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ (1998)

Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts.

Proc Natl Acad Sci USA 95(7): 3908 – 3913.

Azofeifa J, Fauth C, Kraus J, Maierhofer C, Langer S, Bolzer A, Reichman J, Schuffenhauer S, Speicher MR (2000)

An optimized probe set for the detection of small interchromosomal aberrations by use of 24-color FISH

Am J Hum Genet 66(5): 1684-1688

Baksh D, Song L and Tuan RS (2004)

Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy.

J Cell Mol Med 8:301-16.

Barry FP, Boynton R, Murphy M, Haynesworth S, Zaia J (1999)

The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105).

Biochem Biophys Res Commun 265(1): 134 – 139.

Bartholomew A, Sturgeon C, Siatkas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R (2002)

Mesenchymal stem cell suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo.

Exp Hematol 30(1): 42 – 48.

Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE (1990)

Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone.

Dev Biol 140(1): 132 – 138.

Beresford JN (1989)

Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow.

Clin Orthop 240: 270 – 280.

Beresford JN, Joyner CJ, Devlin C, Triffitt JT (1994)

The effect of dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteogenic differentiation of human marrow stromal cells in vitro.

Arch Oral Biol 39(11): 941 – 947.

Beresford JN, Owen ME (1998)

Handbooks in practical animal cell biology: marrow stromal cell culture.

United Kingdom: Cambridge University Press.

Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R (2003)

Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2.

Exp Cell Res 287(1): 98 – 105.

Bosch P, Musgrave DS, Lee JY, Gummins J, Shuler T, Ghivizzani TC, Evans T, Robbins TD, Huard J (2000)

Osteoprogenitor cells within skeletal muscle.

J Orthop Res 18(6): 933 – 944.

Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE (1997)

Growth kinetics, self-renewal and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation.

J Cell Biochem 64(2): 278 – 294.

Caplan A. (1991)

Mesenchymal stem cells.

J Orthop Res.;9:641-650.

Caplan AI (1994)

The mesengenic process.

Clin Plast Surg 21:429-35.

Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM (1997)

Principles of cartilage repair and regeneration.

Clin Orthop 342: 254 – 269

Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G. (1980)

Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny.

Blood 56:289-301.

Chachques JC, Herreros J, Trainini J, Juffe A, Rendal E, Prosper F, Genovese J. (2004)

Lifethreatening arrhythmias after cellular cardioplasty. Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of cardioverter-defibrillators in cellular cardiomyoplasty.

Int J Cardiol 95, Suppl 1:S29-33.

Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S, Sun JP (2004)

Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction.

Am J Cardiol 94:92-95.

Cheng S-L, Yang JW, Rifas L, Zhang S-F, Avioli LV (1994)

Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: Induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone.

Endocrinology 134(1): 277 – 286.

Chuah MK, Van Damme A, Zwinnen H, Goovaerts I, Vanslembrouck V, Collen D, Vandendriessche T (2000)

Long-term persistence of human bone marrow stromal cells transduced with factor VIII retroviral vectors and transient production of therapeutic levels of human factor VIII in non-myeloablated immunodeficient mice.

Hum Gen Ther 11(5): 729 – 738.

Cohnheim J (1867)

Arch Path Physiol Klein Med, 40:1

Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ (2000)

Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic adherent cells from human bone marrow.

Proc Natl Acad Sci USA 97(7): 3213 – 3218.

Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ (2001)

Identification of a subpopulation of rapid self – renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells.

Proc Natl Acad Sci USA 98(14): 7841 – 7845.

Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, Kloner RA (2005)

Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and longterm effects

Circulation 112:214-223.

Deans RJ, Moseley AB (2000)

Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses.

Exp Hematol 28:875-884.

De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP (2001)

Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane.

Arthritis Rheum 44(7): 1928 – 1942.

Dennis JE, Caplan AI (1996)

Differentiation potential of conditionally immortalized mesenchymal progenitor cells from adult marrow of a H-2Kb-tsA58 transgenic mouse.

J Cell Physiol 167(3): 523 – 538.

Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, Charbord P (2002)

The Stro-1+ marrow cell population is multipotential.

Cells Tissues Organs 170(2-3): 73 - 82.

