

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation

Direktor: Professor Dr. med. Nicolaus Kröger

Regulation der Genexpression von humanen mesenchymalen Stromazellen als Funktion der Expansionsfähigkeit

Dissertation

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

vorgelegt von:

Jan Olaf Baur

aus Berlin

Hamburg 2018

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 31.01.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Claudia Lange

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Stephan Storch

Inhalt

Inhalt.....	2
1 Einleitung.....	4
1.1 Grundlagen der Stammzellentwicklung.....	5
1.2 Hämatopoetische Stammzellen	6
1.3 Humane mesenchymale Stromazellen.....	9
1.4 Anwendungsgebiete der mesenchymalen Stromazellen.....	12
1.5 Ziel der Arbeit	17
2 Material.....	18
2.1 Nährmedien.....	18
2.2 Chemikalien.....	18
2.3 Geräte	19
2.4 Verbrauchsmaterial.....	20
3 Methoden.....	21
3.1 Zellkulturen.....	21
3.2 Gewinnung von RNA und Qualitätskontrollen	23
3.3 Quantitative Realtime-PCR.....	25
3.4 Auswertung der PCR.....	29
4 Ergebnisse.....	30
4.1 Zellkulturen.....	30
4.2 Kulturdauer, Versuchsreihe 2	30
4.3 Unterschiede in den Zellkulturen der Versuchsreihe 2 in Abhängigkeit von Medium und Zusatz.....	31
4.4 PI-Konzentration	33
4.5 Vergleich der hMSC-Kulturen α MEM + PI und DMEM + FCS, Versuchsreihe 2.....	35
4.6 RNA- Isolation	46
4.7 Genexpressionsanalysen.....	47
4.8 Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf andere Wachstumsbedingungen und frühe Passagen.....	58

5	Diskussion	61
5.1	Zellmorphologie	62
5.2	Plättchenlysate-Konzentration	62
5.3	Zellkulturen/ Zellwachstum	62
5.4	Gensequenzierung	64
5.5	NET-6	64
5.6	Limitationen	65
5.7	Zusammenfassung	66
	Abstrakt	68
	Abkürzungsverzeichnis	70
	Quellen	72
	Danksagung	83
	Lebenslauf	84
	Eidesstattliche Versicherung	85

1 Einleitung

Friedenstein beschrieb im Jahr 1966 erstmals Zellen des Knochenmarks, welche an Plastik adhärent waren und die Möglichkeit besaßen, sich *in vitro* unter geeigneten Bedingungen in Fett, Knochen und Knorpel zu differenzieren und nicht der hämatopoetischen Stammzelllinie entstammen (Friedenstein A. et al, 1966). Diese wurden durch ihn als Colony Forming Units- fibroblasts (CFU-F) bezeichnet. Das Potential dieser Zellen war zum damaligen Zeitpunkt noch nicht abzusehen.

Die heute als multipotente mesenchymale Stromazellen bezeichneten Zellen kommen in fast allen adulten Geweben vor. Sie sind leicht zugänglich und bieten viele Möglichkeiten für die klinische Anwendung. Sie offenbaren vielseitige Anwendungsmöglichkeiten in der regenerativen Medizin als auch in der akuten Versorgung einzelner Krankheitsbilder. So konnten unter anderem Erfolge in der Therapie der Graft-vs-host-Disease durch die Anwendung der humanen mesenchymalen Stromazellen (hMSC) erzielt werden (Robles J. et al., 2015, Le Blanc K. et al., 2004).

Die hMSC werden als eine heterogene Zellpopulation mit vielen noch unbekanntem Untergruppen beschrieben. Aufgrund mangelnder eindeutiger Oberflächenmarker wie CD34 bei hämatopoetischen Stammzellen werden die hMSC auch heute noch nach ihren Eigenschaften identifiziert. So gelten folgende Kriterien im Konsensbeschluss als charakteristisch für hMSC: sie sind plastikadhärent, sie exprimieren CD105, CD73 und CD90, sie exprimieren nicht CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79alpha oder CD19, HLA-DR Oberflächenmoleküle und sie können *in vitro* in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten differenzieren (Dominici, M., et al., 2006).

Viele Arbeitsgruppen haben sich in der Zwischenzeit mit den klinischen Anwendungsmöglichkeiten beschäftigt. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit sind ca. 4836 Studien, die sich mit MSC befassen, entweder in Planung oder bereits abgeschlossen (<https://clinicaltrials.gov>, 03/2016).

Die anfängliche Euphorie, eine Alternative zur embryonalen Stammzelle für Forschung und Klinik gefunden zu haben, ist jedoch leicht zurückgegangen. Trotz der bisherigen intensiven Forschung sind viele Wirkmechanismen bzw. Interaktionen der hMSC noch unbekannt. Insbesondere die parakrinen Effekte der hMSC sind nicht abschließend erforscht. Dennoch zeichnen sich viele Möglichkeiten in der klinischen Anwendung ab. Für die anstehenden klinischen Studien und experimentellen Anwendungen besteht daher ein Bedarf an Zellen mit definierten Eigenschaften und einem konstanten Expansionsverhalten, um ausreichende Mengen herstellen zu können.

Ziel dieser Promotion war es daher, Markergene für ein schnelles bzw. langsames Wachstum für die Forschung und insbesondere für die klinischen Anwendungen mit einem minimalen Risiko für die Therapie beim Menschen zu isolieren. Bisher sind viele Arbeiten zu hMSC mit DMEM + FCS als Kulturmedium durchgeführt worden. FCS besitzt jedoch potentiell ein allergenes Potential und eine Gefährdung durch Zoonosen ist nicht auszuschließen (Spees JL. et al., 2004). Es wurde daher mit α MEM + PI ein alternatives Medium zu DMEM + FCS ausgewählt, um eine potentielle klinische Verwendung zu gewährleisten.

Als Untersuchungsmethoden wurden etablierte Verfahren wie Zellkulturen unter Verwendung beider Medien, Mikroarray-Analysen und die qPCR verwendet.

1.1 Grundlagen der Stammzellentwicklung

Stammzellen bilden die Urzellen eines jeden menschlichen Organismus. Sie sind in der Lage, sich unbegrenzt durch Zellteilung selbst zu reproduzieren und sich unabhängig davon in jedes Gewebe des Organismus zu differenzieren. Sie können sich durch symmetrische Zellteilung in zwei identische Tochterzellen mit den gleichen Eigenschaften oder durch eine asymmetrische Teilung in eine identische Tochterzelle und eine bereits weiter, einer entsprechenden Zelllinie folgende, differenziertere Tochterzelle (Progenitorzelle) aufteilen. Diese Zellen werden durch extrinsische Signale in ihrem Wachstum bzw. in ihrer Differenzierung angeregt und können bei Bedarf abgerufen werden. Falls diese Signalgebung unterbleibt, können die Zellen im Stadium der Progenitorzellen verbleiben.

1.1.1 Embryonale Stammzellen

Nach der Fusion einer sekundären Oozyte mit einem Spermium bilden sich in der Zygote omnipotente/totipotente Zellen, die in der Lage sind sich in jede adulte Zelle des Körpers zu differenzieren. Dies behalten die Zellen bis einschließlich zum 8-Zell-Stadium (Morula) bei. Ab dem 16-Zell-Stadium verlieren die Zellen ihre Omnipotenz und sind nur noch pluripotent. Pluripotente Zellen haben ebenfalls das Potential sich in alle adulten Zellen des menschlichen Körpers zu entwickeln, sind aber nicht mehr in der Lage, einen eigenständigen Organismus zu entwickeln. Es bildet sich zunächst die Blastozyste und im weiteren Verlauf der Trophoblast (Evans M, Kaufman M, 1981). Initial kommt es zu einer symmetrischen Zellteilung. Ab dem Bilden der Blastozyste findet eine fortschreitende Differenzierung unter Beibehalten eines Grundstocks von pluripotenten Zellen statt. Dieser Vorgang wird durch verschiedene extrinsische Signale wie z.B. LIF und das intrinsic transcription factor (TF) Netzwerk, welches die pluripotenten Kern-Faktoren OCT4, SOX2 and NANOG bein-

haltet, unterstützt bzw. beeinflusst (Illingworth R., et al., 2016). Es bilden sich die drei Keimblätter Endoderm, Ektoderm und Mesoderm. Von diesen geht die weitere Entwicklung des Embryos aus. Aus dem inneren Keimblatt, dem Endoderm, bilden sich u.a. der Gastrointestinaltrakt, Leber, Pankreas, Respirationstrakt, Schilddrüse, Harnblase und die Harnröhre. Aus dem äußeren Keimblatt, dem Ektoderm, bilden sich das Neuroektoderm und das Oberflächenektoderm. Aus dem Neuroektoderm bildet sich über das Neuralrohr das primäre zentrale Nervensystem. Aus dem Oberflächenektoderm entwickelt sich die Haut und die Hautanhangsgebilde, der Zahnschmelz, die Riechplakode, die Ohrplakode, die Linsenplakode und die Trigeminiplakode. Das Mesoderm bildet das mittlere Keimblatt. Es findet eine weitere Aufteilung in ein intraembryonales und ein extraembryonales Mesoderm statt. Das extraembryonale Mesoderm bildet die Chorionhöhle.

Das intraembryonale Mesoderm wird weiter aufgespalten in ein axiales Mesoderm (Chorda dorsalis, welche als Signalgeber der Neuralrohrentwicklung zum Tragen kommt), das paraxiale Mesoderm (Somiten und damit der Ursprung des Skelettsapparates und der Muskulatur), das intermediäre Mesoderm (Urogenitalsystem) und das laterale Mesoderm (Serosa, Peri-Epikard, Pleura und Peritoneum).

Es bilden sich die ersten adulten determinierten Stammzellen. Aus diesen bilden sich dann bei einem entsprechenden Reiz die jeweiligen Gewebezellen, welche sich später unter anderem in hämatopoetische, mesenchymale und gewebständige Stammzellen aufteilen.

Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die adulten Stammzellen erfolgen.

1.2 Hämatopoetische Stammzellen

1.2.1 Charakterisierung

Im Rahmen der mesodermalen Reifung des Embryos bildet sich zunächst der Dottersack und in weiteren Schritten erste Vorläufer des blutbildenden Systems. In den frühen Stadien kommt es zunächst in der fetalen Leber zur Bildung des fetalen Blutes. Die Stammzellen können auch noch im Nabelschnurvenenblut nachgewiesen werden. Im weiteren Reifungsverlauf übernehmen dann die später im adulten Menschen für die Blutbildung verantwortlichen Organe, Milz und Knochenmark (mit zeitlichen Einschränkungen auch der Thymus), die Aufgabe der Blutbildung (Kondo M., et al., 2003). Im adulten Menschen konnten hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark und im, durch Wachstumsfaktoren stimulierten, Blut nachgewiesen werden (Morrison S., Shah N., 1997). Es konnten also in diesen Organen die multipotenten hämatopoetischen Stammzellen nachgewiesen werden (Wu A, Till J,

Siminovitch L, McCulloch E, 1968, 1967). Charakterisiert werden diese Zellen durch ihre Oberflächenmoleküle und ihre Struktur.

Innerhalb dieser Charakterisierung wird eine weitere Unterscheidung zwischen Langzeit-hämatopoetischen Stammzellen, Kurzzeit- hämatopoetischen Stammzellen und multipotenten Progenitorzellen getroffen. Durch unterschiedliche Oberflächenstrukturen kommt es zu folgender Einteilung:

- Für die Langzeit-hämatopoetischen Stammzellen sind folgende Moleküle charakteristisch:
Thy1.1low, Flt3-, CD 34-/low, N-Cad+, Tie2+, SP+
- Für die Kurzzeit-hämatopoetischen Stammzellen sind folgende Moleküle charakteristisch:
Thy1.1low, Flt3-, CD34+
- Für die multipotenten Progenitorzellen sind folgende Moleküle charakteristisch:
Thy1.1-, Flt3+, CD34+ (Kühl S, Kühl M, Stammzellbiologie, 2012, Seite 107)

Die hämatopoetischen Stammzellen werden unter anderem auch durch die Regulation von CD45, CD14 oder CD11b charakterisiert (Petersen B. et al., 1999).

Die hämatopoetischen Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, das heißt sie sind in der Lage, sich selbst zu vervielfältigen, ohne ihre Pluripotenz aufzugeben. Eine Tochterzelle verbleibt pluripotent, die weitere differenziert sich entweder in eine lymphatische Progenitorzelle oder eine myeloische Progenitorzelle (Smith C, 2003).

Die lymphatischen Progenitorzellen bilden die Grundlage für sämtliche Lymphozyten und damit der Immunantwort. Zu diesen zählen die Makrophagen, die neutrophilen Granulozyten, die natürlichen Killer-Zellen, die B-Lymphozyten, die T-Lymphozyten und die Antigen-präsentierenden Zellen (Wu A, Till J, Siminovitch L, McCulloch E, 1968, 1967).

Die myeloische Progenitorzelle bildet im Rahmen ihrer weiteren Differenzierung festgelegte Progenitorzellen, aus denen sich die reifen nicht lymphatischen Blutzellen bilden.

Diese lassen sich weiter unterteilen:

- Die colony-forming Unit Erythrozyten, aus denen sich die Erythrozyten entwickeln
- Die CFU Megakaryozyt, aus denen sich die Thrombozyten entwickeln
- Die CFU-G/M, aus denen sich die neutrophilen Granulozyten und die Monozyten entwickeln
- Die CFU-Eo, aus denen sich die eosinophilen Granulozyten entwickeln

- Und zuletzt die CFU-Baso, aus denen sich die basophilen Granulozyten entwickeln (Lüllmann-Rauch R., Histologie, 2003, Seite 249, Abb. 13.1)

1.2.2 *Klinische Anwendungsgebiete*

Mit dem Ende des zweiten Weltkrieges und dem erstmaligen Einsatz von nuklearen Waffen in Japan 1945 zeigte sich bei den Überlebenden der Atomschläge auch zum ersten Mal die Wirkung von hohen Strahlendosen auf das menschliche Knochenmark. In den folgenden Jahren wurde nun die Wirkung von radioaktiver Strahlung auf den Organismus weiter erforscht und erste Schlüsse für die klinische Anwendung gezogen (Appelbaum F. et al., 2007). Heute ist die hämatopoetische Stammzelltransplantation eine seit Jahrzehnten etablierte Therapie bei hämatologischen, onkologischen, vererbten und immunologischen Erkrankungen (Juric M. et al., 2016). So kommt sie vor allem in der Therapie der unterschiedlichen Leukämien und des myelodysplastischen Syndroms zur Anwendung (Saber W, Horowitz M, 2016, Ljungman P., et al., 2010).

Sie ist in Kombination mit einer Radio-Chemotherapie ein wichtiger Therapiebaustein in der Therapie der akuten Leukämien (Hansen J., et al., 1980), hier insbesondere in der Therapie der akuten myeloischen Leukämie und der akuten lymphozytischen Leukämie (Impola U., et al., 2016, Blaise D., et al., 1992, Thomas E. et al., 1977). Sie kommt allerdings ebenso in der Therapie der chronischen myeloischen Leukämie (Alfonso A., et al., 2017, Gotlib J., 2017, Gratwohl A. et al., 2010, Devergie A., et al., 1995) und der Therapie der chronischen lymphozytischen Leukämie zum Einsatz (Schwarzbich M, McClanahan F, Gribben J, 2016, Ljungman P., et al., 2010). Im Rahmen der Therapie des Non-Hodgkin Lymphoms (Metayer C., et al, 2003, McSweeney P., et al., 2001) oder auch des Hodgkin- Lymphoms wird die hämatopoetische Stammzelltransplantation als Standardtherapie verwendet (Ljungman P., et al., 2010). Die hämatopoetische Stammzelltransplantation ist aber nicht nur auf die Therapie der Leukämien begrenzt. Die allogene Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen ist eine seit Jahren angewandte Therapie bei der β 0-Thalassemia major und der Sichelzellanämie. Das Langzeit-Überleben ist mit über 90% bei einer frühen Therapie vielversprechend (Srivastava A, Shaji R, 2017, Rai P, Malik P, 2016). Sie wird auch zur Therapie der schweren kombinierten Immunschwäche (SCID) (Ljungman P., et al., 2010, Grunebaum E., et al., 2006) eingesetzt. Die idiopathische aplastische Anämie ist ein weiteres Einsatzgebiet der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (Peffault de Latour R., 2016). Daneben wird eine Stammzelltransplantation auch bei soliden Tumoren eingesetzt. Ein weiteres Einsatzgebiet ist das Hochrisiko-Neuroblastom bei Kindern. Hier zeigte sich in der follow-up-Analyse ein Vorteil in der Therapie (Matthay KK. et al., 2009). In Einzelfällen werden auch Kinder und jugendliche Patienten mit einer therapieresistenten

juvenilen idiopathischen Arthritis mit einer Stammzelltransplantation therapiert (Wulffraat N., et al., 2008).

Bei all den erfolgreichen Anwendungsgebieten der Transplantation muss jedoch auch das Risikoprofil der möglichen Folgeschäden für den Patienten betrachtet werden. Die hämatopoetische Stammzelltransplantation kann eine GvHD und ein akutes Nierenversagen bei allogenen Transplantationen auslösen (Smith S., Asher A., 2017, Krishnappa V. et al., 2016). Des Weiteren kann durch die invasive Vorbehandlung eine post-transplantäre lymphoproliferative Erkrankung (PTLD) ausgelöst werden (Llaurador G., McLaughlin L., Wistinghausen B., 2017). In seltenen Fällen können thrombo-embolische Komplikationen nach einer Transplantation auftreten (Sahin U., et al., 2016). Im Rahmen der Akutphase bzw. innerhalb der ersten zwei Jahre nach der Transplantation sind Blutungen und Infektionen ein nicht zu vernachlässigender Faktor für den Outcome des Patienten (Tay J., et al., 2016, Ogonek J., et al., 2016, Santos K., et al., 2016, Lee L., et al., 2016).

1.2.3 Gewebsständige Stammzellen

Als gewebsständige Stammzellen werden diese Zellen bezeichnet, die im jeweiligen Zielgewebe vorliegen und der individuellen Geweberegeneration dienen. So finden sich diese Zellen u.a. im Hirn (Gage F., 2000), in der Leber (Forbes S., et al., 2002), im Gastrointestinaltrakt (Bjerknes M., Cheng H., 1999), in der Haut (Alonso L., Fuchs E., 2003), im Muskel (Bel A., et al., 2003) im Knochenmark und im Blut (Blau H., et al., 2001).

1.3 Humane mesenchymale Stromazellen

1.3.1 Charakterisierung

Die hMSC wurden zuerst 1966 von Friedenstein et al beschrieben. Er postulierte, dass sie multipotente, an Plastik adhärente Stromazellen des Knochenmarks sind. Diese sind *in vitro* vom fibroblastischen Phenotyp und sind multipotente Progenitorzellen von Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten. Sie wurden zunächst als Colony Forming Unit- fibroblast, dann als mesenchymale Stammzellen und zuletzt als mesenchymale Stromazellen bezeichnet. Caplan beschrieb 1991 erstmals diese Zellen als adulte multipotente mesenchymale Stammzellen. Diese Zellen seien unabhängig vom Alter des Spenders in der Lage, sich *in vitro* zu Knorpel und Knochen zu differenzieren. Mikroskopisch zeigten sich große spindelförmige Zellen und ein dichtes Zytoplasma. Aus diesem Zellenrasen bildeten sich osteogene Zellnester (CFU), aus denen unter anderem aktive Knochenbildung (Trabekel, etc.) hervorging. Des Weiteren bildete sich *in vitro* in ähnlichen Zellnestern Knorpel-, Fett-

und Sehngewebe, sowie Markstruma. In CFU behielten sie ihr multilineales Potential bei (Pittenger M. et al, 1999). In den Zellkulturen *in vitro* zeigte sich, dass 60- 80% der Zellen osteo-chondrogenes Potential entwickeln (Muraglia A. et al, 2000).

Die CFU bilden eine heterogene Masse. So besitzt ein Teil der Zellen sowohl die Möglichkeit zur Selbstregeneration, als auch zur Multipotenz, während der andere Teil der Zellen ein limitiertes Entwicklungspotenzial besitzt. Die Entwicklung der Zellen ist hochgradig von den Kulturbedingungen abhängig (Owen M., 1988). Die CFU sind heterogen mit Zonen unterschiedlich reifer Zellpopulationen. Diese lassen sich grob unterteilen in schmale, spindelförmige Zellen, die sich schnell selbst erneuern und große, platte Zellen, die sich nur langsam replizieren und reifer wirken (Mets T. and Verdonk G., 1981; Colter D. et al, 2001; Sekiya I. et al, 2002). Daraus ergibt sich ein sich schnell regenerierender Rand, bestehend aus den schmalen Zellen mit hoher Multipotenz und einem reiferen Kern aus den langsam replizierenden reiferen Zellen. Es wird davon ausgegangen, dass sich die mesenchymale Stromazelle bevorzugt asymmetrisch in je eine Progenitorzelle und eine neue Stammzelle aufteilt (Gottschling S. et al, 2006, Kobune M., et al, 2004).

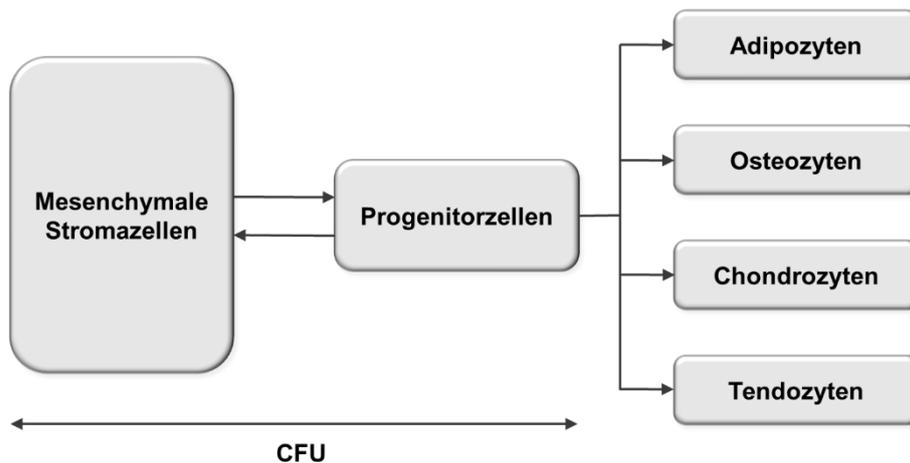


Abbildung 1: Differenzierung von hMSC, Modifiziert nach Owen M.

Diese Differenzierung ist sowohl von extrinsischen als auch von intrinsischen Faktoren abhängig. So brauchen die Zellen eine gewisse Wachstumsdichte, um sich weiter zu differenzieren (210 Zellen pro 0,05mm²). Es wurde die These aufgestellt, dass Blut- und Stromazellen von den gleichen Grundzellen abstammen, sich dann in unterschiedliche Stammzell-Linien aufspalten. Sie kommen vor allem im Knochenmark vor (Tuli R. et al, 2003, Prockop DJ, 1997). Sie wurden aber auch schon erfolgreich in anderen Geweben isoliert. So kommen die hMSC bzw. msc-like Zellen in nahezu allen adulten Geweben wie z.B. im Fettgewebe, der synovialen Membran von Gelenken, Knochen, Haut, Blut, fetaler Leber, Lunge

und dem Nabelschnurblut vor (Melief S., et al., 2013, Prockop DJ, 2007, Le Blanc K., et al., 2007, Kassis I. et al., 2006, Wagner W. et al., 2005, c. et al., 2005, Gronthos S. et al., 2001).

Fibroblasten ähnliche plastikadhärente Zellen aus dem Knochenmark oder anderen Ursprüngen werden als multipotente mesenchymale Stromazellen bezeichnet (Horwitz EM., Prather W. 2009). Im Gegensatz zu hämatopoetischen Stammzellen mit CD34+ wurde bisher kein sicherer Oberflächenmarker isoliert (Pittenger M. et al., 1999). Sie exprimieren ein Antigenmuster, welches unter anderem mesenchymale, endotheliale, epitheliale und muskuläre Anteile enthält (Minguell J., Erices A., Conget P., 2001).

Es wurden zwischenzeitlich die ISCT-Kriterien formuliert, um sowohl den Sprachgebrauch als auch die weitere Forschung zu vereinfachen. Diese ISCT-Kriterien sind wie folgt definiert:

hMSC sind Zellen, die

1. plastikadherent sind
2. CD105, CD73 und CD90 exprimieren
3. CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79alpha oder CD19, HLA-DR Oberflächen Moleküle nicht exprimieren
4. sich in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten in vitro differenzieren lassen (Dominici M, et al., 2006, Takeuchi M. et al., 2015, Muraglia A. et al., 2000).

In ihrer Entwicklung durchlaufen die hMSC eine morphologische Veränderung. Initial sind sie spindelförmig bzw. fusiform. Von anfangs dünnen, schmalen und spindelförmigen Zellen (wahrscheinlich die frühen Progenitorzellen) verändert sich ihre Morphologie zu größeren spindelförmigen und großen runden Zellen (Vogel W. et al., 2003, Sekiya I. et al., 2002). Die Größe und Form der Zellen ist unter anderem vom Kulturmedium abhängig (Solchaga L. et al., 2004). Die hMSCs machen nur 0.001% bis 0.01% der humanen mononukleären Zellen des Knochenmarks aus (Castro-Malaspina H., et al. 1980). Sie kommen im Verhältnis von einer Stromazelle zu 34.000 kernhaltigen Zellen vor (Wexler S. et al., 2003).

Sie werden häufig und auch in den meisten Publikationen durch eine Dichtegradientenzentrifuge von den anderen Zellen getrennt. Sie bilden allerdings eine heterogene Zellmasse. Sie unterscheiden sich im Vergleich untereinander im Wachstum, in der Morphologie und in der Differenzierungskapazität (Le Blanc K., Pittenger M., 2005, Sekiya I. et al., 2002) von den anderen Zellen. Die Proliferationsfähigkeit der Zellpopulationen und damit der Oberflächenproteine unterliegen Schwankungen, die sowohl von der Zell-Zell-Interaktion als auch von den Wachstumsbedingungen abhängig sind (Satomura K. et al., 2000, Krebsbach P. et al., 1999). Im Knochenmark tragen sie durch parakrine Effekte und durch unmittelbaren Zell-

Zell-Kontakt, wie z.B. durch β_1 -Integrin, zur Selbstregeneration der hämatopoetischen Stammzellen bei (Gottschling S. et al., 2006, Tavassoli M., Minguell J. 1991). Sie differenzieren sich in Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten, Tendozyten und ein Zellstruma, welches ein unterstützendes Mikroklima für hämatopoetische Stammzellen bildet (Minguell J., Erices A., Conget P., 2001).

