

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

**Institut für Biochemie und Molekularbiologie II : Molekulare Zellbiologie**

**Frau Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel**

**Optimierung der Proliferationsrate humaner mesenchymaler  
Stammzellen zum Zwecke des *Tissue Engineering***

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

**vorgelegt von**

**Yaser Salhi**

**aus Gaza, Palästina**

**Hamburg**

**2010**

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 06.04.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. P. Adamietz

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. W. Rüter

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	1
<b>1 Zielsetzung und theoretischer Hintergrund .....</b>	<b>4</b>
<b>2 Einleitung .....</b>	<b>6</b>
2.1 Ursprung und Herkunft von mesenchymalen Stammzellen .....	8
2.2 Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen .....	10
2.3 Plastizität der Stammzellen .....	14
2.4 Therapeutische Verwendung von mesenchymalen Stammzellen .....	15
2.4.1 Immunsuppression .....	16
2.4.2 Gentherapie .....	16
2.4.3 Knochenrekonstruktion .....	16
2.4.4 Gelenk-Knorpelrekonstruktion .....	18
2.5 Stammzellen und <i>Tissue engineering</i> .....	20
2.6 <i>In vitro</i> Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen .....	26
2.6.1 Adipogene Differenzierung .....	26
2.6.2 Myogene Differenzierung .....	26
2.6.3 Osteogene Differenzierung .....	27
2.6.4 Chondrogene Differenzierung .....	30
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>33</b>
3.1 Material .....	33
3.1.1 Untersuchungsmaterial .....	33
3.1.2 Geräte und Materialien .....	33
3.2 Methoden .....	35
3.2.1 Isolierung von mesenchymalen Stammzellen .....	35
3.2.2 Kultivierung der isolierten Stammzellen .....	36
3.2.3 Passagieren der Zellkulturen .....	40
3.2.4 Einfrieren der Zellkulturen .....	40
3.2.5 Auftau-Vorgang der konservierten Zellen .....	40
3.2.6 Durchflusszytometrische Analyse .....	41
3.2.6.1 Markieren der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörper .....	41

3.2.6.2	Grundlagen der Durchflusszytometrie (Flow Cytometrie) .....	41
3.2.6.3	Einstellen der FSC- und SSC-Detektoren .....	42
3.2.6.4	Analyse .....	42
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
4.1	Isolierung und Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen.....	43
4.1.1	Anreicherung der hMSCs über den Ficoll-Gradienten .....	43
4.1.2	Abtrennung der hämatopoetischen Zellen .....	43
4.1.3	Zellmorphologie von Primärzellen.....	45
4.1.4	Die Heterogenität der kultivierten Zellpopulation .....	46
4.2	Einfluss der Adhärungsdauer und Aussaatdichte auf die Proliferationsrate der hMSCs .....	49
4.3	Einfluss von Adhärungszeitpunkt und Aussaatdichte auf Proliferationsrate und Morphologie der hMSCs .....	51
4.3.1	Proliferationsrate .....	51
4.3.2	Zellmorphologie .....	56
4.3.3	Qualitative und quantitative Abschätzung der Heterogenität von hMSC-Populationen mittels Durchflusszytometrie .....	60
4.4.	Selektion schnell proliferierender hMSCs während der ersten Passage .....	64
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>67</b>
5.1	Effekt der Variation der Aussaatdichte .....	73
5.2	Variation der Adhärungsbedingungen .....	75
5.3	Selektion schnell proliferierender Zellen .....	76
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>79</b>
	Literatur .....	81
	Danksagung .....	98
	Lebenslauf .....	99
	Eidesstattliche Erklärung .....	100

## Abkürzungsverzeichnis

ACT	autologe Chondrocytentransplantation
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
bFGF	basic Fibroblast Groth Faktor
BMP-n	Bone Morphogenic Protein n
BMSC(s)	Bone marrow stromal cell(s) = Knochenmark-Stromazelle(n)
BSP	Bone Sialoprotein
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca	circa
CAD	Computer assisted design
CD	Cluster of Differentiation (CD-Molekül)
cDNA	copy Desoxyribonucleinsäure
CFU-F	colony-Forming Unit Fibroblasts
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
d	Tag
D	Deutschland
d. h.	das heißt
Dkk-1	Dickkopf-1
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetaacetat
EGF	Epidermal groth factor
ES(s)	embryonale Stammzelle(n)
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FKS	fötales Kälberserum
FS	Forward scatter
g	Gramm
G-CSF	Granulocyte Colony stimulating Faktor = Granulozyten-Kolonie- stimulierender Faktor
GKF	Gewebekulturflasche
(h)MSC(s)	(human) mesenchymal stem cell(s) = (humane) mesenchymale Stammzelle(n)

---

IGF-n	Insulin-like Groth Faktor n
IL-n	Interleukin-n
J	Jahr
KM	Knochenmark
Ln	Zelllinie n
m	männlich
MAPC(s)	multipotent adult progenitor cells(s) = multipotente adulte Vorläuferzelle(n)
Max.	maximal
Min	Minute
Mio	Million
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MNC	Mononuclear Cells = mononukleäre Zellen
mRNA	messenger RNA
MSF	Macrophage Stimulating Faktor = Makrophagen-stimulierender Faktor
MyoD1	myogenic differentiation 1
NaCl	Natriumchlorid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
P	Passage
PBS	Dulbeccos phosphate-buffered saline
PDGF	Platelet-derived Groth Faktor
RS(s)	recycling stem cell(s)
PZ	Passagezeit = Tag
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
s.	siehe
S500	Aussaaddichte 500 Zellen/cm <sup>2</sup> Kulturboden
S1000	Aussaaddichte 1000 Zellen/cm <sup>2</sup> Kulturboden
S5000	Aussaaddichte 5000 Zellen/cm <sup>2</sup> Kulturboden
SCF	Stem Cell Factor = Stammzell-Faktor
SPC(s)	stromal precursors cell(s)
SS	Site Scatter
STRO-1	stromal cell surface marker
TGF-β	Transforming Groth Faktor-beta
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
ÜS	Überstand
USA	United States of America

v. a.	vor allem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VF	Vermehrungsfaktor
w	weiblich
Wn	Well n
Wnt5a	Wingless-typ MMTV integration site family, member 5A
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

# 1 Zielsetzung und theoretischer Hintergrund

## Zielsetzung

Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (MSCs) haben prinzipiell die Fähigkeit sich zu vermehren und in verschiedene Zelllinien zu differenzieren. Damit eignen sie sich im Rahmen des *tissue engineering* potenziell als Quelle für die *in vitro* Herstellung einer Reihe nicht-hämatopoetischer Gewebe. Voraussetzung ist, dass sich die *in vitro* vermehrten Zellen etwa mit Hilfe von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren selektiv zur Expression des gewünschten Phänotyps stimulieren lassen.

Der erste Schritt auf dem Wege zur artefiziellen Gewebeherstellung mit dem Ziel eines therapeutischen Einsatzes ist die Abtrennung von hämatopoetischen Zellen. Die weit verbreitete Methode der Adhärerung allein reicht dazu allerdings nicht aus. Man erhält auf diesem Wege eine Mischung verschiedener Zellpopulationen, deren Interaktionen die Tendenz zur spontanen, unkontrollierten Differenzierung zu verschiedenen Zielzellen fördern. Erkennbar ist dieses Phänomen unter anderem daran, dass bei Versuchen zur *in vitro* Vermehrung der mesenchymalen Zellen bereits nach wenigen Passagen ein rasches Nachlassen der anfänglichen Proliferationsrate beobachtet wird.

Für humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) sollen Kulturbedingungen gefunden werden, die eine für die Zwecke des *tissue engineering* ausreichende Zellvermehrung *in vitro* und damit gleichzeitig eine weitgehende Vermeidung spontaner Differenzierung erlauben. Konkret soll untersucht werden, in wie weit sich dieses Ziel durch Veränderung der Aussaatdichte und der Adhärerungszeit sowie durch selektive Anreicherung schnell wachsender Zellen erreichen lässt.



## Theoretischer Hintergrund

Die Kultivierung mesenchymaler Stammzellen zum Zwecke der Vermehrung führt nicht nur zur Bildung identischer Nachkommen sondern auch immer zur spontanen Differenzierung in verschiedene Zielzellen. Dieses Phänomen wird auch beobachtet, wenn wie beim Klonieren ursprünglich von nur einer Zelle ausgegangen wird. Als Erklärung dafür wird angenommen, dass die Regulierung von Proliferation und Differenzierung der hMSCs in hohem Maße von der spezifischen Interaktion mit anderen Zellen abhängt. Unter anderem wird die Existenz sogenannter Regulatorzellen postuliert, die die Proliferation unterstützen oder auch hemmen können wobei die Signale sowohl parakrin als auch durch direkte Zell-Zell-Kontakte übertragen werden. Auf dieser Vorstellung beruht die Idee, dass die unerwünschte vorzeitige Differenzierung zugunsten der Proliferation vermieden werden kann, wenn es gelingt, das Zahlenverhältnis der Effektorzellen und Regulatorzellen experimentell zu verändern. Dieses Ziel lässt sich möglicherweise durch verschiedene Maßnahmen erreichen, eventuell auch durch Anwendung einer Kombination. Eine erste Möglichkeit besteht in der Variation der Adhärenzbedingungen im Rahmen der Isolierung der Zellen. Sie beruht auf der Annahme, dass Regulator- und Effektorzellen nicht unbedingt identische Neigungen zur Adhärenz an die Gefäßoberfläche zeigen. Die zweite Möglichkeit wird in einer Erniedrigung der Aussaatdichte gesehen. Der Effekt parakriner wie juxtakriner Signale seitens der Regulatorzellen sollte sich durch schlichte Verdünnung der Zellen vermindern lassen. Sollten die unerwünschten Signale, die eine vorzeitige Differenzierung auslösen, ihren Ursprung vor allem in bereits differenzierten Zellen haben, müsste auch eine partielle Anreicherung der schneller proliferierenden Zellen etwa durch mechanische Abtrennung von den langsam wachsenden, partiell differenzierten Zellen zum Erfolg führen.

## 2 Einleitung

Stammzellen sind besondere Zelltypen, die sich durch zwei Eigenschaften auszeichnen, die in dieser Kombination bei keinem anderen Zelltyp vorkommen:

- Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur fortgesetzten Selbsterneuerung, d. h., sie können sich durch Zellteilung über lange Zeiträume in einem relativ undifferenzierten Zustand erneuern und vermehren.
- Stammzellen besitzen die Fähigkeit, unter geeigneten Bedingungen zu differenzieren, d. h. sich zu Zellen unterschiedlicher Spezialisierung zu entwickeln.

Der Begriff der Stammzelle ist somit solchen Zellen vorbehalten, die einerseits identische Tochter-Stammzellen sowie andererseits Progenitorzellen hervorbringen, die nach Durchlaufen eines festgelegten Differenzierungsprozesses terminal differenzierte Funktionszellen liefern (*Hall und Watt, 1989; Lin et al., 1997*). Aus praktischen Gründen unterscheidet man embryonale und sogenannte adulte Stammzellen. Diese Unterschiede betreffen neben den Methoden zu ihrer Gewinnung und Vermehrung vor allem ihr Potenzial zur Differenzierung in die verschiedenen Zell- und Gewebetypen. Während embryonale Stammzellen als pluripotente Zellen zu Zellen aller drei Keimblätter differenzieren können, ist die Fähigkeit der adulten Stammzellen in dieser Hinsicht eingeschränkt. Adulte Stammzellen sind postnatalen Ursprungs und befinden sich durchweg in aus reifen Zellen gebildetem Gewebe. Sie können in einer Reihe verschiedener Phänotypen auftreten. Bis zur Stimulation durch intrinsische Faktoren verharren sie im undifferenzierten Stadium.

Die Forschung an menschlichen Stammzellen verfolgte zunächst das Ziel, grundlegende Erkenntnisse über Entwicklungs- und Differenzierungsvorgänge beim Menschen zu gewinnen. Inzwischen hat die Stammzellforschung jedoch große Hoffnung in die Entwicklung neuartiger und verbesserter Therapien für schwere Erkrankungen geweckt, die bisher nicht oder nur unzureichend behandelt werden können. Weitere Anwendungen liegen in der Reproduktionsmedizin, der Entwicklung von Pharmawirkstoffen und der Toxikologie etwa als Alternative zu Tierversuchen.

Anfangs stützte sich die humane Stammzellenforschung zunächst auf adulte Stammzellen und seit 1998 auch zunehmend auf die embryonalen Stammzellen. Während die Zielsetzungen der Stammzellforschung allgemein als wünschenswert begrüßt werden, herrscht noch kein Konsens darüber, ob die Gewinnung von embryonalen Stammzellen ethisch vertretbar ist, da sie mit der Zerstörung menschlicher Embryonen einhergeht. Zur Zeit wird international noch kontrovers diskutiert, welche Teilbereiche der Forschung an menschlichen Stammzellen als notwendiges, verhältnismäßiges und angemessenes Mittel zur Erreichung dieser Zielsetzungen akzeptiert werden können (swiss, 2003).

Weniger belastet durch ethische Bedenken sowie aufgrund einer Reihe besonderer Eigenschaften erscheinen die adulten Stammzellen in Forschung und Medizin eine vorteilhafte Alternative darzustellen. Eine Gegenüberstellung ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1: Embryonale versus adulte Stammzellen (Hamburg University Press, 2003)

	<b>embryonale Stammzellen</b>	<b>adulte Stammzellen</b>
<b>pro</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• gut expandierbar</li> <li>• pluripotent</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• leicht gewinnbar</li> <li>• keine ethischen Bedenken</li> <li>• zum Teil gut expandierbar</li> <li>• multipotent</li> <li>• gut verträglich</li> <li>• autolog und allogon möglich</li> </ul>
<b>contra</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ethische und rechtliche Bedenken</li> <li>• schwierige Gewinnbarkeit</li> <li>• Gefahr der Abstoßung</li> <li>• Immunsuppression notwendig</li> <li>• Gefahr eines Terato-Carcinoms</li> <li>• Mangel an spezifischen Markern</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mangel an spezifischen Markern</li> </ul>

Als Teil der adulten humanen Stammzellen haben die mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) prinzipiell die Fähigkeit, sich *in vitro* zu vermehren und in verschiedene Zelllinien zu differenzieren. Damit eignen sie sich im Rahmen des *tissue engineering* potenziell als Quelle für die *in vitro* Herstellung einer Reihe nicht-hämatopoetischer Gewebe (Buckwalter et al., 1995).

## 2.1 Ursprung und Herkunft von mesenchymalen Stammzellen

Gewebespezifische Vorläuferzellen, die in der Lage sind, in reife Gewebe bildende Zellen zu differenzieren, wurden erstmals von Friedenstein und später von Owen beschrieben (Friedenstein et al., 1976; Owen et al., 1987). Sie isolierten fibroblastenartige Zellklone (colony-Forming Unit Fibroblasts; CFU-F) aus dem Stroma des Knochenmarks mit der Fähigkeit, *in vitro* knochen- und knorpelartige Zellformationen zu bilden. Der Begriff der mesenchymalen Stammzelle (Mesenchymal Stem Cell, MSC) wurde von Caplan geprägt (Buckwalter et al., 1995; Bruder et al., 1994). Daneben existieren weitere Definitionen von undifferenzierten, im Knochenmark lokalisierten Zellen, die initial schnell proliferieren und durch exogene Faktoren und Interaktion mit anderen Zellen (Long et al., 1995) in die osteogene (Long et al., 1995; Muragila et al., 2000; Joyner et al., 1997) oder chondrogene Differenzierung (Johnstone et al., 1998) geleitet werden. Diese als „Bone marrow stromal cells“ (BMSCs) (Quarto et al., 1995; Muragila et al., 2000), „Osteoprogenitor“ (Long et al., 1995) oder „fibroblastic colony-forming unit“ (CFU-F) (Joyner et al., 1997; Owen et al., 1988) bezeichneten Zellen sind nach ihrer Herkunft und Isolierung aus dem Knochenmark beschrieben.

Bei den von den verschiedenen Autoren isolierten Zellpopulationen handelt es sich streng genommen nicht in jedem Fall um mesenchymale Stammzellen (MSCs) (Caplan et al., 1991), da sie durch die unterschiedlichen Isolierungsprotokolle, nicht aber durch eine ausreichende Charakterisierung der Zellen definiert sind. Dies wird durch zukünftige immunzytologische Untersuchungen zu zeigen sein. Die häufig noch als Synonyme verwendeten Begriffe für die verschiedenen Zellpopulationen sind in der Tabelle 2 gegenübergestellt.

Tabelle 2: Synonyme für den Begriff „mesenchymale Stammzellen“

Bezeichnung	identifiziertes Zelltyp	Ursprung/Autor
Precursors of non-hematopoietic tissue	Adherent cells of bone marrow that include fibroblast-like cells, endothelial cells, and monocytes/macrophage	Meerschwein ( <i>Friedenstein et al., 1970</i> ) Maus ( <i>Friedenstein et al., 1976</i> )
Colony forming unit-fibroblast (CFU-F)	Colonies of fibroblastic cells, with the occasional monocyte/macrophage present	Mensch ( <i>Castro-Malaspina et al., 1980</i> ) Maus ( <i>Friedenstein et al., 1982; Mori et al., 1987</i> ) Kaninchen ( <i>Owen et al., 1987</i> )
Mesenchymal stem cells (MSCs)	Cells defined by their selective attachment to a solid surface	Mensch ( <i>Caplan et al., 1991</i> )
Marrow stromal cells	Adherent cells of bone marrow that include and/or adherent fibroblast-like cells, endothelial cells and colonies monocytes/macrophage	Maus ( <i>Prockop et al., 1997; Mori et al., 1978; Piersma et al., 1985</i> )
Bone marrow stromal (stem) cells (BMSSCs) and/or Stromal precursors cells (SPCs)	Non-hematopoietic cells of mesenchymal origin, displaying fibroblastic morphology	Maus ( <i>Dexter et al., 1974</i> ) Mensch ( <i>Shi et al., 2002; Bianco et al., 2000</i> )
RS-1, RS-2, mMSCs (RS: Recycling stem cell) (m: mature)	RS-1: thin, spindle-shaped cells RS-2: moderately thin, spindle-shaped cells mMSCs: wider, spindle-shaped cells	Mensch ( <i>Colter et al., 2000, Colter et al., 2001</i> )
Multipotent adult progenitor Cells (MAPCs)	Culture- derived bone marrow-derived progenitor cells	Mensch ( <i>Reyes et al., 2001</i> ) Ratte ( <i>Jiang et al., 2002</i> )

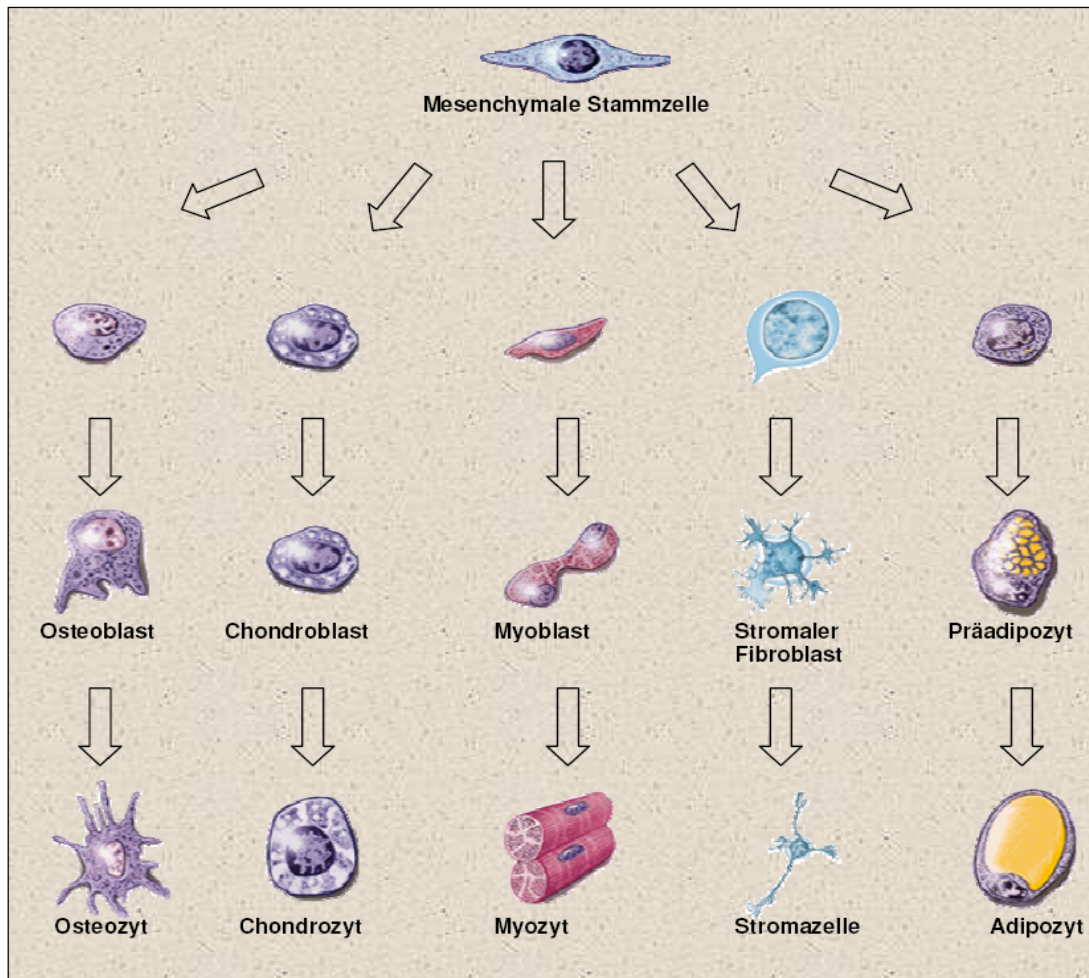
Gegenwärtig wird das Knochenmarkspirat als ergiebigste Quelle für MSCs betrachtet (*Pittenger et al., 1999*). Daneben findet man sie auch im Fettgewebe (*Zuk et al., 2002*), im Periost (*Nakahara et al., 1991*), in der Synovialmembran (*De Bari et al., 2001*), in der Dermis (*Young et al., 1998*), in Perizyten (*Brighton et al., 1992*), im peripheren Blut (*Zvaifler et al., 2000*), im Nabelschnurblut (*Erices et al., 2000*) und im Muskelbindegewebe (*Bosch et al., 2000*).

Das Knochenmark besteht hauptsächlich aus drei Zelltypen: hämatopoetischen Stammzellen und deren Nachfahren, Stromazellen (z.B. Fibroblasten, Adipozyten) und endothelialen Zellen. Die hämatopoetischen Stammzellen wurden bereits intensiv studiert und sind daher wohl die am besten charakterisierten Stammzellen

(Lemischka et al., 1986; Sachs et al., 1987; Spangrude et al., 1988; Weissman et al., 2000).

## 2.2 Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen

Undifferenzierte hMSCs besitzen die Fähigkeit, die Hämatopoese zu unterstützen indem sie das Milieu regulieren (Haynesworth et al., 1996; Koc et al., 2000). Ihnen wird außerdem eine Funktion bei der Immunmodulation und –suppression zugeschrieben (Frassoni et al., 2002; Le Blanc et al., 2003; Le Blanc et al., 2004). Daher werden sie in der allogenen Stammzellentransplantation zur Verhinderung und Behandlung der Spender-gegen-Wirt-Reaktion eingesetzt. Ihre quantitativ bedeutendste Aufgabe wird jedoch darin gesehen, durch eine bedarfsgesteuerte stetige Replikation und Differenzierung in die spezifischen Subpopulationen der einzelnen mesenchymalen Gewebezellen die durch die begrenzte Lebenszeit bedingten Verluste auszugleichen. Man bezeichnet die durch extrinsische Signale und intrinsische Wachstumsfaktoren gesteuerten spezifischen Differenzierungsschritte als mesengenen Prozess (Bruder et al., 1994; Horch et al., 1998; Long et al., 1995; Quarto et al., 1995). Inzwischen ist es vielfach gelungen, diesen Prozess *in vitro* zu simulieren. So können aus postnatalem Knochenmark isolierte hMSCs unter entsprechenden Kultivierungsbedingungen *in vitro* in eine Reihe mesodermaler, ektodermaler und endodermaler Gewebetypen differenzieren. Dazu gehören Knochen (Pittenger et al., 1999; Caplan et al., 1991; Friedenstein et al., 1987; Beresford et al., 1989; Jaiswal et al., 1997), Knorpel (Pittenger et al., 1999; Lennon et al., 1996; Johnstone et al., 1998; Machay et al., 1998), Sehnen und stromales Bindegewebe (Young et al., 1998; Majumdar et al., 1998), Skelettmuskeln (Saito et al., 1995; Wakitani et al., 1995; Ferrari et al., 1998), Herzmuskeln (Makino et al., 1999; Fukuda et al., 2001), Fett (Pittenger et al., 1999; Dennis et al., 1996), neuronales Gewebe (Azizi et al., 1998; Kopen et al., 1999), Nerven (Woodbury et al., 2000), mesangiales Gewebe (Ito et al., 2001), Epithel von Leber, Lunge und Darm (Jiang Y et al., 2002; Reyes et al., 2002) und Endothel (Oswald et al., 1987). Eine Übersicht der aus mesenchymalen Stammzellen hervorgehenden Gewebezellen findet sich in Abbildung 1.



**Abbildung 1: Differenzierungspotenzial von humanen mesenchymalen Stammzellen.**

Das Schaubild stellt die Differenzierungslinien dar, in welche humane MSCs aus Knochenmark bisher differenziert werden konnten. (verändert aus: Mesenchymal stem cells of human adult bone marrow, Pittenger M und Marshak D in: Stem cell biology. Marshak D, Gardner R und Gottlieb D, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001)

Die von Friedenstein erstmals beschriebenen multipotenten Stammzellen aus dem Stroma des Knochenmarks wurden später durch verschiedene Forschergruppen intensiv weiter untersucht und die Methoden verfeinert. Am häufigsten werden hMSCs aus Knochenmarkaspiraten gewonnen und anschließend durch Dichtezentrifugation angereichert (*Buckwalter et al., 1995; Johnstone et al., 1998*). In der Regel werden Nährmedien bei 37 °C, 5 % Kohlendioxid-Atmosphäre und physiologischer Sauerstoffpartialdruck appliziert, was zu stark proliferierenden und am Flaschenboden adhärenen Zellen führt, die dann nach enzymatischer

Ablösung von der Plastikoberfläche subkultiviert werden. Als Beispiel dafür seien die folgenden in der Literatur besonders häufig zitierten Protokolle genannt:

Nach Caplan werden hMSCs aus einem Percoll- bzw. Ficoll-Gradienten gewonnen und nach Plastikadhärenz in DMEM mit 10% selektioniertem FKS kultiviert (*Lennon et al., 1996; Haynesworth et al., 1992a; Haynesworth et al., 1992b; Lennon et al., 1996*). Mesenchymale Progenitorzellen (MPCs) nach Prockop werden aus einem Ficoll-Gradienten gewonnen und nach Plastikadhärenz in  $\alpha$ -MEM mit 20% FKS kultiviert (*Colter et al., 2000; Prockop et al., 2001*). STRO-1+ Zellen nach Simmons, werden anhand des STRO-1 Oberflächenmarkers (Antikörpers) mittels Flow-Zytometrie isoliert (*Simmons et al., 1991; Simmons et al., 1994; Gronthos et al., 1994*). Verfaillie identifizierte unter Glycophorin A selektierten, CD45 negativen Zellen eine pluripotente Subpopulation der hMSCs, die Multipotent Adult Progenitor Cells (MAPCs), die Adhärenz auf Fibronectin- beschichtetem Plastik zeigen und in DMEM mit 2% FKS und diversen anderen Zusätzen kultiviert werden (*Reyes et al., 2001; Verfaillie et al., 2003*).

Besonders interessant für den Einsatz im *tissue engineering* sind auch die folgenden Entdeckungen: werden die aus dem Knochenmark isolierten hMSCs mit einer sehr geringen Dichte von 1-10 Zellen /cm<sup>2</sup> ausgesiedelt, ist die Entstehung von Zellklonen aus jeder einzelnen Zelle zu beobachten (*Colter et al., 2000; Colter et al., 2001; Kuznetsow et al., 1997*). Mit wachsender Aussaatdichte sind solche Kolonien jedoch zunehmend morphologisch heterogen. Sie setzen sich zusammen aus kürzeren, sich schnell teilenden, und längeren, sich langsamer teilenden Zellen (*Colter et al., 2000, Colter et al., 2001; DiGirolamo et al., 1999; Sekiya et al., 2002*). Pittenger et al. beobachteten, dass aus humanem Knochenmark gewonnene und nach Caplan in Langzeitkultur gehaltene hMSCs längere Zeit in einem undifferenzierten Status verharren und dass Kolonien, die aus einer einzigen isolierten Zelle hervorgehen, unter geeigneten Bedingungen entlang der osteogenen, adipogenen und chondrogenen Linie ausreifen können.