DiGirolamo CM, Stokes D, Colter DC, Phinney DG, Class R, Prockop DJ (1999)

Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simply colonyforming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate.

Br J Haematol 107(2): 275 – 281.

Dimarakis I, Levicar N (2006)

Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research

Stem Cells 24:1407-1408.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Metteucci P, Grisanti S, Gianni AM (2002)

Human bone marrow stromal cell suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli.

Blood 99(10): 3839 – 3843.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E (2006)

Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement

Cytotherapy 8:315-317.

Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, Lataillade JJ (2005)

Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cellbased therapy applications

J Cell Physiol 205:228-236.

Erdö F, Bührle C, Blunk J, Hoehn M, Xia Y, Fleischmann B, Föcking M, Küstermann E, Kolossov E, Hescheler J, Hossmann KA, Trapp T (2003)

Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke.

J Cereb Blood Flow Metab. 23(7):780-5.

Erices A, Conget P, Minguell JJ (2000)

Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood.

Br J Haematol 109(1): 235 – 242.

Feig C, Kirchhoff C, Ivell R, Naether O, Schulze W, Spiess AN (2006)

A new paradigm for profiling testicular gene expression during normal and disturbed human spermatogenesis.

Mol Hum Reprod Nov 17;

Fibbe WE, Noort WA (2003)

Mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cell transplantation

Ann N Y Acad Sci. 996:235-244.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G (1998)

Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors.

Science 279(5356): 1528 – 1530.

Frassoni F, Labopin M, Bacigalupo A, Gluckman E, Rocha V, Bruno B (2002)

Expanded mesenchymal stem cells (MSC), co-infused with HLA identical hemopoietic stem cell transplants, reduce acute and chronic graft-versus-host disease: a matched pair meeting of the analysis.

Int Soc Cell Ther , SA 006 (Abstract).

Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV (1966)

Osteogenesis in transplants of bone marrow cells.

J Embryol Exp Morphol 16(3): 381 – 390.

Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, Ruadkow IA (1974)

Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method

Exp Hematol 2:83-92.

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV (1987)

Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers.

Cell Tissue Kinet 20(3): 263 – 272.

Fukuda K (2001)

Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering.

Artif Organs 25(3): 187 – 193.

Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC (1996)

Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo.

J Exp Med.; 183(4):1797-806.

Gregory CA, Singh H, Perry AS, Prockop DJ (2003)

The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow.

J. Biol Chem 278:28067-28078.

Gregory CA, Reyes E, Whitney MJ, Spees JL (2006)

Enhanced engraftment of mesenchymal stem cells in a cutaneous wound model by culture in allogenic species-specific serum and administration in fibrin constructs

Stem Cells 24:2232-2243.

Gronthos S, Graves SE, Otha S, Simmons PJ (1994)

The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors.

Blood 84(12): 4164 – 4173.

Gruber R, Karreth F, Kandler B, Fuerst G, Rot A, Fischer MB, Watzek G (2004)

Platelete-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions.

Platelets 15:29-35.

Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI (1992a)

Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal stem cells are detectet by monoclonal antibodies.

Bone13(1): 69 – 80.

Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI (1992b)

Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow.

Bone 13(1): 81 – 88.

Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI (1996)

Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro:

Effects of dexamethasone and IL-1.

J Cell Physiol 166(3): 585 – 592.

Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK (1999)

Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta

Nat Med 5: 309-313.

Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, Li H, Ma HL and Lo WH (2002)

Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow.

Stem Cells 20:249-58.

Ito T, Suzuki A, Okabe M, Imai E, Hori M (2001)

Application of bone marrow-derived stem cells in experimental nephrology.

Exp Nephrol 9(1): 444 – 450.

Jaquet K, Krause KT, Denschel J, Faessler P, Nauerz M, Geidel S, Boczor S, Lange C, Stute N, Zander A, Kuck KH (2005)

Reduction of myocardial scar size after implantation of mesenchymal stem cells in rats: what is the mechanism?

Stem Cells Dev 14:299-309.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP (1997)

Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro.

J Cell Biochem 64(2): 295 – 312.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002)

Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.

Nature 418(4): 41 – 49.

Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU (1998)

In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells.

Exp Cell Res 238(1): 265 – 272.