Es besteht eine Interaktion zwischen hMSC, hämatopoetischen Stammzellen und immun-kompetenten Zellen über die Oberflächenmoleküle. Diese Interaktion zwischen den hMSC und der Umgebung wird über verschiedene Mechanismen herbeigeführt. Initial wurde die parakrine Freisetzung von Proteinen beschrieben. Ein Teil der Zell-Zell-Interaktion wird über die Oberflächenmoleküle durchgeführt (Sepúlveda J. et al, 2014). In neueren Arbeiten wurde ein bedarfsgerechter Austausch über Exosomen und ein mitochondrialer Austausch über Gap Junction Kanäle beschrieben (Liang X. et al., 2014, Islam MN. et al., 2012.)

hMSC sezernieren Cytokine, wenn sie mit immunkompetenten Zellen in Kultur gehalten werden. Diese Cytokine beeinflussen das Profil der Dendritischen Zellen, der nativen und der Effektor-T-Zellen (T1-Helferzellen, T2-Helferzellen) und der natürlichen Killerzellen. Diese Zellen werden zu einem anti-inflammatorischen oder toleranten Phänotyp beeinflusst. Eine max. Cytokinproduktion kann mit einer max. antigenabhängigen Proliferation der Zellen korrelieren (Majumdar M. et al, 2003). Insbesondere die differenzierten dendritischen Zellen Typ 1 werden angeregt, weniger Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) zu sezernieren. Die differenzierten dendritischen Zellen Typ 2 werden angeregt, die Interleukin 10-Sekretion zu steigern (Aggarwal S., Pittenger M., 2005). hMSC interagieren mit allen Zellen des Immunsystems und beeinflussen die Immunantwort u.a. durch Inhibierung der Sekretion von zwei der am stärksten proinflammatorisch wirkenden Cytokine, des TNF- α und IFN- γ . Des Weiteren geschieht dies durch eine vermehrte Expression von antiinflammatorischen Cytokinen wie Interleukin-10 (Aggarwal S., Pittenger M., 2005, Le Blanc K. et al., 2003, Zhang W. et al., 2004). Auf der anderen Seite erhöhen hMSC die Interleukin-12/18 induzierte IFN- γ Produktion von NK-Zellen. Sie erreichen dies über die Erhöhung der Interleukin-12-Rezeptor Expression und der Phosphorylierung von STAT4 (Thomas H., et al., 2014). hMSC besitzen also immunmodulatorische Fähigkeiten sowohl in anti- als auch in pro-inflammatorischer Ausprägung.

1.4 Anwendungsgebiete der mesenchymalen Stromazellen

Die hMSC bieten aufgrund ihrer Multipotenz ein weites Einsatzspektrum in der regenerativen Medizin und im Tissue Engineering. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die möglichen Anwendungsbereiche der hMSC erfolgen.

1.4.1 Herzinfarkt

Die kardialen Ischämien bzw. der stattgehabte Herzinfarkt sind in unserer westlichen Welt eine häufige Pathologie, in Folge derer durch den Sauerstoffmangel die Myokardzellen rasch geschädigt werden bzw. absterben. Aus diesem Grund war und ist eine regenerative Anwendung der MSC im Sinne eines direkten Zellersatzes bereits früh in den Fokus der Forschung gerückt. In frühen Studien wurde eine Anwendung von MSC nach einem Herzinfarkt untersucht und eine Neubildung von Myokardzellen gefunden (Yeh E. et al., 2003, Makino S. et al., 1999, Toma C., et al. 2002). Als möglicher Mechanismus wurde die Transdifferenzierung postuliert. Eine direkte Transdifferenzierung der MSC oder Fusion von Myokardzellen und hMSC konnte jedoch in folgenden Studien nicht überzeugend nachgewiesen werden (Jaquet K., et. al., 2005). In neueren Studien wurden die Verbesserungen der Myocardregeneration auf parakrine Effekte mit Reduzierung der Narbenbildung und endogenen Reparaturprozessen zurückgeführt (Levit R. et al., 2013). Es wurde eine Zunahme der Kollateralkreisläufe nach hMSC-Gabe, insbesondere bei jüngeren Probanden, beobachtet. Diese Verbesserung der Durchblutung wurde durch kollaterales Remodelling und auf parakrine Effekte mit u.a. MCP-1, welches das kollaterale Gefäßwachstum anregt, zurückgeführt. Die hMSC haben sich dabei nicht in die Gefäßwand integriert (Liu Y. et al., 2014). Im Schweineversuch konnten MSC die Herzleistung bei einem chronischen Myokardinfarkt durch eine Steigerung der Angiogenese erhöhen (Sato T. et al., 2011).

1.4.2 Hirninfarkt/ Hirnschädigung

Die hMSC produzieren eine große Anzahl von arteriogenen Zytokinen. Eine lokale Injektion von hMSC im Kleintiermodell führte ähnlich wie bei dem ischämisch veränderten Gewebe eines Herzinfarktes zu einer vermehrten Kollateralisierung und damit zu einer verbesserten Perfusion. Als Folge dessen war im Mäuseversuch die cerebrale Gewebeschädigung und damit die neurologische Ausfallssymptomatik einer Kleinhirnschämie geringer ausgeprägt. Die parakrinen Faktoren der hMSC zeigten eine neuroprotektive Wirkung im Rattenmodell bei einer traumatischen Hirnschädigung und eine verbesserte Wundheilung. Dies wurde unter anderem auf eine Reduzierung des oxidativen Stresses und eine erhöhte Zellmigration zurückgeführt (Torrente D. et al., 2014, Donega V. et al., 2014). Ähnliche parakrine Mechanismen wurden nach intramuskulären Injektionen bei einer muskulären Ischämie im Rattenmodell beobachtet. Sie wurden auf eine lokale Freisetzung von arteriogenen Zytokinen zurückgeführt (Kinnaird T. et al., 2004).

1.4.3 Akute Graft-vs-host-disease

Die Graft-vs-host-disease (GVHD) ist eine Komplikation bzw. Erkrankung, die nach einer allogenen Stammzell- oder Knochenmarkstransplantation auftreten kann. Sie tritt in ca. 30% - 60% aller Fälle auf. Der Pathomechanismus wird durch einen Angriff der Spender-T-Lymphozyten (T-Gedächtniszellen) gegen den Empfänger erklärt. Es werden zwei unterschiedliche Typen der GVHD unterschieden. Eine akute Form, die in den ersten 100 Tagen nach der Transplantation auftritt und eine chronische, welche nach ca. drei Monaten beginnt und lebenslänglich anhalten kann. Die Symptomatik kann unterschiedliche stark ausgeprägt sein (mild bis schwer). Die akute Form wird weiter in eine klassische, eine late-onset und eine persistierende und rekurrende akute GVHD unterteilt. Die Therapie beinhaltet neben einer symptomatischen eine immunsuppressive medikamentöse Therapie (Zeiser R. et al., DAG-KBT, 2015). Insbesondere die steroidtherapierefraktäre akute GVHD stellt mit ihrer hohen Morbidität und Mortalität (ca. 90%) ein wichtiges klinisches Einsatzspektrum für MSC dar (Schüle S., Berger A., 2015, Munneke J. et al., 2015). Die aktuellen Ergebnisse zeigen, dass gerade hMSC mit ihren T-Zellmodulierenden Eigenschaften bei therapierefraktären Fällen gute Erfolge bringen, denn die hMSC beeinflussen das Immunsystem über parakrine Effekte auf Basis der T-Zellen (Le Blanc K., Mougiakakos D., 2012, Meirelles L da S., et al., 2009). In Studien konnte gezeigt werden, dass MSC das Risiko einer GVHD über eine IFN- γ -Aktivierung und damit zu einer Umprogrammierung der MSC in einen anti-inflammatorischen Phänotyp reduzieren (Polchert D. et al., 2008, Thomas H., et al., 2014). Im Mausmodell konnten die Versuchstiere bei einem Auftreten von GVHD von einer MSC-Gabe profitieren. Durch eine Runterregulation der T-Zell-Expression von IFN- γ , TNF- α , IL-2 und IL-17 wurde die Immunantwort moduliert und konnte damit die Pathogenese der Erkrankung entscheidend beeinflussen bzw. therapieren, wenn nicht sogar einer Erkrankung vorbeugen (Robles J. et al., 2015, Le Blanc K. et al., 2004). Es wurden Hinweise auf eine Besiedelung der Milz, und damit einen direkten Eingriff in die T-Zellproduktion des Empfängers nachgewiesen (Auletta J. et al., 2015). In einer Metaanalyse von Hashmi S. et al. aus dem Jahr 2016 konnte eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 63% nach sechs Monaten bei einer steroidrefraktären akuten GVHD und der Gabe von MSC nachgewiesen werden. Es wurde auf die weitere Notwendigkeit einer großen randomisierten Studie zu diesem Thema auch in weiteren Publikationen, die einen Benefit der hMSC-Therapie nachgewiesen haben, hingewiesen (Munneke J. et al., 2015). Eine Beziehung zwischen Überlebenswahrscheinlichkeit und dem Alter des Zellspenders, des Mediums oder der Dosis der hMSC konnte nicht nachgewiesen werden.

1.4.4 *Diabetes mellitus*

Diabetes mellitus, sowohl Typ I als auch insbesondere Typ II sind verbreitete Krankheiten in der entwickelten Welt. Mit dieser Erkrankung gehen chronische degenerative Folgeerscheinungen einher. Zu diesen gehören unter anderem die diabetische Polyneuropathie, die diabetische Nephropathie, die diabetische Retinopathie, die Arteriosklerose und diverse Wundheilungsstörungen. Die hMSC bieten hier verschiedene Therapieansätze. Die Fettleibigkeit, die mit dem Diabetes mellitus Typ II oftmals einhergeht, sowie die sklerotischen Veränderungen der peripheren Blutgefäße, führen zu einer Mangelversorgung der Haut und damit der Wunde. Dies führt zu einem permanenten unterschweligen inflammatorischen Zustand und bildet somit den zentralen Ansatzpunkt für eine Therapie mit hMSC. Es wird davon ausgegangen, dass durch parakrine Effekte und eine lokale Regulation der Mikroumgebung ein Umfeld für eine beschleunigte Wundheilung geschaffen wird (Li H., Fu X., 2012). Im Kleintiermodell konnten so bereits erste Ergebnisse erzielt werden (Kato J. et al., 2014, Argôlo Neto N. et al., 2012, Sasaki M. et al., 2008). Durch parakrine Effekte, z.B. VEGF und NGF, tragen hMSC zur Angiogenese bei chronischen Wunden und somit der Wundheilung bei (Shen L. et al., 2013). Sie wirken wie auch bei anderen Erkrankungen anti-inflammatorisch (Sasaki M. et al., 2008).

Im diabetischen Mausmodell wurde einige Tage nach erfolgter hMSC-Infusion eine erhöhte Anzahl von β -Zellen im Pankreas und ein erhöhter Insulinspiegel im Blut festgestellt (Limbert C. et al., 2011, Lee R. et al., 2006). In den Glomeruli der Nieren wurden hMSC nachgewiesen, welche zu einer morphologischen Verbesserung/ Wiederherstellung der Niere führten (Lee R. et al., 2006). MSC konnten im Mausmodell durch das Schaffen einer zytoprotektiven Mikroumgebung antiapoptotisch einer diabetischen Retinopathie vorbeugen (Ezquer M. et al., 2016)

1.4.5 *Asthma Bronchiale*

hMSC haben im Mäuseversuch über eine Regulation der T-Zellen einen Rückgang der chronischen inflammatorischen Prozesse zur Folge (Bonfield T. et al., 2010).

1.4.6 *Akute Nierenschädigung*

Im Mausversuch konnte ein protektiver Effekt bei tubulären Schädigungen, u.a. durch Cisplatin, in Form von antiapoptotischen und proliferatorischen Effekten auf die peritubulären Kapillaren nachgewiesen werden (Večerić-Haler Ž. et al., 2016, Yuan L. et al., 2011). Des Weiteren wurden Verbesserungen der diabetischen Nephropathie bei der Ratte nachgewiesen (Shuai Wang et al., 2013). Es wurden parakrine Effekte durch MSC im Rattenmodell

beschrieben, welche über eine Reduzierung der inflammatorischen Reaktion zu einer Verbesserung der Nierenleistung beim akuten Nierenversagen führten (Lange C., et al., 2005, Tögel F., et al., 2005).

1.4.7 Osteogenesis imperfecta

Die Osteogenesis imperfecta, ist eine sowohl autosomal-dominant als auch autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung der Knochensynthese. Die Erkrankung tritt in unterschiedlicher Ausprägung durch eine Biosynthesestörung der Kollagenbildung auf. Sie tritt mit einer Inzidenz von 1: 15.000- 20.000 Geburten auf. Betroffen ist hier hauptsächlich die Bildung des Kollagen Typ 1 (COL1A1 und COL1A2). Insgesamt sind elf verschiedene Untertypen bekannt. In Kleintierversuchen konnte bei MSC-transplantierten Mäusen eine niedrigere Rate von Knochenbrüchen u.a. durch eine höhere Plastizität der Knochenstrukturen nachgewiesen werden (Jones G. et al., 2014). In klinischen Versuchen und individuellen Heilversuchen konnten erste Erfolge in der Behandlung von Osteogenesis imperfecta festgestellt werden (Chan J., Götherström C., 2014, Otsuru S. et al., 2012).

1.4.8 Rückenmarksverletzungen / Degenerative Verletzungen des Bewegungsapparates

In Rattenversuchen konnte nachgewiesen werden, dass sich die Tiere nach einem spinalen Trauma schneller neurologisch erholen und somit einen funktional besseren Outcome haben. Des Weiteren konnten durch hMSC inflammatorische Prozesse, welche im Rahmen der spinalen Schädigung aufgetreten sind, unterdrückt werden und so ebenfalls zu einer schnelleren Regeneration beitragen (Park D. et al., 2013, Sheth R. et al., 2008).

Im Rattenmodell wurden neue Muskelstränge durch MSC gebildet (Dezawa M. et al., 2005, De Bari C. et al., 2003) und eine effizientere Wundheilung bei chronischer Wundheilungsstörung nachgewiesen (Malhotra S. et al., 2016). In Kombination mit einem Hydrogel wurde eine Neubildung von Nucleus pulposus-Zellen beschrieben, welche somit zur Regeneration bei Bandscheibendegeneration beitragen können (Thorpe A. et al., 2016).

1.4.9 Sepsis

Die Sepsis ist ein Systemisches Inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS) mit Nachweis eines Keimes. Dabei ist es unerheblich, ob nun ein Bakterium oder ein Pilz als ursächlich anzusehen ist. Die Sepsis ist, falls sie nicht früh diagnostiziert und therapiert wird, in vielen Fällen durch eine hohe Sterblichkeit gekennzeichnet. hMSC haben in Versuchen einen positiven Benefit durch eine Immunmodulation und eine Neuprogrammierung der

Makrophagen u.a. mit Prostaglandin E₂ und der neutrophilen Granulozyten hin zu einem anti-inflammatorischen Phänotyp aufgezeigt (Németh K., et al., 2009). Es kam im Mäuseversuch zu einer Freisetzung von anti-microbial Peptiden, Interleukin 10 und weiteren parakrinen Effekten, welche sich günstig auf den weiteren Krankheitsverlauf auswirkten (Lombardo E., van der Poll T., DelaRosa O., Dalemans W., 2015).

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein Prädiktor bzw. Markergen in einer niedrigen Passage (P0, P1) zu definieren, um so eine valide Einschätzung des möglichen Spendermaterials bezüglich des zu erwartenden Gesamtzellwachstums und der Geschwindigkeit des Zellwachstums durchführen zu können.

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit ist es, die Übertragung der bereits bekannten Zellkulturergebnisse auf ein alternatives Kulturmedium zu prüfen. So wurden die Zellkulturen sowohl mit dem ursprünglichen Kulturmedium DMEM + FCS, als auch mit einem neu eingeführten Medium α MEM + PI durchgeführt.

Um gleichbleibende Vergleichsbedingungen zu schaffen, wurde auf bereits etablierte Verfahren wie z.B. standardisierte Zellkulturen und die qPCR zurückgegriffen. Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 56 Zellkulturen von 28 Spendern und neun Zellkulturen einer früheren Spendergruppe miteinander verglichen.

Im Besonderen wurden folgende Hypothesen formuliert:

Hypothese 1: Es besteht ein Unterschied in der Zellmorphologie bezüglich unterschiedlicher Wachstumsbedingungen.

Hypothese 2: Es besteht ein Unterschied in der Genexpression bezüglich unterschiedlicher Wachstumsbedingungen.

Hypothese 3: Die Genexpression der Zellen ist bereits von Unterschieden in der individuellen Zellkulturpflege abhängig.

Hypothese 4: Das Wachstum der α MEM- Kulturen ist von der PI-Konzentration abhängig.

Hypothese 5: Es gibt ein Markergen für ein schnelles bzw. langsames Zellwachstum in den frühen Passagen P0 und P1 für das Kulturmedium DMEM + FCS.

Hypothese 6: Es gibt ein Markergen für ein schnelles bzw. langsames Zellwachstum in den DMEM + FCS- Kulturen, welches sich auch auf Kulturen mit α MEM + PI übertragen lässt.

2 Material

2.1 Nährmedien

DMEM, invitrogen, Paisley UK

α MEM, BioWhittaker, Lonza, B-4800 Verviers Belgium

Ultraglutamine 1, BioWhittaker, Lonza, B-4800 Verviers Belgium

DPBS, GIBCO, invitrogen, Paisley UK

FCS, BioWhittaker/Lonza

Heparin-Natrium-25000-ratiopharm, Ulm, DE

2.2 Chemikalien

2-Mercaptoethanol min. 98%; Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA

Absolut Ethanol, J.T.Baker, Mallinchröd Baker B.V., Deventer-Holland (8006)

Essigsäure 3%

PCR-Wasser, J.T. Baker, Mallinchröd Baker B.V., Deventer-Holland

Aqua ad iniectiones, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim DE

Guanidiniumthiocyanat

Ethidium bromide solution 10 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA

Agarose electrophoresis grade, invitrogen, Paisley UK (15510-027)

Tris Acetate-EDTA buffer, 10x konzentriert, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA

RNeasy Kit, Qiagen Hilden DE (74104)

QIAshredder, Qiagen, Hilden, DE (79654)

Superscript III Kit, invitrogen, Paisley UK (# 18080-044)

RNAseOut, invitrogen, Paisley UK (# 10777-019)

OligodT(20), invitrogen, Paisley UK (# 18418-020)

10mM dNTPs, Fermentas

DNA Purification Kit, Qiagen Hilden DE (28004)

SYBR Premix EX Taq, TaKaRa Bio Inc., F. Hoffmann-La Roche Ltd, Alameda, Ca USA (RR0041)

Türk'sche Lösung, Merck KGaA, Darmstadt, DE

10x DNA loading buffer

100 bp DNA Marker

80% Ethanol vergällt, Walter-CMP Kiel, Kiel, DE

2.3 Geräte

Zentrifugen

Heraeus Instruments, Biofuge pico, Hanau, DE

Hettich-Zentrifugen, Rotina 46 R, Tuttlingen DE

Eppendorf, Centrifuge 5415 C, Hamburg DE

Brutschrank

Hera cell 240, Heraeus Instruments, Hanau, DE

Hera freeze, Heraeus Instruments, Hanau, DE

Liebherr premium, Aut

Liebherr profi line, Aut

Neubauer Zählkammer, P. Marienfeld GmbH & Co. Kg, Lauda-Königshofen, DE

Work bench, Hera safe, Heraeus, Hanau, DE

Olympus CKX41, Olympus Co., Tokyo, JP

Thermomixer 5436, Eppendorf GmbH, Hamburg DE

Biometra UNO-Thermoblock, Biotron, Göttingen DE

IKA-Combimag RCT, Janke und Kunkel Kg, IKA Werk, Staufen i. Breisgau DE

MX 3.000 P, Stratagene, Amsterdam NL

Pipetus, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE

Eppendorf Pipetten 0,5-10ul, 10-100ul, 100-1000ul, Eppendorf GmbH, Hamburg, DE

Elektrophoresekammer, Serva, Heidelberg, DE

Energiequelle, Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg, USA

REAX control, Heidolph, Schwabach, DE

Mikrofuge sprout, Biolabproducts, Bebensee, DE

Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, USA

Kamera, Kaiser RA 101, DE

UV-Tisch Fluor_Link, AGS Heidelberg, DE

Bioanalyser, Agilent Technologies, Santa Clara, USA

2.4 Verbrauchsmaterial

Pipettenspitzen, Biosphere Filter Tips 10µl, 100µl, 1000µl, Sarstedt AG, Nümbrecht, DE

Stabpipetten 5ml, 10ml, 25ml, Sterological Pipet, Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA

Falcon Tubes 15ml, 50ml, cellstar greiner bio-one, Frickenhausen, DE

Eppendorf Tubes 1,5ml, cellstar greiner bio-one, Frickenhausen, DE

Eppendorf Tubes 0,5 ml, cellstar greiner bio-one, Frickenhausen, DE

96 well tubes, Sarstedt AG, Nümbrecht, DE

Deckel für 96 well tubes, Sarstedt AG, Nümbrecht, DE

Handschuhe, Peha soft, Paul Hartmann Ag, Heidenheim, DE

Handschuhe, Nitra-Tex, Ansell Limited, Tamworth, Staffordshire, UK

25cm² Tissue Culture Flask T25, Becton Dickinson Labware, Le Point De Claix, France

3 Methoden

3.1 Zellkulturen

3.1.1 Herstellung eines Plättchenlysats

Zur Herstellung des Plättchenlysats wurden mindestens zehn humane Buffy Coats, die von der Blutbank des UKE zu Verfügung gestellt worden sind, gepoolt. Diese wurden in 50 ml Falcon Tubes aufgeteilt und bei 200 rcf für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert (Rotina 46R). Von den beiden entstehenden Phasen wurde die obere Phase, die Plasma, Thrombozyten und als Verunreinigung Leukozyten enthält, abgenommen und davon die Zellzahl bestimmt. Eine Probe zur Bestimmung der Leukozytenanzahl (10 µl) wurde entnommen, mit 90 µl Türk'scher Lösung verdünnt und 10 Minuten inkubiert. Die Türk'sche Lösung färbt selektiv nur kernhaltige Zellen an. So können Erythrozyten und Thrombozyten voneinander abgegrenzt werden. Nun wird mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer die Anzahl der Leukozyten in der Probe bestimmt ($\text{Anzahl Leukozyten gesamt/ml} = \text{Anzahl Leukozyten gezählt} / 4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$).

Für die Thrombozytenzählung wurden drei verschiedene Verdünnungen mit Thrombo count angesetzt (1:100, 1:500, 1:1000) und ebenfalls mittels Neubauer Zählkammer ausgezählt. Das Thrombo count hämolysiert die Erythrozyten und lässt die Thrombozyten unter dem Durchlichtmikroskop hell leuchten. Aus den drei Zählungen wird der Mittelwert errechnet ($\text{Thrombozyten} \times 10^9/\text{ml} = (\text{Thrombozyten}/80) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 4 \times 10^4$).

Das unverdünnte Plasma wurde in 1ml Aliquots bei -80°C gelagert. Die Thrombozytenanzahl lag nicht unter $3 \times 10^9/\text{ml}$.

3.1.2 Studienpopulation

Zur Gewinnung von hMSC wurde menschliches Knochenmark verwendet, welches von Knochenmarkspenden aus der Klinik für Stammzelltransplantation (UKE Hamburg) stammte. Es lag ein Votum der Hamburger Ethikkommission vor. Die Spender unterschrieben eine Einwilligungserklärung zur Abgabe von Knochenmarkaspirat für Forschungszwecke. Das Knochenmark wurde unter aseptischen Bedingungen im Operationssaal per Stanzbiopsie aus den Darmbeinschaufeln entnommen. Es wurden hierbei mehrere 10 ml Spritzen Knochenmark entnommen. Die erste 10 ml Spritze wurde für die Forschungsgruppe verwendet. Das übrige Knochenmark wurde als Transplantat für Patienten der KMT mit unterschiedlichen hämatologischen bzw. onkologischen Erkrankungen verwendet.

3.1.3 Zusammensetzung verwendeter Kulturmedien

Die folgenden Medien wurden für die Zellkulturen der jeweiligen Spender verwendet.

DMEM:

DMEM mit 10% FCS + 1% Ultraglutamin 1

α MEM:

α MEM mit 1% Ultraglutamin 1 und 5% PI und 5 IU/ml Heparin

3.1.4 Isolierung hMSC

Zur Isolation der hMSC musste das Knochenmark aufbereitet werden. Mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation wurden die verschiedenen Bestandteile der Knochenmarksspende voneinander getrennt. Dafür wurde das Knochenmark 1:2 mit PBS verdünnt, auf 15ml Ficoll (1,077g/ml) geschichtet und bei 800 rcf für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Dadurch bildeten sich vier Phasen. In der untersten Phase befanden sich Erythrozyten und Granulozyten. In der darüber liegenden nächsten Phase befand sich das Ficoll. Dem Ficoll lagerte sich eine graue, sehr dünne Schicht auf. Dieser Monolayer enthielt mononukleäre Zellen und die gewünschten hMSC. Die oberste Phase bestand aus Plasma, PBS und Fett. Die mononukleäre Schicht wurde vorsichtig mit einer Stabpipette abgenommen, mit PBS gewaschen und die Zellzahl mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt (10 μ l in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung mit Essigsäure).

Es wurden 1×10^7 Zellen in je eine T25 (Tissue flask mit 25cm² Oberfläche) mit den entsprechenden Medien eingesät. Es wurde jeweils eine Kultur pro Medium (α MEM + PI/DMEM + FCS) angesetzt.

3.1.5 Kultivierung hMSC

Die frisch eingesäten Zellkulturen wurden alle drei Tage mit frischem Medium versorgt. Das Medium wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Bei den ersten beiden Mediumwechseln kam ein Waschschrift mit PBS hinzu. Hierbei wurden die Zellen nach Entnahme des Kulturmediums, mit 5 ml PBS gespült und dieses anschließend wieder entnommen. Der Mediumwechsel, wie auch alle weiteren Arbeitsschritte mit den Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Arbeitsbank mit laminarer Luftströmung durchgeführt. Die Kulturen wurden in einem Brutschrank bei konstanten Umgebungsbedingungen von 37°C, 21% O₂-Gehalt und 5% CO₂-Gehalt inkubiert.

3.1.6 Ernten, Passagieren der hMSC

Die Kulturen wurden täglich unter einem Mikroskop auf ihr Wachstum bzw. ihre Zelldichte überprüft. Erreichte eine Kultur eine 75% - 80% Konfluenz des Zellrasens, musste diese T25-Kulturflasche „trypsinisiert“ werden, da es ab einer gewissen Zelldichte zu einer Hemmung des Zellwachstums kommen kann. Zunächst erfolgte das Absaugen des Mediums, gefolgt von einer Waschung mit 5ml PBS und einer Zugabe von 1 ml 0,05% Trypsin auf die Zellen. Das Trypsin löste die plastik- adhärenen Zellen vom Untergrund („Trypsinieren“). Trypsin ist eine Endopeptidase, welche die extrazellulären Proteine und damit die Verbindungen zwischen Zelle und Plastik spaltet. Das Trypsin wurde, nachdem alle Zellen sich vom Untergrund gelöst haben, mit 4ml des jeweiligen Kulturmediums inaktiviert. Anschließend wurde die Zellzahl mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt ($\text{Zellzahl/ml} = n(4) \times \text{Verdünnungsquotient} \times 10^4/\text{ml}$, $\text{Gesamtzellzahl} = \text{Zellzahl/ml} \times 5\text{ml}$).

Nun wurden $1,25 \times 10^4$ Zellen in eine neue T25-Kulturflasche eingesät, d.h. 500 Zellen/cm². Die übrige Zellsuspension wurde bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert, gewaschen und in ein 1,5 ml Tube übertragen. Es wurde nochmals bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Pellet trocken bei -80°C gelagert.