Die Charakterisierung der hMSCs hinsichtlich ihrer Oberflächenmoleküle, Zytokinsekretion und sezernierten Extrazellulärmatrix ist in der Literatur nicht einheitlich beschrieben. Das Oberflächenantigen CD34, welches hämatopoetische Stammzellen kennzeichnet, ist auf frisch isolierten hMSCs zum Teil nachweisbar und geht bei der



Kultivierung *in vitro* verloren (Waller et al., 1995). Das ursprüngliche Vorhandensein zeigt, dass es möglicherweise einen gemeinsamen Vorläufer für beide Populationen gibt. Unterschieden werden sie durch das Antigen CD50, welches nur auf hMSCs nachgewiesen werden kann (Pittenger et al., 1999; Waller et al., 1995). Eine weitere Möglichkeit der Charakterisierung der hMSCs nach Simmons ist die positive Immunselektion durch den monoklonalen Antikörper (AK) STRO-1 (Simmons et al., 1991; Simmons et al., 1994). Die so identifizierten hMSCs zeigen ebenfalls die Fähigkeit der Differenzierung in Stromazellen, Gefäßmuskelzellen, Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten (Dennis et al., 2002). Die monoklonalen AK SH2, SH3 und SH4 identifizierten verschiedene, spezifische Antigene auf der

Tabelle 3: Oberflächenmarker, die von mesenchymalen Stammzellen exprimiert werden (Pittenger et al., 1999; Pittenger et al., 2001)

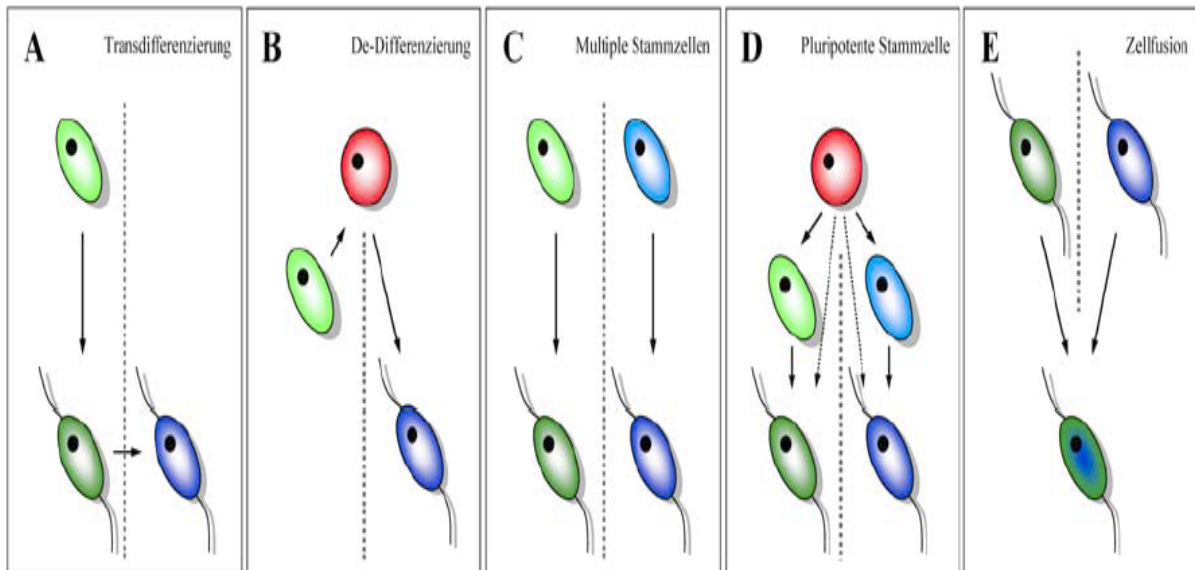
Typ	Bezeichnung	CD-Nomenklatur
<b>Zytokinrezeptoren</b>	IL-1R	CD121
	IL-3R	CD123
	IL-4R	CD124
	IL-6R	CD126
	IL-7R	CD127
	TNFR	CD120
<b>Wachstumsfaktor-Rezeptoren</b>	BFGFR	-
	PDGFR	CD140
	TGF $\beta$ R	-
<b>extrazelluläre Matrix-Rezeptoren</b>	ICAM-1	CD54
	ICAM-2	CD102
	VCAM-1	CD106
	ALCAM	CD166
	LFA-3	CD58
	Endoglin (SH2)	CD105
	Hyaluronsäurerezeptor	CD44

	Integrine: α1, α2 α3, αA αV, β1 β3, β4	CD49a, CD49b CD49c, CD49e CD51, CD29 CD61, CD104
<b>andere</b>	Ecto-5`Nucleotidase (SH3)	CD73
	Thy-1	CD90
	IFNδR	CD119

Zelloberfläche von hMSCs nach Caplan, die auf Osteozyten und Osteoblasten nicht mehr nachweisbar sind (*Haynesworth et al., 1992a*). Das SH2 -Antigen ist später als Endoglin (CD105), dem Rezeptor für TGF-β3, identifiziert worden, welcher eine große Rolle bei der Induktion der chondrogenen Differenzierung von hMSCs spielt (*Barry et al., 1999*). SH3 und SH4 wurden als verschiedene Epitope des Oberflächenantigens CD73 erkannt, dessen Rolle bei der Differenzierung der hMSCs noch diskutiert wird (*Barry et al., 2001*). Des Weiteren sind undifferenzierte hMSCs auch über die Expression des Granulozytenkolonie stimulierenden Faktors (G-CSF), des Stammzell-Faktors (SCF), des Makrophagen- stimulierenden Faktors (MSF) der Interleukine 6 und 11 und durch ein cDNA-Array identifizierbar. Die Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die zur Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen eingesetzten Oberflächenmarker.

### 2.3 Plastizität der Stammzellen

Als Plastizität bezeichnet man das Phänomen, dass adulte Stammzellen eines Gewebes in Zellen eines anderen Gewebes differenzieren können. Der Mechanismus der Plastizität wird zur Zeit noch kontrovers diskutiert (*Raff et al., 2003*). Die verschiedenen Vorstellungen zur Erklärung der beobachteten Effekte sind schematisch in der Abbildung 2 dargestellt: Transdifferenzierung, De-Differenzierung, Existenz multipler Stammzellen oder Zellfusion (*Wagers et al., 2004*). Wahrscheinlich spielen umgebungsabhängige Faktoren eine zentrale Rolle bei der Reprogrammierung der Zelle.



**Abbildung 2: schematische Darstellung der möglichen Mechanismen der Stammzellplastizität.**

(A) Transdifferenzierung. (B) De-Differenzierung. (C) Vorliegen multipler Stammzellen bzw. (D) einer pluripotenten Stammzelle. (E) Fusion determinierter Zellen. Die Keimblatt- bzw. Lineage-Grenzen werden durch die gepunktete Linie symbolisiert. (Abbildung modifiziert nach Wagners and Weissman 2004).

## 2.4 Therapeutische Verwendung von mesenchymalen Stammzellen

Der mögliche therapeutische Nutzen mesenchymaler Stammzellen war von Anfang an Motivation für die Entwicklung verschiedener Tiermodelle. Reichten zunächst Untersuchungen an Kaninchen, Maus und Ratte zur Gewinnung allgemeinerer Erkenntnisse, wurden später eher Großtiermodelle wie Hund, Schaf und Schwein bevorzugt, um bereits speziellere, auf den klinischen Einsatz am Menschen zielende Fragen zu beantworten (Zander et al., 2002). Letztere rekrutierten sich aus naheliegenden Gründen zunächst hauptsächlich aus dem Gebiet der Orthopädie sowie Mund- und Kieferchirurgie zur Unterstützung der Knochenneubildung. Inzwischen hat sich die Basis für therapeutische Anwendung mesenchymaler Stammzellen erheblich verbreitet wie man an den im folgenden angeführten Beispielen erkennen kann.

### 2.4.1 Immunsuppression

Die Beobachtung, dass adulte humane MSCs die Proliferation von T-Lymphozyten und die zellvermittelte Lympholyse cytotoxischer Lymphozyten hemmen (*Di Nicola et al., 2002*) und somit immunsuppressive Eigenschaften haben (*Le Blanc et al., 2004*), spielt vor allem im Bereich der allogenen Knochenmarktransplantation eine wichtige Rolle. So kann z. B. die gleichzeitige Verabreichung von MSCs bei der Transplantation hämatopoetischer Stammzellen eine Spender-gegen-Wirt-Reaktion abschwächen oder teilweise verhindern (*Frasconi et al., 2002*). Le Blanc et al (*2004*) zeigten in einer Einzelfallbeschreibung, dass eine therapierefraktäre Spender-gegen-Wirt-Reaktion Grad IV nach einer haploidenten Stammzell-Transplantation durch die nachfolgende intravenöse Gabe von MSCs geheilt werden konnte.

### 2.4.2 Gentherapie

Die logische Ergänzung des *cell engineering* ist die Gentherapie (*Morgan et al., 1998; Andree et al., 1998*). Hierbei werden Gensequenzen von Wachstumsfaktoren entweder durch einen *ex vivo* oder *in vivo* Ansatz durch virale Vektoren (*Möller et al., 2000*) oder non-virale Methoden (*Andree et al., 1998*), als Plasmide in die Zellen geschleust. Die Lipofektion (*Felgner et al., 1989*) wurde als inzwischen breit akzeptierter Ansatz der Gentherapie in das *tissue engineering* eingeführt (*Schaefer et al., 1999; Andree et al., 1998*). Nach erfolgreicher Transfektion exprimieren die Zellen das gewünschte Polypeptid. Sowohl Chondro- als auch Osteoblasten wurden durch Lipofektion mit den Wachstumsfaktoren EGF, bFGF und letztere auch mit VEGF transfiziert. Es zeigte sich eine transiente Sekretion des Faktors mit einem therapeutischen Effekt auf die Proliferation der Zellen (*Schaefer et al., 1999*).

### 2.4.3 Knochenrekonstruktion

Bereits 1998 wiesen Bruder et al. nach, dass unter Verwendung poröser Matrices aus Hydroxylapatit und  $\beta$ -Tricalciumphosphat, die mit autologen hMSCs beladen werden, bei Defekten an langen Röhrenknochen von ausgewachsenen Hunden signifikant mehr Geflecht- und Lamellenknochen gebildet wird als bei unbeladenen Matrices. Eine stärkere Kallusbildung durch den Einsatz der Zell-Matrix-Verbindung konnte auch bei Schafen beobachtet werden (*Kon et al., 2000*). Aktuelle *in vitro* Studien weisen eine weitere Verbesserung der Adhärenz, Proliferation und

osteogenen Differenzierung der mit hMSCs beladenen Matrices nach (*El-Amin et al., 2002*).

Die Transplantation von hMSCs zur Reparatur großer Knochendefekte beim Menschen ist bisher noch nicht publiziert. Derzeit befinden sich jedoch schon klinische Studien von Osiris Therapeutics in der Phase I bis II der Erprobung. Zugrunde liegen Erfahrungen wie etwa die einer erfolgreichen Transplantation von autologen Periostzellen zur Sinusboden-Augmentation. Die Periostzellen wurden dafür zuvor in Gegenwart von autologem Serum *in vitro* expandiert und in eine Matrix aus Ethysorb eingebettet (*Schmelzeisen et al., 2003*). Hier zeigte sich ähnlich wie bei Hund und Schaf eine rasche Neubildung von Knochensubstanz.

In analoger Weise könnten mesenchymale Stammzellen eingesetzt werden, die aus Knochenmarkaspiraten gewonnen und durch Dichtezentrifugation angereichert wurden (*Joyner et al., 1997*). Die *in vitro* kultivierten hMSCs lassen sich bereits in ausreichendem Maße proliferieren und durch Addition von Osteoinduktoren in osteogene Zellen differenzieren, die durch Expression knochenspezifischer Marker wie alkalische Phosphatase und Osteoclastin charakterisiert sind. Allerdings ist dabei eine mit zunehmender Differenzierung einhergehende Verlangsamung der Proliferationsrate der Zellen noch nicht zu vermeiden.

Als im Sinne der Zielsetzung sehr vorteilhaft erwies sich die hohe Tendenz der gewonnenen hMSCs Populationen zur Adhärenz an verschiedenen porösen knochenähnlichen Biomaterialien, die schon bisher Einsatz bei der Stopfung von Knochendefekten fanden. Inzwischen wurden verschiedenen Methoden zur Besiedlung entwickelt, von denen nur die dynamische Methode in Suspensionskultur und die Vakuumaspiration visköser Osteoblastensuspensionen erwähnt seien (*Schaefer et al., 1999*). Anschließend können die Konstrukte weiter *in vitro* in einer Perfusionskammer gezüchtet werden (*Sittinger et al., 1997*). Zum Nachweis des osteogenetischen Potenzials solcher mit humanen Osteoblasten präparierten Transplantate wurden sie subcutan in immuninkompetente Nacktmäuse implantatiert, wo sich 8 Wochen später eine ektopische Ossifikation als Folge appositionellen Knochenwachstums auf dem Biomaterial fand. Die Möglichkeit der Präformierung des Materials, z.B. durch Computer assisted design (CAD) anhand von Daten einer

3D-Computertomographie, stellt die Herstellung fast beliebiger dreidimensionaler Formen zur Rekonstruktion von Schädel- oder Röhrenknochendefekte „custom-made“ in Aussicht (Schaefer et al., 1999).

#### 2.4.4 Gelenk-Knorpelrekonstruktion

Als Beispiel für einen weiteren möglichen therapeutischen Einsatz mit guten Erfolgsaussichten sei noch kurz auf die *in vitro* -Herstellung von Knorpel-Knochen-Konstrukten zur Behandlung von Gelenkknorpeldefekten eingegangen. Viele Menschen leiden unter degenerativ bedingten Gelenkschmerzen, die meist zu einer Einschränkung der Bewegungsfähigkeit führen. Die Möglichkeit der Reparatur von Knorpelschäden, hervorgerufen durch Entzündung, Verletzung und/oder Degeneration, mit Hilfe von hMSCs ist deshalb von großem Interesse. Die chondrogene Differenzierung von hMSCs ist von einer Vielzahl von Faktoren, einschließlich der Parameter Zelldichte, Zelladhäsion und Zusatz von Wachstumsfaktoren, abhängig (Johnstone et al., 1998). Eine auf die Einbringung von hMSCs basierende Möglichkeit zur Reparatur von Gelenkknorpeldefekten in Kombination mit natürlichen und synthetischen Trägermaterialien ist am Tier bereits untersucht worden (Caplan et al., 1997). Einschlägige Ergebnisse beschränken sich bisher allerdings auf die Verwendung von reifen Chondrozyten, die zuvor aus dem Gelenkknorpel isoliert wurden (König et al., 2003). Das Dilemma dieses Ansatzes liegt darin, dass die Gewinnung einer ausreichenden Anzahl autologer Zellen einen größeren Knorpeldefekt hinterlassen würde als der zu reparierende Schaden. Als Ausweg bieten sich prinzipiell zwei Alternativen an, entweder *in vitro* Expansion der primären Chondrozyten oder chondrogene Differenzierung von *in vitro* proliferierten hMSCs zu reifen Chondrozyten. Inzwischen wurden beide experimentellen Ansätze mit zum Teil großem Aufwand verfolgt, allerdings bisher nur teilweise erfolgreich.

Der Vollständigkeit halber sei noch erwähnt, dass auch versucht wurde, ausreichende Mengen von autologen reifen Chondrozyten aus anderen Organen wie zum Beispiel aus hyalinem Rippenknorpel zu gewinnen (Klemm et al., 1998). Hier ist jedoch noch nicht bestätigt, ob die aus Rippenknorpel stammenden Chondrozyten in der Lage sind, Knorpelgewebe mit den für den Gelenkknorpel erforderlichen Eigenschaften zu bilden.

Primäre Chondrozyten verlieren *in vitro* beim Versuch der Vermehrung nach und nach ihren differenzierten Phänotypus, erkennbar an der Erlangung einer fibroblastoiden Morphologie und dem Verlust der Fähigkeit zur Bildung von Kollagen des Typs II und als Folge davon auch der Bildung von hyalinem Knorpel. Es wurde zwar seither sehr intensiv wenn auch bisher erfolglos nach Möglichkeiten gesucht, diesen als Dedifferenzierung bezeichneten Prozess wieder rückgängig zu machen. Dieses meist als Redifferenzierung bezeichnete Verfahren konnte bisher nur bei verschiedenen Tiermodellen zufriedenstellende Ergebnisse liefern (*Domm et al., 2000*).

Diese Befunde scheinen zunächst nicht mit der Tatsache im Einklang zu stehen, dass es eine seit mehr als einem Jahrzehnt klinisch eingeführte Methode zur Therapie von Gelenkflächenschäden gibt, die auf der Verwendung *in vitro* expandierter reifer Chondrozyten beruht, die 'Autologe Chondrozytentransplantation' (ACT) (*Brittberg et al., 1994*). Die vorzugsweise aus den Gelenkflächen der Patienten isolierten Chondrozyten werden unter Inkaufnahme der Problematik der De- und Redifferenzierung in 7-14 Tagen auf eine für die Transplantation ausreichende Zellzahl gebracht (*Klemm et al., 1998; Domm et al., 2000; Möller et al., 2000*). Dabei wird die Möglichkeit genutzt, dass das Ausmaß der Dedifferenzierung und damit der Verlust der Fähigkeit zur Bildung von biomechanisch kompetentem Knorpelgewebe erst mit der Zeit langsam zunehmen. Allerdings bleibt dabei in jedem einzelnen Fall ungewiss, welcher Qualität die schließlich implantierten Zellen sind. Auch eine nachträgliche Analyse einer Biopsie des sich im Laufe der Zeit bildenden Ersatzgewebes verbietet sich aus ethischen Gründen.

Die Vermeidung dieser Problematik ist nur möglich, wenn man nicht versucht, Zellen zu implantieren, sondern funktionelle Gewebe, die zuvor mit Hilfe der Methoden des *tissue engineering in vitro* hergestellt wurden. Bei der Entwicklung tragfähiger Strategien mit diesem Ziel stieß man schon bald auf weitere Probleme. Es wurde klar, dass es nicht reichen würde, lediglich passend geformte Knorpelstücke in die geschädigten Areale von Gelenkflächen zu verpflanzen, da Knorpelgewebe einerseits ausreichend fest auf der subchondralen Knochenlamelle haften muss, andererseits aber nicht nach Implantation damit verwächst. Als Implatate konnten also nur sandwichartige osteochondrale Konstrukte in Frage kommen, wobei ein Trägermaterial eingesetzt werden muss, von dem die Integration in den Knochen

erwartet werden kann. Daraus resultierten im Wesentlichen nur zwei alternative Vorstellungen wie dieses Ziel im Rahmen des *tissue engineering* erreicht werden könne:

- Die Verwendung eines präformierten biphasischen Biomaterials (Composite) oder
- die Fusion von fertigen Knorpel- und Knochenkomponenten.

Beide Ansätze wurden im Tierversuch erprobt. Im ersten Ansatz wird ein synthetisches Composite mit Zellen, die aus MSCs gewonnen wurden, besiedelt und die osteochondrale Differenzierung durch exogene Faktoren induziert (*Angele et al., 1999*). Im zweiten Ansatz wird eine Knorpelkomponente aus formbarer Matrix und Chondrozyten, sowie eine Knochenkomponente aus porösem Biomaterial und Osteoblasten hergestellt und anschließend zu einem osteochondralem Konstrukt fusioniert (*Schaefer et al., 1999*). Entscheidend ist hierbei die stabile Verbindung der glatten, differenzierten Knorpelschicht, die zur Verankerung im Schaft des Knochens dient. In eigenen Versuchen gelang dies mit primären Chondrozytenkulturen und Osteoblasten aus MSCs. Im ektopen Tiermodell entwickelte sich ein stabiles osteochondrales Konstrukt mit Knorpelschicht und vaskularisiertem Knochenzapfen. Entscheidend für die Rekonstruktion von Knochengewebe ist die Bildung eines Gefäßnetzes zur Durchblutung des Konstrukts, um die Oxygenisation der Osteoblasten nach der Implantation zu gewährleisten. Ansätze zur Angiogenese sind zusammengesetzte Konstrukte aus osteo- und angiogenen Zellen oder die Induktion der Vaskularisation durch angiogene Wachstumsfaktoren (*Schaefer et al., 1999*). Bis zur Sicherstellung einer schnellen Neovaskularisation bleiben die Konstrukte noch auf kleine Größen, die durch Diffusion ernährt werden, limitiert.

## **2.5 Stammzellen und *Tissue engineering***

Viele vererbte oder erworbene Erkrankungen sind mit chronischen oder akuten Gewebe- und Organausfällen verbunden, die mit den derzeit verfügbaren Mitteln des Gewebe- und Organersatzes nur unzureichend therapiert werden können. Der Einsatz von Stammzellen erlaubt es, in Zukunft dabei neue Wege zu gehen, um einen biologisch verträglichen, funktionellen Zell- und Gewebeersatz im Rahmen eines *tissue engineering* zu entwickeln. Damit entsteht mittelfristig ein Forschungs- und Anwendungsbereich, der durch fließende Übergänge zwischen Stammzellforschung und *tissue engineering* gekennzeichnet ist. Aus der Stammzellforschung



wird das Potenzial der Stammzellen eingebracht, Zellmaterial *in vitro* zu vermehren und zu differenzieren. Aus dem *tissue engineering* werden unter anderem *Know-how* und Methoden eingebracht, den Differenzierungsprozess und die Funktionalität der Zellen durch gezielte Gestaltung ihrer Umgebung (Zell-Zell-Kontakte, Zell-Matrix-Interaktionen) und die Gabe von Wachstumsfaktoren in der gewünschten Weise zu beeinflussen. Durch die Zusammenführung dieser Kompetenzen könnte erreicht werden, dass die Zellen einen gewebe- oder organähnlichen Zellverband bilden (*Bianco et al., 2001*). Damit könnten Herzklappen, Blutgefäße, Lungen-, Urothel- (Harnblase/Harnleiter), Leber-, Darm- und Nierengewebe, künstliche Bauchspeicheldrüse, Haut, Knochen, Knorpel und Bindegewebe erzeugt werden. Am weitesten fortgeschritten und schon in der klinischen Anwendung sind die Herstellung von Haut, Knorpel und Knochen mit Hilfe des *tissue engineering* aus adulten, meist autologen (d. h. patienteneigenen) Stammzellen (*Griffith et al., 2002; Stock et al., 2001*). Selbst eine künstliche Harnblase wurde schon im Tierversuch erprobt (*Oberpenning et al., 1999*).

Darüberhinaus öffnet sich – wie bereits oben erwähnt - die Möglichkeit, die zu transplantierenden Gewebe mit Hilfe gentechnischer Modifikationen *in vitro* zu modifizieren und damit Defekte, wie zum Beispiel fehlende Enzymfunktionen zu beheben. Zwar scheint die Vorstellung der Züchtung von ganzen bioartifiziellen Organen (z. B. Niere, Bauchspeicheldrüse, Herz) mit Hilfe von Stammzellen heute noch im Bereich des Utopischen zu liegen, doch ist der Aufbau derart komplexer Strukturen durch Methoden des *tissue engineering* grundsätzlich denkbar. So sind zur Zeit noch verschiedene wichtige Fragen ungelöst, zum Beispiel, wie die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der bioartifiziellen Gewebe und Organe gewährleistet werden soll. Dazu müssten zunächst die Kenntnisse über die Neubildung von Blutgefäßen erweitert werden, da der Anschluss des bioartifiziellen Gewebes oder Organs an das Blutgefäßsystem des Empfängers essentiell ist (*Martin et al., 2001*).

Tabelle 4: Anwendungen des Tissue Engineering, Zielorgane und die hierfür benötigten Zelltypen (*Martin et al., 2001*)

Zielorgan	Benötigter Zelltyp
Herzklappe	Endothelzellen, Myofibroblasten
Gefäße	Endothelzellen, Myofibroblasten
Lungen	Pneumozyten
Leber	Hepatozyten
Niere	Epithelzellen des Nierentubulus
Harnblase/Harnleiter	Urothelzellen
Pankreas	Inselzellen
Darm	Enterozyten
Haut	Epithelzellen
Knochen	Osteoblasten
Knorpel	Chondrozyten
Bindegewebe	Fibroblasten

*Tissue engineering* ist eine interdisziplinäre, angewandte Wissenschaft zur Wiederherstellung von defekten Organfunktionen (*Langer et al., 1993*). Wichtige Prinzipien sind die Implantation von Biomaterialien entweder unterstützt durch induktive Proteine (*Stevenson et al., 1994; Yasko et al., 1994*) bzw. deren Gensequenzen (*Morgan et al., 1998*) oder durch histogene Zellen (*Bruder et al., 1994; Horch et al., 1998; Kadiyala et al., 1997*). Beide Prinzipien - Induktion bzw. Regeneration aus sich heraus - haben ihre Indikationen.

Die Idee des *Tissue engineering* auf der Basis von Stammzellen stützt sich ursprünglich auf Erkenntnisse aus der Embryonalentwicklung: Hier sind spezifische Progenitorzellen mittelbar für die Bildung der Gewebe einschließlich der Funktionszellen und der extrazellulären Matrix verantwortlich. Das heißt, also auch die Produktion von extrazellulären Bestandteilen der Gewebe wie Kollagenen, Hyaluronsäure, Proteoglykanen und Fibronectin wird im Rahmen der Reifung der Gewebe über sequentielle Signaltransduktionprozesse von Zellen der Gewebe kontrolliert (*Urist et al., 1983; Buckwalter et al., 1995*). Der Prozess setzt sich später fort. Auch die reifen Gewebe unterliegen im Laufe des gesamten Lebens einer

analog gesteuerten kontinuierlichen Remodellierung was sich in einer sich ständig ändernden molekularen und zellulären Zusammensetzung bis ins Alter niederschlägt (*Buckwalter et al., 1995*). Kein Gewebe besteht zudem aus phänotypisch völlig einheitlichen Zellen.

Dies führte zur Entwicklung konkreter Vorstellungen über neue Möglichkeiten zur Geweberekonstruktion: Danach sind proliferierende Progenitorzellen in der Lage, sich dreidimensional zu orientieren und zu gewebebildenden Zellen zu differenzieren, wenn sie mit oder ohne biologische Trägermaterialien in einen Gewebedefekt gebracht werden. Entscheidend ist ihre Fähigkeit, auf Zell-Zell-Kontakte und die spezifischen Signalstoffe der neuen *in vivo* -Umgebung im Sinne der Gewebebildung zu reagieren und damit einen quasi „natürlichen“ Heilungsprozess aus Chemotaxis, Migration und Reparatur nachzuvollziehen (*Caplan et al., 1991*). Optimal werden die Konstrukte fest integriert und übernehmen die organotypische Funktion. Im konkreten Fall ist die Geweberegeneration jedoch ein sehr komplexer, mehrschrittiger und multifaktorieller Prozess, der perfekt koordiniert werden muss. Zudem ist in einer komplexen chirurgischen Situation die Hand eines geschickten Chirurgen erforderlich, um alle Variablen entsprechend den klassischen Transplantationstechniken ausreichend zu berücksichtigen.

Die multipotente mesenchymale Stammzelle (MSC) ist bereits seit langem Forschungsobjekt mit dem Ziel der Rekonstruktion verschiedener Stützgewebe (*Caplan et al., 1991*). Als frühes Beispiel dafür sei eine Arbeit von Kadiyala et al. angeführt. Die Autoren zeigten, dass segmentale Defekte im Rattenfemur mit osteogenen Zellen, die aus hMSCs gewonnen wurden, schneller heilen als die Vergleichskontrollen ohne Zellen (*Kadiyala et al., 1997*). Zuvor hatte Quarto bei Versuchen zur *in vitro* Kultivierung von Stammzellen eine altersabhängige Abnahme bei deren Gewinnung aus Patienten-Aspiraten festgestellt und auf die Notwendigkeit der *ex vivo* Vermehrung von osteogenen Stammzellen bei älteren Menschen hingewiesen (*Quarto et al., 1995*).

Die Implantation von Progenitorzellen in einen Organdefekt repräsentiert zur Zeit noch die am häufigsten praktizierte therapeutische Anwendung von adulten Stammzellen. Doch gewinnt inzwischen auch ein alternativer Ansatz mehr und mehr an

Bedeutung. Ihm liegt die Idee zugrunde, reife differenzierte Zellen zur extrakorporalen Gewebeneubildung einzusetzen, die zuvor durch *in vitro*-Proliferation und -Differenzierung aus autologen Stammzellen gewonnen wurden. Einschlägige Erfahrungen stammen vor allem aus experimentellen Untersuchungen mit Zellen mesenchymalen Ursprungs.

Unbehandelte Gelenkknorpel-Defekte unterliegen einer fortschreitenden Degenerierung des Knorpels, weil geschädigtes funktionelles Knorpelgewebe stets von neuem durch biomechanisch minderwertiges Narbengewebe ersetzt wird. Die zur Zeit am häufigsten applizierte Behandlung ist die „Autologe Chondrozyten-Transplantation“, bei der *in vitro* proliferierte Chondrozyten in den Defekt gespritzt werden, wo sie Dank einer zuvor angebrachten Membran in ausreichender Konzentration lokalisiert werden können (Brittberg et al., 1994). Das Verfahren leidet allerdings unter der Möglichkeit, dass auch nach dieser Behandlung die Bildung von minderwertigem Narbengewebe nicht vermieden werden kann. Die bessere Alternative wäre hier ohne Zweifel die Implantation von *in vitro* mit Hilfe der Methoden des *tissue engineering* hergestelltem Gelenkknorpel in den Defekt. Es ist seit langem bekannt, dass frisch isolierte, sogenannte primäre Knorpelzellen in der Lage sind, *in vitro* Knorpelgewebe mit der für die hyaline Knorpelmatrix charakteristischen Zusammensetzung aus Kollagen Typ II und Glucosaminglykanen zu synthetisieren. Der neugebildete Knorpel zeigt darüberhinaus biomechanische Eigenschaften hinsichtlich des Elastizitätsmoduls, die dem des nativen Gelenkknorpels ähneln. Weiterer Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit der minimal-invasiven Implantation unter Vermeidung einer Arthrotomie, wie sie bei der gegenwärtigen autologen Knorpelzelltransplantation mit Periostlappen notwendig ist. Durch *tissue engineering* hergestellter Knorpel muss histologisch auf seine Morphologie und physikalisch auf seine organotypische biomechanische Funktion getestet werden (Peritti et al., 1999).

Nachteiligerweise differenzieren Chondroblasten aus hMSCs zu hypertrophen und kalzifizierenden Chondrozyten (Johnstone et al., 1998). Aus diesem Grund werden Knorpelzellen derzeit aus organotypischen Biopsien gewonnen (Domm et al., 2000; Möller et al., 2000). Zur Vermehrung einer Dedifferenzierung in der zweidimensionalen Kulturschale können die Zellen ohne Vermehrung *in vitro* als primäre Chondrozytenkultur gezüchtet werden (Domm et al., 2000).