Kobayashi T, Watanabe H, Yanagawa T, Tsutsumi S, Kayakabe M, Shinozaki T, Higuchi H, Takagishi K (2005)

Motility and growth of human bone-marrow mesenchymal stem cells during ex vivo expansion in autologous serum

J Bone Joint Surg Br 87:1426-1433.

Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM (2000)

Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy

J Clin Oncol 18:307-316.

Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W (2002)

Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH)

Bone Marrow Transplant 30:215-222.

Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG (1999)

Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains

Proc Natl Acad Sci U S A 96:10711-10716.

Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D, Robey PG (1997)

Single-colony derived strain of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo.

J Bone Miner res 12(9): 1335 – 1347.

Lange C, Schroeder J, Stute N, Lioznov MV, Zander AR (2005A)

High-potential human mesenchymal stem cells

Stem Cells Dev 14:70-80.

Lange C, Togel F, Ittrich H, Clayton F, Nolte-Ernsting C, Zander AR, Westenfelder C (2005B)

Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats

Kidney Int 68:1613-7.

Lange C, Cakiroglu F, Spiess AN, Cappallo-Obermann H, Dierlamm J, Zander AR (2007)

Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine.

J Cell Physiol;213(1):18-26.

Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O (2003)

HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells.

Exp Hematol 31:890-896.

Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O (2004)

Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells

Lancet 363:1439-1441.

Lennon DP (1996)

Human and animal mesenchymal progenitor cells from bone marrow: Identification of serum for optimal selection and proliferation.

In vitro Cell Dev Biol 32: 602 - 611.

Lennon DP, Haynesworth SE, Bruder SP, Jaiswal N, Caplan AI (1996)

Development of a serum screen for mesenchymal progenitor cells from bone marrow.

In Vitro Cell Dev Biol 32(10): 602 – 611.

Liu P, Oyajobi BO, Russell RG, Scutt A (1999)

Regulation of osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells: interaction between transforming growth factor-beta and 1,25(OH)₂ vitamin D₃ in vitro.

Calcif Tissue Int 65(2): 173 – 180.

Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM, Meotti C, Bertoja AZ, Giardino R, Fornasari PM, Mercuri M, Picci P (2003)

Platelet- derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells *Biomaterials* 24:3095-3100.

Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF (1998)

Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from bone marrow. *Tissue Eng* 4(4): 415 – 428.

Mackensen A, Drager R, Schlesier M, Mertelsmann R, Lindemann A (2000)

Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 49(3): 152 -156.

Mahmood A, Lu D, Chopp M (2004)

Marrow stromal cell transplantation after traumatic brain injury promotes cellular proliferation within the brain
Neurosurgery 55:1185-1193.

Majors AK, Boehm CA, Nitto H, Midura RJ, Muschler GF (1997)

Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation
J Orthop Res. 15(4):546-57.

Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S (1999)

Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro.
J Clin Invest 103(5): 697 – 705.

Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F (2001)

Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood.
Haematologica 86:1099-1100.

Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR (1998)

Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 85:638-646.

Marx RE (2004)

Platelet-rich plasma: evidence to support its use.
J Oral Maxillofac Surg 62:489-496.

Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zohlhoefer D, Hoppe K, Schiemann M, Kennerknecht E, Sauer S, Schulz C, Kerstan S, Rudelius M, Seidl S, Sorge F, Langer H, Peluso M, Goyal P, Vestweber D, Emambokus NR, Busch DH, Frampton J, Gawaz M (2006)

Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo

J Exp Med 203:1221-1233.

Matsubara T, Tsutsumi S, Pan H, Hiraoka H, Oda R, Nishimura M, Kawaguchi H, Nakamura K, Kato Y (2004)

A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix.

Biochem Biophys Res Commun. 313(3): 503 – 508.

Meuleman N, Tondreau T, Delforge A, Dejeneffe M, Massy M, Libertalis M, Bron D, Lagneaux L (2006)

Serum-free medium supplemented with a serum substitute

Eur J Haematol 76:309-316.

Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V, Seo BM, Sonoyama W, Zheng JJ, Baker CC, Chen W, Ried T, Shi S (2006)

Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation.

Stem Cells 24:1095-1103.