Die Kultur direkt nach der erstmaligen Aussaat wurde als P0 bezeichnet. Nach jeder Passage wurde sie dann als P1, P2 etc. bezeichnet. Aus den jeweils bestimmten Zellzahlen der jeweiligen Passagen wurde das kumulative Wachstum in Abhängigkeit zum Kulturmedium bzw. zu den Medium-Zusätzen bestimmt und in Form einer Wachstumskurve dargestellt.

3.2 Gewinnung von RNA und Qualitätskontrollen

3.2.1 RNA-Isolierung aus Primärzellen

Aus den im Vorkapitel gewonnenen Pellets wurde im nächsten Schritt RNA isoliert.

Das Pellet wurde, um der Aktivität von RNasen vorzubeugen, auf Trockeneis gelagert. Gearbeitet wurde mit dem RNeasy Kit (Qiagen).

Auf das noch gefrorene Pellet wurde RLT-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol gegeben. Der Puffer dient der Lyse der Zellen und das β-Mercaptoethanol spaltet Disulfidbrücken und beugt so RNase-Aktivität vor. Nun wurde das Gemisch eine Minute mit dem Vortex gut gemischt, um die Zellen aufzubrechen und die RNA freizusetzen.

Nachfolgend wurde das Gemisch homogenisiert, indem es auf QIAshredder-Säulen (Qiagen) pipettiert und zentrifugiert (zwei min bei 14.000 rpm) wurde. Der Durchlauf der qia-shredder-Säulen wurde 1:2 mit 70%-igem Ethanol verdünnt und auf RNeasy Säulen gegeben, an denen die RNA gebunden wird. Dann folgten gemäß dem Kit-Protokoll mehrere Waschschrte mit den Puffern RW1 und RPE. Es folgte ein Trockenschritt und ein Elutions-schritt. Für die Elution wurden 30 µl auf 70°C vorgewärmtes H₂O auf die Säule gegeben, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Durchlauf enthielt die RNA und wurde bei -80 °C gelagert. Die Konzentration der RNA wurde mit Hilfe eines Computergestützten NANO Drop (Photometer) errechnet. Um die Qualität der RNA sicherzustellen, wurde ein Kontrollgel der RNA durchgeführt.

3.2.2 RNA Qualitätskontrolle via Agarosegel

500 ng RNA wurde mit 8 µl H₂O und 8µl RNA loading buffer (Fermentas) gemischt und bei 70 °C 10 min denaturiert. Anschließend wurde das Gemisch eine Minute lang auf Eis inkubiert. Es wurde ein 1% Agarosegel mit Ethidiumbromid und Guanidiniumthiocyanat verwendet. Aufgetragen wurden 500 ng RNA pro Tasche. Die Elektrophorese wurde bei 70 Volt für 60 min durchgeführt. Das Gel wurde auf einem UV-Tisch ausgewertet und photographisch dokumentiert. Bei qualitativ guten RNAs bilden sich zwei Banden, die S18- und die S28- Bande (ribosomale Banden). Diese wurden als Qualitätsmerkmal definiert.

3.2.3 RNA Qualitätskontrolle via Bioanalyser

Als weitere Qualitätskontrolle der gewonnenen RNA wurde diese per Elektrophorese im Bioanalyser auf Verunreinigungen überprüft. Hier galt es, ebenfalls eine möglichst gute Darstellung der Banden für S18 und S28 zu erreichen. Eine RNA Integrity Nummer (RIN) von 10,0 gilt als Optimum bei einer minimalen Verunreinigung. Als Ziel wurde eine RIN von 8-9,5 definiert, um so eine maximale Qualität der RNA für die weiteren Versuche zu erreichen.

3.2.4 cDNA-Synthese

Bei der anschließenden cDNA-Synthese wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Diese diente als Grundlage für die quantitative PCR. Als Grundlage für die c-DNA-Synthese dienten 500 ng RNA der hMSC und das Superscript III Kit von Invitrogen. Das Superscript III Kit beinhaltet die in Tabelle 1 genannten Bestandteile. Die RNA wurde mit 50 µM Oligo-(dT) 20 Primer (Invitrogen), 10 mM Nukleotidmix (Fermentas) und 13 µl Aqua ad iniectionem gemischt und bei 65 °C für fünf Minuten denaturiert. Es erfolgte eine einminütige Inkubation auf Eis.

Tabelle 1: Komponenten für die cDNA-Synthese

RNA	500 ng
Oligo(dT)20 50 µM	1 µl
10 mM dNTP	1 µl
H ₂ O	Ad 13 µl

Jeder Reaktion wurden die in Tabelle 2 benannten Bestandteile hinzugegeben. Für die Synthese wurde der Ansatz im Biometra Thermoblock für 60 min bei 60 °C inkubiert und anschließend für 15 min auf 70 °C erhitzt, um die reverse Transkriptase zu denaturieren. Die entstandene cDNA wurde mit 80 µl destilliertem H₂O auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Tabelle 2: Zusammensetzung für einen Ansatz Mastermix

5x Strangpuffer	4 µl
100 mM DTT	1 µl
RNaseOut	1 µl
Superscript III	1 µl

3.3 Quantitative Realtime-PCR

Durch ein Microarray Experiment mit hMSC im Vorversuch wurden hoch-bzw. herunter-regulierte Gene ermittelt. Diese sollten durch quantitative PCR validiert werden.

3.3.1 Primerauswahl

Die Primer wurden mit Hilfe des Primer 3 Programs (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3_www.cgi, 03/2007) ausgewählt.

Die Primer für das jeweilige Gen sollten ein Temperaturspektrum von T_m= 57-65 °C, eine Länge von 18-27 bp und einen GC-Gehalt von 40-60 % haben. Sein Amplikon sollte ca. 150-300 bp groß sein. Auch sollten komplementäre Bereiche in den Primern (Sekundärstrukturen) und Nukleotidwiederholungen (z.B. AAAA) vermieden werden. Am 3'-Ende der Primer sollten zwei Guanin oder Cytosin bp liegen. Diese dienen einer besseren Bindung und Elongation (GC clamp) während der PCR. Die Synthese der Primer erfolgte durch

Eurofins MWG. Der Primer musste vor dem Einsatz auf eine Konzentration von 100 pmol/ μ l = 100 μ M mit PCR-Wasser angesetzt werden. Der Ansatz wurde nochmals 1:10 auf 10 pmol/ μ l verdünnt und bei -20°C gelagert.

3.3.2 Fluoreszenzfarbstoff/ SYBR-Green

Als Fluoreszenzfarbstoff diente SYBR-Green I, ein nucleinsäurebindender Farbstoff, der hochspezifisch in der kleinen Furche der Doppelstrang DNA (dsDNA) interkaliert. Das SYBR Green ändert sein Emissionsspektrum bei einer Anregung von 497 nm und zeigt eine Emission bei 520 nm. Das Fluoreszenzsignal ist dann direkt proportional zur Menge der dsDNA. Der Nachteil besteht darin, dass das SYBR-Green an jede dsDNA bindet und somit auch an die sogenannten Primer-Dimer-Komplexe. Diese entstehenden Komplexe sind Nebenprodukte der PCR. Zusätzlich zum SYBR-Green wurde ROX II eingesetzt, um Pipettiergenauigkeiten und ein eventuelles Hintergrundrauschen auszugleichen.

Für die quantitative PCR wurde das SYBR Premix EX Taq (TaKaRa Bio Inc., F. Hoffmann-La Roche Ltd) verwendet. Eine Reaktion besteht aus den in Tabelle 3 benannten Bestandteilen. Die verwendete Hot Start Polymerase trägt eine Schutzkappe, die erst bei 95°C inaktiviert wird.

Tabelle 3: Zusammensetzung für einen Ansatz

2x Premix Ex Taq	12,5 μ l
cDNA	2 μ l
Sense Primer	0,5 μ l
Antisense Primer	0,5 μ l
ROX II	0,5 μ l
H ₂ O	9 μ l

Eine PCR lässt sich in folgende Phasen aufteilen:

1. Die initiale, lineare Phase, deren Fluoreszenz sich nicht vom Hintergrundrauschen abhebt.
2. Die frühe exponentielle Phase, in der sich die Fluoreszenz des PCR-Produkts erstmals signifikant über das Hintergrundrauschen abhebt (Schwellenwert der Fluoreszenz)
3. Die logarithmisch-lineare Phase mit einem optimalen Verhältnis von allen PCR Bestandteilen und daher optimalen Vervielfältigungsbedingungen.

4. Die Plateau-Phase ohne weitere Fluoreszenzveränderungen, da die Bestandteile der PCR aufgebraucht sind und keine Neusynthese mehr möglich ist.

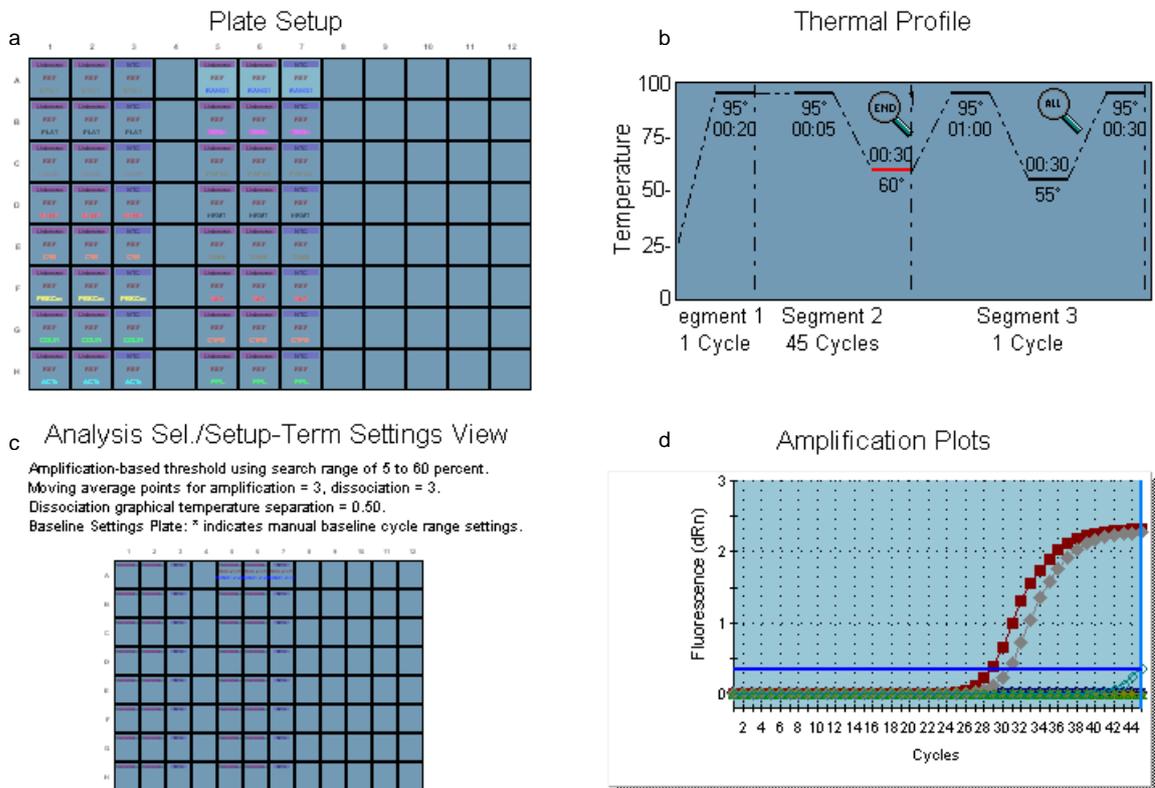


Abbildung 2: Beispielhafter Aufbau einer PCR, von oben links nach unten rechts. a: Das Plate Setup der einzelnen eingebrachten Proben, b: Thermales Profil. c: Darstellung der Amplifikation basierten Schwellen. d: Die Fluoreszenz in Abhängigkeit zu den PCR-Zyklen.

Die Quantifizierung erfolgte in der frühen exponentiellen Phase. Die MX Pro-Software ermittelt den Schwellenwert der Fluoreszenz. Für jede PCR wurde der Zyklus ermittelt, bei dem dieser erreicht wurde. Dieser Wert wird ct (circle threshold) genannt.

Für den ct gilt:

$$DNA_{ct} = e^{ct} \times DNA_0$$

DNA_{ct} = Menge an DNA am ct, e = Effizienz, ct = circle threshold, DNA_0 = Ausgangsmenge DNA am Startpunkt

Die Effizienz (e) wurde mit dem Software-Analyse-Paket qpcR der Firma Ritz, Spiess ermittelt. Für eine ideale PCR gilt eine Effizienz von 2, in der Praxis liegt der Wert meistens zwischen 1,5 und 2. Die PCR wurde in 96 Well Platten mit dem MX3000P von Stratagene durchgeführt.

Das PCR-Programm wurde in folgende Teilbereiche eingeteilt:

Zunächst wurde durch ein 20 sec. andauerndes Erhitzen auf 95°C die Hot Start DNA-Polymerase aktiviert.

In den sich anschließenden 45 Zyklen wurden jeweils für 5 sec. bei 95 °C die RNA-cDNA-Hybride denaturiert (siehe Abbildung 2b). Die Primer-Hybridisierung und die Extension erfolgten in den nächsten 30 sec. bei 60 °C.

Zum Abschluss der PCR wurde die Schmelzkurve ermittelt. Der Schmelzpunkt hängt von der Länge und dem GC-Gehalt des Amplikons ab. Ein PCR-Produkt liefert einen einheitlichen Schmelzpunkt. Die Primer-Dimere haben einen wesentlich niedrigeren Schmelzpunkt, so dass eine gute Unterscheidung möglich ist. Die Kurve liefert also Rückschlüsse über die Qualität der PCR. Abschließend wurde ein Kontrollgel durchgeführt.

Das Kontrollgel bestand aus 2 % Agarose in 1x TAE-Puffer und Ethidiumbromid. In die Geltaschen wurden ein Mix aus 3 µl DNA (PCR-Produkt), 1 µl 10x DNA loading buffer und 6 µl H₂O aufgetragen. In die jeweils erste bzw. letzte Tasche wurde 10 µl des 100bp DNA Markers (Invitrogen) als Kontrolle aufgetragen.

Die Elektrophorese lief bei 70 Volt für 60 min. Das Gel wurde auf einem UV-Tisch ausgewertet und photographisch dokumentiert. Die Länge der PCR-Banden wurde durch den Vergleich mit dem 100 bp Marker ermittelt. Sie musste der, durch Primer 3 ermittelten, Länge des Amplikons entsprechen.

Tabelle 4: Ansatz für ein 2%-iges Agarosegel

1x TAE	40 ml
Agarose	0,8 g
Ethidiumbromid	0,4 µl

3.3.3 *Aufreinigung und Sequenzierung des PCR-Produkts*

Das PCR-Produkt wurde während der Etablierung der PCR jeweils einmal pro Primerpaar sequenziert, um die Richtigkeit des Amplikons zu verifizieren. Zur Aufreinigung wurde das DNA Purification Kit (Qiagen) eingesetzt. Dazu wurden 3 µl PCR-Produkt und 25 µl PBI Puffer gemischt und mit dem Vortex gut gemischt. Anschließend wurde das Gemisch auf eine MinElute Säule aufgetragen und zentrifugiert. Dadurch wurde die DNA an die Säule gebunden. Um eventuelle Verunreinigungen in Form von PCR-Bestandteilen zu beseitigen, wurde gemäß dem Manual von Qiagen ein Waschschrift mit 750 µl PE-Puffer und eine Zentrifugation durchgeführt. Im Anschluss wurde die aufgereinigte DNA mit 10 µl H₂O eine

Minute lang inkubiert und durch Zentrifugation eluiert. 1 µl der aufgereinigten DNA wurde zusammen mit 1,5 µl des verwendeten Primers zur Sequenzierung bei Eurofins MWG GmbH (Martinsried, Ger) eingeschickt. Die von Eurofins übermittelten Sequenzierungsdaten wurden mit den Datenbankeinträgen verglichen. Dies war die abschließende Bestätigung des PCR-Produkts.

3.4 Auswertung der PCR

3.4.1 *Analyse der quantitativen PCR*

Untersucht wurde die Genexpression aus mesenchymale Stromazellen von 28 Spendern.

Die relative Quantifizierung wurde mit der Software REST (relative expression software tool, Pfaffl et al., 2002) durchgeführt. Diese Software übernimmt gleichzeitig die Normalisierung der cDNA- Mengen, berechnet den fold change und führt einen Signifikanztest durch.

Die Normalisierung dient dem Ausgleich von Probe-zu-Probe Unterschieden (z.B. Varianz bei reverser Transkription).

Diese wird mit Housekeeping Genen durchgeführt. Diese Gene sind unabhängig von schnellem oder langsamem Wachstum bzw. vom Kulturmedium gleich stark exprimiert. Die Housekeeping Gene wurden im Microarray-Experiment ermittelt. Es waren die drei Gene mit der geringsten Standardabweichung zwischen allen Proben. Diese Gene wurden in REST für die Normalisierung eingesetzt. Bei den eingesetzten Housekeeping Genen handelte es sich dabei um die ribosomalen Gene RPS16, RPS27a und das Stoffwechselgen GAPDH.

3.4.2 *Statistische Analyse*

Zur statistischen Analyse wurde der two-tailed Student's t-test durchgeführt. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Zellkulturen

Es wurden mesenchymale Stromazellen von 28 Spendern, die zwischen 33 - 116 Tage in Kultur gehalten worden sind, untersucht. Der Altersdurchschnitt war 34,6 Jahre. Von den Probanden waren 12 weiblich, 16 männlich, der jüngste Proband war 4 Jahre und der älteste 56 Jahre alt. Diese Kulturen und deren Daten werden als Versuchsreihe 2 bezeichnet.

Die Zellkulturen hatten als Ziel die Passage P6 zu erreichen. Von den 28 Probanden wurde dies in 15 Fällen für DMEM + FCS und in 9 Fällen für α MEM + PI erreicht. Eine Kultur musste Aufgrund einer bakteriellen Kontamination abgebrochen werden. Die anderen vorzeitig abgebrochenen Kulturen stagnierten im Wachstum, so dass diese Kulturen ebenfalls eingestellt wurden. Dies schloss die alpha -MEM Kulturen mit einer PL-Konzentration von $1,5 \times 10^9/\text{ml}$ ein.

Die hier erarbeiteten Daten wurden mit den Daten von neun Spendern (SK, SL, NS, JS, MP, AE, FA2, IS, SG) eines bereits im Vorfeld in der Arbeitsgruppe durchgeführten Versuches verglichen. Diese neun Spender und deren Daten werden als Versuchsreihe 1 bezeichnet. Diese Kulturen wurden in DMEM + FCS kultiviert. Sie waren zwischen 111 – 154 Tage in Kultur. Von den Spendern der Versuchsreihe 1 erreichten sieben die Passage P6, zwei stagnierten im Wachstum. Genaue Angaben zum Geschlecht oder Alter lagen uns nicht vor.

4.2 Kulturdauer, Versuchsreihe 2

Die Zellkulturen zeigten eine große Schwankungsbreite, was die Kulturdauer und die Passageabstände anging. Um die Übersicht zu wahren bzw. zur Vereinfachung wurde die Passage P4 als Referenzpunkt für ein schnell oder langsames Wachstum gewählt.

Die α MEM + PI -Kulturen erreichten durchschnittlich 44 Tage nach ihrer initialen Aussaat diese Referenz, die DMEM + FCS -Kulturen erreichten P4 erst nach 50 Tagen. Da viele α MEM-Kulturen im Anfangsstadium bereits nach P4 im Wachstum stagnierten, standen zur Auswertung im Vergleich zu den DMEM + FCS -Kulturen weniger Probenwerte zur Verfügung. Ab P4 wuchsen die DMEM + FCS -Kulturen kontinuierlich weiter und erreichten unter gleichbleibenden Kulturbedingungen häufiger die Zielpassage P6. Die α MEM + PI -Kulturen verließen die initiale Wachstumsrate und wiesen deutlich längere Passageintervalle auf (Vergleich P6 α MEM + PI: DMEM + FCS, 17:15 Tage). Insgesamt erreichten nur 9 Kulturen

α MEM + PI die Zielpassage P6 (P4=22 Kulturen). Dem stehen 15 Kulturen mit DMEM + FCS, die P6 erreichten (P4= 25 Kulturen), entgegen.

Tabelle 5: Spender ID Versuchsreihe 2, Alter der Spender und das Geschlecht der Spender.

Spender ID	Alter	Geschlecht	Spender ID	Alter	Geschlecht	Spender ID	Alter	Geschlecht
EL	43	männlich	RS	23	männlich	HM	30	männlich
PD	24	männlich	GA	35	weiblich	VM	37	männlich
GS	21	weiblich	FM	39	männlich	MA	44	weiblich
US	26	weiblich	PS	19	weiblich	EM	4	weiblich
SA	49	männlich	ST	22	männlich	KK	47	weiblich
BT	36	männlich	JS	48	männlich	LN	29	weiblich
SHII	47	männlich	KB	45	weiblich	RJ	22	weiblich
KS	40	Weiblich	BD	31	männlich	BB	50	männlich
StM	46	weiblich	GK	32	männlich	PM	25	männlich
RK	56	männlich						

Tabelle 6: Versuchsreihe 1 Spender ID

Spender ID	SK	SL	NS	JS	MP	AE	FA2	IS	SG

Die Spenderkulturen der Versuchsreihe 1 in DMEM + FCS waren durchschnittlich 113 Tage in Kultur (min. 98 Tage, max. 147 Tage). Sie erreichten durchschnittlich nach 77 Tagen die Passage P4. Von den neun Spendern erreichten sieben die Passage P6. Zwei Kulturen stagnierten in der Passage P5. Das durchschnittliche Passageintervall vor P6 war bei den Kulturen der Versuchsreihe 1 21 Tage. Im Vergleich dazu war das Passageintervall der Kulturen der Versuchsreihe 2 in DMEM + FCS mit 15 Tagen im Schnitt sechs Tage kürzer. Die durchschnittliche kumulative Zellzahl nach P6 war bei den Spendern der 1. Versuchsreihe $1,22E+14$ Zellen.

4.3 Unterschiede in den Zellkulturen der Versuchsreihe 2 in Abhängigkeit von Medium und Zusatz

4.3.1 Morphologie

Die Zellen mit α MEM + PI wuchsen spindelförmig und in den Anfangsstadien weniger dicht. Die Zellen mit DMEM + FCS wuchsen grober, weniger ausladend, eher eng und rundlich in CFU. Diese CFU traten in den höheren Passagen (ab P2) in den Hintergrund, so dass ein kontinuierlicher Monolayer aus Zellen vordergründig wurde.

hMSC in α MEM + PI

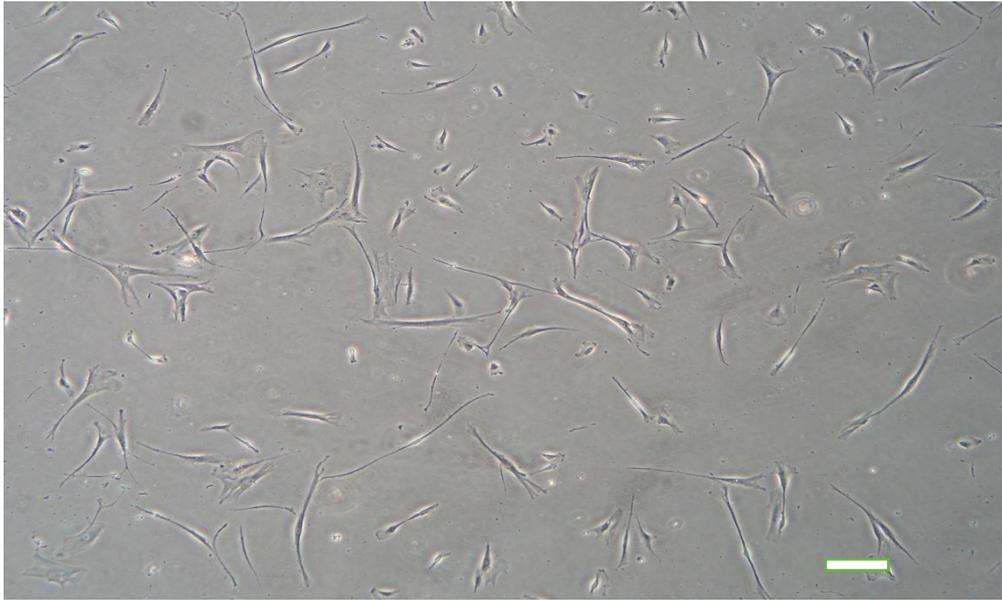


Abbildung 3: hMSC in α MEM + PI, Passage P4

Der Balken entspricht 250 μ m

hMSC in DMEM + FCS

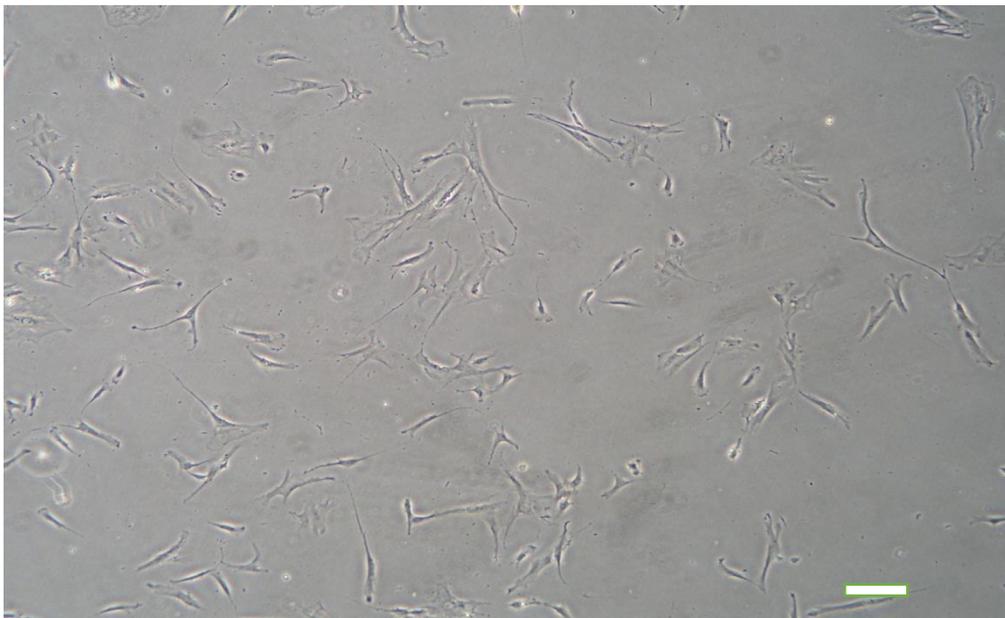


Abbildung 4: hMSC in DMEM + FCS, Passage P4

Der Balken entspricht 250 μ m

4.3.2 *Wachstum von hMSC in DMEM + FCS*

Die Kulturen waren durchschnittlich 76 Tage in Kultur (min. 59 Tage, max. 116 Tage). Die durchschnittliche Zeit bis zur Passagierung betrug 11 Tage. Diese Werte unterlagen großen individuellen Schwankungen und nahmen mit zunehmender Passagedauer zu. Die durchschnittliche Zellzahl der Kulturen betrug im Mittel pro Passage $3,21 \times 10^5$ Zellen.