Obwohl Knochengewebe die Fähigkeit zur Eigenheilung besitzt, kann diese in besonderen Fällen, bei traumatischen oder onkologischen Defekten, Dysgenesien oder Osteopenie gestört sein (*Quarto et al., 1995; Klemm et al., 1998*). Derzeit werden diese Defekte als goldener Standard durch autogene Knochentransplantationen aufgefüllt, die ein Defekt an der Spenderstelle hinterlassen (*Younger et al., 1989*). *Tissue engineering* bietet die Möglichkeit, die Morbidität der Spenderstelle durch Minimierung der Probe zu reduzieren. Durch die *ex vivo* Vermehrung können osteogenetische Zellen aus mesenchymalen Stammzellen amplifiziert (*Bruder et al., 1994; Caplan et al., 1991*) und v.a. beim älteren Patienten in ausreichender Menge in Defekte eingebracht werden (*Quarto et al., 1995*). Die Wahl des Konstrukts oder die Anpassung an den Defekt durch *in situ* Modellierung (*Schaefer et al., 1999*). Aus diesen Gründen ist die Knochenrekonstruktion durch *tissue engineering* den bisherigen Methoden überlegen und bietet nicht nur die biotechnologische Lösung der bekannten Probleme Spendermorbidity, Immunogenität und Implantatlockerung sondern auch eine Erweiterung der Indikationen und Therapiemöglichkeiten.

Pluripotente embryonale Stammzellen (ESs) könnten eine Quelle für Stammzellen der endo, mes- und ektodermalen Linie sein, so dass aus einer Zelle mehrere Gewebe generiert werden können (*Chen et al., 1997*). Somit könnten komplexe Organe, die aus mehreren Geweben bestehen, durch unterschiedliche Differenzierung von ESs in einem sequentiellen Differenzierungsprozess zu verschiedenen spezialisierten Progenitorzellen, entwickelt werden. Intensive Studien zum *ex vivo* Verhalten von allogenen embryonalen Stammzellen, einer möglichen Immunogenität, dem Verlust der Kontaktinhibition, ihrer De- und Redifferenzierungsfähigkeit sind jedoch notwendig (*Chen et al., 1997*).

Die Entwicklung von *tissue engineering* -Produkten erfordert das Verständnis der physiologischen Regenerationsprozesse und eine interdisziplinäre Kooperation von Medizinern, Biologen und Materialforschern. Die Effizienz der Produkte muss durch den klinischen Einsatz und stringente Erfolgskontrollen demonstriert werden. Sowohl die Entwicklung als auch die Testung wird dabei durch den erfahrenen Chirurgen geleitet.

## 2.6 In vitro Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

### 2.6.1 Adipogene Differenzierung

In der rekonstruktiven und plastischen Chirurgie besteht ein ständig wachsender Bedarf an geeigneten Transplantaten, um Weichgewebsdefekte, wie sie z.B. nach Tumorresektionen auftreten, erfolgreich rekonstruieren zu können. Derzeit in der Klinik angewandte Materialien wie Kollagenpräparate oder Silikonimplantate haben z. T. wesentliche Nachteile wie die Langzeitresorption bzw. die Gefahr der Bildung fibrotischer Kapseln. Körpereigenes Fettgewebe stellt das natürliche Füllmaterial dar, kann jedoch nur mit extrem großem chirurgischem Aufwand erfolgreich transplantiert werden. Die Züchtung von Fettgewebe mit den Methoden des *tissue engineering*s stellt eine vielversprechende Alternative zu den derzeit verfügbaren Behandlungsweisen dar (Beahm et al., 2003).

Grundsätzlich werden gegenwärtig zwei unterschiedliche Strategien verfolgt, um Fettgewebe *in vivo* aufzubauen (Weiser et al., 2007). Zum einen kann die de novo Synthese von Fettgewebe direkt im Körper angeregt werden, indem pro-adipogene Faktoren, wie z.B. bFGF oder Insulin, im zu füllenden Defekt appliziert oder freigesetzt werden. Die zweite Strategie beinhaltet die Transplantation von Fettvorläuferzellen wie sie im Fettgewebe oder differenzierten Adipozyten vorkommen. Derartige Vorläuferzellen haben Stammzellcharakter, d.h. sie können zunächst *in vitro* unter geeigneten Bedingungen vermehrt werden, um für die klinische Applikation ausreichende Mengen zu erhalten. Differenzierte Adipozyten erhält man daraus oder aus den multipotenten hMSCs autologer Knochenmarksbiopsien durch *in vitro* Kultivierung unter dem Einfluss von 1-Methyl-3-Isobutylxanthin, Dexamethason und Insulin. (Neubauer et al., 2004; Neubauer et al., 2005).

### 2.6.2 Myogene Differenzierung

Brust- und Viszeralfettgewebe enthält nach aktuellen Analysen neben Adipozyten auch Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Blutzellen, Gewebemakrophagen und mesenchymale Stammzellen. Letztere haben das Potential, *in vitro* in mesodermale Zellen wie unter anderem Myoblasten und Kardiomyozyten zu differenzieren.

Experimentelle Daten, die die Hypothese unterstützen, dass in der Stromazellfraktion des Fettgewebes in der Tat multipotente Stammzellen existieren, wurden von Cousin und Planat vorgelegt. Nach 3-wöchiger Inkubation von Zellen aus der Stromazellfraktion des Fettgewebes im myogenem Medium (DMEM, 10%FKS, 5%Pferdeserum, 50  $\mu$ M Hydrocortison) kommt es typischerweise zur Ausbildung von kleinen longitudinalen, vielkernigen Zellen, die im weiteren Verlauf fusionieren und über 6 Wochen deutlich an Größe zunehmen. In solchen Zellen ließ sich sowohl immunologisch wie auch mit Hilfe von RT-PCR Analysen die Expression von MyoD1, einem myogenen Regulationsfaktor, sowie von Myosin Heavy Chain nachweisen. (*Cousin et al., 2003; Planat et al., 2003*)

### 2.6.3 Osteogene Differenzierung

Die molekularen Mechanismen der osteogenen Differenzierung und deren Regulation durch Wachstumsfaktoren sind nach wie vor Objekt intensiver Forschung. Die multipotenten, potenziell hochproliferativen hMSCs entwickeln sich unter dem Einfluss von Glucocorticoiden (Dexamethason), Ascorbinsäure und  $\beta$ -Glyzerophosphat schrittweise über Osteoprogenitorzellen und Prä-Osteoblasten zu Osteoid produzierenden Osteoblasten, die in die verkalkende Interzellulärsubstanz eingeschlossen sind. Die im letzten Schritt der Entwicklungskaskade entstehenden Osteozyten sind nicht mehr teilungsfähig. Sie dienen der Regulation des Calcium- und Phosphatspiegels und steuern die Aktivität der Knochen um- und abbauenden Osteoklasten.

Dexamethason fördert vor allem die Proliferation und unterstützt die Differenzierung (*Bellows et al., 1990*) während Ascorbinsäure unter anderem für den Aktivitätsanstieg der Alkalischen Phosphatase verantwortlich ist und die Produktion von Osteocalcin unterstützt, einem Hydroxylapatit bindenden Protein der Knochenmatrix. (*Liu et al., 1999*). Organisches und freies Phosphat spielen eine Rolle bei der Mineralisation und Modulation der Osteoblastenaktivität und beeinflussen die Produktion des osteogenen Schlüsselgens cbfa1 (Core Binding Factor alpha1) (*Tenenbaum et al., 1992; Beck et al., 2000*).

Die osteogene Differenzierung von hMSCs ist vor allem erkennbar an einer deutlichen Veränderung der Zellmorphologie sowie des Musters der exprimierten

Oberflächenmarker und extrazellulären Matrixmoleküle. So sind die Antikörper SH-2, SH-3 und SH-4 auf den Osteoprogenitorzellen nachweisbar, fehlen aber auf den Osteoblasten (*Haynesworth et al., 1992a*). Daneben wird ein Anstieg der Aktivität der Alkalischen Phosphatase, eine veränderte Expression der Osteocalcin-mRNA und eine extrazelluläre Deponierung von Hydroxylapatit beobachtet. (*Jaiswal et al., 1997; Beresford et al., 1994; Rickard et al., 1996*).

Progenitorzellen werden funktionell definiert als Vorläuferzellen, die in eine oder mehrere Linien differenzierbar sind und eine eingeschränkte Selbstteilungskapazität aufweisen (*Long et al., 2001*). *In vitro* entsprechen sie beispielsweise den CFU-F (*Friedenstein et al., 1966*), einer fibroblastenartige Zellpopulation mit deutlichem osteogenem Potenzial (*Owen et al., 1987*). Die Zahl der humanen Osteoprogenitorzellen nimmt mit dem Alter und dem Vorliegen einer Osteoporose ab (*D'ippolito et al., 1999; Nishida et al., 1999*). Prä-Osteoblasten repräsentieren das Übergangsstadium zwischen den stark proliferativen Osteoprogenitorzellen und den ausgereiften Osteozyten. Sie nehmen die angrenzende Lokalisation zum aktiven Osteoblasten ein und werden hauptsächlich nach morphologischen Kriterien definiert. Typische, als Markerproteine bezeichnete Proteine der Knochenzellen, wie die Alkalische Phosphatase, Osteonectin (*Bianco et al., 1988*), Osteocalcin, Osteopontin und Bone Sialoprotein (BSP) werden nur in sehr geringem Umfang exprimiert (*Dunlop et al., 1995; Chen et al., 1991; Gronthos et al., 1999*).

Einen Überblick über die Differenzierungsschritte und die jeweils nachweisbaren Markerproteine gibt Tabelle 5.

Tabelle 5: Nachweis von Oberflächenmarkern auf den Zellen der Verschiedenen Stufen der osteogenen Differenzierung (MSC bis Osteocyt)

Marker-Proteine	MSC	Osteo-progenitor	Prä-osteoblast	Osteoblast	Osteozyt	Referenz
SH-2	X					( <i>Haynesworth et al, 1992a</i> )
SH-3	X					( <i>Haynesworth et al, 1992a</i> )
SH-4	X					( <i>Haynesworth et al, 1992a</i> )



SB-10	X	X				(Bruder et al., 1997)
Stro-1		X	X	X		(Simmons et al., 1991)
AP			X	X		(Bruder et al., 1990)
Osteonectin			X	X		(Bianco et al., 1988)
Osteopontin			X	X	X	(Mark et al., 1987)
Osteocalcin				X	X	(Bronckers et al., 1987)
BSP				X	X	Chen et al., 1991)

Auch die Regenerierung des Knochengewebes im Rahmen des natürlichen Knochenwachstums, Knochenumbaus oder der Frakturheilung unterliegt der Regulation durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, die sich zum Großteil in der Knochmatrix befinden, aber auch von aktivierten Makrophagen bereitgestellt werden. Mit großer Wahrscheinlichkeit sind eine Vielzahl dieser Faktoren auch in fötalem Kälberserum und humanem Serum enthalten. In welchem Ausmaß die zweite Phase der osteogenen Differenzierung, die Bildung von Extrazellulärmatrix durch Wachstumsfaktoren kontrolliert wird, kann bereits weitgehend *in vitro* nachvollzogen werden. Zu den wichtigsten Faktoren zählen der Platelet-Derived Groth Faktor (PDGF), der basic Fibroblast Groth Factor (bFGF), der Transforming Groth Factor-beta (TGF- $\beta$ ), der Insuline-like Groth Factor-I (IGF-I, Somatomedine C) und die Bone Morphogenic Proteins (BMP)-2, 6, 7. Die Stimulation der Zellaktivität in der Go-G1-Phase und die damit verbundene Steigerung der Proliferationsrate wird durch PDGF (Antoniades et al., 1982; Ross et al., 1986), bFGF (Tsuda et al., 1985; Gospodarowicz et al., 1986), TGF- $\beta$  (Fromique et al., 1998; Kassem et al., 2000), BMP-2 (Fromique et al., 1998) und BMP-7 (Asahina et al., 1993) vermittelt. Insbesondere das bFGF wird zur forcierten *in vitro* Expansion von hMSCs genutzt. Jedoch wird das Zellwachstum durch diese Faktoren nicht selektiv begünstigt. So wird auch ein Anstieg der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase unter der

Gabe von bFGF (Walsh et al., 2000), TGF- $\beta$  (Kassem et al., 2000), IGF-1 (Schmid et al., 1984), und den BMP's (Yeh et al., 2002; Cheng et al., 2003) beobachtet.

Zusätzlich ist unter dem Einfluss der BMP's auch eine erhöhte Expressionsrate von Markerproteinen wie Osteocalcin, Osteopontin und Bone Sialoprotein (BSP) zu verzeichnen (Yeh et al., 2002; Cheng et al., 2003).

Die Bildung von Proteoglycanen und deren Mineralisierung im Rahmen der späten osteogenen Differenzierung wird in Anwesenheit der folgenden Wachstumsfaktoren in unterschiedlichem Ausmaß unterstützt: PDGF (Antoniades et al., 1982), bFGF (Gospodarowicz et al., 1986; Chaudhary et al., 2004), TGF- $\beta$  (Fromique et al., 1998; Kassem et al., 2000), IGF-1 (Schmid et al., 1984) und der BMP' (Fromique et al., 1998; Asahina et al., 1993; Yeh et al., 2002; Cheng et al., 2003).

Für die erfolgreiche *in vitro*-Kultivierung ist bedeutsam, dass es bei einem kombinierten Einsatz einiger der beschriebenen Wachstumsfaktoren zudem auch zu Synergie-Effekten bzw. zu einer Wirkungsabschwächung kommen kann (Piche et al., 1989) oder zur Stimulierung der Synthese eines anderen Faktors (Zeng et al., 2003).

#### 2.6.4 Chondrogene Differenzierung

Als chondrogene Differenzierung bezeichnet man zunächst den Prozess der Bildung von Chondroblasten und Chondrozyten aus den mesenchymalen Stammzellen. Zum Teil wird der Begriff jedoch auch zusätzlich für die anschließende Bildung von hyalinem oder hypertrophem Knorpelgewebe verwendet. Der Grund dafür sind möglicherweise verschiedene Protokolle, die keine Isolierung der differenzierten Chondrozyten vor dem Einsatz zur *in vitro* Chondrogenese vorsehen. Beispiele dafür sind die am häufigsten zitierten Studien zur chondrogenen Differenzierung aus hMSCs (Johnstone et al., 1998; Machay et al., 1998). Diese Autoren behandeln zuvor zu Pellets sedimentierte hMSCs mit dem Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 3 neben Dexamethason in einem geeigneten serumfreien Medium. Unter diesen Bedingungen kommt es nicht nur zur Differenzierung zu Chondrozyten sondern praktisch simultan auch schon zur Bildung und Sezernierung der für den Knorpel charakteristischen extrazellulären Komponenten wie Kollagen Typ II und die Glykosaminoglykane. Entscheidend für den Erfolg ist dabei der Aufbau eines spezifischen Mikromilieus in der Kultur. Man geht davon aus, dass die intensiven Zell-Zell-Kontakte die Bildung eines komplexen Netzwerks aus auto- und parakrin sezernierten Wachstumsfaktoren initiieren, dessen Wirkung sowohl von der Anzahl

und Dichte der Zellen sowie auch der Präsenz „fremder“ Zellen abhängt (*Pittenger MF et al., 1999*). Die Fähigkeit zur Bildung von Knorpelgewebe aus Zellpellets in Gegenwart von TGF- $\beta$ 3 wurde unter anderem auch zur Identifizierung von mesenchymalen Stammzellen in Knochenmarkaspiraten eingesetzt. Andererseits lassen die erwähnten Befunde nicht den Schluss zu, dass sich dieses verbreitete Verfahren auch zur *in vitro* Herstellung von hyalinem Knorpel im Rahmen des *tissue engineering* eignet, wie man ihn für die Therapie von Gelenkflächenschäden benötigt. So berichten verschiedene Autoren, dass vor allem die Zellen an der Oberfläche der Zellpellets ein an Kollagen Typ I reiches Gewebe zu formen scheinen, das eher dem Perichondrium ähnelt und die Chondrogenese der anderen Zellen über parakrine Signale beeinflusst (*Yoo et al., 1998*). Wenn Yoo JU et al. mit der serumfreien Pelletkultur unter Anwesenheit von TGF- $\beta$ 1 die Chondrogenese einleiten, bildet sich aus *in vitro* expandierten mesenchymalen Zellen im Laufe von 5 Tagen Knorpelgewebe mit einem signifikantem Anteil von Kollagen Typ X, was bedeutet, dass dabei hypertrophes Gewebe entsteht.

Yoo JU et al. diskutieren drei Faktoren, die möglicherweise für die Steuerung der Chondrogenese verantwortlich sind. Da ist zum einen die Zusammenballung der Zellen zu einem Pellet, die der Zellkondensation vor der embryonalen Knorpel- bzw. Knochenbildung nachempfunden ist. Zum anderen scheint das zeitliche Muster der Konzentration von TGF- $\beta$ 1 sehr bedeutsam zu sein. Dieser Faktor, der zusammen mit verwandten Wachstumsfaktoren ebenfalls bei der embryonalen Knorpelbildung sowie bei der Knochenbruchheilung zu finden ist, ist nicht nur wichtig für die Induzierung der Chondrogenese sondern stimuliert auch die terminale Differenzierung bis zur Hypertrophie. Schließlich soll das serumfreie Medium, das verwendet wird, chemisch sehr genau definiert sein. Dass diese drei Faktoren nur im Zusammenspiel ihr chondrogenes Potenzial entwickeln, wurde bereits daran erkannt, dass ein einfaches Versorgen der Monolayerkulturen mit demselben Medium einschließlich der Wachstumsfaktoren nicht zur Chondrogenese führt (*Yoo et al., 1998*).

Ein Ausweg aus diesem Dilemma ist möglicherweise ein alternatives Protokoll für die Chondrogenese, bei dem Zelldifferenzierung und Gewebekonstruktion in zwei zeitlich voneinander getrennten Phasen nacheinander ablaufen. Für diese Hypothese spricht die Beobachtung, dass es bei Verwendung von humanen Chondrozyten mit differenziertem Phänotyp in der Pelletkultur durchaus zur Bildung von hyalinem

Knorpel kommt, erkennbar an der Anwesenheit von Kollagen Typ II und der Abwesenheit der Kollagentypen I und X (*Slobodianski, 2006*). Das Ziel der chondrogenen Differenzierung von *in vitro* expandierten humanen mesenchymalen Stammzellen ohne zugleich die Gewebekonstruktion zu initiieren, kann erreicht werden, indem die dafür verantwortlichen frühen Zell-Zell-Kontakte bis zum Abschluss der Differenzierung vermieden werden. Ein dafür geeignetes Verfahren ist die Behandlung von in ein reversibles Alginate-Gel eingeschlossenen Zellen mit dem von Machay beschriebenen Wachstumsfaktor-Cocktail (*Slobodianski, 2006*). Die anschließend vom Gel befreiten Zellen bilden in der Pelletkultur ein Knorpelgewebe, dessen Gehalt an Kollagen Typ I und X nicht höher liegt als in nativem Hyalinen Knorpel des Menschen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Untersuchungsmaterial

Das zur Durchführung dieser Arbeit verwendete Knochenmark stammt von gesunden Spendern des Knochenmarktransplantationszentrums der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf. Dabei handelte es sich in allen Fällen um therapeutisch nicht mehr verwendete Reste. Das Alter der 9 Spender lag zwischen 20 und 48 Jahren (2 Frauen und 7 Männer). Die Gewinnung des Materials erfolgte durch Aspiration aus dem Beckenknochen. Um mögliche Alter- und Geschlechtseinflüsse sicher zu meiden, wurden für einen kompletten Versuch nur Zellen eines einzigen Spenders benutzt.

Tabelle 6: Spenderdaten mit Geschlecht und Alter

Spender	Geschlecht	Alter in Jahren
1	M	31
2	M	46
3	M	33
4	W	23
5	M	28
6	M	42
7	M	20
8	M	34
9	W	37

#### 3.1.2 Geräte und Materialien

##### Geräte

- sterile Werkbank Hera Safe (Heraeus, Hanau)
- CO<sub>2</sub>/ O<sub>2</sub>-Inkubator (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)
- Einmal-Pipetten (1-, 2-, 5-, 10- und 20-ml) (Becton Dickinson, USA)

- Falcon Tube (15,50 ml) (Becton Dickinson, USA)
- Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>, 50 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>) (Nunc, Denmark)
- 24-Loch-Platten (Cellstar) (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
- Kanüle (1,20x 40 mm BC/SB) (B. Braun AG, Melsungen, D)
- Spritze (10ml) (B. Braun AG, Melsungen, D)
- Zentrifuge Rotanta/TRC (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
- Zentrifuge (NETHELER. HINZ GmbH, D)
- Mikroskop (ULWCD 0.30 olympus, Japan)
- CASY® Cell Counter + Analyser System Model TT (Schärfe System, Reutlingen)
- Victor- Multilabel Counter (Wallac, Finnland)
- Flowcytometer Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, USA)
- Wasserbad GFL (Labortechnik GmbH Burgwedel)
- Vortexer VF2 (Janke&Kunkell KA Labortechnik)

## **Materialien**

### Kulturmedium für Stammzellen:

- Dulbecco's Modified Eagle Medium -DMEM- (Gibco, Karlsruhe, D)  
Zusätze: 1% Penicillin (Gibco, Karlsruhe, D)  
1% Streptomycin (Gibco, Karlsruhe, D)  
10% fötales Kälberserum (FKS) (Cat N: DE 14-801F 8 South American Origin, USA)

### Dichtegradient:

- Ficoll (Sigma, München)  
Dichte: 1,077 g/ml

### Waschmedium/ Lösungsmittel:

- Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco, Karlsruhe, D)
- Trypsin-EDTA (PAA Laboratories GmbH, Austria)
- Ethanol (Merck, D)
- Aqua dest. (Baxter, Unterschleißheim, D)
- DMSO (Dimethylsulfoxid): C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS (ECC No. 200664)
- CASY-Puffer (Schärfe System, Reutlingen)

### Antikörper für Flowcytometrie:

- anti-human CD45 FITC (Acris GmbH, D)

- anti human CD54 FITC (Acris GmbH, D)
- anti human CD90 (Thy-1) FITC (Acris GmbH, D)
- anti human CD105 FITC (Acris GmbH, D)
- anti human CD106 FITC (Acris GmbH, D)
- anti human STRO-1 (RD SYSTEMS, Minneapolis)

Fixierungsmittel:

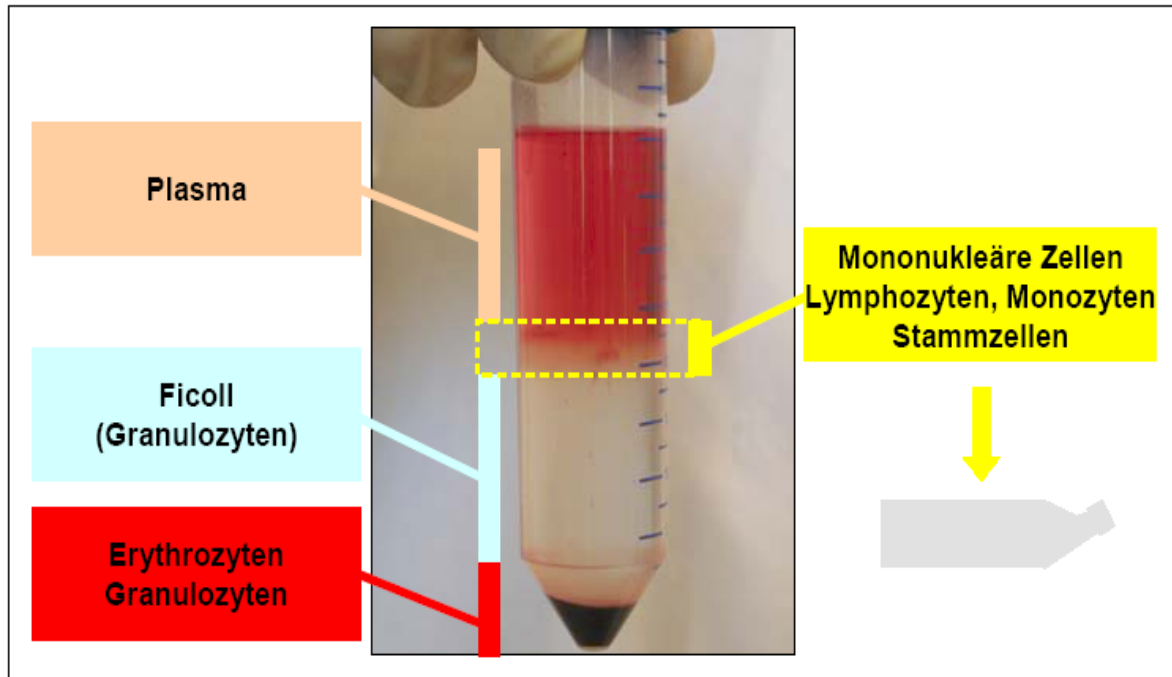
- 37% Formaldehyd (Merck, Darmstadt, D) verdünnt und gepuffert mit PBS, Endkonzentration: 3,7%

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Isolierung von mesenchymalen Stammzellen

Die hMSCs wurden unter sterilen Bedingungen (sterile Werkbank) aus Knochenmark (KM) isoliert, das bei 9 Spendern im Rahmen der Knochenmarkspende operativ gewonnen wurde. Die Transfusionsbeutel mit den KM-Resten wurden mit etwa 20 ml DMEM gespült, der Inhalt dann in ein 50 ml Falcon Tube überführt und bei 1400 u/min für 5 Min zentrifugiert. Der die hMSCs enthaltende Überstand wurde mittels Pipette abgesaugt und dann in ein weiteres Falcon Tube über 15 ml Ficoll (Dichte 1.077 g/ml) geschichtet und bei 2000 u/min für 20 Min. ohne Bremse zentrifugiert. Dadurch bilden vor allem die Erythrozyten und die meisten reifen Granulozyten ein Pellet auf dem Boden des Röhrchens, während die Stromazellen und andere mononukleäre Knochenzellen eine weißliche Schicht an der Interphase zwischen Ficoll und dem Waschmedium formen. Diese Zellschicht wurde nun vorsichtig mittels 10-ml-Pipette aufgenommen, in ein weiteres Falcon Tube überführt und bei 1400 u/min für 5 Min. zentrifugiert. Die Suspension wurde in eine definierte Menge von Kulturmedium (DMEM+10%FKS+1%Penicillin+1%Streptomycin) aufgenommen und resuspendiert.

Aus dem Gemisch wurden dann mit einer 10-100 µl-Pipette 100 µl entnommen und mittels Zellzähler gezählt.



**Abbildung 3: Die Auftrennung der Zellsuspension im Ficoll-Gradienten**

Die Grenzphase (gelbe Markierung) zwischen Plasma- und Ficoll-Phase enthält die mononukleären Zellen (MNC).

### 3.2.2 Kultivierung der isolierten Stammzellen

#### Versuch 1:

Die isolierten Zellen wurden in drei 75 cm<sup>2</sup> GKF ( in jeweils etwa 4 Millionen Zellen) kultiviert: Zellfraktion a (La), Zellfraktion b (Lb) und Zellfraktion c (Lc)

Am ersten Tag nach der Isolierung wurde das Medium aus der ersten GKF (La) abgesaugt und verworfen (LaÜS).

Am dritten Tag nach der Isolierung wurde das Medium aus der zweiten GKF (Lb) abgesaugt und verworfen (LbÜS).

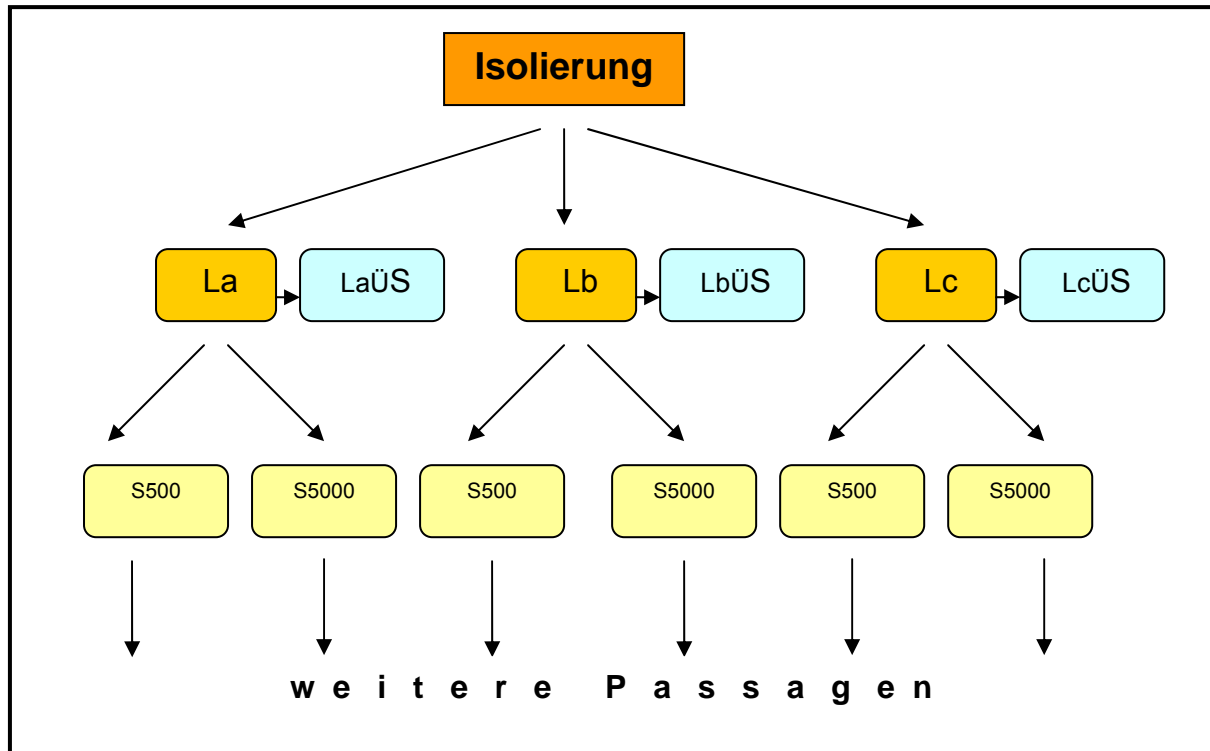
Am fünften Tag nach der Isolierung wurde das Medium aus der dritten GKF (Lc) abgesaugt und verworfen (LcÜS).