Mizuno N, Shiba H, Ozeki Y, Mouri Y, Niitani M, Inui T, Hayashi H, Suzuki K, Tanaka S, Kawaguchi H, Kurihara H (2006)

Human autologous serum obtained using a completely closed bag system as a substitute for foetal calf serum in human mesenchymal stem cell cultures

Cell Biol Int 30:521-524.

Muller I, Kordowich S, Holzwarth C, Spano C, Isensee G, Staiber A, Viebahn S, Gieseke F, Langer H, Gawaz MP, Horwitz EM, Conte P, Handgretinger R, Dominici M (2006)

Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM

Cytotherapy 8:437-444.

Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI (1991)

Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo.

J Orthop Res 9(4): 465 – 476.

Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS (2002)

Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells.

J Orthop Res 20(5): 1060 – 1069.

Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, Werner C (2004)

Mesenchymale stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro.

Stem Cells 22(3): 377 – 384.

Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemin G (2000)

Tissue-engineered bone regeneration

Nat Biotechnol 18:959-963.

Phinney DG, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N and Prockop DJ (1999)

Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells.

J Cell Biochem 75:424-36.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999)

Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells

Science 284:143-147.

Poh KK, Sperry E, Young RG, Freyman T, Barringhaus KG, Thompson CA (2006)

Repeated direct endomyocardial transplantation of allogeneic mesenchymal stem cells: Safety of a high dose, "off-the-shelf", cellular cardiomyoplasty strategy

Int J Cardiol Aug 2;

Prockop D (1997)

Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues

Science 276:71-74.

Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL (2003)

One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissue.

Proc Natl Acad Sci (USA) 100(1): 11917 - 11923.

Reyes M, Verfaillie CM (2001)

Characterization of multipotent adult progenitor cells. A subpopulation of mesenchymal stem cells.

Ann N Y Acad Sci 938: 231 – 233.

Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM (2001)

Purification and ex vivo expansion of postnatal human bone marrow mesodermal progenitor cells.

Blood 98(9): 2615 – 2625.

Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, Sarkar G, Spelsberg TC, Riggs BL (1996)

Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow.

J Bone Miner Res 11(3): 312 – 324.

Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnie H, Marschall HU, Dlugosz A, Szakos A, Hassan Z, Omazic B, Aschan J, Barkholt L, Le Blanc K (2006)

Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease
Transplantation 81:1390-1397.

Robertson JA (2001)

Human embryonic stem cell research: ethical and legal issues.
Nat Rev Genet 2(1): 74 – 78.

Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A (2005)

Spontaneous human adult stem cell transformation.
Cancer Res 65:3035-3039.

Saito T, Dennis JE, Lennon DP, Young RG, Caplan AI (1995)

Myogenic expression of mesenchymal stem cells within myotubes of mdx mice in vitro
and in vivo.
Tissue Engin 1(4): 327 – 343.

Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ (2002)

Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the
yields of early progenitors and evaluate their quality.
Stem Cell 20(6): 530 – 541.

Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA (1997)

Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human
immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions
Blood 89:776-779.

Shahdadfar A, Fronsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE (2005)

In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell
proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability
Stem Cells 23:1357-1366.

Shakibaei M and De Souza P (1997)

Differentiation of mesenchymal limb bud cells to chondrocytes in alginate beads.
Cell Biol Int 21:75-86.

Simmons PJ, Torok-Storb B (1991)

Identification of stromal cell Precursors in human bone marrow by a novel monoclonal
antibody, STRO-1.
Blood 78(1): 55 -62.

Simmons PJ, Gronthos S, Zannettino A, Otha S, Graves S (1994)

Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in
hemopoiesis.

Prog Clin Biol Res 389: 271 – 280.

Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen J, Stenderup K, Rattan SI, Jensen TG, Kassem M (2002)

Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells.

Nat Biotechnol 20(6): 592 – 596.

Spees JL, Gregory CA, Singh H, Tucker HA, Peister A, Lynch PJ, Hsu SC, Smith J, Prockop DJ (2004)

Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy

Mol Ther 9:747-756.

Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR (2004)

Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use

Exp Hematol 32:1212-1225.

Till Je, McCulloch Ea. (1963)

Early repair processes in marrow cells irradiated and proliferating in vivo.

Radiat Res. 18:96-105.

Tögel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C (2005)

Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms

Am J Physiol Renal Physiol 289:F31-42.