Tabelle 7: Zeit bis zur Passage in Tagen und durchschnittliche Zellzahl pro T25-Kulturflasche (in DMEM + FCS); in Klammern ist die Standardabweichung dargestellt.

Pas- sage	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Zeit in Tagen	9 ($\pm 1,93$)	11 ($\pm 3,66$)	11 ($\pm 1,97$)	10 ($\pm 2,31$)	11 ($\pm 3,00$)	12 ($\pm 5,29$)	15 ($\pm 8,78$)
Durch- schnittl iches Zell- wachs- tum pro Pas- sage	$5,71 \times 10^5$ ($\pm 2,90 \times 10^5$)	$3,45 \times 10^5$ ($\pm 1,50 \times 10^5$)	$3,06 \times 10^5$ ($\pm 1,15 \times 10^5$)	$2,76 \times 10^5$ ($\pm 1,35 \times 10^5$)	$2,77 \times 10^5$ ($\pm 1,31 \times 10^5$)	$2,36 \times 10^5$ ($\pm 1,07 \times 10^5$)	$2,15 \times 10^5$ ($\pm 9,53 \times 10^4$)

Die durchschnittliche kumulative Zellzahl der Zellkulturen, welche in DMEM + FCS kultiviert wurden, betrug nach der Passage P6 $7,71 \times 10^{13}$ Zellen.

4.3.3 Wachstum von hMSC in α MEM + PI

Die Kulturen, die P6 erreichten waren durchschnittlich 69 Tage in Kultur (min. 55 bis max. 103 Tage). Die durchschnittliche Passagedauer betrug 10 Tage. Die durchschnittliche Zellzahl betrug $6,50 \times 10^{05}$ Zellen pro Passage.

Tabelle 8: Zeit bis zur Passage in Tagen und durchschnittliche Zellzahl pro T25-Kulturflasche (α MEM + PI); in Klammern ist die Standardabweichung dargestellt.

Pas- sage	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Zeit in Tagen	8 ($\pm 1,77$)	7 ($\pm 1,66$)	9 ($\pm 2,27$)	10 ($\pm 3,41$)	13 ($\pm 7,04$)	11 ($\pm 3,62$)	17 ($\pm 11,58$)
Durch- schnittl iches Zell- wachs- tum pro Pas- sage	$1,33 \times 10^6$ ($\pm 5,58 \times 10^5$)	$6,23 \times 10^5$ ($\pm 2,60 \times 10^5$)	$6,24 \times 10^5$ ($\pm 3,44 \times 10^5$)	$4,89 \times 10^5$ ($\pm 3,02 \times 10^5$)	$4,47 \times 10^5$ ($\pm 2,66 \times 10^5$)	$4,55 \times 10^5$ ($\pm 3,00 \times 10^5$)	$3,09 \times 10^5$ ($\pm 2,45 \times 10^5$)

Die durchschnittliche kumulative Zellzahl betrug $3,71 \times 10^{16}$ Zellen.

4.4 PI-Konzentration

Aus unseren Vorversuchen haben wir entsprechende Kenntnisse bezüglich des zu erwartenden Zellwachstums in α MEM + PI erworben. Wie aus Abbildung 5 zu entnehmen zeigte

sich in den ersten Kulturen der neuen Spenderreihe mit einer PI-Konzentration von $1,5 \times 10^9/\text{ml}$ eine Stagnation der Zellkulturen bei P3/P4.

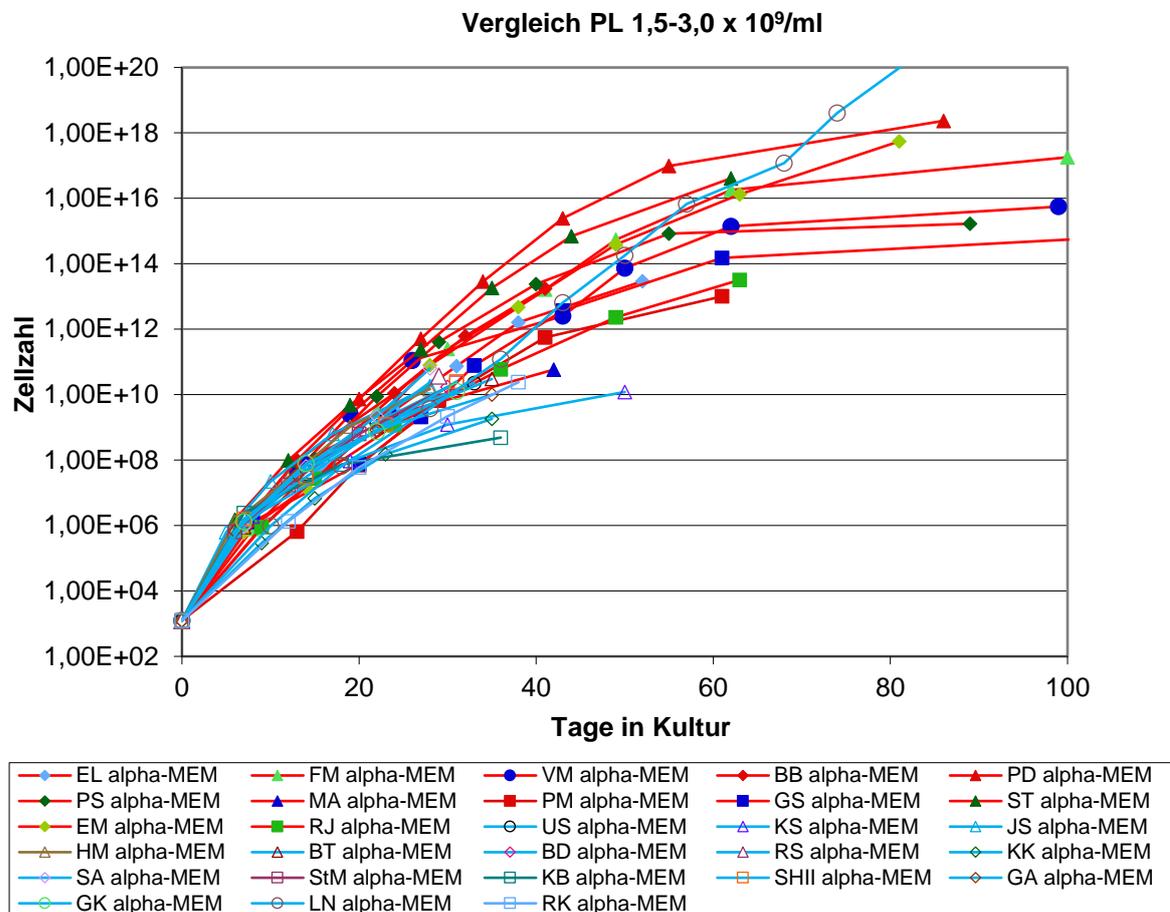


Abbildung 5: In blau sind Wachstumskurven der Kulturen mit $\alpha\text{MEM} + \text{PI } 1,5 \times 10^9/\text{ml}$ gegenüber den roten Wachstumskurven der Kulturen mit $\alpha\text{MEM} + \text{PI } 3,0 \times 10^9/\text{ml}$ dargestellt. Diese Graphik stellt die Abhängigkeit des Wachstumsverhaltens der Zellkulturen von der Konzentration des PI dar.

In den blauen Wachstumskurven zeigte sich eine frühe Stagnation der Zellkulturen in $\alpha\text{MEM} + \text{PI}$ ab P3/P4 bei einer PI-Konzentration von $1,5 \times 10^9/\text{ml}$. Wir haben daraufhin die PI-Konzentration auf $3,0 \times 10^9/\text{ml}$ korrigiert und erneut das Wachstumsverhalten beobachtet. Wie aus den roten Wachstumskurven zu ersehen ist, kam es nicht mehr zu der zuvor beobachteten Stagnation der Zellkulturen.

Ein Ausreißer stellt die Kultur des Spenders LN dar. Diese Kultur zeigte auch ohne Anpassung der PI-Konzentration ein langfristiges konstantes Wachstum. Wir haben das als Einzelphänomen gewertet.

Nachdem die PI-Konzentration auf $3,0 \times 10^9/\text{ml}$ umgestellt wurde, erreichten die nachfolgenden Kulturen höhere Passagen und stagnierten nicht mehr bei P3/4 im Wachstum. Das

Wachstumsverhalten der Zellkulturen entsprach nun dem uns aus Vorversuchen bekannten Verhalten.

4.5 Vergleich der hMSC-Kulturen α MEM + PI und DMEM + FCS, Versuchsreihe 2

Im direkten Vergleich der unterschiedlichen Kulturmedien zeigte sich, dass bis P4 die Passagierungszeitspannen bei α MEM + PI kürzer sind. Ab P4 schlägt dies zugunsten von DMEM + FCS um, so dass die Passagezeiten nun bei DMEM + FCS kürzer waren (siehe Tabelle 9). In der absoluten kumulativen Zellzahl schlägt sich das nicht nieder. Die Gesamtzellzahl war bei den α MEM + PI-Kulturen mit $3,71 \times 10^{16}$ Zellen im Vergleich zu $7,71 \times 10^{13}$ Zellen bei den DMEM + FCS -Kulturen im Durchschnitt höher.

Tabelle 9: Durchschnittliche Anzahl von Tagen bis zur jeweiligen nächsthöheren Passage (α MEM + PI gegenüber DMEM + FCS); in Klammern ist die Standardabweichung dargestellt.

Zeit bis zur Passage	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
α MEM + PI	8 ($\pm 1,77$)	7 ($\pm 1,66$)	9 ($\pm 2,27$)	10 ($\pm 3,41$)	13 ($\pm 7,04$)	11 ($\pm 3,62$)	17 ($\pm 11,58$)
DMEM + FCS	9 ($\pm 1,93$)	11 ($\pm 3,66$)	11 ($\pm 1,97$)	10 ($\pm 2,31$)	11 ($\pm 3,00$)	12 ($\pm 5,29$)	15 ($\pm 8,78$)
Durchschnittliche Gesamtzellzahl α MEM + PI							$3,71 \times 10^{16}$ Zellen ($\pm 1,32 \times 10^{17}$)
Durchschnittliche Gesamtzellzahl DMEM + FCS							$7,71 \times 10^{13}$ Zellen ($\pm 2,21 \times 10^{14}$)

Die DMEM + FCS-Kulturen erreichten längere Kulturauern mit einem konstanten Wachstum im Vergleich zu den α MEM + PI- Kulturen. Die α MEM + PI -Kulturen hatten dagegen im Durchschnitt höhere Wachstumszahlen (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Durchschnittliche Zellwachstum der unterschiedlichen Medien bis P6 in Zellen; in Klammern ist die Standardabweichung dargestellt.

Passage	DMEM + FCS	α MEM + PI
P0	$5,71 \times 10^5$ ($\pm 2,90 \times 10^5$)	$1,33 \times 10^6$ ($\pm 5,58 \times 10^5$)
P1	$3,45 \times 10^5$ ($\pm 1,50 \times 10^5$)	$6,23 \times 10^5$ ($\pm 2,60 \times 10^5$)
P2	$3,06 \times 10^5$ ($\pm 1,15 \times 10^5$)	$6,24 \times 10^5$ ($\pm 3,44 \times 10^5$)
P3	$2,76 \times 10^5$ ($\pm 1,35 \times 10^5$)	$4,89 \times 10^5$ ($\pm 3,02 \times 10^5$)
P4	$2,77 \times 10^5$ ($\pm 1,31 \times 10^5$)	$4,47 \times 10^5$ ($\pm 2,66 \times 10^5$)
P5	$2,36 \times 10^5$ ($\pm 1,07 \times 10^5$)	$4,55 \times 10^5$ ($\pm 3,00 \times 10^5$)
P6	$2,15 \times 10^5$ ($\pm 9,53 \times 10^4$)	$3,09 \times 10^5$ ($\pm 2,45 \times 10^5$)

Wie aus Tabelle 10 zu entnehmen erreichten die neuen Zellkulturen in α MEM + PI durchschnittlich höhere Zellzahlen nach den jeweiligen Passagen im Vergleich zu den neuen Zellkulturen in DMEM + FCS. Insbesondere über die ersten vier Passagen (P0-P3) wird das deutlich. Ebenfalls wird hier ein konstantes Wachstum der Zellkulturen in DMEM + FCS aufgezeigt. Im Vergleich zu α MEM + PI kommt es bei P2/P3 nicht zu einem Wachstums-einbruch ($6,24 \times 10^5$ Zellen auf $4,89 \times 10^5$ Zellen).

Das Wachstumsverhalten (Passage und Zellzahl) war von Alter und Geschlecht der Spender unabhängig.

4.5.1 Schnelles gegenüber langsamen Wachstum

Aus den Wachstumskurven wurden Spender (Tabelle 11) identifiziert, deren hMSC potentiell ein schnelles oder langsames Wachstum aufwiesen. Die Einteilung erfolgte anhand des Zellwachstums und der Passagedauer aus den Wachstumskurven.

Tabelle 11: Spender ID schnell und langsamer Kulturen in DMEM + FCS.

Schnell wachsende Zellkulturen	Langsam wachsende Zellkulturen
HM	RK
BT	JS
RS	MA
BD	FM
StM	VM
SH II	EL
SA	GS
GK nicht validiert	PM
	EM nicht validiert
	RJ

4.5.2 DMEM + FCS, Versuchsreihe 2

Zunächst wurden die Spender der Versuchsreihe 2 in DMEM + FCS miteinander verglichen. Es wurden dabei sieben schnell wachsende Kulturen und neun langsam wachsende Kulturen identifiziert.

Tabelle 12: Durchschnittliche Zeit bis zur Passage bei DMEM + FCS neu in Tagen; in Klammern ist die Standardabweichung dargestellt.

	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Schnelles Wachstum	10 ($\pm 2,00$)	10 ($\pm 2,63$)	10 ($\pm 2,76$)	11 ($\pm 3,56$)	11 ($\pm 3,25$)	13 ($\pm 5,34$)	15 ($\pm 6,65$)
Langsames Wachstum	12 ($\pm 3,79$)	13 ($\pm 4,14$)	12 ($\pm 2,28$)	14 ($\pm 5,86$)	16 ($\pm 6,16$)	19 ($\pm 6,63$)	24 ($\pm 8,43$)

Diese Kulturen unterschieden sich in der durchschnittlichen Zeit bis zur jeweiligen Passage und in der durchschnittlichen Zellzahl. Wie aus Tabelle 12 zu entnehmen, unterschieden sich die schnellen Kulturen von den langsamen Kulturen durch eine kürzere Passagedauer bis zum Erreichen der entsprechenden Konfluenz, welche als Ziel für die „Trypsinierung“ gesetzt wurde. Deutlich wird dies bei dem von uns gesetzten Zielpunkt P4. Die Zeit war bei den schnell wachsenden Kulturen mit 11 Tagen im Vergleich zu 16 Tagen durchschnittlich fünf Tage kürzer.

Tabelle 13: Durchschnittliche Zellzahl pro Passage P0-P6 DMEM + FCS neu; in Klammern ist die Standardabweichung dargestellt.

	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	Durchschnittliche Zellzahl P6 gesamt
Schnelles Wachstum	$1,18 \times 10^6$ ($\pm 1,30 \times 10^6$)	$3,87 \times 10^5$ ($\pm 1,95 \times 10^5$)	$4,23 \times 10^5$ ($\pm 1,66 \times 10^5$)	$3,95 \times 10^5$ ($\pm 1,71 \times 10^5$)	$3,98 \times 10^5$ ($\pm 1,63 \times 10^5$)	$2,52 \times 10^5$ ($\pm 1,30 \times 10^5$)	$2,33 \times 10^5$ ($\pm 9,48 \times 10^4$)	$1,80 \times 10^{14}$ ($\pm 2,35 \times 10^{14}$)
Langsames Wachstum	$4,6 \times 10^5$ ($\pm 3,01 \times 10^5$)	$2,56 \times 10^5$ ($\pm 1,26 \times 10^5$)	$2,92 \times 10^5$ ($\pm 1,26 \times 10^5$)	$2,01 \times 10^5$ ($\pm 7,43 \times 10^4$)	$1,64 \times 10^5$ ($\pm 6,80 \times 10^4$)	$1,43 \times 10^5$ ($\pm 6,06 \times 10^4$)	$1,58 \times 10^5$ ($\pm 7,63 \times 10^4$)	$5,46 \times 10^{12}$ ($\pm 1,34 \times 10^{13}$)

Ähnliches wurde für die durchschnittliche Zellzahl der jeweiligen Passagen festgestellt. Die schnellen Kulturen der Versuchsreihe 2 wiesen eine durchschnittlich höhere Zellzahl pro Passage und eine höhere durchschnittliche Gesamtzellzahl zum Zeitpunkt P6 auf: $1,80 \times 10^{14}$ Zellen bei den schnellen Kulturen der Versuchsreihe 2 im Gegensatz zu $5,46 \times 10^{12}$ Zellen bei den langsamen Kulturen der Versuchsreihe 2 in DMEM + FCS (siehe auch Tabelle 13).

In Abbildung 6 ist das unterschiedliche Wachstumsverhalten der schnell und langsam wachsenden Kulturen der Versuchsreihe 2 in DMEM + FCS gegenübergestellt. Aus dieser Graphik geht hervor, dass insbesondere während der ersten Passagen die Differenzierung zwischen schnell und langsam wachsenden Kulturen stattfindet. Im Verlauf findet sich, im angewendeten Beobachtungsfenster bis P6, ein fast paralleles Wachstum. Die Gesamtzellzahl der schnell wachsenden Kulturen der Versuchsreihe 2 wird aber von den langsam wachsenden Zellkulturen der Versuchsreihe 2 bis einschließlich P6 nicht mehr erreicht.

Vergleich schnell und langsam wachsender Kulturen DMEM + FCS Versuchsreihe 2

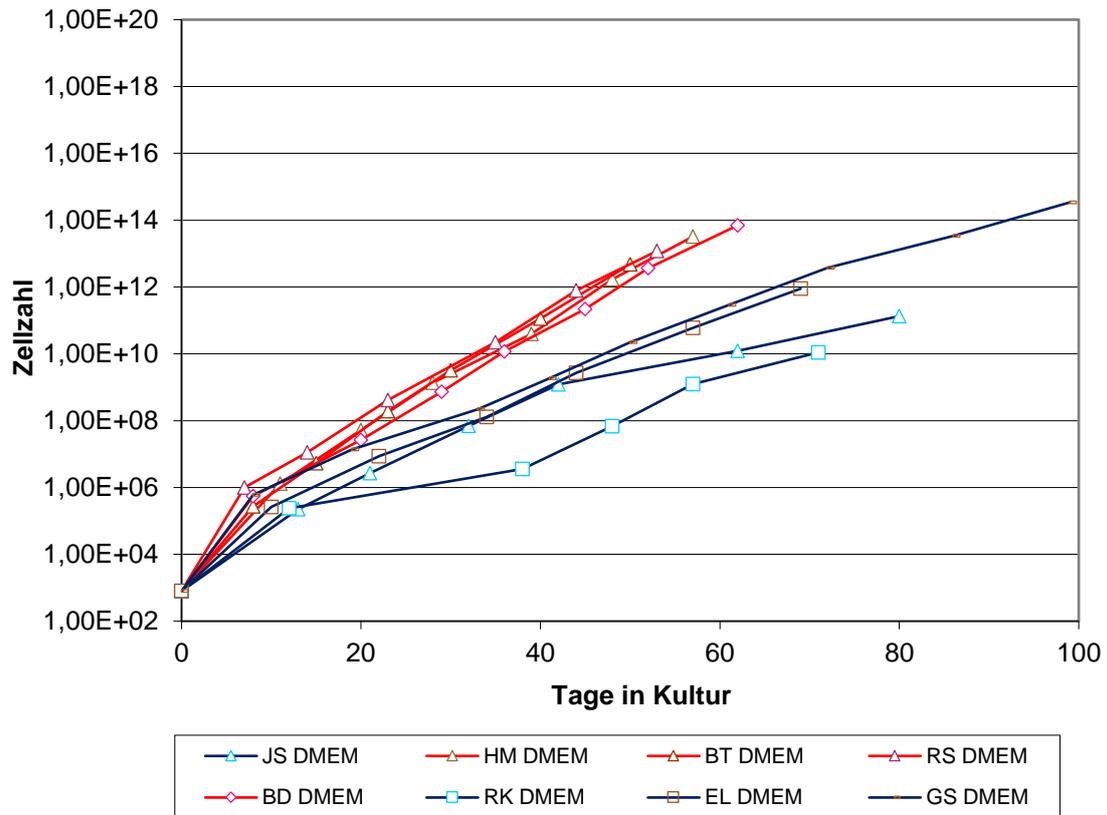


Abbildung 6: Zeigt den Vergleich zwischen schnell (rot) und langsam (blau) wachsenden Kulturen der Versuchsreihe 2 in DMEM + FCS in Gesamtzellzahlen pro Passage und in Abhängigkeit zu der Zeit in Tagen in Kultur.

Da P4 eine der Passagen zur Validierung darstellt und als einer der Zielpunkte bestimmt wurde, werden hier zur besseren Übersicht die unterschiedlichen Verhältnisse nochmals für P4 isoliert dargestellt.

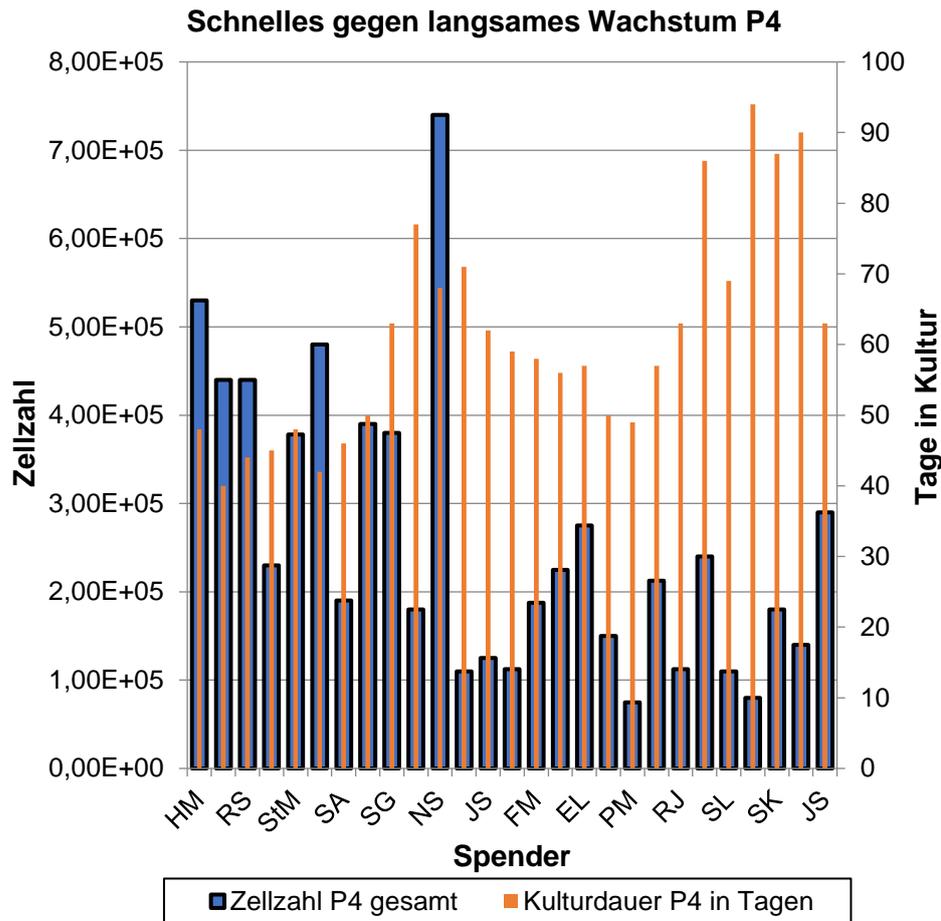


Abbildung 7: Zeigt die kumulative Zellzahl schneller und langsamer Zellkulturen in DMEM + FCS in Abhängigkeit von der Kulturdauer in Tagen.

Aus der Abbildung 7 kann man die unterschiedliche Zellzahl am Punkt P4 für die schnellen und langsamen Zellkulturen der Versuchsreihe 2 in DMEM + FCS ablesen. Insbesondere die höhere Zellzahl in kürzerer Zeit steht hier im Vordergrund. Dies fällt insbesondere bei den Spenderzellen mit schnellem Wachstum der Versuchsreihe 2 HM, RS, StM, BT, SH II und den Spenderzellen mit langsamem Wachstum der Versuchsreihe 2 RK, JS, MA, FM, VM, GS, PM und RJ auf. Hier ist klar ein Unterschied in der kumulativen Gesamtzellzahl und in der Kulturdauer bis P4 für die jeweiligen langsamen bzw. schnellen Kulturen ablesbar.

4.5.3 DMEM + FCS, Versuchsreihe 1

In den Voruntersuchungen wurden bereits neun Spenderkulturen in DMEM + FCS gemäß dem Protokoll aus Material und Methodik durchgeführt (Tabelle 6). Diese werden als Versuchsreihe 1 bezeichnet.

Tabelle 6: Spender ID Versuchsreihe 1

Spender ID	SK	SL	NS	JS	MP	AE	FA2	IS	SG
------------	----	----	----	----	----	----	-----	----	----

Diese Kulturen wurden bis einschließlich P6 in Kultur gehalten und ausgewertet. Die Wachstumskurven dieser Kulturen wurden in Abbildung 8 dargestellt. Bereits in der Ansicht der Wachstumskurven zeigt sich ein unterschiedliches Zellwachstum, wie es bereits in den Zellkulturen der Spender der Versuchsreihe 2 DMEM + FCS beschrieben wurde. Anhand der erhobenen Daten wurden auch diese in schnell und langsam wachsende Kulturen eingeteilt.

Aus diesen Spenderkulturen der Versuchsreihe 1 wurde das Material für eine Genexpressionsanalyse gewonnen. Anhand derer wurden mögliche Markergene für ein schnelles oder langsames Wachstum für die hMSC im Vorfeld bestimmt.