Damit wurden Zellen verwendet, die unterschiedlich lange Gelegenheit zur Adhärerung mit der Plastikoberfläche der Zellkulturflaschen hatten (1, 3 und 5 Tage).

La, Lb und Lc wurden nach Erreichen einer Konfluenz von etwa 80% jeweils in 2 75-cm<sup>2</sup> GKF mit den Aussattdichten: 500 Zellen/cm<sup>2</sup> und 5000 Zellen/cm<sup>2</sup> weiterkultiviert.



Passagiert wurden die Zellen innerhalb einer Zelllinie gleichzeitig wenn mind. eine der beiden Zellunterlinien eine Konfluenz von etwa 80% (insgesamt 5 Passagen) erreicht hat.



**Abbildung 4: schematische Darstellung des ersten Versuches**

La = Zellfraktion a, Lb = Zellfraktion b, Lc = Zellfraktion c, LaÜS = Überstand der Zellfraktion a, LbÜS = Überstand der Zellfraktion b, LcÜS = Überstand der Zellfraktion c, S500 = Zellen der Aussaatdichte 500/cm<sup>2</sup>, S5000 = Zellen der Aussaatdichte 5000/cm<sup>2</sup>

#### **Versuch 2 bis 4:**

Die isolierten Zellen wurden in 3 ml Kulturmedium aufgenommen und in einer 25 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflasche (GKF) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Wasserdampfsättigung in einem Inkubationsschrank kultiviert. Am zweiten Tag nach der Isolierung wurde das Medium bzw. der Überstand (mit den nicht-adhären Zellen) aus der GKF (Tag1) mittels einer 10-Pipette abgesaugt und in weitere GKF (Tag 2) überführt. In der GKF-Tag1 wurden 3 ml frisches Kulturmedium pipettiert. Am dritten Tag wurde nach demselben Prinzip das Medium (= Überstand) von GKF-Tag2 in GKF-Tag3 überführt. In GKF-Tag2 wurden dann 3 ml frisches Kulturmedium pipettiert.

Die letzten Schritte wurden so weitergeführt bis letztlich 7 GKF<sub>n</sub> (Tag1 bis Tag7) entstanden, die hMSCs mit unterschiedlichen Adhäsionszeiten enthalten.

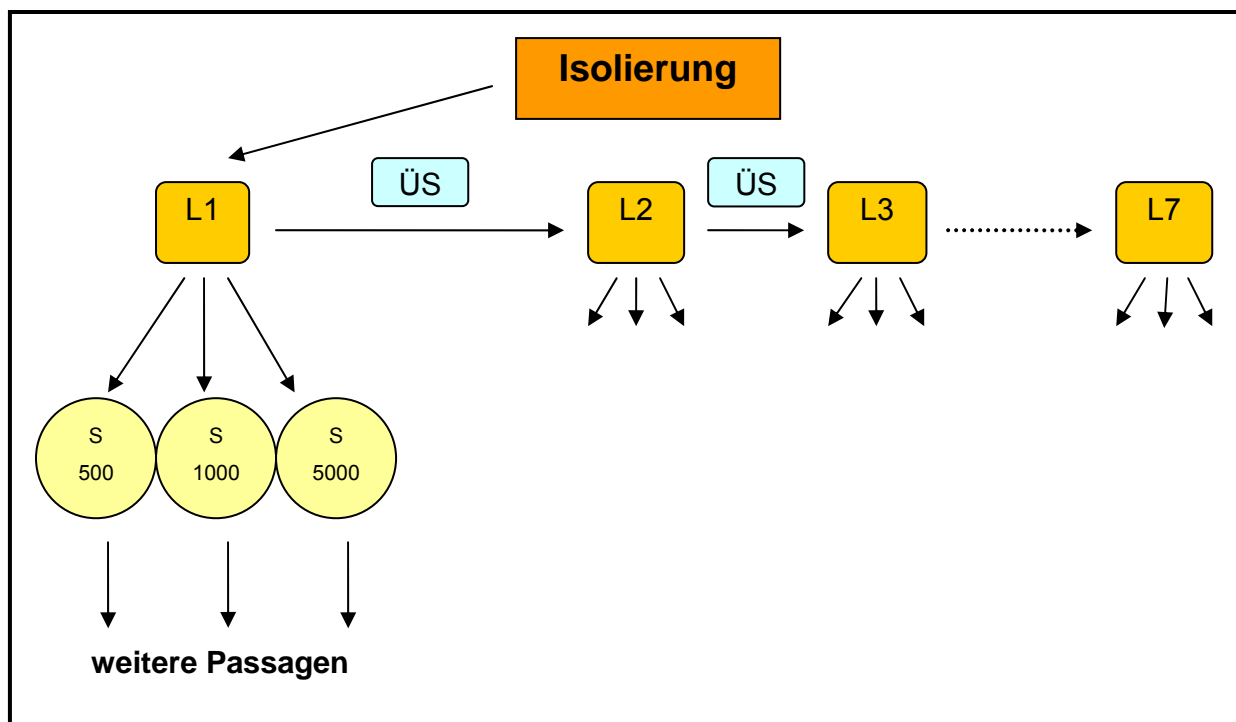
Am achten Tag wurde das Medium mit den nicht-adhärennten Zellen aus GKF7 entfernt und durch 3 ml frisches Medium ersetzt.

Die Kulturen wurden in diesen Versuchen solange kultiviert, bis sich ein Zellrasen mit einer Konfluenz von etwa 80% bildete. Die Proliferation der Zellen konnte lichtmikroskopisch beobachtet werden.

In der Regel wurde das Kulturmedium während der gesamten Kultivierungszeit zweimal pro Woche ausgetauscht.

In drei 25 cm<sup>2</sup> GKF<sub>n</sub> wurde ein Teil der Zellen mit den folgenden Aussaatdichten weiter kultiviert: erste GKF mit 500 Zellen/cm<sup>2</sup>, zweite GKF mit 1000 Zellen/cm<sup>2</sup> und eine dritte GKF mit 5000 Zellen/cm<sup>2</sup>.

Alle Zellfraktionen (Tag1-Tag7=L1-L7) wurden nach Erreichen der ca. 80%-igen Konfluenz wie oben beschrieben jeweils in drei 25 cm<sup>2</sup> GKF<sub>n</sub> mit drei verschiedenen Aussaatdichten weiterkultiviert und so entstanden nach der ersten Passage (Passage 0) 21 Zellunterfraktionen, die zum Teil immer mit der selben Aussaatdichte bis zur sechsten Passage weiterkultiviert wurden.



**Abbildung 5: schematische Darstellung der Versuche 2 bis 4**

Ln = Zellfraktion n, ÜS = Überstand, S500 = Zellen der Aussaatdichte 500/cm<sup>2</sup>, S1000 = Zellen der Aussaatdichte 1000/cm<sup>2</sup>, S5000 = Zellen der Aussaatdichte 5000/cm<sup>2</sup>

**Versuch 5:**

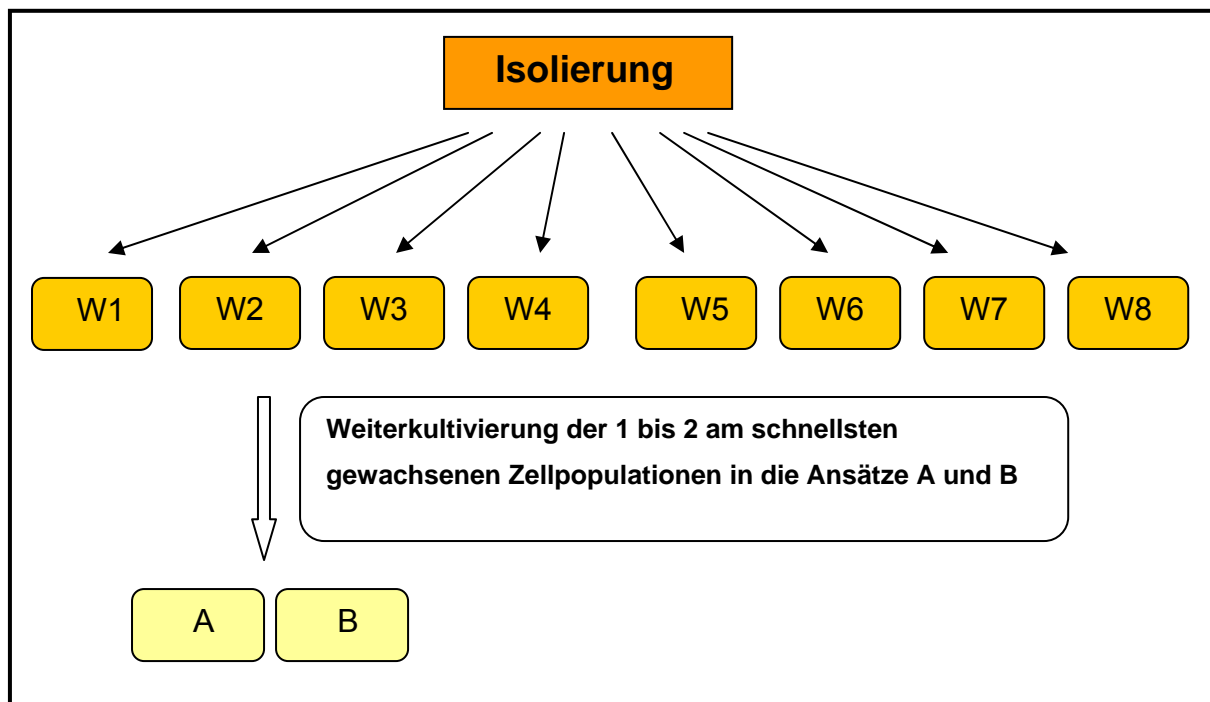
Die Zellen 5 verschiedener Spender wurden wie oben beschrieben isoliert. Die nicht adhärenierten Zellen wurden nach dem ersten Tag abgenommen und die adhärenierten Zellen vor der Trypsinierung zweimal mit PBS gewaschen.

Die gewonnenen Zellen wurden mit einer Dichte von 500 Zellen/cm<sup>2</sup> jeweils auf 8 Wells (W) einer 24-ger Platte ausgesät und dann kultiviert. Nach 10 bis 11 Tagen wurde nach den unten dargestellten Methoden trypsiniert und gezählt.

Für die weitere Kultivierung (Passage 1 = P1) wurden jeweils nur die 1 bis 2 am schnellsten gewachsenen Zellpopulation(en) ausgewählt.

Zur Verifizierung der erreichbaren Proliferationsrate wurden Aliquots (mit je 40000 Zellen) auf T80-Flaschen ausgesät und erneut 9-12 Tage kultiviert:

Aus der Zellzahlbestimmung wurden der Gesamte VF sowie der VF pro Tag ausgerechnet.

**Abbildung 6: schematische Darstellung des fünften Versuches**

Wn = Well n, A = Ansatz A, B = Ansatz B

### **3.2.3 Passagieren der Zellkulturen**

Die GKFn wurden nach Erreichen einer bestimmten Konfluenz jeweils wie folgendes weiterkultiviert (passagiert):

Medium wurde entfernt, Zellkulturen mit 2 ml PBS gewaschen, für 5 min. mit 2 ml 0,25% Trypsin-EDTA inkubiert und dadurch in Suspension gebracht. Leichte Klopfbewegungen verstärken den Ablösevorgang der Zellen. Die Trypsinreaktion wurde durch den Zusatz 3 ml Stopmedium (DMEM, 10%FKS, 1% Penicillin, 1% Streptomycin) gestoppt.

Zellen wurden gezählt. Medium wurde für 5 min bei 1400 n/min zentrifugiert, flüssiges Medium mittels 10-Pipette abgesaugt. Pellet dann in frische 3 ml Kulturmedium aufgenommen.

Die Zellen wurden bei jeder Passage mittels Cellcounter gezählt. Die Zahlen wurden dann für die Statistik dokumentiert.

### **3.2.4 Einfrieren der Zellkulturen**

Der Rest der Zellen wurde für spätere Anwendungen (erneute Kultivierungen und durchflusszytometrische Messungen) auf folgender Weise konserviert:

Die Zellsuspension wird dazu abzentrifugiert, flüssiges Medium wird entfernt, Pellet wird in 0,5 ml Einfriermedium (90% FKS+10% Dimethylsulfoxid) aufgenommen.

Die entstandene Suspension wird nun in ein beschriftetes Kryoröhrchen überführt.

Die Kryoröhrchen können dann bei -70 °C Monate bis Jahre lang eingefroren werden.

### **3.2.5 Auftau-Vorgang der konservierten Zellen**

Die tief gefrorenen Zellen, die schon bereits Gegenstand vorgegangener Studien waren, wurden bei -70 °C aufbewahrt.

Nach der Entnahme der Zellen aus dem Behälter werden diese direkt im 37 °C Wasserbad unter Schwenkbewegungen vorsichtig erwärmt, dabei sollte man insbesondere auf das Vermeiden einer Kontamination des Kryoröhrchen-Deckels der Zellen mit dem Wasserbad achten.

Anschließend wird die Aufgetaute Zellsuspension in ein steriles 13 ml-Röhrchen überführt und unter tropfenweiser Zugabe von Auftaumedium (DMEM + FKS im Verhältnis 1:1) weiter ständig geschwenkt. Zuletzt wird nun die Zellsuspension in eine GKF mit 7 ml Kulturmedium überführt und bis zum Erreichen der entsprechenden Konfluenz kultiviert.

### **3.2.6 Durchflusszytometrische Analyse**

#### **3.2.6.1 Markieren der Zellen mit fluorezenzmarkierten Antikörpern**

Jeweils 100 µl der vorher mit PBS gewaschenen, zentrifugierten und danach in eine Spezielle Lösung (99%PBS+1%FKS+0,1%NaN<sub>3</sub>) aufgenommene Zellsuspension werden auf Falcon-Röhrchen (Polystyren) zur FACScan- Analyse verteilt und mit jeweils 10 µl der entsprechenden monoklonalen Antikörperlösung versetzt (CD45 20 µl) und auf dem Vortex-Schüttler vorsichtig gemischt.

Dieser Ansatz muss dann auf Eis (etwa -4°C) im Dunkeln 30 min. lang inkubiert werden.

Vor der eigentlichen FACScan-Analyse müssen die Ansätze noch zweimal mit einer speziellen Lösung gewaschen werden (Ausnahme: zu den mit STRO-1 markierten Zellen muss vorher noch ein zweiter Antikörper -Goat Anti Mouse- gegeben werden und dann für weitere 30min. auf Eis inkubiert werden), damit ungebundene Antikörper aus dem Ansatz entfernt werden können und nicht zu falsch positiver Fluoreszenz führen. Das Sediment wird in 600 µl Aufnahmelösung (PBS zu 4% Formaldehyd 1:1) überführt und kann nun der FACScan-Messung unterzogen werden.

#### **3.2.6.2 Grundlagen der Durchflusszytometrie (Flow Cytometrie)**

Die Durchflusszytometrie ist ein inzwischen schon sehr etabliertes Verfahren zur Analyse von Einzelzellen in Suspensionen auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Das Prinzip der Durchflusszytometrie ist die simultane Messung verschiedener physikalischer und chemischer Zelleigenschaften auf Einzellebene.

Die zu analysierenden Zellen werden dabei einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt und ihre Fluoreszenz durch senkrecht zu diesem Strahl angebrachte

Photozellen gemessen. Weitere Detektoren zeichnen die Streuung des einfallenden Lichts selbst auf und liefern damit Informationen über die Größe der jeweiligen Zelle. Der größte Anteil der Lichtstreuung erfolgt in die Vorwärtsrichtung (d.h. entlang des einfallenden Lichtstrahls). Dieses Licht wird als *forward light scatter*/FSC bezeichnet und ist in erster Linie ein Maß für die Zellgröße.

Das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht hängt hauptsächlich von der Granularität der Zellen ab (*side scatter*/SSC).

Für die Messungen eingesetzt wurde ein FACScan-Gerät mit luftgekühlten Argonlasern, die Licht einer Wellenlänge von 488nm generieren. Zur Analyse diente PC Lysis software (Becton-Dickinson).

### **3.2.6.3 Einstellen der FSC- und SSC-Detektoren**

Anhand der jeweiligen Negativkontrolle wurde der Stellenwert (beim FSC) so gewählt, dass noch der Beginn der Rauschsignale des Debris sichtbar war. Die Spannung der Photoröhren wurde dann so eingestellt, dass die Zellen der Negativkontrolle in der Nähe des Koordinatenursprungs noch eine Gauss-ähnliche Verteilungskurve der Autofluoreszenz ergeben.

Für FL1 und FL2 wurde eine logarithmische Signalverstärkung gewählt (für SSC und FSC eine Lineare), so wie es für Immunfluoreszenzmessungen von Zelllinien empfohlen wird.

### **3.2.6.4 Analyse**

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden bei Zellsuspensionen verschiedener Adhärenzzeiten, Aussaatdichten und Passagen vorgenommen.

An jedem Messtag wurde ein Teil der zumessenden Zellen als Negativkontrolle bzw. als Referenz unmarkiert gemessen.

Pro Messereignis wurden sowohl bei den Kontrollen als bei den Antikörperkonjugierten Zellsuspensionen 5000-1000 Zellen registriert.

Die Daten wurden mit Hilfe des Textverarbeitungsprogrammes 'Microsoft Word, Version XP', den Tabellenverarbeitungsprogrammen Microsoft Excel, Version XP' und Power Point kalkuliert und grafisch aufbereitet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Isolierung und Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSCs)

#### 4.1.1 Anreicherung der hMSCs über den Ficoll-Gradienten

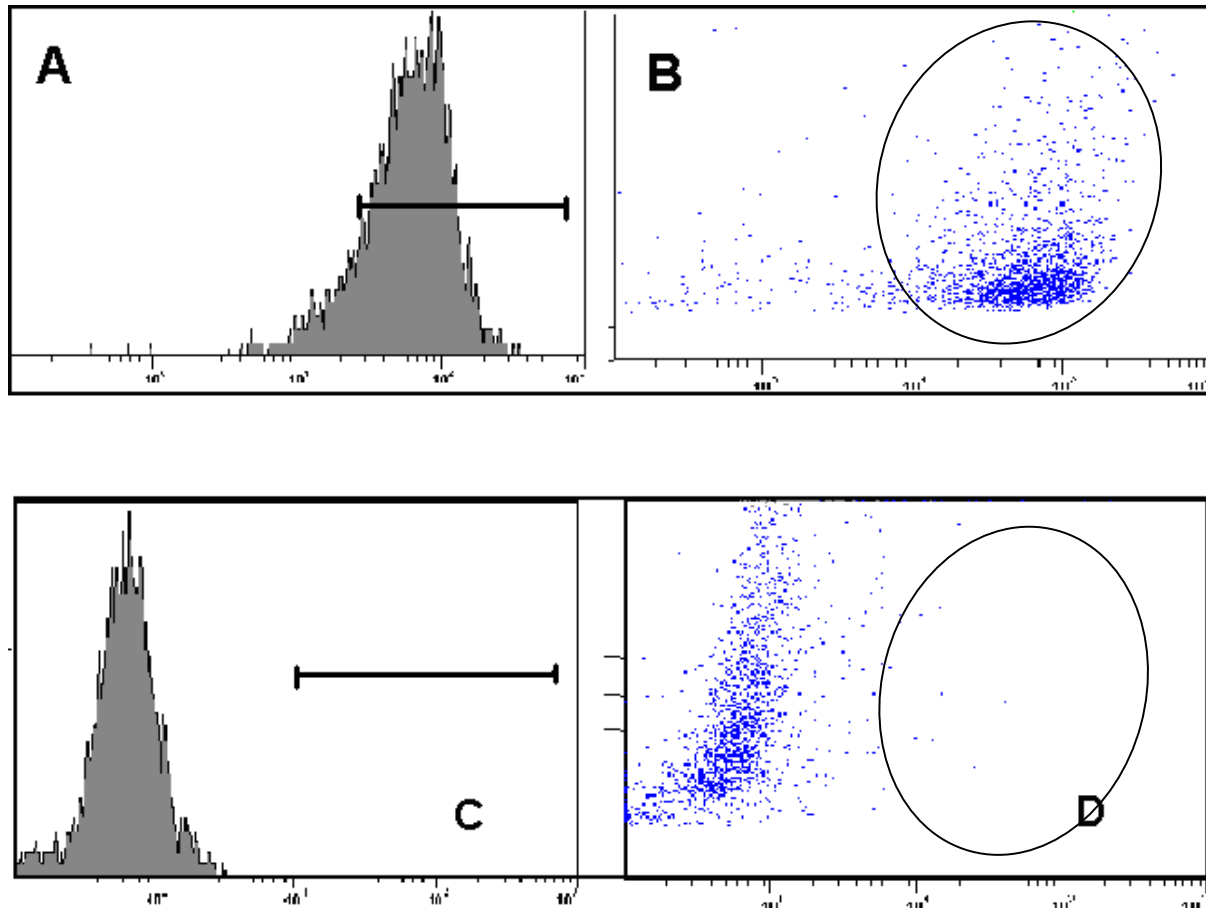
Die frisch aus dem Knochenmarkaspirat isolierten Zellen sehen im Lichtmikroskop rund aus und zeigen keine Ausläufer. Ein Teil von ihnen lässt eine schwach rosa Färbung erkennen. Wahrscheinlich handelt es sich um die Zellen mit hämatopoetischem Ursprung, die auch häufig Zellaggregate bilden. Zur Anreicherung der humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) wurden diese Zellen einer Zentrifugation über einen Ficoll-Gradienten (s. 3.2.1) unterworfen, um zunächst den größten Teil der Erythrozyten und Granulozyten zu entfernen. Die Ausbeute an mononuklearen Zellen variierte dabei erheblich unter den Spendern, so dass hinsichtlich des Alters und des Geschlechts keine Aussagen gemacht werden können. Innerhalb der mononukleären Zellfraktion ist der Anteil der undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen allerdings auch nach der Anreicherung immer noch sehr klein. Er wird von verschiedenen Autoren auf etwa 1:100.000 geschätzt (Caplan et al., 1994).

#### 4.1.2 Abtrennung der hämatopoetischen Zellen

Der große Überschuss an hämatopoetischen Zellen lässt sich sehr wirkungsvoll mithilfe einer einfachen und inzwischen weit verbreiteten Methode reduzieren. Wie im Methodenkapitel beschrieben adhären die Zellen mesenchymalen Ursprungs selektiv an Oberflächen üblicher Plastik-Zellkulturgefäße. So lässt sich der größte Teil der hämatopoetischen Zellen nach 24-72 Stunden Adhäsion allein durch gründliches Auswaschen entfernen. Der Erfolg der Anwendung dieser Technik wurde routinemäßig mithilfe durchflusszytometrischer Analysen kontrolliert.

Ein repräsentatives Ergebnis ist in der Abbildung 7 dargestellt. Es belegt die hochselektive Wirkung der Adhäsion der hMSCs an den Zellkulturflaschenboden. Für diese durchflusszytometrische Analyse wurden die hämatopoetischen Zellen mit Antikörpern fluoreszenzmarkiert, die gegen den für hämatopoetische Zellen spezifischen Oberflächenmarker CD45 gerichtet waren. Vor der Adhäsion (A+B)

weist die hohe Fluoreszenz-Signalstärke für CD45 auf dessen Präsenz hin, die nach gründlichem Auswaschen und Mediumwechsel in der adhärenierten Zellfraktion praktisch nicht mehr nachweisbar ist (C+D).



**Abbildung 7: CD 45-Markierung vor und nach dem ersten Mediumwechsel**

In A und C werden die Anzahl der Zellen (y-Achse) und die Fluoreszenzstärke (x-Achse) gegeneinander aufgetragen. Die Fluoreszenzstärke nimmt nach rechts zu.

In B und D werden die Parameter Forward Scatter „FS“ für die Größe (y-Achse) und Side Scatter „SS“ für die Granularität bzw. Rauigkeit der Oberfläche (x-Achse) gegeneinander aufgetragen.

Gezeigt wird die starke Präsenz der CD 45-positiven hämatopoetischen Zellen in der frisch angereicherten Fraktion (A und B), 2 bis 3 Tage nach der Isolierung bzw. nach dem ersten Mediumwechsel (C und D) sind diese Zellen deutlich weniger präsent.



### 4.1.3 Zellmorphologie von Primärzellen

Die adhärenenten Zellen teilen sich nach Resuspendierung in Wachstumsmedium und erneuter Adhärenierung relativ schnell wobei sie mehrheitlich bald eine fibroblastoide Form annehmen. Innerhalb von 2-4 Wochen bildet sich ein konfluenter Zellrasen, der zum größten Teil aus fibroblastoiden Zellen mit langen Ausläufern besteht. Daneben tauchen während der Proliferation mit der Zeit jedoch auch immer Zellen mit deutlich anderer Morphologie auf. Im Vergleich zu den kleinen spindelförmigen Zellen (schwarzer Pfeil in der Abbildung 8) erscheinen diese im Lichtmikroskop größer und flächiger (gelber Pfeil). Dabei handelt es sich offensichtlich um mesenchymale Zellen, die auf dem Wege der Differenzierung in die verschiedenen Zielzellen wie Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten oder Myozyten unterschiedlich weit fortgeschritten sind. Da sich diese partiell differenzierten Zellen in geringerem Maße an der Vermehrung der Population beteiligen, sinkt der statistisch bestimmte Durchschnittswert der Proliferationsrate. Umgekehrt erkennt man an einem Absinken der Proliferationsrate ein wachsendes Ausmaß an spontaner Differenzierung. Die Folge ist weiterhin eine Zunahme der Heterogenität der Zellpopulation.



**Abbildung 8: Zellmorphologie von Zellen nach dem ersten Mediumwechsel (Lichtmikroskopische Aufnahme, 10x Vergrößerung)**

Zu sehen sind zwei Zellarten, die eine länglich und klein (schwarzer Pfeil), die andere größer und flächiger (gelber Pfeil).

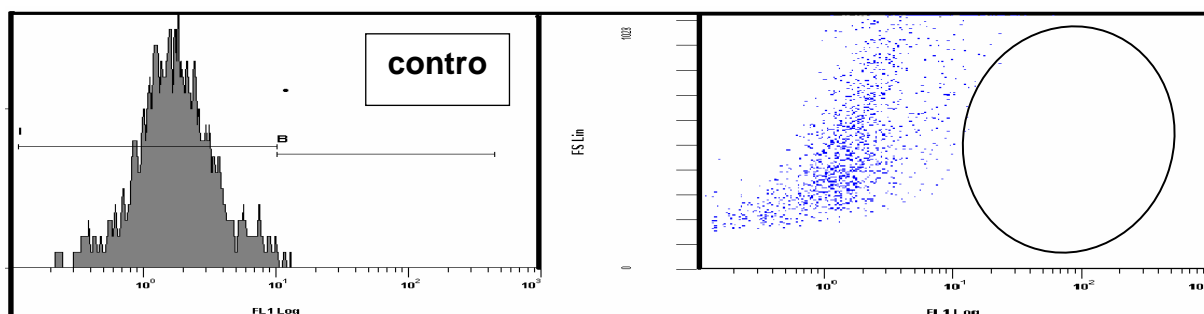
#### 4.1.4 Die Heterogenität der kultivierten Zellpopulationen

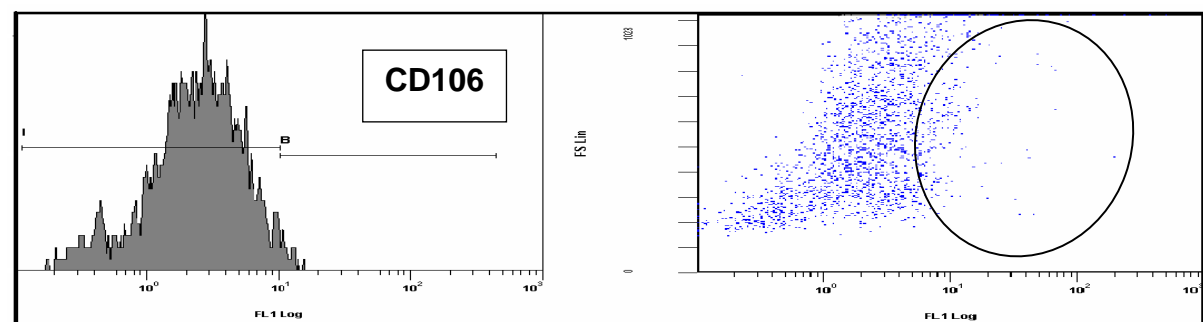
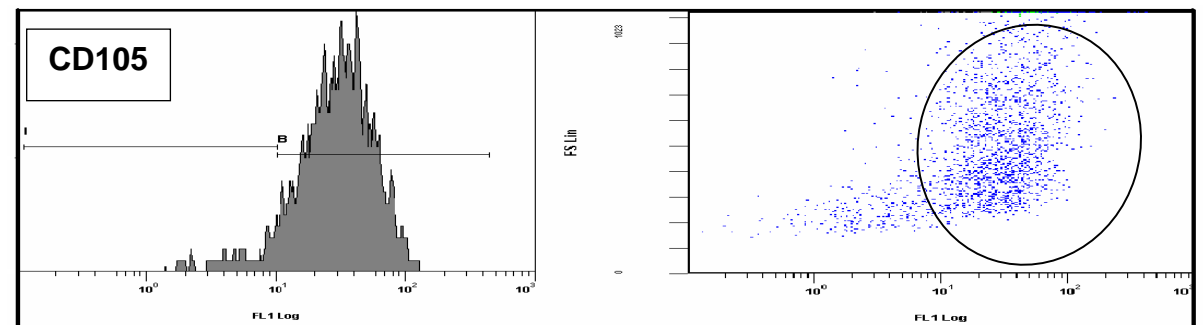
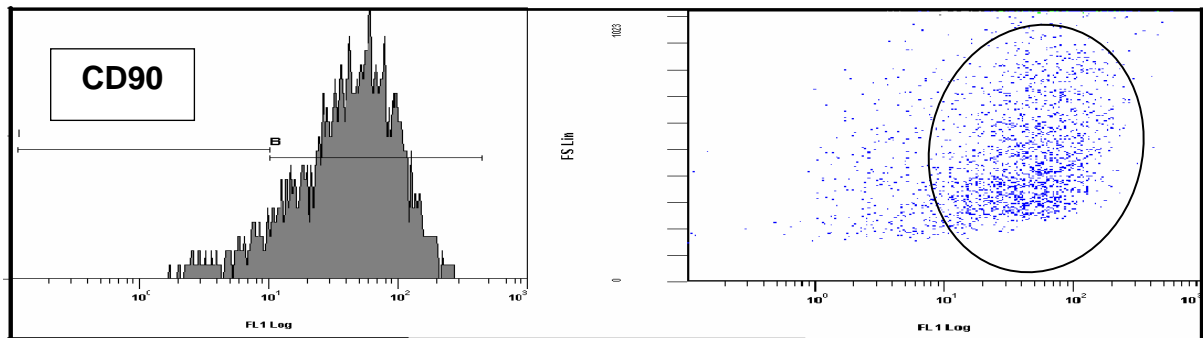
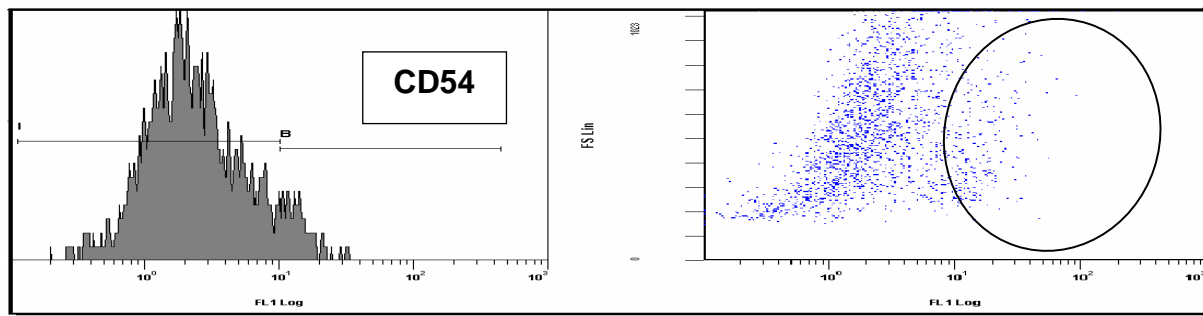
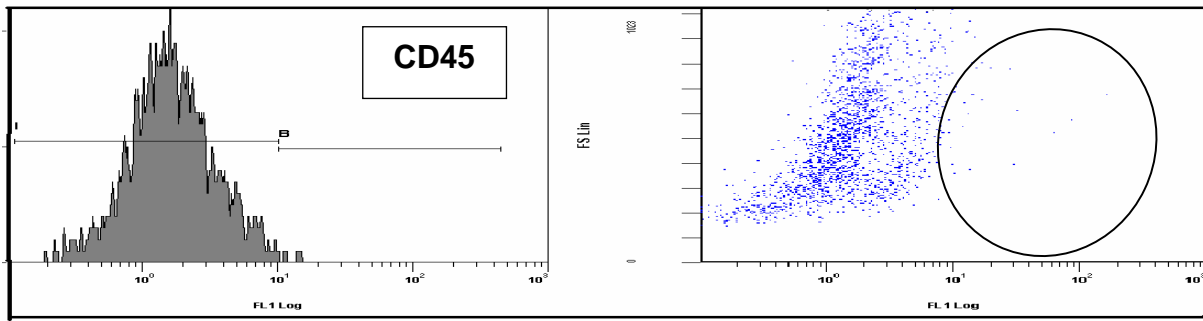
Die zu erwartende Heterogenität der Population der adhärenz Zellen lässt sich schon nach der ersten Passage direkt mithilfe der Durchflusszytometrie nachweisen. Dazu werden fluoreszenzmarkierte Antikörper eingesetzt, die spezifisch gegen Oberflächenmarker der verschiedenen Zelltypen der mesenchymalen Zellfraktion gerichtet sind.