Tuschong L, Soenen SL, Blaese RM, Candotti F, Muul LM (2002)

Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy.

Hum Gene Ther. 13(13):1605-10.

Van Vlasselaer P, Falla N, Snoeck H and Mathieu E (1994)

Characterization and purification of osteogenic cells from murine bone marrow by two-color cell sorting using anti-Sca-1 monoclonal antibody and wheat germ agglutinin.

Blood 84:753-63.

Verfaillie C, Pera M, Lansdorp P. (2002)

Stem cells hype and reality

Hematology 369-391.

Verfaillie CM, Schwartz R, Reyes M, Jiang Y (2003)

Unexpected potential of adult stem cells.

Ann N Y Acad Sci. 996:231-4.

Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM (1994)

Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage.

J Bone Joint Surg Am 76(4): 579 – 592.

Waller EK, Olweus J, Lund-Johansen F, Huang S, Nguyen M, Guo GR Terstappen L (1995)

The “common stem cell” hypothesis reevaluated: human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors.

Blood 85(9): 2422 – 2435.

Watt FM, Hogan BL (2000)

Out of Eden: stem cells and their niches.

Science 287:1427-1430.

Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM (2003):

Adult bone marrow is rich source of human mesenchymal ‘stem’ cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not.

Br J Haematol 121(2): 368 – 374.

Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Nagasaka T (2004)

Translational Research for Injectable Tissue-Engineered Bone Regeneration Using Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma: From Basic Research to Clinical Case Study

Cell Transplantation 13:343-355.

Yamaguchi M, Hirayama F, Wakamoto S, Fujihara M, Murahashi H, Sato N, Ikebuchi K, Sawada K, Koike T, Kuwabara M, Azuma H, Ikeda H. (2002)

Bone marrow stromal cells prepared using AB serum and bFGF for hematopoietic stem cells expansion.

Transfusion 42(7):921-7.

Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ (1998)

Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair.

J Orthop Res 16(4): 406 – 413.

Zander AR, Stute N, Kolb HJ, Seeber S, Schmitz N (2002)

Stammzellforschung. Diesseits des Rubikon.

Deutsches Ärzteblatt 99(6): A341 – A343.

Zohar R, Sodek J and McCulloch CA (1997)

Characterization of stromal progenitor cells enriched by flow cytometry.

Blood 90:3471-81

Zuk, PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001)

Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.

Tissue Eng 7(2): 211 – 228.

Zuk P, Zhu M, Ashjian P, et al.

Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.

Mol Biol Cell. 2002;13:4279-4295.

8. Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an meinen Doktorvater, **Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. A. R. Zander**, für die Vergabe des Themas, für die Bereitstellung aller nötigen Materialien und für die freundliche Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Betreuerin **PD Dr. rer. nat. Claudia Lange**, die mich während dieser Zeit konstruktiv betreut und geduldig gefördert hat. Ihre Unterstützung stellte eine wichtige Stütze in der Durchführung der Arbeit dar und trug damit maßgeblich zum Gelingen bei.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Forschungslabors, im Besonderen bei Anke Wahlers, Stefan Hartung und Kathleen Mevius, für die angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfe.

Meinen Eltern **Maide** und **Hasan Hüseyin Cakiroglu** gebührt ein besonderer Dank, da sie mir dieses Studium ermöglichten und immer für mich da sind.

Auch all meinen **Freunden** möchte ich an dieser Stelle danken für ihre bewusste und unbewusste Motivation, diese Doktorarbeit und mein Studium zu beenden.

9. Lebenslauf

05.08.82	Geboren in Neumünster als jüngstes von 3 Kindern der Eheleute Hasan Hüseyin Cakiroglu und Maide Cakiroglu
August 1993	Einschulung in das Klaus-Groth-Gymnasium, Neumünster
Juni 2002	Bestehen des Abiturs am Klaus-Groth-Gymnasium
Oktober 2002	Beginn des Humanmedizinstudiums an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
September 2004	Bestehen der ärztlichen Vorprüfung an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
November 2008	Bestehen des 2. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
Seit 01.06.2009	Assistenzärztin in der Medizinischen Abteilung II des St. Joseph Krankenhauses, Berlin

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht an einen Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Figen Cakiroglu