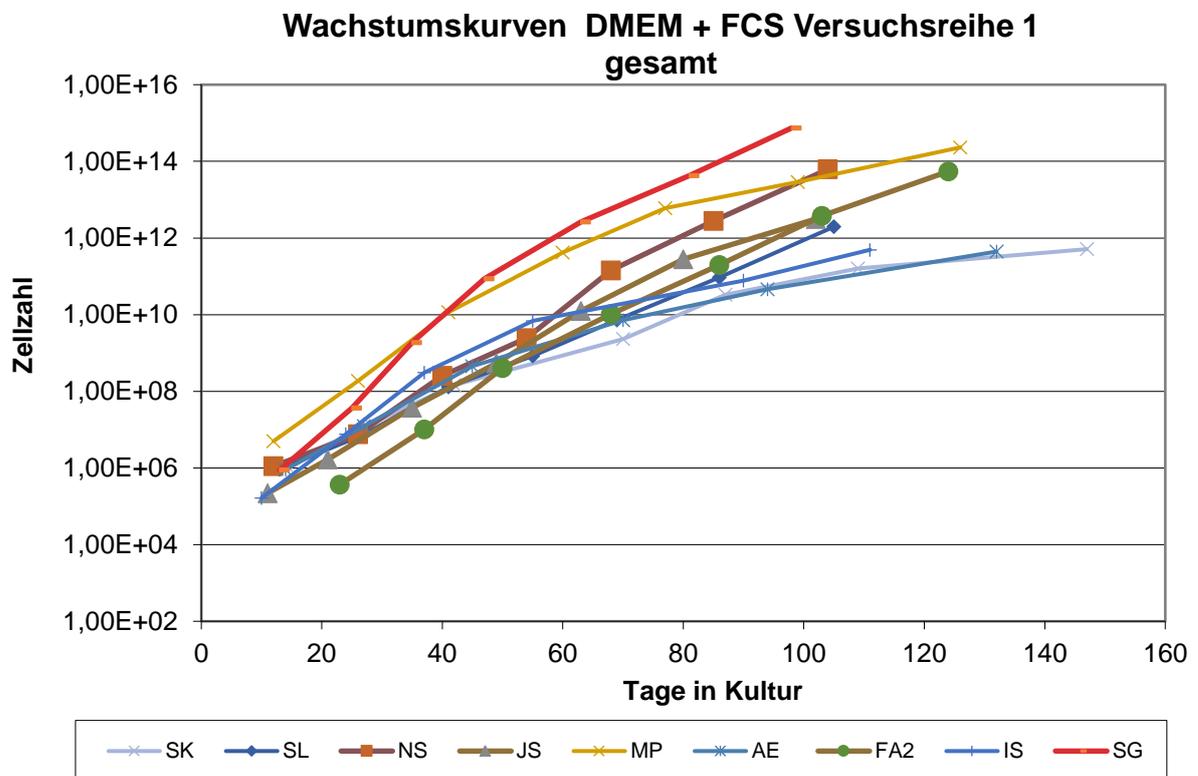


Abbildung 8: Zeigt die einzelnen Wachstumskurven der Spender der Versuchsreihe 1 in DMEM + FCS. Es wurde die Zellzahl in der einzelnen Passage in Abhängigkeit zur Zeit in Tagen aufgetragen.

Diese wurden ebenfalls anhand ihres Zellwachstums und ihrer Passagedauer in schnell und langsam wachsende Kulturen eingeteilt. Als mögliche schnell wachsende Zellkulturen wurden die Spender SG und MP und für mögliche langsame Zellkulturen die Spender AK und AE identifiziert.

Tabelle 14: ID schneller und langsamer Zellkulturen Versuchsreihe 1

Schnell wachsende Zellkulturen	Langsam wachsende Zellkulturen
SG	SK
MP	AE

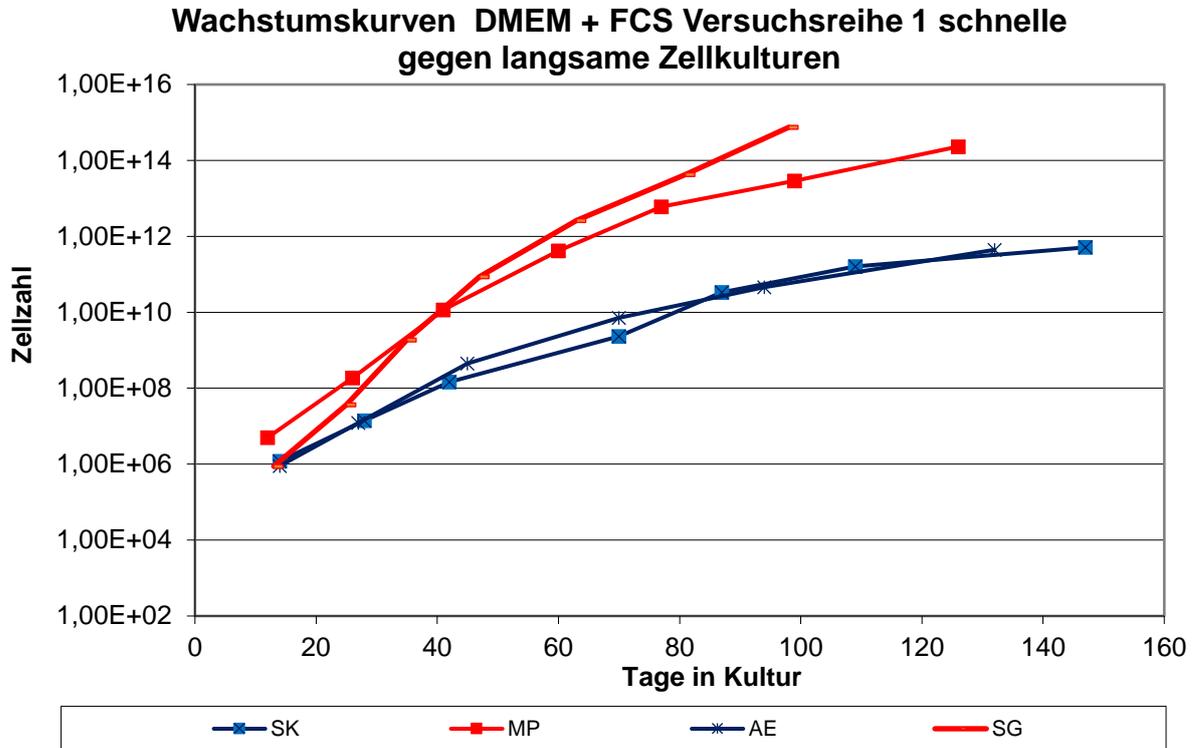


Abbildung 9: Zeigt die einzelnen Wachstumskurven schneller (rot) und langsamer (blau) Zellkulturen der Spender der Versuchsreihe 1 in DMEM + FCS. Es wurde die Zellzahl in den einzelnen Passagen in Abhängigkeit zur Zeit in Tagen aufgetragen.

Diese Spender wurden in Abbildung 9 in ihrem Wachstumsverhalten nochmals gegenübergestellt. Auch hier zeigt sich auf den ersten Blick ein ähnliches Wachstum wie bei den Kulturen der Versuchsreihe 2 in DMEM + FCS. Auch hier sind die schnellen Kulturen durch eine höhere Zellzahl in den frühen Passagen gekennzeichnet. In den höheren Passagen kommt es auch hier zu einem fast parallelen Wachstum. Die höhere kumulative Zellzahl der schnellen Kulturen werden von den langsamen auch hier in dem gegebenen Zeitfenster bis einschließlich P6 nicht erreicht. Im direkten Vergleich zwischen den Spenderkulturen der beiden Versuchsreihen zeigte sich jedoch ein unterschiedliches Wachstumsverhalten.

In der durchschnittlichen Kulturdauer bis zur nächsten Passage zeigte sich in P0 im Vergleich ein längeres Wachstum der Versuchsreihe 1 von vier Tagen, in P1 von sieben Tagen, in P3 von 19 Tagen, in P4 von 27 Tagen, in P5 von 36 Tagen und in P6 von 37 Tagen. Die

Spender der Versuchsreihe 1 waren also insgesamt länger in Kultur. Die ausgewählten Kulturen der Spender der Versuchsreihe 2 erreichten, wie in Abbildung 6 gut zu erkennen, bereits nach 40- 80 Tagen in Kultur die Passage P6. In den Kulturen der Spender der Versuchsreihe 1 wurde P6, wie in Abbildung 9 zu erkennen erst deutlich später, also zwischen 80- 150 Tagen in Kultur erreicht.

Tabelle 15: Durchschnittliche kumulative Kulturdauer der Passagen beider Versuchsreihen in Tagen; in Klammern ist die Standardabweichung dargestellt.

Spender	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Ver- suchs- reihe 1	14 ($\pm 3,78$)	27 ($\pm 4,35$)	41 ($\pm 4,82$)	59 ($\pm 8,83$)	77 ($\pm 12,12$)	98 ($\pm 17,31$)	113 ($\pm 17,82$)
Ver- suchs- reihe 2	10 ($\pm 1,93$)	20 ($\pm 4,09$)	30 ($\pm 4,67$)	40 ($\pm 5,32$)	50 ($\pm 7,29$)	62 ($\pm 10,30$)	76 ($\pm 16,98$)

Wir haben uns daraufhin die einzelnen Passagezeiten im Vergleich zwischen den Spendern der unterschiedlichen Versuchsreihen genauer angeschaut. Die unterschiedliche Passage-dauer wurde in Tabelle 16 gegenübergestellt. Der Unterschied der durchschnittlichen Zeit bis zur nächsten Passage in Tagen war in P0 fünf Tage, in P1 zwei Tage, in P2 drei Tage, in P4 acht Tage, in P5 neuen Tage und in P6 sechs Tage (Tabelle 16). Die Spenderkulturen der Versuchsreihe 1 wurden also später „trypsiniert“ bevor sie wieder ausgesät wurden.

Tabelle 16: Durchschnittliche Zeit bis zur nächsten Passage der Spender beider Versuchsreihen in Tagen; in Klammern ist die Standardabweichung dargestellt.

Spender	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Ver- suchs- reihe 1	14 ($\pm 3,78$)	13 ($\pm 1,39$)	14 ($\pm 2,09$)	18 ($\pm 5,41$)	19 ($\pm 6,83$)	21 ($\pm 6,75$)	21 ($\pm 7,23$)
Ver- suchs- reihe 2	9 ($\pm 1,93$)	11 ($\pm 3,66$)	11 ($\pm 1,97$)	10 ($\pm 2,31$)	11 ($\pm 3,00$)	12 ($\pm 5,29$)	15 ($\pm 8,78$)

Wir haben parallel überprüft ob sich dies auch in der kumulativen Gesamtzellzahl niederschlägt. Der Unterschied ließ sich auch in der jeweiligen Zellzahl abbilden. So ist die durchschnittliche Zellzahl in P0 der Spender der Versuchsreihe 2 mit $5,71 \times 10^5$ Zellen höher als die der Spender der Versuchsreihe 1 mit $1,20 \times 10^5$ Zellen. Dieses Verhalten der höheren Zellzahl ist bis auf P2 über alle Passagen erkennbar (Tabelle 17).

Tabelle 17: Durchschnittliches Zellwachstum der Spenderzellen beider Versuchsreihen in der jeweiligen Passage; in Klammern ist die Standardabweichung dargestellt.

Spender DMEM + FCS	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Versuchsreihe 1	$1,20 \times 10^5$ ($\pm 1,48 \times 10^5$)	$2,78 \times 10^5$ ($\pm 2,00 \times 10^5$)	$4,37 \times 10^5$ ($\pm 2,04 \times 10^5$)	$2,68 \times 10^5$ ($\pm 1,61 \times 10^5$)	$2,60 \times 10^5$ ($\pm 2,03 \times 10^5$)	$1,60 \times 10^5$ ($\pm 8,43 \times 10^4$)	$1,88 \times 10^5$ ($\pm 8,70 \times 10^4$)
Versuchsreihe 2	$5,71 \times 10^5$ ($\pm 2,90 \times 10^5$)	$3,45 \times 10^5$ ($\pm 1,50 \times 10^5$)	$3,06 \times 10^5$ ($\pm 1,15 \times 10^5$)	$2,76 \times 10^5$ ($\pm 1,35 \times 10^5$)	$2,77 \times 10^5$ ($\pm 1,31 \times 10^5$)	$2,36 \times 10^5$ ($\pm 1,07 \times 10^5$)	$2,15 \times 10^5$ ($\pm 9,53 \times 10^4$)

4.5.4 α MEM + PI, Versuchsreihe 2

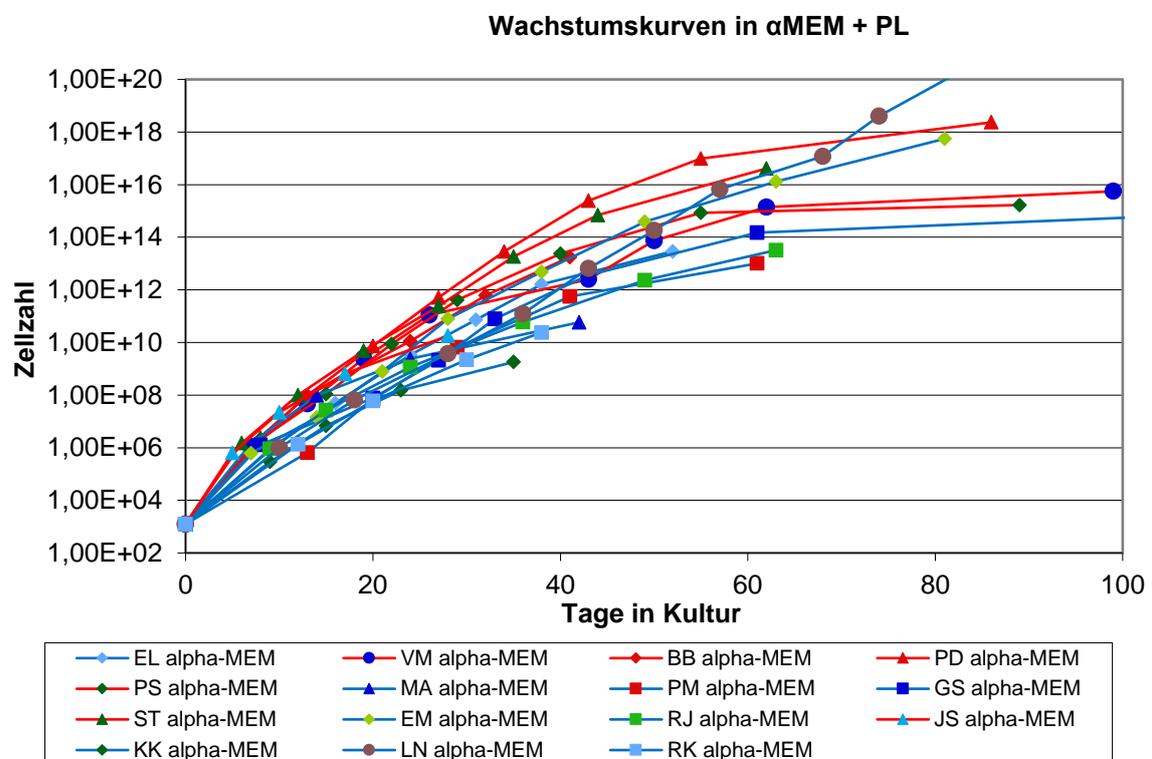


Abbildung 10: Zeigt die Wachstumskurven schneller (rot) und langsamer (blau) Zellkulturen der Spender der Versuchsreihe 2 in α MEM + PI. Es wird die Zellzahl in den einzelnen Passagen in Abhängigkeit zur Zeit in Tagen aufgetragen.

Entsprechend der DMEM + FCS -Kulturen wurden auch die α MEM + PI -Kulturen in schnell und langsam wachsende Kulturen eingeteilt. Auch hier wurde nach Passagedauer und nach Zellwachstum die Einteilung vorgenommen. Es konnten neun schnell und sechs langsam wachsende Kulturen identifiziert werden (Abbildung 10 und Tabelle 18).

Tabelle 18: Neue Spender ID schneller und langsamer Zellkulturen in α MEM + PI

Langsam wachsende Zellkulturen	Schnell wachsende Zellkulturen
EL	PS
EM	VM
PM	BB
GS	JS
LN	PD
KK	ST
MA	
RK	
RJ	

Ein Spender (VM) war in DMEM + FCS eine langsame und in α MEM + PI eine schnelle Kultur.

4.5.5 Zellverdopplungen

Weiterhin wurden die Zellverdopplungen aller Spender der Versuchsreihe 2 während der Kultivierungsdauer jeder einzelnen Passage miteinander verglichen.

Hier zeigte sich bei α MEM + PI eine durchschnittliche Gesamt-Zellverdopplung von 23,77. Die summarische Zellverdopplung von DMEM + FCS der Kulturen der Versuchsreihe 2 war 23,78, wohingegen die der Versuchsreihe 1 25,49 war.

Tabelle 19: Gesamte Zellverdopplungen DMEM + FCS Spender der Versuchsreihe 1 von P0-P5/P6.

Spender ID	SK	SL	NS	JS	MP	AE	FA2	IS	Sg
Zellverdopplung	18,70	27,76	32,52	26,44	27,14	18,91	27,14	21,51	33,33

Tabelle 20: Gesamte Zellverdopplungen DMEM + FCS Spender der Versuchsreihe 2 von P0-P5/P6.

Spender ID	EL	PD	GS	SA	BT	SHII	KS	StM	RK
Zellverdopplung	21,71	27,87	29,08	26,00	24,05	29,39	10,93	28,83	15,49
Spender ID	RS	GA	FM	PS	ST	JS	KB	BD	GK
Zellverdopplung	23,52	29,80	25,69	23,85	24,55	19,19	12,18	26,93	23,91
Spender ID	HM	VM	MA	EM	KK	LN	RJ	BB	PM
Zellverdopplung	24,56	24,23	15,13	27,10	24,82	35,95	17,67	21,64	28,11

4.6 RNA- Isolation

Im Rahmen der Qualitätskontrollen wurden die verwendeten RNAs abschließend per Bioanalyser auf eventuelle Verunreinigungen überprüft.

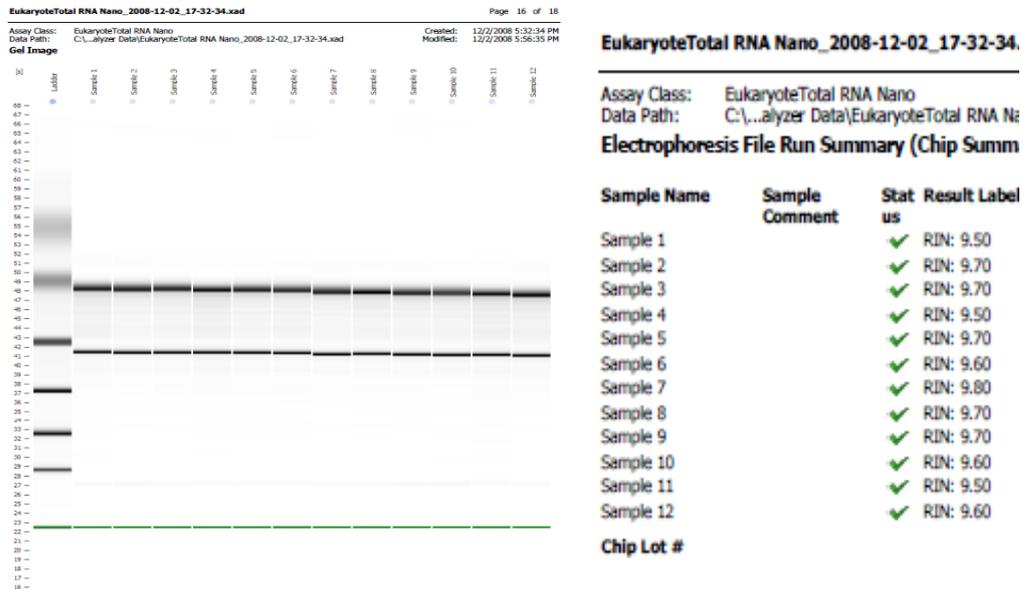
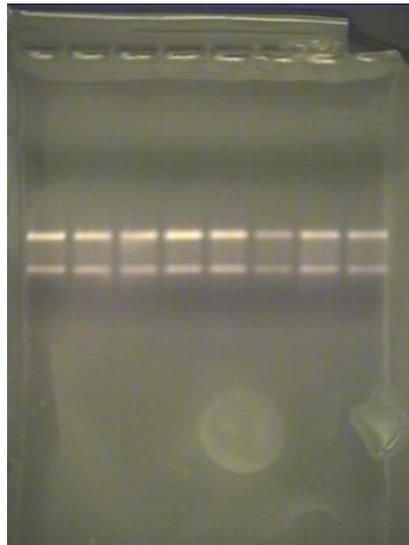


Abbildung 11: Bioanalyserkontrolle eines Teils der verwendeten RNA. Links zeigt das verwendete Kontrollgel und rechts die per Bioanalyser erhobenen RIN.

Wie aus der Graphik und dem Gel zu entnehmen, war die Reinheit der verwendeten RNA im guten bis sehr guten Bereich. Die RIN erreichten einen Mittelwert von 9,63 bei einer Standardabweichung von $\pm 0,09847319$. Man kann hier von einem sehr guten Reinheitsgrad der verwendeten RNA sprechen.

Des Weiteren wurde eine RNA Qualitätskontrolle mittels Agarosegel durchgeführt. Als Qualitätsmerkmal wurden zwei klare Banden, die S18- und die S28 Bande, definiert.



S28

S18

Abbildung 12: 1% Agarose-Kontrollgel mit den S18- und S28- Banden

4.7 Genexpressionsanalysen

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden bereits neun Zellkulturen der Versuchsreihe 1 in DMEM + FCS durchgeführt. Die 28 Zellkulturen der Versuchsreihe 2 wurden im Gegensatz sowohl in DMEM + FCS als auch in α MEM + PI durchgeführt. Anhand dieser Kulturen der Versuchsreihe 1 wurden schnell und langsam wachsende Kulturen (siehe Tabelle 21) bestimmt und zur weiteren Microarray/ Genexpressions-Analyse verwendet. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden je drei Proben der schnell und langsam wachsenden Kulturen unterschiedlicher Passagen (P4-P6) zur Isolation geeigneter Kandidatengene untersucht.

Tabelle 21: Spender ID der Versuchsreihe 1 DMEM + FCS mit Passage für die Microarray-Analyse

Schnelles Wachstum	Langsames Wachstum
SG P5	SK P4
SG P6	SK P5
MP P5	AE P5

Aus den Zellkulturen der Versuchsreihe 1 wurden bereits schnelle und langsame Kulturen identifiziert. Mit dem gewonnenen Material wurde eine Mikroarray Analyse durchgeführt. Eine unvollständige nur exemplarische Auflistung der einzelnen Gene und deren fold change ist in Abbildung 13 dargestellt. Wir haben uns in Abhängigkeit vom t-Test für Gene mit der höchsten bzw. niedrigsten Expression entschieden. Anhand dieser Einteilung wurden die einzelnen Gene zur weiteren Validierung ausgewählt (siehe Tabelle 22).

mRNA	mean S	mean L	fold change S/L	ttest
Cartilage glycoprotein39 (CHI3L1)	12,557	9,206	10,2	0,0075
Hypothetical protein FLJ13612 (EF-hand domain fam. mD1)	11,107	7,863	9,5	0,0154
Interferon-induced transmembrane protein 1 (IFITM)	13,072	10,114	7,8	0,0148
Prostaglandin D2 synthase (21kD, brain) (PTGDS)	13,236	10,502	6,7	0,0452
FGFR2, Transcript variant 13	8,240	5,544	6,5	0,0362
WISP2	13,044	10,455	6,0	0,0436
Periplakin (PPL)	10,258	8,012	4,7	0,0178
p57 (CDKN1C)	10,821	8,663	4,5	0,0000
Limbic system-associated membrane protein (LSAMP)	9,174	7,260	3,8	0,0227
OCTN2	9,377	7,550	3,5	0,0302
RAS, dexam.-induced 1 (RASD1)	8,384	6,604	3,4	0,0441
mRNA for KIAA1077 protein, partial	12,174	10,424	3,4	0,0190
Homo sapiens Rab coupling protein (RCP)	9,024	7,313	3,3	0,0374
Protocadherin beta 2 (PCDHB2)	9,146	7,665	2,8	0,0367
HMT1 hnRNP methyltransferase-like1 (HRMT1L1)	10,009	8,560	2,7	0,0154
Laminin alpha 2 (LAMA2)	9,720	8,284	2,7	0,0163
B-cell translocation gene1, (BTG1)	12,731	11,323	2,7	0,0026
Reticulon 2 (RTN2)	8,994	7,599	2,6	0,0195
Clone IMAGE:3618365	9,873	8,494	2,6	0,0395
IGF1	8,351	7,006	2,5	0,0246
Amino acid transporter system A1 (ATA1)	11,869	10,596	2,4	0,0361
Transcription factor (NF-ATc/B)	9,948	8,714	2,4	0,0013
Protocadherin beta 9 (PCDHB9)	9,364	8,149	2,3	0,0118
Type-2 phosphatidic acid phosphatase alpha-2 (PAP2-a2)	13,176	11,973	2,3	0,0356
Potassium channel, subfamily K, member 15 (KCNK15)	8,534	7,331	2,3	0,0220
Protein kinase C mu (PRKCM)	12,169	10,996	2,3	0,0399
DKFZp761F0621	9,403	8,293	2,2	0,0092
Prostaglandin E receptor 1 (subtype EP1) (PTGER1)	8,331	7,262	2,1	0,0376
Hypothetical protein FLJ14917	10,546	9,501	2,1	0,0051
KIAA0022 gene product	9,619	8,584	2,0	0,0185
ADAMTS2, transcript variant 1	11,750	10,717	2,0	0,0259
ATP synthase (ATP5A1)	11,965	10,955	2,0	0,0210
Albumin D-box binding protein (DBP)	10,264	9,258	2,0	0,0300

mRNA	mean S	mean L	fold change S/L	ttest
Hypothetical protein DKFZp564D0478	7,072	9,206	-4,4	0,0177
hypothetical protein PRO1489 (PRO1489) (CaCamKinII Inh)	9,005	10,991	-4,0	0,0246
Tetraspanin13 (NET-6)	8,890	10,594	-3,3	0,0362
Interferon a-inducible protein 27 (IFI27)	7,542	9,218	-3,2	0,0128
Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta (ARHGDI3)	8,515	10,157	-3,1	0,0471
Solute carrier family 38, m5 (SLC38A5)	8,176	9,771	-3,0	0,0407
Colony stimulating factor 2 receptor, beta (CSF2RB)	6,408	7,926	-2,9	0,0404
Dual specificity phosphatase 6 (DUSP6), transcript variant 1	8,781	10,293	-2,9	0,0008
Osteopontin (SPP1)	7,635	9,134	-2,8	0,0021
Plasminogen activator, tissue (PLAT), transcript variant 1	11,273	12,769	-2,8	0,0344
Solute carrier family 4, anion exchanger, m3 (SLC4A3)	6,693	8,063	-2,6	0,0287
Putative secreted ligand homologous to fjx1 (FJX1)	11,638	12,878	-2,4	0,0363
mRNA for KIAA1835 protein, partial	10,830	11,974	-2,2	0,0364
Translocase of outer mitochondrial membrane 34 (TOMM34)	9,146	10,258	-2,2	0,0209
Tumor suppressing subtransferable candidate 3 (TSSC3)	10,822	11,898	-2,1	0,0026
Galactosidase, alpha (GLA)	10,562	11,628	-2,1	0,0264
CTP synthase (CTPS)	9,559	10,588	-2,0	0,0173

Abbildung 13: Exemplarische und unvollständige Ergebnisse der MA-Analyse der Versuchsreihe 1. Sie zeigt u.a. die regulatorischen Veränderungen (fold change) der Genexpression der Kulturen. Die Abbildung wurde von Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dipl.-Biochem.C. Lange und Frau Dr. rer. nat. H. Capallo-Obermann erstellt.