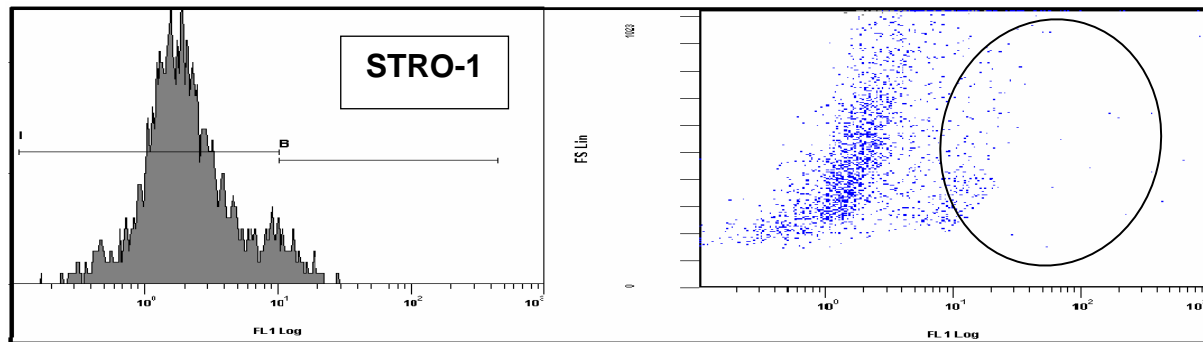
Verwendet wurden sowohl negative wie positive Oberflächenmarker, das heißt solche, die von mesenchymalen Stammzellen nicht exprimiert werden wie CD45, als auch andere wie CD54, CD90, CD105, CD106 und STRO-1, die in unterschiedlichem Maße exprimiert werden.

Als positive immunzytochemische Marker für multipotente mesenchymale Stammzellen wurden in dieser Arbeit zwei der in der Literatur beschriebenen Standardmarker, CD90 und CD105 eingesetzt (*Haynesworth et al., 1992a*). Daneben dienten STRO-1 als Marker für osteogene und CD106 als Marker für chondrogene Progenitor-Zellen (*Dennis et al., 2002; Gronthos et al., 1994*) sowie der extrazelluläre-Matrix-Rezeptoren-Marker CD54, der auch von hMSCs exprimiert wird (*Pittenger et al., 1999; Pittenger et al., 2001*).

Die folgende Abbildung zeigt repräsentativ das Resultat einer durchflusszytometrischen Analyse in Proliferationsmedium kultivierter humaner mesenchymaler Stammzellen der ersten Passage.







### Abbildung 9: Durchflusszytometrie von Zellen der ersten Passage

In der linken Reihe werden die Anzahl der Zellen (y-Achse) und die Fluoreszenzstärke (x-Achse) gegeneinander aufgetragen.

In der rechten Reihe wird der Parameter Forward Scatter „FS“ für die Größe (y-Achse) und Side Scatter „SS“ für die Granularität bzw. Rauigkeit der Oberfläche (x-Achse) gegeneinander aufgetragen.

Gezeigt wird exemplarisch das Resultat einer Durchflußzytometrie-Analyse von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs), die für eine Passage in Proliferationsmedium kultiviert wurden. In diesem repräsentativen Beispiel zeigt sich, dass der für hämatopoetische Zellen positive Marker CD45 kaum exprimiert wurde. Neben der starken Präsenz der CD 90- und CD 105-positiven undifferenzierten hMSCs werden auch chondrogene CD 106-positive Vorläuferzellen und osteogene STRO 1-positive Progenitorzellen gefunden. Somit lässt sich die Heterogenität bzw. das Vorhandensein von bereits (vor)differenzierten Zellen bestätigen.

Man erkennt, dass mit dem für hematopoetische Zellen spezifischen Marker CD45 praktisch ebenso wenige Zellen identifiziert wurden wie mit der Kontrolle ohne primären Antikörper. Bei den positiven Markern sieht es sehr unterschiedlich aus, was für eine große Heterogenität spricht. Während viele Zellen auf die Antikörper mit den Markern CD90 und CD105 reagieren, sind es schon bedeutend weniger, die von den Antikörpern erkannt werden, die gegen die Marker CD54, STRO-1 und CD106 gerichtet sind. Dieses Einzelergebnis entspricht dabei in etwa der Verteilung wie man sie während der Passagierung der adhärenierten Zellen beobachtet.

Die folgende Tabelle (Tabelle 7) enthält eine statistische Auswertung aller Analysen der in dieser Arbeit verwendeten Zellpopulationen. Die auf die untersuchten

Oberflächenmarker entfallenden prozentualen Anteile stimmen recht gut mit den Messergebnissen der Analyse in Abbildung 9 überein.

Tabelle 7: Durchschnittswerte der prozentualen Anteile der markierten Zellpopulationen

Oberflächen-Marker	CD45	CD54	CD90	CD105	CD106	STRO-1
Anteil der markierten Zellen (%)	3,3	29,8	68,1	70,0	8,0	14,1

Neben CD 90- und CD 105-positiven undifferenzierten MSCs werden auch chondrogene, CD 106-positive Vorläuferzellen und osteogene STRO 1-positive Progenitorzellen gefunden.

Somit lässt sich die Heterogenität bzw. das Vorhandensein von bereits (vor)differenzierten Zellen bestätigen.

#### 4.2 Einfluss der Adhärungsdauer und Aussaatdichte auf die Proliferationsrate der hMSCs

Die Abtrennung der hämatopoetischen Zellen mit Hilfe der Methode der Adhärung allein liefert noch keine homogene Population undifferenzierter mesenchymaler Zellen. Wie die durchflusszytometrischen Analysen gezeigt haben, erhält man nach Passagierung stets eine Mischung verschiedener Zellpopulationen, deren Interaktionen die Tendenz zur spontanen, unkontrollierten Differenzierung zu verschiedenen mesenchymalen Zelltypen möglicherweise noch weiter fördert. Da es das Ziel dieser Arbeit war, Kulturbedingungen zu finden, die eine für das *tissue engineering* unerwünschte spontane Differenzierung in ausreichendem Maße verhindern, wurde als erstes versucht, zu klären,

- in welchem Ausmaß Zell-Zell-Kontakte oder parakrine Faktoren für die unkontrollierte Differenzierung während der Proliferation mitverantwortlich sind und zweitens:

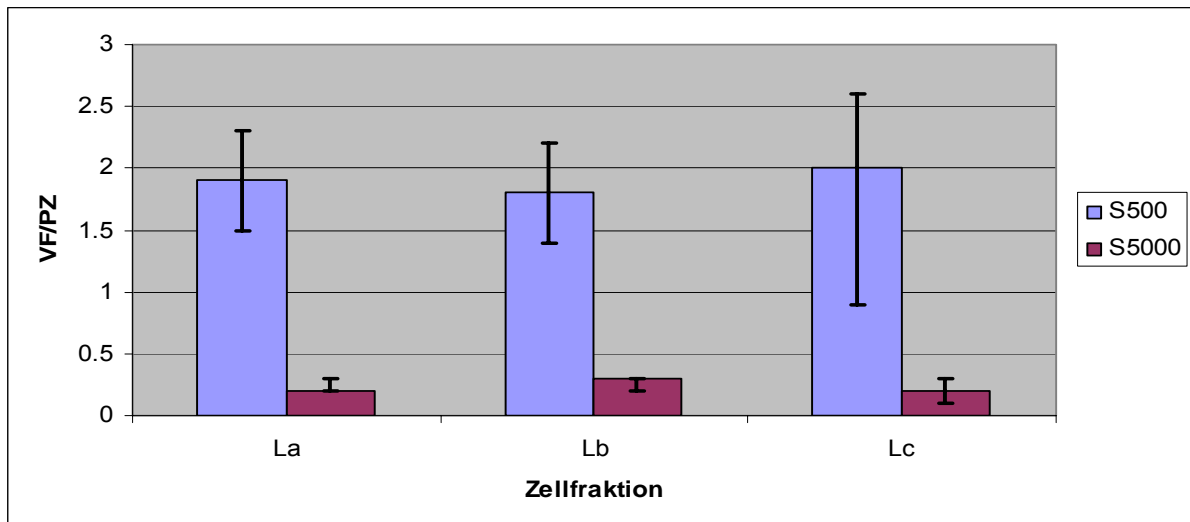
- ob die hMSCs möglicherweise in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten an der Plastikoberfläche der Kulturgefäße adhären.

Ausgehend von der Annahme einer inversen Beziehung zwischen Proliferationsrate und Differenzierungstendenz bei den hMSCs wurde als Maß für die Differenzierungstendenz aus praktischen Gründen die jeweils beobachtete *in-vitro*-Proliferationsrate verwendet. Zur Beantwortung der beiden oben genannten Fragen wurde dazu in verschiedenen Experimenten der Einfluss einer stark verminderten Aussaatdichte sowie der Adhärenzungsdauer auf die Proliferationsrate nebeneinander untersucht.

Im ersten Versuch wurde frisch angereicherten Stammzellen unterschiedlich lange Gelegenheit zur Adhärenzung an der Plastikoberfläche gegeben (1, 3 und 5 Tage). Die so entstandenen Zellfraktionen (La, Lb und Lc) wurden jeweils zusätzlich mit den Aussaatdichten von 5000 und 500 Zellen/cm<sup>2</sup> kultiviert und über 5 Passagen unter diesen Bedingungen proliferiert.

Wie in der Abbildung 10 wiedergegeben ergaben die Analysen der erreichten Zellzahlen, dass die Proliferationsraten bei allen Ansätzen mit der sehr niedrigen Aussaatdichte von 500/cm<sup>2</sup> um ein mehrfaches höher lagen als bei denen mit der Aussaatdichte 5000/cm<sup>2</sup>. So vermehrten sich die Zellpopulationen der Aussaatdichte 500/cm<sup>2</sup> durchschnittlich ca. 2-fach pro Tag. Hingegen lag der Vermehrungsfaktor der Zellansätze mit der Aussaatdichte 5000/cm<sup>2</sup> durchschnittlich nur bei ca. 0,2-fach pro Tag.

Die mit unterschiedlicher Adhärenzungsdauer gewonnenen Zellfraktionen La, Lb und Lc wiesen hingegen hinsichtlich der Vermehrungsrate keine sichtbaren Unterschiede auf. Damit scheint die Variierung der Adhärenzungsdauer keine Möglichkeit zur Stimulierung der Proliferation humaner mesenchymaler Stammzellen zu bieten.



**Abbildung 10: Einfluss von Adhärungsdauer und Aussaadichte auf die Proliferationsrate der hMSCs**

Dem VF/PZ (y-Achse) werden die Zellfraktionen (x-Achse) gegenübergestellt. Die Daten stammen aus Mittelwerten der ersten 4 Passagen (P1 bis P4).

Die Vermehrungsrate der Zellen der Aussaadichte 500/cm<sup>2</sup> lagen deutlich höher als die der Aussaadichte 5000/cm<sup>2</sup>. Hinsichtlich unterschiedlicher Adhärungsdauer kann zwischen den Zellfraktionen keine relevante Aussage gemacht werden.

Ln = Zellfraktion n, VF/PZ = Vermehrungsrate pro Passagezeit bzw. Pro Tag, S500 = Zellen der Aussaadichte 500/cm<sup>2</sup>, S5000 = Zellen der Aussaadichte 5000/cm<sup>2</sup>.

### 4.3 Einfluss von Adhärungszeitpunkt und Aussaadichte auf Proliferationsrate und Morphologie der hMSCs

#### 4.3.1 Proliferationsrate

Der erste Versuch legte bereits nahe, dass die Variierung der Adhärungsdauer anscheinend nicht zur Beeinflussung der Proliferationsrate taugt. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass der Versuchsansatz möglicherweise nicht geeignet ist, feine Unterschiede festzustellen, wurde die experimentelle Messung mit einer kleinen Variation wiederholt. Wurde den Zellen bisher ein unterschiedlicher Zeitraum zwischen ein bis fünf Tagen Gelegenheit zur Adhärung an der Plastikoberfläche

gegeben, wurde die Dauer der Adhärenz in den folgenden Versuchen Nr. 2 bis 4 mit 24h konstant gehalten, aber der Zeitpunkt der Zellernte variiert. Damit konnten nun zu verschiedenen Zeitpunkten Zellfraktionen gewonnen werden, die vorzugsweise Zellen mit definierter Adhärenzzeit enthielten.

Praktisch wurde nach folgendem Schema verfahren: Diejenigen Zellen, die vom Tag n-1 bis zum Tag n nach der Isolierung adhären, werden als Fraktion „Ln“ bezeichnet. Diejenigen Zellen, die nach 24h Adhärenz noch nicht adhären (Überstand), wurden jeweils täglich eine Woche lang auf je eine frische Zellkulturflasche zur Adhärenz gegeben. Die jeweils nach 24h adhären Zellen wurden vom Kulturmedium befreit, gewaschen und bis zum Erreichen einer Konfluenz von etwa 80% weiter kultiviert. Trypsinierung und Neuaussaat erfolgten wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben.

Um gleichzeitig den im vorangegangenen Versuch erhobenen Befund des starken Einflusses der Aussaatdichte auf die Proliferationsrate zu verifizieren, wurden alle Ansätze zusätzlich mit diesmal drei unterschiedlichen Aussaatdichten (500 Zellen/cm<sup>2</sup>, 1000 Zellen/cm<sup>2</sup> und 5000 Zellen/cm<sup>2</sup>) aber sonst gleichen Bedingungen gefahren. Um darüberhinaus festzustellen, wie nachhaltig die zu beobachtenden Effekte möglicherweise sind, wurden die Zellzahlen der Fraktionen L1 bis L7 diesmal über sechs Passagen bestimmt. Im Folgenden sind die Ergebnisse für die Passagen 1, 3 und 6 separat dokumentiert.

### **Zellfraktionen der Passage 1**

Die Ergebnisse der Messungen der Proliferationsraten in Abhängigkeit von der Aussaatdichte und dem Adhärenzzeitpunkt sind in der Abbildung 11 dargestellt.

Sie bestätigen die Beobachtungen des vorhergehenden Versuchs: In allen sieben Zellfraktionen (L1 bis L7) der ersten Passage werden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Auch hinsichtlich der Abhängigkeit der Proliferationsrate von der Aussaatdichte werden die früheren Beobachtungen bestätigt: Mit sinkender Aussaatdichte steigt die Proliferationsrate deutlich an. Die Zellen vermehrten sich bei der Aussaatdichte 500 im gegebenen Versuchszeitraum rechnerisch bis zu ca. 5-fach pro Tag, bei der Aussaatdichte 1000 noch bis zu ca. 2-fach pro Tag und bei der Aussaatdichte 5000 hingegen nur noch bis zu ca. 0,5-fach pro Tag.



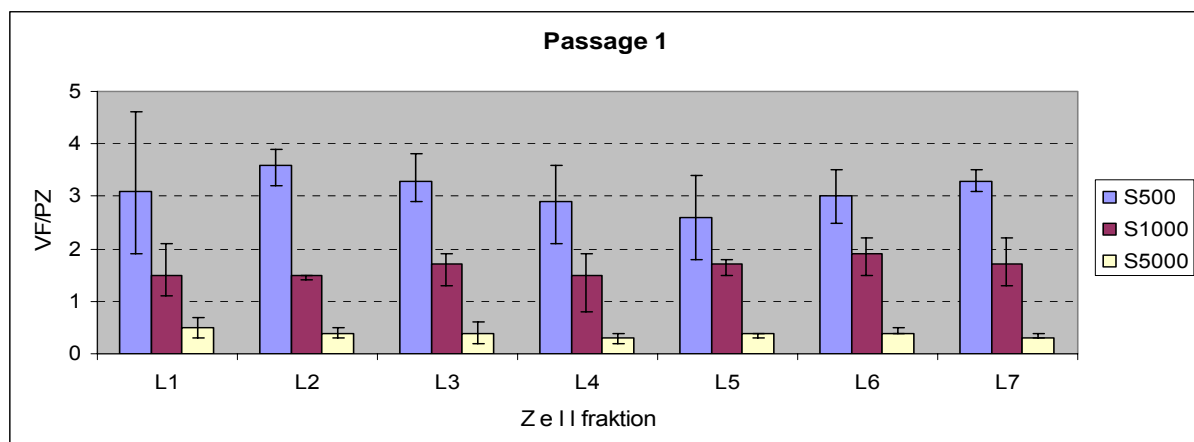
### Zellfraktionen der Passage 3

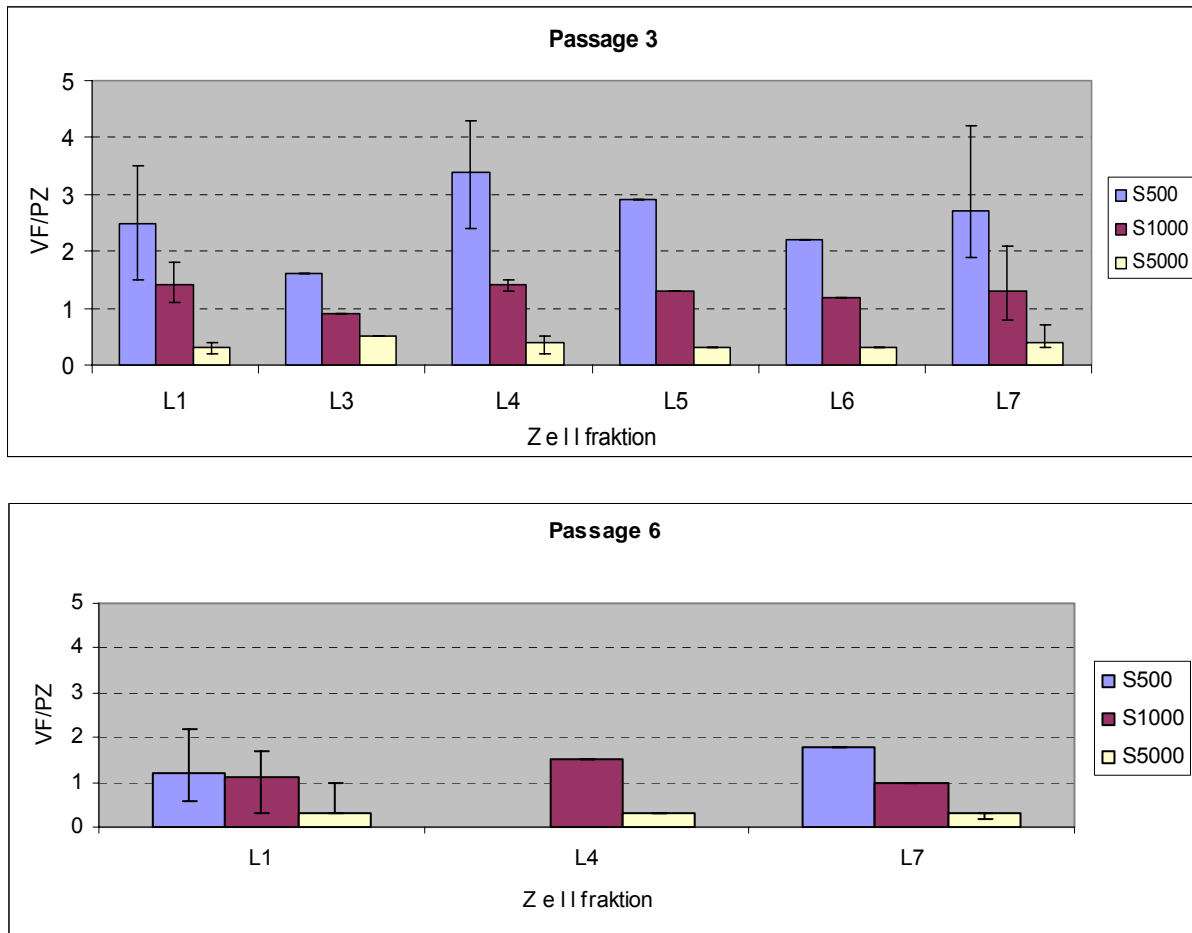
Die Ergebnisse der Messungen der Proliferationsraten in Abhängigkeit von der Adhärenzzeit und der Aussaatdichte ähneln sehr stark den Befunden nach der ersten Passage: Aus den Daten in Abbildung 11 geht hervor, dass die unterschiedlichen Adhärenzzeiten wiederum keinen eindeutigen Einfluss auf die Proliferationsrate auszuüben scheinen. Bestätigt wurde auch die starke Abhängigkeit der Proliferationsrate von der Aussaatdichte bei allen Zellfraktionen L1 bis L7 nach der Passage 3. Mit sinkender Aussaatdichte stieg sie bis zu etwa 5-fach an.

### Zellfraktionen der Passage 6

Nur die Zellfraktionen L1, L4 und L7 wurden bis zur sechsten Passage kultiviert. Dabei wurde jeweils nach Erreichen einer Konfluenz von etwa 80% neu passagiert. Vorherrschender Eindruck bei der Betrachtung der Ergebnisse nach der Passage 6 war ein deutlicher Abfall der Proliferationsrate bei allen drei Zellfraktionen im Vergleich zu den Beobachtungen nach der ersten und dritten Passage. Dabei scheint die Abnahme bei den Zellen mit der niedrigsten Aussaatdichte (500/cm<sup>2</sup>) relativ am stärksten zu sein, hier sank der Vermehrungsfaktor auf maximal 2-fach.

Insgesamt deutet sich jedoch auch hier die bereits vorher beobachtete inverse Korrelation zwischen Proliferationsrate und Aussaatdichte wieder an, wenn auch statistisch nicht abgesichert. Auch hinsichtlich des Einflusses der Adhärenzzeit auf die Proliferationsrate werden keine Veränderungen festgestellt.





**Abbildung 11: Proliferationsraten der Zellfraktionen L1 bis L7 in der ersten, dritten und sechsten Passage**

Passage 1:

Die Proliferationsraten lagen bei allen Ansätzen mit niedrigeren Aussaatdichten deutlich höher als bei höheren (die Zellen der Aussaatdichte S500 vermehrten sich durchschnittlich bis zu ca. 5fach pro Tag, die der Aussaatdichte 1000 bis zu ca. 2fach pro Tag und die Zellen der Aussaatdichte 5000 bis zu ca. 0,5fach pro Tag).

Zwischen den Zellpopulationen, die am 1. Tag, 2. Tag, .... oder am 7. Tag der Kultur adhärirten konnte kein deutlicher Unterschied wahrgenommen werden.

Passage 3:

Die Proliferationsraten lagen bei allen Ansätzen mit niedrigeren Aussaatdichten deutlich höher als bei höheren (die Zellen der Aussaatdichte S500 vermehrten sich durchschnittliche bis zu ca. 5fach pro Tag, die der Aussaatdichte 1000 bis zu ca. 2fach pro Tag und die Zellen der Aussaatdichte 5000 bis zu ca. 0,5fach pro Tag).

Hinsichtlich unterschiedlicher Adhärenzzeiten konnte auch in der 3. Passage kein deutlicher Unterschied wahrgenommen werden.

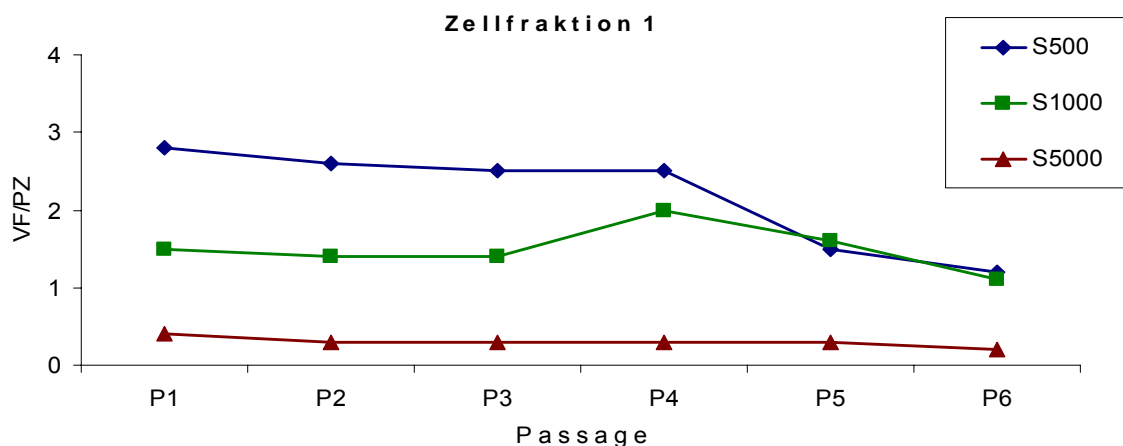
#### Passage 6:

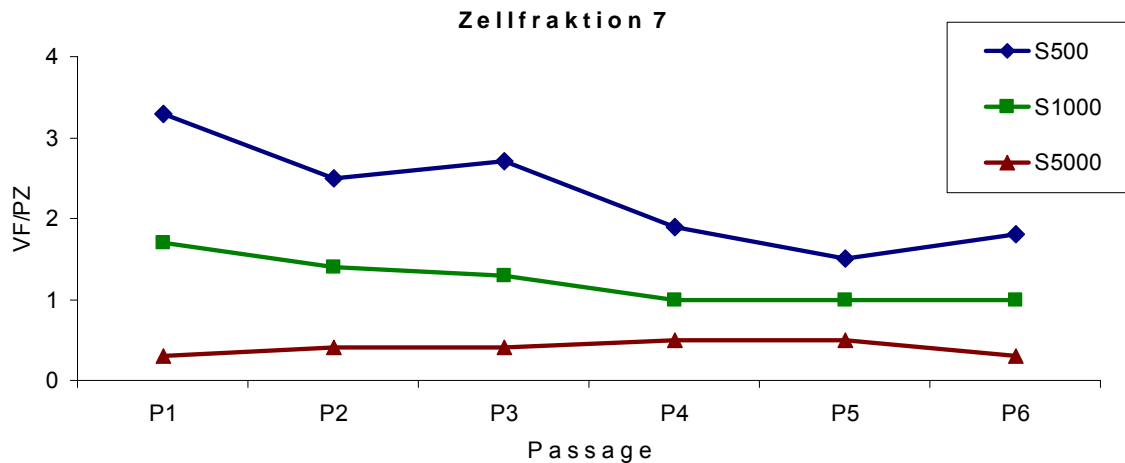
Im Vergleich zu Passage 1 und Passage 3 war die Proliferationsrate in der Passage 6 bei allen weiter kultivierten Zellfraktionen (L1, L3 und L7) deutlich niedriger, insbesondere bei den Zellen der Aussaatdichte 500/cm<sup>2</sup> konnte eine starke Abnahme der Zellzahlen festgestellt werden. Einige Zellfraktionen erreichten die 6. Passage nicht.