Tabelle 22: Eingesetzte Gene für die erste qPCR Validierung

WNT1-Pathway, tissue growth factor, Zellwachstum	CHI3L1	Cartilage glycoprotein 39
Transmembranproteine, Oberflächenstrukturen zur Zellentwicklung, Aktivierung, Signaltransduktion, Beweglichkeit	NET 6 PLAT Sulf 1	Tetraspanin 13 Tissueplasminogen activator Sulfatase 1
Zelladhäsionsproteine, Zell-Zell-Interaktion	iFiTM1 (Osteoblastendifferenzierung)	Interferon-induced transmembranprotein 1
Zytoskelett	ARGHDiß Actc 1	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta Actin
Neuromodulation, neuronale Differenzierung	PTGDS (Plättchenaggregationshemmer)	Prostaglandin D2 Synthase
Zellproliferation und Differenzierung	BTG 1 DUSP 6	B-Cell translocation gene 1 Dual specificity phosphatase 6
Zellstoffwechsel, Energiegewinnung	GAPDH RPS 27a RPS 16 C20orf59	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Ribosomal protein S27a Ribosomal protein S16 Aliase
Gewebedifferenzierung	Col11a1 (Faserbildend, Knorpelbildung)	Collagen, Type XI, alpha 1

Anhand der Microarray-Analyse (MA) wurden 50 Gene als mögliche Markergene identifiziert. Die Auswahl wurde bereits im Vorfeld dieser Arbeit nochmals auf 12 mögliche Kandidaten für ein Markergen und drei Housekeeping Gene reduziert bzw. begrenzt (siehe Tabelle 22). Es wurden Gene mit möglichst hoher Veränderung ausgewählt. Als Normalisierungsgene wurden die Gene der ribosomalen Proteine RPS27a, RPS16 und das Gen für GAPDH als Housekeeping Gene mit unveränderter Genexpression verwendet. Die aus der Microarray-Analyse gewonnen und auf Kandidaten wurden per qPCR validiert. Es wurden nicht nur die Passagen P3/P4, sondern auch frühe Passagen wie P0/P1 validiert (siehe Abbildung 14).

Folgende Validierungen wurden durchgeführt:

In der ersten Validierung wurden schnell wachsende DMEM + FCS-Kulturen der Versuchsreihe 2 mit langsam wachsenden DMEM + FCS-Kulturen der Versuchsreihe 1 verglichen (P3/P4).

In der zweiten Validierung wurden schnell und langsam wachsende Kulturen der Versuchsreihe 1 miteinander verglichen (P3/P4).

In der dritten Validierung wurden schnell wachsende Kulturen der Versuchsreihe 2 und langsame wachsende Kulturen der Versuchsreihe 1 miteinander verglichen (P3/P4).

In der vierten Validierung wurden schnell und langsam wachsende Kulturen der Versuchsreihe 2 mit einander verglichen (P4).

In der fünften Validierung wurden schnell und langsam wachsende Kulturen der Versuchsreihe 2 mit einander verglichen (P1).

In der sechsten Validierung wurden schnell gegen langsam wachsende Kulturen der Versuchsreihe 2 mit einander verglichen (P0). Eine Veränderung unter zwei wurde dabei als Hintergrundrauschen definiert.

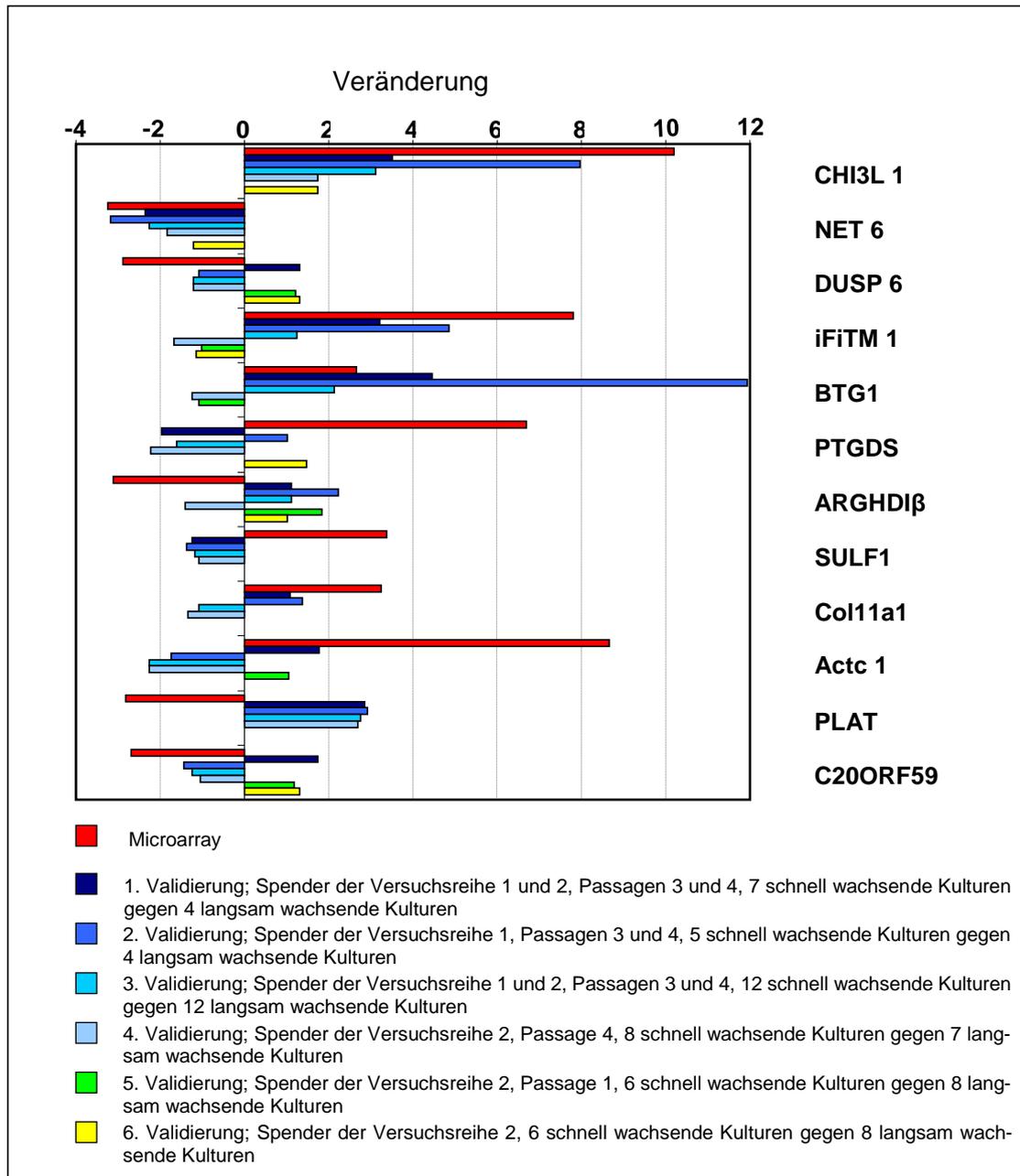


Abbildung 14: Zeigt die unterschiedlichen Genexpressionen von langsamen gegenüber schnellen Zellkulturen in DMEM + FCS auch in Abhängigkeit von den Spendern der Versuchsreihe 1 und Versuchsreihe 2 in Veränderungen.

4.7.1 Validierung der Genexpression, erste Untersuchung zur Validierung

Für die einzelnen Gene wurden folgende Expressionen nachgewiesen:

CHIL31

In den durchgeführten Validierungen konnte die in der MA-Untersuchung bestimmte Veränderung für dieses Gen nicht in gleicher Höhe reproduziert werden. In der ersten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passagen 3 und 4, 7 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) wurde eine Veränderung von ca. 3,5 erreicht. In der zweiten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1, Passagen 3 und 4, 5 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) wurde eine Veränderung von 8 erreicht. Verglichen mit einer Veränderung von ca. 10,2 in der MA-Untersuchung konnte bei gleichen Kulturbedingungen das Ergebnis der MA nicht reproduziert werden. In der dritten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1 und 2, Passagen 3 und 4, 12 schnell wachsende Kulturen gegen 12 langsam wachsende Kulturen) wurde eine Veränderung von ca. 3 erreicht. In der vierten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 4, 8 schnell wachsende Kulturen gegen 7 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. Die fünfte Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 1, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) wurde für dieses Gen nicht durchgeführt. In der sechsten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen.

NET-6

In den für NET-6 durchgeführten Validierungen konnte bei gleichbleibenden Kulturbedingungen (nur Versuchsreihe 1) das MA-Ergebnis von -3,3 nahezu reproduziert werden. In der ersten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passagen 3 und 4, 7 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) wurde eine Veränderung von ca. -2,2 erreicht. In der zweiten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1, Passagen 3 und 4, 5 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) wurde eine Veränderung von ca. -3 erreicht. Dies entspricht in etwa dem Ergebnis der MA-Untersuchung. In der dritten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1 und 2, Passagen 3 und 4, 12 schnell wachsende Kulturen gegen 12 langsam wachsende Kulturen) wurde eine Veränderung von ca. -2,2 erreicht. In der vierten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 4, 8 schnell wachsende Kulturen gegen 7 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. Die fünfte Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 1, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) wurde für

dieses Gen nicht durchgeführt. In der sechsten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen.

DUSP 6

Hier konnte das MA-Ergebnis (ca. -2,9) zu keinem Zeitpunkt reproduziert werden. In der ersten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passagen 3 und 4, 7 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der zweiten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1, Passagen 3 und 4, 5 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der dritten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1 und 2, Passagen 3 und 4, 12 schnell wachsende Kulturen gegen 12 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der vierten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 4, 8 schnell wachsende Kulturen gegen 7 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der fünften Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 1, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der sechsten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen.

iFiTM1

Bei iFiTM1 konnte das MA-Ergebnis einer ca. 7,8-fachen Veränderung des Genes bei den schnell wachsenden Kulturen im Gegensatz zu den langsam wachsenden Kulturen der Passagen 3 und 4 in der Tendenz reproduziert werden. In der ersten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passagen 3 und 4, 7 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) wurde eine Veränderung von ca. 3,2 erreicht. In der zweiten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1, Passagen 3 und 4, 5 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) wurde eine Veränderung von ca. 4,8 erreicht. In der dritten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1 und 2, Passagen 3 und 4, 12 schnell wachsende Kulturen gegen 12 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der vierten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 4, 8 schnell wachsende Kulturen gegen 7 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der fünften Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 1, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der sechsten Validierung

(Spender der Versuchsreihe 2, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen.

BTG 1

Die in der MA-Analyse festgestellte Veränderung von ca. 2,7 wurde nicht identisch reproduziert. In den ersten beiden Validierungen wurde eine ähnliche Tendenz der Veränderungen festgestellt. In der ersten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passagen 3 und 4, 7 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) wurde eine Veränderung von ca. 4,4 erreicht. In der zweiten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1, Passagen 3 und 4, 5 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) wurde eine Veränderung von ca. 1,2 erreicht. In der dritten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1 und 2, Passagen 3 und 4, 12 schnell wachsende Kulturen gegen 12 langsam wachsende Kulturen) wurde eine Veränderung von 2,2 erreicht. In der vierten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 4, 8 schnell wachsende Kulturen gegen 7 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der fünften Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 1, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. Die sechste Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) wurde für dieses Gen nicht durchgeführt.

PTGDS

Das Gen PTGDS hatte in der MA-Analyse eine positive Veränderung von ca. 6,7. In den Validierungen konnte dies nicht reproduziert werden. In der ersten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passagen 3 und 4, 7 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der zweiten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1, Passagen 3 und 4, 5 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der dritten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1 und 2, Passagen 3 und 4, 12 schnell wachsende Kulturen gegen 12 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der vierten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 4, 8 schnell wachsende Kulturen gegen 7 langsam wachsende Kulturen) wurde eine Veränderung von ca. -2,2 erreicht. Die fünfte Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 1, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) wurde für dieses Gen nicht durchgeführt. In der sechsten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen.

ARGHDiB

Das Gen hatte in der MA-Analyse eine Veränderung von ca. -3,1. In der zweiten Validierung konnte eine gegenläufige signifikante Veränderung festgestellt werden. In der ersten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passagen 3 und 4, 7 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der zweiten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1, Passagen 3 und 4, 5 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) wurde eine Veränderung von ca. 2,2 erreicht. In der dritten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1 und 2, Passagen 3 und 4, 12 schnell wachsende Kulturen gegen 12 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der vierten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 4, 8 schnell wachsende Kulturen gegen 7 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der fünften Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 1, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der sechsten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen.

SULF 1

Das Gen hatte in der MA-Analyse eine Veränderung von ca. 3,5. Dies konnte nicht reproduziert werden. In der ersten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passagen 3 und 4, 7 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der zweiten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1, Passagen 3 und 4, 5 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der dritten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1 und 2, Passagen 3 und 4, 12 schnell wachsende Kulturen gegen 12 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der vierten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 4, 8 schnell wachsende Kulturen gegen 7 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. Die fünfte Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 1, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) wurde für dieses Gen nicht durchgeführt. Die sechste Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) wurde für dieses Gen nicht durchgeführt.

Col11a1

Das Gen hatte in der MA-Analyse eine Veränderung ca. 3,4. In der Validierung konnte dies nicht reproduziert werden. In der ersten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passagen 3 und 4, 7 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der zweiten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1, Passagen 3 und 4, 5 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der dritten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1 und 2, Passagen 3 und 4, 12 schnell wachsende Kulturen gegen 12 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der vierten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 4, 8 schnell wachsende Kulturen gegen 7 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. Die fünfte Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 1, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) wurde für dieses Gen nicht durchgeführt. Die sechste Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) wurde für dieses Gen nicht durchgeführt.

Actc 1

Das Gen hatte in der MA-Analyse eine Veränderung von ca. 8,8. In der Validierung konnte dieses nicht reproduziert werden. In der ersten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passagen 3 und 4, 7 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der zweiten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1, Passagen 3 und 4, 5 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der dritten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1 und 2, Passagen 3 und 4, 12 schnell wachsende Kulturen gegen 12 langsam wachsende Kulturen) wurde eine Veränderung von ca. -2,2 erreicht. In der vierten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 4, 8 schnell wachsende Kulturen gegen 7 langsam wachsende Kulturen) wurde eine Veränderung von ca. -2,2 erreicht. In der fünften Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 1, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. Die sechste Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) wurde für dieses Gen nicht durchgeführt.

PLAT

Das Gen hatte in der MA-Analyse eine Veränderung von ca. -2,8. In den Validierungen war das Gen gegenläufig hochreguliert (erste bis vierte Validierung). In der ersten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passagen 3 und 4, 7 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) wurde eine Veränderung von ca. 2,8 erreicht. In der zweiten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1, Passagen 3 und 4, 5 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) wurde eine Veränderung von ca. 3 erreicht. In der dritten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1 und 2, Passagen 3 und 4, 12 schnell wachsende Kulturen gegen 12 langsam wachsende Kulturen) wurde eine Veränderung von ca. 2,7 erreicht. In der vierten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 4, 8 schnell wachsende Kulturen gegen 7 langsam wachsende Kulturen) wurde eine Veränderung von ca. 2,6 erreicht. Die fünfte Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 1, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) wurde für dieses Gen nicht durchgeführt. Die sechste Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) wurde für dieses Gen nicht durchgeführt.

C20orf59

Das Gen hatte in der MA-Analyse eine Veränderung von ca. -2,6. Dies konnte in den Validierungen nicht reproduziert werden. In der ersten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passagen 3 und 4, 7 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der zweiten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1, Passagen 3 und 4, 5 schnell wachsende Kulturen gegen 4 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der dritten Validierung (Spender der Versuchsreihe 1 und 2, Passagen 3 und 4, 12 schnell wachsende Kulturen gegen 12 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der vierten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 4, 8 schnell wachsende Kulturen gegen 7 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der fünften Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, Passage 1, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen. In der sechsten Validierung (Spender der Versuchsreihe 2, 6 schnell wachsende Kulturen gegen 8 langsam wachsende Kulturen) blieb die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen.

Von den ausgewählten Genen wurde nur für NET-6 eine Signifikanz nachgewiesen. Diese war aber für P0 und P1 in DMEM + FCS nicht nachweisbar.

4.7.2 Validierung der Genexpression, zweite Untersuchung zur Validierung

Nach Abschluss der ersten Untersuchungen mit sechs Validierung wurde die ursprüngliche Genliste durch ausgewählte Gene einer weiteren MA-Untersuchung ergänzt bzw. ausgetauscht (siehe Tabelle 24).

Diese Gene und einzelne Gene aus der ersten Validierungsgruppe wurden nun auf die Übertragbarkeit auf Kulturen in α MEM + PI und auf niedrige Passagen (P0/P1) überprüft. Die Daten zur Bestimmung dieser Gene lagen bereits aus einem Vorversuch der Arbeitsgruppe vor (siehe Abbildung 14). Auch diese Gene wurden nach ihrer Funktion zusammengefasst.

4.8 Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf andere Wachstumsbedingungen und frühe Passagen

Tabelle 24: Gene, aus der MA, zur zweiten Genexpressionsanalyse in der qPCR nach funktionellen Clustern geordnet.

Neuromodulation, neuro-nale Differenzierung	PTGDS (Plättchenaggregationshemmer)	Prostaglandin D2 synthase
Zellproliferation und Differenzierung	BTG 1	B-Cell translocation gene 1
Zellstoffwechsel, Energiegewinnung	Golga 1, CTDS 1	Golgin A1, Cathepsin D1
Zelladhäsionsproteine, Zell-Zell-Interaktion	Zyxin, CEACAM 5, CD 151	Zyxin, Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5, CD151 molecule
Transmembranproteine, Oberflächenstrukturen zur Zellentwicklung, Aktivierung, Signaltransduktion, Beweglichkeit	NET 6, PP4519	Tetraspanin 13, Yip1 interacting factor homolog B
Zytoskelett	TuBB4	Tubulin, beta 4A class Iva

Im Rahmen der weiteren Untersuchungen sollte die Übertragbarkeit der Genexpression aus den in DMEM + FCS kultivierten Zellkulturen auf Kulturen in α MEM + PI und die Passagen P0 und P1 geprüft werden. Dazu wurden erneut qPCR mit isolierter RNA aus den Kulturen

der Versuchsreihe 2, die in α MEM + PI kultiviert wurden durchgeführt. Im Rahmen der ursprünglichen MA-Untersuchung wurden keine α MEM + PI-Kulturen analysiert, so dass keine Vergleichswerte einer MA-Untersuchung vorlagen. Zur Analyse wurden die Passagen P0 und P1 von sechs schnell wachsenden und neun langsam wachsenden Kulturen in α MEM + PI ausgewählt und miteinander verglichen. Hierfür wurden folgende Gene (siehe Tabelle 24) zur Validierung ausgewählt: GolgA1, PP4519, TUBB4, CTSD1, CD151, CEACAM 5, Zyxin, NET-6, PTGDS, BTG 1.

4.8.1 Genvalidierung für α MEM + PI

Als nächster Schritt wurde die Genexpression von Kulturen der Versuchsreihe 2, welche in α MEM + PI kultiviert wurden, der Passagen P0 und P1 analysiert.

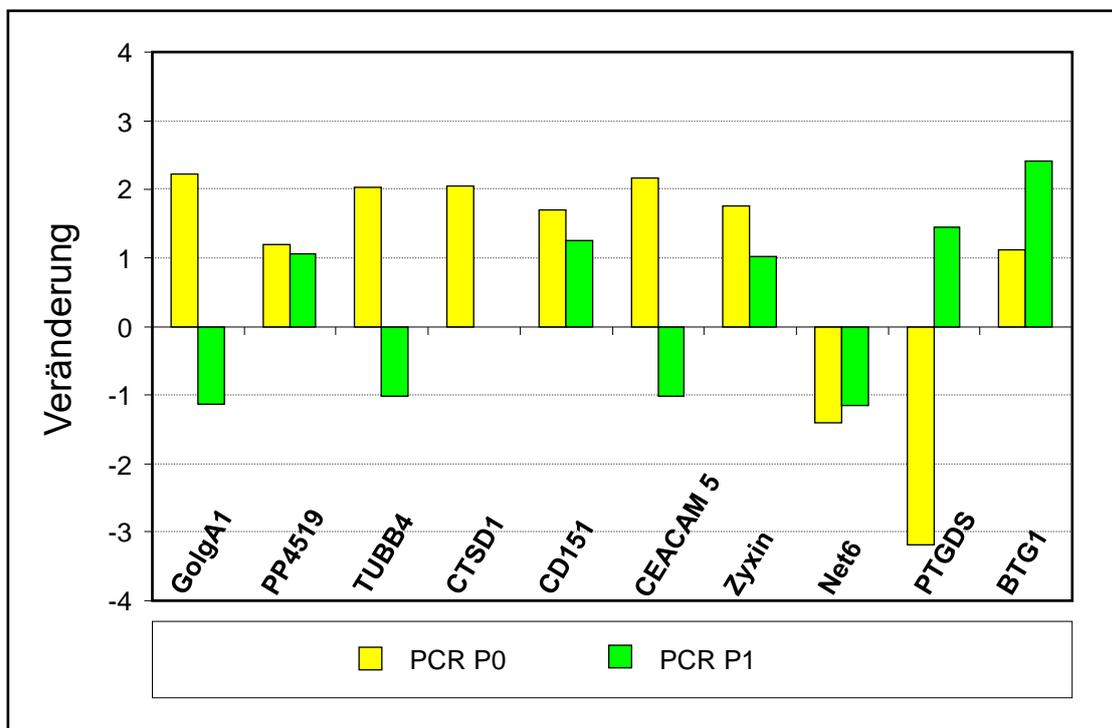


Abbildung 15: Genexpression von α MEM + PI kultivierten Zellen der Versuchsreihe 2 in den Passagen P0 und P1. Es wurde die Genexpression von sechs schnell wachsenden Kulturen und neun langsam wachsenden Kulturen in α MEM + PI verglichen. Die Abbildung zeigt die Veränderungen der Genexpressionsanalyse im Vergleich der Passagen P0 und P1.

Für die einzelnen Gene wurde folgende Expressionen gefunden:

GolgA 1: Für die Passage P0 war eine Veränderung von ca. 2,2 nachweisbar. In der Passage P1 war die Expression im Bereich des Hintergrundrauschens.

PP4519: In beiden Passagen P0 und P1 war das Gen nicht über den Bereich des Hintergrundrauschens exprimiert.

TuBB4: Für die Passage P0 war eine Veränderung von ca. 2,1 nachweisbar. In der Passage P1 war das Gen nicht über das Hintergrundrauschen exprimiert.

CTSD 1: In der Passage P0 war eine Veränderung von ca. 2,1 nachweisbar. Für die Passage P1 lag nicht genügend Material für eine Genexpressionsanalyse vor.

CD 151: In beiden Passagen war das Gen nicht über das Hintergrundrauschen exprimiert.

CEACAM 5: Für die Passage P0 war eine Veränderung von ca. 2,2 nachweisbar. In der Passage P1 war das Gen nur im Bereich des Hintergrundrauschens exprimiert.

Zyxin: In beiden Passagen war das Gen nur im Bereich des Hintergrundrauschens exprimiert.

NET 6: In beiden Passagen war das Gen im Bereich des Hintergrundrauschens exprimiert.

PTGDS: In der Passage P0 war eine Veränderung von ca. 3,2 nachweisbar. In der Passage P1 hingegen war das Gen nur im Bereich des Hintergrundrauschens exprimiert.

BTG 1: Das Gen war in der Passage P0 im Bereich des Hintergrundrauschens exprimiert. Für die Passage P1 war eine Veränderung von ca. 2,5 nachweisbar.

5 Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit sollte ein Markergen zur Prognose einer schnell oder langsam wachsenden Zellkultur identifiziert werden.

Die im Vorfeld durchgeführten Zellkulturen (Versuchsreihe 1) und folgenden Mikroarray-Untersuchungen zeigten mögliche Kandidatengene, die durch eine hohe bzw. niedrige Veränderung auffällig waren.

Diese möglichen Markergene sollten nun in DMEM + FCS, einer alternativen Kulturlösung und in niedrigen Passagen validiert werden. Da FCS ein Infektionsrisiko mit bovinen Kontaminationen bzw. Zoonosen aufweist und potentielle antigene Reaktionen (FCS wird in den Zellen gespeichert) auch auf körpereigene hMSC auslösen kann wurde ein alternatives Kulturmedium ausgewählt. (Kinzebach S. et al., 2012, Bernardo M. et al., 2009, Lange C. et al. 2007, Spees JL. et al. 2004). Wir haben mit Blick auf die eigenen Erfahrungen und den Literaturempfehlungen α MEM + PI als Kulturmedium ausgewählt (Fekete N. et al., 2012). Die Verdopplungszeiten von PI-Kulturen im Gegensatz zu FCS-Kulturen sind kürzer und das Genprofil von PI-gewachsenen hMSC zeigt eine niedrigere Expression von MHC II Genen (MHC-II DP beta1 (HLA-DPB1) MHC-II DM alpha (HLA-DMA), MHC-II DR alpha (HLA-DRA), MHC-II DP alpha1 antigen). Dies erklärt teilweise die schwächere Antigenität, der in PI-expandierten hMSC, in allogenen Settings (Zander A., et al., 2011).

Ein Vorteil von Plättchenlysat, neben der Verdopplungszeit, ist die fehlende Gefährdung durch Zoonosen (Gottipamula S. et al, 2013, Schallmoser K. et al 2007). So könnte nach Identifikation eines Spenders die nötige Zellmenge zur Transplantation in kurzer Zeit ohne das Risiko einer immunogenen Reaktion, einer Zoonose oder ähnlicher Gefährdungen (z.B. Prionen) im Labor bereitgestellt werden. Es gibt jedoch kritische Stimmen, die unter einer PI geführten Zellkultur eine Abnahme der inhibitorischen Wirkung auf die T-Zell Proliferation nachgewiesen haben (Abdelrazik H. et al., 2011) und damit einen wesentlichen Vorteil der hMSC-Wirkung bei z.B. Graft-vs-host-Disease gefährdet sehen. Eigene Ergebnisse der Arbeitsgruppe konnten diesen verringerten inhibitorischen Effekt nicht bestätigen (Lange C., et al.,2007), was PI-expandierte hMSC als erstrebenswerte Population für die Zelltherapie bestätigt.

Hierbei ist ein schnelles Wachstum der Zellkulturen mit dem Blick auf eine zeitliche Notwendigkeit zur therapeutischen Transplantation ein wesentlicher Faktor. Die bereits durchgeführten Zellkulturversuche wurden mit DMEM + FCS durchgeführt. Entsprechend sind alle Mikroarray-Analysen unter diesen Bedingungen bestimmt worden. Dies sollte nun auf

weniger riskante Bedingungen und auf niedrige Passagezahlen übertragen und validiert werden.

5.1 Zellmorphologie

Die in α MEM + PI kultivierten Zellen zeigten das typische dünne, spindelförmige Zellwachstum mit einer Tendenz zur eher flächigen Aussaat. Das Zellwachstum entsprach einem kontinuierlichen Monolayer. Die in DMEM + FCS kultivierten Zellen zeigten ein leicht dickeres, weniger ausladendes, eher rundliches Wachstum. Die Zellen organisierten sich schnell in CFU. In den höheren Passagen traten diese immer mehr in den Hintergrund und bildeten wie die α MEM+PI- Zellkulturen einen kontinuierlichen Monolayer. Diese Beobachtungen deckten sich mit den Vorversuchen in unserer Arbeitsgruppe und der Literatur (Heathman T. et al., 2016, Solchaga L. et al., 2004).

5.2 Plättchenlysats-Konzentration

Aus unseren Vorerfahrungen mit α MEM + PI als Kulturmedium wurde zunächst eine PI-Konzentration von $1,5 \times 10^9$ /ml verwendet. Das Wachstum der Zellen stagnierte unter diesen Nährbedingungen kontinuierlich nach der dritten Passage. Nach einer Umstellung der PI-Konzentration auf $3,0 \times 10^9$ /ml konnten deutlich längere Kultur dauern und höhere Passagen erzielt werden. Die Entwicklung der hMSC war, sowohl was die Wachstumsverhältnisse als auch die spätere Differenzierung angeht, von der PI-Konzentration abhängig (Shani S. et al., 2014). Die Effekte von PI sind unter anderem auf eine hohe Anzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF und FGF2 zurück zu führen (Fekete N. et al., 2012). Dies war mit Hinblick auf das Wachstumsverhalten und das Erreichen der Passagen P4-P6 notwendig, da nur so eine Vergleichbarkeit der hohen Passagen mit den DMEM + FCS-Kulturen möglich ist.

5.3 Zellkulturen/ Zellwachstum

Die DMEM + FCS- Zellkulturen wuchsen langsamer und mit geringeren Zellzahlen. Sie benötigten im Schnitt 11 Tage Wachstum bis zu Passagierung. Sie sind durch ihr stetiges Wachstum dafür länger kultivierbar (Apel A. et al., 2009). Sie unterschieden sich von den Kulturen mit α MEM + PI auch durch ihre Morphologie. Die Zellen waren unregelmäßig begrenzt, kurz im Vergleich zu α MEM + PI -Zellkulturen und wachsen eher in CFU (Mark P. et al., 2013). Sie lösten sich in höheren Passagen nur schwer von den Plastikböden. Die

Kulturen α MEM + PI zeichneten sich durch ein schnelleres Wachstum im Vergleich zu den Kulturen mit DMEM + FCS aus (Heathman T. et al., 2016). Damit deckten sich unsere Ergebnisse mit den veröffentlichten Erfahrungen. Sie benötigten im Durchschnitt nur 10 Tage bis zur Passagierung. Die Kulturen erlangten in kurzer Zeit hohe Zellzahlen. Sie erreichten schnell ein Stadium der Wachstumsstagnation (ab P5/P6).

Nachdem die Wachstumsbedingungen angepasst wurden, zeigte sich ein vergleichbares Passagierungsverhalten mit höheren Zellzahlen der α MEM + PI -Kulturen im Vergleich mit den DMEM + FCS -Kulturen. Im Versuchsverlauf fiel ein Unterschied der DMEM + FCS-Kulturen der Versuchsreihe 1 in Hinblick auf die Gesamtzellzahlen auf. In den Zellkulturen DMEM + FCS zeigte sich eine Gesamtzellzahl von $7,7 \times 10^{13}$. Bei den Zellkulturen in α MEM + PI zeigte sich eine Gesamtzellzahl von $3,71 \times 10^{16}$. Dies weist auf eine frühere Erschöpfung des Proliferationspotentials hin. In der Einzelbetrachtung, zunächst nur der DMEM + FCS-Kulturen der Versuchsreihen 1 und 2, in Bezug auf die Wachstumskurven und auf die individuelle Kulturgesamtdauer, fiel eine längere Zeitspanne zwischen den einzelnen Passagen und eine höhere Zellzahl bis P3 der älteren Kulturen auf. Dies führten wir auf eine längere Zeitspanne zwischen den einzelnen Passagierungen und einer damit einhergehenden höheren Konfluenz des Zellrasens zurück. Es konnte also nicht wie im Versuchsaufbau vorgeschrieben von einer Ablösung („Trypsinierung“) des Zellrasens bei 75% Konfluenz ausgegangen werden. Wir gingen von einer Besiedelung von min. 85% aus. Aus der Literatur wissen wir, dass hMSC, welche mit hoher Konfluenz wachsen, mit einer reduzierten Proliferationsrate und niedrigeren Gesamtzellzahlen einhergehen (Balint R. et al., 2015). Nicht nur die Anfangszellzahl beim Aussäen der Zellen nach der Passagierung war wichtig, sondern auch die Konfluenz bzw. der Zell-Zell-Kontakt war ein weiterer wichtigerer Faktor für das weitere Zellwachstum bzw. für die weitere Differenzierung der Kulturen (Balint R. et al., 2015, Sekiya I. et al., 2002). Man kann also durch den Zell-Zell-Kontakt von einer Kontaktinhibition der Zellen untereinander ausgehen (Bourin P. et al., 2008). Wichtig für das Zellwachstum sind unter anderem die Sauerstoffsättigung, die Kulturdichte/ Konfluenz, die Passagenummer, das Kulturmedium und die verwendeten Wachstumsfaktoren (Bieback K., 2013, Bourin P., et al., 2008). Eine maschinell geführte immer gleichbleibende Zellkulturpflege, wie z.B. in Bioreaktoren (Ma T., Tsai A., Liu Y., 2016, Heathman T, et al., 2015, Hupfeld J., et al., 2014, Chen A., Reuveny S., Oh S. 2013, Nold P., et al., 2013) möglich, könnte dieses Problem in der Zukunft evtl. ausschließen.

5.4 Gensequenzierung

Aus der Versuchsreihe 1 lagen uns bereits Daten einer reinen DMEM + FCS-Zellkultur vor. Diese Kulturen wurden gemäß ihrem Wachstum in schnell und langsam wachsende Kulturen eingeteilt. Aus diesen Kulturen wurde ein Mikroarray-Versuch mit dem Ziel durchgeführt, eine geschwindigkeitsabhängige Hoch- oder Herunterregulation der Gene zu bestimmen. Anhand derer wurden verschiedene Gene als mögliche Marker für ein schnelles oder langsames Wachstum isoliert. In der Genvalidierung per qPCR aller DMEM + FCS-Kulturen, der schnell und langsam wachsenden Kulturen, waren die Veränderungen bzw. die Regulation in den unterschiedlichen Passagen und den gleichen Passagen teilweise widersprüchlich und entgegengesetzt reguliert. Oftmals war die Veränderung unter dem Hintergrundrauschen nicht nachweisbar. Auch eine Reproduktion der MA-Ergebnisse unter gleichen Bedingungen, wie nur der Passagen P3/P4, war nicht möglich. Nur ein Gen, das NET-6, ließ sich für DMEM + FCS in beiden Versuchsreihen validieren. Allerdings lag die statistische Signifikanz nur für höhere Passagen vor. In den Passagen P0 und P1 konnte keine Signifikanz festgestellt werden.

In der Literatur wurden bereits von der Dichte des Zellrasens abhängige Veränderungen des Zellstoffwechsels beschrieben (Liu Y. et al., 2015). Es wurde der Nachweis erbracht, dass hMSC unter Laktatexposition eine andere bzw. eine veränderte Genexpression aufweisen (Schneider C.-C. et al., 2012). Wir wissen, dass sich allein das Kulturmedium auf die Zellmorphologie, das Wachstum und die Oberflächenproteine bzw. die Genexpression auswirken kann und so z.B. mehr CD105 exprimiert wird (Mark P. et al., 2015, Crapnell K. et al., 2013, Apel A. et al., 2009). Bereits Mediumvariationen beeinflussen die Häufigkeit und Größe von Zellkolonien in der ersten und den folgenden Passagen (Jung S. et al., 2010, Solchaga L. et al., 2004) und damit auch höchstwahrscheinlich die Genexpression.

5.5 NET-6

Das NET-6 oder TSPAN13 ist ein hydrophobes, transmembranöses Protein, welches aus vier tetraspanin-transmembranösen Domänen und zwei extrazellulären Schleifen besteht. Diese sind wahrscheinlich ein Interaktionsort für den intra- und extrazellulären Austausch. Diese werden als wichtig für die Biosynthese und den Zusammenbau des tetraspanin-linked Membranprotein-Netzwerkes, auch Tetraspaninnetz genannt, bezeichnet. In der intrazellulären juxtamembranösen Region wird die Palmitoylierung von Cysteinresiduen durchgeführt. Die C-terminale cytoplasmische Schwanzregion stellt spezifische funktionale Verbindungen zum Cytoskelett oder den Signalproteinen her. (Stipp C. et al., 2002, Yunta M. et al., 2003).

Das NET-6 wird aktuell als ein mögliches Tumorsuppressorgen des Mamma-Karzinom angesehen. NET-6 war im HER2-negativen Mamma-Karzinom niedriger exprimiert. Es war runterreguliert bei Estrogenrezeptor negativen und high grade Tumoren (Huang H. et al., 2005). Im Mausmodell wurde es mit einer erhöhten Apoptose und einer Hochregulation der Apoptosemoleküle p53, bax, caspase 3 und bcl-2 assoziiert (Huang H. et al., 2005). In der Prostata-Karzinom-Forschung wurde postuliert, dass es ein möglicher diagnostischer bzw. ein Biomarker sein kann. Es ist beim Prostata-Karzinom hochreguliert und korreliert mit dem Gleason-Score und dem Prostataspezifischen Antigen (PSA) (Arencibia JM. et al., 2009, Yan C. et al., 2015).

NET-6 wurde in der Differenzierungskaskade der Osteoklasten nachgewiesen und dort insbesondere auf den Osteoklastenvorgängerkernen und damit in der Osteoklastogenese bzw. der Zellfusion. Es wird ein mögliches therapeutisches Potential bei der rheumatoiden Arthritis gesehen (Iwai K. et al., 2007). Da NET-6 bereits in der Osteoklastendifferenzierung nachgewiesen werden konnte, überrascht der Nachweis in den hMSC nicht, da diese Vorläuferzellen der Osteogenese sind. In der Genvalidierung war NET-6 bei den schnell wachsenden DMEM + FCS-Kulturen sowohl in den Kulturen der Versuchsreihe 1 als auch in denen der Versuchsreihe 2 runter reguliert, bei denen der Versuchsreihe 2 allerdings nur im Bereich des Hintergrundrauschens.

Ob NET-6 anhand der durchgeführten Untersuchungen ein valider Marker für ein schnelles Zellwachstum darstellt, konnte anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend geklärt werden. Es bedarf weiterer Untersuchung um eine abschließende Aussage treffen zu können, ob dies nur eine Momentaufnahme dieser Zellkulturen war oder ob es generell postuliert werden kann.

5.6 Limitationen

Wir haben das Wachstumsverhalten von Zellkulturen von insgesamt 37 Spendern und deren Genexpression miteinander verglichen. Die geringe Anzahl von Spendern (37) und auch die teilweise heterogene Zusammensetzung (28 Spender aus der eigenen Zellkultur und 9 Spender aus einer vorhergehenden Kultur) schränken die Aussagefähigkeit dieser Arbeit ein. Des Weiteren zeigte sich bereits bei den 37 Zellkulturen, wie fehleranfällig diese in Bezug auf die Reproduzierbarkeit der Daten und die Abhängigkeit von immer konstanten Kulturbedingungen sind. Hier sind sicherlich höhere Spenderzahlen und maschinell geführte Kulturbedingungen aussagekräftiger. Da gerade in der Zellkulturpflege und in der

weiteren Aufbereitung der Proben viele Schritte manuell durchgeführt werden müssen, liegen hier viele mögliche Fehlerquellen, die zu einer Einschränkung der Aussagen dieser Arbeit führen können.

5.7 Zusammenfassung

hMSC von 37 Spendern unterschiedlichen Geschlechts und Alters wurden in zwei unterschiedlichen Medien (DMEM + FCS und α MEM + PI) in Kultur gehalten. Ihr unterschiedliches Wachstumsverhalten in Abhängigkeit von den Kulturmedien wurde miteinander verglichen. In ihrem Wachstumsverhalten zeigten die Kulturen mit α MEM + PI eine Abhängigkeit von der Konzentration des Plättchenlysates. Eine Korrektur der Konzentration zeigte das schnellere Wachstum mit einer höheren Zellausbeute. Die Zellen sind also in ihrem Wachstum direkt von der Konzentration der wachstumsstimulierenden Faktoren des Plättchenlysates abhängig.

Im direkten Vergleich zeigten die α MEM-Kulturen ein schnelleres Wachstum mit höheren Zellzahlen. Die Kulturen in DMEM + FCS hingegen waren im Wachstum konstanter und erreichten längere Kulturdauern.

Im Vergleich der beiden Versuchsreihen 1 und 2 zeigten sich bei gleichen Kulturbedingungen (DMEM + FCS) Unterschiede in der Passagedauer und in den Gesamtzellzahlen.

Wir haben die Abweichungen auf individuelle Unterschiede bei der Zellkulturpflege, insbesondere auf die Konfluenz des Zellrasens der Kulturen, zurückgeführt. Hier hatte die höhere Dichte des Zellrasens auf dem Kulturflaschenboden und einer damit einhergehenden Kontakthemmung bzw. einer dadurch verbundenen veränderten Stoffwechsellage der Zellen neben einem abweichenden Wachstumsverhalten auch zu einer Veränderung der Genexpression beigetragen.

Diese Veränderungen betrafen unserer Ansicht nach nicht nur die eigentliche Passage selbst, sondern möglicherweise auch die folgenden Passagen. Dies bestätigte sich folgend durch die fehlende Reproduzierbarkeit der MA Ergebnisse und in der Validierung über die unterschiedlichen Passagen. Anhand dieser Daten wird klar, wie abhängig die Genexpression der Zellen von ihren Kulturbedingungen sind.

Die Genregulation ist also neben dem individuellen Genom des Spenders selbst auch von individuellen Unterschieden der Zellkulturpflege und den zur Verfügung stehenden Medien und Wachstumsfaktoren abhängig. Die Isolierung eines Markergens für ein schnelles oder langsames Zellwachstum war unter diesen Bedingungen nicht möglich.

Diese Arbeit zeigt deutlich, wie abhängig die Zellkulturen und insbesondere deren Wachstum von immer gleichbleibenden Rahmenbedingungen sind. So bieten Bioreaktoren eine Möglichkeit diese Bedingungen zu schaffen. Diese könnten die Probleme der unterschiedlichen individuellen Zellkulturpflege in der Zukunft evtl. ausschließen und zur Isolierung eines validen Markergens beitragen. Auch bestehen bezüglich der Zell-Zell-Interaktion bzw. optimaler Wachstumsbedingungen weitere Fragen, die noch nicht abschließend beantwortet sind. Da auch in absehbarer Zeit ein hoher Bedarf an hMSC zur Transplantation bzw. zu Forschungszwecken vorhanden ist, bedarf es sicherlich weiterer Forschung. Seit den ersten Tagen der Erforschung der hMSC durch Friedenstein ist viel Zeit vergangen. Wir haben viele Erkenntnisse dazugewonnen und neue Fragen aufgeworfen. Es besteht nicht nur zu den klinischen Anwendungen, sondern auch zu den Grundlagen noch weiterer Forschungsbedarf.

Abstrakt

Ziel/Hintergrund: Friedenstein beschrieb im Jahr 1966 erstmals Zellen des Knochenmarks, welche an Plastik adhären und die Möglichkeit besaßen, sich in vitro in Knochen und Knorpel zu differenzieren und nicht der hämatopoetischen Stammzelllinie entstammen. Diese wurden im Verlauf als humane mesenchymale Stromazellen bezeichnet.

Derzeitig finden sie eine breite Anwendung in der regenerativen Medizin und in der Therapie hämatologischer Erkrankungen. Diese Anwendungsgebiete bedürfen einer konstant hohen Anzahl von Zellen. Für die therapeutische Anwendung wird eine Mindestzahl von Zellen benötigt, um eine therapeutische Wirksamkeit zu erreichen. Ziel dieser Arbeit war es, ein verlässliches Markergen zu definieren, welches eine valide Aussage über die Zellausbeute und die Wachstumsgeschwindigkeit in niedrigen Passagen ermöglicht. So soll eine frühe Evaluierung von Spendermaterial für die regenerativen bzw. therapeutischen Ansätze ermöglicht werden.

Methoden: Es wurden hMSC aus neun Spenderkulturen bis in die Passagen P0/P1 expandiert. Es folgte eine RNA-Isolation und daraus eine Expressionsanalyse (Microarray-Untersuchung). Die so identifizierten Markergene der hMSC wurden in einer zweiten Untersuchungsreihe mit 28 Spendern unter zwei verschiedenen Kultivierungsprotokollen nach RNA-Isolation und qPCR überprüft.

Ergebnisse: Es wurden Vergleiche von insgesamt 37 Spenderkulturen durchgeführt. In der Auswertung der Zellkulturen zeigten sich deutliche Unterschiede der neun Spenderkulturen vom Microarray-Versuch im Vergleich zu den 28 Spendern der Validierung. Es zeigten sich Unterschiede in der Kulturdauer, der Gesamtzellzahl und in der Genexpression. Die Ergebnisse der Genexpression der 28 Spender der Validierung konnten die Ergebnisse der Microarray-Untersuchung nicht reproduzieren. Sie zeigten oftmals gegenläufige Genregulation im Vergleich zu der bereits erhobenen Analyse. Eine prädiktive Validierung konnte somit nicht erfolgen.

Fazit/Diskussion: In der Auswertung der Zellkulturen zeigten individuelle Unterschiede in der Kulturpflege bereits Auswirkungen. So sind die einzelnen Bestandteile des Mediums und die wachstumsbedingte Zell-Zell-Interaktion in frühen Passagen ein Wegweiser für die weitere Genexpression. Es konnte nachgewiesen werden, dass unter diesen Bedingungen die Identifizierung eines Markergens zur Charakterisierung eines langsamen oder möglichst schnellen Wachstums nicht erreichbar ist. Eine Übernahme der Daten für eine prädiktive hMSC-Expansion war unter diesen Umständen nicht möglich.

Abstract

Background: In 1966 Friedenstein first described bone marrow cells that were not descended from the haematopoietic cell line and that were adherent to plastic and able to differentiate into bone and cartilage. These cells were later named human mesenchymal stroma cells.

Today they are widely used in regenerative medicine and in therapy of haematological diseases. Those fields of application are in constant need of high numbers of cells because a therapeutic usage requires a minimal amount of cells to have a therapeutic effect. It was the aim of this thesis to define a reliable marker gene that grants a valid prediction on the amount of cells and the rate of growth in a low passage in cell cultures. This would allow an early evaluation of the donor material for a regenerative and therefore therapeutic approach.

Methods: hMSC of nine donor cultures were expanded till passages P0/P1. An RNA isolation followed, which was the basis for an expression analysis. In a second analysis with 28 donors those identified marker genes were verified under two different cultivation protocols after RNA isolation and qPCR.

Results: In total 37 donor cultures were compared. In the examination of the cell cultures obvious differences were observed between the microarray examination with nine donor cultures and the validation examination with 28 donor cultures. There were differences in the duration of cultures, the total amount of cells and their gene expression. The gene expression results of the microarray examination could not be reproduced in the validation examination. Instead the validation examination often showed a contrary regulation of genes compared to the microarray examination. Thus a predictive validation could not be performed.

Conclusion: The evaluation of the cell cultures showed that individual differences in culture keeping cause an impact. Individual components of the used medium and cell growth induced cell-cell interaction in early passages are a signpost for the further gene expression. It has been proved that under these conditions a identification of a marker gene for predicting growth rates is not achievable. A data transfer for a predictive hMSC expansion is not possible under these circumstances.

Abkürzungsverzeichnis

Alle Einheiten entsprechen dem internationalen Einheitensystem (SI) und werden nicht mehr gesondert aufgeführt.

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
α-MEM	α- Minimum Essential -Medium
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
ct	cycle threshold
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang- DNA
DTT	Dithiothreitol
et al.	et alii („und andere“)
FCS	fetales Kälberserum
GITC	Guanidiniumthiocyanat
hMSC	humane Mesenchymale Stromazellen
kb	Kilobase(n)
KMT	Klinik für Knochenmarkstransplantation
l	Liter
m	Masse
M	Mol/IMolar
MA	Microarray
mg	Milligramm
min	Minuten
m	Milli
mM	millimolar
mRNA	Boten- RNA
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PI	Plättchenlysat

rcf	relative centrifugal force
REST	Relative Expression Software Tool
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rt-PCR	real-time PCR
sec.	Sekunde
ssDNA	Einzelstrang DNA
T25	25cm ² Tissue Culture Flask
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetate-EDTA buffer
UV	Ultraviolett
z.B.	zum Beispiel

Quellen

1. Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., Frolova, G. P., Northoff, H., Schäfer, R., et al. (1968). HETEROTOPIC TRANSPLANTS OF BONE MARROW. *Transplantation*, 6(2), 230–247.
2. Spees, J. L., Gregory, C. A., Singh, H., Tucker, H. A., Peister, A., Lynch, P. J., Hsu S., Prockop, D. J. (2004). Internalized antigens must be removed to prepare hypo-immunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Molecular Therapy*, 9(5), 747–756.
3. Blau, H. M., Brazelton, T. R., Weimann, J. M., Aboody, K. S., Brown, A., Rainov, N. G., et al. (2001). The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*, 105(7), 829–41. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00409-3](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00409-3)
4. Wagers, A. J., Weissman, I. L., Alison, M. R., Alonso, L., Fuchs, E., Altman, J., et al. (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell*, 116(5), 639–48.
5. Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154–156.
6. Illingworth, R. S., Hölzenspies, J. J., Roske, F. V., Bickmore, W. A., & Brickman, J. M. (2016). Polycomb enables primitive endoderm lineage priming in embryonic stem cells. *eLife* ;5:e14926. DOI: 10.7554/eLife.14926.
7. Morrison, S. J., & Shah, N. M. (1997). Regulatory Mechanisms Review in Stem Cell Biology. *Cell*, 88, 287–298.
8. Kühl S, Kühl M, Stammzellbiologie, 2012, Seite 107
9. Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., et al. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5417), 1168–70.
10. Smith, C. (n.d.). Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center*, 10(1), 9–16.
11. Wu, A. M., Till, J. E., Siminovitch, L., & McCulloch, E. A. (1967). A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells. *Journal of Cellular Physiology*, 69(2), 177–184.
12. Lüllmann-Rauch R., Histologie,2003, Seite 249, Abb.13.1
13. Appelbaum, F. R. (2007). Hematopoietic-Cell Transplantation at 50. *New England Journal of Medicine*, 357(15), 1472–1475.
14. Juric, M. K., Ghimire, S., Ogonek, J., Weissinger, E. M., Holler, E., van Rood, J. J., et al. (2016). Milestones of Hematopoietic Stem Cell Transplantation - From First Human Studies to Current Developments. *Frontiers in Immunology*, 7, 470.
15. Saber, W., & Horowitz, M. M. (2016). Transplantation for myelodysplastic syndromes: who, when, and which conditioning regimens. *Hematology*, 2016(1), 478–484.
16. Ljungman, P., Bregni, M., Brune, M., Cornelissen, J., Witte, T. de, Dini, G., et al. (2010). Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone Marrow Transplantation*, 45(2), 219–234.
17. Hansen, J. A., Clift, R. A., Thomas, E. D., Buckner, C. D., Storb, R., & Giblett, E. R. (1980). Transplantation of Marrow from an Unrelated Donor to a Patient with Acute Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 303(10), 565–567.

18. Impola, U., Larjo, A., Salmenniemi, U., Putkonen, M., Itälä-Remes, M., & Partanen, J. (2016). Graft Immune Cell Composition Associates with Clinical Outcome of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients with AML. *Frontiers in Immunology*, 7, 523. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00523>
19. Blaise, D., Maraninchi, D., Archimbaud, E., Reiffers, J., Devergie, A., Jouet, J., ... Ifrah, N. (1992). Allogeneic bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia in first remission: a randomized trial of a busulfan-Cytosan versus Cytosan-total body irradiation as preparative regimen: a report from the Group d'Etudes de la Greffe de Moelle Osseuse 79(10). 2578-2582
20. Thomas, E., Buckner, C., Banaji, M., Clift, R., Fefer, A., Flournoy, N., et al. (1977). One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood*, 49(4). 511-533.
21. Alfonso, A., Montalban-Bravo, G., & Garcia-Manero, G. (2017). Current management of patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Current Opinion in Oncology*, 29(1), 79–87.
22. Gotlib, J. (2017). How I treat atypical chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2017 Feb 16;129(7):838-845.
23. Gratwohl, A., Schwendener, A., Baldomero, H., Gratwohl, M., Apperley, J., Niederwieser, D., & Frauendorfer, K. (2010). Changes in the use of hematopoietic stem cell transplantation: a model for diffusion of medical technology. *Haematologica*, 95(4), 637–43.
24. Devergie, A., Blaise, D., Attal, M., Tigaud, J., Jouet, J., Vernant, J., et al. (1995). Allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia in first chronic phase: a randomized trial of busulfan-cytosan versus cytosan-total body irradiation as preparative regimen: a report from the French Society of Bone Marrow Graft (SFGM). *Blood*, 85(8).2263-2268.
25. Schwarzbich, M.-A., McClanahan, F., & Gribben, J. (2016). Allogeneic Transplantation for Chronic Lymphocytic Leukemia in the Age of Novel Treatment Strategies. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 30(6), 526–33, 540.
26. Metayer, C., Curtis, R. E., Vose, J., Sobocinski, K. A., Horowitz, M. M., Bhatia, S., et al. (2003). Myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia after autotransplantation for lymphoma: a multicenter case-control study. *Blood*, 101(5). 2015-2023.
27. McSweeney, P. A., Niederwieser, D., Shizuru, J. A., Sandmaier, B. M., Molina, A. J., Maloney, D. G., et al. (2001). Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood*, 97(11). 3390-3400.
28. Srivastava, A., & Shaji, R. V. (2017). Cure for thalassemia major: from allogeneic hematopoietic stem cell transplantation to gene therapy. *Haematologica*. 214-223.
29. Rai, P., & Malik, P. (2016). Gene therapy for hemoglobin disorders - a mini-review. *Journal of Rare Diseases Research & Treatment*, 1(2), 25–31.
30. Grunebaum, E., Mazzolari, E., Porta, F., Dallera, D., Atkinson, A., Reid, B., et al. (2006). Bone Marrow Transplantation for Severe Combined Immune Deficiency. *JAMA*, 295(5), 508.
31. Peffault de Latour, R. (2016). Transplantation for bone marrow failure: current issues. *Hematology*, 2016(1), 90–98.