$L_n$  = Zellfraktion  $n$  = Zellen die am Tag  $n$  adhärten,  $VF/PZ$  = Vermehrungsfaktor pro Passagezeit bzw. pro Tag,  $S_{500}$  = Zellen der Aussaatdichte 500/cm<sup>2</sup>,  $S_{1000}$  = Zellen der Aussaatdichte 1000/cm<sup>2</sup>,  $S_{5000}$  = Zellen der Aussaatdichte 5000/cm<sup>2</sup>.

Als wichtigstes Ergebnis der Messungen nach der sechsten Passage muss die begrenzte Nachhaltigkeit des Einflusses der Aussaatdichte auf die Proliferationsrate festgehalten werden. Konnte der Effekt in den ersten 3-4 Passagen noch deutlich beobachtet werden, nahm er in der fünften und sechsten Passage sichtbar ab.

Geht man davon aus, dass die Adhärenzzeit keinen relevanten Einfluss auf die Proliferationsrate hat, kann man die Mittelwerte der Zellfraktionen L1 bis L7 zum Vergleich der Ergebnisse als Abhängige der Passagenzahl heranziehen. In der Abbildung 12 ergibt sich für die Aussaatdichten 500 und 1000/cm<sup>2</sup> bereits eine deutliche Abnahme der Proliferationsrate nach der vierten Passage.





**Abbildung 12: Darstellung der Proliferationsrate in Abhängigkeit der Passagezahl**

Sowohl im Diagramm der Zellfraktion 1 als auch der Zellfraktion 7 wird die begrenzte Nachhaltigkeit des Einflusses der Aussaatdichte auf die Proliferationsrate festgehalten. Konnte der Effekt in den ersten 3-4 Passagen noch deutlich beobachtet werden, nahm er in der fünften und sechsten Passage ab. Dieses Phänomen betraf vor allem Zellen der Aussaatdichten 500 und 1000. Dargestellt sind die Mittelwerte.

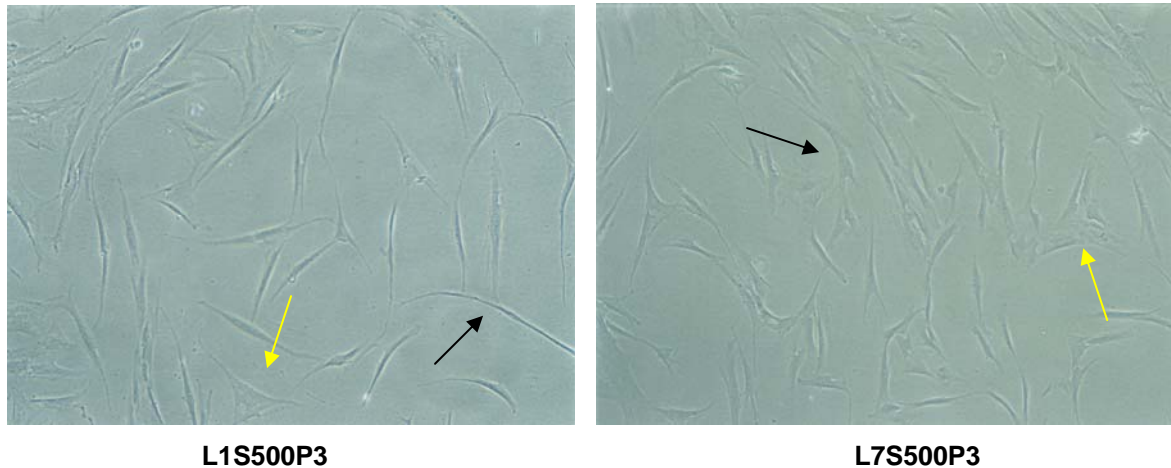
Zellfraktion n = Zellen die am Tag n adhärten, VF/PZ = Vermehrungsfaktor pro Passagezeit bzw. pro Tag, S500 = Zellen der Aussaatdichte 500/cm<sup>2</sup>, S1000 = Zellen der Aussaatdichte 1000/cm<sup>2</sup>, S5000 = Zellen der Aussaatdichte 5000/cm<sup>2</sup>, P n = Passage n.

#### 4.3.2 Zellmorphologie

Wie bereits unter 4.1.3 erwähnt wurde, ließen sich im Verlauf der Kultivierung der Zellen zwei verschiedene Zellarten morphologisch voneinander unterscheiden, der eine Zelltyp klein und spindelförmig, der andere größer und flächiger. Innerhalb von 2-4 Wochen bildete sich ein konfluenter Zellrasen, der zum größten Teil aus schmalen Zellen mit langen Ausläufern bestand.

Die beiden oben genannten Arten von Zellen ließen sich in allen Zellfraktionen bzw. in Zellkulturen verschiedener Adhärungszeiten beobachten. In der Abbildung 13

sind die lichtmikroskopischen Bilder zweier Zellpopulationen gegenübergestellt, die sich nur hinsichtlich der Adhärungszeiten unterscheiden.



**Abbildung 13: Zellmorphologie von Zellkulturen unterschiedler Adhärungszeiten**

Als Beispiel sind dargestellt im ersten Bild von links die Zellen der Aussaatdichte 500 (S500) der Zellfraktion1 (= L1 = Zellen die am ersten Tag nach der Zellisolierung adhärerten) in der 3. Passage (P3). Im zweiten Bild sind die Zellen der Aussaatdichte 500 (S500) der 7. Zellfraktion (= L7 = Zellen, die am siebten Tag nach der Zellisolierung adhärerten) in der 3. Passage (P3).

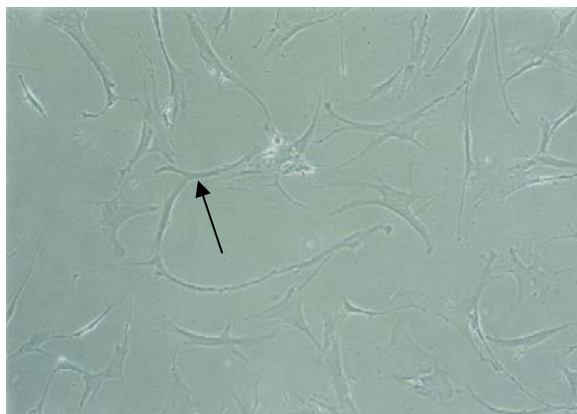
In beiden Zellpopulationen sind teilungsaktive Zellen mit langen Ausläufern (schwarzer Pfeil) aber auch flache teilungsärmere Zellen mit kürzeren Ausläufern (gelber Pfeil) zu sehen.

Hinweise auf eine Veränderung der Zellen in Abhängigkeit von Aussaatdichte und Passagenzahl haben sich auch aus dem täglichen Umgang mit den Zellen ergeben. So wurde unter anderem beobachtet, dass sich Zellen früherer Passagen leichter durch Trypsinierung vom Gefäßboden ablösen ließen als solche der späteren Passagen. Bis zur Passage 4 lösten sich die Zellen in der Regel bereits innerhalb von 30-90 Sekunden nach Trypsingabe vollständig ab. Hingegen dauerte es bei den Zellen der späteren Passagen bis zu 3 Minuten, wobei noch ein zusätzliches Klopfen der Flaschen mit dem Handteller erforderlich war, um die zu diesem Zeitpunkt noch an der Oberfläche haftenden Zellen vollständig abzulösen.

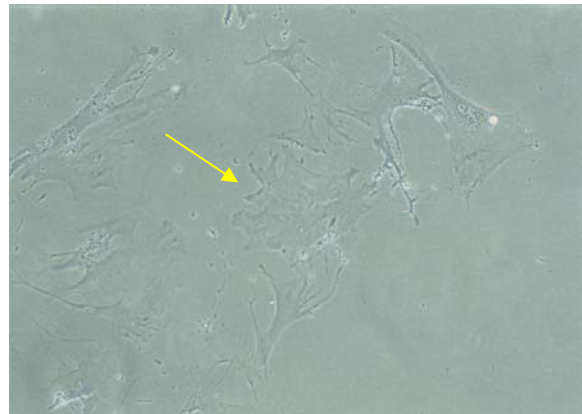
Eine mikroskopische Kontrolle der noch nach drei Minuten Trypsinierung besonders hartnäckig am Kulturflaschenboden adhärierenden Zellen konnte diese der Fraktion der großflächigen Zellen zuordnen. Der Anteil dieser Zellen war bei Zellkulturen der späteren Passagen deutlich größer als bei denen der früheren Passagen und bei den Zellkulturen mit höheren Aussaatdichten größer als bei denen mit niedrigeren Aussaatdichten. Die Probleme mit der Ablösung der Zellen waren der Anlass, die Zellmorphologie in Abhängigkeit von Aussaatdichte und Passagenzahl systematisch zu untersuchen.

Dabei wurde die Vermutung bestätigt, dass der Anteil der großflächigen Zellen mit der Aussaatdichte und Passagenzahl zunahm. Diese Beobachtung unterstützte die anfangs erwähnte Annahme, dass zwischen Proliferationsrate und dem Anteil partiell differenzierter Zellen eine inverse Korrelation besteht.

In der Abbildung 14 sind die lichtmikroskopischen Bilder zweier Zellpopulationen gegenübergestellt, die sich nur hinsichtlich der Passagenzahl unterscheiden.



L1P3S5000



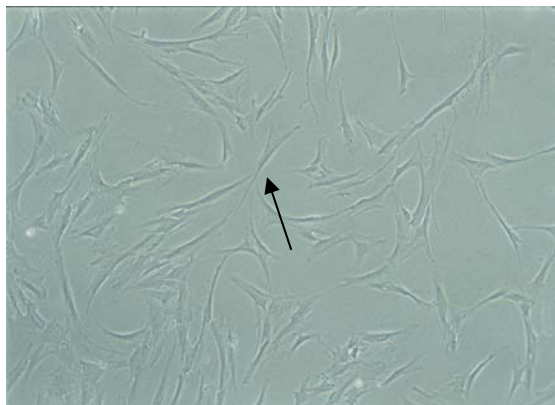
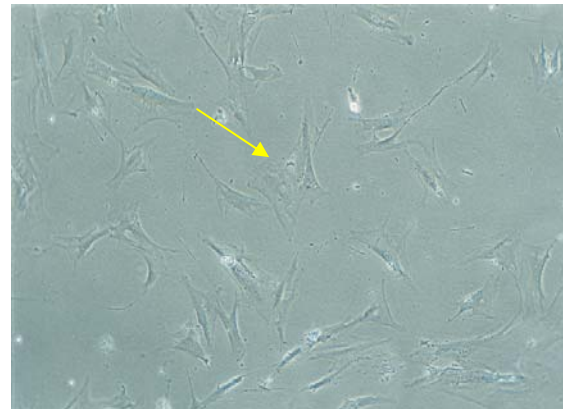
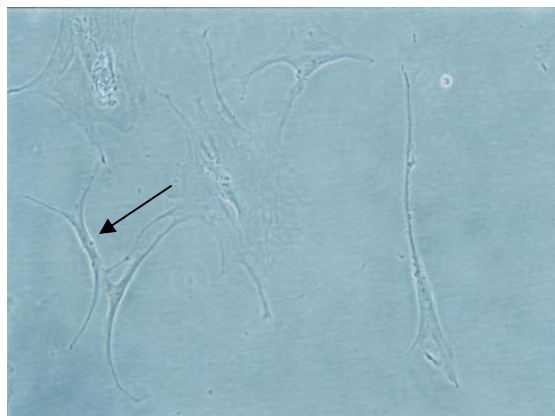
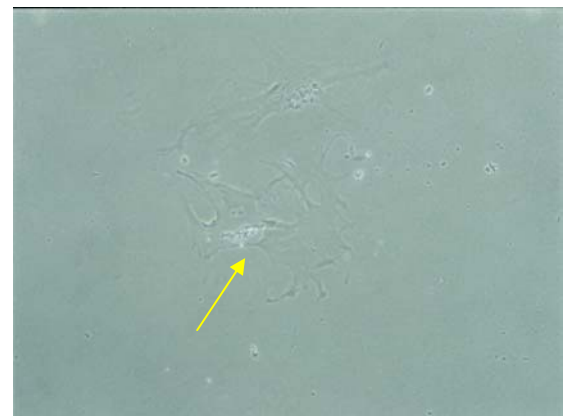
L1P6S5000

**Abbildung 14: Zellmorphologie von Zellkulturen unterschiedlicher Passagen**

Als Beispiel sind dargestellt im ersten Bild von links die Zellen der Aussaatdichte 5000 (S5000) der Zellfraktion 1 (= L1 = Zellen die am ersten Tag nach der Zellisolierung adhärerten) in der 3. Passage (P3). Im zweiten Bild sind die Zellen derselben Zellfraktion und Aussaatdichte in der 6. Passage (P6).

Im ersten Bild dominieren schmalere teilungsaktivere Zellen mit längeren Ausläufern (schwarzer Pfeil), im zweiten Bild flache, breite teilungsarme Zellen mit kürzeren Ausläufern (gelber Pfeil).

Die Abbildung 15 demonstriert den Einfluss der Aussaatdichte auf den Anteil großflächiger Zellen. Er ist bei niedrigerer Passage noch sehr deutlich zu erkennen (L2P3S500 vs. L2P3S5000) während er undeutlicher wird, wenn Zellen der sechsten Passage verglichen werden (L2P6S500 vs. L2P6S5000). Hier wird auch bei der niedrigen Aussaatdichte schon ein hoher Anteil der großen Zellen beobachtet.

**L2P3S500****L2P3S5000****L2P6S500****L2P6S5000**

**Abbildung 15: Zellmorphologie von Zellkulturen unterschiedlicher Aussaatdichten**

Als Beispiel sind dargestellt in der ersten senkrechten Reihe von links die Zellen der Aussaatdichte 500 (S500) der 2. Zellfraktion (= L2 = Zellen die am zweiten Tag nach der Zellisolierung adhärirten) in zwei verschiedenen Passagen (P3 und P6). In der zweiten senkrechten Reihe sind die Zellen derselben Zellfraktion und in denselben Passagen aber in der Aussaatdichte 5000 (S5000).

Die Zellen beider Aussaatdichten verändern sich im Verlauf. In den ersteren Passagen dominierten teilungsaktive schmale Zellen mit längeren Ausläufern (schwarzer Pfeil). In der 6. Passage dominierten große flache Zellen mit kürzeren

Ausläufern, die sich noch kaum teilten (gelber Pfeil). Letztere waren in der Aussaatdichte 5000 ausgeprägter.

#### **4.3.3 Qualitative und quantitative Abschätzung der Heterogenität von hMSC-Populationen mittels Durchflusszytometrie**

Um die mit der Passagenzahl und Aussaatdichte zunehmende Heterogenität *in vitro* kultivierter hMSC-Populationen noch weiter zu charakterisieren, wurde neben der Bestimmung der Proliferationsraten und der lichtmikroskopischen Beurteilung bei allen experimentellen Ansätzen auch eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Neben einer quantitativen Erfassung der Zunahme der Heterogenität der Zellpopulationen wurden aus der qualitativen Veränderung der Zellen auch Hinweise auf die mögliche Ursache erwartet. So sollte sich die vermutete spontane Differenzierung in Richtung auf die mesenchymalen Zielzellen Chondrozyten und Osteoblasten durch Zunahme spezifischer Oberflächenmarker erkennen lassen.

Als charakteristische Marker für die hMSCs wurden die für diesen Zweck häufig eingesetzten Oberflächenantigene CD90 und CD105 ausgewählt. Als Hinweis auf die Präsenz von Chondrozyten bzw. deren Vorläuferzellen wurden die Marker CD54 bzw. CD106 mit in die Analysen eingeschlossen. Ein Hinweis auf die Differenzierung zu Osteoblasten wurde vom Nachweis des Markers STRO-1 erwartet. Zur Kontrolle wurde in allen Fällen zusätzlich der für hMSCs negative Marker der hematopoetischen Stammzellen CD45 eingesetzt.

Die Ergebnisse sämtlicher Analysen sind in der Abbildung 16 zusammengefasst. In den einzelnen Diagrammen A – D sind jeweils die Anteile der mit den verschiedenen Markern identifizierten Zellen als Doppelbalken dargestellt. Damit ist stets auch ein Vergleich des Effektes hoher und niedriger Aussaatdichte möglich.

Als gemeinsames Ergebnis für alle Analysen kann festgehalten werden, dass der größte Teil der Zellen stets mit Hilfe der Marker CD90 und CD105 als hMSCs identifiziert werden konnte. Gleichzeitig konnte eine Verunreinigung mit hämatopoetischen Zellen praktisch ausgeschlossen werden. Der negative Marker lieferte ähnlich niedrige Werte wie die hier nicht gezeigte Kontrolle ohne primäre Antikörper.

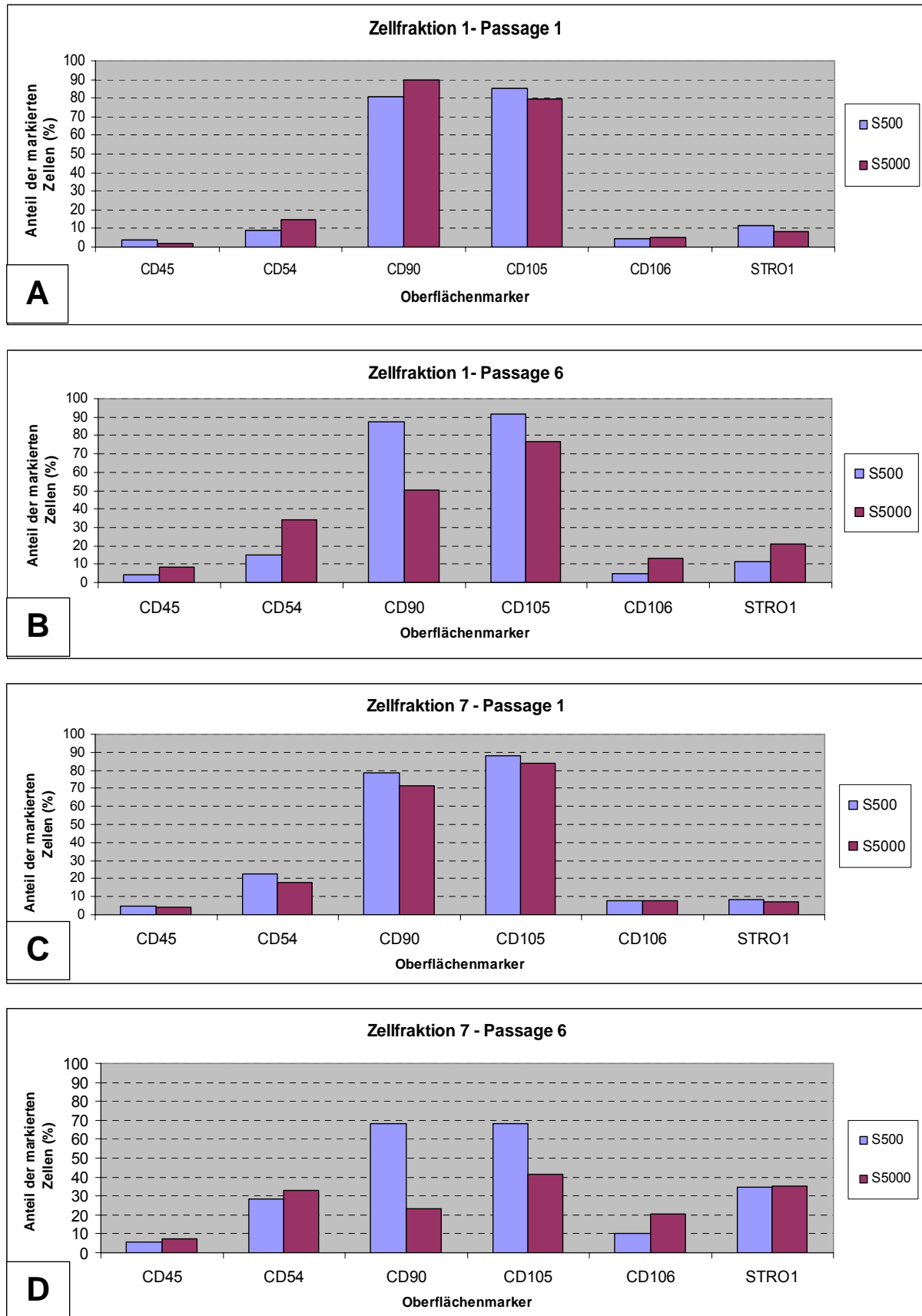


Im Diagramm A ist die Verteilung von Zellen der ersten Passage gezeigt, die am ersten Tag adhärerten (L1P1S500 und L1P1S5000). Es handelt sich dabei um die am schnellsten proliferierenden Zellpopulationen. Deutlich nachweisbar ist bereits in diesen Populationen eine Minderheit von Zellen mit 10-15% Anteil, die auf dem Wege der Differenzierung in Chondrozyten (CD 54 und CD106) bzw Osteoblasten (STRO-1) sind. Dabei scheint die Aussaatdichte nur eine marginale Rolle zu spielen. Wählt man zum Vergleich Zellen aus, die erst spät adhärerten (L7P1S500 und L7P1S5000) und analysiert sie in der ersten Passage, so erhält man die im Diagramm B wiedergegebene Verteilung. Die Zunahme des Markers CD54 auf Kosten des Markers CD90 deutet auf ein stärkeres Ausmaß der spontanen Differenzierung von hMSCs zu Chondrozyten hin. Wiederum scheint die Aussaatdichte hier keine Rolle zu spielen. Ein solcher Effekt wird erst sichtbar wenn man Zellen mit frühem Adhärungszeitpunkt der ersten und sechsten Passage vergleicht (A vs C).

In der sechsten Passage sind es vornehmlich die Zellen mit hoher Aussaatdichte, die in erheblichem Maße zu den Zielzellen Chondrozyten und Osteoblasten differenziert sind. Der Anteil der mit CD90 und CD105 angefärbten Zellen sinkt signifikant zugunsten der Marker CD54, CD106 und STRO-1. Dieser Effekt wird noch weiter verstärkt und erfasst nun auch deutlich die Zellen mit niedrigerer Aussaatdichte, wenn Zellen mit spätem Adhärungszeitpunkt für 6 Passagen kultiviert werden (L7P6S500 und L7P6S5000). Im Diagramm D ist der Anteil der Marker der hMSCs im Vergleich zum Diagramm A noch weiter zugunsten der differenzierten Zielzellen Chondrozyten und Osteoblasten gesunken.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die mit der Bestimmung der Proliferationsraten und der lichtmikroskopischen Beurteilung gewonnenen Erkenntnisse nicht nur bestätigt, sondern erweitert wurden. Nicht nur Aussaatdichte und Passagenzahl sondern auch der späte Adhärungszeitpunkt haben einen stimulierenden Effekt auf die unerwünschte spontane Differenzierung der hMSCs zu den mesenchymalen Zielzellen.

Die Abbildung 16 gibt eine zusammenfassende Darstellung der durchflusszytometrischen Analysen.



**Abbildung 16: zusammenfassende Darstellung der durchflusszytometrischen Analysen**

dargestellt sind 4 Diagramme A - D (Durchschnittswerte aus 2 Versuchen). Dem prozentualen Anteil der markierten Zellen (y-Achse) werden die Oberflächenmarker (x-Achse) gegenübergestellt

Aus den Diagrammen lässt sich folgendes feststellen:

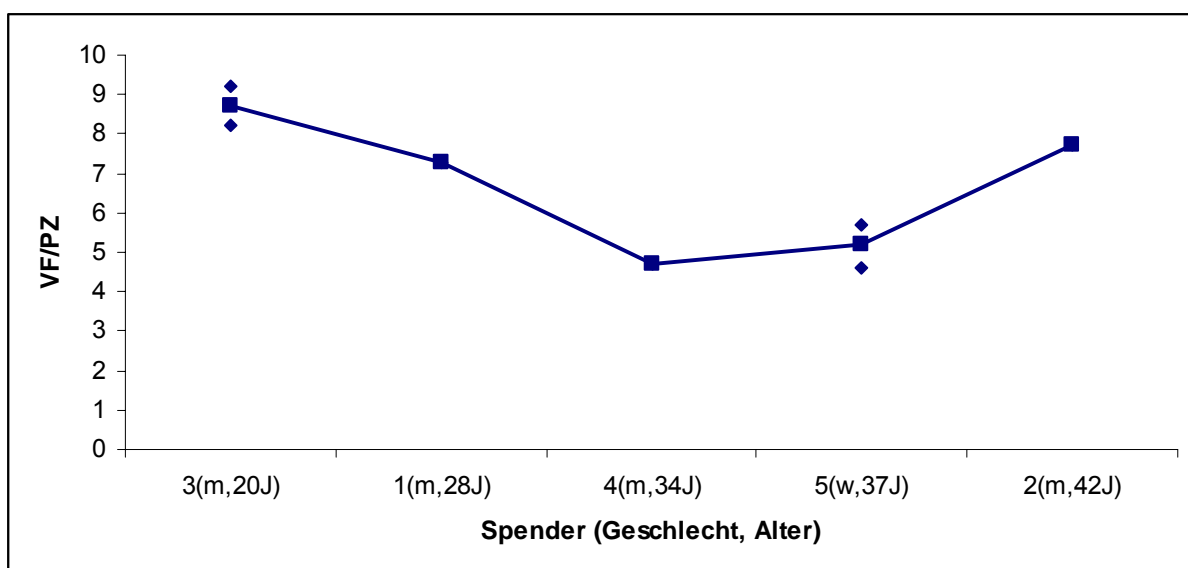
- die Expression der Marker CD90 und CD105 in der sechsten Passage war bei den Zellkulturen der Aussaatdichte 500 stärker als bei denen der Aussaatdichte 5000
- die Expression der Marker CD54, CD106 und STRO-1 in der sechsten Passage war bei den Zellkulturen der Aussaatdichte 500 schwächer als bei denen der Aussaatdichte 5000
- die Expression der Marker CD90 und CD105 war bei den Zellkulturen der Aussaatdichte 5000 in der ersten Passage stärker als bei denen in der sechsten Passage
- die Expression der Marker CD54, CD106 und STRO-1 war bei den Zellkulturen der Aussaatdichte 5000 in der ersten Passage schwächer als bei denen in der sechsten Passage
- die Expression der Marker CD90 und CD105 in der sechsten Passage war bei den Zellkulturen der ersten Zellfraktion stärker als bei denen der siebten Zellfraktion
- die Expression der Marker CD54, CD106 und STRO-1 in der sechsten Passage war bei den Zellkulturen der ersten Zellfraktion schwächer als bei denen der siebten Zellfraktion.
- zwischen der ersten und siebten Zellfraktion lassen sich in der ersten Passage keine eindeutigen Unterschiede wahrnehmen

Zellfraktion n = die an dem Tag n nach der Isolierung adhärenierten Zellen, S500 = Zellen der Aussaatdichte 500/cm<sup>2</sup>, S5000 = Zellen der Aussaatdichte 5000/cm<sup>2</sup>, P = Passage

#### 4.4 Selektion schnell proliferierender hMSCs während der ersten Passage

Mit Hilfe der systematischen Bestimmung der Proliferationsraten in Abhängigkeit von verschiedenen Zellkulturbedingungen konnte zwar ein Weg gefunden werden, wie das Ausmaß der spontanen Differenzierung möglichst klein gehalten werden kann, doch für die Anwendung zum Zwecke des *tissue engineering* reicht diese Empfehlung wahrscheinlich nicht aus. Daher wurde zusätzlich versucht, eine Technik zu entwickeln, die es erlaubt den Anteil der spontan differenzierten hMSCs mit möglichst einfachen Mitteln noch weiter zu senken. Die lichtmikroskopisch beobachtete und mit Hilfe der Durchflusszytometrie nachgewiesene Präsenz differenzierter mesenchymaler Zielzellen in Zellpopulationen schon in der ersten Passage ist möglicherweise die Ursache für die Vergrößerung des Anteils dieser Zellen während der weiteren Passagierung. Denkbar ist, dass ein von den differenzierten Zellen ausgehendes, möglicherweise über Zytokine vermitteltes Signal, für die Differenzierung der unreifen hMSCs verantwortlich ist. Gestützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass dieser Effekt mit einer Erniedrigung der Aussaatdichte dosisabhängig vermindert werden kann. Mit der Verdünnung der Zellen würden auch die Konzentration und die Wirkung der hypothetischen Zytokine sinken. Auf dieser Überlegung basierte die Idee, die möglicherweise für die unerwünschte Differenzierung verantwortlichen Zellen schon vor Beginn der Kultivierung mechanisch zu entfernen. Zur praktischen Anwendung ausgewählt wurde schließlich ein Verfahren, bei dem die adhärenzhaften Zellen nicht wie üblich auf eine möglichst große Zellkulturflasche sondern auf eine Vielzahl separierter kleiner Flächen einer Multiwell-Platte ausgesät wurden. Der Plan beruhte auf der Beobachtung, dass sich frisch ausgesäte Zellen in der Regel lokal sehr unterschiedlich schnell vermehren (Koloniebildung). Dies wurde als Folge des Abstands zu Zellen interpretiert, die Nachbarzellen zur Differenzierung stimulieren. Diese Vorstellung schien zuzutreffen, da sich die in die Miniwells mit etwas mehr als 1 cm<sup>2</sup> Grundfläche ausgesäten Zellen äußerst unterschiedlich schnell vermehren. Während 80% Konfluenz in weniger als 10% der Wells schon nach 4-5 Tagen erreicht wurde, benötigten die Zellen in den meisten anderen Wells dafür bis zu 3 Wochen, in einer Minderheit wiederum wurde keinerlei Zellvermehrung beobachtet. Dass dieses Ergebnis sehr wahrscheinlich Folge einer verminderten gegenseitigen Beeinflussung der Zellen ist, wird durch weitere Beobachtungen unterstützt. Die auf

so einfachem Wege erreichte mechanische Trennung der Zellen erwies sich bei der nachfolgenden Passagierung in den üblichen großen Zellkulturflaschen als nachhaltig. Der in der ersten Passage gemessene Vermehrungsfaktor lag nicht nur deutlich höher als bisher sondern konnte auch über mindestens 4 Passagen reproduziert werden. Um auszuschließen, dass es sich um eine Spender-abhängige Besonderheit handelt, wurden die Ergebnisse an Zellen von insgesamt 5 Spendern reproduziert, die sich hinsichtlich Alter und Geschlecht deutlich unterschieden. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 17 als Funktion des Alters der Spender wiedergegeben. Bei diesen konkreten Messungen wurde jeweils nur das Well ausgewählt, das nach 5 Tagen die höchste Zellzahl erreicht hatte. Bei zwei Spendern wurde der Höchstwert von zwei unter den jeweils 12 Minikulturen gleichzeitig erreicht. Die Bestimmung der Vermehrungsfaktoren führte durchaus zu erheblichen Schwankungen, deren Ursachen bisher nicht bekannt sind. Bei Anordnung der Spenderdaten nach steigendem Alter wie in der Abbildung 17 geschehen oder nach dem Geschlecht ergibt sich keine eindeutige Tendenz. Insgesamt liegen die Werte von 4,6 – 9,2 alle erheblich über dem Niveau der unter den bisher üblichen, optimalen Bedingungen erreichten Werte von kleiner als 4. Zusammenfassend kann damit die am Ende des vorausgehenden Kapitels vorgeschlagene Methode zur Herstellung einer möglichst homogenen hMSCs-Population insofern um die Empfehlung erweitert werden, als die eingesetzten Zellen zuvor nach dem oben beschriebenen Protokoll von den langsamer wachsenden Zellen abgetrennt werden sollten.



**Abbildung 17: Einfluss der Selektion schnell proliferierender Zellen auf die Vermehrungsrate hMSCs**

Dem VF/PZ (y-Achse) wird die Spenderzahl inklusive Geschlecht und Alter (x-Achse) gegenübergestellt. Die Spender-Auftragung erfolgte nach dem Alter.

Der Vermehrungsfaktor der selektierten Zellen erreichte durchschnittlich relativ hohe Werte (zwischen 4,6 und 9,2fach).

Die Spender-abhängigen Schwankungen sind nicht Alter oder Geschlecht zuzuordnen.

VF/PZ = Vermehrungsfaktor pro Passagezeit bzw. pro Tag, m = männlich, w = weiblich, J = Jahre

## 5 Diskussion

Das große klinische Interesse an den mesenchymalen Stammzellen gründet sich neben ihrem spezifischen Differenzierungspotenzial vor allem auf die besondere Eigenschaft dieser Zellen, sich unter Erhalt ihrer Differenzierungsfähigkeit in sehr hohem Maße *in vitro* vermehren zu lassen (Pittenger MF et al., 1999). Dieser Vorteil ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn es keine Alternative gibt, ausreichende Mengen autologer Zellen mesenchymalen Ursprungs für therapeutische Ziele zu gewinnen. Als Beispiel sei noch einmal daran erinnert, dass sich aus der Gelenkfläche isolierte primäre humane Chondrozyten *in vitro* bisher nicht ohne Verlust ihres differenzierten Phänotyps vermehren lassen (Klemm et al., 1998; Domm et al., 2000; Möller et al., 2000).

Ziel der zu dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen war die Optimierung der Kulturbedingungen zur Isolierung und *in vitro* Vermehrung humaner mesenchymaler Stammzellen, die sich insbesondere für die *ex vivo* Herstellung von hyalinem Knorpel mit Hilfe der Methoden des *tissue engineering* eignen. Als konkrete Aufgabe stellte sich die Entwicklung eines Protokolls, das vornehmlich die Tendenz zur spontanen vorzeitigen Differenzierung der Zellen während der Proliferation reduziert, da darin die Hauptursache für die schädliche Heterogenität der gewonnenen Zellpopulationen gesehen wird.

Aus praktischen Gründen wurden die aus dem Knochenmark isolierten Zellen in dieser Arbeit durchgehend als „mesenchymale Stammzellen“ bezeichnet ohne die Funktionalität jeweils in jedem einzelnen Fall tatsächlich nachzuweisen. In der Literatur wird als Alternative auch der Begriff „Knochenmark-Stromazellen“ (*bone marrow stromal cells*) angetroffen. Die Entscheidung, so zu verfahren wie oben ausgeführt, stützt sich auf einen Vorschlag von Pittenger und Marshak, den Begriff „mesenchymale Stammzellen“ immer dann zu verwenden, wenn Bezug genommen werden soll auf deren Fähigkeit, unter geeigneten Bedingungen in die verschiedenen Phänotypen der mesenchymalen Gewebe zu differenzieren. Dagegen soll von Stromazellen gesprochen werden, wenn es um die komplexe Mischung nicht näher

charakterisierter Zellen geht, die aus dem Knochenmark gewonnen werden kann (*Pittenger MF and Marshak DR, 2001*).

Wie von Pittenger et al. schon im Jahre 1999 berichtet ist es den Autoren gelungen, mesenchymale Stammzellen aus dem Mark der Beckenknochen verschiedener adulter Donoren zu isolieren und zu charakterisieren. Zur Abtrennung vor allem der hämatopoetischen Zellen wurde ein Dichtegradient verwendet mit anschließender Adhärerung an die Plastikoberfläche der Kulturgefäße, eine Methode, die vorher bereits von Caplan et al. praktiziert wurde (*Caplan et al., 1994*). Die so angereicherten Zellen bildeten innerhalb von 5-7 Tagen in Gegenwart eines low-glucose-Mediums (Dulbecco's modified Eagle medium: DMEM) unter Zusatz von 10% selektioniertem foetalem Kälberserum (FKS) auf Plastikoberflächen Kolonien, deren Zellen sich sowohl morphologisch als auch nach durchflusszytometrischer Analyse als homogen erwiesen. Die Zellen zeigten darüberhinaus während der weiteren Passagierung keine Tendenz zur spontanen Differenzierung und ließen sich unter den spezifischen Testbedingungen in die differenzierten Phänotypen des Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten überführen. Anders als die embryonalen Stammzellen sind die mesenchymalen Stammzellen damit rein funktionell definiert: Ihre Fähigkeit zur Koloniebildung (CFU-F-Test), zur Expression einer Auswahl spezifischer Oberflächenantigene und zur Differenzierung in Zellen mit mesenchy-malem Phänotyp sind daher auch zu ihrer Definition heranzuziehen.

Mit diesen erfreulichen Ergebnissen wurden bereits vor mehr als einem Jahrzehnt die hohen Erwartungen des Kliniklers an die Etablierung einer generellen Methode zur Bereitstellung autologer mesenchymaler Stammzellen für den therapeutischen Einsatz im Prinzip erfüllt. Allerdings bleiben bis zum klinischen Einsatz noch wenigstens zwei wichtige praktische Probleme zu lösen. Das eine betrifft die Schwierigkeit der Isolierung einer so homogenen Zellpopulation wie von den Autoren beschrieben, das andere den Einsatz des selektionierten foetalen Kälberserums. Denn wie sich herausgestellt hat, ist der Zusatz des selektionierten foetalen Kälberserums für die hohe Qualität der produzierten Zellpopulationen unverzichtbar, für den Klinikler aber allein aus immunologischen Gründen nicht akzeptabel (*Spees JL, 2004*)



Die von Pittenger et al. berichtete Homogenität der isolierten hMSC-Population ist jedoch eine wichtige Voraussetzung für die Fähigkeit der Zellen zur spezifischen Differenzierung in die verschiedenen mesenchymalen Phänotypen. Sie kann allerdings von vielen anderen Autoren nicht bestätigt werden, möglicherweise weil die Isolierungstechnik weniger effektiv war oder aus Mangel an dem von Pittenger verwendetem Serumzusatz. So beobachteten Muraglia et al. mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen eine deutliche Heterogenität der nach derselben Methode isolierten Zellpopulation (*Muragila et al., 2000*). Von anderer Seite wurde auch darauf hingewiesen, dass Art und Menge der gewonnenen Zellen in erheblichem Maße von der Isolierungsmethode beeinflusst werden (*Lange et al. 2005*). Die Aufgabe, mesenchymale Stammzellen in zwei Schritten gegenüber einem mehr als  $10^4$ -fachen Überschuss von Stromazellen anzureichern, gelingt offensichtlich nicht so einfach wie ursprünglich angenommen. Dabei verschärft sich das Problem mit zunehmendem Alter des Donors, da die Zahl der hMSCs abnimmt. Findet man bei einem Neugeborenen noch etwa 1 hMSC pro 1000 kernhaltige Zellen, so sind es bei einem Teenager 1 hMSC pro 10000 und bei einem fünfzigjährigen Menschen nur noch etwa 1 hMSC pro 40000 kernhaltigen Zellen (*Caplan et al., 2007*). Das Problem ist noch ungelöst. Vor allem wird die bisher noch fehlende Standardisierung eines verbindlichen Isolierungsprotokolls beklagt, die für die heterogenen Ergebnisse in den verschiedenen Laboren verantwortlich gemacht wird (*Ho AD et al.; 2008*).

Aufgrund der erwähnten Kontroversen wurde die Heterogenität der im Rahmen der eigenen Untersuchungen isolierten Zellpopulationen ebenfalls mit Hilfe der Durchflusszytometrie überprüft. Als positive immunzytochemische Marker für multipotente mesenchymale Stammzellen wurden zwei der in der Literatur beschriebenen Standardmarker, CD90 und CD105 eingesetzt (*Haynesworth et al., 1992a*). Daneben dienten STRO-1 als Marker für osteogene und CD106 als Marker für chondrogene Progenitor-Zellen (*Dennis et al., 2002; Gronthos et al., 1994*) sowie der extrazelluläre-Matrix-Rezeptoren-Marker CD54, der auch von hMSCs exprimiert wird (*Pittenger et al., 1999; Pittenger et al., 2001*).

Auf der Oberfläche der hMSCs wurde bisher schon eine Vielzahl von Oberflächenantigenen identifiziert. Unter den insgesamt 463 Proteinen befinden sich 148

integrale oder verankerte Membranproteine, sowie 159 membranassoziierte Proteine (*Foster et al., 2005*). Des Weiteren wurden 29 Integrine und Zelladhäsionsmoleküle, 20 Rezeptoren und 18 Ras verwandte kleine GTPasen nachgewiesen (*Foster et al., 2005*). Keiner dieser Oberflächenmarker eignet sich allein als spezifischer Marker für hMSCs. Daher muss immer eine geeignete Kombination verschiedener Marker zur Charakterisierung der hMSCs herangezogen werden. Welche Kombination von Markern optimal zu Charakterisierung von hMSCs ist, wird bisher noch kontrovers diskutiert.

Die Ergebnisse der eigenen durchflusszytometrischen Analysen können das hohe Maß der von Pittenger et al. beobachteten Homogenität ebenfalls nicht bestätigen. Sie deuten darauf hin, dass für die Heterogenität offensichtlich vor allem aus den hMSCs hervorgegangenen Progenitorzellen verantwortlich sind. Mit STRO-1 konnte die Präsenz einer signifikanten Menge osteogener Progenitorzellen nachgewiesen werden, mit CD106 die von Progenitor-Zellen mit chondrogener Vordifferenzierung. Gleichzeitig fällt auf, dass die Zusammensetzung der verschiedenen Zellpräparate erheblich variiert, ein Phänomen, das auch schon von anderen Autoren beschrieben wurde (*Smith et al.; 2004*). Als Erklärung dafür kann man sich vorstellen, dass bei der Isolierung der Zellen aus dem Knochenmark stets eine vom individuellen Bedarf des Donors abhängige Mischung von mesenchymalen Zellen mit unterschiedlichem Differenzierungsstatus angetroffen wird.

Die Hinweise aus den durchflusszytometrischen Analysen wurden bestätigt durch mikroskopische Untersuchungen. Die Kolonien der frisch isolierten hMSCs erwiesen sich auch morphologisch als heterogen. Sie setzen sich zusammen aus kleineren, sich schnell teilenden, und größeren, sich langsamer teilenden Zellen.

Als Fazit lässt sich hier festhalten, dass die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Technik zur Anreicherung der Zellen über einen Ficoll-Gradienten sicher noch verbesserungsfähig ist, um die Vermehrung der Zellen von vornherein unter günstigeren Bedingungen starten zu können. Zu den Vorschlägen, die seit Fertigstellung der experimentellen Untersuchungen gemacht wurden, zählen auch die Berichte von Carrancio und Kasten, die beide auf eine Optimierung der Technik

der Gradientenzentrifugation abzielen, zum Teil durch drastische Reduzierung des Schwerefeldes auf  $1 \times g$  (Carrancio S. et al., 2008; Kasten P et a., 2008). Alternativ wird seit langem versucht die präparative Durchflusszytometrie (*cell sorting*) einzusetzen, wobei nach der strengen Definition allerdings stets Subfraktionen der hMSCs gewonnen werden (Kuznetsov et al., 1997). Inzwischen wurden mehr als 200 verschiedene Antikörper gegen Oberflächenantigene auf ihre Eignung getestet (Rojewski et al., 2008). Die Erfolgsmeldungen zum Einsatz von Antikörpern gegen die Antigene CD56, CD271 und MSCA-1 stammen allerdings erst aus jüngerer Zeit und konnten daher experimentell im Rahmen der Untersuchungen zu dieser Arbeit nicht mehr berücksichtigt werden (Battula VL et al., 2009; Poloni A et al., 2009).

Der Schwerpunkt der experimentellen Bemühungen zur Bereitstellung einer möglichst homogenen hMSC-Population lag denn auch auf einer Optimierung der *in vitro*-Proliferationsphase mit dem Ziel einer maximalen Anreicherung der hMSCs während der Wachstumsphase bei realistischen, suboptimalen Ausgangsbedingungen. Von den drei Möglichkeiten zur Erfolgskontrolle eignete sich praktisch nur die Messung der Teilungshäufigkeit. Sowohl die durchflusszytometrische Bestimmung der Homogenität der Population als auch die Fähigkeit zur Differenzierung in mesenchymale Phänotypen sind zu aufwändig und eignen sich eher als Methoden zur abschließenden Bestätigung. Der Verwendung der Teilungsrate als Parameter für die Anreicherung der hMSCs liegt die Idee zugrunde, dass es sich bei den Kolonie bildenden fibroblastoiden Zellen auch um die am schnellsten proliferierenden Zellen handelt. Daher wird eine Zellpopulation mit höherer durchschnittlicher Teilungsrate einen höheren Anteil der hMSCs enthalten als eine solche mit durchschnittlicher niedrigerer Teilungsrate. Die Bestimmung der durchschnittlichen Teilungsrate ist allerdings nicht ganz unproblematisch. hMSCs zeigen in Kultur in der Regel einen mit der Zeit variierenden Wachstumsverlauf. Er beginnt mit einer lag-Phase, während der nichts sichtbares zu passieren scheint, und wird gefolgt von einer Phase mit rapidem, exponentiellem Wachstum mit einer Zellverdopplungszeit von weniger als 10 Stunden (Prockop et al., 1997; Prockop et al., 2001). Das Wachstum endet in einer stationären Phase, in der die Proliferationsrate gegen Null geht (Sekiya et al., 2002; Bruder et al., 1997). Adulte hMSCs zeigen nach Prockop eine Verdopplungszeit von 33 Stunden und weniger und ein großes

Expansionspotential, wobei aus Untersuchungen des Zellzyklus hervorgeht, dass sich durchschnittlich stets 20% der Zellen im Ruhezustand befinden (*Colter et al., 2000*).

Um die Teilungsrate dennoch als verlässlichen Parameter verwenden zu können, wurde ein reproduzierbarer Vermehrungsfaktor VF definiert. Alle Zellkulturen wurden nur bis ca 80% Konfluenz wachsen gelassen. Nur wenn diese Zelldichte nach drei Wochen noch nicht erreicht wurde, wurde die Kultur ebenfalls gestoppt und die Zellzahl nach Trypsinierung mit einem Cellcounter bestimmt. Die bezogen auf die Anzahl ausgesäter Zellen ermittelte Vermehrung wurde anschließend durch die Anzahl der Kulturtage geteilt. Dieser Quotient wird in dieser Arbeit als Vermehrungsfaktor (VF) definiert. Er gibt die durchschnittliche Zellvermehrung pro Tag an. Je höher der Wert von VF ist, um so höher ist der Anteil an Kolonie bildenden Zellen in der Zellpopulation. Damit erscheint der VF sowohl praktisch wie theoretisch als Parameter zur Optimierung der Zellkulturbedingungen geeignet zu sein, die die Homogenität der Zellpopulation der hMSCs erhöhen. Wegen des hohen experimentellen Aufwands wurden allerdings nur drei Veränderungen getestet, der Effekt einer

- Variierung der Aussaatdichte,
- Veränderung der Adhärierungsbedingungen
- Selektionierung der Kolonie bildenden Zellen

Der letzte Punkt wird im Folgenden auch als partielle Klonierung bezeichnet.

Um möglichst alle vermeidbaren Quellen auszuschließen, die die Streuung der Messwerte unnötig erhöhen, wurden alle Experimente die beiden ersten Punkte betreffend mit den Zellen ein und desselben Donors durchgeführt. Denn bei vergleichenden Voruntersuchungen hatte sich gezeigt, dass das Wachstumsverhalten der Zellen verschiedener Donoren erheblich voneinander abwich.

Es wurde ebenfalls darauf verzichtet, einen Ersatz für foetales Kälberserum zu finden. In Anlehnung an den Bericht von Pittenger et al. wurde zwar ebenfalls ein selektioniertes foetales Kälberserum eingesetzt, allerdings war dieses für die

geplante Chondrogenese optimiert (Pittenger et al. 1999). Eigene Voruntersuchungen mit gepoolten Humanseren hatten in Übereinstimmung mit anderen Autoren prinzipiell den möglichen Einsatz von autologen Seren in der klinischen Anwendung bestätigt, wenn auch zunächst mit Abstrichen bei der erreichbaren Wachstumsrate der isolierten Zellen. Inzwischen sind allerdings Berichte bekannt geworden, die einen Zusatz von Thrombin aktivierten Blutplättchen empfehlen und damit foetales Kälberserum hinsichtlich Expansionseffizienz und Differenzierungsfähigkeit übertreffen (Kocaoemer, A et al., 2007).

### 5.1 Effekt der Variation der Aussaatdichte

Auf die Abhängigkeit der Proliferationsrate der hMSCs von der Anfangszelldichte wurde bereits von Sekiya hingewiesen (Sekiya et al., 2002). Er konnte zeigen, dass die Proliferationsrate der Zellkulturen bei einer schrittweisen Absenkung der Aussaatdichte von der für viele Zellkulturen empfohlenen Dichte von 5000 Zellen/cm<sup>2</sup> bis auf 10 Zellen/cm<sup>2</sup> stetig anstieg. Weitere Studien der Arbeitsgruppe von Prockop bestätigten, dass sich undifferenzierte hMSCs bei stark erniedrigter Aussaatdichte besonders effektiv vermehren ließen (Prockop et al. 2001). In den eigenen Untersuchungen konnte dieses Phänomen im Prinzip ebenfalls reproduziert werden. Die über 4 Passagen gemittelten Expansionsraten der Zellkulturen mit 10-fach erniedrigter Aussaatdichte übertrafen die der Kulturen mit der Standard-Aussaatdichte um mehr als das 10-fache. Für die ersten Passagen lagen die einzelnen Ergebnisse teilweise noch darüber. Das bedeutet, dass auf einer Zellkulturflasche am Ende einer Passage auch absolut mehr Zellen geerntet werden konnten, wenn nur ein Zehntel der Zellen anfangs ausgesät wurde. Als Folge davon wird angenommen, dass sich der relative Anteil undifferenzierter, Kolonie bildender Zellen während jeder Passage erhöht hat. Dies wird durch die durchflusszytometrischen Analysen sowie mikroskopischen Analysen bestätigt. So zeigten die mit einer Aussaatdichte von 500 Zellen pro cm<sup>2</sup> ausgesäten Zellen eine deutlich geringere Heterogenität sowohl hinsichtlich ihrer Größe wie auch der Lichtdurchlässigkeit (*forward scatter*) im Vergleich zu solchen, die bei einer Aussaatdichte von 5000 Zellen pro cm<sup>2</sup> vermehrt wurden. Morphologisch zeigten die

Zellkulturen bei erniedrigter Aussaatdichte einen relativ höheren Anteil von den kleinen teilungsfreudigen spindelförmigen Zellen.

Zur Erklärung des Erfolgs dieser Methode geht man von der Vorstellung aus, dass frisch ausgesäte Zellen nach der Adhäsierung unter anderem mit der Sezernierung eines vom jeweiligen Phänotyp der Zelle abhängigen Musters parakriner Faktoren beginnen. Es wirkt stimulierend oder hemmend auf die Nachbarzellen, in dem Sinne ebenfalls den Differenzierungsstatus der aussendenden Zelle anzunehmen. So kommt es in einer heterogenen Population zu einer Konkurrenz der verschiedenen Möglichkeiten Proliferation, Differenzierung oder nach Erreichen des terminal differenzierten Phänotyps auch Produktion funktioneller Proteine. Durch Erniedrigung der Zelldichte wird auch die Konzentration und damit die Wirkung einiger differenzierend wirkender Faktoren herabgesetzt. Das Ergebnis wird in erheblichem Maße von den Faktoren mitbestimmt, die mit dem Serumzusatz oder separat dem Kulturmedium unabhängig von der Zellverdünnung zugefügt werden.

Die Methode hatte allerdings auch ihre Grenzen. Anders als von Sekiya beobachtet erwies sich eine weitere Erniedrigung der Aussaatdichte unter den Wert von 500 Zellen pro  $\text{cm}^2$  als wenig realistisch. Die Folge waren erheblich verlängerte lag-Phasen, zum Teil entwickelten sich überhaupt keine Kolonien. Eine mögliche Erklärung ist einerseits die wahrscheinlich größere Heterogenität der über den Ficoll-Gradienten gewonnenen Zellpopulationen und andererseits ein relativer Mangel an mitogenen Faktoren im Kulturmedium. Dies könnten auch die Ursachen für die nach 4 Passagen beobachtete deutliche Abnahme der Expansionsrate sein. Passend dazu veränderte sich auch die Zellmorphologie. Viele Zellen verloren im Verlauf der Kultivierung bzw. Passagen ihre Spindelform und breiteten sich flächiger aus. Nach und nach konnten innerhalb der hMSC-Population mehrere Zellmorphologien unterschieden werden. In ähnlicher Weise müssen die Ergebnisse der Durchflusszytometrie gedeutet werden.

Die hMSC-Populationen späterer Passagen wiesen eine verminderte Präsenz von CD90 und CD105 und eine stärkere Präsenz von CD54, CD106 und STRO-1, auf.

Dies ist als Hinweis dafür zu sehen, dass sich ein zunehmender Teil der Zellen auf dem Wege in Richtung auf eine chondrogene bzw. osteogene Differenzierung befand. Der Effekt betraf allerdings die mit niedriger Aussaatdichte kultivierten Zellen in deutlich geringerem Maße.

## 5.2 Variation der Adhärierungsbedingungen

Die Idee zur Überprüfung der Adhärierungsbedingungen als Möglichkeit zur Anreicherung von hMSCs aus den Knochemark-Stromazellen geht auf die folgende Beobachtung zurück. Die Adhärierung der Zellen an vorbehandelte Plastikoberflächen gehört zu den effektivsten Maßnahmen zur Anreicherung von hMSCs (*Tondreau et al., 2004*). Zu den Stromazellen des Knochenmarks, welche eine Plastikadhärenz aufweisen, zählen neben den hMSCs jedoch auch CD45-positive Zellen und solche mit dem CD11b-Antigen, das von Monozyten und Granulozyten exprimiert wird. Das auf lymphohämatopoetischen Zell-Linien vorkommende Oberflächenantigen CD45 ist unter anderem ein Negativmarker für hMSCs. Wegen ihrer Adhärenz können diese Zelltypen für mehrere Wochen in Kultur verbleiben (*Barry et al., 2004*). Bei den eigenen Untersuchungen konnte mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse für diese Zellen trotzdem eine deutliche Abnahme während der Adhärierungsphase (Passage 0) festgestellt werden. Möglicherweise ist eine im Vergleich zu den hMSCs verminderte Adhärenz dafür verantwortlich, dass sich diese Zellen durch die anschließende gründliche Spülung aus der Population der hMSCs entfernen ließen.

Mit einem umfangreichen Mess-Programm wurde versucht die Frage zu beantworten, ob sich schnell proliferierende Zellen hinsichtlich ihrer Adhärungseigenschaften von langsamer wachsenden unterscheiden lassen. Dazu wurden einerseits Zellfraktionen gewonnen, die verschieden lange Gelegenheit zur Adhärierung hatten und andererseits solche, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Aussaat adhärten. Die verschiedenen Zellfraktionen wurden zudem noch über 6 Passagen kultiviert und anschließend die Vermehrungsfaktoren bestimmt. Interessanterweise konnten unter allen Bedingungen Zellfraktionen für die Analysen gewonnen werden, doch blieben die Unterschiede der Messergebnisse stets unter der Signifikanzgrenze. Offensichtlich

erwies sich der Parameter Proliferationsrate als zu grob. Denn mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnten sehr wohl Unterschiede festgestellt werden. So erwiesen sich die am ersten Tag adhärierenden Zellen als weniger anfällig für eine Tendenz zur spontanen, vorzeitigen Differenzierung. Dieser Unterschied wirkte sich zu dem bei den späteren Passagen noch deutlicher aus. In der Abbildung 15 ist die relative Zunahme der auf chondrogen und osteogen vordifferenzierten Zellen vorkommenden Marker CD106 und STRO-1 auf Kosten der Marker CD90 und CD105 dargestellt. Man erkennt, dass die Intensität der Fluoreszenz der differenzierten Zellen bei den am 7. Tag adhärerten Zellen deutlich höher ist als bei den am 1. Tag adhärerten Zellen. Weiterhin ist am Vergleich der nach der 1. und 6. Passage bestimmten Fluoreszenzintensitäten der differenzierten Zellen ein deutlicher Zuwachs auf Kosten der undifferenzierten CD90 und CD105-Zellen erkennbar. Da die Effekte einen additiven Charakter zu haben scheinen, ist eine Kultivierung von Zellen mit frühem Adhärungszeitpunkt und niedriger Aussaatdichte für nicht mehr als 4 Passagen als die zur Zeit optimale Bedingung zu empfehlen, wenn es darauf ankommt, das Ausmaß der Heterogenität der hMSC-Population möglichst niedrig zu halten.

### 5.3 Selektion schnell proliferierender Zellen

Neben der hohen Teilungsrate, der Adhärenz und spezifischen Oberflächenantigenen wurden unter anderem auch morphologische Kriterien zur Anreicherung von hMSC genutzt. Ein Beispiel ist der Vorschlag von Hung et al., ein Sieb einzusetzen, um eine als 'SS-cells' bezeichnete Subfraktion der hMSCs mit hohem Proliferations- und Differenzierungspotenzial anhand ihrer Größe zu isolieren (Hung et al., 2002). Einer anderen Subfraktion der hMSCs, die als RS-Zellen bezeichnet wurde, wird allein das maximale Proliferations- und Differenzierungspotenzial zugesprochen (Colter et al., 2000). Ob es als Nachschubpotenzial für jeden Bedarf angesehen werden kann ist jedoch noch umstritten (Colter et al. 2001; Sekiya et al., 2002).

Neben der Suche nach den entscheidenden Subfraktionen fokussieren andere Autoren ihre Aufmerksamkeit auf die Regulation der Differenzierung und Vermehrung



der hMSCs in der natürlichen Umgebung, um Methoden zur Gewinnung einer homogenen Population humaner mesenchymaler Stammzellen zu entwickeln (*Baksh et al., 2004*). Seit langem ist bekannt, dass mesenchymale Zellen unabhängig vom Differenzierungsstatus eine wichtige Rolle bei der Homöostase der hämatopoetischen Zellen darstellen (*Baksh et al. 2005*). Darüber hinaus gibt es inzwischen auch Hinweise für die Hypothese, dass umgekehrt auch von hämatopoetischen Zellen sezernierte lösliche Faktoren für die Funktionalität der mesenchymalen Zellen gebraucht werden (*Baksh et al. 2005*). Dem scheint zunächst die erfolgreiche Klonierung von hMSCs zu widersprechen, die durch Verdünnung aus einer homogenen hMSC-Population gewonnen wurde (*Pittenger et al 1999*). Erklärbar ist dieses Ergebnis jedoch möglicherweise durch den Zusatz eines für diesen Zweck selektierten foetalen Kälberserums. In Übereinstimmung damit sind eigene Versuche zur Klonierung von hMSCs möglicherweise gescheitert, weil der Zusatz dieses besonderen Serums nicht verwendet wurde. Weiterhin blieb – wie bereits weiter oben erwähnt – möglicherweise aus demselben Grund auch das Wachstum bei hMSC-Kulturen aus, wenn die initiale Aussaatdichte unter 500 Zellen pro  $\text{cm}^2$  lag. Danach wurde unter den konkreten Versuchsbedingungen bei einer Aussaatdichte von 500 Zellen pro  $\text{cm}^2$  gerade die minimale Konzentration an verunreinigenden Stromazellen zur Produktion essentieller Wachstumsfaktoren erreicht. Diese Hypothese wird ebenfalls durch das Ergebnis eines Experiments unterstützt, das im Folgenden als partielle Klonierung bezeichnet werden soll. Die über den Ficoll-Gradienten gewonnenen Zellen wurden mit der Aussaatdichte von 500 Zellen pro  $\text{cm}^2$  statt auf große Flaschen in die Näpfe von 24-Well-Platten ausgesät. Als Resultat wurde festgestellt, dass durchschnittlich nur in 1 – 2 Näpfen ein optimales Wachstum beobachtet werden konnte. Während die Vermehrungsfaktoren in diesen die VF-Werte der bisher erreichten Ergebnisse um mehr als das zweifache übertrafen, lagen sie in den anderen Näpfen noch deutlich unter den Werten der auf den großen Flaschen beobachteten Vermehrungsfaktoren. Wie ist nun diese ungleiche Verteilung zu erklären? Da zu Beginn in jeden Napf dieselbe Zellzahl (ca. 500 Zellen) eingefüllt wurde ist eine so ungleichmäßige Verteilung statistisch äußerst unwahrscheinlich, es sei denn die durchschnittliche Anzahl teilungsfähiger Zellen pro Napf läge deutlich unter dem Wert 1. Dagegen spricht die Beobachtung, dass sich in den Näpfen mit den optimal wachsenden Zellen nach der lag-Phase stets wenigstens

5 bis 7 Kolonien unterscheiden ließen. Wahrscheinlicher ist daher die Annahme, dass ein (oder mehrere) andere(r) Zelltyp(en) mit regulierender Wirkung zufällig die beobachtete Verteilung aufweisen. Prinzipiell denkbar ist sowohl die Abwesenheit hemmend wirkender wie die Anwesenheit stimulierend wirkender ko-kultivierter Zellen, die entsprechend wirkende Faktoren ausschütten. Auszuschließen ist auch nicht, dass beide Arten von Effekten nebeneinander auftreten. Da der hohe Wert des Vermehrungsfaktors bei der anschließenden Expansion auf großen Flaschen und der Aussaatdichte von 500 Zellen pro  $\text{cm}^2$  mindestens für die 4 folgenden Passagen erhalten bleibt, spricht mehr für die nachhaltige Entfernung hemmend wirkender Zellen durch die Technik der partiellen Klonierung.

## 6 Zusammenfassung

Die Möglichkeit, humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (hMSCs) zu isolieren und *in vitro* zu vermehren, um sie in verschiedene Zelltypen zu differenzieren, macht sie interessant für die *in vitro* Herstellung einer Reihe nicht-hämatopoetischer Gewebe. Allerdings bereitet die Tendenz der konventionell isolierten Zellen, schon während der Vermehrung spontan in verschiedene Zelltypen zu differenzieren, noch Probleme. Ausgehend von der These, dass dafür parakrine Effekte nicht ausreichend abgetrennter regulatorisch wirksamer Zellen verantwortlich sind, wurde in dieser Arbeit versucht, eine einfache Methode zur effektiveren Abtrennung dieser Zellen zu entwickeln. Da das Ausmaß spontaner Differenzierung erfahrungsgemäß in inverser Beziehung zur Zellteilungsrate steht, wurde für die experimentelle Arbeit die Vermehrungsrate als Parameter für die Abwesenheit differenzierend wirkender Regulatorzellen gewertet. Zusätzlich wurden Veränderungen in der Zellmorphologie sowie spezifische Zelloberflächenmarker mit Hilfe der Cytofluorometrie genutzt, um die Wirksamkeit der eingesetzten Methoden bei der Reduzierung der Heterogenität der untersuchten Zellpopulationen zu beurteilen. Die erste der drei eingesetzten Methoden besteht in der Variation der Adhärenzbedingungen im Rahmen der Isolierung der Zellen. Sie beruht auf der Annahme, dass Regulator- und Effektorzellen nicht unbedingt in gleichem Ausmaß zur Adhärenz an die Gefäßoberfläche neigen. Die experimentellen Untersuchungen zeigten in der Tat, dass ein solches Optimum existiert. Danach ist es vorteilhafter, die Zellen schon früh nach nur 24-stündiger Adhärenzphase zu ernten, wenn man den Anteil differenzierend wirkender Zellen reduzieren möchte. Die zweite Methode besteht in der Erniedrigung der Aussaatdichte und damit in einer schlichten Verdünnung der Zellen, von der ein vermindernder Effekt der parakrinen und juxtakrinen Signale seitens der Regulatorzellen erwartet wurde. Die experimentellen Untersuchungen bestätigten diese Erwartung sehr deutlich mit einem quantitativen Anstieg der Proliferationsrate der hMSCs und einer morphologisch und cytofluorometrisch nachweisbaren Abnahme differenzierter Zellen in den Populationen. Beide Effekte erschienen jedoch auch in Kombination noch nicht ausreichend, das gesteckte Ziel zu erreichen. Daher wurde zusätzlich eine erst während der Untersuchungen

gemachte Beobachtung genutzt, um schnell wachsende von langsamer wachsenden Zellen mechanisch zu trennen. Für die weitere Kultivierung wurden die schnell wachsenden, Kolonie bildenden Zellen selektiv herangezogen, indem die durch Adhärerung gewonnenen Zellen nicht wie üblich auf große 75 cm<sup>2</sup> -Flaschen, sondern auf Multiwell-Platten mit nur ca. 1 cm<sup>2</sup> Kulturfläche ausgesät wurden. Das Ergebnis war mit einer zwei- bis vierfachen Erhöhung der Proliferationsrate sehr deutlich. Es erwies sich zudem auch als nachhaltig. Die wirkungsvolle Abtrennung der die Differenzierung stimulierenden und die Proliferation hemmenden Zellen durch diese einfache Technik der partiellen Klonierung ließ sich noch mindestens für die vier folgenden Passagen beobachten. Diese Arbeit kommt daher insgesamt zu dem Ergebnis, zur Gewinnung von hMSCs mit einer möglichst niedrigen Heterogenität - wie sie für den Einsatz zum *tissue engineering* gebraucht werden – eine Kombination aus allen drei untersuchten Methoden zu empfehlen, also eine kurze Adhärenzzeit, eine niedrige Aussaatdichte und die partielle Klonierung durch Selektion der Kolonie bildenden Zellen.

---

# Literaturverzeichnis

**Andree C, Tanczos E, Flis B, Schaefer DJ, et al (1998)**

Transfection of human keratinocytes in vitro with the particle mediated gene transfer and the liposome-mediated gene transfer method.

In: Stark GB, Horch R, Tanczos E (eds) Biological matrices and tissue reconstruction. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 267.

**Angele P, Kujat R, Nerlich M, Yoo J, et al (1999)**

Engineering of osteochondral tissue with bone marrow mesenchymal progenitor cells in a derivated hyaloran-gelatin composite sponge.

Tissue Eng 5:545.

**Antoniades HN, Owen AJ (1982)**

Growth factors and regulation of cell growth.

Annu Rev Med 33:445-463. Review.

**Asahina I, Sampath TK, Nishimura I, Hauschka PV (1993)**

Human osteogenic protein-1 induced both chondroblastic and osteoblastic differentiation of osteoprogenitor cells derived from newborn rat calvaria.

J Cell Biol 123(4):921-933.

**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.

**Bärbel Hüsing, Eve-Marie Engels, Rainer Frietsch, Sibylle Gaisser, Klaus Menrad, Beatrix Rubin, Lilian Schubert, Rainer Schweizer, René Zimmer ( swiss 2003)**

Menschliche Stammzellen, Studie des Zentrums für Technologiefolgen-Abschätzung beim Schweizerischen Wissenschafts- und Technologierat (SWTR).

**Baksh D, Song L und Tuan RS (2004)**

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

J Cell Mol Med 8:301-16.

**Baksh D, E.Davies J, W.Zandstra P (2005)**

Soluble factor cross-talk between human bone marrow-derived hematopoietic and mesenchymal cells enhances in vitro CFU-F and CFU-O growth and reveals heterogeneity in the mesenchymal progenitor cell compartment.

Blood, Volume 106, Number 9

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

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

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

**Barry FP, Boynton R, Murphy M, Haynesworth S, Zaia J (2001)**

The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells.

Biochem Biophys Res Commun 289(2):519-524.

**Barry FP, Murphy JM. (2004)**

Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization.

Int J Biochem Cell Biol. 36(4):568-84.

**Batulla V.L., Tremblé S, Bareiss P. M. et al (2009)**

Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1

Haematologica, 94:173-184

**E.K. Beahm, R.L. Walton & C.W. Patrick Jr (2003)**

Progress in adipose tissue construct development.

Clin.Plast.Surg. 30(4),547-558.

**Beck GR, Zerler B, Moran E (2000)**

Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression

proc Natl Acad Sci USA 97 (15): 8352-8357.

**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.

**Bianco P, Silvestrini G, Termine JD, Bonucci E (1988)**

Immunohistochemical localization of osteonectin in developing human and calf bone using monoclonal antibodies.

Calc Tissue Int 43(3):155-161.

**Bianco P., Robey P.G. (2000)**

Marrow stromal stem cells,

J. Clin. Invest., 105:1663-1668.

**Bianco, P.; Robey, P. G. (2001)**

Stem cells in tissue engineering.  
Nature 414, S. 118-121.

**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.

**Brighton CT, Lorich DG, Kupcha R, Reilly TM, Jones AR, Woodbury RA 2nd (1992)**  
The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell.  
Clin Orthop 275:287-299.

**Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, et al (1994)**  
Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation.  
N Engl J Med 331:889.

**Bronckers AL, Gay S, Finkelmann RD, Butler WT (1987)**  
Developmental appearance of Gla proteins (Osteocalcin) and alkaline phosphatase in tooth germs and bones of the rat.  
Bone Miner 2(5):361-373.

**Bruder SP, Caplan AI (1990)**  
A monoclonal antibody against the surface of osteoblasts recognizes alkaline phosphatase isoenzymes in bone liver, kidney and intestine.  
Bone 11(2):133-139.

**Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI (1994)**  
Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy.  
J Cells Biochem 56:283.

**Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE (1997)**  
Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens.  
Bone 21(3):225-235.

**Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S (1998)**  
The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects.  
J Bone Joint Surg Am 80(7):985-996.

**Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R (1995)**  
Bone biology, part II. Formation, modelling, remodelling and regulation of cell funktion.  
J bone Joint Surg Amm 77:1276.

**Caplan A.I. (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)**

Principies of cartilage repair and regeneration.  
Clin Orthop 342:254-269.

**Caplan AI. (2007)**

Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine.  
J Cell Physiol. 213(2):341-7.

**Carrancio S, Lopez-Holgado N, Sanchez-Guijo FM, Villaron E, Barbado V, Tabera S, Diez-Campelo M, Blanco J, San Miguel JF, Del Canizo MC (2008)**

Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification.  
Exp Hematol. 36(8):1014-21

**Castro-Malaspina H., Gay R.E., Resnick G, Kapoor N., Meyers P., Chiarieri D., McKenzie S., Broxmeyer H.E., Moore M.A. (1980)**

Charakterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny.  
Blood, 56:289-301.

**Chaudhary LR, Hofmeister AM, Hruska KA(2004)**

Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation.  
Bone 34(3):402-411.

**Chen JI, Zhang Q, McCulloch AG, Sodek J (1991)**

Immunohistochemical localization of bone sialoprotein (BSP) in fetal porcine bone tissues: Comparisons with secreted phosphoprotein 1 (Spp1, osteopontin) and SPARC (osteonectin).  
Histochem j 23(6):281-289.

**Chen U, Esser R, Kotlenga K, Allis S, et al (1997)**

Potencial application of quasi-totipotent embryonic stem cells: A 10-year study of soft-tissue engineering with embryonic stem cells.  
Tissue Eng 3:321.

**Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakaran P, Szatkowski JP, Park JY, He TC (2003)**

Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenic proteins (BMPs).  
J Bone Joint Surg 85A(8):1544-1552.

**Colter D.C., Class R., D.J. (2000)**

Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow,  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.



**Colter D.C., Sekiya I., Prockop D.J. (2001)**

Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells,  
proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:7841-7845.

**Cousin B, Andre M, Arnaud E, Penicaud L, Casteilla L (2003)**

Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue.  
Biochem Biophys Res Commun. 301:1016-22.

**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.

**De Wynter EA, Emmerson AJ, Testa NG (1999)**

Properties of peripheral blood and cord blood stem cells.  
Bailliere`s Best Pract Res Clin Haematol 12(1-2):1-17.

**Dexter T.M., Lajtha L.G. (1974)**

Proliferation of haemopoietic stem cells in vitro,  
Br.J. Haematol., 28:525-530.

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

Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate.  
Br J Haematol 107(2):275-281.

**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 non-specific mitogenic stimuli.  
Blood 99(10):3839-3843.

**D'ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA (1999)**

Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow.  
J Bone Miner Res 14(4):1115-1122.

**Dommm C, Fay J, Schünke M, Kurz B (2000)**

Die Redifferenzierung von differenzierten Gelenkknorpelzellen in Alginatkultur.

Orthopädie 29:91.

**Dunlop LL, Hall BK (1995)**

Relationships between cellular condensation, preosteoblast formation and epithelial-mesenchymal interactions in initiation of osteogenesis.

Int J Dev Biol 39(2):357-371.

**El-Amin SF, Attawia M, Lu HH, Shan AK, Chang R, Hickok NJ, Tuan RS, Laurencin CT (2002)**

Integrin expression by human osteoblasts cultured on degradable polymeric materials applicable for tissue engineered bone.

J Orthop Res 20(1):20-28.

**Erices A, Conget P, Minguell JJ (2000)**

Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood.

Br J Haematol 109(1):235-242.

**Felgner PL, Ringold GM (1989)**

Cationic liposome-mediated transfection.

Nature 337:387.

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

Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors.

Science 279(5356):1528-1530.

**Foster LJ, Zeemann PA, Li C, Mann M, Jensen ON, Møller M (2005)**

Expression profiling of membrane proteins by quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation.

Stem Cells 23(9):1367-77.

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

Expanded mesenchymal stem cells (MSC). Co-infused with HLA identical hematopoietic 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 A.J., Chailakhjan R.K., Lalykina K.S. (1970)**

The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells

Cell Tissue Kinet., 3:393-403.

**Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN (1976)**

Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs.

Exp Hematol 4(5):267-274.

**Friedenstein A.J., Latzinik N.W., Grosheva A.G., Gorskaya U.F. (1982)**

Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges,  
Exp. Hematol., 10:217-227.

**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.

**Fromique O, Marie PJ, Lomri A(1998)**

Bone morphogenic protein-2 and transforming growth factor- $\beta$ 2 interact to modulate human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation.  
J Cell Biochem 68(4):411-426.

**Fukuda K (2001)**

Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering.  
Artif Organs 25(3):187-193.

**Gospodarowicz G, Neufeld G, Schweigerer (1986)**

Fibroblast growth factor.  
Mol Cell Endocrinol 46(3):187-204.

**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(36):28067-28078.

**Griffith, L. G.; Naughton, G. (2002)**

Tissue Engineering - Current Challenges and Expanding Opportunities.  
Science 295, S. 1009-1014.

**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.

**Gronthos S, Zannettino AC, Graves SE, Otha S, Hay SJ, Simmons PJ (1999)**

Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells.  
J Bone Miner Res 14(1):47-56.

**Hall PA, Watt FM (1989)**

Stem cells, The generation and maintenance of cellular diversity  
Development 106(4):619-633.

**Hamburg University Press, Hamburg (2003)**

Stammzellforschung, Debatte zwischen Ethik, Politik und Geschäft.

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

Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal stem cells are detected by monoclonal antibodies.  
Bone 13(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(6):591-593. Review

**Ho AD, Wagner W, Franke W (2008)**

Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations.  
Cytotherapy 10(4):320-30.

**Horch RE, Bannasch H, Kopp J, Andree C, Stark GB (1998)**

Single-cell suspensions of cultured human keratinocytes in fibrin-glue reconstitute the epidermis.  
Cell Transplant 7:309.

**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.

**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 B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A, Verfaillie C.M. (2002)**

Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow,  
Nature, 418:41-49.

**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.

**Joyner C, Bennett A, Triffitt JT (1997)**

Identification and enrichment of human osteoprogenitor cells by using differentiation stage-specific monoclonal antibodies.

Bone 21:1.

**Kadiyala S, Jaiswal N, Bruder SP (1997)**

Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defect.

Tissue Eng 3:173.

**Kassem M, Kveilborg M, Eriksen EF (2000)**

Production and action of transforming growth factor- $\beta$  in human osteoblast cultures: dependence on cell differentiation and modulation by calcitriol.

Eur J Clin Invest 30(5):429-437.

**Kasten P, Beyen I, Egermann M, Suda A.J., A. Moghaddam A, Zimmermann G, Luginbühl R (2008)**

Instant stem cell therapy: characterization and concentration of human mesenchymal stem cells in vitro.

European Cells and Materials Vol. 16 (47-55)

**Klemt C (1998)**

Tissue engineered cartilage with cultured chondrocytes and a collagen sponge matrix.

In: Stark GB, Horch R, Tanczos E (eds) Biological matrices and tissue reconstruction.

Springer, Berlin Heidelberg New York, p 169.

**Kocaoemer A, Kern S, Klüter H, Bieback K (2007)**

Human AB Serum and Thrombin-Activated Platelet-Rich Plasma are Suitable Alternatives to Fetal Calf Serum for the Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue.

Stem Cells, 25:1270-1278.

**König S, Kuschnierz R, Schmelzeisen R, Schulz G (2003)**

Knochen und Knorpel aus der Zellkultur.

Die gelben Hefte 42 Suppl.2):1-8.

**Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, Boyde A, Ruspanini I, Chistolini P, Rocca R, Giardino R, Cancedda R, Quarto R (2000)**

Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones.

J Biomed Mater Res 49(3):328-337.

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

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

J Clin Oncol 18(2):307-316.

**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 USA 96(19):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 from bone after transplantation in vivo.

J Bone Miner res 12(9):1335-1347.

**C. Lange, J. Schroeder, M. v. Lioznov, A. R. Zander (2005)**

High-Potential Human Mesenchymal Stem Cells

Stem Cells and Development 14:70-80.

**Langer R, Vacanti JP (1993)**

Tissue engineering.

Science 260:920.

**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(10):890-896.

**Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström 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.

**Lemischka IR, Raulet DH, Mulligan RC (1986)**

Developmental potential and dynamic behavior of haematopoietic stem cells.

Cell 45(6):917-927.

**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.

**Lin H (1997)**

The fate of stem cells in the germline.

Annu Rev Genet 31:455-491.

**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)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> in vitro.

Calcif Tissue Int 65(2):173-180.

**Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA, Mann KG (1995)**

Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors.

J Clin Invest 95:881.

**Long MW (2001)**

Osteogenesis and bone-marrow-derived-cells.  
Blood Cells, Molecules, and Diseases 27(3):677-690.

**Machay 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.

**Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL (1998)**

Phenotypic and funktional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC) and stromal cells.  
J Cell Physiol 176(1):57-61.

**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 stroaml cells in vitro.  
J Clin invest 103(5):697-705.

**Mark MP, Prince CW, Oosawa T, Gay S, Bronckers AL, Butler WT (1987)**

Immunohistochemical demonstration of a 44 kDa phosphoprotein in developing rat bones.  
J Histochem Cytochem 35(7):707-715.

**Martin, U.; Haverich, A. (2001)**

Potentiale adulter Stammzellen: Kann auf die Verwendung embryonaler Stammzellen verzichtet werden? Gutachten im Auftrag der Konrad-Adenauer-Stiftung.  
Hannover: Medizinische Hochschule Hannover.

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

A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix.  
BiochemBiophys Res Commun. 313(3):503-508.

**Möller HD, Fu FH, Niyibizi C, Studer RK, et al (2000)**

TGF $\beta$ -1-Gentransfer in Gelenkknorpelzellen.  
Orthopädie 29:75.

**Morgan JR, Yarmush ML (1998)**

Gene therapy in tissue engineering. In: Patrick CW, Mikos AG, McIntire LV (eds) Frontiers in tissue engineering. Pergamon, New York, p 278.

**Mori K.J., Fujitake H., Ohkubo H., ItoY., Dexter T.M. (1978)**

Development of stromal cell colonies in bone marrow cell culture,  
Gann, 69:689-693.

**Mori M., Sadahira Y., Awai M. (1987)**

Characteristics of bone marrow fibroblastic colonies (CFU-F) formed in collagen gel, *Exp. Hematol.*, 15:1115-1120.

**Muragila A, Cancedda R, Quarto R (2000)**

Conal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cells Sci* 113:1161.

**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.

**M. Neubauer, C. Fischbach, P. Bauer-Kreisel, E. Lieb, M. Hacker, J. Tessmar, M.B. Schulz, A. Goepferich & T. Blunk (2004)**

Basic fibroblast growth factor enhances PPAR- $\gamma$  ligand-induced adipogenesis of mesenchymal stem cells. *FEBS Lett.* 577(1-2),277-283

**M. Neubauer, M. Hacker, P. Bauer-Kreisel, B. Weiser, C. Fischbach, M.B. Schulz, A. Goepferich & T. Blunk (2005)**

Adipose tissue engineering based on mesenchymal stem cells and basic fibroblast growth factor in vitro. *Tissue Eng.* 11(11-12),1840-1851.

**Nishida S, Endo N, Yamagiwa H, Tanizawa T, Takahashi HE (1999)**

Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J Bone Miner Res Metab* 17(3):171-177.

**Oberpenning, F.; Meng, J.; Yoo, J. J.; Atala, A. (1999)**

De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nature Biotechnology* 17, 149-155.

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

Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro *Stem Cells* 22(3):377-384.

**Owen ME, Cave J, Joyner CJ (1987)**

Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of marrow CFU-f. *J Cell Sci* 87(Pt 5):731-738.

**Owen M, Friedenstein AJ (1988)**

Stromal stem cells: marrow derived osteogenic precursors. *Giba Found Symp* 136:42.

**Peritti GM, Bonassar LJ, Caruso EM, Randefah MA, et al (1999)**

Biomechanical analysis of a chondrocyte-based repair model of articular cartilage. *Tissue Eng* 5:317.



**Piche JE, Graves DT (1989)**

Study of the growth factor requirement of human bone-derived cells: a comparison with human fibroblasts.  
Bone 10(2):131-138.

**Piersma A.H., Brockbank K.G., Ploemacher R.E., van Vliet E., Brakel-van Peer K.M., Visser P.J. (1985)**

Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow,  
Exp. Hematol., 13:237-243.

**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 mesenchymal stem cells  
Science 284(5411):143-147.

**Pittenger M.F, Marshak D.R. (2001)**

Mesenchymal Stem Cells of Human Adult Bone Marrow.  
Marshak D.R., Gardner R.L., Gottlieb D. (Hrsg): Stem Cell Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

**Planat-Benard V, Menard C, Andre M, Puceat M, Perez A, Garcia-Verdugo J-M, Penicaud L, Casteilla L. (2003)**

Spontaneous Cardiomyocyte Differentiation from Adipose Tissue Stroma Cells.  
Circ Res., Dec 1 [Epubahead of print].

**Poloni A, Maurizi G, Rosini V, Mondini E, Mancini S et al (2009)**

Selection of CD271(+) cells and human AB serum allows a large expansion of mesenchymal stromal cells from human bone marrow.  
Cytotherapy, 11(2): 153-62

**Prockop D.J. (1997)**

Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues,  
Science, 276: 71-74.

**Prockop DJ, Sekiya I and Colter DC (2001)**

Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells.  
Cytotherapy 3:393-6.

**Quarto R, Thomas D, Liang D (1995)**

Bone progenitor cell deficits and the age-associated decline in bone repair capacity.  
Calcif Tissue Int 56:123.

**Raff M (2003)**

Adult stem cell plasticity: fact or artefact?  
Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 19,1-22.

**Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaillie C.M. (2001a)**

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

Blood, 98:2615-2625.

**Reyes M, Verfaillie CM (2001b)**

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

Ann N Y Acad Sci 938:231-233.

**Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker H, Verfaillie CM (2002)**

Origin of endothelial progenitor in human postnatal bone marrow.

J Clin Invest 109(3):337-346.

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

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

J Bone Miner Res 11(3):312-324.

**M T Rojewski, B M Werber, H Schrezenmeier (2008)**

Phenotypic Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Various Tissues

Transfus Med Hemother 35:168-184.

**Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF (1986)**

The biology of platelet-derived growth factor.

Cell 46(2):155-169 Review.

**Sachs L (1987]**

The molecular control of blood cell development.

Science 238(4832):1374-1379.

**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.

**Schaefer DJ, Kiefer T, Wallmichrath J, Looden Z, et al (1999)**

Design of composite bone constructs by tissue engineering and gene therapy.

Cells Tissues Organs 166:18.

**Schmelzeisen R, Schimming R, Sittinger M (2003)**

Making bone: implant insertion into tissue-engineered bone for maxillary sinus floor augmentation – a preliminary report.

J Cranio Maxillo Surg 31:34-39.

**Schmid C, Steiner T, Froesch ER (1984)**

Insulin-like growth factor I supports differentiation of cultured osteoblast-like cells.

FEBS Lett 173(1):48-52.

**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.

**Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ (2002).**

Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects.  
Ann Thorac Surg 73(6):1919-1926.

**Shi S., Gronthos S., Chen S., Reddi A., Counter C.M., Robey P.G. , Wang C.Y. (2002)**

Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression,  
Nat. Biotechnol., 20:587-591.

**Simbonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justensen 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.

**Simmons PJ, Torok-Storb B (1991)**

Identivication 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)f4**

Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hemopoiesis.  
Prog Clin Biol Res 389:271-280.

**Sittinger M, Schultz O, Keyszer G, Minuth WW, Burmester GR (1997)**

Artificial tissues in perfusion culture.

J Artif Organs 20:57.

**Slobodianski, Alexei, (Dissertation 2006, Universität Hamburg)**

Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen zu Chondrozyten

**Spangrude GI, Heimfeld S, Weissman IL (1988)**

Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells.

Science 241(5):747-756.

**Spees JL, Gregory CA, Singh H et al (2004)**

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

Mol Ther 2004;9:747–756.

**Stevenson S, Cunningham N, Toth J, Davy D, Reddi AH (1994)**

The effect of osteogenin (a bone morphogenetic Protein) on the formation of bone in orthotopic segmental defects in rats.

J Bone Joint Surg Am 76:1676.

**Stock, U. A.; Vacanti, J. P. (2001)**

Tissue Engineering: Current State and Prospects.

Annu. Rev. Med. 52, S. 443-451.

**Tenenbaum HC, Limeback H, McCulloch CA, Mamujee H, Sukhu B, Torontali M [1992]**

Osteogenic phase-specific co-regulation of collagen synthesis and mineralization by betaglycerophosphate in chick periosteal cultures.

Bone 13(2):129-138.

**Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Massy M, Mortier C, Delforge A, Bron D (2004)**

Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation.

Differentiation. 72(7):319-26.

**Tsuda T, Kaibuchi K, Kawahara H, Fukuzaki Y, Takai Y (1985)**

Induction of protein kinase C activation and Ca<sup>2+</sup> mobilization by fibroblast growth factor in Swiss 3T3 cells.

FEBS Lett 191(2):205-210.

**Urist MR, DeLange RJ, Finerman GAM (1983)**

Bone cell differentiation and growth factors.

Science 220:680.

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

Unexpected potential of adult stem cells.

Ann N Y Acad Sci 996:231-234.

**Wagers, A.J. and Weissman, I.L. (2004).**

Plasticity of adult stem cells.

Cell 116,639-648.

**Wakitani S, Saito T, Caplan AI (1995)**

Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine.

Muscle Nerve 18(9):1417-1426.

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

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

Blood 85(9):2422-2435.

**Walsh S, Jefferiss C, Jordan GR, Screen J, Beresford JN (2000)**

Expression of the developmental markers STRO-1 and alkaline phosphatase in cultures of human marrow stromal cells: regulation by fibroblast growth factor (FGF)-2 and relationship to the expression of the FGF receptors 1-4.

Bone 27(2):185-195.

**B. Weiser, M. Neubauer, A. Goepferich, & T. Blunk (2007)**

Tissue Engineering, Fat (1),1-12 .

Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering 1

**Weissman IL (2000)**

Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution.  
Cell 100(1):157-168.

**Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB (2000)**

Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons.  
J Neurosci Res 61(4):364-370.

**Yasko AW, Lane JM, Tomin E, Bostrom M, et al (1994)**

The healing of segmental bone defects, included by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2).  
J Bone Joint Surg Am 74:659.

**Yeh LC, Tsai AD, Lee JC (2002)**

Osteogenic protein-1 (OP-1, BMP-7) induces osteoblastic cell differentiation of the pluripotent mesenchymal stem cell line C2C12.  
J Cell Biochem 87(2):292-304.

**Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, Johnstone B (1998)**

The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells.  
J Bone Joint Surg m 80(12):1745-1757.

**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.

**Younger EM, Chapman MW (1989)**

Morbidity at bone graft donor sites.  
J Orthop Trauma 3:192.

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

Stammzellforschung. Diesseits des Rubikon.  
Deutsches Ärzteblatt 99(6):A341-A343.

**Zeng H, Du JY, Zheng QX, Duan DY, Liu X, Xiong A, Kang B, Liu C (2003)**

Effect of basic fibroblast growth factor on biological characteristics of rat osteoblasts.  
Chin J Traumatol 6(4):229-233.

**Zuk, PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2002)**

Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.  
Tissue Eng 7 (2):211-228.

**Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN (2000)**

Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals.  
Arthritis Res 2(6) 477-488.

## Danksagung

Für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit und die Möglichkeit der Forschung im Labor des Institutes für molekuläre Zellbiologie des UKE danke ich Frau Prof. Dr. rer. Physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel.

Mein besonderer Dank gilt an meinen Doktorvater PD Dr. rer. nat. Peter Adamietz für die Heranführung an das Thema, für den vielseitigen fachlichen Rat sowie die engagierte Betreuung und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Großer Dank gilt allen Mitarbeitern und involvierten Kollegen aus anderen Forschungsgruppen für die wichtigen Erfahrungen, die sehr freundschaftliche Unterstützung und den Austausch in der Zeit des experimentellen Arbeitens.

Bei Herrn Prof. Dr. med. U. Schumacher und Herrn Prof. Dr. med. W. Rütter möchte ich mich ausdrücklich für die Übernahme der Gutachten bedanken.

Mein Dank gilt auch an meine Familie und meine Freunde, die mich immer unterstützt haben.

## Lebenslauf

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die Arbeit mit Thema „Optimierung der Proliferationsrate humaner mesenchymaler Stammzellen zum Zwecke des *Tissue Engineering*“ 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 die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Y. Salhi