32. Matthay, K. K., Reynolds, C. P., Seeger, R. C., Shimada, H., Adkins, E. S., Haas-Kogan, D., et al. (2009). Long-Term Results for Children With High-Risk Neuroblastoma Treated on a Randomized Trial of Myeloablative Therapy Followed by 13-cis-Retinoic Acid: A Children's Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology*, 27(7), 1007–1013.
33. Wulffraat, N. M., van Rooijen, E. M., Tewarie, R., Brinkman, D., Prakken, B., & Kuis, W. (2008). Current perspectives of autologous stem cell transplantation for severe juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmunity*, 41(8), 632–638.
34. Smith, S. R., & Asher, A. (2017). Rehabilitation in Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, 28(1), 143–151.
35. Krishnappa, V., Gupta, M., Manu, G., Kwatra, S., Owusu, O.-T., & Raina, R. (2016). Acute Kidney Injury in Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Review. *International Journal of Nephrology*, 2016, 5163789. doi:10.1155/2016/5163789
36. Llaurador, G., McLaughlin, L., & Wistinghausen, B. (2017). Management of post-transplant lymphoproliferative disorders. *Current Opinion in Pediatrics*, 1. 34-40.
37. Sahin, U., Ataca Atila, P., Atila, E., Toprak, S. K., Demirer, T., Aglietta, M., et al. (2016). An overview of hematopoietic stem cell transplantation related thrombotic complications. *Critical Reviews in Oncology/hematology*, 107, 149–155.
38. Tay, J., Allan, D., Beattie, S., Bredeson, C., Fergusson, D., Maze, D., et al. (2016). Rationale and design of platelet transfusions in haematopoietic stem cell transplantation: the PATH pilot study. *BMJ Open*, 6(10), e013483.
39. Ogonek, J., Kralj Juric, M., Ghimire, S., Varanasi, P. R., Holler, E., Greinix, H., & Weissinger, E. (2016). Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Frontiers in Immunology*, 7, 507.
40. Santos, K. B. dos, Souza, R. S. e, Atalla, A., & Hallack-Neto, A. E. (2016). Herpes zoster after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Revista Brasileira de Hematologia E Hemoterapia*, 38(4), 298–301.
41. Lee, L. E., Barsoumian, A. E., Brown, A. W., Wiggins, M. A., Renshaw, J. S., Oswald, M. B., & Murray, C. K. (2016). Rates of Microbiologically Diagnosed Infection and Pathogen Detection in Hematopoietic Stem Cell Transplant Patients. *Military Medicine*, 181(11), e1685–e1691.
42. Summer, R., Kotton, D. N., Sun, X., Ma, B., Fitzsimmons, K., & Fine, A. (2003). Side population cells and Bcrp1 expression in lung. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 285(1).
43. Goodell, M. A., Rosenzweig, M., Kim, H., Marks, D. F., DeMaria, M., Paradis, G., et al. (1997). Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nature Medicine*, 3(12), 1337–1345.
44. Gage, F. H. (2000). Mammalian Neural Stem Cells. *Science*, 287(5457). 1433-1438.
45. Forbes, S., Vig, P., Poulsom, R., Thomas, H., & Alison, M. (2002). Hepatic stem cells. *The Journal of Pathology*, 197(4), 510–8.
46. Bjerknes, M., & Cheng, H. (1999). Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology*, 116(1), 7–14.
47. Alonso, L., & Fuchs, E. (2003). Stem cells of the skin epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 11830–5.

48. Bel, A., Messas, E., Agbulut, O., Richard, P., Samuel, J.-L., Bruneval, P., et al. (2003). Transplantation of autologous fresh bone marrow into infarcted myocardium: a word of caution. *Circulation*, 107, 5247-52.
49. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., et al. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5411), 143-7.
50. Muraglia, A., Cancedda, R., & Quarto, R. (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Journal of Cell Science*, 113, 1161-6.
51. Owen, M. (1988). Marrow stromal stem cells. *Journal of Cell Science*, 10, 63-76.
52. Mets, T., & Verdonk, G. (1981). Variations in the stromal cell population of human bone marrow during aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 15(1), 41-49.
53. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(14), 7841-7845.
54. Sekiya, I., Larson, B. L., Smith, J. R., Pochampally, R., Cui, J., & Prockop, D. J. (2002). Expansion of Human Adult Stem Cells from Bone Marrow Stroma: Conditions that Maximize the Yields of Early Progenitors and Evaluate Their Quality. *Stem Cells*, 20(6), 530-541.
55. Gottschling, S., Saffrich, R., Seckinger, A., Krause, U., Horsch, K., Miesala, K., & Ho, A. D. (2006). Human Mesenchymal Stromal Cells Regulate Initial Self-Renewing Divisions of Hematopoietic Progenitor Cells by a β 1-Integrin-Dependent Mechanism. *STEM CELLS*, 25(3), 798-806.
56. Kobune, M. (2004). Indian hedgehog gene transfer augments hematopoietic support of human stromal cells including NOD/SCID-2m^{-/-} repopulating cells. *Blood*, 104(4), 1002-1009.
57. Tuli, R., Tuli, S., Nandi, S., Wang, M. L., Alexander, P. G., Haleem-Smith, H., et al. (2003). Characterization of Multipotential Mesenchymal Progenitor Cells Derived from Human Trabecular Bone. *Stem Cells*, 21(6), 681-693.
58. Prockop, D. J. (2007). "Stemness" Does Not Explain the Repair of Many Tissues by Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells (MSCs). *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 82(3), 241-243.
59. Le Blanc, K., & Ringdén, O. (2007). Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *Journal of Internal Medicine*, 262(5), 509-525.
60. Kassis, I., Zangi, L., Rivkin, R., Levdansky, L., Samuel, S., Marx, G., & Gorodetsky, R. (2006). Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplantation*, 37(10), 967-76.
61. Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., et al. (2005). Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental Hematology*, 33(11), 1402-1416.
62. Gronthos, S., Franklin, D. M., Leddy, H. A., Robey, P. G., Storms, R. W., & Gimble, J. M. (2001). Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Journal of Cellular Physiology*, 189(1), 54-63.

63. Horwitz, E. M., & Prather, W. R. (2009). Cytokines as the major mechanism of mesenchymal stem cell clinical activity: expanding the spectrum of cell therapy. *The Israel Medical Association Journal: IMAJ*, 11(4), 209–11.
64. Minguell, J. J., Erices, A., & Conget, P. (2001). Mesenchymal stem cells. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 226(6), 507–20.
65. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–7.
66. Takeuchi, M., Higashino, A., Takeuchi, K., Hori, Y., Koshiba-Takeuchi, K., Makino, H., et al. (2015). Transcriptional Dynamics of Immortalized Human Mesenchymal Stem Cells during Transformation. *PloS One*, 10(5), e0126562.
67. Vogel, W., Grünebach, F., Messam, C. A., Kanz, L., Brugger, W., & Bühring, H.-J. (2003). Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica*, 88(2), 126–33.
68. Solchaga, L. A., Welter, J. F., Lennon, D. P., & Caplan, A. I. (2004). Generation of Pluripotent Stem Cells and Their Differentiation to the Chondrocytic Phenotype. In *Cartilage and Osteoarthritis* (Vol. 100, 053–068). New Jersey: Humana Press.
69. Castro-Malaspina, H., Gay, R. E., Resnick, G., Kapoor, N., Meyers, P., Chiarieri, D., et al. (1980). Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*, 56(2), 289–301.
70. Wexler, S. A., Donaldson, C., Denning-Kendall, P., Rice, C., Bradley, B., & Hows, J. M. (2003). Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal “stem” cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *British Journal of Haematology*, 121(2), 368–374.
71. Le Blanc, K., & Pittenger, M. (2005). Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy*, 7(1), 36–45. <http://doi.org/10.1080/14653240510018118>
72. Satomura, K., Krebsbach, P., Bianco, P., & Gheron Robey, P. (2000). Osteogenic imprinting upstream of marrow stromal cell differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 78(3), 391–403.
73. Krebsbach, P. H., Kuznetsov, S. A., Bianco, P., & Robey, P. G. (1999). Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 10(2), 165–81.
74. Tavassoli, M., & Minguell, J. J. (1991). Homing of hemopoietic progenitor cells to the marrow. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 196(4), 367–73.
75. Majumdar, M. K., Keane-Moore, M., Buyaner, D., Hardy, W. B., Moorman, M. A., McIntosh, K. R., & Mosca, J. D. (n.d.). Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Science*, 10(2), 228–41.
76. Aggarwal, S., & Pittenger, M. F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105(4), 1815–22.
77. Le Blanc, K., Tammik, L., Sundberg, B., Haynesworth, S. E., & Ringdén, O. (2003). Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scandinavian Journal of Immunology*, 57(1), 11–20

78. Zhang, W., Ge, W., Li, C., You, S., Liao, L., Han, Q., et al. (2004). Effects of Mesenchymal Stem Cells on Differentiation, Maturation, and Function of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Stem Cells and Development*, 13(3), 263–271.
79. Sepúlveda, J. C., Tomé, M., Fernández, M. E., Delgado, M., Campisi, J., Bernad, A., & González, M. A. (2014). Cell senescence abrogates the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells in the lethal endotoxemia model. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 32(7), 1865–77.
80. Islam, M. N., Das, S. R., Emin, M. T., Wei, M., Sun, L., Westphalen, K., et al. (2012). Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nature Medicine*, 18(5), 759–65.
81. Liang, X., Ding, Y., Zhang, Y., Tse, H.-F., & Lian, Q. (2014). Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell Transplantation*, 23(9), 1045–59.
82. Yeh, E. T. H., Zhang, S., Wu, H. D., Körbling, M., Willerson, J. T., & Estrov, Z. (2003). Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation*, 108(17), 2070–3.
83. Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J., et al. (1999). Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *Journal of Clinical Investigation*, 103(5), 697–705.
84. Toma, C. (2002). Human Mesenchymal Stem Cells Differentiate to a Cardiomyocyte Phenotype in the Adult Murine Heart. *Circulation*, 105(1), 93–98.
85. Levit, R. D., Landazuri, N., Phelps, E. A., Brown, M. E., Garcia, A. J., Davis, M. E., et al. (2013). Cellular Encapsulation Enhances Cardiac Repair. *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease*, 2(5), e000367.
86. Liu, Y., Liu, T., Han, J., Yang, Z., Xue, X., Jiang, H., & Wang, H. (2014). Advanced Age Impairs Cardioprotective Function of Mesenchymal Stem Cell Transplantation from Patients to Myocardially Infarcted Rats. *Cardiology*, 128(2), 209–219.
87. Sato, T., Iso, Y., Uyama, T., Kawachi, K., Wakabayashi, K., Omori, Y., et al. (2011). Coronary vein infusion of multipotent stromal cells from bone marrow preserves cardiac function in swine ischemic cardiomyopathy via enhanced neovascularization. *Laboratory Investigation*, 91(4), 553–564.
88. Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M. S., Shou, M., Lee, C. W., Barr, S., et al. (2004). Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*, 109(12), 1543–9.
89. Donega V., Nijboer C., Braccioli L., Slaper-Cortenbach I., Kavelaars A., et al. (2014) Intranasal Administration of Human MSC for Ischemic Brain Injury in the Mouse: In Vitro and In Vivo Neuroregenerative Functions. *PLoS ONE*, 2014 vol: 9 (11), e112339
90. Torrente, D., Avila, M., Cabezas, R., Morales, L., Gonzalez, J., Samudio, I., & Barreto, G. (2014). Paracrine factors of human mesenchymal stem cells increase wound closure and reduce reactive oxygen species production in a traumatic brain injury in vitro model. *Human & Experimental Toxicology*, 33(7), 673–684. 659
91. Zeiser R. et al. Leitlinien DAG-KBT, 2015
92. Schüle, S., & Berger, A. (2015). [Mesenchymal stromal cells in the treatment of graft-versus-host disease: where do we stand?]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 58(11–12), 1265–73.

93. Munneke, J. M., Spruit, M. J. A., Cornelissen, A. S., van Hoeven, V., Voermans, C., & Hazenberg, M. D. (2015). The Potential of Mesenchymal Stromal Cells as Treatment for Severe Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease: A Critical Review of the Literature. *Transplantation*, 2309-2314.
94. Le Blanc, K., & Mougiakakos, D. (2012). Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nature Reviews. Immunology*, 12(5), 383–96.
95. da Silva Meirelles, L., Fontes, A. M., Covas, D. T., & Caplan, A. I. (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20(5–6), 419–427.
96. Polchert, D., Sobinsky, J., Douglas, G., Kidd, M., Moadsiri, A., Reina, E., et al. (2008). IFN- γ activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *European Journal of Immunology*, 38(6), 1745–1755.
97. Robles, J. D., Liu, Y. P., Cao, J., Xiang, Z., Cai, Y., Manio, M., et al. (2015). Immunosuppressive mechanisms of human bone marrow derived mesenchymal stromal cells in BALB/c host graft versus host disease murine models. *Experimental Hematology & Oncology*, 4(1), 13.
98. Auletta, J. J., Eid, S. K., Wuttisarnwattana, P., Silva, I., Metheny, L., Keller, M. D., et al. (2015). Human Mesenchymal Stromal Cells Attenuate Graft-Versus-Host Disease and Maintain Graft-Versus-Leukemia Activity Following Experimental Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *STEM CELLS*, 33(2), 601–614.
99. Li, H., & Fu, X. (2012). Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cutaneous wound repair and regeneration. *Cell and Tissue Research*, 348(3), 371–7.
100. Kato, J., Kamiya, H., Himeno, T., Shibata, T., Kondo, M., Okawa, T., et al. (2014). Mesenchymal stem cells ameliorate impaired wound healing through enhancing keratinocyte functions in diabetic foot ulcerations on the plantar skin of rats. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 28(5), 588–595.
101. Argôlo Neto, N. M., Del Carlo, R. J., Monteiro, B. S., Nardi, N. B., Chagastelles, P. C., de Brito, A. F. S., & Reis, A. M. S. (2012). Role of autologous mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma on healing of cutaneous wounds in diabetic mice. *Clinical and Experimental Dermatology*, 37(5), 544–53.
102. Sasaki, M., Abe, R., Fujita, Y., Ando, S., Inokuma, D., & Shimizu, H. (2008). Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(4), 2581–7.
103. Shen, L., Zeng, W., Wu, Y.-X., Hou, C.-L., Chen, W., Yang, M.-C., et al. (2013). Neurotrophin-3 Accelerates Wound Healing in Diabetic Mice by Promoting a Paracrine Response in Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplantation*, 22(6), 1011–1021.
104. Limbert, C., Pâth, G., Ebert, R., Rothhammer, V., Kassem, M., Jakob, F., & Seufert, J. (2011). PDX1- and NGN3-mediated in vitro reprogramming of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells into pancreatic endocrine lineages. *Cytotherapy*, 13(7), 802–13.
105. Lee, R. H., Seo, M. J., Reger, R. L., Spees, J. L., Pulin, A. A., Olson, S. D., & Prockop, D. J. (2006). Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(46), 17438–17443.

106. Ezquer, M., Urzua, C. A., Montecino, S., Leal, K., Conget, P., & Ezquer, F. (2016). Intravitreal administration of multipotent mesenchymal stromal cells triggers a cytoprotective microenvironment in the retina of diabetic mice. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), 42.
107. Bonfield, T. L., Nolan Koloze, M. T., Lennon, D. P., & Caplan, A. I. (2010). Defining human mesenchymal stem cell efficacy in vivo. *Journal of Inflammation (London, England)*, 7, 51.
108. Večerić-Haler, Ž., Erman, A., Cerar, A., Motaln, H., Kološa, K., Lah Turnšek, T., et al. (2016). Improved Protective Effect of Umbilical Cord Stem Cell Transplantation on Cisplatin-Induced Kidney Injury in Mice Pretreated with Antithymocyte Globulin. *Stem Cells International*, 2016, 3585362. doi: 10.1155/2016/3585362. Epub 2016 Jan 5.
109. Yuan, L., Wu, M.-J., Sun, H.-Y., Xiong, J., Zhang, Y., Liu, C.-Y., et al. (2011). VEGF-modified human embryonic mesenchymal stem cell implantation enhances protection against cisplatin-induced acute kidney injury. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 300(1), F207-18.
110. Wang, S., Li, Y., Zhao, J., Zhang, J., & Huang, Y. (2013). Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Podocyte Injury and Proteinuria in a Type 1 Diabetic Nephropathy Rat Model. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 19(4), 538–546.
111. Jones, G. N., Moschidou, D., Abdulrazzak, H., Kalirai, B. S., Vanleene, M., Osatis, S., et al. (2014). Potential of human fetal chorionic stem cells for the treatment of osteogenesis imperfecta. *Stem Cells and Development*, 23(3), 262–76.
112. Chan, J. K. Y., & Götherström, C. (2014). Prenatal transplantation of mesenchymal stem cells to treat osteogenesis imperfecta. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 223. <http://doi.org/10.3389/fphar.2014.00223>
113. Otsuru, S., Gordon, P. L., Shimono, K., Jethva, R., Marino, R., Phillips, C. L., et al. (2012). Transplanted bone marrow mononuclear cells and MSCs impart clinical benefit to children with osteogenesis imperfecta through different mechanisms. *Blood*, 120(9), 1933–41.
114. Park, D. Y., Mayle, R. E., Smith, R. L., Corcoran-Schwartz, I., Kharazi, A. I., & Cheng, I. (2013). Combined Transplantation of Human Neuronal and Mesenchymal Stem Cells following Spinal Cord Injury. *Global Spine Journal*, 3(1), 1–6.
115. Sheth, R. N., Manzano, G., Li, X., & Levi, A. D. (2008). Transplantation of human bone marrow-derived stromal cells into the contused spinal cord of nude rats. *Journal of Neurosurgery. Spine*, 8(2), 153–62.
116. Dezawa, M., Ishikawa, H., Itokazu, Y., Yoshihara, T., Hoshino, M., Takeda, S., et al. (2005). Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5732), 314–7.
117. De Bari, C., Dell'Accio, F., Vandenabeele, F., Vermeesch, J. R., Raymackers, J.-M., & Luyten, F. P. (2003). Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *The Journal of Cell Biology*, 160(6), 909–918.
118. Malhotra, S., Hu, M. S., Marshall, C. D., Leavitt, T., Cheung, A. T. M., Gonzalez, J. G., et al. (2016). Mesenchymal Stromal Cells as Cell-Based Therapeutics for Wound Healing. *Stem Cells International*, 2016, 1–6.
119. Thorpe, A. A., Boyes, V. L., Sammon, C., & Le Maitre, C. L. (2016). Thermally Triggered Injectable Hydrogel, Which Induces Mesenchymal Stem Cell Differentiation to Nucleus Pulposus Cells: Potential for Regeneration of the Intervertebral Disc. *Acta Biomaterialia*. 36., 99-111.

120. Lombardo, E., van der Poll, T., DelaRosa, O., & Dalemans, W. (2015). Mesenchymal stem cells as a therapeutic tool to treat sepsis. *World Journal of Stem Cells*, 7(2), 368–79.
121. Kinzebach S., Bieback K. (2012) Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal Cells under Xenogenic-Free Culture Conditions. In: Weyand B., Dominici M., Hass R., Jacobs R., Kasper C. (eds) *Mesenchymal Stem Cells - Basics and Clinical Application I. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol 129. Springer, Berlin, Heidelberg 33–57.
122. Bernardo, M. E., Locatelli, F., & Fibbe, W. E. (2009). Mesenchymal stromal cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1176, 101–17.
123. Lange, C., Cakiroglu, F., Spiess, A.-N., Cappallo-Obermann, H., Dierlamm, J., & Zander, A. R. (2007). Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. *Journal of Cellular Physiology*, 213(1), 18–26.
124. Spees, J. L., Gregory, C. A., Singh, H., Tucker, H. A., Peister, A., Lynch, P. J., et al. (2004). Internalized Antigens Must Be Removed to Prepare Hypoimmunogenic Mesenchymal Stem Cells for Cell and Gene Therapy. *Molecular Therapy*, 9(5), 747–756.
125. Fekete, N., Rojewski, M. T., Fürst, D., Kreja, L., Ignatius, A., Dausend, J., & Schrenzenmeier, H. (2012). GMP-Compliant Isolation and Large-Scale Expansion of Bone Marrow-Derived MSC. *PLoS ONE*, 7(8), e43255. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0043255>.
126. Zander, A. R., Stute, N., Kolb, H.-J., Seeber, S., & Schmitz, N. (2002). Adulte oder embryonale Stammzellen? *Dtsch Arztebl* 2002; 99(6): A-341 / B-275 / C-258
127. Gottipamula, S., Muttigi, M. S., Kolkundkar, U., & Seetharam, R. N. (2013). Serum-free media for the production of human mesenchymal stromal cells: a review. *Cell Proliferation*, 46(6), 608–627.
128. Schallmoser, K., Bartmann, C., Rohde, E., Reinisch, A., Kashofer, K., Stadelmeyer, E., et al. (2007). Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion*, 47(8), 1436–46.
129. Abdelrazik, H., Spaggiari, G. M., Chiossone, L., & Moretta, L. (2011). Mesenchymal stem cells expanded in human platelet lysate display a decreased inhibitory capacity on T- and NK-cell proliferation and function. *European Journal of Immunology*, 41(11), 3281–90.
130. Heathman, T. R. J., Stolzing, A., Fabian, C., Rafiq, Q. A., Coopman, K., Nienow, A. W., et al. (2016). Scalability and process transfer of mesenchymal stromal cell production from monolayer to microcarrier culture using human platelet lysate. *Cytotherapy*, 18(4), 523–35.
131. Shani, S., Ahmad, R. E., Naveen, S. V., Murali, M. R., Puvanan, K., Abbas, A. A., & Kamarul, T. (2014). Platelet rich concentrate promotes early cellular proliferation and multiple lineage differentiation of human mesenchymal stromal cells In Vitro. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 845293. . <http://doi.org/10.1155/2014/845293>
132. Mark, P., Kleinsorge, M., Gaebel, R., Lux, C. A., Toelk, A., Pittermann, E., David, R., Steinhoff, G., Ma, N. (2013). Human Mesenchymal Stem Cells Display Reduced Expression of CD105 after Culture in Serum-Free Medium. *Stem Cells International*, 2013, 698076. <http://doi.org/10.1155/2013/698076>.

133. Balint, R., Richardson, S. M., & Cartmell, S. H. (2015). Low-density subculture: a technical note on the importance of avoiding cell-to-cell contact during mesenchymal stromal cell expansion. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(10), 1200–3.
134. Sekiya, I., Larson, B. L., Smith, J. R., Pochampally, R., Cui, J., & Prockop, D. J. (2002). Expansion of Human Adult Stem Cells from Bone Marrow Stroma: Conditions that Maximize the Yields of Early Progenitors and Evaluate Their Quality. *Stem Cells*, 20(6), 530–541.
135. Bourin, P., Gadelorge, M., Peyrafitte, J.-A., Fleury-Cappellesso, S., Gomez, M., Rage, C., & Sensebé, L. (2008). Mesenchymal Progenitor Cells: Tissue Origin, Isolation and Culture. *Transfusion Medicine and Hemotherapy: Offiziell Organ Der Deutschen Gesellschaft Fur Transfusionsmedizin Und Immunhamatologie*, 35(3), 160–167.
136. Ma, T., Tsai, A.-C., & Liu, Y. (2016). Biomanufacturing of human mesenchymal stem cells in cell therapy: Influence of microenvironment on scalable expansion in bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, Volume 108, 15 April 2016, 44-50.
137. Liu, Y., Muñoz, N., Bunnell, B. A., Logan, T. M., & Ma, T. (2015). Density-Dependent Metabolic Heterogeneity in Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 33(11), 3368–81.
138. Schneider, C.-C., Ateschrang, A., Königsrainer, I., Glatzle, J., Bühler, S., Schaefer, R., et al. (2012). Lactate Influences the Gene Expression Profile of Human Mesenchymal Stem Cells (hMSC) in a Dose Dependant Manner. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 30(6), 1547–1556.
139. Crapnell, K., Blaesius, R., Hastings, A., Lennon, D. P., Caplan, A. I., & Bruder, S. P. (2013). Growth, differentiation capacity, and function of mesenchymal stem cells expanded in serum-free medium developed via combinatorial screening. *Experimental Cell Research*, 319(10), 1409–1418.
140. Apel, A., Groth, A., Schlesinger, S., Bruns, H., Schemmer, P., Büchler, M. W., & Herr, I. (2009). Suitability of human mesenchymal stem cells for gene therapy depends on the expansion medium. *Experimental Cell Research*, 315(3), 498–507.
141. Jung, S., Sen, A., Rosenberg, L., & Behie, L. A. (2010). Identification of growth and attachment factors for the serum-free isolation and expansion of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 12(5), 637–57.
142. Stipp, C. S., Kolesnikova, T. V., & Hemler, M. E. (2003). Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(2), 106–112.
143. Yunta, M., & Lazo, P. A. (2003). Tetraspanin proteins as organisers of membrane microdomains and signalling complexes. *Cellular Signalling*, 15(6), 559–64.
144. Huang, H. (2005). Aberrant Expression of Novel and Previously Described Cell Membrane Markers in Human Breast Cancer Cell Lines and Tumors. *Clinical Cancer Research*, 11(12), 4357–4364.
145. Huang, H. (2005). Aberrant Expression of Novel and Previously Described Cell Membrane Markers in Human Breast Cancer Cell Lines and Tumors. *Clinical Cancer Research*, 11(12), 4357–4364.
146. Arencibia, J. M., Martín, S., Pérez-Rodríguez, F. J., & Bonnin, A. (2009). Gene expression profiling reveals overexpression of TSPAN13 in prostate cancer. *International Journal of Oncology*, 34(2), 457–63.

147. Yan, C., Kim, Y.-H., Kang, H. W., Seo, S. P., Jeong, P., Lee, I.-S., et al. (2015). Urinary Nucleic Acid TSPAN13-to-S100A9 Ratio as a Diagnostic Marker in Prostate Cancer. *Journal of Korean Medical Science*, 30(12), 1784–92.
148. Iwai, K., Ishii, M., Ohshima, S., Miyatake, K., & Saeki, Y. (2007). Expression and function of transmembrane-4 superfamily (tetraspanin) proteins in osteoclasts: reciprocal roles of Tspan-5 and NET-6 during osteoclastogenesis. *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology*, 56(4), 457–63.
149. Hupfeld, J., Gorr, I. H., Schwald, C., Beaucamp, N., Wiechmann, K., Kuentzer, K., et al. (2014). Modulation of mesenchymal stromal cell characteristics by microcarrier culture in bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(11), 2290–2302.
150. Chen, A. K.-L., Reuveny, S., & Oh, S. K. W. (2013). Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: Achievements and future direction. *Biotechnology Advances*, 31(7), 1032–1046.
151. Tögel F., Hu Z., Weiss K., Isaac J., Lange C., et. al. (2005) Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2005 vol: 289 F31-F42.
152. Jaquet K., Krause K., Denschel J., Faessler P., Nauerz M., et. al. (2005) Reduction of Myocardial Scar Size after Implantation of Mesenchymal Stem Cells in Rats: What Is the Mechanism? *Stem Cells and Development* 2005 vol: 14 (3) 299-309.
153. Lange C., Tögel F., Ittrich H., Clayton F., Nolte-Ernsting C., et. al. (2005) Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats *Kidney International* 2005 vol: 68 (4) 1613-1617
154. Németh K., Leelahavanichkul A., Yuen P., Mayer B., Parmelee A., et. al. (2009) Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature medicine* 2009 vol: 15 (1) 42-9.
155. Thomas, H., Jäger, M., Mauer, K., Brandau, S., Lask, S., & Flohé, S. B. (2014). Interaction with Mesenchymal Stem Cells Provokes Natural Killer Cells for Enhanced IL-12/IL-18-Induced Interferon-Gamma Secretion. *Mediators of Inflammation*, 2014, 143463. <http://doi.org/10.1155/2014/143463>

Danksagung

Mein Dank gilt insbesondere Frau PD Claudia Lange und Frau Dr. Heike Capallo-Obermann, die mich ausdauernd immer wieder von neuem motiviert und angetrieben haben. Des Weiteren möchte ich Frau Eva-Maria Kolb für ihre Unterstützung und aufbauenden, liebevollen Worte danken.

Lebenslauf

Der Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

Eidesstattliche Versicherung

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

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

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: