



Universitätsklinikum  
Hamburg-Eppendorf

**Expansion von humanen, mesenchymalen Stammzellen  
in autologem Serum unter besonderer Berücksichtigung  
der osteogenen Differenzierung**

Dissertation

Katja Holtz

Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik  
der Universitätsklinik Eppendorf  
Abt. Hämatologie und Onkologie  
Einrichtung für Knochenmarktransplantation  
Universitätskrankenhaus Eppendorf

Leiter: Prof. Dr. Dr. h. c. A. R. Zander

**Expansion von humanen, mesenchymalen Stammzellen  
in autologem Serum, unter besonderer Berücksichtigung  
der osteogenen Differenzierung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Katja Holtz  
aus Herzberg / Elster

Hamburg, 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 13.12.2004

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. A. R. Zander

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Priv. Doz. Dr. B. Fehse

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Priv. Doz. Dr. P. Adamietz

*Für meine Eltern  
und Wolfram*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Fragestellung</b> .....	1
<b>2. Einleitung</b> .....	2
2.1. Allgemeine Einleitung .....	2
2.2. Ursprung und Herkunft von mesenchymalen Stammzellen .....	3
2.3. Isolierung und Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen nach Caplan et al. .	5
2.4. Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen .....	6
2.5. Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen .....	8
2.6. Osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen .....	8
2.7. Beeinflussung mesenchymaler Stammzellen durch osteogene .....	10
Wachstumsfaktoren .....	10
2.8. Therapeutische Verwendung von mesenchymalen Stammzellen .....	11
<b>3. Material und Methoden</b> .....	15
3.1. Material .....	15
3.1.1. Untersuchungsmaterial .....	15
3.1.2. Zellkulturmedium, Lösungsmittel und Chemikalien.....	15
3.2. Methoden .....	17
3.2.1. Gewinnung von mesenchymalen Stammzellen .....	17
3.2.2. Gewinnung von autologem Serum.....	17
3.2.3. Fötale Kälberserum.....	18
3.2.4. Zellkulturen in der 24-Loch-Platte .....	18
3.2.5. Quantifizierung der Zellzahl .....	20
3.2.6. Osteogene Differenzierung .....	20
3.2.6.1. von Kossa Assay .....	21
3.2.6.2. von Kossa Assay – Skalen .....	22
3.2.7. Adipogene Differenzierung .....	22
3.2.7.1. Adipogener Assay .....	23
3.2.7.2. Adipogener Assay – Skala .....	23
3.2.8. Zellkulturen in der Zellkulturflasche .....	24
3.2.9. Bestimmung von Oberflächenmarkern .....	24
3.2.10. Statistische Methoden.....	25
3.2.11. Elektronische Datenverarbeitung.....	25

<b>4. Ergebnisse</b> .....	26
4.1. Spenderdaten .....	26
4.2. Zellmorphie .....	26
4.2.1. Primärkultur, Passage 1 und Passage 2.....	26
4.2.2. Trypsinieren der Zellkulturen .....	28
4.3. Wachstum.....	28
4.3.1. Isolation in der Primärkultur (24-Loch-Platte) .....	28
4.3.2. Expansion in der Primärkultur (24-Loch-Platte).....	30
4.3.3. Expansion in Passage 1 (24-Loch-Platte).....	35
4.3.4. Isolation und Expansion in der Zellkulturflasche (PK bis P2).....	40
4.4. Osteogene Differenzierung.....	40
4.4.1. Zellmorphie .....	40
4.4.2. von Kossa Assay .....	41
4.5. Adipogene Differenzierung .....	43
4.5.1. Zellmorphie .....	43
4.5.2. Adipogener Assay.....	44
4.6. Oberflächenmarker .....	45
<b>5. Diskussion</b> .....	50
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	67
<b>7. Anhang</b> .....	68
<b>8. Literaturverzeichnis</b> .....	82
<b>9. Danksagung</b> .....	96
<b>10. Lebenslauf</b> .....	97

## Abkürzungsverzeichnis

AIM	Adipogenic Induction Medium (adipogenes Induktionsmedium)
AK	Antikörper
AMM	Adipogenic Maintenance Medium (adipogenes Erhaltungsmedium)
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Autologes Serum
$\alpha$ -MEM	alpha-Modified Essential Medium
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor (Fibroblasten- Wachstumsfaktor)
BMP	Bone Morphogenic Protein
BMSC	Bone Marrow Stromal Cells (Knochenmark-Stromazellen)
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinder-Serumalbumin )
BSE	Bovine Spongiform Encephalopathy (Spongiforme Encephalopathie des Rindes)
BSP	Bone Sialoprotein
Cbfa1	Core Binding Factor alpha 1 (Kernbindungs-Faktor alpha 1)
CFE	Colony-Forming Efficiency (Kolonie-bildende-Effizienz)
CFU-F	Colony-Forming Unit Fibroblast
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FKS (FCS)	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor (Granulozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor)
GF	Gesichtsfeld
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (Granulozyten und Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor)
HLA	Human Leucocyte antigen (Histokompatibilitäts - Komplex)
HSZ (HSC)	Haematopoietic Stem Cells (Hämatopoetische Stammzellen)
IGF-I	Insuline-like Growth Factor (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor)
IL	Interleukin
IMDM	Isocove's Modified Dulbecco's Medium
KI	Konfidenzintervall
KM	Knochenmark
KT	Kulturtag
MAPC	Multipotent Adult Progenitor Cells (multipotente adulte Progenitor- bzw. Vorläuferzellen)
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor (Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor)

MEM	Minimal Essential Medium
MHC-I	Major Histocompatibility Complex I (Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse I)
MHC-II	Major Histocompatibility Complex II (Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse II)
MNZ (MNC)	Mononucleare Cells (Mononukleäre Zellen)
MPZ (MPC)	Mononucleare Progenitor Cells (Mononukleäre Progenitor- bzw. Vorläuferzellen)
MSZ (MSC)	Mesenchymal Stem Cells (Mesenchymale Stammzellen)
MSF	Macrophage Stimulating Factor (Makrophagen-stimulierender Faktor)
P 1	Passage 1
P 2	Passage 2
PBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PK	Primärkultur
rpm	Rounds Per Minute (Umdrehung pro Minute)
SCF	Stem Cell Factor (Stammzell-Faktor)
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor–beta
VT	Vertiefung



# 1. Fragestellung

Mesenchymale Stammzellen aus dem adulten Knochenmark gelten als Vorläufer von postnatalen Osteoblasten. Sie sind unreif und multipotent und dabei insbesondere gut osteogen differenzierbar. Es handelt sich um eine kleine und relativ reine Zellpopulation, die sehr gut vermehrbar ist. Mesenchymale Stammzellen sind bereits in der Klinik erprobt, nicht immunogen und selbst im allogenen Setting bei einer intravenösen Gabe gut verträglich. Es handelt sich um typische adulte Stammzellen mit einer großen Plastizität, deren Differenzierung von Umgebungsfaktoren (Milieu) abhängt. Die Expansion und Differenzierung von Stammzellen in einem Medium, dem fötales Kälberserum zugesetzt wird, ist heute eine etablierte Methode, um Zellen für das Tissue Engineering zu gewinnen.

Die Kontamination mit bovinen Proteinen kann dabei zum Auslösen allergischer Reaktionen auf das Tierereiweiß, zur Entstehung lokaler Entzündungen und zur Abstoßung der transplantierten Stammzellen führen. Weiterhin besteht das Risiko einer möglichen Übertragung von tierischen Infektionserregern. Im Vordergrund steht jedoch die Sorge der Übertragung von Prionen, die mit dem Hervorrufen der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit in Verbindung gebracht werden. Aus diesen Gründen ist der Einsatz von fötalem Kälberserum am Menschen in Deutschland ethisch bedenklich.

Die Suche nach Kälberserum-freien Alternativen steht deshalb im Focus wissenschaftlicher Untersuchungen. Der Zusatz von autologem Serum ist möglicherweise solch eine Alternative zur erfolgreichen Isolation und Expansion von humanen, mesenchymalen Stammzellen. Daher ist das Wachstums- und Differenzierungsverhalten der unter dieser Bedingung kultivierten Zellen für die spätere klinische Anwendung von besonderem Interesse.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu untersuchen, ob humane, mesenchymale Stammzellen Kälberserum-frei, unter dem Zusatz von autologem Serum gewonnen und in genügender Zahl expandiert werden können. Dafür wird dem Kulturmedium das autologe Serum in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt.

Außerdem soll untersucht werden, ob die so gewonnen Zellen Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen aufweisen und ob sie als Zeichen der Multipotenz (Erhalt der Zellunreife) adipogen und osteogen differenzierbar sind.

Dabei wird das Wachstums- und Differenzierungsverhalten der Zellkulturen unter dem Zusatz von autologem Serum und fötalem Kälberserum, dem derzeitigen Goldstandard, verglichen.

## 2. Einleitung

### 2.1. Allgemeine Einleitung

Trotz der bestehenden ethischen, moralischen und rechtlichen Bedenken der Verwendung embryonaler Stammzellen in der Forschung wird das Reservoir von Vorläuferzellen im adulten Organismus weniger aktiv untersucht. Embryonale Stammzellen sind gut expandierbar und differenzierbar, jedoch schwierig zu gewinnen. Die erheblichen klinischen Bedenken der Verwendung dieser Stammzellen liegen in der beschriebenen Bildung von Teratokarzinomen (Erdo et al., 2003) und der Gefahr der Abstoßungsreaktion beim Empfänger (Trepagnier, 2000; Robertson, 2001). Bei der Differenzierung von der embryonalen Stammzelle zum reifen Gewebe werden Histokompatibilitäts-Komplexe (HLA) des Spenders entwickelt, die eine lebenslange und nebenwirkungsreiche Immunsuppression erforderlich machen.

Eine Alternative bilden die multipotenten, adulten humanen Stammzellen, die aus verschiedenen Geweben gewonnen, relativ leicht und in ausreichender Menge expandiert und ohne Immunsuppression zurückgegeben werden können.

Die Identifizierung multipotenter, adulter mesenchymaler Stammzellen (MSZ), die zum Beispiel relativ einfach aus dem Stroma des Knochenmarkes gewonnen werden können, hat das Forschungsinteresse im Bereich des Tissue Engineering geweckt. Adulte Stammzellen aus verschiedenen Geweben werden im Hinblick auf ihr Potential für die therapeutische Verwendung untersucht und charakterisiert (de Wynter et al., 1999; Le Blanc et al., 2003; Verfaillie et al., 2003).

Der Begriff Stammzelle ist dabei generell der Zelle vorbehalten, die die Fähigkeit besitzt, eine Progenitorzelle, welche einen festgelegten Differenzierungsprozeß durchmacht, und eine identische Tochter-Stammzelle hervorzubringen (Hall und Watt, 1989; Lin, 1997). So können Stammzellen in verschiedenen zellulären Phänotypen auftreten. Bis zur Stimulation durch intrinsische und extrinsische Faktoren verharren sie in ihrem undifferenzierten Stadium. Adulte Stammzellen sind postnatalen Ursprungs und befinden sich durchweg in reifem Gewebe.

Um in vitro expandierte humane Stammzellen klinisch verwenden zu können, ist es in vielen Ländern, so auch in Deutschland, erforderlich, auf den Einsatz tierischer Seren zu verzichten. Bei der Transplantation von adulten Stammzellen, die bisher unter dem Zusatz von fötalem Kälberserum kultiviert werden, besteht die Gefahr der Übertragung von Infektionserregern und Prionen des Rindes. Diese werden in Verbindung gebracht mit der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (Klein und Dumble, 1993; Will et al.,

1996), einer spongiformen Enzephalopathie, die mit symmetrischen Veränderungen im hinteren Thalamus und den Basalganglien und der Bildung von Amyloidplaques im gesamten Gehirn einhergeht. Diese Erkrankung wird den Prionenkrankheiten zugerechnet und steht höchstwahrscheinlich im Zusammenhang mit BSE (bovine spongiform encephalopathy), einer bei Rindern vorkommenden Form dieser Krankheit (Schielke, Pschyrembel 2002). Der Kontakt mit dem Tiereweiß kann außerdem allergische Reaktionen und lokale Entzündungen auslösen und zur Abstoßung der transplantierten Stammzellen führen (Selvaggi et al., 1997; Mackensen et al., 2000; Tuschong et al., 2002). Deshalb wird aktiv nach Alternativen gesucht.

Erste Untersuchungen an humanen Stromazellen und Fibroblasten des Knochenmarkes sowie an Zellen des trabekulären Knochens zeigen, dass eine FKS- freie Expansion dieser Zellen unter dem Zusatz von humanem Serum im Prinzip möglich ist und dabei zu gleich guten (Yamamoto et al., 2003; Spees et al., 2004) und sogar zu besseren Ergebnissen (Shigeno und Ashton, 1995; Anselme et al., 2002) führt. Eine bessere Expansion unter dem Zusatz von humanem AB-Serum oder autologem Serum bzw. Plasma beobachteten auch Yamaguchi et al. (2002), allerdings nur unter der zusätzlichen Gabe von Wachstumsfaktoren (bFGF- basic Fibroblast Growth Factor). Andere Autoren hingegen zeigten, dass eine gute Expansion nur unter dem Zusatz von FKS möglich ist (Koller et al., 1998; Kuznetsov et al., 2000).

Auch bei der osteogenen und adipogenen Differenzierung zeigen sich unter FKS-freien Bedingungen und unter dem Zusatz von humanem Serum vergleichbare (Yamamoto et al., 2003) und bessere Ergebnisse (Oreffo et al., 1997).

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die Kultivierung unter dem Zusatz von 20% autologem Serum ein wichtiger Schritt ist, um Rinderproteine in Zellen zu reduzieren, die in FKS-haltigen Medien isoliert und expandiert wurden (Spees et al., 2004). Zur FKS- freien Isolation von humanen MSZ gibt es bisher keine überzeugenden Daten.

Die vorliegende Arbeit untersucht, ob und inwieweit sich MSZ nach Caplan et al. in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Kälberserum-frei, unter dem Zusatz von autologem Serum gewinnen, expandieren und differenzieren lassen.

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

## 2.2. Ursprung und Herkunft von mesenchymalen Stammzellen

Adulte humane MSZ mit der Fähigkeit, sich in Chondrozyten, Osteoblasten, Adipozyten,

---

Fibroblasten oder andere Gewebe mesenchymalen Ursprungs zu differenzieren, findet man im Knochenmark (Pittenger et al., 1999), im Fettgewebe (Zuk et al., 2001), im Periost (Nakahara et al., 1991), in der Synovialmembran (De Bari et al., 2001), im Muskel (Bosch et al., 2000), in der Dermis (Young et al., 2001), in Perizyten (Brigthon et al., 1992), im peripheren Blut (Zvaifler et al., 2000), im Nabelschnurblut (Erices et al., 2000) und im trabekulären Knochen (Noth et al., 2002). Gegenwärtig wird das Knochenmarkaspirat als ergiebigste Quelle für MSZ betrachtet.

Das Knochenmark besteht hauptsächlich aus drei Zelltypen: hämatopoetischen Stammzellen und deren Nachfahren, Stromazellen (z.B. Fibroblasten, Adipozyten) und endothelialen Zellen. Die hämatopoetischen Stammzellen wurden bereits intensiv studiert und sind wohl die Stammzellen, die am besten charakterisiert sind (Lemischka et al., 1986; Sachs, 1987; Spangrude et al., 1988; Weissman, 2000).

Friedenstein et al. legten 1966 mit der Identifizierung fibroblastenartiger Zellen des Knochenmarkes, die bei der Kultivierung in vitro undifferenziert blieben und in Zellen des Stütz- und Bindegewebes differenziert werden konnten, den grundlegenden Meilenstein in der Erforschung adulter Stammzellen (Friedenstein et al., 1966) Die so genannten „fibroblast colony forming cells“ bzw. „Colony-Forming Unit Fibroblasts“ (CFU-F) waren in der Lage, knochen- und knorpelartige Zellformationen zu bilden (Friedenstein, 1976; Owen et al., 1987). Die von Friedenstein erstmals beschriebenen multipotenten Stammzellen aus dem Stroma des Knochenmarkes wurden später durch verschiedene Gruppen intensiv untersucht. Diese Zellen unterscheiden sich in erster Linie durch die vielfältigen Isolierungs- und Kulturbedingungen. MSZ nach Caplan et al. werden aus einem Percoll bzw. Ficoll-Gradienten gewonnen und nach Plastikadhärenz in DMEM mit 10% selektioniertem FKS kultiviert (Haynesworth et al., 1992a; Lennon, 1996). Mesenchymale Progenitorzellen (MPZ) nach Prockop et al. werden aus einem Ficoll-Gradienten gewonnen und nach Plastikadhärenz in  $\alpha$ -MEM mit 20% FKS kultiviert (Prockop, 1997; Colter et al., 2000). Stro-1+ Zellen nach Simmons, werden anhand des Stro-1 Oberflächenmarkers (Antikörpers) mittels Flow-Zytometrie isoliert (Simmons und Torok-Storb, 1991; Gronthos et al., 1994; Simmons et al., 1994). Verfaillie et al. identifizierten unter Glycophorin A selektierten, CD45 negativen Zellen eine pluripotente Subpopulation der MSZ, die Multipotent Adult Progenitor Cells (MAPC), die Adhärenz auf Fibronectin- beschichtetem Plastik zeigen und in DMEM mit 2% FKS und diversen anderen Zusätzen kultiviert werden (Reyes und Verfaillie, 2001; Verfaillie et al., 2003). Pittenger et al. (1999) beobachteten, dass aus humanem Knochenmark gewonnene und in Langzeitkultur gehaltene MSZ nach Caplan et al. längere Zeit in einem undifferenzierten Status verharren und dass Kolonien, die aus einer einzigen isolierten Zelle hervorgehen, unter geeigneten Bedingungen entlang der osteogenen, adipogenen

und chondrogenen Linie ausreifen können.

Obwohl viele Studien daraufhin deuten, dass es sich möglicherweise um gleiche Zellen mit ähnlichem Differenzierungsverhalten handelt, kann bis heute keine klare Definition humaner MSZ gegeben werden.

Da Informationen über spezifische Marker, welche diesen Zelltyp eindeutig charakterisieren und der Nachweis, dass sie aus einer Zelle hervorgegangen und somit klonogen sind, oftmals noch fehlen, bleibt es bei den meisten Studien offen, ob es sich tatsächlich um „wahre“ Stammzellen handelt oder um eine Population vielfältiger, linienspezifischer Vorläuferzellen. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Gruppen im Hinblick auf die klinische Anwendbarkeit möglich zu machen, gibt es das Bestreben, die Kulturbedingungen zu standardisieren (Beresford und Owen, 1998; Majumdar et al., 1998).

Weiterhin mangelt es an einer einheitlichen Bezeichnung. So verwenden einige Forschergruppen den Terminus „marrow stromal cells“ gleichgestellt mit „mesenchymal stem cell“ oder „mesenchymal progenitor cell“ (Prockop, 1997). Eine Studie, die Stromazellen und MSZ bezüglich Morphe, Phänotyp und Funktion in vitro untersuchte, zeigt, dass MSZ homogener und fibroblastenartiger sind als Stromazellen und sich z.B. durch ihre individuelle Antwort auf Interleukin-6 (IL-6) unterscheiden (Majumdar et al., 1998).

Ursächlich für das Fehlen eindeutiger Definitionen sind aber auch der fließende Übergang zwischen MSZ und Fibroblasten und die vielfältigen Methoden hinsichtlich ihrer Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung.

### 2.3. Isolierung und Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen nach Caplan et al.

Humane MSZ werden in der Regel aus Knochenmark (KM) isoliert, welches durch Beckenkammaspiration gewonnen wird. Die Zahl an MSZ im adulten KM liegt bei den verschiedenen Untersuchern zwischen 1 in  $10^4$  und 1 in  $10^6$  mononukleären Zellen (MNZ), die z.B. durch den Colony-Forming Unit Fibroblast - Assay (CFU-F – Assay) erkannt werden. Dieser Assay quantifiziert adhärente Zellpopulationen über individuelle Foci bzw. Kolonien, die jeweils von einer einzigen Vorläuferzelle abstammen.

Technisch ist es mit Hilfe von 10% FKS möglich, 50 – 376 Mio. humane MSZ aus 10 ml Knochenmarkaspirat eines erwachsenen Spenders zu gewinnen (Pittenger et al., 1999). MSZ wurden durch Fraktionierung mit Hilfe eines Dichtegradienten, wie Ficoll oder Percoll, aus dem Knochenmarkaspirat isoliert und in einer standardisierten Zelldichte in

DMEM unter Zusatz von 10% selektierten FKS kultiviert. Nach 2 bis 3 Tagen werden nicht adhärenente Zellen ausgewaschen, während die Plastik-adhärenente Zellen über 14 Tage hinweg in der Primärkultur expandiert werden können. Annähernd konfluente Kulturen werden trypsinisiert, neu ausgesiedelt und in weiteren Passagen expandiert. Auf diese Art und Weise können MSZ nach Caplan et al. bis zu über 40 mal passagiert werden ohne die Multipotenz entlang der mesenchymalen Linie zu verlieren, obwohl ihre Wachstumsrate reduziert ist.

Die Studie physiologischer Signale im Hinblick auf die effiziente Expansion in Kultur wird dabei jedoch durch den Zusatz von FKS zum Kulturmedium limitiert.

## 2.4. Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen

Adulte Stammzellen nach Caplan, Prockop, Simmons und Verfaillie et al. werden als Zellen mit Multipotenz beschrieben, da sie die Fähigkeit besitzen, sich unter geeigneten Bedingungen entlang verschiedener Zell- und Gewebelinien zu differenzieren.

So können aus postnatalem Knochenmark isolierte MSZ unter entsprechenden Kultivierungsbedingungen eine Reihe mesodermaler, ektodermaler und endodermaler Gewebetypen, einschließlich Knochen (Friedenstein et al., 1987; Owen, 1988; Beresford, 1989; Caplan 1991; Haynesworth et al., 1992b, 1997; Jaiswal et al., 1997; Pittenger et al., 1999), Knorpel (Lennon et al., 1996; Johnstone et al., 1998; Mackay et al., 1998; Pittenger et al., 1999), Sehnen und stromalem Bindegewebe (Young et al., 1998; Majumdar et al., 2000), Skelettmuskeln (Saito et al., 1995; Wakitani et al., 1995; Ferrari et al., 1998), Herzmuskeln (Makino et al., 1999; Fukuda, 2001), Fett (Dennis und Caplan, 1996; Pittenger et al., 1999), neuronalem Gewebe (Azizi et al., 1998; Kopen et al., 1999), Nerven (Woodbury et al., 2000), mesangialem Gewebe (Ito et al., 2001) Epithel von Leber, Lunge und Darm (Jiang et al., 2002, Reyes et al., 2002) und Endothel (Oswald et al., 2004) annehmen.

Obwohl MSZ das gesamte Leben über im Körper nachgewiesen werden können, nimmt ihre Anzahl mit dem Alter des Untersuchten ab und ist abhängig vom Ort der Entnahme und dem Stadium einer systemischen Erkrankung (Majors et al., 1997). Adulte, humane MSZ nach Prockop et al. zeigen eine Verdopplungszeit von 33 Stunden und weniger und ein großes Expansionspotential, wobei Untersuchungen des Zellzyklus aufzeigen, dass sich 20% der Zellen in einem Ruhezustand befinden (Colter et al., 2000). Trotz der großen Expansionsraten von Langzeitkulturen haben MSZ eine endliche Teilungsfähigkeit, ein für Stammzellen eher uncharakteristisches Verhalten. Bruder et al. (1997) beobachteten an MSZ nach Caplan et al. durchschnittlich 38 Verdopplungen der

Zellpopulation, bevor ein Alterungsprozeß bzw. ein verlangsamtes Wachstums- und Teilungsverhalten eintritt. Allein die MAPC von Verfallie zeigen nach mehr als 120 Verdopplungen der Zellpopulation noch keine Zeichen der Zellalterung mit reduzierter Teilungsfähigkeit oder Verlust der Differenzierbarkeit (Jiang et al., 2002).

Das Altern der Zellen kann bei der Kultivierung *in vitro* durch eine spezielle Oberflächenbehandlung der Kulturplatten oder Kulturflaschen hinausgezögert werden (Matsubara et al., 2004). Die Lebensspanne der MSZ kann weiterhin mit Hilfe retroviraler Transduktion mit dem humanen Telomerase- Gen auf mehr als 260 Verdopplungen der Zellpopulation ausgebaut werden (Simonsen et al., 2002).

Werden die aus dem Knochenmark isolierten MSZ mit einer sehr geringen Dichte von 1 – 10 Zellen / cm<sup>2</sup> ausgesiedelt, ist die Entstehung von Zellklonen, die aus einer Zelle hervorgehen, zu beobachten (Kuznetsov et al., 1997; Reyes et al., 2001; Colter et al., 2000, 2001). Diese Kolonien sind morphologisch heterogen. Sie setzen sich zusammen aus kürzeren, sich schnell teilenden, und längeren, sich langsamer teilenden Zellen. Dabei ist ein Überwiegen der kürzeren Zellen mit der höheren Teilungs- und Differenzierungskapazität bei niedriger Zelldichte und ein Überwiegen der langen, mehr ausgereiften und langsamer proliferierenden Zellen bei hoher Zelldichte zu beobachten (DiGirolamo et al., 1999; Colter et al., 2000, 2001; Sekiya et al., 2002). MSZ nach Prockop et al. zeigen in Kultur meistens einen Wachstumsverlauf, der mit einer lag-Phase beginnt, gefolgt von einer Phase mit rapidem, exponentiellem Wachstum und einer Zellverdopplungszeit von weniger als 10 Stunden. Das Wachstum endet in einer stationären Phase, in der die Proliferationsrate gegen Null geht (Bruder et al., 1997; Sekiya et al., 2002). Dieses Wachstumsverhalten kann durch den Nachweis der zyklischen Expression der Protoonkogene Dickkopf-1 (Dkk-1) und Wnt5a, welche die Zellteilung- und Differenzierung beeinflussen, erklärt werden. Dabei wirkt Dkk-1 inhibitorisch auf Wnt5a. Das während der frühen log-Phase, d.h. während des exponentiellen Wachstums, durch die MSZ synthetisierte und sezernierte Dkk-1 ist in der stationären Phase kaum noch nachweisbar. Im Gegensatz dazu ist Wnt5a in der log-Phase nicht nachweisbar, wird jedoch in der stationären Phase exprimiert. Möglicherweise unterstützt Dkk-1 die Expansion der kurzen, teilungsfreudigen MSZ (Gregory et al., 2003; Prockop et al., 2003).

Weiterhin besitzen undifferenzierte MSZ die Fähigkeit, die Hämatopoese zu unterstützen und das Milieu zu regulieren (Haynesworth et al., 1996; Koc et al., 2000). Ihnen wird außerdem eine Immunmodulation und -suppression zugeschrieben (Frassoni et al., 2002; Le Blanc et al., 2003, 2004), weshalb sie in der allogenen Stammzellentransplantation zur Verhinderung und Behandlung der Spender-gegen-Wirt-Reaktion eingesetzt werden.

## 2.5. Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen

Die Charakterisierung der MSZ hinsichtlich ihrer Oberflächenmoleküle, Zytokinsekretion und sezernierten Extrazellulärmatrix ist in der Literatur heterogen beschrieben. Das Oberflächenantigen CD34, welches hämatopoetische Stammzellen kennzeichnet, ist auf frisch isolierten MSZ zum Teil nachweisbar und geht bei der Kultivierung in vitro verloren (Waller et al., 1995). Das ursprüngliche Vorhandensein zeigt, dass es möglicherweise einen gemeinsamen Vorläufer für beide Populationen gibt. Unterschieden werden sie durch das Antigen CD50, welches nur auf MSZ nachgewiesen werden kann (Waller et al., 1995; Pittenger et al., 1999).

Eine weitere Möglichkeit der Charakterisierung der MSZ nach Simmons ist die positive Immunselektion durch den monoklonalen Antikörper (AK) Stro-1 (Simmons und Torok-Storb, 1991; Simmons et al., 1994). Die so identifizierten MSZ zeigen ebenfalls die Fähigkeit der Differenzierung in Stromazellen, Gefäßmuskelzellen, Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten (Dennis et al., 2002). Die monoklonalen AK SH2, SH3 und SH4 identifizieren verschiedene, spezifische Antigene auf der Zelloberfläche von MSZ nach Caplan et al., die auf Osteozyten und Osteoblasten nicht mehr nachweisbar sind (Haynesworth et al., 1992a). Das SH2 bindende Antigen ist später als Endoglin (CD105), dem Rezeptor für TGF- $\beta$ 3, identifiziert worden, welcher eine große Rolle bei der Induktion der chondrogenen Differenzierung von MSZ spielt (Barry et al., 1999). SH3 und SH4 wurden als verschiedene Epitope des Oberflächenantigens CD73 erkannt, dessen Rolle bei der Differenzierung der MSZ noch diskutiert wird (Barry et al., 2001).

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

## 2.6. Osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

Die molekularen Mechanismen der Differenzierung und die Regulation durch Wachstumsfaktoren sind nach wie vor Objekt intensiver Forschung. Die osteogene Induktion ist hierbei in vitro am besten erforscht. MSZ, die in Kultur optimalen Konzentrationen von Dexamethason, Ascorbinsäure und  $\beta$ -Glycerophosphat ausgesetzt sind, nehmen eine kuboide Morphe an, zeigen eine erhöhte Enzymaktivität für Alkalische Phosphatase, exponieren osteoblastische Oberflächenantigene, verändern als Antwort auf 1,25-(OH) $_2$  D $_3$  (biologisch aktive Form des Vitamins D $_3$ ) und Dexamethason die Synthese der Osteocalcin mRNA und lagern extrazellulär mineralisiertes Hydroxylapatit



ab, ein Charakteristikum von Osteoblasten und terminal differenzierten Osteozyten (Beresford et al., 1994; Cheng et al., 1994; Rickard et al., 1996; Jaiswal et al., 1997).

Dexamethason fördert vor allem die Proliferation und unterstützt die Differenzierung (Bellows et al., 1990). Ascorbinsäure ist unter anderem für den Aktivitätsanstieg der Alkalischen Phosphatase verantwortlich und unterstützt die Produktion von Osteocalcin, einem Protein der Knochenmatrix, das Hydroxylapatit bindet (Liu et al., 1999). Organisches und freies Phosphat spielen eine Rolle bei der Mineralisation und Modulation der Osteoblastenaktivität und beeinflussen die Produktion des osteogenen Schlüsselgens Cbfa1 (Core Binding Factor alpha 1) (Tenenbaum et al., 1992; Beck et al., 2000).

Die multipotenten, potentiell hochproliferativen MSZ entwickeln sich unter diesen Bedingungen schrittweise über Osteoprogenitorzellen und Prä-Osteoblasten zu Osteoid produzierenden Osteoblasten, die in die verkalkende Interzellulärsubstanz eingeschlossen sind. Die im letzten Schritt der Entwicklungskaskade entstandenen Osteozyten sind nicht mehr teilungsfähig. Sie dienen der Regulation des Calcium- und Phosphatspiegels und steuern die Aktivität der Knochen um- und abbauenden Osteoklasten.

Progenitorzellen werden funktionell definiert als Zellen, die in eine oder mehrere Linien differenzierbar sind und eine eingeschränkte Selbstteilungskapazität aufweisen (Long, 2001). In vitro entsprechen diese Vorläuferzellen beispielsweise den CFU-F (Friedenstein et al., 1966), einer fibroblastenartigen Zellpopulation mit deutlichem osteogenem Potential (Owen et al., 1987). Die Zahl der humanen Osteoprogenitorzellen nimmt mit dem Alter und dem Vorliegen einer Osteoporose ab (D'Ippolito et al., 1999; Nishida et al., 1999).

Prä-Osteoblasten repräsentieren das Übergangsstadium zwischen den stark proliferativen Osteoprogenitorzellen und den ausgereiften Osteocyten. Sie nehmen die angrenzende Lokalisation zum aktiven Osteoblasten ein und werden hauptsächlich nach morphologischen Kriterien definiert (Dunlop und Hall, 1995). Typische Proteine der Knochenzellen (Markerproteine), wie die Alkalische Phosphatase, Osteonectin (Bianco et al., 1988) Osteocalcin, Osteopontin und Bone Sialoprotein (BSP) werden nur in sehr geringem Umfang exprimiert (Butler, 1989; Chen et al., 1991; Gronthos et al., 1999). Während der osteogenen Differenzierung von MSZ verändert sich die Anwesenheit von Oberflächenmolekülen und extrazellulären Matrixmolekülen.

So sind die Antikörper SH-2, SH-3 und SH-4 auf den Osteoprogenitorzellen nachweisbar, fehlen aber auf den Osteoblasten (Haynesworth et al., 1992a).

Einen Überblick über die Differenzierungsschritte und die jeweils nachweisbaren Markerproteine gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Nachweis von Oberflächenmarkern auf den Zellen der verschiedenen Stufen der osteogenen Differenzierung (MSZ bis Osteocyt)

Markerproteine	MSZ	Osteoprogenitor	Präosteoblast	Osteoblast	Osteozyt	Referenz
SH-2	x					Haynesworth et al., 1992a
SH-3	x					Haynesworth et al., 1992a
SH-4	x					Haynesworth et al., 1992a
SB-10	x	x				Bruder et al., 1997
STRO-1	x	x	x	x		Simmons und Torok-Storb, 1991
AP			x	x		Bruder und Caplan, 1990
Osteonectin			x	x		Bianco et al., 1988
Osteopontin			x	x	x	Mark et al., 1987
Osteocalcin				x	x	Bronckers et al., 1987
BSP				x	x	Chen et al., 1991

## 2.7. Beeinflussung mesenchymaler Stammzellen durch osteogene Wachstumsfaktoren

Die Regenerierung von Knochengewebe im Rahmen des natürlichen Knochenwachstums, Knochenumbaus oder der Frakturheilung wird durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren unterstützt, die sich zum Großteil in der Knochenmatrix befinden, aber auch von aktivierten Makrophagen sezerniert werden. Mit großer Wahrscheinlichkeit sind eine Vielzahl dieser Faktoren auch in fötalem Kälberserum und humanem Serum enthalten. Die Beeinflussung der osteogenen Differenzierung, mit dem Ziel der Bildung von Extrazellulärmatrix durch Wachstumsfaktoren, ist auch *in vitro* beschrieben. Zu den wichtigsten Faktoren zählen der Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), der basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), der Transforming Growth Factor-beta (TGF-β), der Insuline-like Growth Factor-I (IGF-I; Somatomedine C) und die Bone Morphogenic Proteins (BMP)-2, 6, 7. Die Stimulation der Zellaktivität in der G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>-Phase und die damit verbundene Steigerung der Proliferationsrate wird durch PDGF (Antoniades und Owen, 1982; Ross et al., 1986), bFGF (Tsuda et al., 1985; Gospodarowicz et al., 1986; Bianchi et al., 2003; Zeng et al., 2003), TGF-β (Fromigué et al., 1998; Kassem et al., 2000), BMP-2 (Lecanda et al., 1997; Fromigué et al., 1998) und BMP-7 (Asahina et al., 1993; Sampath et al., 1993) vermittelt. Insbesondere das bFGF wird zur forcierten

Expansion von MSZ genutzt.

Jedoch wird nicht nur das Zellwachstum begünstigt, auch ein Anstieg der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase ist unter der Gabe von bFGF (Walsh et al., 2000), TGF- $\beta$  (Kassem et al., 2000), IGF-1 (Schmid et al., 1984), und den BMP's (Li et al., 1996; Yeh et al., 2002 ; Cheng et al., 2003) zu beobachten.

Unter dem Einfluß der BMP's ist zusätzlich eine erhöhte Expressionsrate von Markerproteinen wie Osteocalcin, Osteopontin und Bone Sialoprotein (BSP) zu verzeichnen (Li et al., 1996; Lecanda et al., 1997; Yeh et al., 2002; Cheng et al., 2003).

Die osteogene Differenzierung, d.h. die Bildung der Extrazellulärmatrix in Form von Proteoglycanen und deren Mineralisierung, wird in Anwesenheit der folgenden Wachstumsfaktoren in unterschiedlich ausgeprägter Intensität unterstützt: PDGF (Antoniades und Owen, 1982; Heldin et al., 1988), bFGF (Gospodarowicz et al., 1986; Chaudhary et al., 2004), TGF- $\beta$  (Globus et al., 1988; Robey et al., 1987 ; Makower et al., 1988 ;Fromigué et al., 1998; Kassem et al., 2000), IGF-1 (Schmid et al., 1984; Makower et al., 1988) und der BMP's (Asahina et al., 1993; Sampath et al., 1993; Rickard et al., 1994 ; Lecanda et al., 1997; Puleo, 1997; Fromigué et al., 1998; Yeh et al., 2002 ; Chen et al, 2001; Cheng et al., 2003;).

Zwischen einem Teil der beschriebenen Wachstumsfaktoren gibt es neben der Beeinflussung der Zellkultur eine Art Wechselspiel, was zu einer gegenseitigen Wirkungsverstärkung bzw. Wirkungsabschwächung führt (Piche und Graves, 1989) oder die Synthese eines anderen Faktors stimuliert (Loef et al., 1986; Zeng et al., 2003).

## 2.8. Therapeutische Verwendung von mesenchymalen Stammzellen

Vor allem innerhalb der letzten 5 bis 8 Jahre wurde der therapeutische Nutzen mesenchymaler Stammzellen intensiv am Tier untersucht. Dabei entstanden insbesondere an Kaninchen, Maus und Ratte Kleintiermodelle, an Hand derer die Vielfältigkeit der möglichen therapeutischen Verwendung deutlich wurde (Zander et al., 2002).

Großtiermodelle an Hund, Schaf und Schwein waren wichtige Vorreiter des klinischen Einsatzes am Menschen. So wiesen Bruder et al. (1998) z.B. nach, dass unter Verwendung poröser Matrices aus Hydroxylapatit und  $\beta$ -Tricalciumphosphat, die mit autologen MSZ beladen werden, bei Defekten an langen Röhrenknochen von ausgewachsenen Hunden signifikant mehr Geflecht- und Lamellenknochen gebildet wird als bei unbeladenen Matrices. Eine stärkere Kallusbildung durch den Einsatz der Zell-Matrix-Verbindung konnte auch bei Schafen beobachtet werden (Kon et al., 2000).

Basierend auf der Möglichkeit, MSZ kardiomyogen zu differenzieren (Makino et al., 1999; Fukuda, 2001), wurde ein Modell am Schwein entwickelt, welches zeigt, dass die Gabe von autologen MSZ die Behandlung eines Infarktes positiv unterstützt (Shake et al., 2002).

#### Organersatz - Knochen

Die Neubildung von Knochen stellt einen großen Bereich für das Tissue Engineering mit adulten Stammzellen dar.

Die Nutzung natürlicher und synthetischer Materialien (Matrices) als dreidimensionale Träger der MSZ ist Hoffnungsträger für die therapeutische Verwendung vor allem im orthopädischen sowie mund- und kieferchirurgischen Einsatz im Rahmen der Knochenneubildung. Aktuelle in vitro Studien weisen eine weitere Verbesserung der Adhärenz, Proliferation und osteogenen Differenzierung der mit MSZ beladenen Matrices nach (El-Amin et al., 2002).

Die Transplantation von MSZ zur Reparatur großer Knochendefekte beim Menschen ist bisher noch nicht publiziert. Derzeit befinden sich jedoch klinische Studien von Osiris Therapeutics in der Phase I bis II der Erprobung.

Schmelzeisen et al. zeigten an 2 Patienten die erfolgreiche Transplantation von in vitro expandierten, autologen Periostzellen bei der Sinusboden-Augmentation. Die Periostzellen wurden dafür in autologem Serum kultiviert und in eine Matrix aus Ethysorb eingebettet (Schmelzeisen et al., 2003). Hier zeigte sich ähnlich wie bei Hund und Schaf eine rasche Neubildung von Knochensubstanz.

#### Organersatz - Knorpel

Viele Menschen leiden unter degenerativ bedingten Gelenkschmerzen, die oft zu einer Einschränkung der Bewegungsfähigkeit führen. Die Möglichkeit der Reparatur von Knorpelschäden, hervorgerufen durch Entzündung, Verletzung oder Degeneration, mit Hilfe von MSZ ist deshalb von großem Interesse. Die chondrogene Differenzierung von MSZ ist von einer Vielzahl von Faktoren, einschließlich der Parameter Zelldichte, Zelladhäsion und Zusatz von Wachstumsfaktoren, abhängig (Johnstone et al., 1998). Die auf die Einbringung von MSZ basierende Reparatur von Gelenkknorpeldefekten unter Verwendung natürlicher und synthetischer Trägermaterialien ist am Tier bereits beschrieben (Wakitani et al., 1994; Caplan et al., 1997). Die Transplantation in vitro expandierter, autologer Chondrozyten zeigt gute Ergebnisse (König et al., 2003). Solch eine Operation ist verbunden mit der Entstehung eines Defektes in gesundem Knorpel. Auch hier wird der Einsatz autologer MSZ bereits untersucht.

### Immunsuppression

Die Beobachtung, dass adulte humane MSZ die Proliferation von T-Lymphozyten und die zellvermittelte Lympholyse cytotoxischer Lymphozyten hemmen (Di Nicola et al., 2002) und somit immunsuppressive Eigenschaften haben (Bartholomew et al., 2002; Krampera et al., 2003; Le Blanc et al., 2003), spielt vor allem im Bereich der allogenen Knochenmarktransplantation eine wichtige Rolle. So kann z.B. die gleichzeitige Verabreichung von MSZ bei der Transplantation hämatopoetischer Stammzellen eine Spender-gegen-Wirt-Reaktion abschwächen oder teilweise verhindern (Frasconi et al., 2002). Le Blanc et al. (2004) zeigten in einer Einzelfallbeschreibung, dass eine therapierefraktäre Spender-gegen-Wirt-Reaktion Grad IV nach einer haploidenten Stammzell-Transplantation durch die nachfolgende i.v. Gabe von MSZ geheilt werden konnte.

### Gentherapie

Das Einbringen retroviraler Vektoren in MSZ, mit dem Ziel, die Bildung bestimmter Substanzen zu initiieren, macht den Einsatz im Bereich der Gentherapie möglich.

Bei der Osteogenesis imperfecta, einer Erbkrankheit, bei der es auf Grund der Bildung eines fehlerhaften Kollagen Typ-1 durch die Osteoblasten zu multiplen Frakturen und schweren Skeletdeformitäten kommt, ist die Transplantation von MSZ kurzfristig erfolgreich. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass nach der Transplantation eine Zunahme der Knochendichte, ein Anstieg der Wachstumsgeschwindigkeit und ein Rückgang der Frakturhäufigkeit zu beobachten ist (Horwitz et al., 1999; 2001).

Die Infusion von MSZ führt bei Patienten mit metachromatischer Leukodystrophie zur signifikanten Besserung der Nervenleitgeschwindigkeit und bei Patienten mit der Hurler-Pfaundler-Krankheit zu einer langsam zunehmenden Knochendichte (Koc et al., 2002).

Die Produktion therapeutischer Spiegel an Faktor VIII nach der i.v. Gabe von MSZ, die mit einem retroviralen Vektor für Faktor VIII beladen waren, wurde bereits im Kleintiermodell demonstriert und ist ein Hoffnungsträger in der Gentherapie der Hämophilie A (Chuah et al., 2000).

Im Bereich des Tissue Engineering ist der Einsatz humaner, adulter Stammzellen ein Schwerpunkt in der Forschung, der immer mehr an Bedeutung gewinnt. Das große Spektrum der Einsetzbarkeit von MSZ in der Klinik erfordert ein Vorankommen im Verstehen des Wachstums- und Differenzierungsverhaltens dieser multipotenten Zellen. So konnten Prockop et al. erst kürzlich zeigen, dass die Gewebe- und Zellreparatur mit MSZ nicht nur auf dem Herstellen eines Milieus, das die Regeneration der endogenen Zellen unterstützt oder auf der Transdifferenzierung beruht, wie bisher angenommen, sondern dass in seltenen Fällen auch eine Zellfusion möglich ist (Prockop et al., 2003).

Mit dem Zugewinn an Erkenntnissen wird die klinische Verwendung von MSZ in Zukunft wahrscheinlich noch vielfältiger.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Untersuchungsmaterial

Die zur Durchführung dieser Arbeit benötigten Untersuchungsmaterialien Knochenmark und venöses Blut (zur Herstellung autologen Serums) stammten von gesunden, freiwilligen Spendern des Knochenmarktransplantationszentrums der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf. Dieses Material wurde nach vorheriger Aufklärung und nur mit der schriftlichen Einwilligung der Spender verwendet. Die Zustimmung der Ethikkommission liegt vor.

##### 3.1.2. Zellkulturmedium, Lösungsmittel und Chemikalien

###### Kulturmedium:

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 1 g/l Glucose (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

Zusätze: 1% Penicillin (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)  
1% Streptomycin (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)  
1%, 3%, 10% autologes Serum (AS)  
10% fötales Kälberserum (FKS) (BioWhittaker, USA, Lot: 1SB 0009)

###### Dichtegradient:

- Ficoll-Paque<sup>TM</sup>-PLUS (Amersham Pharmacia Biotech AD, Uppsala, Schweden)

Dichte: 1,077 g/ml

###### Waschmedium / Lösungsmittel:

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

Zusätze: 1% Penicillin (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)  
1% Streptomycin (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

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

- 100% Ethanol (Merck, Deutschland)

- 99% Isopropanol (Sigma, Steinheim, Deutschland)  
teilweise verdünnt mit Aqua dest. auf 60%

- Aqua dest. (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland)

- Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma, Steinheim, Deutschland)  
mit PBS (1 mg/ml) in Lösung gebracht

osteogene / adipogene Induktionssubstanzen:

- Dexamethason (Fluka, Buchs, Schweiz)
- L-Ascorbinsäure-2-Phosphat (=AsAP, Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- $\beta$ -Glyzerophosphat (Sigma, Steinheim, Deutschland)
- 1-Methyl 3-Isobutylxanthin (Sigma, Steinheim, Deutschland)
- Indomethazin (Sigma, Steinheim, Deutschland)
- humanes, rekombinantes Insulin (Hartmann La Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland)

Fixierungsmittel:

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

Färbesubstanzen:

- 6% Silbernitrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Fettrot-7B (Fluka, Buchs, Schweiz)  
Stammlösung: gelöst in 99% Isopropanol (500 mg/100 ml)  
Gebrauchslösung: mit Aqua dest. auf 60% verdünnte Stammlösung
- Hämalan (Sigma, Steinheim, Deutschland)

Antikoagulanzen:

- Liquemin N 10.000 (Hartmann La Roche, Grenzach - Wyhlen, Deutschland)  
10 000 I.E. wurden aufgenommen in 10 ml NaCl
- Canusal (100 I.E./ml) (CP Pharmaceuticals, Wrexham, Großbritannien)

Antikörper für die Flow-Zytometrie:

- CD34, Maus IgG1, PE markiert
- CD59, Maus IgG2a, FITC markiert
- MHC-Klasse I, Maus IgG1, FITC markiert
- MHC-Klasse II, Maus IgG2a, FITC markiert  
(Becton Dickinson – Biosciences / Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
- CD45, Maus IgG1, PE markiert
- CD90, Maus IgG1, FITC markiert  
(Beckman Coulter – Biomedical Research, Krefeld, Deutschland)
- CD105, Maus IgG1, FITC markiert (Serotec, Düsseldorf, Deutschland)



### Plastikmaterial:

- 24-Loch-Platten (Cellstar®) (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
- Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) (BD Falcon®, BD Biosciences – Labware Europe, Le Pont De Claix, Frankreich)
- Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) (Cellstar®) (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
- Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml) (Falcon®, BD - Labware Europe, Le Pont De Claix, Frankreich)
- Eppendorf Tubes (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
- Serum-Röhrchen (7,5 ml, weiss) - Sarstedt Monovette® (Nümbrecht, Deutschland)
- white top tubes (25 ml) - (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Gewinnung von mesenchymalen Stammzellen

Die MSZ wurden aus KM isoliert, das bei 7 Spendern im Rahmen der Knochenmarkspende operativ und bei 2 Spendern ambulant durch Beckenkammpunktionen gewonnen wurde. Es wurden 5 ml der ersten Spritze verwendet. Sofort nach der Entnahme wurden dem KM 2000 I.E. Liquemin bzw. 200 I.E. Canusal zugegeben.

Das frisch gewonnene Material wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt und mit Hilfe des Dichtegradienten Ficoll und durch Zentrifugation bei 2000 rpm für 20 Min. ohne Bremse (Minifuge 2, Heraeus Christ, Deutschland) aufgetrennt. Der Gradient, welcher die Zellen enthält, wurde mittels Pipette abgesaugt, in DMEM (serumfrei) aufgenommen und erneut bei 1400 RPM für 7 Min. zentrifugiert (Hettich Rotanta, Tuttlingen, Deutschland).

Das so entstandene Zellpellett wurde in DMEM (serumfrei) aufgeschwemmt und die Zellzahl in der Neubauerkammer bestimmt. Vor dem Aussiedeln wurde der Zellsuspension das entsprechende Serum frisch zugesetzt. Die mononukleären Zellen befanden sich von der Abnahme des Zellringes nach dem Ficoll bis zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich 10 bis 15 Min. in DMEM ohne den Zusatz von Serum.

### 3.2.2. Gewinnung von autologem Serum

Das venöse Vollblut (38 ml bei 7 Spendern, 172 ml bei 2 Spendern) wurde am Abend vor der Knochenmarkentnahme abgenommen und ca. 14 Stunden bei 4°C gelagert. Anschließend wurde es bei 3000 rpm für 5 Min. zentrifugiert (Labofuge 200, Heraeus

Sepatech, Deutschland). Das gewonnene Serum wurde in Eppendorf Tubes portioniert und bis zur Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert, um eine Konzentrationsminderung der Inhaltsstoffe (Nährstoffe und Wachstumsfaktoren) zu verhindern und so gleiche Ausgangsbedingungen für jeden Versuch zu gewährleisten.

Auf eine Hitzeinaktivierung des Serums wurde bewusst verzichtet.

### 3.2.3. Fötale Kälberserum

Das fötale Kälberserum (500 ml), welches seit dem Kauf bei  $-80^{\circ}\text{C}$  lagerte, wurde schonend bei  $4^{\circ}\text{C}$  über 12 bis 24 Stunden aufgetaut. Um optimale Bedingungen und Vergleichbarkeit mit AS herzustellen, wurde es statt in 50 ml Portionen ebenfalls in Eppendorf Tubes portioniert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Bei dem verwendeten FKS handelt es sich um ein FKS, das zuvor bezüglich seiner Expansions- und Differenzierungskapazität (adipogen und osteogen) an humanen MSZ selektioniert und im Labor etabliert wurde.

### 3.2.4. Zellkulturen in der 24-Loch-Platte

Alle Zellkulturen wurden im Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 vol%  $\text{CO}_2$  und einer Luftfeuchtigkeit von mindestens 95% auf 24-Loch-Platten inkubiert. Die Oberfläche der 24-Loch-Platten, mit einer Fläche von  $1,7\text{ cm}^2$  pro Vertiefung (VT) ist für die adhärenzte Zellkultur vorbehandelt.

Die plastikadhärenten MSZ wurden mit dem oben beschriebenen DMEM, welches bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde, unter Zugabe von 1%, 3% und 10% AS bzw. 10% FKS gewonnen, expandiert und differenziert. In der Regel wurde das Medium während der gesamten Kultivierungszeit (Primärkultur bis Passage 2) alle 3 Tage ausgetauscht. AS und FKS wurden jeweils vor dem Zusetzen frisch aufgetaut.

Die Verteilung der einzelnen Bedingungen auf den 24-Loch-Platten ist in Abbildung 1a dargestellt (siehe Anhang).

In der Primärkultur (PK) wurden 650.000 Zellen je VT mit 400  $\mu\text{l}$  Kulturmedium ausgesiedelt. Dies entspricht der herkömmlichen Aussiedlungsdichte von 10 Mio. Zellen in einer Kulturflasche mit einer Fläche von  $25\text{ cm}^2$  in 5 ml Medium. Pro Fragestellung wurden 15 Vertiefungen bearbeitet.

An Kulturtag (KT) 3 der PK fand der erste Medienwechsel statt. Die Platten wurden zuvor 3 mal leicht geschwenkt, so dass sich die am Boden abgesetzten Rundzellen lösten und

so beim Wechsel des gesamten Kulturmediums fast vollständig entfernt werden konnten. Mit dem Austausch des Mediums war auch ein Entfernen aller bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht adhärenen MSZ verbunden, weshalb die ersten 3 KT als Isolationsphase betrachtet werden können.

Am KT 9 der PK wurde das Kulturmedium nach dem Bestimmen der Zellzahl entnommen und getrennt nach dem jeweiligen Serumzusatz gesammelt. Anschließend wurden die Zellkulturen mit PBS gewaschen, für 2 Min. mit 0,25% Trypsin-EDTA inkubiert und in Suspension gebracht. Die Trypsinreaktion wurde durch den Zusatz des jeweiligen Kulturmediums gestoppt. Die pro Fragestellung (15 VT) erhaltenen Zellsuspensionen wurden gepoolt, gewaschen und als Passage 1 (P1) mit je 15 VT pro Fragestellung auf neuen 24-Loch-Platten ausgesiedelt. Da die Zellzahl sehr gering war (max. 90000 Zellen pro Bedingung), wurde ein Auszählen in der Neubauerkammer für nicht sinnvoll erachtet. Aus diesem Grund wurde die Zahl der neu ausgesiedelten Zellen anhand des Konfluenzgrades von je 12 ausgezählten Gesichtsfeldern über alle 15 VT geschätzt. Um gleiche Ausgangsbedingungen für P1 zu schaffen, wurden an KT 0 jeweils ca. 20 Zellen / cm<sup>2</sup> ausgesiedelt (Konfluenzgrad von ca. 0,5 %).

Am KT 7 von P1 erfolgte nach der Bestimmung der Zellzahl ein erneutes Trypsinieren. Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden ebenfalls gepoolt, gewaschen und als Passage 2 (P2) mit je 6 VT pro Fragestellung für die osteogene und adipogene Differenzierung auf neuen 24-Loch-Platten ausgesiedelt.

Die Differenzierung erfolgte dabei jeweils in 4 VT pro Fragestellung, weitere 2 VT dienten als Kontrolle. Die Verteilung der einzelnen Bedingungen auf den 24-Loch-Platten ist in Abbildung 1b dargestellt (siehe Anhang).

Auch hier wurde die Zahl der neu ausgesiedelten Zellen anhand des Konfluenzgrades von je 12 ausgezählten Gesichtsfeldern über alle 15 VT geschätzt. Für die osteogene Differenzierung wurde an KT 0 mit einem Konfluenzgrad von ca. 1% und für die adipogene Differenzierung mit einem Konfluenzgrad von ca. 40% bis 50% neu ausgesiedelt.

Um die osteogenen und adipogenen Assays möglichst zeitnah (KT 21) durchführen zu können, mussten für die adipogene Differenzierung in P2 deutlich mehr Zellen ausgesiedelt werden, da die erste Inkubation mit den Induktionsmedien erst 3 bis 5 Tage nach Konfluenz erfolgen sollte. Der osteogene Assay erfordert keine Konfluenz, so dass zur Vermeidung des vorzeitigen Ablösens der konfluenten Monolayer (Beobachtung bei den Pilotversuchen) mit einer niedrigen Zelldichte ausgesiedelt wurde.

### 3.2.5. Quantifizierung der Zellzahl

Die Quantifizierung der Zellzahl erfolgte bei den 24-Loch-Platten durch das manuelle Auszählen von 12 sich nicht überlappenden Gesichtsfeldern (GF) pro VT (siehe Abb. 2 im Anhang) an einem Invers-Durchlicht-Mikroskop (Televal 31, Zeiss, Jena, Deutschland) bei 100 facher Vergrößerung. Die GF wurden dabei zentral in die VT gelegt, da am Rand jeder Vertiefung durch Lichtbrechungseffekte einige Bereiche nur unscharf zu sehen waren. Im linken Okular des Mikroskopes befand sich eine Okular-Format-Platte, die dem Justieren eines Bildausschnittes einer ansetzbaren Kamera dient. Diese Vorlage hatte die Form eines Rechteckes, welches sich bei einer 100 fachen Vergrößerung mit einer Größe von 0,3 cm x 0,175 cm in der Vertiefung abbildete. Dementsprechend haben die ausgezählten 12 GF eine Fläche von 0,6 cm<sup>2</sup>.

Es wurde darauf geachtet, dass sich die Kulturplatten während der Zellzählung nicht länger als 5 Min. außerhalb des Brutschrankes befanden.

Die Zellzahl wurde an den KT 3, 6 und 9 in PK, an den KT 4 und 7 in P1 und an den KT 3, 7, 11, 15, 18 und 21 in P2 der osteogenen Differenzierung bestimmt. Eine zusätzliche Zellzählung erfolgte bei 3 der 9 Spender an allen KT sowohl in PK als auch in P1. Die Bestimmung der Zellzahl an KT 3 in PK ist dabei ein wichtiges Maß für die Zellgewinnung in der Isolationsphase.

Da während der Expansion ein reines Auszählen der Zellen nicht mehr möglich war, wurde durch Bestimmen des Konfluenzgrades auf die Zellzahl geschlossen. Dafür wurde vor jeder Zählung für jede getestete Bedingung und bei jedem Spender durch reines Auszählen ermittelt, wie viele Zellen einem Konfluenzgrad von 10% entsprechen.

Die Zellen zeigten unter den verschiedenen Bedingungen leicht voneinander abweichende Zellgrößen und Zellmorphie. So entsprechen einem Konfluenzgrad von 10% an KT 9 in PK z.B. bei 1% AS 23 Zellen, bei 3% AS 20 Zellen bei 10% AS 18 Zellen und bei 10% FKS 20 Zellen. Der Konfluenzgrad wurde anschließend geschätzt. Anhand dieser Festlegung kann von jedem Konfluenzgrad auf die Zellzahl geschlossen werden. Wenn 20 Zellen einem Konfluenzgrad von 10% entsprechen, entsprechen demzufolge 140 Zellen einem Konfluenzgrad von 70%.

### 3.2.6. Osteogene Differenzierung

Die osteogene Differenzierung (Jaiswal 1997, modifiziert) erfolgte an den Zellkulturen der 2. Passage mit 4 VT pro Fragestellung, beginnend mit dem Tag der Aussaat.

Die osteogenen Induktionssubstanzen wurden mit einer Präzisionswaage (Mettler, Deutschland) eingewogen, unter Verwendung von PBS in Lösung gebracht und vor dem

Aliquotieren mit einem 0,22 µm Filter (Merck, Bruchsal Deutschland) steril filtriert. Die Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert und zum Medienwechsel frisch aufgetaut. Die Endkonzentration im Medium (osteogenes Induktionsmedium) wurde durch eine Verdünnung der Stammlösungen im Verhältnis von 1:100 erreicht. Die Konzentration der Stammlösungen und der osteogenen Induktionsmedien sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Die Induktionssubstanzen Ascorbinsäure und Dexamethason wurden dem DMEM unter Zusatz von AS bzw. FKS ab dem Tag der Aussaat und die Induktionssubstanz β-Glyzerophosphat ab KT 9 hinzugefügt.

Tabelle 2: Konzentration der osteogenen Stammlösungen und Endkonzentration der Induktionssubstanzen im osteogenen Induktionsmedium

Induktionssubstanz	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Dexamethason	10 µM	0,1 µM
L-Ascorbinsäure-2-Phospat	5 mM	0,05 mM
β-Glyzerophosphat	300 mM	3 mM

### 3.2.6.1. von Kossa Assay

Zum Nachweis extrazellulärer, kalziumhaltiger Matrixmoleküle wurde an KT 21 (P2) der von Kossa Assay (in: Böck, 1989) durchgeführt. Mit diesem Assay erfolgt der indirekte Nachweis einer osteogenen Differenzierung.

Nach Entfernen des Mediums und 2 Waschgängen mit PBS wurden die Zellen mit 3,7% Formaldehyd, welches mit PBS gepuffert war, für 10 Min. inkubiert und fixiert. Das Fixierungsmittel wurde einmal mit PBS und anschließend zweimal mit Aqua dest. ausgewaschen, da PBS in Verbindung mit Silbernitrat ausflockt. Die Färbung erfolgte mit 6% Silbernitratlösung, unter Einwirkung von energiereichem UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm für 20 Min..

Die Beurteilung erfolgte unter Zuhilfenahme einer makroskopischen und einer mikroskopischen Skalierung. Für die mikroskopische Einschätzung wurden je 12 sich nicht überlappende GF pro VT über 4 VT ausgewertet und der daraus resultierende Median als Endwert ermittelt.

### 3.2.6.2. von Kossa Assay – Skalen

Für die Erstellung der Skalen wurden digitale Aufnahmen (Coolpix 885, Nikon, Japan) der von Kossa-Assays verwendet und das Ausmaß der Anfärbung der Extrazellulärmatrix als numerischer Wert ausgedrückt. Die makroskopische Skala wurde in 6, die mikroskopische Skala in 11 Abstufungen unterteilt, jeweils mit der Stufe 0 (Kontrolle) beginnend. Die Skalen sind im Anhang einsehbar (siehe Abb. 19 und 20).

### 3.2.7. Adipogene Differenzierung

Die adipogene Differenzierung (Dennis, 1999; Pittenger et al., 1999, modifiziert) erfolgte an Zellkulturen der 2. Passage mit 4 VT pro Fragestellung, beginnend 3 bis 5 Tage nach Konfluenz.

Die adipogenen Induktionssubstanzen wurden mit einer Präzisionswaage (Mettler, Deutschland) eingewogen und Methylisobutylxanthin und Indomethazin unter Verwendung von 100% Ethanol in Lösung gebracht. Dexamethason konnte in PBS und Insulin in Aqua dest. gelöst werden.

Vor dem Aliquotieren wurden die Stammlösungen, Insulin ausgenommen, mit einem 0,22 µm Filter steril filtriert, bei -20°C gelagert und zum Medienwechsel jeweils frisch aufgetaut.

Die Endkonzentration im Medium (adipogenes Induktionsmedium) wurde durch eine Verdünnung der Stammlösungen im Verhältnis von 1:100 erreicht. Dem in Lösung befindlichen Insulin wurde zuvor in PBS gelöstes und steril filtriertes BSA, mit einer Konzentration von 1mg / ml, in einer Verdünnung von 1:10 zugesetzt. Die Konzentration der Stammlösungen und der adipogenen Induktionsmedien sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Es wird zwischen adipogenem Induktionsmedium (AIM), welches sich aus Dexamethason, Methylisobutylxanthin, Indomethazin und Insulin zusammensetzt und adipogenem Erhaltungsmedium (AMM), das nur aus Insulin besteht, unterschieden. Aufeinander folgend wurden die Zellkulturen für jeweils 2 bis 3 Tage mit AIM und AMM inkubiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt.

Die entsprechenden Substanzen wurden dem DMEM mit AS bzw. FKS hinzugefügt.

Tabelle 3: Konzentration der adipogenen Stammlösungen und Endkonzentration der Induktionssubstanzen im adipogenen Induktionsmedium

Induktionssubstanz	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Dexamethason	100 µM	1 µM
1-Methyl 3-Isobutylxanthin	50 mM	0,5 mM
Indomethazin	10 mM	100 µM
Insulin	10 mg/ml*	10 µg/ml

\* Konzentration der Stammlösung vor der Verdünnung in BSA

### 3.2.7.1. Adipogener Assay

Zum Nachweis intrazellulärer Fettvakuolen wurde nach 2 Differenzierungsdurchläufen (AIM und AMM) der adipogene Assay durchgeführt.

Die Färbung erfolgte nach Lillie (in: Böck, 1989) mit Fettrot-7B, welches in Isopropanol 99% gelöst war. Zum Erhalt der benötigten Gebrauchslösung wurde die Stammlösung mit Aqua dest. auf 60% verdünnt und steril filtriert (0,22 µm Filter).

Eingeschlossen in 2 Waschgänge mit PBS wurden die Zellen mit 3,7% Formaldehyd, welches mit PBS gepuffert war, für 10 Min. fixiert.

Die Anfärbung der intrazellulären Fettvakuolen wurde durch eine Inkubation mit Isopropanol 60% für 5 Min. vorbereitet und erfolgte für 10 Min. mit der frisch filtrierten Gebrauchslösung, welche durch Verdünnung der Stammlösung von Fettrot-7B erhalten wurde. Vor dem abschließenden Waschgang mit Aqua dest. wirkte Isopropanol 60% für 1 Min. ein.

Die Kerngegenfärbung wurde mit gefiltertem (0,22 µm Filter) Hämalaun vorgenommen, das für 5 Min. einwirkte und mit Aqua dest. ausgewaschen wurde.

Die Beurteilung erfolgte unter Zuhilfenahme einer mikroskopischen Skalierung. Für die mikroskopische Einschätzung wurden 12 sich nicht überlappende GF pro VT ausgewertet und der daraus resultierende Median als Endwert ermittelt.

### 3.2.7.2. Adipogener Assay – Skala

Für die Erstellung der Skala wurden digitale Aufnahmen (Coolpix 885, Nikon, Japan) der adipogenen Assays verwendet und das Ausmaß der Anfärbung der intrazellulären Fettvakuolen als numerischer Wert ausgedrückt. Die Skala beinhaltet 11 Abstufungen, mit der Stufe 0 (Kontrolle) beginnend. Sie ist im Anhang einsehbar (siehe Abb. 22).

### 3.2.8. Zellkulturen in der Zellkulturflasche

Um in relativ kurzer Zeit eine große Zahl an Zellen für die Bestimmung von Oberflächenmarkern zu generieren, wurden von Spender 7 und 9 zusätzlich Zellkulturen in 25 cm<sup>2</sup>- und 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen, deren Oberfläche für die Zellkultur vorbehandelt ist, kultiviert. Für die PK wurde jeweils eine 25 cm<sup>2</sup>-Flasche benutzt. Die ausgesiedelte Zellzahl lag bei 10 Mio. MNZ auf 5 ml Kulturmedium.

Die plastikadhärenten MSZ wurden mit dem oben beschriebenen DMEM, welches bei 4°C gelagert wurde, unter Zugabe von 10% AS und 10% FKS expandiert. In der Regel wurde das Medium während der gesamten Kultivierungszeit (PK bis P2) alle 3 Tage ausgetauscht. AS und FKS wurden jeweils frisch aufgetaut zugesetzt.

Am KT 9 der PK wurden die Zellkulturen mit PBS gewaschen, für 2 Min. mit 0,25% Trypsin - EDTA inkubiert und in Suspension gebracht. Die erhaltene Zellsuspension wurde als P1 mit einer Zellzahl von ca. 800 MSZ / cm<sup>2</sup> in 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen auf 5 ml Kulturmedium neu ausgesiedelt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in der Neubauerkammer.

An KT 7 der P1 wurde erneut trypsiniert und die erhaltene Zellsuspension als P2 mit einer Zellzahl von ca. 800 MSZ / cm<sup>2</sup> in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen auf 12 ml Kulturmedium neu ausgesiedelt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in der Neubauerkammer.

Ab KT 6 wurde mit 15 ml Medium pro 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche gearbeitet. Zu diesem Zeitpunkt war ein Konfluenzgrad von ca. 50% erreicht.

An KT 9 der P2 wurden die Zellkulturen, die für die Bestimmung der Oberflächenmarker angesetzt waren, trypsiniert und die Zellsuspension bis zur Messung am Flow-Zytometer auf Eis gelagert, um eine Adhäsion der MSZ an der Oberfläche des Röhrchens zu verhindern.

### 3.2.9. Bestimmung von Oberflächenmarkern

Die Bestimmung der Oberflächenmarker erfolgte mittels Flow-Zytometrie an frisch trypsinierten MSZ der 2. Passage, die in Medium mit dem Zusatz von 10% AS und 10% FKS kultiviert worden waren.

Getestet wurden die Marker CD34, CD45, CD90, CD105, MHC-Klasse I, MHC-Klasse II und zur Positivkontrolle CD59. Die Analyse wurde mit dem Flow-Zytometer FACScan und der Software Cellquest der Firma Becton Dickinson (Becton Dickinson GmbH – Biosciences / Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.



### 3.2.10. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Hilfe des Institutes für medizinische Biometrie und Epidemiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Um zu zeigen, dass MSZ nicht nur mit FKS, sondern auch mit AS gewonnen werden können, wurden von 9 Spendern AS und KM untersucht. Weiterhin sollte für jeden einzelnen Spender, bei dem die Gewinnung von MSZ gelang, überprüft werden können, ob die Anzahl der mit AS gewonnenen MSZ konzentrationsabhängig ist. Deshalb wurden die Versuche mit 1% AS, 3% AS und 10% AS durchgeführt.

Außerdem sollte überprüft werden, ob die Anzahl der mit 10% FKS gewonnenen MSZ genauso hoch ist wie die bei den von AS, mit der die größte Anzahl an MSZ gewonnen werden konnte. Die Anzahl der unabhängigen Versuchswiederholungen (bzw. die Anzahl der VT) wurde mit Hilfe des Vorzeichentestes abgeschätzt und auf 15 festgelegt.

Die Abbildungen der PK und P1 wurden so erstellt, dass zuerst für jeden Spender der Median über alle Gesichtsfelder einer Vertiefung bestimmt wurde. Bei Benutzung derselben Konzentration desselben Mediums wurden dann die Mediane für jede VT eines Spenders als Realisationen unabhängiger Versuche unter identischen Bedingungen betrachtet. Damit konnte ein verteilungsfreies Konfidenzintervall für den Median berechnet werden, der mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,95 in mindestens der Hälfte der VT erwartet wird.

Die Abbildungen, welche die Ergebnisse von P2 veranschaulichen, zeigen mittlere Werte und keine Konfidenzintervalle, da nur 4 VT mit und 2 VT ohne osteogenen Zusatz verwendet wurden.

Da die Ergebnisse des von Kossa- Assays und des adipogenen Assays ein Score sind, wurde für jede VT der Median über die GF bestimmt und nicht der Mittelwert.

### 3.2.11. Elektronische Datenverarbeitung

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

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

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Spenderdaten

Für die vorliegende Arbeit wurden von insgesamt 9 gesunden Spendern im Alter von 23 bis 40 Jahren 5 ml Knochenmarkspirat der ersten Spritze verwendet. Die nachfolgende Tabelle zeigt die wichtigsten Spenderdaten.

Tabelle 4: Spenderdaten mit Geschlecht, Alter und Zahl mononukleärer Zellen (MNZ) / ml KM

Spender	Geschlecht	Alter in Jahren	MNZ / ml KM
1	♂	25	10,2 Mio.
2	♂	29	8,4 Mio.
3	♂	35	8,8 Mio.
4	♀	40	8 Mio.
5	♂	24	10 Mio.
6	♂	23	10 Mio.
7	♂	28	8,4 Mio.
8	♂	28	8 Mio.
9	♂	29	11 Mio.
<b>Median</b>	8 ♂ ; 1 ♀	<b>28</b>	<b>8,8 Mio.</b>

### 4.2. Zellmorphie

#### 4.2.1. Primärkultur, Passage 1 und Passage 2

##### Zellkultur mit 1% AS

Die MSZ waren im Vergleich zu den Zellen der anderen Serumzusätze deutlich kürzer und etwas breiter und zeigten zum Großteil kürzere und dickere Ausläufer (siehe Abb. 15a und 16a im Anhang).

In PK war bis zum KT 9 fast keine Bildung von Kolonien mit der Größe von 20 bis 30 Zellen zu beobachten. Die Zahl der Monozyten variierte im Median zwischen 1 bis 5 Zellen pro GF, wobei das Maximum mit 5 Zellen / GF an KT 6 erreicht wurde. Danach war ein Rückgang der Monozytenzahl zu verzeichnen.

In P1 und P2 zeigte sich ab KT 3 die Entstehung vieler kleiner Kolonien in der Größe von

5 bis 10 Zellen, die nur langsam Kontakt zueinander bekamen. Das Wachstum von Monozyten war in diesen Passagen nicht mehr zu beobachten.

#### Zellkultur mit 3% AS

Die MSZ waren schlanke Zellen mit kurzen Ausläufern. Sie unterschieden sich von den Zellkulturen mit 1% AS durch ihre schlankere Form und von den Zellen mit 10% AS bzw. 10% FKS durch ihre kürzeren Ausläufer (siehe Abb. 15b und 16b im Anhang).

In PK und P1 bildeten sie innerhalb der ersten 6 KT viele kleine Kolonien mit der Größe von 5 bis 10 Zellen, welche in weiteren 3 KT zu großen Kolonien mit der Größe von 15 bis 25 Zellen auswuchsen und konfluent wurden. In P2 war die Entstehung dieser anfänglich kleinen Kolonien nicht mehr zu beobachten.

Die Zahl der Monozyten in PK variierte im Median zwischen 1 bis 10 Zellen pro GF, wobei das Maximum mit 10 Zellen / GF an KT 6 erreicht wurde. Die Zahl der Monozyten war dann rückläufig. In P1 war nur noch eine sehr geringe Anzahl an Monozyten zu verzeichnen, P2 war nahezu monozytenfrei.

#### Zellkultur mit 10% AS

Unter dieser Bedingung waren die MSZ sehr lange und schlanke Zellen mit langen Ausläufern, die von PK bis P2 eine sehr schnelle Koloniebildung zeigten (siehe Abb. 15c und 16c im Anhang).

An KT 6 waren viele Kolonien in der Größe von 10 bis 15 Zellen zu beobachten, die innerhalb von weiteren 3 KT auf die Koloniegröße von 20 bis 30 Zellen anwuchsen. Morphologische Unterschiede zu den Zellkulturen mit 10% FKS ließen sich nicht feststellen.

Die Zahl der Monozyten in PK variierte im Median zwischen 1 bis 7 Zellen pro GF, wobei das Maximum mit 7 Zellen / GF auch hier an KT 6 zu verzeichnen war. Die Zahl der Monozyten nahm im weiteren Verlauf wieder ab. In P1 war nur noch eine sehr geringe Anzahl an Monozyten zu verzeichnen und P2 war nahezu monozytenfrei.

#### Zellkultur mit 10% FKS

Die MSZ stellten sich wie in der Literatur beschrieben als lange, schlanke Zellen mit schmalen Ausläufern dar (siehe Abb. 15d und 16d im Anhang).

Die Zahl der Monozyten war ähnlich niedrig wie bei den Zellkulturen mit 1% AS und variierte in PK im Median zwischen 1 bis 5 Zellen / GF, wobei das Maximum mit 5 Zellen / GF an KT 6 erreicht wurde und danach ein Rückgang zu beobachten war. In P1 waren nur noch vereinzelt Monozyten sichtbar und P2 war monozytenfrei.

In den Vertiefungen zeigten sich unterschiedlich gute Wachstumsbedingungen. So war

vor allem im Zentrum einer jeden Vertiefung ein sehr gutes Wachstum mit hohem Konfluenzgrad zu beobachten und in den direkten Randgebieten ein schlechteres Wachstum mit meist geringerem Konfluenzgrad.

#### 4.2.2. Trypsinieren der Zellkulturen

Beim Trypsinieren war bei allen Zellkulturen mit AS im Vergleich zu den Zellkulturen mit FKS ein schnelleres Ablösen der adhären MSZ von der Oberfläche der 24-Loch-Platten und den T25- bzw. T75-Kulturflaschen zu beobachten. Besonders deutlich zeigte sich dies bei den Zellkulturen mit 10% AS, welche sich bereits 30 bis 50 Sec. nach Trypsinzugabe vollständig ablösten. Die Zellen der Kulturen mit 10% AS lösten sich schneller als die Zellen der Kulturen mit 3% AS und 1% AS. Das Ablösen der Zellen unter 10% FKS dauerte hingegen ca. 2 Min. und ein abschließendes Klopfen der Platten bzw. Flaschen auf dem Handteller war erforderlich, um die zu diesem Zeitpunkt noch an der Oberfläche haftenden Zellen zu lösen.

Ein Großteil der zum Zeitpunkt des Trypsinierens vorhandenen adhären Monozyten haftete nach Beendigung des Vorganges noch an der Platten- oder Flaschenoberfläche, so dass nur wenige dieser Zellen in die folgende Passage übernommen wurden.

#### 4.3. Wachstum

Um Aussagen über das Wachstum unter den verschiedenen Serumzusätzen treffen zu können, wurde bei allen Spendern an den KT 3, 6 und 9 in PK, an den KT 4 und 7 in P1 und an den KT 3, 7, 11, 15, 18 und 21 der osteogen differenzierten Zellkulturen die Zellzahl an 12 sich nicht überlappenden GF / VT bestimmt (siehe Methodenteil).

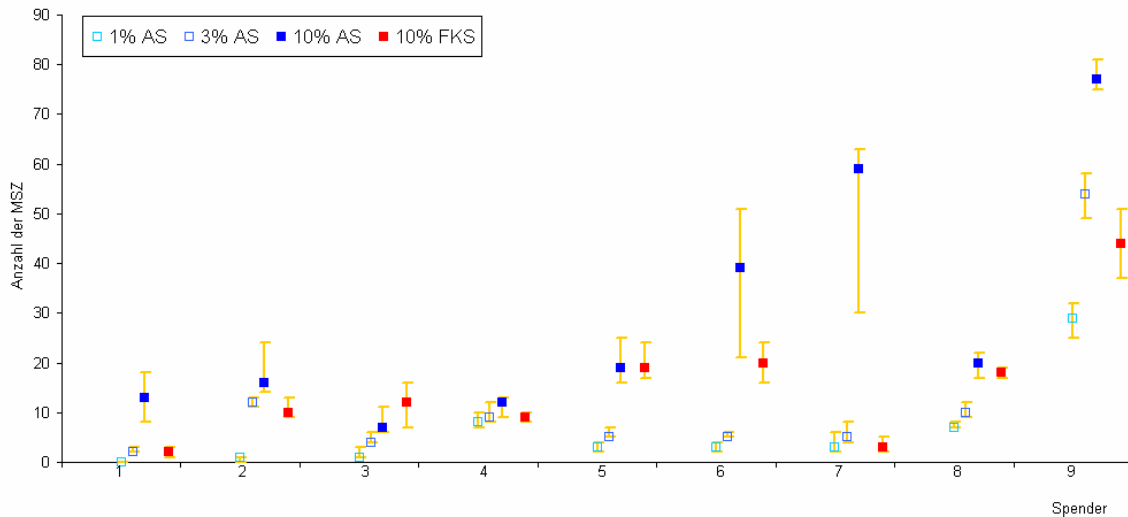
Zusätzlich wurden bei den Spendern 7, 8 und 9 tägliche Zellzählungen in PK und P1 durchgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Zellzahlbestimmungen an den verschiedenen Tagen der Primärkultur und der Passage 1 dargestellt. Sie geben Aufschluß darüber, inwieweit eine Isolation und Expansion humaner MSZ unter dem Zusatz von AS gelingt.

##### 4.3.1. Isolation in der Primärkultur (24-Loch-Platte)

Bei der Primärkultur wird zwischen Isolation und Expansion unterschieden. Die Phase der Zellisolation (siehe Abb. 3 und Tabelle 5) kann auf die Kulturtage 0 bis 3 begrenzt werden,

da an KT 3 der erste Medienwechsel stattfand und somit alle bis dahin nicht adhärenen MSZ ausgewaschen wurden.

Abb. 3: Isolation der MSZ in der Primärkultur



Grafische Darstellung der medianen Zellzahlen der MSZ an KT 3 in der Primärkultur für alle Spender.

Den Spendern (x-Achse) wird die Zellzahl (y-Achse) gegenübergestellt. Die in unterschiedlichen Farben positionierten Quadrate zeigen die Mediane der jeweiligen Spender, die aus 12 GF pro VT berechnet wurden. Ein hoher Wert bedeutet, dass unter der getesteten Bedingung viele Zellen generiert wurden. Die Federbalken zeigen die 95% Konfidenzintervalle, d.h. die Bereiche, innerhalb derer der Median mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,95 erwartet wird.

Am KT 3 in PK wurden unter dem Zusatz von 10% AS bei 7 von 9 Spendern im Median mehr Zellen isoliert (bei 4 Spendern ohne ein Überlappen der 95% KI) als unter dem Zusatz von 10% FKS. Bei einem Spender (Spender 5) waren unter beiden Bedingungen nahezu gleiche, mediane Zellzahlen zu verzeichnen. Lediglich bei einem Spender (Spender 3) zeigte sich unter dem Zusatz von 10% FKS eine bessere Isolation als unter dem Zusatz von AS (mit Überlappen der 95% KI). Unter dem Zusatz von 10% FKS wurden bei 4 von 9 Spendern (alle ohne ein Überlappen der 95% KI) mehr MSZ, bei 2 Spendern annähernd gleich viele und bei 3 Spendern weniger MSZ (mit Überlappen der 95% KI) isoliert als unter dem Zusatz von 3% AS.

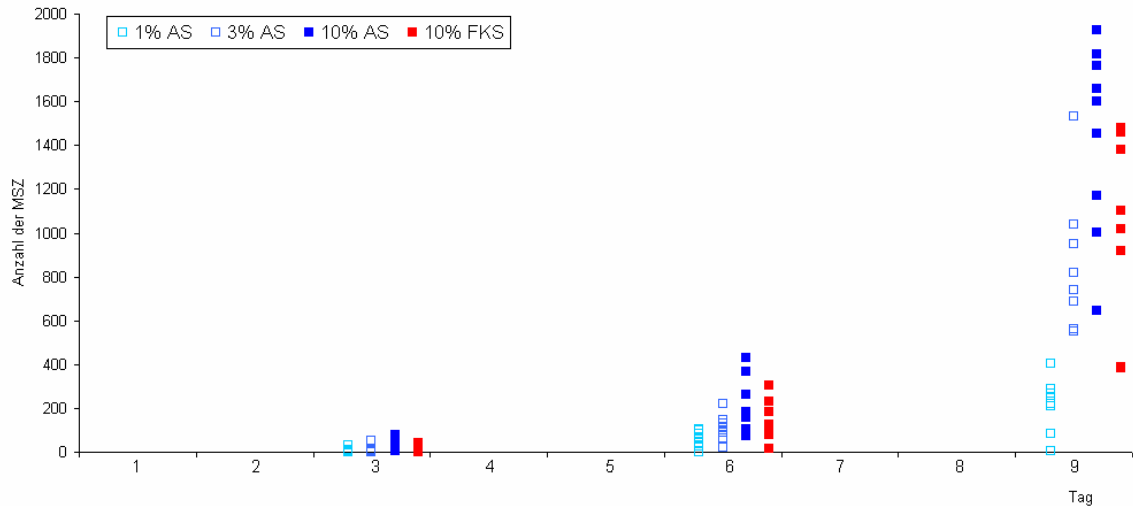
Unter dem Zusatz von 3% AS wurden bei allen Spendern (bei 8 Spendern ohne ein Überlappen der 95% KI) niedrigere Zellzahlen erreicht als unter dem Zusatz von 10% AS. Die wenigsten MSZ ließen sich bei allen Spendern unter dem Zusatz von 1% AS isolieren.

Im Folgenden wird der Einfachheit halber die Bezeichnung „ohne ein Überlappen der 95% KI“ synonym mit „signifikant“ und die Bezeichnung „mit Überlappen der 95% KI“ synonym mit „nicht signifikant“ verwendet.

### 4.3.2. Expansion in der Primärkultur (24-Loch-Platte)

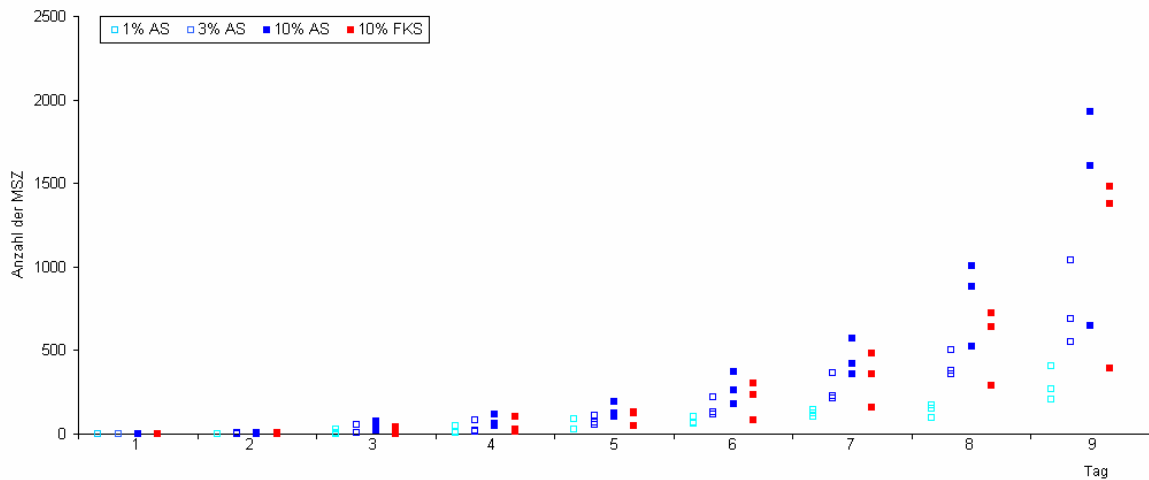
Die Zeit zwischen KT 3 und 9 wird als Expansionsphase betrachtet (siehe Abb. 4 bis 7). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass bereits in der späten Phase der Isolation (KT 2) vor allem bei den Zellkulturen unter dem Zusatz von 10% AS und 10% FKS die ersten Zellteilungen erfolgten.

Abb. 4: Isolation und Expansion der MSZ in der Primärkultur



Grafische Darstellung der medianen Zellzahlen der MSZ in der Primärkultur für alle Spender an den KT 3, 6 und 9. Den Tagen der Primärkultur (x-Achse) wird die Zellzahl (y-Achse) gegenübergestellt. Die in unterschiedlichen Farben positionierten Quadrate zeigen die Mediane der jeweiligen Spender, die aus 12 GF pro VT berechnet wurden.

Abb. 5: Isolation und Expansion der MSZ in der Primärkultur



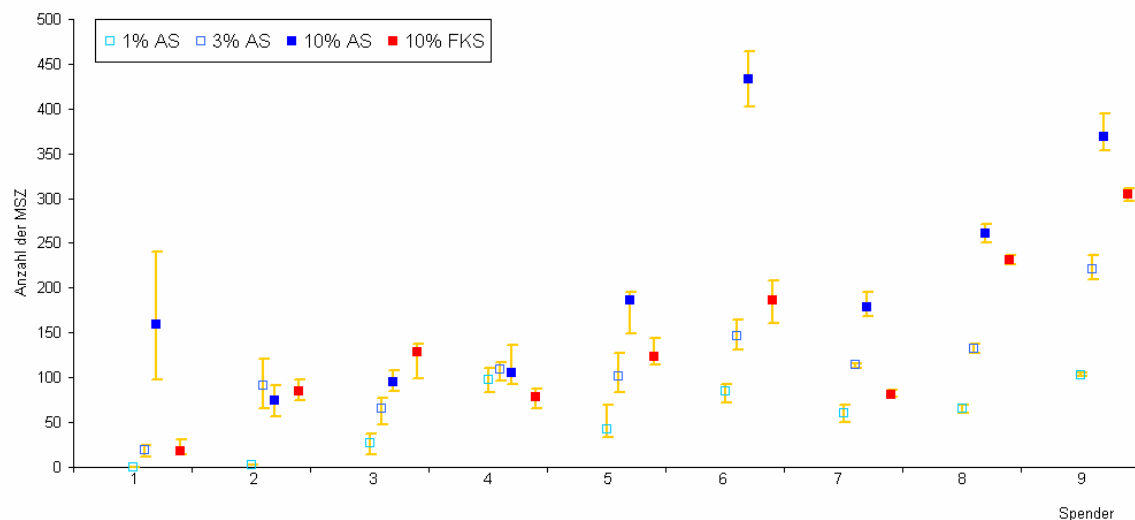
Grafische Darstellung der medianen Zellzahlen der MSZ für die Spender 7, 8 und 9 an allen KT in der Primärkultur. Den Tagen der Primärkultur (x-Achse) wird die Zellzahl (y-Achse) gegenübergestellt. Die in unterschiedlichen Farben positionierten Quadrate zeigen die Mediane der jeweiligen Spender, die aus 12 GF

pro VT berechnet wurden.

Die MSZ bzw. die MSZ- ähnlichen Zellen zeigten ein exponentielles Wachstum. Eine reine lag-Phase über mehrere Tage wurde nicht beobachtet.

An KT 3 zeigten die MSZ unter dem Zusatz von 10% AS und 10% FKS einen leichten „Vorsprung“ gegenüber den anderen getesteten Serumbedingungen. Dieser baute sich im Laufe der Expansion in PK weiter aus und war an den KT 6 und 9 in den meisten Fällen deutlich sichtbar (siehe Abb. 6 a und b). Zwischen den Zellkulturen unter 3% AS und 10% FKS wurden bis an KT 6 ähnliche Zellzahlen erreicht, erst danach war ein deutlicheres Auseinanderweichen zu beobachten. Diese Unterschiede bezüglich der Zellzahlen gibt Tabelle 6 in Form von Faktoren wieder.

Abb. 6 a: Expansion der MSZ am Tag 6 der Primärkultur



Grafische Darstellung der medianen Zellzahlen der MSZ für alle Spender in der Primärkultur: a) an KT 6 und b) an KT 9. Den Spendern (x-Achse) wird die Zellzahl (y-Achse) gegenübergestellt. Die in unterschiedlichen Farben positionierten Quadrate zeigen die Mediane der jeweiligen Spender, die aus 12 GF pro VT berechnet wurden. Die Federbalken zeigen die 95% Konfidenzintervalle.

Am KT 6 in PK wurden unter dem Zusatz von 10% AS bei 7 von 9 Spendern im Median mehr MSZ expandiert (alle signifikant) als unter dem Zusatz von 10% FKS. Bei den anderen 2 Spendern (Spender 2 und 3) zeigte sich die gegensätzliche Situation, d.h., es wurden unter dem Zusatz von 10% FKS im Median mehr MSZ expandiert (nicht signifikant) als unter dem Zusatz von 10% AS.

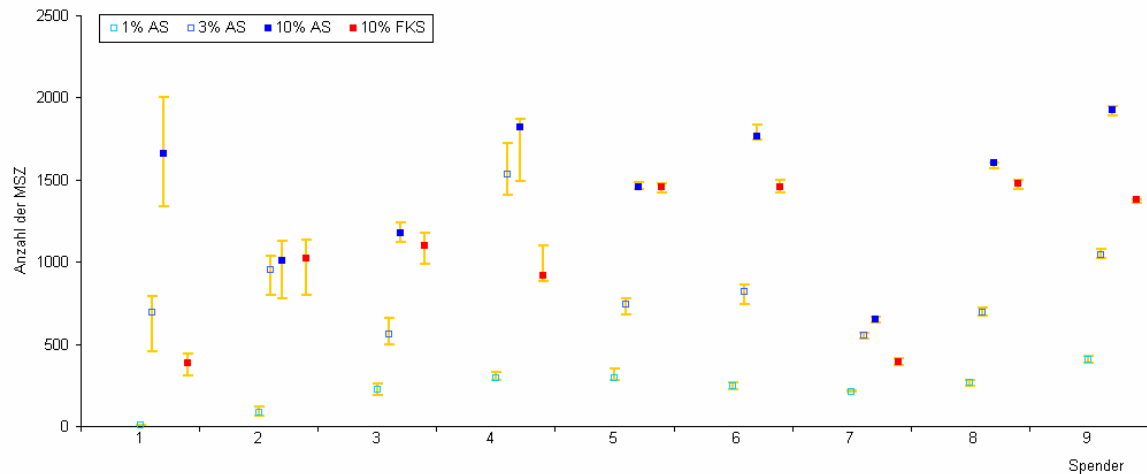
Unter dem Zusatz von 10% FKS wurden im Median bei 5 von 9 Spendern (bei 2 Spendern signifikant) mehr MSZ, bei 1 Spender annähernd gleich viele und bei 3 Spendern weniger MSZ (bei 2 Spendern signifikant) expandiert als unter dem Zusatz von

3% AS.

Unter dem Zusatz von 3% AS wurden bei 6 Spendern (alle signifikant) niedrigere Zellzahlen erreicht als unter dem Zusatz von 10% AS. Bei den anderen Spendern zeigte sich unter dem Zusatz von 3% AS ein besseres Wachstum (nicht signifikant).

Mit einer Ausnahme zeigte sich unter dem Zusatz von 1% AS die schlechteste Expansion.

Abb. 6 b: Expansion der MSZ am Tag 9 der Primärkultur



Am KT 9 in PK wurden wie bereits an KT 6 unter dem Zusatz von 10% AS bei 7 von 9 Spendern im Median mehr MSZ expandiert (bei 6 Spendern signifikant) als unter dem Zusatz von 10% FKS. Bei zwei Spendern waren unter beiden Bedingungen nahezu gleiche Zellzahlen zu verzeichnen.

Unter dem Zusatz von 10% FKS wurden bei 6 von 9 Spendern (bei 5 Spendern signifikant) mehr MSZ, und bei den anderen 2 Spendern weniger MSZ (bei Beiden signifikant) expandiert als unter dem Zusatz von 3% AS.

Unter dem Zusatz von 3% AS wurden bei allen Spendern (bei 5 Spendern signifikant) niedrigere Zellzahlen erreicht als unter dem Zusatz von 10% AS.

Unter dem Zusatz von 1% AS wurden mit Abstand die wenigsten MSZ expandiert.

Innerhalb der getesteten Bedingungen zeigte sich in PK sowohl bei jedem einzelnen Spender (intraindividuelle Variabilität) als auch zwischen den Spendern (interindividuelle Variabilität) eine deutliche Schwankung der Zellzahlen. Im Folgenden wird näher auf diese Unterschiede eingegangen (Tabelle 5 und 6).



Tabelle 5: Mittlere Zahl der MSZ in der Primärkultur

Serum-Zusatz	Spender	KT 1	KT 2	KT 3	KT 4	KT 5	KT 6	KT 7	KT 8	KT 9
1% AS	1			0,00			0,00			0,54
	2			0,06			0,20			7,63
	3			0,14			2,37			18,45
	4			0,74			8,03			25,47
	5			0,26			4,08			26,16
	6			0,26			7,33			20,49
	7	0,00	0,05	0,29	0,82	2,18	5,02	8,88	12,83	17,60
	8	0,01	0,06	0,64	0,93	2,32	5,47	10,41	14,27	23,63
	9	0,05	0,21	2,39	4,04	7,25	8,56	12,05	7,89	33,81
	<b>Insgesamt</b>	<b>0,02</b>	<b>0,11</b>	<b>0,53</b>	<b>1,93</b>	<b>3,92</b>	<b>4,56</b>	<b>10,45</b>	<b>11,66</b>	<b>19,31</b>
3% AS	1			0,19			1,51			55,17
	2			0,96			7,81			76,41
	3			0,42			5,37			47,56
	4			0,79			8,82			129,85
	5			0,55			8,58			62,00
	6			0,43			12,00			66,00
	7	0,03	0,07	0,46	1,28	5,87	9,43	19,29	29,56	46,11
	8	0,02	0,07	0,88	1,60	4,55	10,86	17,66	31,44	58,00
	9	0,11	0,35	4,42	6,73	9,53	18,42	30,10	41,52	87,44
	<b>Insgesamt</b>	<b>0,05</b>	<b>0,16</b>	<b>1,01</b>	<b>3,20</b>	<b>6,65</b>	<b>9,20</b>	<b>22,35</b>	<b>34,17</b>	<b>69,84</b>
10% AS	1			1,21			13,89			134,83
	2			1,67			6,51			79,83
	3			0,68			8,52			100,39
	4			1,04			9,28			145,05
	5			2,04			14,40			121,33
	6			3,18			35,70			148,40
	7	0,06	0,11	4,08	4,78	8,74	15,29	29,03	43,81	54,00
	8	0,04	0,28	1,68	3,72	10,35	21,73	37,06	72,60	131,90
	9	0,19	0,48	6,69	9,72	16,23	31,13	47,20	84,00	165,00
	<b>Insgesamt</b>	<b>0,09</b>	<b>0,29</b>	<b>2,47</b>	<b>6,07</b>	<b>11,77</b>	<b>17,38</b>	<b>37,76</b>	<b>66,80</b>	<b>120,08</b>
10% FKS	1			0,21			2,28			33,06
	2			0,87			7,14			80,76
	3			1,05			9,92			91,62
	4			0,77			6,96			82,30
	5			1,83			11,00			121,50
	6			1,84			15,49			120,11
	7	0,01	0,06	0,36	1,01	3,98	6,91	13,27	24,00	32,33
	8	0,01	0,09	1,52	2,27	10,12	19,13	30,10	59,33	122,22
	9	0,07	0,32	3,70	8,36	11,14	25,40	40,06	53,89	114,22
	<b>Insgesamt</b>	<b>0,03</b>	<b>0,16</b>	<b>1,35</b>	<b>3,88</b>	<b>8,42</b>	<b>11,58</b>	<b>27,81</b>	<b>45,74</b>	<b>88,68</b>

Die Tabelle zeigt den Zusammenhang zwischen dem Tag der Primärkultur und der mittleren Zellzahl pro GF, aus den Mittelwerten von 12 GF pro VT jeder getesteten Serumkonzentration eines jeden Spenders berechnet. Dabei ist n=3 an jedem KT und n=9 an den KT 3, 6 und 9. Die gemittelte Zellzahl aller Spender einer jeden Serumkonzentration an jedem Tag der Primärkultur ist unter „Insgesamt“ hinterlegt. Eine große Schwankung der Werte innerhalb einer Bedingung zeigt eine hohe interindividuelle Variabilität.

Zwischen den Spendern zeigte sich unter allen getesteten Bedingungen eine große Variabilität bezüglich der Zellzahl. Ein Vergleich der Mittelwerte zwischen den einzelnen

Spendern zeigte, dass an allen KT und bei fast allen Spendern unter dem Zusatz von 3% AS höhere mittlere Zellzahlen erreicht wurden als unter dem Zusatz von 1% AS und niedrigere mittlere Zellzahlen als unter dem Zusatz von 10% AS. An KT 3 wurden bei 8 von 9 Spendern und an KT 6 bei 7 von 9 Spendern unter dem Zusatz von 10% AS mehr MSZ gewonnen als unter dem Zusatz von 10% FKS. An KT 3, 6 und 9 wurden bei 6 von 9 Spendern mehr MSZ unter dem Zusatz von 10% FKS gewonnen als unter dem Zusatz von 3% AS.

Tabelle 6: Faktoren, um die sich die Zellzahlen in der Primärkultur unterscheiden

	PK	1 % AS	3 % AS	10 % AS	10 % FKS
1 % AS	KT 3		2,0	5,0	2,8
	KT 6		2,0	3,8	2,5
	KT 9		3,6	6,2	4,6
3 % AS	KT 3			2,5	1,4
	KT 6			1,9	1,3
	KT 9			1,7	1,3
10 % AS	KT 3				0,6
	KT 6				0,7
	KT 9				0,7

Die Tabelle zeigt den Unterschied bezüglich der mittleren Zellzahl pro GF (12 GF pro VT) zwischen den verschiedenen Kulturbedingungen an den KT 3, 6 und 9 in der Primärkultur. Ein hoher Faktor bedeutet, dass sich die mittleren Zellzahlen deutlich voneinander unterscheiden.

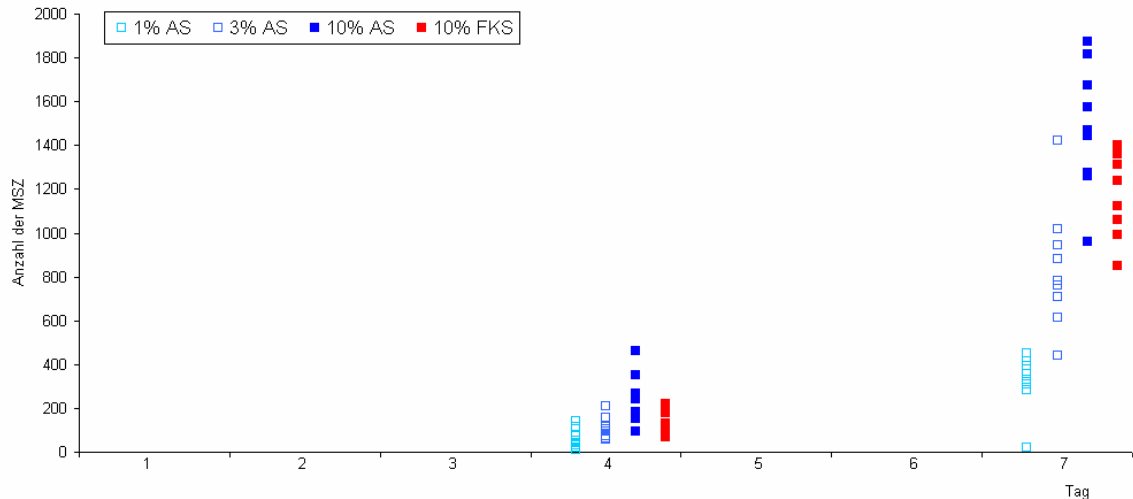
Als Trend zeigt sich, dass sich die Faktoren zwischen 1% AS und allen anderen getesteten Bedingungen im Verlauf erst reduzieren und dann über den Ausgangswert ansteigen, d.h. unter dem Zusatz von 1% AS ein langsames Wachstum mit längerer Verdopplungszeit zu verzeichnen ist. Ein Vergleich innerhalb der anderen getesteten Serumzusätze zeigt, dass sich die Faktoren im Verlauf stetig reduzieren, bzw. erst reduzieren und dann stagnieren, d.h. die MSZ haben ähnliche Verdopplungszeiten. Ab einem gewissen Konfluenzgrad könnte hier der sogenannte „Deckeneffekt“ zum Tragen kommen.

In der Gesamtheit wird dabei deutlich, dass in der Primärkultur unter dem Zusatz von 10% AS sowohl in der Phase der Isolation als auch während der Expansion bei der Mehrzahl der Spender (bei 7 von 9 Spendern) die höchste Zahl an MSZ zu generieren war. Es lässt sich keine klare Aussage darüber treffen, welchen Platz 10% FKS und 3% AS in der weiteren Rangfolge einnehmen, jedoch zeichnet sich tendenziell 10% FKS > 3% AS ab. Der Zusatz von 1% AS scheint sowohl für die Isolation als auch für die Expansion innerhalb des gleichen Zeitraumes am wenigsten geeignet zu sein.

### 4.3.3. Expansion in Passage 1 (24-Loch-Platte)

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Zellzahlbestimmungen an den verschiedenen Tagen in P 1 dargestellt (Abb. 7 bis 9). Sie geben Aufschluss darüber, inwieweit eine Expansion über PK hinaus unter dem Zusatz von AS bei niedriger Aussiedlungsdichte gelingt.

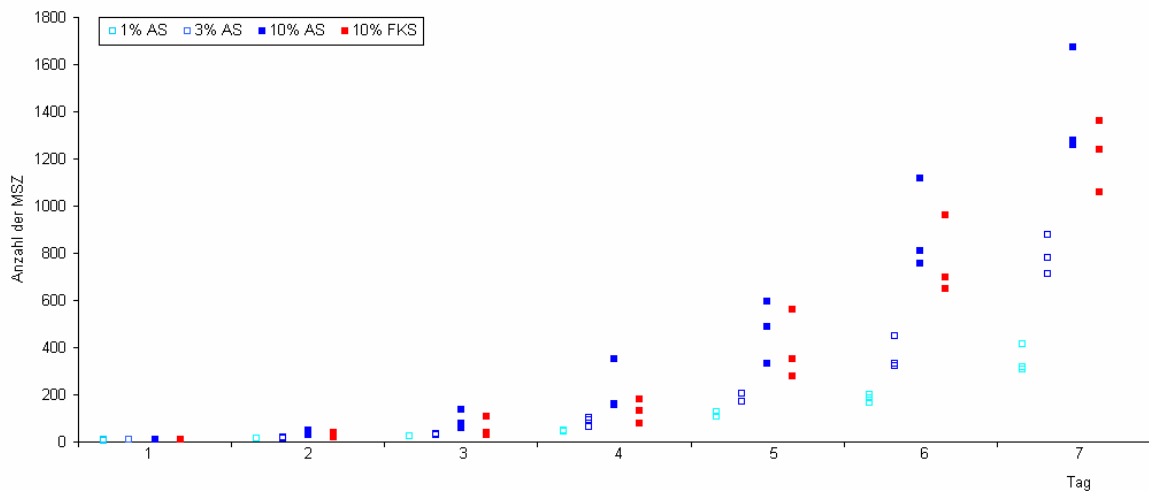
Abb. 7: Isolation und Expansion der MSZ in Passage 1



Grafische Darstellung der medianen Zellzahlen der MSZ in Passage 1 für alle Spender.

Den Tagen der Passage 1 (x-Achse) wird die Zellzahl (y-Achse) gegenübergestellt. Die in unterschiedlichen Farben positionierten Quadrate zeigen die Mediane der 9 Spender an, die aus 12 GF pro VT berechnet wurden.

Abb. 8: Isolation und Expansion der MSZ in Passage 1

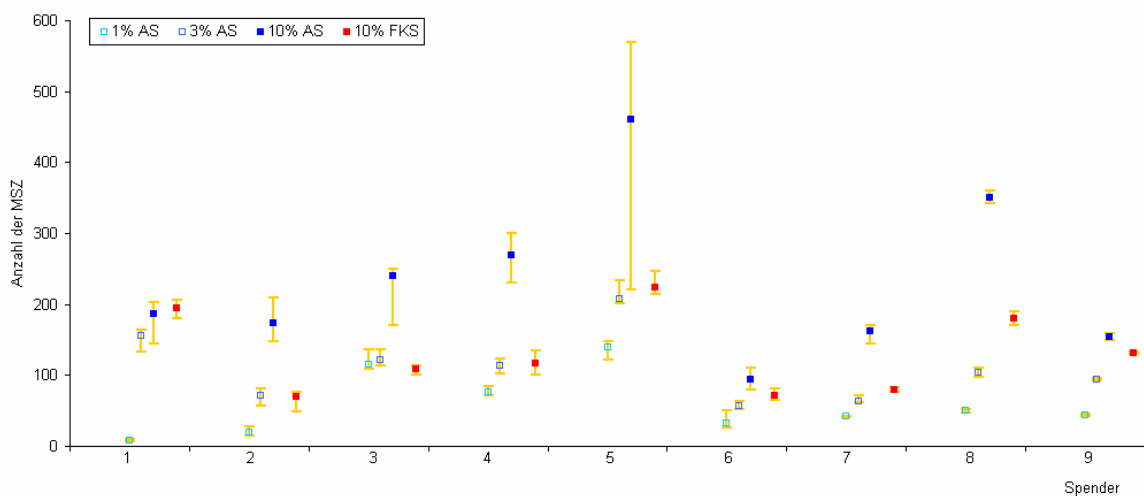


Grafische Darstellung der medianen Zellzahlen der MSZ für die Spender 7, 8 und 9 an allen KT in Passage 1. Den Tagen der Passage 1 (x-Achse) wird Zellzahl (y-Achse) gegenübergestellt. Die in unterschiedlichen

Farben positionierten Quadrate zeigen die Mediane der 3 Spender an, die aus 12 GF pro VT berechnet wurden.

Auch in P1 war bei allen Zellkulturen ein exponentieller Wachstumsverlauf ohne deutliche lag-Pase zu beobachten. Bei gleicher ausgesiedelter Zellzahl (ca. 20 Zellen / cm<sup>2</sup>) zeigten sich innerhalb von 7 Tagen deutliche Unterschiede bezüglich der mittleren Zellzahlen (siehe Tabelle 7 und 8). Ein deutlicheres Auseinanderweichen war ab KT 4 zu beobachten.

Abb. 9 a: Expansion der MSZ am Tag 4 in Passage 1



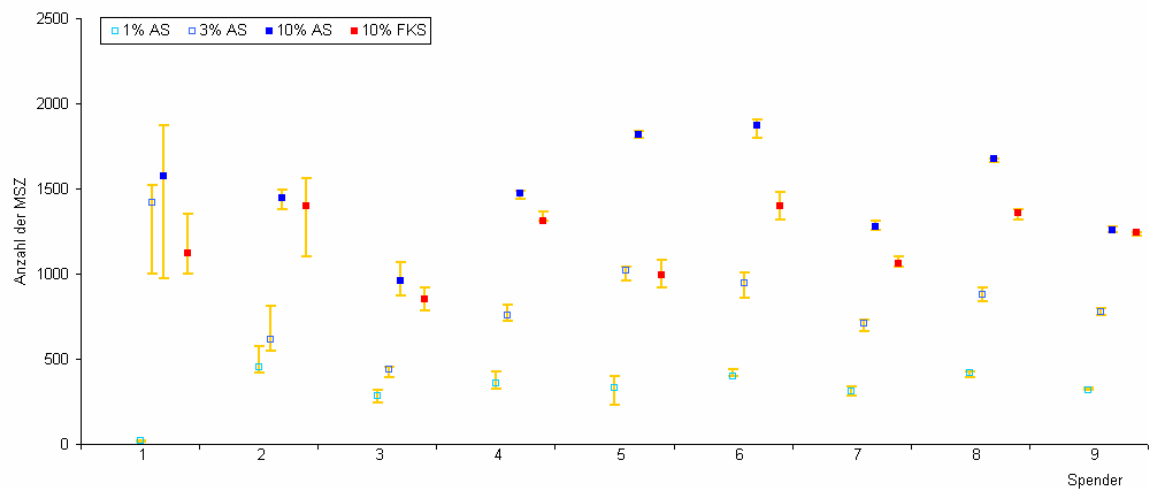
Grafische Darstellung der medianen Zellzahlen der MSZ für alle Spender in Passage 1: a) an KT 4 und b) an KT 7. Den Spendern (x-Achse) wird die Zellzahl (y-Achse) gegenübergestellt. Die in unterschiedlichen Farben positionierten Quadrate zeigen die Mediane der jeweiligen Spender, die aus 12 GF pro VT berechnet wurden. Die Federbalken zeigen die 95% Konfidenzintervalle.

Am KT 4 in P1 wurden unter dem Zusatz von 10% AS bei 8 von 9 Spendern im Median mehr Zellen expandiert (bei 6 Spendern signifikant) als unter dem Zusatz von 10% FKS. Lediglich bei einem Spender (Spender 1) zeigte sich eine ähnlich gute Expansion.

Unter dem Zusatz von 10% FKS wurden bei 6 von 9 Spendern (bei 4 Spendern signifikant) mehr MSZ, bei 2 Spendern annähernd gleich viele und bei 1 Spender im Median weniger MSZ (nicht signifikant) isoliert als unter dem Zusatz von 3% AS. Die Zellzahlen der Kulturen unter 3% AS lagen bei allen Spendern (bei 7 Spendern signifikant) unter denen mit dem Zusatz von 10% AS.

Die wenigsten MSZ ließen sich mit Ausnahme von Spender 3 unter dem Zusatz von 1% AS gewinnen.

Abb. 9 b: Expansion der MSZ am KT 7 in Passage 1



Am KT 7 in P1 wurden unter dem Zusatz von 10% AS bei allen 9 Spendern im Median mehr Zellen expandiert (bei 6 Spendern signifikant) als unter dem Zusatz von 10% FKS. Unter dem Zusatz von 10% FKS wurden im Median bei 7 von 9 Spendern (alle signifikant) mehr MSZ, und bei 1 Spender annähernd gleiche viele MSZ (nicht signifikant) und bei 1 Spender weniger MSZ (nicht signifikant) expandiert als unter dem Zusatz von 3% AS.

Die Zellzahlen der Kulturen unter 3% AS lagen bei allen Spendern (bei 8 Spendern signifikant) unter denen mit dem Zusatz von 10% AS.

Es ließen sich bei allen Spendern unter dem Zusatz von 1% AS die wenigsten Zellen expandieren.

Das bedeutet für die Expansion in Passage 1, dass unter dem Zusatz von 10% AS bei fast allen Spendern (an KT 7 bei allen Spendern) die höchste Zellzahl generiert werden konnte.

Weiterhin zeichnete sich hier der Trend von PK ab, dass innerhalb der gleichen Kultivierungszeit unter dem Zusatz von 10% FKS bei der Mehrzahl der Spender mehr MSZ expandiert wurden als unter dem Zusatz von 3% AS.

Auch in P1 wurde deutlich, dass der Zusatz von 1% AS innerhalb desselben Zeitraumes für die Expansion von MSZ am wenigsten geeignet zu sein scheint.

Tabelle 7: Mittlere Zahl der MSZ in Passage 1

Serum-Zusatz	Spender	KT 1	KT 2	KT 3	KT 4	KT 5	KT 6	KT 7
1% AS	1*				0,66			1,64
	2				1,76			41,88
	3				9,93			23,22
	4				6,43			31,28
	5				11,19			26,64
	6				3,76			34,41
	7	0,54	1,07	1,94	3,46	10,76	15,88	25,85
	8	0,72	1,12	2,06	4,19	8,93	16,39	33,96
	9	0,77	1,25	1,93	3,62	10,35	13,93	26,71
	Insgesamt	<b>0,68</b>	<b>1,15</b>	<b>1,97</b>	<b>5,54</b>	<b>10,01</b>	<b>15,40</b>	<b>30,49</b>
3% AS	1				13,18			108,22
	2				5,56			56,25
	3				10,34			35,78
	4				9,38			64,00
	5				17,64			83,22
	6				4,96			78,98
	7	0,71	1,33	2,20	5,42	14,28	28,61	58,56
	8	0,85	1,58	2,52	8,54	14,56	36,94	73,56
	9	0,91	1,82	2,77	7,85	17,13	26,67	65,11
	Insgesamt	<b>0,82</b>	<b>1,58</b>	<b>2,49</b>	<b>9,21</b>	<b>15,32</b>	<b>30,74</b>	<b>69,30</b>
10% AS	1				15,43			125,42
	2				14,68			117,87
	3				18,98			80,17
	4				22,28			122,58
	5				35,61			152,10
	6				8,48			154,70
	7	0,88	2,33	5,10	13,15	39,90	67,30	106,80
	8	0,84	4,03	11,74	29,10	49,10	92,30	138,72
	9	1,00	2,64	6,43	12,79	27,85	63,20	104,90
	Insgesamt	<b>0,91</b>	<b>3,00</b>	<b>7,76</b>	<b>18,94</b>	<b>38,95</b>	<b>74,27</b>	<b>122,58</b>
10% FKS	1				15,68			97,22
	2				5,17			110,56
	3				9,02			69,98
	4				9,84			111,15
	5				19,31			83,00
	6				6,17			118,56
	7	0,81	1,56	2,48	6,65	32,13	54,56	89,00
	8	0,84	3,29	8,64	14,78	47,67	81,00	112,22
	9	0,82	1,88	3,33	10,93	23,11	58,56	102,67
	Insgesamt	<b>0,82</b>	<b>2,25</b>	<b>4,82</b>	<b>10,84</b>	<b>34,30</b>	<b>64,70</b>	<b>99,37</b>

Die Tabelle zeigt den Zusammenhang zwischen dem Tag in P1 und der mittleren Zellzahl pro GF, aus den Mittelwerten über 12 GF pro VT jeder getesteten Serumkonzentration eines jeden Spenders berechnet. Dabei ist n=3 an den KT 1, 2, 3, 5 und 6 und n=9 an den KT 4 und 7. Die gemittelte Zellzahl aller Spender einer jeden Serumkonzentration an jedem Tag der PK ist unter „Insgesamt“ hinterlegt. Eine große Schwankung der Werte innerhalb einer Bedingung zeigt eine hohe interindividuelle Variabilität.

\* Auf Grund der geringen Zellzahl wurde in P1 bei 1% AS mit 100% neu ausgesiedelt.

Ähnlich wie in PK zeigte sich auch in P1 zwischen den Spendern unter allen getesteten Bedingungen eine deutliche Variabilität bezüglich der Zellzahl. So schwankten die Werte an KT 4 bei 10% AS zwischen 8,5 und 35,6 und lagen im Mittel bei 18,9. Bei 3% AS lagen sie zwischen 5,4 und 17,6 und im Mittel bei 9,2. Bei 1% AS lagen sie zwischen 1,7 und 11,2 und im Mittel bei 5,5 und bei 10% FKS zwischen 5,2 und 19,3 und im Mittel bei 10,8. Ein Vergleich der Mittelwerte zwischen den einzelnen Spendern zeigt wie bereits in PK, dass an allen KT und bei allen Spendern unter dem Zusatz von 3% AS höhere mittlere Zellzahlen erreicht wurden als unter dem Zusatz von 1% AS und niedrigere mittlere Zellzahlen als unter dem Zusatz von 10% AS. An KT 4 wurden bei 8 von 9 und an KT 7 bei allen Spendern unter dem Zusatz von 10% AS mehr MSZ gewonnen als unter dem Zusatz von 10% FKS. An KT 4 und 7 wurden bei 7 von 9 Spendern mehr MSZ unter dem Zusatz von 10% FKS gewonnen als unter dem Zusatz von 3% AS.

Tabelle 8: Faktoren, um die sich die Zellzahlen in Passage 1 unterscheiden

	P1	1 % AS	3 % AS	10 % AS	10 % FKS
1 % AS	KT 4		1,7	3,4	2,0
	KT 7		2,7	4,0	3,3
3 % AS	KT 4			2,1	1,2
	KT 7			1,8	1,4
10 % AS	KT 4				0,6
	KT 7				0,8

Die Tabelle zeigt den Unterschied bezüglich der mittleren Zellzahl pro GF (12GF pro VT) zwischen den verschiedenen Kulturbedingungen an den KT 4 und 7 in P1. Ein hoher Faktor bedeutet, dass sich die mittleren Zellzahlen deutlich voneinander unterscheiden.

Als Trend zeigt sich, dass die Faktoren zwischen 1% AS und allen anderen getesteten Bedingungen im Verlauf deutlich über den Ausgangswert ansteigen. Ein Vergleich innerhalb der anderen getesteten Serumzusätze zeigt, daß sich die Faktoren im Verlauf reduzieren. Das spricht einerseits für unterschiedliche Verdopplungszeiten, wobei die Zellen unter dem Zusatz von 1% AS ein langsames Wachstum zeigen als alle anderen getesteten Bedingungen. Andererseits kann auch hier der Deckeneffekt dazu beitragen

In der Gesamtheit wird deutlich, dass unter dem Zusatz von 10% AS an allen Tagen von P1 die höchsten mittleren Zellzahlen erreicht wurden. Mit dem Zusatz von 10% FKS ließen sich bei einigen Spendern nahezu genauso viele Zellen generieren wie unter dem Zusatz von 10% AS. Unter dem Zusatz von 3% AS ließen sich deutlich weniger Zellen gewinnen als unter 10% AS bzw. 10% FKS. Die Kulturen unter dem Zusatz von 1% AS zeigten an allen Tagen in P1 die niedrigste mittlere Zellzahl.

Die Beobachtungen bezüglich der Qualität der Serumzusätze im Hinblick auf die Isolation und Expansion von MSZ lassen sich in P2 fortsetzen. Auch in dieser Passage wurde bis auf wenige Ausnahmen unter dem Zusatz von 10% AS die höchste Zellzahl generiert (siehe Abb. 14 a bis d im Anhang).

Weiterhin zeigte sich in Passage 2, dass der Zusatz von Dexamethason und Ascorbinsäure bei einigen Spendern initial einen positiven Effekt auf die Proliferation der MSZ hatte.

#### 4.3.4. Isolation und Expansion in der Zellkulturflasche (PK bis P2)

Für die Bestimmung der Oberflächenmarker war es nötig, eine hohe Zellzahl zu generieren. Dafür wurden 10 Mio. MNZ von den Spendern 7 und 9 unter dem Zusatz von 10% AS und 10% FKS (nur Spender 7) in 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen ausgesiedelt und unter sonst gleichen Bedingungen kultiviert.

Unter dem Zusatz von 10% AS wurden in P2 an KT 9 bei Spender 7 11,2 Mio. MSZ und bei Spender 9 11,7 Mio. MSZ in der Naubauer-Kammer ausgezählt. Unter dem Zusatz von 10% FKS lag in P2 an KT 9 bei Spender 7 die Zellzahl bei 6,7 Mio. MSZ.

Mit nur 1 ml KM war es so unter dem Zusatz von 10% AS, gewonnen aus 65 ml venösem Vollblut, möglich, 11,5 Mio. MSZ innerhalb von 25 Tagen (über 2 Passagen) zu gewinnen. Unter dem Zusatz von 10% FKS und sonst gleichen Bedingungen (siehe Methoden) wurden in der gleichen Zeit hingegen nur 6,7 Mio. MSZ gewonnen.

#### 4.4. Osteogene Differenzierung

##### 4.4.1. Zellmorphie

Unter der Zugabe der osteogenen Induktionsmedien ließen sich in P2 morphologische Veränderungen der MSZ beobachten. Die Zellen wurden ab KT 6, d.h. nach der 2. Gabe von Dexamethason und Ascorbinsäure, flächiger und die Ausläufer kürzer. Dies gab dem Großteil der Zellen ein kuboides Aussehen. Dieser Gestaltwandel zeigte sich bei den MSZ unter Zusatz von 10% AS und 10% FKS deutlicher als bei den MSZ unter Zusatz von 1% und 3% AS (siehe Abb. 17 a-d im Anhang).

Ab dem KT 11, d.h. 2 Tage nach der 1. Gabe von  $\beta$ -Glycerophosphat, konnte bei den MSZ, die unter dem Zusatz von 10% AS und 10% FKS kultiviert wurden, die Bildung von extrazellulären Matrixvesikeln beobachtet werden (siehe Abb. 18 a-d im Anhang), die bei



10% AS an Zahl und Größe deutlich stärker ausgebildet waren. Diese Matrixmoleküle zeigten sich in sehr geringem Ausmaß auch bei 3% AS und waren bei 1% AS nicht beobachtbar.

Die Zellen, die in P2 ohne den Zusatz von osteogenen Induktionssubstanzen kultiviert wurden (Kontrollen), zeigten die gleiche Morphe wie in der entsprechenden PK und P1. Sie waren im Vergleich zu den osteogen stimulierten Zellen deutlich schlanker und zeigten längere Ausläufer.

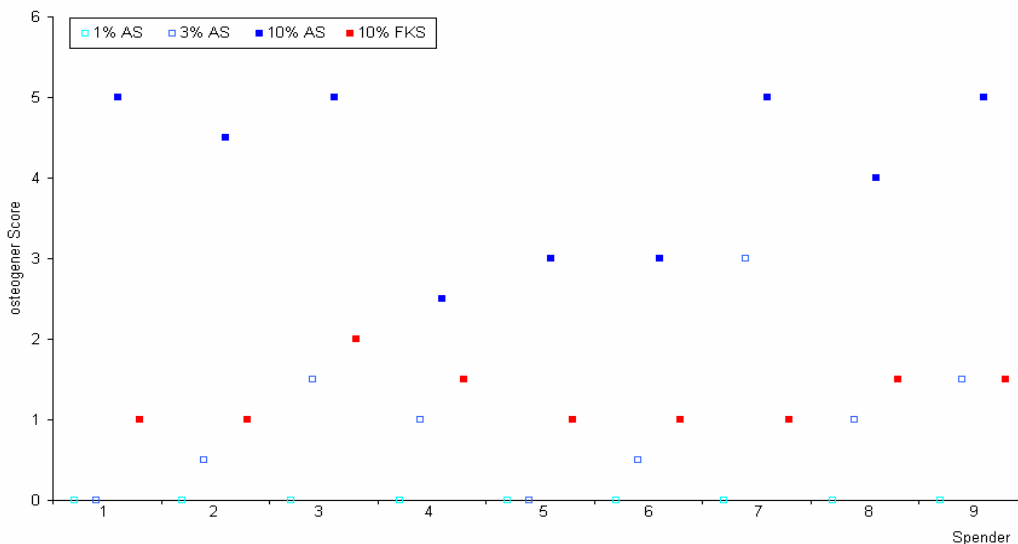
#### 4.4.2. von Kossa Assay

Zur Quantifizierung der osteogenen Differenzierung wurde der Nachweis extrazellulärer Knochenmatrix mittels des von Kossa Assays nach 21 Tagen der osteogenen Stimulation, modifiziert nach Jaiswal, genutzt.

Die Auswertung erfolgte makroskopisch und mikroskopisch (siehe Abb. 10 und 11) an semiquantitativen Skalen (siehe Abb. 19 und 20 im Anhang).

Im Folgenden werden die Ergebnisse der osteogenen Differenzierung an den Zellkulturen der Passage 2 dargestellt. Sie geben Aufschluss darüber, inwieweit eine osteogene Differenzierung unter dem Zusatz von AS gelingt.

Abb. 10: Grad der osteogenen Differenzierung (makroskopisch)



Grafische Darstellung des makroskopischen Grades der osteogenen Differenzierung in Passage 2. Den Spendern (x-Achse) wird der osteogene Score (y-Achse) gegenübergestellt. Ein hoher Score bedeutet eine starke makroskopische von Kossa Färbung und damit eine gute osteogene Differenzierung. Die in unterschiedlichen Farben positionierten Quadrate zeigen die medianen Scores auf der makroskopischen von Kossa Skala der jeweiligen Spender, die aus 12 GF pro VT (bei 4 VT) berechnet wurden.

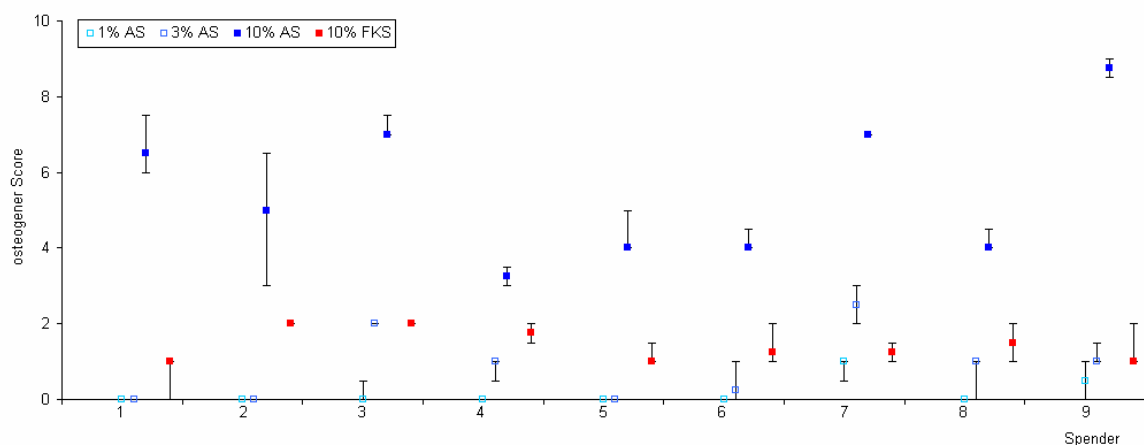
Bei allen Spendern war unter dem Zusatz von 10% AS die stärkste makroskopische Färbung zu sehen. Bei den 9 Spendern nahm der Median über den Vertiefungen und Gesichtsfeldern Werte zwischen 2,5 und 5 an.

Unter dem Zusatz von 10% FKS zeigt sich bei 7 von 9 Spendern eine stärkere makroskopische Anfärbung, bei 1 Spender eine gleich starke und bei 1 Spender eine geringere makroskopische von Kossa Färbung als unter dem Zusatz von 3% AS. Der mediane Skalenwert über den Vertiefungen und Gesichtsfeldern lag bei den 9 Spendern zwischen 1 und 2.

Unter dem Zusatz von 3% AS war nur bei 7 von 9 Spendern die von Kossa Färbung auch makroskopisch sichtbar. Der Median über den Vertiefungen und Gesichtsfeldern nahm Werte zwischen 0,5 und 3 an.

Unter dem Zusatz von 1% AS war der Assay makroskopisch bei keinem der 9 Spender positiv. Der mediane Skalenwert über den Vertiefungen und Gesichtsfeldern lag bei allen Spendern bei Null.

Abb. 11: Grad der osteogenen Differenzierung (mikroskopisch)



Grafische Darstellung des mikroskopischen Grades der osteogenen Differenzierung in Passage 2.

Den Spendern (x-Achse) wird der osteogene Score (y-Achse) gegenübergestellt. Ein hoher Score bedeutet eine starke mikroskopische von Kossa Färbung und damit eine gute osteogene Differenzierung. Die in unterschiedlichen Farben positionierten Quadrate zeigen die medianen Scores auf der mikroskopischen von Kossa Skala der jeweiligen Spender, die aus 12 GF pro VT (bei 4 VT) berechnet wurden. Die Federbalken zeigen die Streuungen an. Sind keine Federbalken angezeigt, wurde immer der gleiche Score erreicht.

Ersichtlich ist, dass bei allen Spendern unter dem Zusatz von 10% AS die stärkste mikroskopische Färbung zu sehen war (bei allen signifikant). Bei den 9 Spendern nimmt der Median über den Vertiefungen und Gesichtsfeldern Werte zwischen 3,3 und 8,8 an.

Unter dem Zusatz von 10% FKS zeigt sich bei 6 von 9 Spendern (bei 3 Spendern signifikant) eine stärkere mikroskopische Anfärbung, bei 2 von 9 Spendern eine gleich starke und bei 1 von 9 Spendern (nicht signifikant) eine geringere mikroskopische von

Kossa Färbung als unter dem Zusatz von 3% AS. Der mediane Skalenwert über den Vertiefungen und Gesichtsfeldern lag bei den verschiedenen Spendern zwischen 1 und 2. Unter dem Zusatz von 3% AS war nur bei 6 von 9 Spendern die von Kossa Färbung mikroskopisch sichtbar. Der Median über den Vertiefungen und Gesichtsfeldern lag hier zwischen 0 und 2.

Unter dem Zusatz von 1% AS war nur bei 3 der 9 Spender ein mikroskopischer Nachweis des von Kossa Assays beobachtbar. Der mediane Skalenwert über den Vertiefungen und Gesichtsfeldern lag bei den Spendern zwischen 0 und 1.

Das bedeutet zusammengefasst, dass Zellkulturen unter dem Zusatz von 1% AS sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch keine osteogene Differenzierung zeigten, d.h. sie waren von Kossa negativ. Zellkulturen unter 3% AS und 10% FKS waren in den meisten Fällen makroskopisch ebenfalls von Kossa negativ und zeigten mikroskopisch suboptimale Ergebnisse, d.h. sie waren schwach von Kossa positiv. Zellkulturen unter 10% AS zeigten sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch eine gute bis sehr gute osteogene Differenzierung, sie waren eindeutig von Kossa positiv.

Eine osteogene Differenzierung war an den Zellkulturen, die als Kontrolle dienten, weder makroskopisch noch mikroskopisch nachweisbar.

## 4.5. Adipogene Differenzierung

### 4.5.1. Zellmorphie

Die Bildung von intrazellulären, fetthaltigen Vakuolen war bei allen Zellkulturen sichtbar. Bereits einen Tag nach der ersten Zugabe der adipogenen Induktionsmedien an KT 8 in P2 war bei den Zellkulturen mit 3% AS und 10% AS sowie bei 10% FKS die Entstehung von Vakuolen beobachtbar, deren Zahl und Größe sehr verschieden war. Bei 3% AS bildeten sich zu dieser Zeit zunächst nur sehr wenige kleine Vakuolen. Bei 10% AS waren flächendeckend in ca. 80% – 90% der Zellen sehr kleine Vakuolen entstanden. Vereinzelt waren kleine Ansammlungen größerer Vakuolen beobachtbar. Unter der Zugabe von 10% FKS waren hingegen zu diesem frühen Zeitpunkt bereits viele große, zu Gruppen formierte Vakuolen erkennbar. Im Gegensatz zu 10% AS erfolgte die Vakuolenbildung aber nur in ca. 60% der Zellen. Die Zellkulturen mit 1% AS zeigten nach der ersten adipogenen Stimulation keine Vakuolenbildung.

Unter der weiteren Stimulation nahm bei den Kulturen mit 3% AS, 10% AS und 10% FKS die Zahl und auch die Größe der Vakuolen zu. Mit der zweiten adipogenen Stimulation

war auch bei den Kulturen mit 1% AS vereinzelt die Bildung von sehr kleinen, einzeln liegenden Vakuolen beobachtbar.

Mit der Entstehung der Vakuolen zeigte sich bei allen Zellkulturen, insbesondere bei denen mit dem Zusatz von 3%, 10% AS und 10% FKS, eine morphologische Veränderung der MSZ. Die Zellen wurden breiter und kürzer und zeigten teilweise eine nahezu kubische Gestalt, ähnlich den Zellen, die osteogen differenziert wurden (siehe Abb. 21 a-h im Anhang). Unter der adipogenen Stimulation wirkte die Intrazellulärsubstanz deutlich aufgelockert.

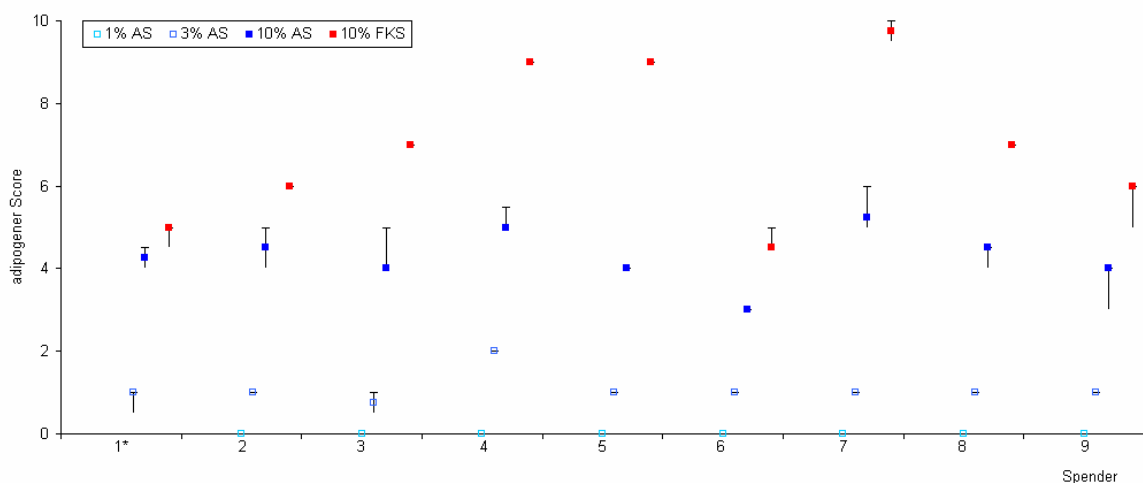
#### 4.5.2. Adipogener Assay

Zur Quantifizierung der adipogenen Differenzierung wurde der Nachweis intrazellulärer Fettvakuolen nach 2 Zyklen der adipogenen Differenzierung nach Pittenger mittels des adipogenen Assays mit einer Färbung nach Lillie (in: Böck, 1989) genutzt.

Die Auswertung der adipogenen Differenzierung erfolgte mikroskopisch (siehe Abb. 12) an einer semiquantitativen Skala (siehe Abb. 22 im Anhang).

Im Folgenden werden die Ergebnisse der adipogenen Differenzierung an den Zellkulturen der Passage 2 dargestellt. Sie geben Aufschluss darüber, inwieweit eine adipogene Differenzierung unter dem Zusatz von AS gelingt.

Abb. 12: Grad der adipogenen Differenzierung (mikroskopisch)



Grafische Darstellung des mikroskopischen Grades der adipogenen Differenzierung in Passage 2.

Den Spendern (x-Achse) wird der adipogene Score (y-Achse) gegenübergestellt. Ein hoher Score bedeutet eine starke mikroskopische Anfärbung im adipogenen Assay und damit eine gute adipogene Differenzierung. Die in unterschiedlichen Farben positionierten Quadrate zeigen die medianen Scores auf der mikroskopischen Skala des adipogenen Assays der jeweiligen Spender, die aus 12 GF pro VT (bei 4VT) berechnet wurden. Die Federbalken zeigen die Streuungen an. Sind keine Federbalken angezeigt, wurde immer der gleiche Score

erreicht. Das Sternchen bedeutet, dass für die Zellkultur unter dem Zusatz von 1% AS keine adipogene Differenzierung durchgeführt wurde.

Ersichtlich ist, dass bei allen Spendern (bei 8 Spendern signifikant) unter dem Zusatz von 10% FKS die stärkste mikroskopische Färbung zu sehen war. Der Median über den Vertiefungen und Gesichtsfeldern lag bei den verschiedenen Spendern zwischen 5 und 9,8.

Unter dem Zusatz von 10% AS zeigt sich bei allen Spendern im Vergleich zu 10% FKS eine geringere und im Vergleich zu 3% AS eine deutlich stärkere mikroskopische Anfärbung (alle signifikant). Der mediane Skalenwert über den Vertiefungen und Gesichtsfeldern lag bei den 9 Spendern bei 10% AS zwischen 3 und 5,5.

Unter dem Zusatz von 3% AS war bei allen Spendern eine mikroskopische Anfärbung der fetthaltigen Vakuolen zu beobachten. Der Median über den Vertiefungen und Gesichtsfeldern lag hier bei den verschiedenen Spendern zwischen 1 und 2.

Unter dem Zusatz von 1% AS war bei keinem der Spender ein deutlicher, mikroskopischer Nachweis der extrazellulären Fettvakuolen beobachtbar. Der mediane Skalenwert über den Vertiefungen und Gesichtsfeldern war bei allen Spendern Null.

#### 4.6. Oberflächenmarker

Die Bestimmung der Oberflächenmarker CD34, CD45, CD59, CD90, CD105, MHC-Klasse I und MHC-Klasse II erfolgte in P2. Verwendet wurden Zellkulturen mit dem Zusatz von 10% AS der Spender 7 und 9 und die Zellkultur mit dem Zusatz von 10% FKS des Spenders 7. Die mittels Flow-Zytometrie erhaltenen Ereignisse der Proben wurden in zwei Gates (R1 und R2) aufgetrennt. Das Gate R2 beinhaltet dabei den größten Teil der Ereignisse. Unter dem Zusatz von 10% AS lagen bei Spender 7 89 % der Ereignisse und bei Spender 9 93 % der Ereignisse in R2. Unter dem Zusatz von 10% FKS lagen bei Spender 7 94% der Ereignisse in R2. Eine weitergehende Analyse ergab keine Unterschiede in der Antigen-Expression zwischen R1 und R2, so dass alle aufgezeichneten Ereignisse die Grundlage für die Auswertung bildeten. Die getesteten MSZ der verschiedenen Serumbedingungen (AS versus FKS) hatten eine identische, mittlere Zellgröße.

Im Folgenden (siehe Abb. 13 a-c) werden die Ergebnisse der Bestimmung der Oberflächenmarker an den Zellkulturen (Kultivierung in der Kulturflasche) der Passage 2 dargestellt. Sie geben Aufschluß darüber, inwieweit das Spektrum der exprimierten Oberflächenmarker unter dem Zusatz von AS und FKS übereinstimmt.

Abb. 13 a: Bestimmung von Oberflächenmarkern für 10% FKS (Spender 7)

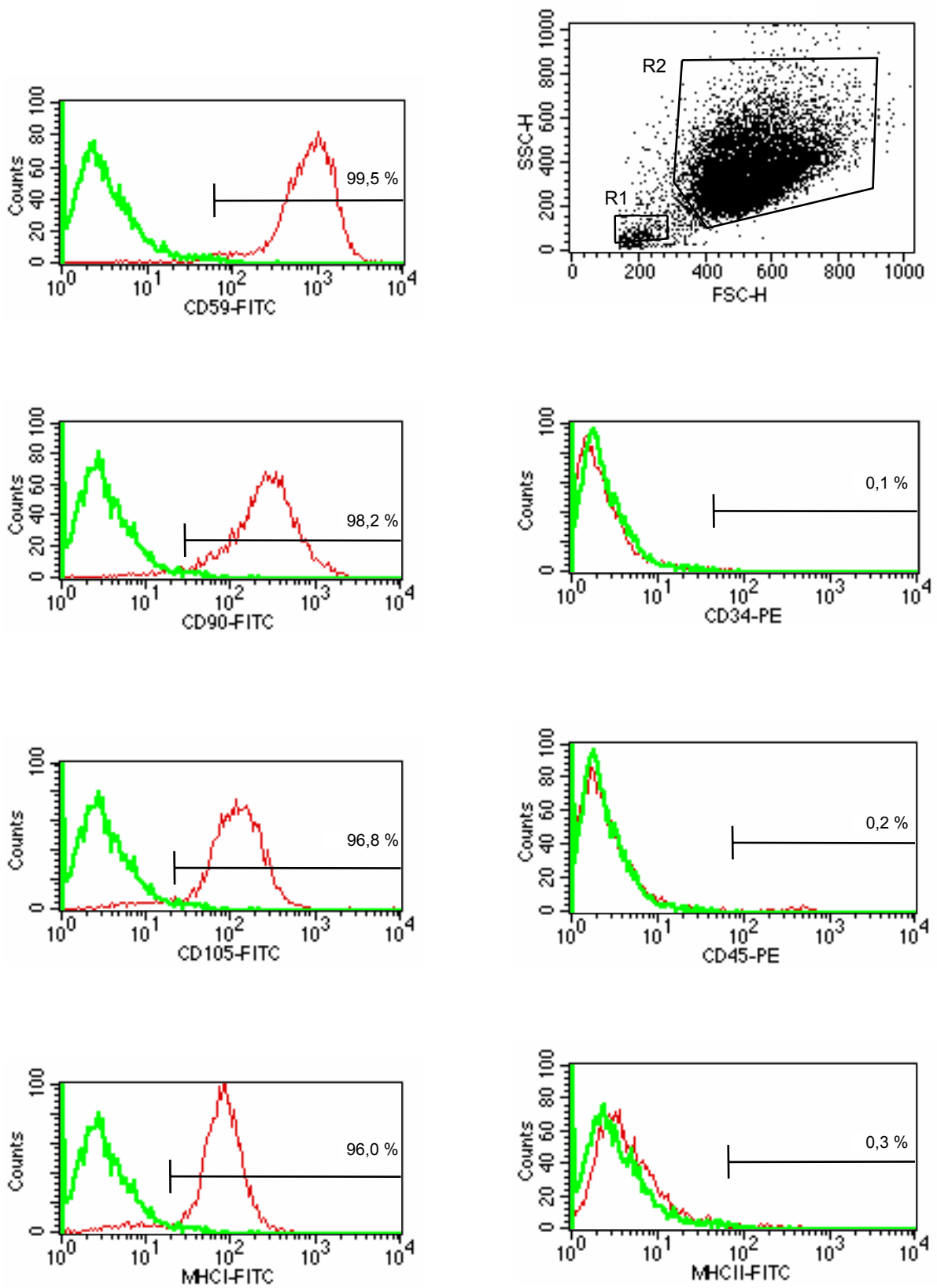


Abb. 13 b: Bestimmung von Oberflächenmarkern für 10% AS (Spender 7)

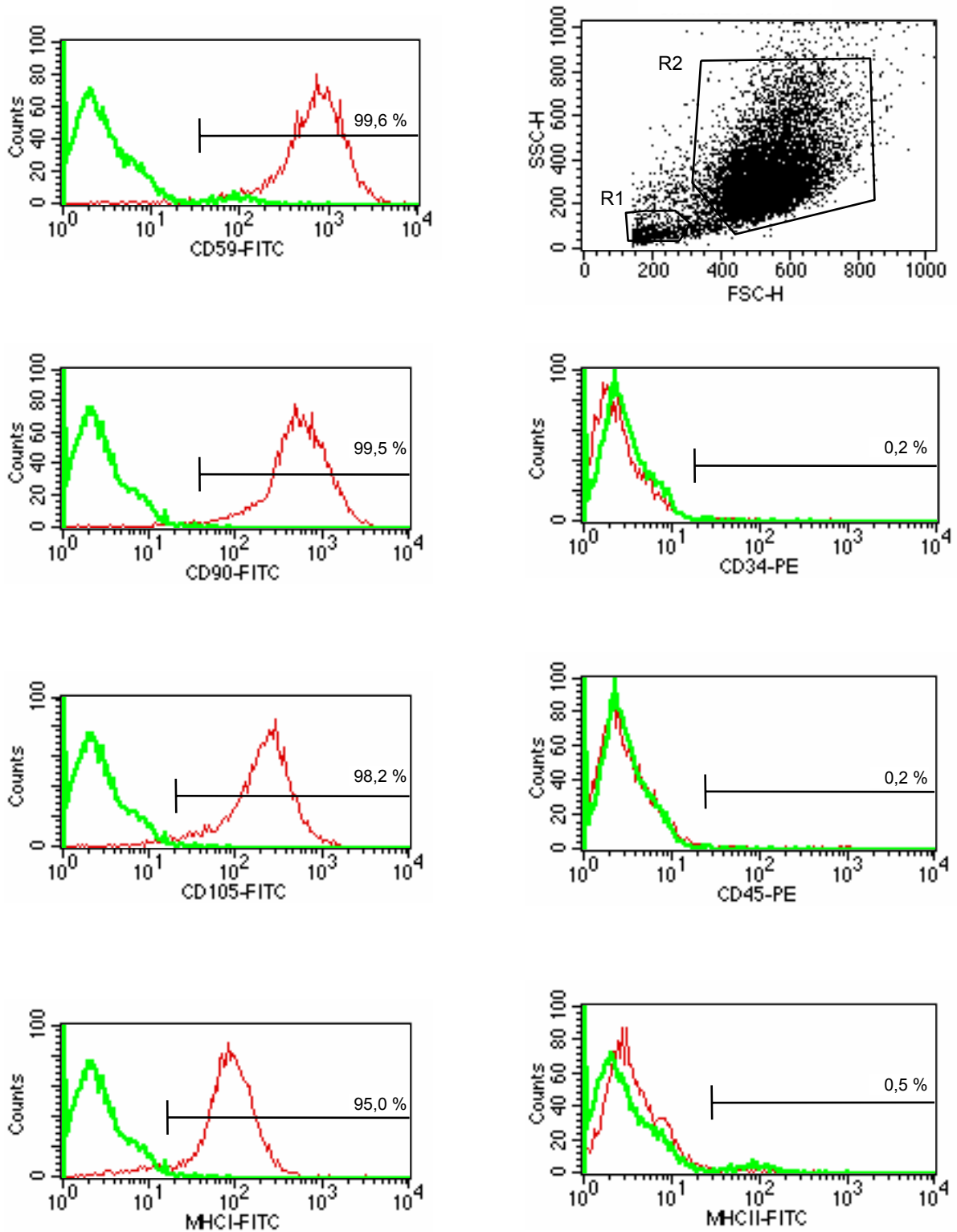
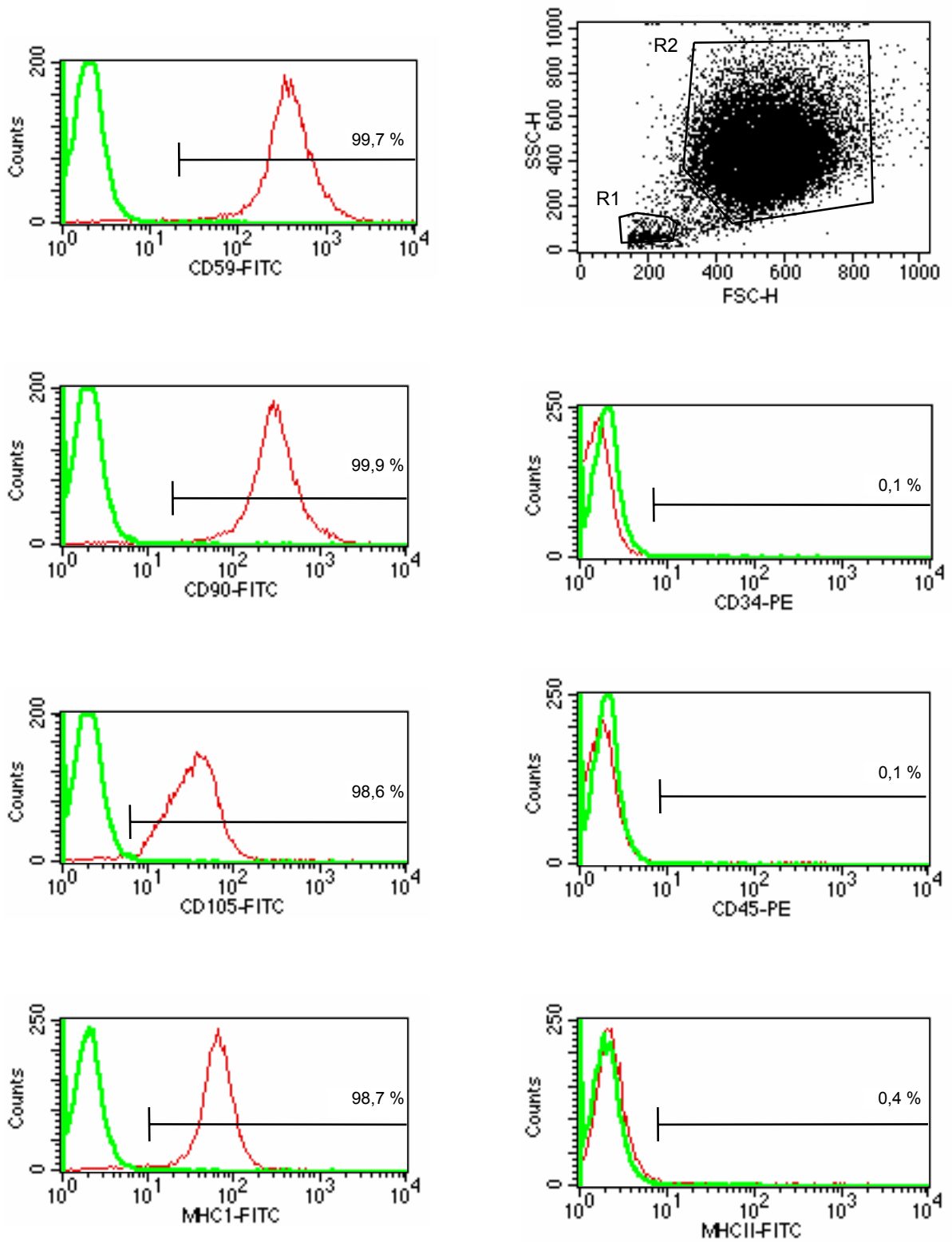


Abb. 13 c: Bestimmung von Oberflächenmarkern für 10% AS (Spender 9)



Grafische Darstellung der Expression von Oberflächenmarkern auf Zellkulturen der Passage 2 der Spender 7 und 9 unter dem Zusatz von 10% AS bzw. 10% FKS.

Die Verteilung der aufgezeichneten Ereignisse (Gate R1 und R2) ist jeweils in der rechten oberen Grafik dargestellt.



Bei allen anderen Grafiken wird die Expression der getesteten Antigene (mit Hilfe FITC- bzw. PE- markierter Antikörper) (x-Achse) der Zahl der gemessenen Ereignisse (y-Achse) gegenübergestellt. Dabei wird die unspezifische Isotyp-Kontrolle grün und die Abfrage des CD-Antigens rot abgebildet. Die mit einer waagerechten Linie versehenen Markierungen geben den Anteil (in Prozent) der Zellen an, die den getesteten Oberflächenmarker exprimieren.

Alle getesteten Zellkulturen reagierten mit graduellen Unterschieden positiv auf CD59, CD 90, CD105 und MHC- Klasse I und zeigten eine negative Reaktion auf CD34, CD45 und MHC- Klasse II. Bei Spender 7 zeigten sich zwischen dem Zusatz von AS und dem Zusatz von FKS nur geringfügige, quantitative Unterschiede. Auch unter den Bestimmungen der Spender 7 und 9 zeigte sich unter dem Zusatz von 10% AS kein deutlicher Unterschied im Spektrum der Expressierung.

## 5. Diskussion

Die relative „Leichtigkeit“, mit der MSZ aus dem Knochenmark in vitro kultiviert und expandiert werden können, und die Plastizität führten bei vielen Forschergruppen zu der Überlegung, diese Zellen auch in der Klinik zu verwenden. Diese Anwendungen umfassen unter anderem die Unterstützung der Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen (Koc et al., 2000), die Immunmodulation zur Verhinderung einer Spender-gegen-Wirt-Reaktion (Devine und Hoffman, 2000; Frassoni et al., 2002), die Reparatur geschädigter Organe (Bruder et al., 1998; Award et al., 1999; Strauer et al., 2002) und die Gentherapie (Chuah et al., 2000).

Die Expansion und Differenzierung von MSZ in Medium, dem 10% oder 20% fötales Kälberserum zugesetzt sind, ist heute eine etablierte Methode, um Zellen für das Tissue Engineering zu gewinnen (Haynesworth et al., 1992a; Prockop, 1997).

In Deutschland ist der klinische Einsatz mittels FKS gewonnener Zellen im Allgemeinen verboten. Nur in sehr speziellen Fällen kann eine Ausnahmegenehmigung beim Paul-Ehrlich-Institut eingeholt werden.

Deshalb ist die Entwicklung von Kulturmedien ohne tierische Proteine von erheblichem wissenschaftlichen, klinischen und wirtschaftlichen Interesse.

### Diskussion der Ergebnisse zur Gewinnung und Expansion von MSZ

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob es gelingt, aus dem Knochenmark isolierte humane MSZ kälberserumfrei, unter dem Zusatz von autologem Serum zu gewinnen und in ausreichender Menge zu expandieren. Verwendet wurde dafür das Knochenmarkaspirat der ersten Spritze und nicht hitzeinaktiviertes, autologes Serum, gewonnen aus peripherem Blut. Das Serum wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert, um einen kontinuierlichen und kritischen Abfall der Konzentration an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren zu verhindern. Es wurde dem Kulturmedium DMEM, stets frisch aufgetaut, für 3 bis 4 Tage zugesetzt, um möglichst konstante Bedingungen über den gesamten Kultivierungszeitraum zu gewährleisten. Um eine Vergleichbarkeit zu Zellkulturen mit etablierten Bedingungen (nach Caplan et al.) sicherzustellen, wurden gleichzeitig Zellen unter dem Zusatz von 10% FKS kultiviert. Das FKS wurde ebenfalls portioniert, bei -20°C gelagert und frisch aufgetaut hinzugefügt.

Um eine möglichst hohe Expansionsrate in P1 zu erzielen, wurden die MSZ mit einer sehr geringen Dichte ausgesiedelt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass unter dem Zusatz von 10% AS sowohl in der Phase der Isolation in der Primärkultur als auch in der Phase der Expansion in der Primärkultur und

in den Passagen 1 und 2 im Allgemeinen die meisten Zellen gewonnen und expandiert wurden.

Unter dem Zusatz von 3% AS ließen sich innerhalb desselben Zeitraumes sowohl in PK als auch in P1 deutlich weniger Zellen isolieren und expandieren als unter dem Zusatz von 10% AS. Ein Mehr an Wachstumsfaktoren und Nährstoffen begünstigt möglicherweise das gute und schnelle Wachstum unter dem Zusatz von 10% AS.

Während der Kultivierung war sowohl in PK als auch in P1 zwischen den getesteten Bedingungen ein sogenannter „Deckeneffekt“ (relativer Platzmangel) mit Annähern der Zellzahlen zum Ende der jeweiligen Passage zu beobachten (siehe Tabelle 6 und 8, Kapitel 4). D.h., die Zellen unter dem Zusatz von 10% AS erreichen bereits ab KT 7 in PK einen Konfluenzgrad von 30 – 40%, sodass die Zellen zueinander Kontakt erhalten, und auf Grund des relativen Platzmangels eventuell ihre Teilungsrate reduzieren. Die Zellen unter dem Zusatz von 3% AS und 10% FKS hingegen teilen sich weiterhin mit einer hohen Teilungsrate, da hier zu diesem Zeitpunkt ein geringerer Konfluenzgrad besteht. Mit dem möglichen Auftreten dieses Effektes sind deutliche Unterschiede bezüglich der Zellzahlen nur bis zu einem gewissen Konfluenzgrad sichtbar. So wurden am Ende einer Passage nicht mehr so deutlich voneinander abweichende Zellzahlen ermittelt, insbesondere bei den Zellkulturen unter dem Zusatz von 3% AS, 10% AS und 10% FKS.

Innerhalb derselben Kultivierungszeit lagen die Zahlen der generierten Zellen unter dem Zusatz von 1% AS sowohl in PK als auch in P1 und P2 unter den Werten der anderen getesteten Bedingungen. Diese Beobachtungen bei 1% AS könnten auf niedrigere Konzentrationen an wichtigen Inhaltsstoffen des Serums, wie beispielsweise den Wachstumsfaktoren zurückzuführen sein. So zeigten die Zellen als Zeichen des relativen Mangels eine etwas schlechtere Proliferation, verbunden mit einer nur langsam zunehmenden Zellzahl und einem innerhalb dieser Zeit in den meisten Fällen nur teilweise konfluenten Monolayer.

Die MSZ wurden sowohl auf 24-Loch-Platten als auch in T25- und T75-Kulturflaschen, deren Oberfläche für die Zellkultur vorbehandelt war, kultiviert. Ein Unterschied bezüglich des Wachstumsverhaltens und der Zellmorphie war dabei nicht zu beobachten. Es fiel lediglich auf, dass sich die adhärennten MSZ unter der Gabe von Trypsin beim Zusatz von AS schneller von der Oberfläche ablösten als beim Zusatz von FKS. Möglicherweise bilden MSZ unter dem Zusatz von AS andere, für die Adhärenz verantwortliche Oberflächenproteine aus als unter dem Zusatz von FKS. Vielleicht führt aber auch das Einwirken von AS auf die Oberflächenbeschichtung des Plastikmaterials zu dem abweichenden Verhalten beim Trypsinieren. Das schnellere Ablösen der MSZ hatte keine Auswirkungen auf das weitere Wachstum.

Ziel dieser Arbeit war es, das Wachstumsverhalten der Zellen unter den verschiedenen Bedingungen genauer zu verfolgen. Weil die Gesamtzahl der MSZ pro Serumbedingung trotz Poolens aller VT einer Bedingung klein war und die Bestimmung der Zellzahl in der Neubauerkammer ungenau ausgefallen wäre, wurde die Zellzahl in der Regel alle drei Tage manuell am Mikroskop ausgezählt. Dies ist aber nur bis zu einem gewissen Konfluenzgrad möglich, sodass die Zellzahl bei höherer Dichte geschätzt wurde. Die Übereinstimmung der geschätzten Zellzahl (an Hand des Konfluenzgrades) mit der tatsächlich vorliegenden Zellzahl (Bestimmung durch die Neubauerkammer, Auszählen am Mikroskop) wurde in Pilotversuchen und während der Versuche dieser Arbeit wiederholt überprüft. Dennoch zeigte sich, dass in 15 VT mit einer Gesamtfläche von 25,5 cm<sup>2</sup> trotz gleichen Wachstumsverhaltens und gleicher Morphologie weniger Zellen zu generieren waren als in einer 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche. Die verschiedenen Plastikmaterialien von Kulturplatte und Kulturflasche (verschiedene Hersteller) könnten zu unterschiedlicher Adhärenz und differierendem Wachstum geführt haben. In den Vertiefungen zeigten sich zudem unterschiedlich gute Wachstumsbedingungen. So war vor allem im Zentrum einer jeden Vertiefung ein gutes Wachstum mit hohem Konfluenzgrad zu beobachten und in den Randgebieten ein schlechteres Wachstum mit meist geringerem Konfluenzgrad. Auf Grund dieser Verteilung läßt sich am ehesten erklären, warum bei insgesamt gleicher Kulturfläche voneinander abweichende Zellzahlen erreicht wurden.

Bei allen Spendern zeigte sich für alle getesteten Serumbedingungen eine unterschiedlich stark ausgeprägte, intraindividuelle Variabilität. Bezüglich der zu generierenden Zellzahl waren zwischen den Spendern mitunter deutliche Schwankungen (interindividuelle Variabilität) zu beobachten. Diese Variabilitäten können sowohl zellspezifischer als auch serumspezifischer Natur sein. Für das Vorliegen zellspezifischer Faktoren spricht die interindividuelle Variabilität bei dem Zusatz von FKS, da bei allen Spendern das gleiche FKS zugesetzt wurde. Um die Ursache der Variabilitäten zu klären, müssten humane MSZ unter der Zugabe von verschiedenen allogenen Seren expandiert werden, um so geeignete Seren herauszufiltern. Mit Hilfe standardisierter, humaner Serumzusätze ließen sich dann eventuell auch besonders gut geeignete MSZ-Spender screenen.

#### Diskussion der Ergebnisse zur osteogenen Differenzierung

Unter dem Zusatz der osteogenen Induktionssubstanzen zum Kulturmedium der Zellkulturen der 2. Passage wurde eine Veränderung der Zellmorphologie beobachtet. Aus den vormals langgestreckten, schlanken Zellen wurden binnen weniger Tage deutlich kürzere, flächigere Zellen, die teilweise eine kuboide Gestalt annahmen. Diese morphologische Transformation beobachteten auch Cheng et al. an Stromazellen des menschlichen

Knochenmarkes, die sie unter dem Einfluß von Dexamethason untersuchten (Cheng et al., 1994). Neben dem Gestaltwandel zeigte sich ab dem KT 11, also 2 Tage nach der ersten Gabe von  $\beta$ -Glycerophosphat, die Bildung erster extrazellulärer Matrixmoleküle, welche im weiteren Verlauf zunahm. Die undifferenzierten Zellen scheinen erst mit der Zugabe von  $\beta$ -Glycerophosphat fähig zu sein, mineralisierte Matrix zu formen. Diese scheinbare Abhängigkeit wurde auch in anderen Studien an humanen BMSC beobachtet (Cheng et al., 1994; Rickard et al., 1996).

Das Ausmaß der osteogenen Differenzierung wurde gemessen an der Stärke der Anfärbung extrazellulärer Matrixmoleküle beim von Kossa Assay, der im Allgemeinen ein akzeptierter Surrogatmarker für in vitro- Kulturen ist.

Mit der niedrigen Aussiedlungsdichte (Konfluenzgrad von ca. 1%) sollte verhindert werden, dass sich die Zellen bei zu hoher Zelldichte von der Oberfläche der VT lösen und zu Zellhaufen zusammenlagern (Beobachtungen in den Pilotversuchen). So war innerhalb der 21 Tage der Differenzierung initial ein gutes Wachstum möglich.

Bis auf die Zellkulturen mit 1% AS wiesen alle ein homogenes, annähernd konfluentes Monolayer auf. Die Konfluenz der Zellkultur scheint dabei aber keine Voraussetzung für die Bildung extrazellulärer Matrixvesikel zu sein, denn die Zellen unter 3% AS und 10% FKS zeigten trotz konfluenten Monolayer schlechtere Ergebnisse bei der osteogenen Differenzierung, als es unter 10% AS zu beobachten war. Sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch waren alle Zellkulturen, die mit 10% AS kultiviert wurden, stärker von Kossa positiv als unter den anderen Serumbedingungen (siehe Abb. 10 und 11, Kapitel 4). Das bedeutet, in diesen Zellkulturen war der größte Anteil osteogen differenzierter Zellen vorhanden, der zur Bildung von extrazellulärer Knochenmatrix befähigt ist. Die Zellkulturen unter dem Zusatz von 10% AS zeigten sowohl das beste Wachstum als auch die stärkste Anfärbung im von Kossa Assay, als Zeichen der Bildung extrazellulärer Matrixvesikel. Autologes Serum enthält demnach sowohl mitogene Wachstumsfaktoren als auch Differenzierungsfaktoren, deren Wirkung vermutlich dosisabhängig ist. Dies würde das unterschiedlich gute Zellwachstum und die unterschiedlich gute Differenzierbarkeit erklären. Das Wachstum, gemessen an der Zellzahl und die Differenzierbarkeit, wiederum gemessen an der Anfärbung extrazellulärer Matrixvesikel, zeigen im Allgemeinen beim Zusatz von AS folgende Rangfolge: 1% AS < 3% AS < 10% AS. Die Zellkulturen unter dem Zusatz von 10% FKS und 10% AS zeigen ein ähnliches Wachstum, die osteogene Differenzierung jedoch ist bei 10% AS besser.

Unerwartet war die Beobachtung, dass die Zellkulturen unter dem Zusatz von 10% FKS, welches zuvor auch hinsichtlich einer guten osteogenen Differenzierbarkeit selektioniert wurde, makroskopisch und mikroskopisch relativ schwach von Kossa positiv waren. Möglicherweise sind veränderte Kulturbedingungen zum Zeitpunkt der Selektionierung

und während der Versuchsreihe dieser Arbeit ursächlich. Im Rahmen der Versuche wurde mit einer niedrigen Zelldichte ausgesiedelt und so Wachstum ermöglicht und das  $\beta$ -Glycerophosphat in deutlich niedrigerer Konzentration (3 mM versus 10 mM) und erst ab KT 9 zugesetzt, im Unterschied zur Selektionierung vom FKS, wo es bereits ab KT 1 zugegeben wurde.

#### Diskussion der Ergebnisse zur adipogenen Differenzierung

Die adipogene Differenzierung ist eine Möglichkeit, das Vorhandensein der Multipotenz bei MSZ zu belegen (DiGirolamo et al., 1999)

Mit Ausnahme der Zellkulturen unter 1% AS war bei den anderen getesteten Serumbedingungen die adipogene Differenzierung nachweisbar, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß (siehe Abb. 12 im Anhang).

Unter dem Zusatz von 10% FKS war eine inhomogene Bildung (in 60% der Zellen) vieler, sehr großer Vakuolen zu beobachten. Im Vergleich dazu waren die Vakuolen unter dem Zusatz von 10% AS deutlich kleiner, jedoch homogener (in 80% - 90% der Zellen) verteilt. Das bedeutet möglicherweise, dass unter dem Zusatz von 10% AS, prozentual gesehen mehr Zellen über PK und P1 bis in P2 ihre Unreife behielten als unter dem Zusatz von FKS und damit gut adipogen differenzierbar waren. Möglicherweise enthält das selektionierte FKS mehr Lipide und adipogene Faktoren als autologes Serum, was die Bildung großer Vakuolen begünstigt.

Die schlechten Ergebnisse der unter 1% AS und 3% AS kultivierten Zellen bei der osteogenen und adipogenen Differenzierung lassen darauf schließen, dass ein Mangel an wichtigen Substanzen möglicherweise verbunden ist mit dem Verlust an Unreife und Differenzierbarkeit.

#### Diskussion der Ergebnisse zur Bestimmung der Oberflächenmarker

An Zellen der homogenen, konfluenten Monolayer der 2. Passage, kultiviert unter dem Zusatz von 10% FKS und 10% AS, wurden mittels Flow-Zytometrie verschiedene Oberflächenmarker bestimmt. Ausgewählt wurden Markerproteine, die den immunologischen Phänotyp von MSZ des Knochenmarkes (MSZ nach Caplan et al.) widerspiegeln, die unter dem Zusatz von 10% FKS kultiviert wurden (Haynesworth et al., 1992a; Barry et al., 1999; Pittenger et al., 1999; Wexler et al., 2003). Bislang fehlten Ergebnisse zur Bestimmung dieser oder anderer Markerproteine an Zellkulturen, die unter AS expandiert wurden.

Die Flow-Zytometrie zeigte, dass die Zellkulturen unter dem Zusatz von AS und FKS CD90, CD105 (Endoglin, SH-2) und MHC-I (HLA Klasse-I) in sehr ähnlichem Umfang

exprimierten, und dass CD34, CD45 und MHC-II (HLA Klasse-II) nicht nachgewiesen wurden (siehe Abb. 13 – 15, Kapitel 4).

MSZ exprimieren demzufolge kaum HLA-Antigene der Klasse II, welche sich auf Immunzellen befinden und dort der Kommunikation untereinander dienen. Wegen ihrer zentralen Bedeutung bei der Immunantwort werden sie auch als Ia-Antigen (Immunantwort-assoziiertes Antigen) bezeichnet. Das bedeutet, dass der Kontakt mit MSZ keine Proliferation von Lymphozyten und keine zellvermittelte Lympholyse cytotoxischer Lymphozyten hervorruft (Di Nicola et al., 2002). MSZ sind somit nicht immunogen und zeigen sogar immunsuppressive Eigenschaften (Bartholomew et al., 2002; Krampera et al., 2003; Le Blanc et al., 2003, 2004).

Diese Arbeit zeigt erstmals, dass es unter FKS-freien Kulturbedingungen unter dem Zusatz von AS gelingt, MSZ zu isolieren und zu expandieren, welche ähnliche Proliferationsraten, die gleichen morphologischen Eigenschaften und die gleiche Expression von Oberflächenmarkern zeigen wie MSZ, die unter standardisierten Bedingungen mit 10% FKS kultiviert werden.

#### Diskussion der Ergebnisse vor dem Hintergrund der internationalen wissenschaftlichen Literatur

Die Kultivierung adulter, humaner Stammzellen ist etabliert und standardisiert. Sowohl MSZ nach Caplan et al. als auch MSZ nach Prockop et al. zeigen unter dem Zusatz von 10% bzw. 20% FKS ein gutes Wachstum und eine gute Differenzierbarkeit. Der Zusatz von fötalem Kälberserum zum Kulturmedium ist jedoch für den klinischen Einsatz dieser Zellen in vielen Ländern verboten, so auch in Deutschland. Aus diesen Gründen gibt es das Bestreben, alternative Serumzusätze zu testen und zu etablieren.

Untersuchungen der letzten Jahre zeigen, dass es unter dem Zusatz von humanem Serum oder Plasma gelingt, verschiedene Zellen des Knochenmarkstromas zu expandieren und zu differenzieren.

Im Folgenden werden Arbeiten diskutiert, die das Verhalten von adulten Stammzellen des Knochenmarkes und des Knochens unter alternativem Serumzusatz im Vergleich zum fötalen Kälberserum untersuchten.

Shigeno und Ashton demonstrierten, dass Zellen, gewonnen aus trabekulärem Knochen und kultiviert unter dem Zusatz von AS eine signifikant größere Proliferationsrate zeigen als Zellkulturen, denen FKS zugesetzt wurde (Shigeno und Ashton, 1995). Um welchen Faktor sich die Proliferationsraten unterscheiden, kann der Studie allerdings nicht

entnommen werden. Des Weiteren ist unklar, welche Qualität das FKS hatte. Untersucht wurde Material von 20 Patienten im Alter von 5 bis 70 Jahren.

Diese Untersuchung wurde durchgeführt an Knochenzellen aus mehrfach gewaschenen (frei von hämatopoetischen Zellen des Knochenmarkes) Stücken des trabekulären Knochens, welche in  $\alpha$ -MEM unter Zusatz von 10% AS bzw. 10% FKS expandiert wurden. Die Auswertung dieser Studie erfolgte an KT 14 in PK.

Die vorliegende Arbeit untersuchte im Unterschied zu Shigeno und Ashton die Gewinnung und Expansion humaner, adulter MSZ aus dem Knochenmark des Beckenkammes gesunder Spender im Alter von 23 bis 40 Jahren. Sie zeigt, dass auch humane, adulte MSZ bis in P2 eine sehr gute Proliferation unter der Kultivierung mit 10% AS aufweisen.

Oreffo et al. untersuchten an humanen Fibroblasten des Knochenmarkes die Rolle von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (biologisch aktive Form des Vitamin  $\text{D}_3$ ) und Dexamethason in Hinblick auf die adipogene und osteogene Differenzierbarkeit unter der Kultivierung mit humanem AB-Serum (Oreffo et al., 1997). Gewonnen wurden die Fibroblasten aus trabekulären Knochen von 21 Spendern im Alter von 14 bis 88 Jahren und kultiviert in  $\alpha$ -MEM, dem 10% FKS bzw. 10% humanes AB -Serum sowie  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Dexamethason allein oder in Kombination zugesetzt wurden. Das von 12 verschiedenen Spendern stammende humane AB-Serum wurde vor der Verwendung gepoolt.

Wenn neben der Gabe von Dexamethason der Serumzusatz kontinuierlich (ohne den Wechsel der Serumart) erfolgte, zeigte sich unter humanem AB-Serum eine bessere adipogene Differenzierung als unter FKS. Wurde unter der Gabe von Dexamethason während der Kultivierung von FKS auf humanes AB-Serum gewechselt, zeigte sich eine bessere adipogene Differenzierung, gegenüber einem Wechsel von humanem AB-Serum auf FKS. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase, die als Maß der osteogenen Differenzierbarkeit bestimmt wurde, war signifikant höher bei allen Zellkulturen, die unter dem Zusatz von humanem AB-Serum kultiviert wurden, als bei den Zellkulturen unter FKS. Die Anwesenheit der osteogen wirkenden Substanzen  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Dexamethason spielte im Vergleich nur eine geringe Rolle, da sie unabhängig vom zugegebenen Serum aktivitätssteigernd wirkten.

Oreffo et al. schlussfolgerten aus ihrer Arbeit, dass in humanen Serum Faktoren enthalten sind, die besonders in Anwesenheit von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Dexamethason synergistisch bezüglich der adipogenen und osteogenen Differenzierbarkeit wirken und die im fötalen Kälberserum nicht vorhanden sind.

Die vorliegende Arbeit zeigt ähnliche Ergebnisse bei humanen, adulten MSZ. Auch ohne den kontinuierlichen Zusatz von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  war unter dem Zusatz von 3% und 10% AS eine osteogene Differenzierung (P2) möglich. Dabei zeigten die Zellkulturen unter dem Zusatz von 10% AS eine deutlich bessere osteogene Differenzierbarkeit als die



Zellkulturen unter Zusatz von 10% FKS. Unter Zusatz von FKS zeigte sich jedoch eine bessere adipogene Differenzierung als unter dem Zusatz von AS. Möglicherweise enthält humanes Serum mehr osteogene Wachstumsfaktoren und weniger Lipide und adipogene Faktoren als FKS.

Koller et al. untersuchten die Expansion hämatopoetischer Stammzellen des Knochenmarkes unter Zusatz von humanem autologem und allogenen Serum bzw. Plasma und unter Serumfreiheit, im Vergleich zum Zusatz tierischer Seren (Koller et al., 1998). Dem Kulturmedium Isocove's Modified Dulbeccos's Medium (IMDM) wurden 20% humanes Serum oder Plasma, 20% FKS oder 20% Pferdeserum bzw. 10% FKS und 10% Pferdeserum zugesetzt. Das Medium enthielt weiterhin Hydrokortison und diverse humane, rekombinante Wachstumsfaktoren, unter anderem Interleukin-3, Erythropoetin und GM-CSF (Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor). Die mittels Ficoll separierten Zellen des Knochenmarkaspirates wurden in CD34-positive und CD34-negative Zellen separiert. Die CD34-negativen Zellen dienten als akzessorische Zellen (Fütterzellen) und wurden in einem festgelegten Verhältnis mit CD34-positiven Zellen und anderen MNZ über 12 Tage kultiviert. Das Medium wurde jeweils nur zu 50% gewechselt. Die Untersuchungen erfolgten an Zellen der Primärkultur.

Koller et al. beobachteten, dass unter dem Zusatz von humanem Serum bzw. Plasma (autolog bzw. allogenes) und unter Serumfreiheit bei den akzessorischen Zellen des Stromas eine geringere CFU-F Bildung stattfand und eine geringere Zelldichte ausgebildet wurde als unter dem Zusatz tierischer Seren.

Die vorliegende Arbeit untersuchte ebenfalls das Wachstumsverhalten CD34-negativer Zellen des Knochenmarkes unter der Kultivierung mit autologem Serum. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Koller et al. zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass es unter dem Zusatz von autologem Serum, insbesondere bei einer Konzentration von 10% möglich ist, CD34-negative Zellen zu expandieren, welche die gleiche Morphe und den gleichen immunologischen Phänotyp aufweisen, wie MSZ, die unter 10% FKS kultiviert wurden. Die vorliegende Arbeit vergleicht außerdem den Zusatz verschiedener Konzentrationen an autologem Serum. Sie zeigt, dass MSZ in autologem Serum isolierbar und expandierbar sind und bei 10% AS in der Mehrzahl sogar einen Wachstumsvorteil gegenüber den Zellen zeigen, die mit 10% FKS kultiviert wurden. Jedes FKS unterscheidet sich in seiner Zusammensetzung, so dass die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich des Wachstumsverhaltens der Zellen in der entsprechenden Zusammensetzung des verwendeten FKS begründet sein können. Möglicherweise enthielt das selektionierte FKS, welches bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, weniger Wachstumsfaktoren als das von Koller et al.. Aus ihrer Arbeit ist nicht ersichtlich, wie das FKS vorbehandelt und verwendet wurde.

Des Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit reine Kulturen von MSZ untersucht und keine Co-Kulturen. Aus der Arbeit von Koller et al. geht nicht hervor, ob es sich bei den adhärennten Zellen, die aus CD34- negativen Zellen hervorgegangen sind, um MSZ oder MSZ-ähnliche Zellen handelt. Bei der überwiegenden Mehrzahl der CD34-negativen Zellen handelt es sich um hämatopoetische Zellen bzw. MNZ. Es kann davon ausgegangen werden, dass die MSZ in Anwesenheit von CD34-positiven Zellen unter Zusatz von humanem Serum ihr Wachstums- und Differenzierungsverhalten ändern. Möglicherweise liegen die gegensätzlichen Ergebnisse beider Arbeiten darin begründet, dass verschiedene Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen (Vorbehandlung der Zellen, unterschiedliche Serumqualitäten und Kulturmedien) untersucht wurden, was wiederum deutlich macht, wie sinnvoll es ist, MSZ möglichst eindeutig zu charakterisieren und zu definieren.

Kuznetsov et al. untersuchten an humanen Stromazellen des Knochenmarkes den Effekt von humanem Serum auf die Proliferation in vitro und die Knochenbildung in vivo (nach Transplantation in Verbindung mit porösen Keramikmatrices) (Kuznetsov et al., 2000). Untersucht wurden Knochenmarkzellen aus trabekulärem Knochen von 6 Spendern im Alter von 0,5 bis 15 Jahren.

Die BMSC wurden aus Knochenfragmenten isoliert und in  $\alpha$ -MEM über 5 Passagen kultiviert. Getestet wurde der Zusatz von 20% FKS, 20% humanem AB-Serum (kommerziell erworben) und 20% Kaninchenserum, sowie die Serumfreiheit. Dem Medium wurden weiterhin noch Dexamethason, L-Ascorbinsäure-magnesiumphosphat zugesetzt. Das serumfreie Medium war zusätzlich angereichert mit Insulin, Transferrin und Selen (ITS).

Kuznetsov et al. zeigten mit ihrer Studie, dass die Koloniebildende Effizienz (Colony-Forming Efficiency = CFE) bzw. die Proliferation bis P2 unter dem Zusatz von humanem AB-Serum bei allen Spendern geringer war als unter Zusatz von FKS. D.h., unter Zusatz von FKS konnten wesentlich mehr BMSC gewonnen werden als unter Zusatz von humanem AB-Serum. Die beste Knochenbildung in vivo zeigte sich aber, wenn die BMSC unter FKS mit Wechsel auf Serumfreiheit kultiviert wurden. Die Untersucher schlussfolgerten daraus, dass humane MSZ, kultiviert in FKS und vor der Transplantation inkubiert mit serumfreiem Medium, signifikant mehr Knochen bilden als MSZ, die konstant in serumhaltigem Medium kultiviert werden. Des Weiteren kommen sie zu dem Schluß, dass sowohl in FKS als auch in humanem Serum Faktoren enthalten sind, welche die osteogene Differenzierung inhibieren.

Im Unterschied zu dieser Studie kann die vorliegende Arbeit zeigen, dass es unter dem Zusatz von 10% AS gelingt, MSZ zu gewinnen und in ausreichender Menge zu expandieren und das im Allgemeinen sogar besser als unter dem Zusatz von FKS. In der

vorliegenden Arbeit wurde nicht hitzeinaktiviertes, autologes Serum verwendet, das frisch aufgetaut zugesetzt wurde. Es ist möglich, dass allein die Seren (kommerziell erworbenes, humanes AB-Serum und autologes Serum) so verschieden behandelt wurden, dass es zu Unterschieden hinsichtlich der Isolation und Expansion der Zellen kommen kann. Genaue Angaben zum verwendeten Serum sind der Arbeit von Kuznetsov et al. nicht zu entnehmen. Die untersuchten BMSC wurden von den Autoren nicht näher charakterisiert.

Außerdem zeigt die vorliegende Arbeit, dass die unter 10% AS kultivierten Zellen in vitro sehr gut osteogen differenzierbar sind. Die MSZ wurden in der 2. Passage mit den osteogenen Induktionssubstanzen stimuliert. Der von Kossa Assay war bei allen untersuchten Spendern unter dem Zusatz von 10% AS sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch von Kossa positiv. In der vorliegenden Arbeit wurde die osteogene Differenzierung an Hand der Anfärbung extrazellulärer Matrixvesikel beim von Kossa Assay in vitro bemessen, in der Studie von Kuznetsov hingegen an der Knochenbildung in vivo. Die vorliegende Arbeit kann keine Aussage darüber treffen, wie sich die osteogen differenzierten Zellen später in vivo verhalten, d.h. ob eine Knochenbildung beobachtbar wäre oder nicht. Die Arbeit von Kuznetsov macht keine Aussagen über die osteogene Differenzierung in vitro.

Yamaguchi et al. zeigten in einer Studie, die sich mit der Expansion hämatopoetischer Stammzellen befasst, dass sich Stromazellen des Knochenmarkes (BMSC) unter der Zugabe von 10% humanem AB-Serum und bFGF in einer Konzentration von 1,0 ng / ml zwei- bis dreimal besser expandieren lassen als unter der Zugabe von 12,5 % FKS bzw. Pferdeserum und Hydrocortison (Yamaguchi et al., 2002).

Als Kulturmedium fand IMDM Verwendung und die Untersuchung wurde an Zellen der 1. Passage durchgeführt. Die Expansionsrate unter 10% AS war dabei abhängig von der zugesetzten Dosis an bFGF. Ohne den Zusatz des Wachstumsfaktors war die Expansion der Zellen unter dem Zusatz von FKS besser als unter dem Zusatz von AS.

Im Unterschied zu dieser Studie wurde in der vorliegenden Arbeit dem Kulturmedium DMEM autologes Serum zugesetzt. Auf die Gabe von Wachstumsfaktoren wurde bewußt verzichtet. Mit dieser Arbeit wird gezeigt, dass sowohl die Isolation als auch die Expansion von MSZ unter dem Zusatz von 10% autologem Serum ohne den Zusatz von Wachstumsfaktoren, insbesondere von bFGF sowohl in PK als auch in P1 und P2 möglich und in der Mehrzahl der Fälle besser ist als die Expansion unter Zusatz von 10% FKS. Aus der Arbeit von Yamaguchi et al. geht nicht hervor, um welche Zellen des Knochenmarkstromas es sich genau handelt.

Anselme et al. untersuchten an humanen CFU-F (MSZ-ähnlichen Zellen) des

Knochenmarkes die Abhängigkeit des Wachstums und der Differenzierung von den Kulturbedingungen und der Qualität des zugesetzten Serums (Anselme et al., 2002).

Die Untersuchung erfolgte an Zellkulturen der PK von 31 Spendern im Alter von 27 bis 53 Jahren. Dem Kulturmedium  $\alpha$ -MEM wurden dafür 15% humanes AB-Serum, 15% autologes Plasma, 15% FKS, 1% Ultroser G, bestehend aus verschiedenen tierischen Proteinen und Prolifix S3 / S6, basierend auf pflanzlichen Proteinen, zugegeben. Neben dem alleinigen Einfluß der verschiedenen Seren wurde der zusätzliche Effekt von Dexamethason getestet.

Unter dem Zusatz von 15% humanem AB-Serum zeigte sich eine gleich gute bis bessere CFU-F Bildung im Vergleich zur Kontrolle, die aus  $\alpha$ -MEM mit dem Zusatz von Ultroser G (Kombination tierische Seren) bestand. Die Zahl und die Fläche der CFU-F's unter 15% humanem AB-Serum konnten durch den Zusatz von Prolifix S6 weiter erhöht werden. Gleiche Beobachtungen wurden auch bei 15% autologem Plasma und Prolifix S6 gemacht. FKS zeigte ebenfalls eine gute CFU-F Bildung, doch verglichen mit allen anderen getesteten Zusätzen, also auch verglichen mit humanem AB-Serum bzw. autologem Plasma allein und unter dem Zusatz von Prolifix S6, waren die Kolonien im Durchmesser kleiner. Die Zahl der CFU-F's war bei den Kulturen mit humanem AB-Serum höher als bei denen mit FKS.

Des Weiteren zeigte sich unter dem Zusatz von humanem AB-Serum eine stärkere Expression von Osteonectin als unter dem Zusatz von FKS. Der Grad der osteogenen und adipogenen Differenzierung, gemessen am von Kossa Assay und der Anfärbung mit Ölrot O wurde nur für Zellkulturen unter dem Zusatz von Ultroser G bestimmt. Die Expression der Alkalischen Phosphatase zeigt für Ultroser G, humanes AB-Serum mit Zusatz von 15% Prolifix S6 und autologes Plasma mit dem Zusatz von 1% Prolifix S6 annähernd gleiche Ergebnisse.

Wurden Zellen mit FKS oder autologem Plasma mit der Gabe von Dexamethason kultiviert, zeigte sich ein positiver Effekt hinsichtlich der Zahl und des Durchmessers der CFU-F's.

Anselme et al. demonstrierten, dass es gelingt, humane CFU-F auf der Basis von humanem AB-Serum (15%) und autologem Plasma (15%) zu kultivieren. Die zusätzliche Gabe von Prolifix S6 wirkt sich dabei wachstumsfördernd aus.

Die Autoren sprechen in ihrer Arbeit parallel von MSZ und CFU-F, sodass unklar bleibt, welche Zellen untersucht wurden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass humane, adulte MSZ des Knochenmarkes unter der Kultivierung mit autologem Serum ebenfalls ein besseres Wachstum zeigen als unter dem Zusatz von FKS. Im Gegensatz zu Anselme wurde das Serum in einer Konzentration von nur 10% zugesetzt und auf die zusätzliche Gabe jeglicher Wachstumsfaktoren verzichtet. Das gute Wachstum unter dieser Bedingung wurde nicht nur an Zellkulturen der PK,

sondern auch an Kulturen der ersten und zweiten Passage gezeigt. Des Weiteren sind die unter dieser Bedingung gewonnenen und expandierten MSZ sehr gut osteogen differenzierbar (von Kossa stark positiv).

Yamamoto et al. haben gezeigt, dass die Expansion und osteogene Differenzierung von humanen Stromazellen des Knochenmarkes (BMSC) unter dem Zusatz von 10% AS zu gleich guten Ergebnissen führt wie unter dem Zusatz von 10% FKS (Yamamoto et al., 2003).

Sie siedelten die Zellen des gesamten Knochenmarkes nach Zentrifugation ohne einen Dichtegradienten in  $\alpha$ -MEM aus. Dem Kulturmedium wurde 10% hitzeinaktiviertes, autologes Serum zugesetzt, das bei 4°C gelagert wurde. Untersucht wurden Zellen der Primärkultur von 10 Patienten im Alter von 10 bis 33 Jahren.

Es zeigte sich eine deutliche interindividuelle Variabilität in Bezug auf die untersuchten Parameter. Die Zahl und Fläche der CFU-F's und AP-positiven Kolonien war unter dem Zusatz von 10% AS und FKS ähnlich. Eine hohe Expression der mRNA von Osteopontin, Osteocalcin und BSP wurde bei Dexamethason substituierten Zellkulturen beider Serumzusätze beobachtet. Der Nachweis mineralisierter Matrixmoleküle wurde jedoch nur an einer Probe (in PK), an Zellen, die unter dem Zusatz von 10% AS und 10% FKS kultiviert wurden, erbracht. Die osteogenen Induktionssubstanzen wurden ab KT 3 zugesetzt. Unter beiden Bedingungen zeigte sich eine annähernd gleiche Mineralisierung. Im Unterschied zu dieser Studie zeigt die vorliegende Arbeit, dass es unter der Kultivierung mit 10% AS in Passage 2 gelingt, bei allen getesteten Spendern mineralisierte Matrixmoleküle nachzuweisen und zwar in größerem Umfang als bei den Zellen, die mit 10% FKS kultiviert wurden. Die MSZ dieser Arbeit wurden aus einem Dichtegradienten gewonnen und in DMEM kultiviert. Die besseren Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der osteogenen Differenzierung sind möglicherweise dadurch zu erklären, dass kein hitzeinaktiviertes Serum verwendet wurde, sondern autologes Serum, das nach der Gewinnung bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert und jedes Mal frisch aufgetaut zugesetzt wurde. Dies sollte ein Absinken der Konzentration wichtiger Nährstoffe und Wachstumsfaktoren verhindern, die möglicherweise ausschlaggebend sind für die Zellteilung und den Erhalt der Unreife und Multipotenz. Die MSZ, die in autologem Serum kultiviert wurden, zeigten dabei eine deutlich bessere osteogene Differenzierung als die Zellkulturen unter 10% FKS, was eventuell durch eine höhere Konzentration osteogen wirkender Wachstumsfaktoren im autologen Serum erklärbar ist.

Spees et al. untersuchten die Möglichkeit, die Kontamination mit FKS-haltigen Proteinen bei der Kultivierung von Stammzellen des Knochenmarkstromas zu reduzieren (Spees et al., 2004). Zur Quantifizierung der Kontamination wurde das verwendete FKS mit

Fluoreszin-Isothiocyanat (FITC) markiert und die Fluoreszenz der damit kultivierten Zellen gemessen. Die Zellen, die in  $\alpha$ -MEM unter dem Zusatz von 20% FITC markierten FKS kultiviert wurden, zeigten auch nach intensivem Waschen einen hohen Grad an FKS-Kontamination.

Die mit FKS kontaminierten MSZ wurden anschließend im Hinblick auf ihr Wachstum (Lebensfähigkeit, Teilungsfähigkeit und Morphe) und die Elimination kontaminierender Proteine in serumfreiem Medium und Medium mit dem Zusatz von 20% FKS, 20% autologem Serum bzw. 10% autologem Serum plus EGF und bFGF kultiviert.

Dabei wurde unter dem Zusatz von 10% AS plus EGF und bFGF sowohl bei niedriger als auch bei hoher Aussiedlungsdichte (50 versus 500 Zellen /  $\text{cm}^2$ ) eine höhere Zellzahl erzielt als unter dem Zusatz von 20% FKS, das als Positivkontrolle diente. Weiterhin war bei den Zellen, die unter dem Zusatz von 20% humanem Serum und 10% autologem Serum kultiviert wurden, eine drastische Reduktion der Fluoreszenz bzw. FKS-Kontamination zu verzeichnen. Im Hinblick auf die Morphe zeigte sich, insbesondere bei hoher Aussiedlungsdichte, dass die Zellen unter dem Zusatz von 10% autologem Serum schmaler und homogener waren als unter 20% FKS. Außerdem waren sie reich an sich schnell teilenden Zellen, die sich durch eine hohe Klonogenität und multipotente Differenzierbarkeit auszeichnen (RS-Zellen).

Aus ihren Beobachtungen schlussfolgerten Spees et al., dass die Inkubation der mit FKS kontaminierten MSZ mit autologem Serum zur drastischen Elimination der Kontamination und zum prozentualen Anstieg der RS-Zellen führt.

Diese Arbeit ist weiterführend in der Erforschung Kälberserum-freier Kulturmedien, die den klinischen Einsatz von MSZ ermöglichen und verbessern.

Die vorliegende Arbeit bestätigt die Beobachtungen hinsichtlich der guten Expansion von MSZ des Knochenmarkes unter dem Zusatz von AS. Sie zeigt außerdem, dass nicht nur die Expansion, sondern auch die Isolation Kälberserum-frei unter dem Zusatz von AS, insbesondere in einer Konzentration von 10% und ohne den weiteren Zusatz von Wachstumsfaktoren, gelingt. Die so isolierten und expandierten Zellen behalten die Fähigkeit der osteogenen und adipogenen Differenzierbarkeit (über 2 Passagen). Im Unterschied zu Spees et al. haben die MSZ der vorliegenden Arbeit unter dem Zusatz von AS und FKS keine Unterschiede bezüglich der Zellmorphe und Zellgröße.

Diese Arbeit zeigt, dass MSZ, die morphologisch den MSZ nach Caplan et al. entsprechen, auch unter dem Zusatz von autologem Serum in ausreichender Menge isoliert und expandiert werden können. Dabei spielen die geringe Aussiedlungsdichte und der Zusatz von frisch aufgetautem AS bei der Expansion in P1 und P2 möglicherweise eine besondere Rolle. Von den getesteten Konzentrationen 1% AS, 3% AS und 10% AS

ist der Zusatz von 10% AS sowohl für die Isolation als auch für die Expansion optimal.

Der Zusatz von 3% AS erscheint sowohl für die Isolation als auch für die Expansion innerhalb desselben Kultivierungszeitraumes als weniger geeignet. Der Zusatz von 1% AS ist für die Isolation der MSZ ungeeignet und erscheint für die Expansion innerhalb desselben Kultivierungszeitraumes als begrenzt geeignet.

Des Weiteren zeigen die MSZ als Zeichen der Multipotenz unter dem Zusatz von 10% AS in P2 eine sehr gute osteogene und adipogene Differenzierbarkeit, was für den Erhalt der Unreife über PK hinaus spricht. Der Zusatz von 3% AS ist auch hierbei weniger gut geeignet. Der Zusatz von 1% ist für die Differenzierung ungeeignet.

Es wird erstmals gezeigt, dass die unter autologem Serum kultivierten Zellen ein annähernd identisches Spektrum an Oberflächenmarkern exprimieren wie MSZ, die unter FKS kultiviert werden. Neben der gleichen Zellmorphologie und Zellgröße bestätigt dies die Vermutung, dass es sich bei den hier isolierten und expandierten Zellen um MSZ handelt. Weitere Untersuchungen bezüglich der chondrogenen Differenzierbarkeit, der Gleichheit der Gene und der Proteinexpression sind aber nötig, um diese Vermutung zu untermauern.

Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit, in der von MSZ, modifiziert nach Caplan et al., gesprochen wird, ist bei vielen der hier diskutierten Studien von CFU-F (Progenitoren der MSZ) die Rede. Der Begriff CFU-F wurde von Friedenstein und Owen geprägt (Friedenstein et al., 1966; Friedenstein, 1976; Owen et al., 1987) und beschreibt eine Gruppe von Zellen des Knochenmarkes, die in der Lage sind, knochen- und knorpelartige Zellformationen zu bilden. MSZ nach Caplan et al., Prockop et al. und Simmons et al. zeigen ebenfalls diese Eigenschaft. Trotz ähnlichen Verhaltens in der Zellkultur gibt es keinen einheitlichen Konsens darüber, ob es sich um die gleiche Zellpopulation oder um verschiedene Vorläuferzellen handelt. Wahrscheinlich werden auf Grund der unterschiedlichen Gewinnungs- und Kultivierungsmethoden verschiedene Zelllinien mit ähnlichen Eigenschaften verglichen. Eine Zelle verändert sich bereits mit dem Herausnehmen aus dem natürlichen Milieu und erst recht unter den verschiedenen Kulturbedingungen. So zeigen beispielsweise MSZ nach Caplan et al. und MSZ nach Prockop et al. unter verschiedenen Kulturbedingungen zwar ähnliche Eigenschaften und Morphologie, nicht jedoch das gleiche Gene Array.

Standardisierte Bedingungen bezüglich Gewinnung und Kultivierung sowie eine eindeutige Charakterisierung dieser multipotenten Stammzellen würden die Vergleichbarkeit deutlich verbessern bzw. erst ermöglichen. Bei den diskutierten Arbeiten sprechen Spees et al. und bedingt Anselme et al. direkt von der Kultivierung humaner MSZ, die anderen Autoren reden von BMSC, Fibroblasten des Knochenmarkes und

Knochenzellen. So bleibt allein durch die verschiedenen Namen, die teilweise sogar synonym verwendet werden, offen, ob von der gleichen Zellpopulation gesprochen wurde. Obwohl durch Shigeno und Ashton bereits 1995 gezeigt wurde, dass sich Zellen, die aus trabekulärem Knochen gewonnen wurden, unter dem Zusatz von humanem AB-Serum gut und sogar besser expandieren lassen als unter dem Zusatz von FKS, gibt es zur Kälberserum-freien Kultivierung von MSZ bis zum derzeitigen Zeitpunkt keine Studie, infolge derer ein Wechsel von tierischem Serum zu humanem Serum oder sogar Serumfreiheit stattgefunden hat.

#### Diskussion der Ergebnisse hinsichtlich des klinischen Einsatzes

Für den klinischen Einsatz von in vitro kultivierten MSZ ist es zwingend erforderlich, das Risiko der Übertragung von Krankheitserregern und Prionen und die Gefahr einer überschießenden Immunreaktion durch den Kontakt mit tierischem Fremdeiweiß ganz auszuschließen oder deutlich zu minimieren. Diese Risikominimierung wird z.B. bei der Eigenblutspende bedacht. Die Verwendung von autologem Serum, gewonnen aus venösem Vollblut, schließt eine Infektion der Zellkulturen mit Krankheitserregern und Prionen des Rindes aus.

Für die Klinik werden normalerweise 1 bis 3 Mio. vitale MSZ pro kg Körpergewicht benötigt.

Für diese Arbeit war es im Rahmen der Bestimmung von Oberflächenmarkern nötig, eine große Zellzahl zu generieren. Es gelang in 25 Tagen (innerhalb von 2 Passagen) 11,5 Mio. MSZ unter dem Zusatz von 10% AS zu gewinnen (n=2). Dafür wurden ca. 65 ml venöses Vollblut und 1 ml KM benötigt. Das bedeutet für die Klinik verallgemeinert, dass einem durchschnittlich 70 kg schweren Menschen, mit nur 5 bis 10 ml Knochenmarkaspirat und ca. 400 ml venösem Blut (bei Zusatz von 10% AS) innerhalb von 25 Tagen ca. 70 Mio. MSZ zurückgegeben werden können. Muss die Menge des benötigten Serums und damit des benötigten Blutes reduziert werden, weil z. B. bei einem Patienten schwierige Herz-Kreislauf-Verhältnisse vorliegen, ist es auch möglich, während der Expansion auf 3% AS bzw. 1% AS zu wechseln. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, dass die Zellgewinnung und Expansion innerhalb desselben Zeitraumes unter 10% AS optimaler ist als unter dem Zusatz von 3% AS. Die Daten belegen, dass die Zellzahlen nahezu gleich ansteigen, sich also um ähnliche Faktoren verändern, jedoch zeitlich verzögert (siehe Tabelle 5 und 7, Kapitel 4). Demnach besteht die Möglichkeit, dass Zellkulturen unter dem Zusatz von 3% AS annähernd gleiche Zellzahlen aufweisen, wenn sie 1 bis 2 Tage länger in der jeweiligen Passage gehalten werden. Somit könnte der nötige Serumbedarf deutlich (um ca. 50%) gesenkt werden. Ähnliches gilt für den Zusatz von 1% AS. Ist eine verlängerte Kultivierungszeit tolerabel und eine drastische Reduktion



des Serumbedarfes erforderlich (um ca. 80%), besteht vielleicht auch die Möglichkeit, mit dem Zusatz von nur 1% AS ausreichend viele Zellen zu expandieren. Bei der Verwendung von 3% und 1% AS muss jedoch bedacht werden, dass die Isolation der MSZ unter dem Zusatz von 10% AS eindeutig von Vorteil ist. So könnte die Isolation unter dem Zusatz von 10% AS erfolgen und für die Expansion der Serumzusatz reduziert werden. Ob unter diesen Bedingungen ein gleich gutes Ergebnis hinsichtlich der osteogenen und adipogenen Differenzierung erreicht werden kann wie bei der ausschließlichen Kultivierung mit 10% AS, ist mit dieser Arbeit nicht zu beantworten. MSZ unter dem Zusatz von 3% AS sind weniger gut und MSZ unter dem Zusatz von 1% AS weder osteogen noch adipogen differenzierbar (siehe Abb. 12 und 13, Kapitel 4). Möglicherweise kann die Differenzierbarkeit mit einer abschließenden Kultivierung in 10% AS verbessert werden. Vielleicht ist der Mangel an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren aber auch mit dem Verlust der Unreife und der Differenzierbarkeit verbunden. Sollten den so expandierten MSZ jedoch immunmodulatorische bzw. immunsuppressive Eigenschaften (Le Blanc et al, 2003, 2004) nachgewiesen werden, könnten sie in vielen Bereichen der Medizin eingesetzt werden.

Darüber hinaus wäre eine Reduktion des benötigten Serums auch durch die Zugabe einer am Verbrauch orientierten Menge an Medium während der Expansion möglich. D.h., bei einer geringen Aussiedlungsdichte (niedrige Zellzahl) in P1 und P2 ist es möglich, die Menge des zugegebenen Mediums um 20% zu reduzieren und erst dann zu erhöhen, wenn ein bestimmter Konfluenzgrad erreicht wurde. Es ist durchaus denkbar, in P1 bzw. P2 bis zum KT 4 mit nur 4ml (T25-Flasche) bzw. 12 ml (T75-Flasche) Medium zu arbeiten. Weiterhin ist wahrscheinlich, dass das Passagieren verbessert werden kann, indem der Zeitpunkt des Trypsinierens noch weiter optimiert wird. Die Wachstumskurven dieser Arbeit zeigen, dass ab einem gewissen Konfluenzgrad eine langsamere Zunahme der Zellzahl zu beobachten ist. Möglicherweise sollte die Zellkultur bereits zu diesem frühen Zeitpunkt, bei einem Konfluenzgrad um 30%, trypsinisiert und passagiert werden, um so ein Zurückfahren oder Abschalten des „Zellteilungs-Genes“ zu verhindern.

### Ausblick

Für die klinische Anwendung ist weiterhin zu prüfen, ob mit der Verwendung von „Bioreaktoren“ und geschlossenen Einmal-Systemen die Kultivierung von humanen MSZ unter dem Zusatz von AS genauso gut gelingt oder z.B. durch eine kontinuierliche Serumzufuhr noch weiter optimiert werden kann.

Weil es nicht bei jedem Patienten möglich sein wird, ausreichend autologes Serum zu gewinnen, wird es auch in Zukunft nötig sein, weitere Alternativen zum Einsatz von FKS zu finden, z.B. in Form von serumfreien Medien mit dem Zusatz von Wachstumsfaktoren.

Vielleicht ist es sogar möglich, ein allogenes Serum, das den hohen Anforderungen der Kultivierung von MSZ entspricht, industriell herzustellen.

Neben der Verwendung autologer MSZ sollte auch der Einsatz allogener MSZ (z.B. haploident – z.B. von einem Elternteil) in der Zukunft nicht ausgeschlossen werden (Le Blanc et al., 2004).

## 6. Zusammenfassung

Seit dem Bekanntwerden der großen Plastizität adulter Stammzellen und der Möglichkeit guter Expansion unter dem Zusatz tierischer Seren, nimmt das Bestreben zu, diese Zellen in vielen Anwendungsgebieten der Medizin zu nutzen. Die Kontamination mit tierischen Proteinen während der Kultivierung verbietet nicht nur in Deutschland die nachfolgende Transplantation am Menschen. Diese Limitierung der Einsetzbarkeit in der Klinik kann mit dem Verzicht auf tierisches Eiweiß vermindert werden.

In der vorliegenden, experimentellen Arbeit wurde die Qualität verschiedener Serumkonzentrationen (1%, 3%, 10% AS) bezüglich der Gewinnung, der Expansion und der osteogenen und adipogenen Differenzierbarkeit von adulten mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarkes vergleichend untersucht. Als Kontrolle diente der Zusatz von 10% FKS, welches als standardisierter Serumzusatz etabliert ist.

Bei gleich ausgesiedelter, niedriger Zellzahl und gleicher Kultivierungszeit ist der Zusatz von 10% AS sowohl für die Isolation als auch für die Expansion optimal. Der Zusatz von 3% AS ist sowohl für die Isolation als auch für die Expansion weniger geeignet. Der Zusatz von 1% AS ist sowohl für die Isolation als auch für die Expansion nur begrenzt geeignet. Im Vergleich zum Zusatz von 10% FKS sind unter dem Zusatz von 10% AS gleich hohe bis höhere Zellzahlen und unter dem Zusatz von 3% AS und 1% AS im Allgemeinen niedrigere Zellzahlen zu generieren.

Des Weiteren sind MSZ, die unter dem Zusatz von 10% AS kultiviert werden, sehr gut osteogen und gut adipogen differenzierbar. Die Zellkulturen unter dem Zusatz von 3% AS sind sowohl weniger osteogen als auch weniger adipogen differenzierbar. MSZ, die unter dem Zusatz von 1% AS kultiviert werden, sind nicht differenzierbar. Im Vergleich zum Zusatz von 10% FKS sind MSZ unter dem Zusatz von 10% AS deutlich besser osteogen und unter dem Zusatz von 3% AS ähnlich gut osteogen und generell weniger adipogen differenzierbar.

Es wird erstmals gezeigt, dass die unter 10% AS kultivierten MSZ, die sowohl die gleiche Zellmorphologie als auch die gleiche Zellgröße aufweisen wie MSZ, die unter 10% FKS kultiviert werden, ein annähernd identisches Spektrum an Oberflächenmarkern exprimieren, wie MSZ, die unter 10% FKS kultiviert werden.

Für einen raschen klinischen Einsatz muss die Kultivierung von adulten mesenchymalen Stammzellen mit humanem Serum, autolog oder allogon, weiterentwickelt und standardisiert werden. Die vorliegende Arbeit leistet hierzu einen wichtigen Beitrag.

## 7. Anhang

Abb. 1 a: Plattendesign für die Zellkulturen der Primärkultur und Passage 1  
(Zur Verwendung kamen in PK und P1 jeweils 3 Platten pro Spender.)

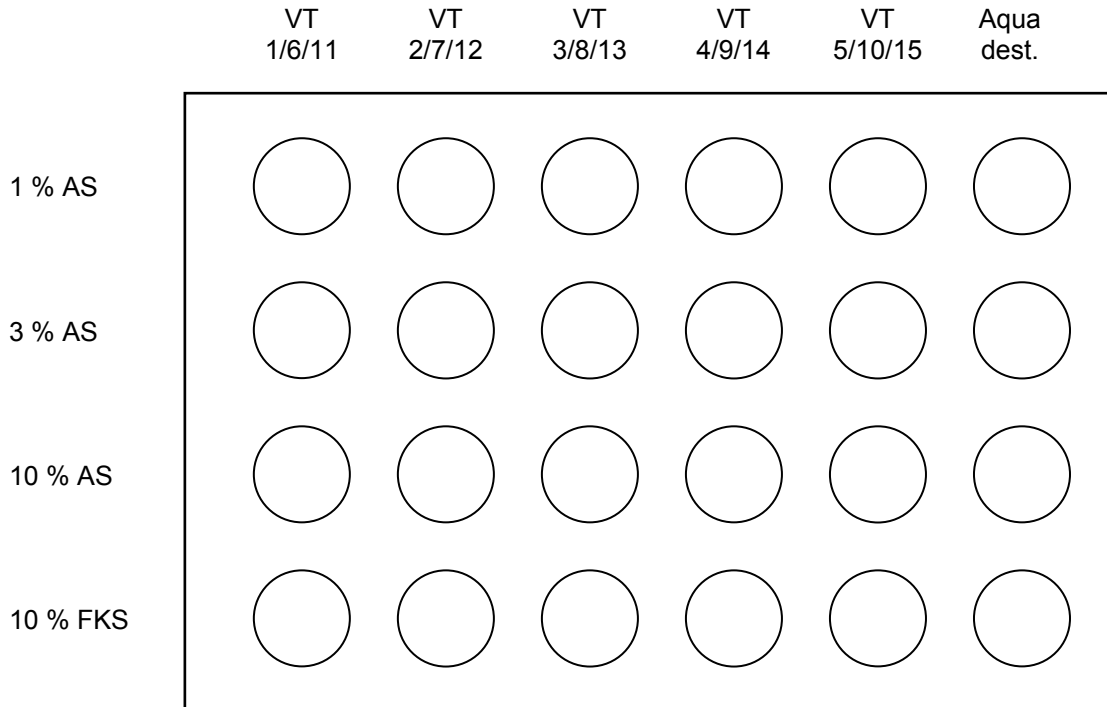


Abb. 1 b: Plattendesign für die Zellkulturen der osteogenen (OD) und adipogenen (AD)  
Differenzierung in Passage 2

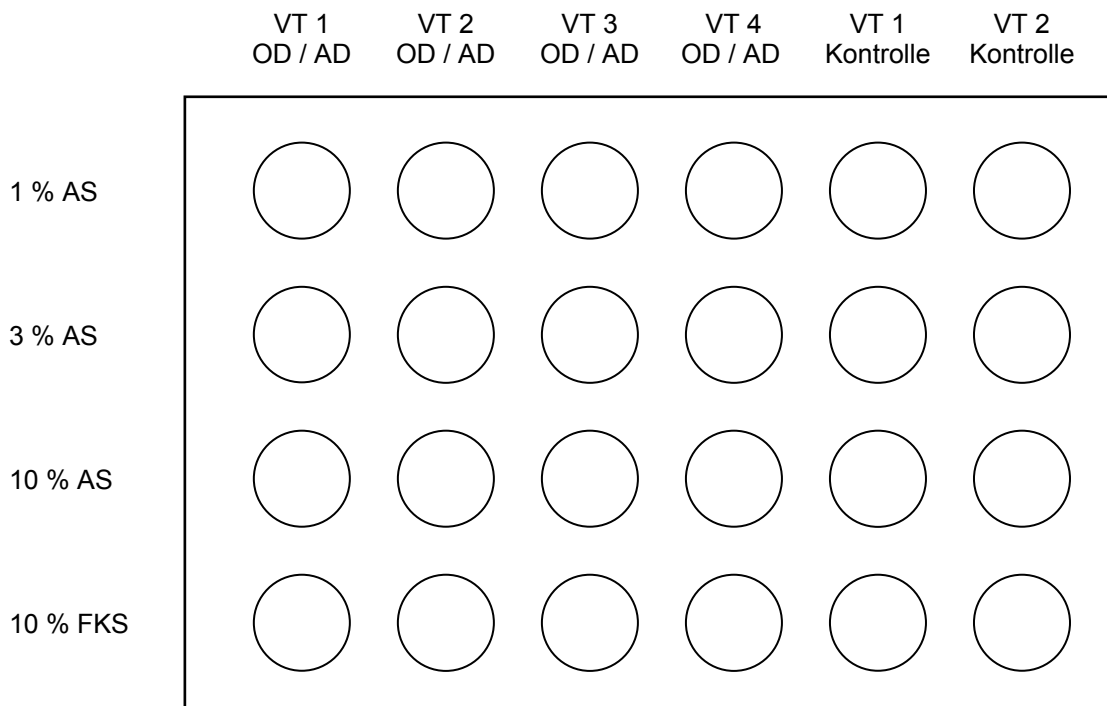


Abb. 2: Position der 12 GF in einer VT; Maße eines GF bei 100 facher Vergrößerung

VT:  $d = 1,8 \text{ cm}$   
 $A = 1,7 \text{ cm}^2$

GF:  $A = 0,052 \text{ cm}^2$   
12 GF:  $A = 0,63 \text{ cm}^2$

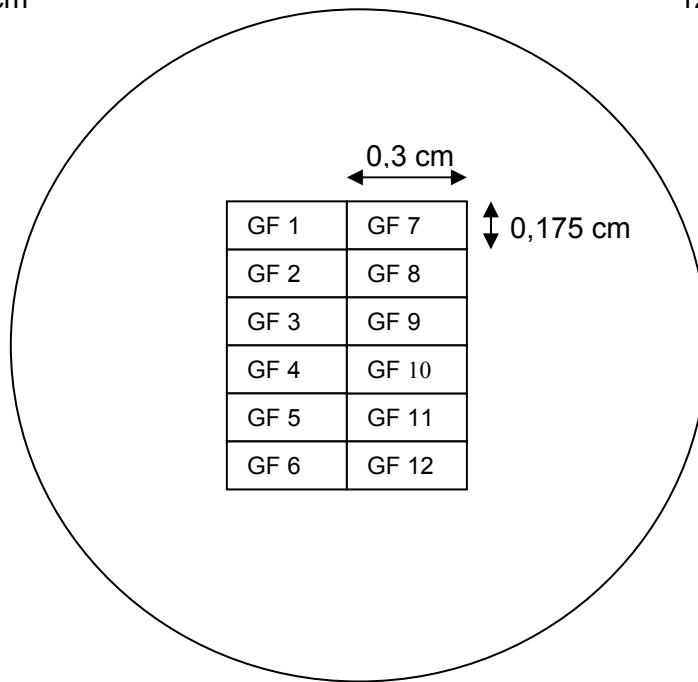
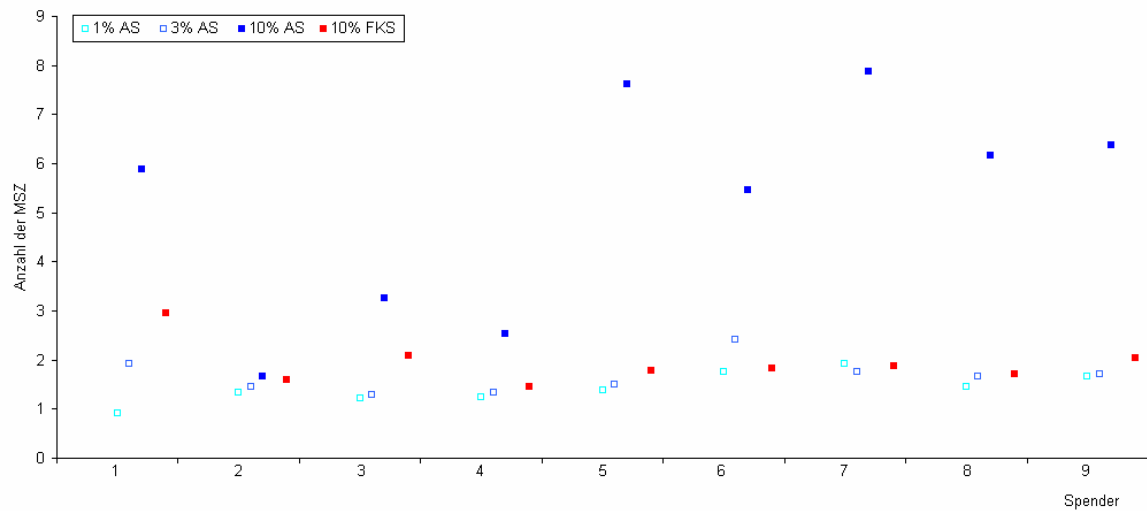


Abb. 14. a-d: Wachstum in P2

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Zellzahlbestimmungen an den verschiedenen Tagen der Passage 2 an Zellkulturen, die bei der osteogenen Differenzierung als Kontrollen dienten (2 VT), dargestellt.

Abb. 14 a: Expansion der MSZ am Tag 3 in Passage 2



Grafische Darstellung der mittleren Zellzahlen der MSZ in Passage 2 für alle Spender: a) an KT 3, b) an KT 7, c) an KT 11, d) an KT 15. Den jeweiligen Spendern (x-Achse) wird die Anzahl der gezählten bzw. geschätzten Zellzahlen (y-Achse) gegenübergestellt. Die in unterschiedlichen Farben positionierten Quadrate zeigen die Mittelwerte der 9 Spender, die aus 12 GF pro VT berechnet wurden. Ein hoher Wert bedeutet, daß unter der getesteten Bedingung viele Zellen generiert wurden.

Abb. 14 b: Expansion der MSZ am Tag 7 in Passage 2

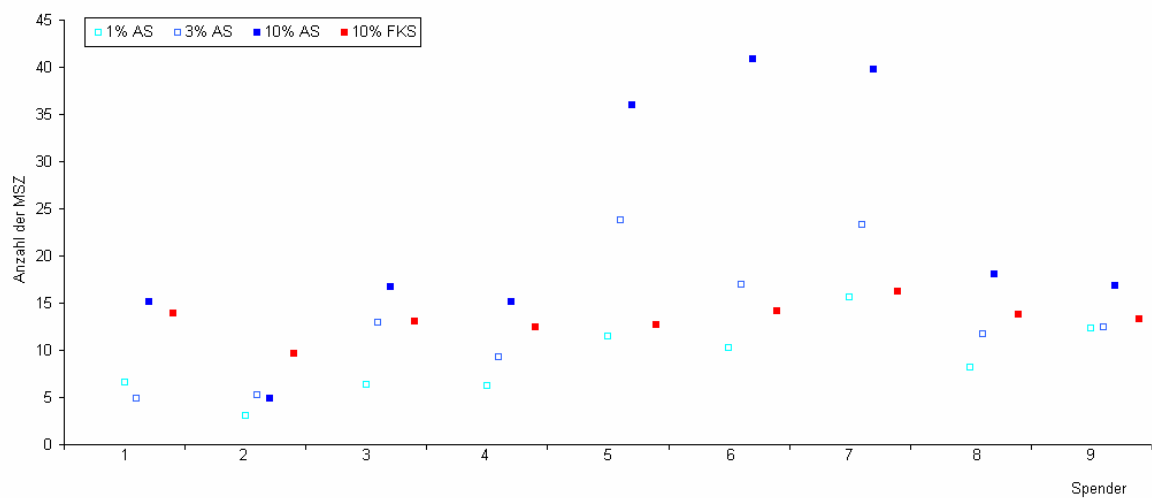


Abb. 14 c: Expansion der MSZ am Tag 11 in Passage 2

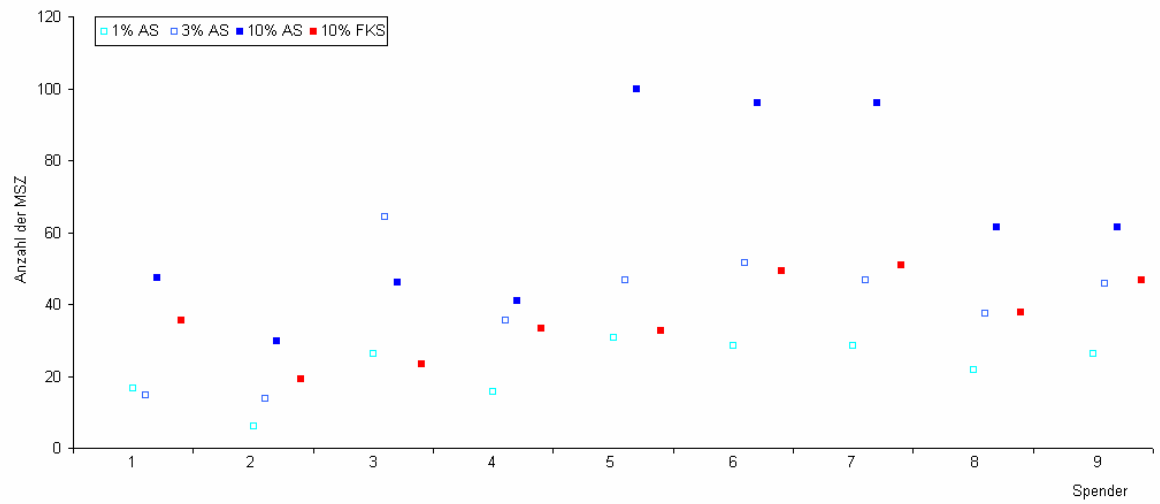


Abb. 14 d: Expansion der MSZ am Tag 15 in Passage 2

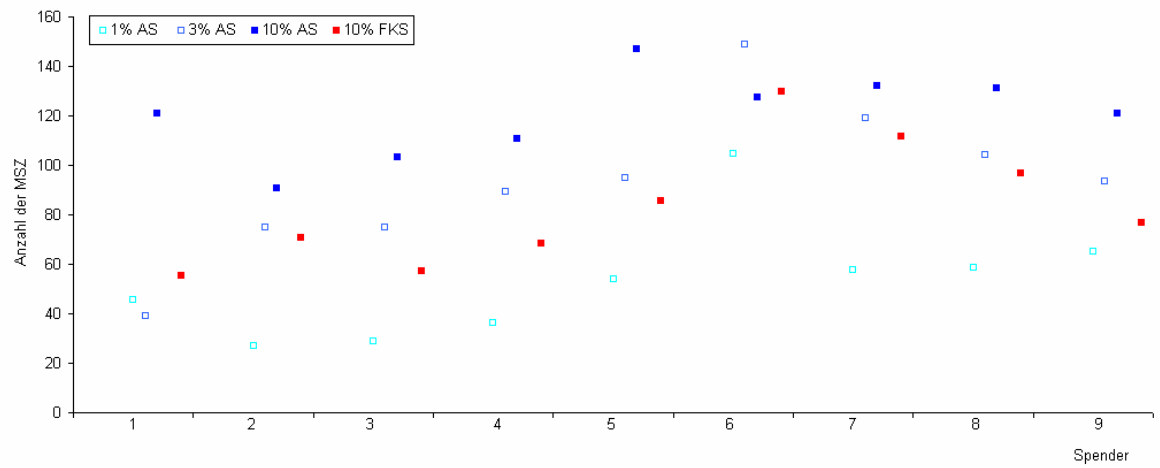
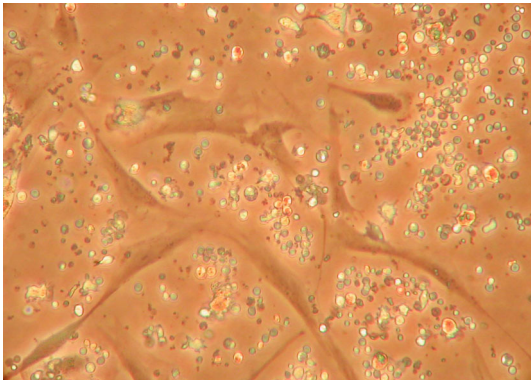
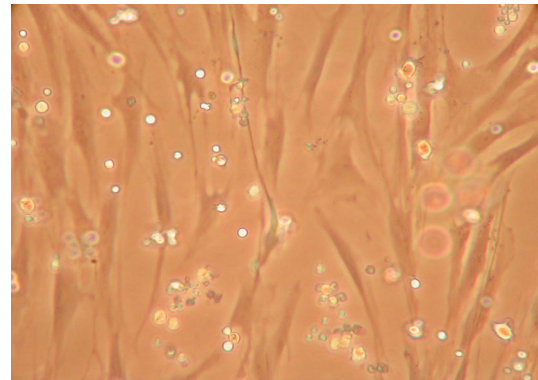


Abb. 15 a - d: Zellmorphie in PK

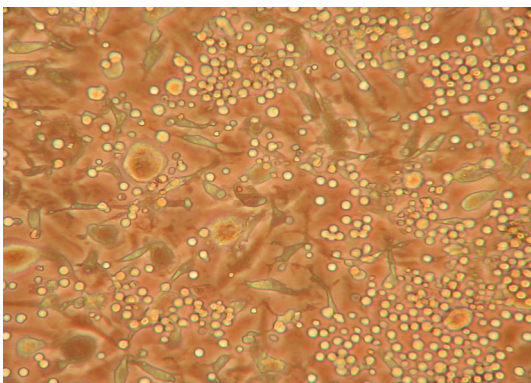
Zellkulturen an KT 9 in PK (Spender 4) – 100 fache Vergrößerung



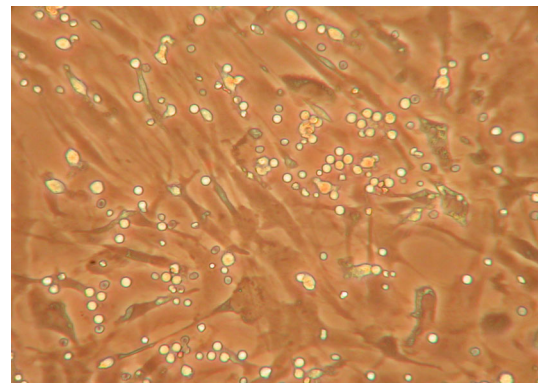
a) 1 % AS \*



b) 3 % AS



c) 10 % AS \*



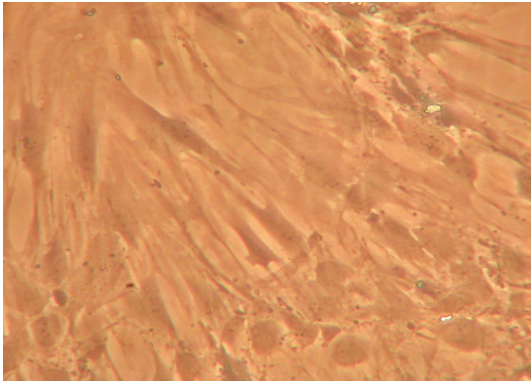
d) 10 % FKS \*

\* Die Zahl der Rundzellen und Monozyten ist nicht repräsentativ.

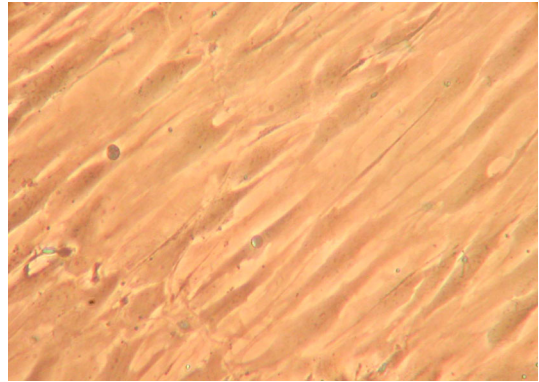


Abb. 16 a – d: Zellmorphe in P1

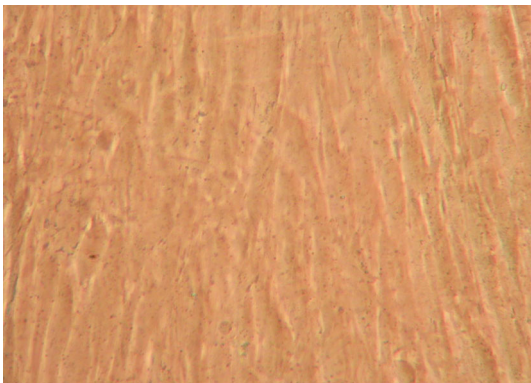
Zellkulturen an KT 7 in P1 (Spender 6) – 100 fache Vergrößerung



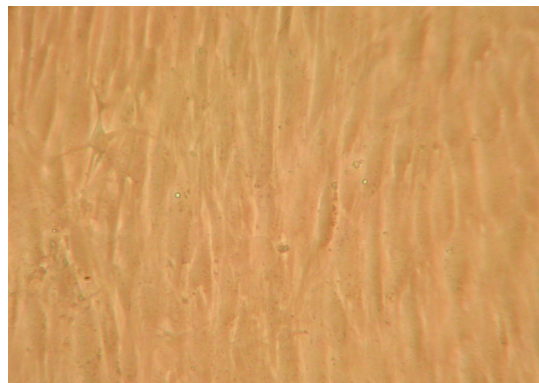
a) 1% AS



b) 3% AS



c) 10% AS

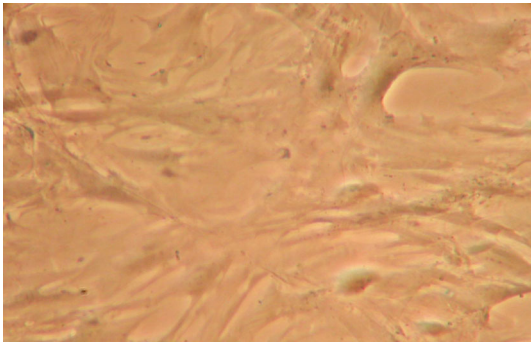


d) 10% FKS

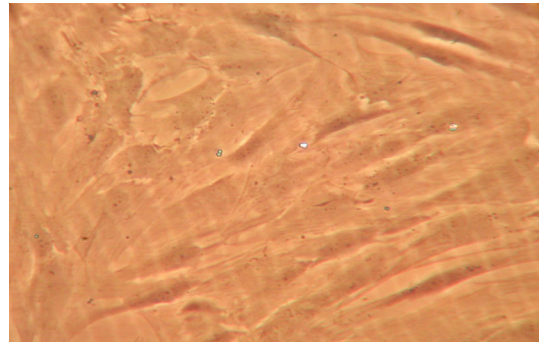
Abb.17 a - h: Osteogene Differenzierung - Zellmorphologie

Zellkulturen mit und ohne (Kontrolle) osteogener Differenzierung an KT 11 in P2

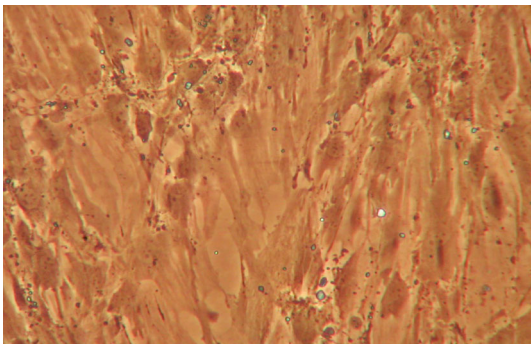
(Spender 7) – 100 fache Vergrößerung



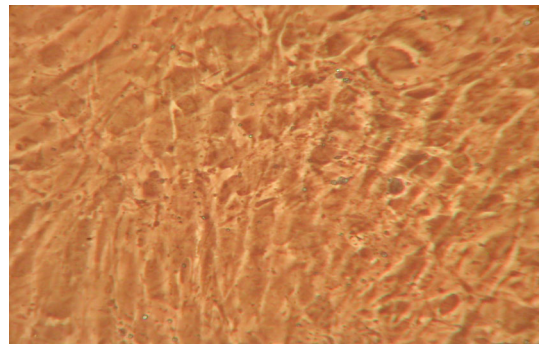
a) Osteogene Differenzierung: 1 % AS



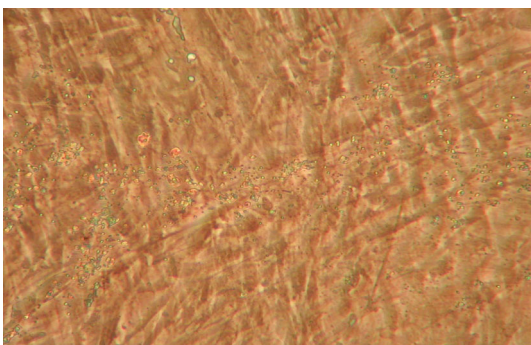
b) Kontrolle: 1 % AS



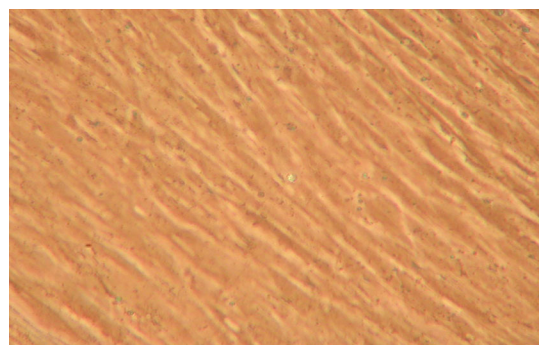
c) Osteogene Differenzierung: 3 % AS



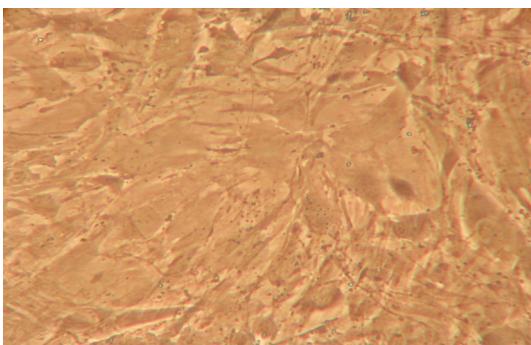
d) Kontrolle: 3 % AS



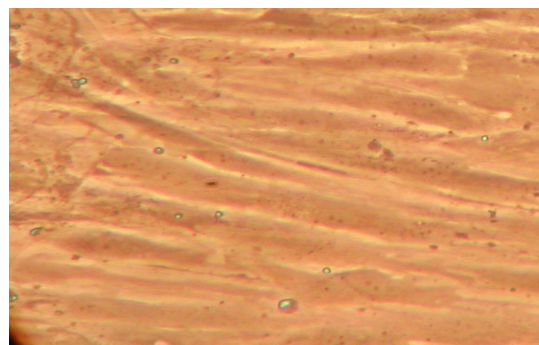
e) Osteogene Differenzierung: 10 % AS



f) Kontrolle: 10 % AS



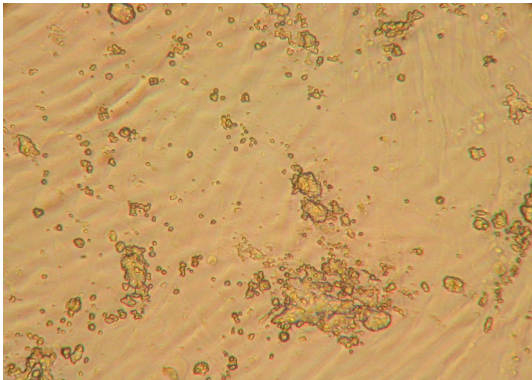
g) Osteogene Differenzierung: 10 % FKS



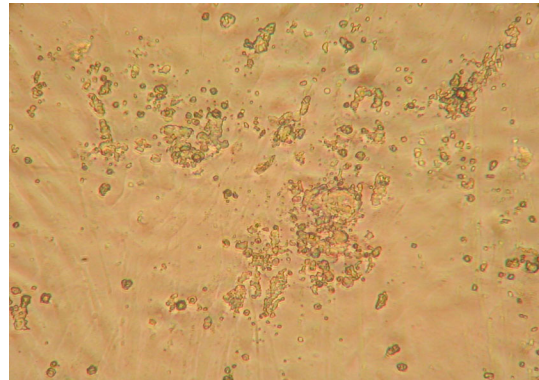
h) Kontrolle: 10 % FKS

Abb. 18 a- d: Osteogene Differenzierung – Bildung von Matrixvesikeln

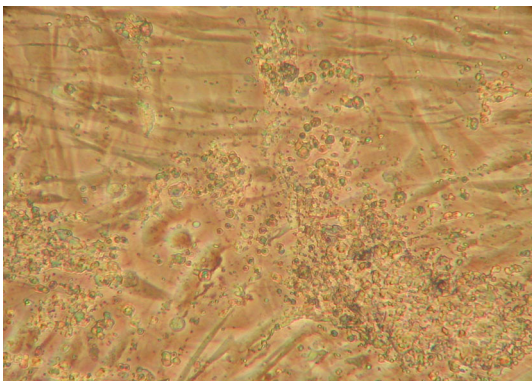
Zellkulturen in P2 unter dem Zusatz von 10 % AS mit Bildung extrazellulärer Matrixvesikel  
(Spender 9) – 100 fache Vergrößerung



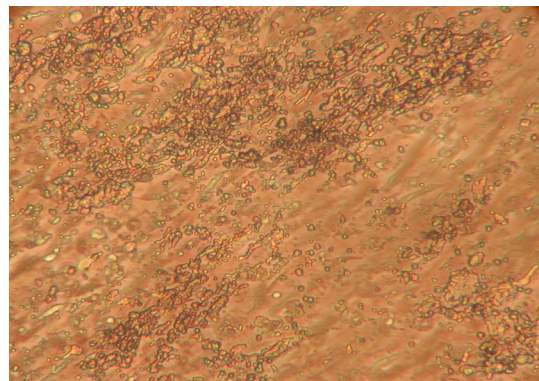
a) KT 11 in P2



b) KT 15 in P2



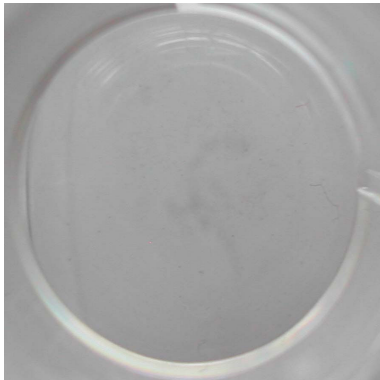
c) KT 18 in P2



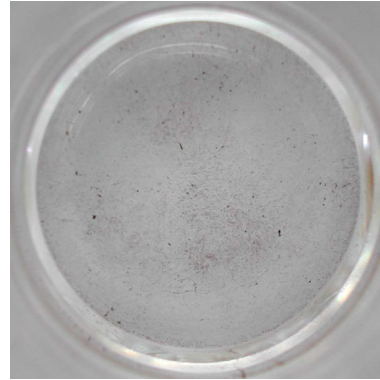
d) KT 21 in P2

Abb. 19: von Kossa Assay – makroskopische Skala

Aufsteigend nach Anfärbung extrazellulärer Matrixvesikel mit einer numerischen Skala von 0 bis 5 sortiert.



Stufe 0



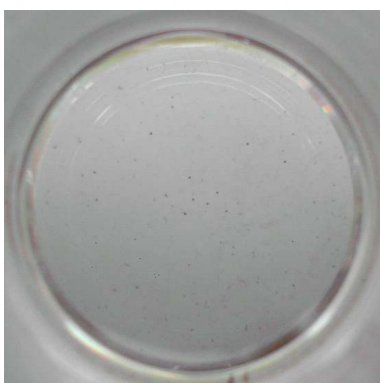
Stufe 3



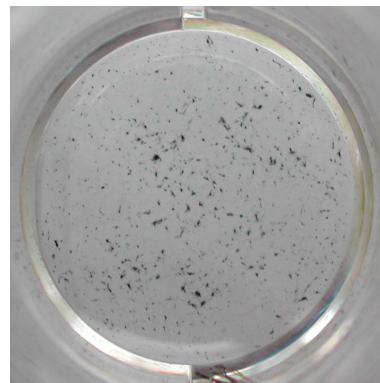
Stufe 1



Stufe 4



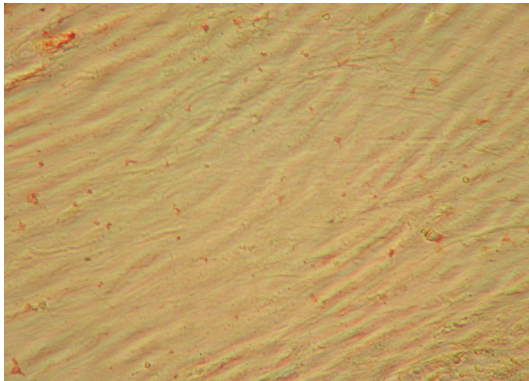
Stufe 2



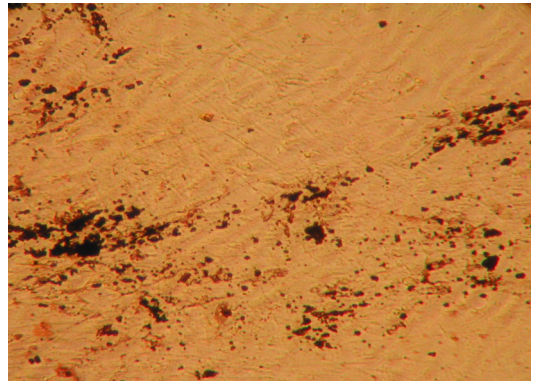
Stufe 5

Abb. 20: von Kossa Assay – mikroskopische Skala

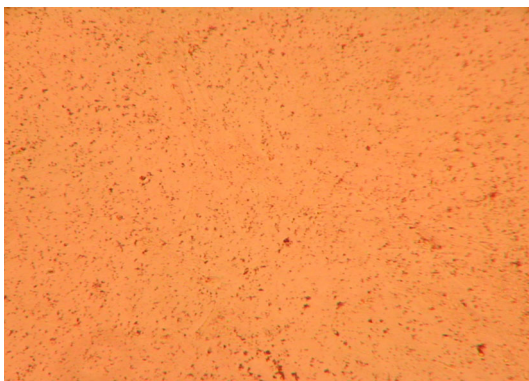
Aufsteigend nach Anfärbung extrazellulärer Matrixvesikel mit einer numerischen Skala von 0 bis 10 sortiert -100 fache Vergrößerung



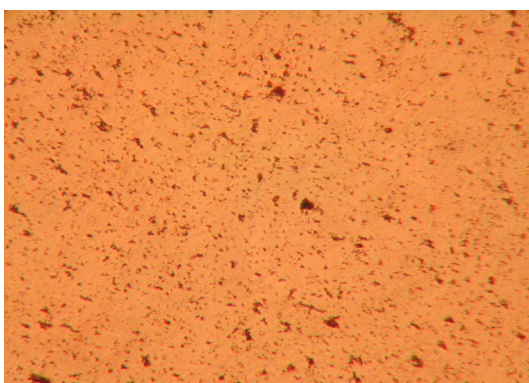
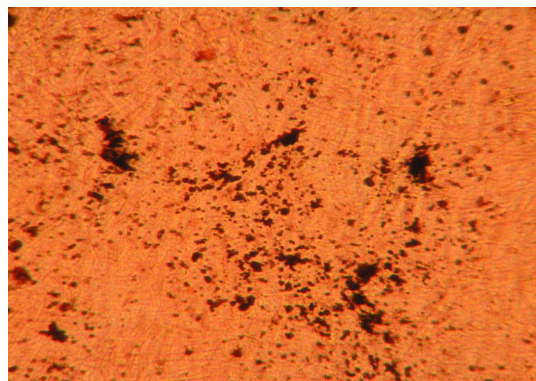
Stufe 0



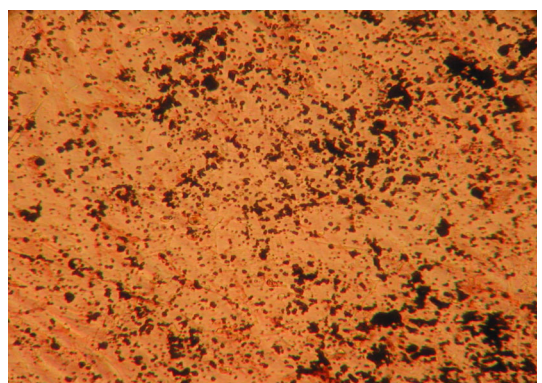
Stufe 3



Stufe 1

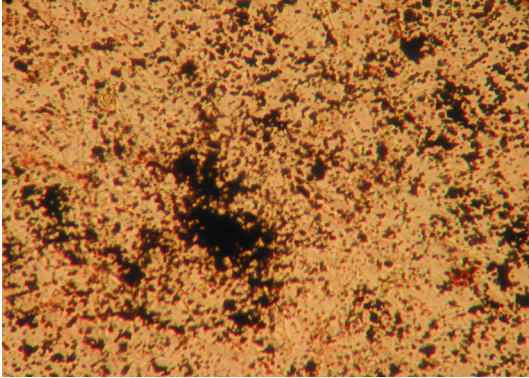


Stufe 2

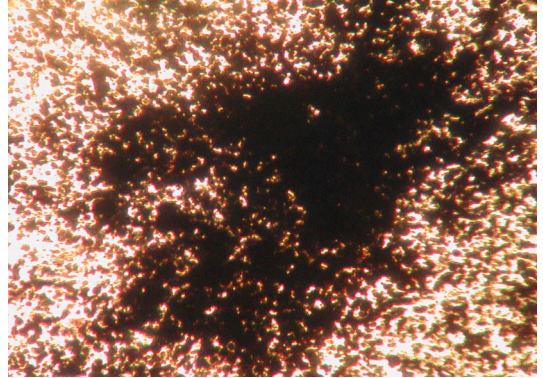


Stufe 5

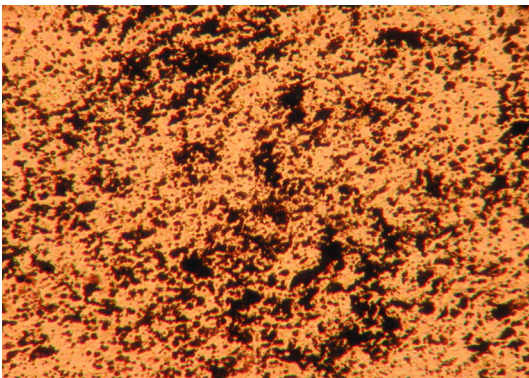
Abb. 20: von Kossa Assay – mikroskopische Skala (Fortsetzung)



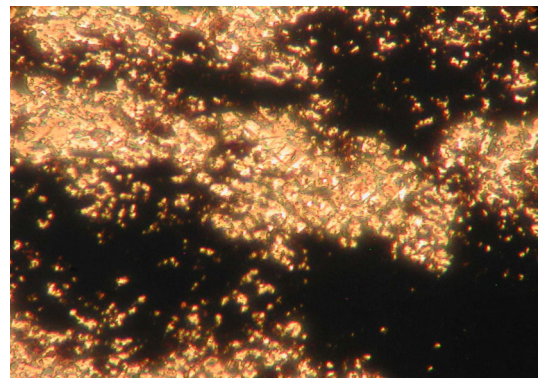
Stufe 6



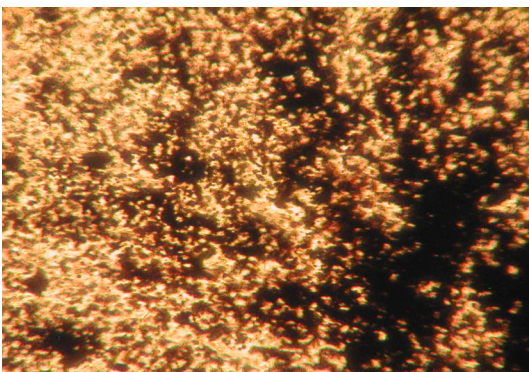
Stufe 9



Stufe 7



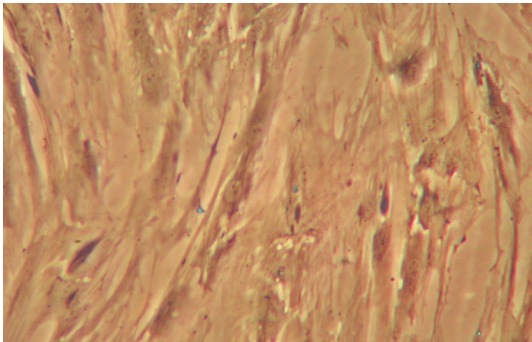
Sufe 10



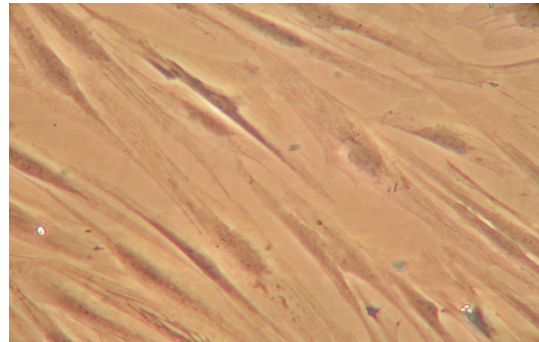
Stufe 8

Abb. 21 a - h.: Adipogene Differenzierung - Zellmorphie

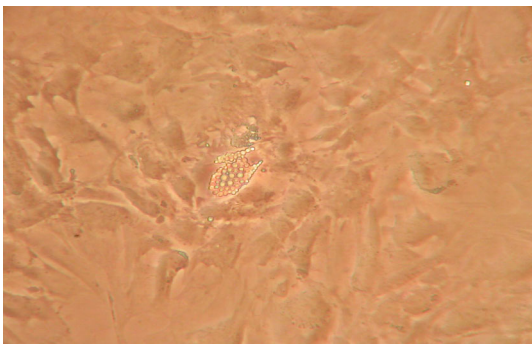
Zellkulturen mit und ohne (Kontrolle) adipogener Differenzierung an KT 11 in P2 (nach 1. Differenzierungszyklus) (Spender 7) – 100 fache Vergrößerung



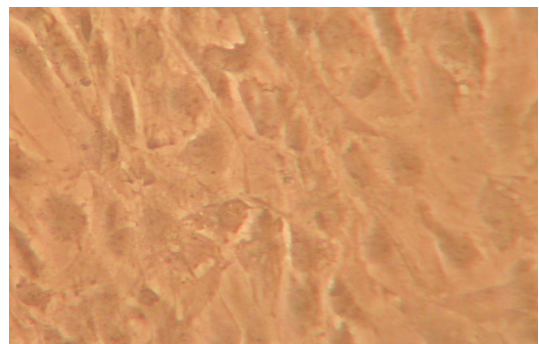
a) Adipogene Differenzierung: 1% AS



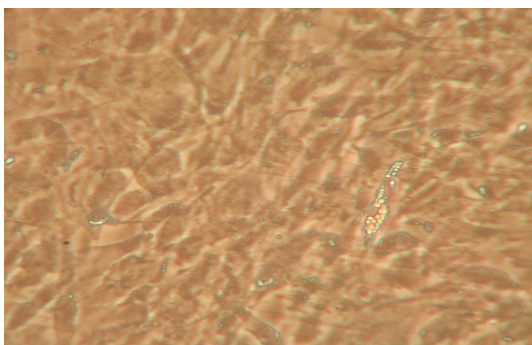
b) Kontrolle: 1% AS



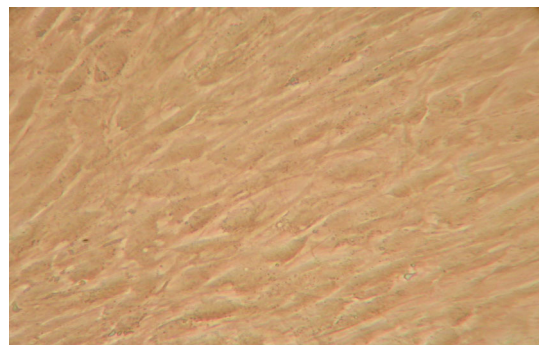
c) Adipogene Differenzierung: 3% AS



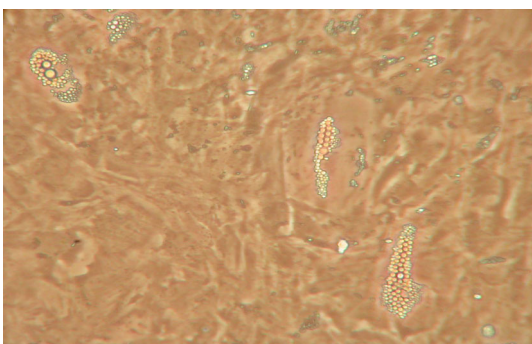
d) Kontrolle: 3% AS



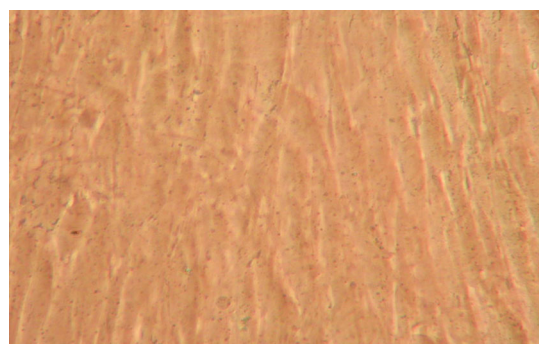
e) Adipogene Differenzierung: 10 % AS\*  
\* viele winzige Vakuolen (auf Abb. kaum sichtbar)



f) Kontrolle: 10 % AS



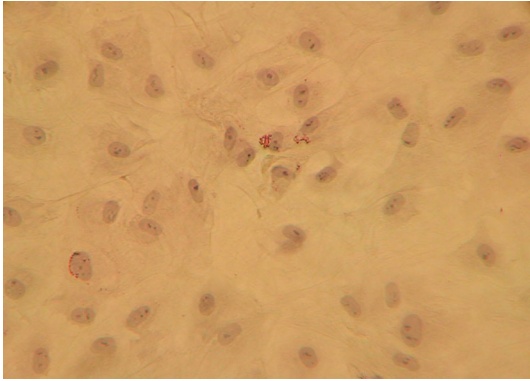
g) Adipogene Differenzierung: 10 % FKS



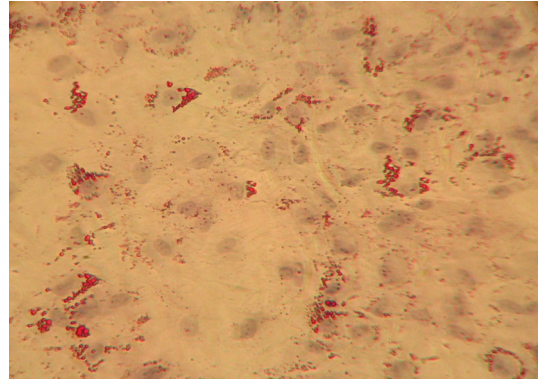
h) Kontrolle: 10 % FKS

Abb. 22: Adipogener Assay - Skala

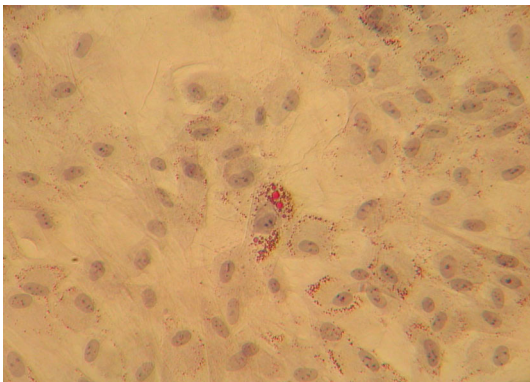
Aufsteigend nach Anfärbung intrazellulärer Fettvakuolen mit einer numerischen Skala von 0 bis 10 sortiert. (100 fache Vergrößerung)



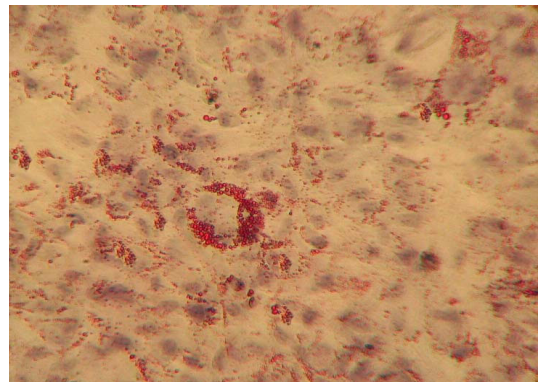
Stufe 0



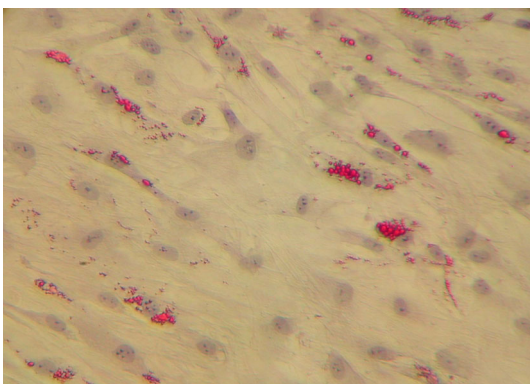
Stufe 3



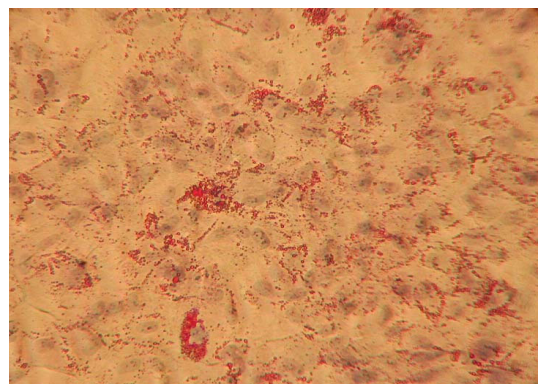
Stufe 1



Stufe 4



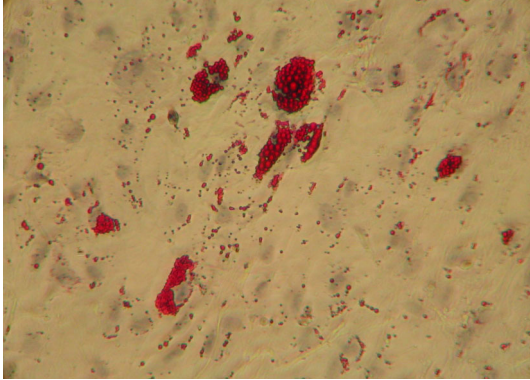
Stufe 2



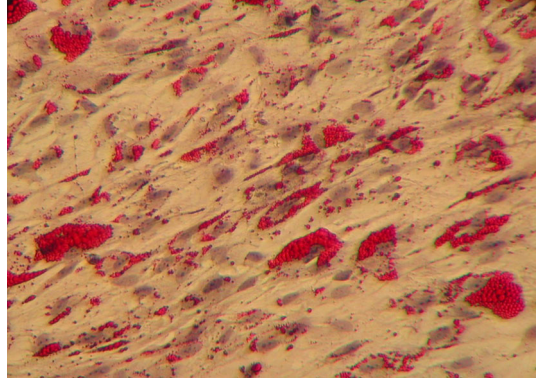
Stufe 5



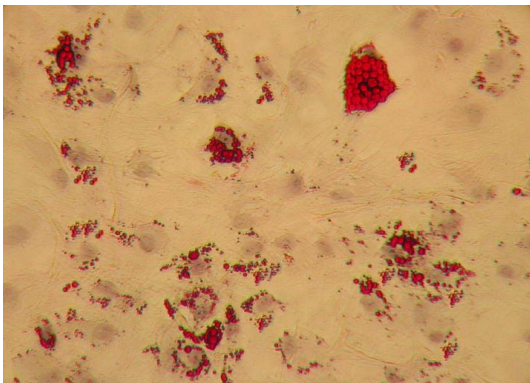
Abb. 22: Adipogener Assay - Skala (Fortsetzung)



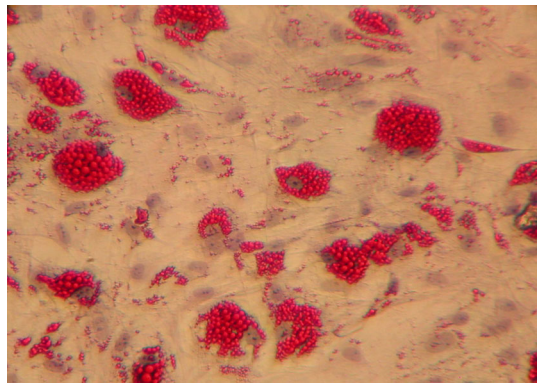
Stufe 6



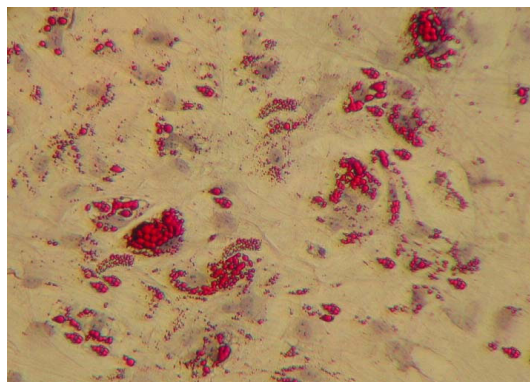
Stufe 9



Stufe 7



Stufe 10



Stufe 8

## 8. Literaturverzeichnis

**Anselme K, Broux O, Noel B, Bouxin B, Bascoulergue G, Dudermel AF, Bianchi F, Jeanfils J, Hardouin P (2002)**

In vitro control of human bone marrow stromal cells for bone tissue engineering.  
Tissue Engin 8(6): 941 – 953.

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

Growth factors and regulation of cell growth.  
Annu Rev Med 33: 445 – 463. Review.

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

Human osteogenic protein-1 induced both chondroblastic and osteoblastic differentiation of osteoprogenitor cells derived from newborn rat calvaria.  
J Cell Biol 123(4): 921 – 933.

**Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B, Caplan AI (1999)**

Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon.  
Tissue Eng 5(3): 267 – 77.

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

Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts.  
Proc Natl Acad Sci USA 95(7): 3908 – 3913.

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

The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105).  
Biochem Biophys Res Commun 265(1): 134 – 139.

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

The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells.  
Biochem Biophys Res Commun 289(2): 519 – 524.

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

Mesenchymal stem cell suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo.  
Exp Hematol 30(1): 42 - 48.

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

Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression.  
Proc Natl Acad Sci USA 97(15): 8352 – 8357.

**Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE (1990)**

Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone.  
Dev Biol 140(1): 132 – 138.

**Beresford JN (1989)**

Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow.  
Clin Orthop 240: 270 – 280.

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

The effect of dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteogenic differentiation of human marrow stromal cells in vitro.  
Arch Oral Biol 39(11): 941 – 947.

**Beresford JN, Owen ME (1998)**

Handbooks in practical animal cell biology: marrow stromal cell culture.  
United Kingdom: Cambridge University Press.

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

Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2.  
Exp Cell Res 287(1): 98 – 105.

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

Immunohistochemical localization of osteonectin in developing human and calf bone using monoclonal antibodies.  
Calc Tissue Int 43(3): 155 – 161.

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

Osteoprogenitor cells within skeletal muscle.  
J Orthop Res 18(6): 933 – 944.

**Böck P (1989)**

Färbung mit Ölrot. In: Romeis Mikroskopische Technik.  
17. Auflage, Urban und Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 378 - 379.

**Böck P (1989)**

Silbermethode nach von Kossa. In: Romeis Mikroskopische Technik.  
17. Auflage, Urban und Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 425.

**Brighton CT, Lorich DG, Kupcha R, Reilly TM, Jones AR, Woodbury RA 2nd (1992)**

The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell.  
Clin Orthop 275: 287 - 299.

**Bronckers AL, Gay S, Finkelmann RD, Butler WT (1987)**

Developmental appearance of Gla proteins (Osteocalcin) and alkaline phosphatase in tooth germs and bones of the rat.  
Bone Miner 2(5): 361 – 373.

**Bruder SP, Caplan AI (1990)**

A monoclonal antibody against the surface of osteoblasts recognizes alkaline phosphatase isoenzymes in bone liver, kidney and intestine.  
Bone 11(2): 133 – 139.

**Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE (1997)**

Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens.  
Bone 21(3): 225 – 235.

**Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE (1997)**

Growth kinetics, self-renewal and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation.  
J Cell Biochem 64(2): 278 – 294.

**Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S (1998)**

The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects.

J Bone Joint Surg Am 80(7): 985 – 996.

**Butler WT (1989)**

The nature and significance of osteopontin.

Connect Tissue Res 23(2-3): 123 – 136. Review.

**Caplan AI (1991)**

Mesenchymal stem cells.

J Orthop Res 9(5): 641 – 650.

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

Principles of cartilage repair and regeneration.

Clin Orthop 342: 254 – 269.

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

Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation.

Bone 34(3): 402 – 411.

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

Immunohistochemical localization of bone sialoprotein (BSP) in fetal porcine bone tissues: Comparisons with secreted phosphoprotein 1 (Spp1, osteopontin) and SPARC (osteonectin).

Histochem J 23(6): 281 – 289.

**Chen TL, Shen WJ, Kraemer FB (2001)**

Human BMP-7 / OP-1 induced the growth and differentiation of adipocytes and osteoblasts in bone marrow stromal cell culture.

J Cell Biochem 82(2): 187 – 199.

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

Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenic proteins (BMPs).

J Bone Joint Surg 85 A(8): 1544 – 1552.

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

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

Endocrinology 134(1): 277 – 286.

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

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

Hum Gen Ther 11(5): 729 – 738.

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

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

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

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

Identification of a subpopulation of rapid self – renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells.  
Proc Natl Acad Sci USA 98(14): 7841 - 7845.

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

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

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

Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane.  
Arthritis Rheum 44(7): 1928 – 1942.

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

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

**Dennis JE, Caplan AI (1996)**

Differentiation potential of conditionally immortalized mesenchymal progenitor cells from adult marrow of a H-2Kb-tsA58 transgenic mouse.  
J Cell Physiol 167(3): 523 – 538.

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

The Stro-1+ marrow cell population is multipotential.  
Cells Tissues Organs 170(2-3): 73 - 82.

**Devine SM, Hoffman R (2000)**

Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation.  
Curr Opin Hematol 7(6): 358 – 363. Review.

**Dexter TM (1982)**

Stromal cell associated haemopoiesis.  
J Cell Physiol 1 (Suppl): 87 – 94.

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

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

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

Human bone marrow stromal cell suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli.  
Blood 99(10): 3839 – 3843.

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

Relationships between cellular condensation, preosteoblast formation and epithelial-mesenchymal interactions in initiation of osteogenesis.  
Int J Dev Biol 39(2): 357 – 371.

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

Integrin expression by human osteoblasts cultured on degradable polymeric materials applicable for tissue engineered bone.  
J Orthop Res 20(1): 20 – 28.

- Erdo F, Buhle C, Blunk J, Hoehn M, Xia Y, Fleischmann B, Focking M, Kustermann E, Kolossov E, Hescheler J, Hossmann KA, Trapp T (2003)**  
Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke.  
J Cereb Blood Flow Metab 23(7): 780 – 785.
- Erices A, Conget P, Minguell JJ (2000)**  
Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood.  
Br J Haematol 109(1): 235 – 242.
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F (1998)**  
Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors.  
Science 279(5356): 1528 – 1530.
- Frassoni F, Labopin M, Bacigalupo A, Gluckman E, Rocha V, Bruno B (2002)**  
Expanded mesenchymal stem cells (MSC), co-infused with HLA identical hemopoietic stem cell transplants, reduce acute and chronic graft-versus-host disease: a matched pair meeting of the analysis.  
Int Soc Cell Ther , SA 006 (Abstract).
- Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV (1966)**  
Osteogenesis in transplants of bone marrow cells.  
J Embryol Exp Morphol 16(3): 381 – 390.
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP (1968)**  
Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues.  
Transplantation 6(2): 230 – 247.
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN (1976)**  
Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs.  
Exp Hematol 4(5): 267 – 274.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV (1987)**  
Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers.  
Cell Tissue Kinet 20(3): 263 – 272.
- Fromigué O, Marie PJ, Lomri A (1998)**  
Bone morphogenic protein-2 and transforming growth factor- $\beta$ 2 interact to modulate human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation.  
J Cell Biochem 68(4): 411 – 426.
- Fukuda K (2001):**  
Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering.  
Artif Organs 25(3): 187 - 193.
- Globus RK, Patterson-Buckendahl P, Gospodarowicz D (1988)**  
Regulation of bovine bone cell proliferation by fibroblast growth factor B.  
Endocrinology 123(1): 98 – 105.
- Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L (1986)**  
Fibroblast growth factor.  
Mol Cell Endocrinol 46(3): 187 – 204.
-

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

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

J Biol Chem 278(36): 28067 – 28078.

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

The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. Blood 84(12): 4164 – 4173.

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

Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells.

J Bone Miner Res 14(1): 47 – 56.

**Hall PA, Watt FM (1989) Stem cells:**

The generation and maintenance of cellular diversity.

Development 106(4): 619 – 633.

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

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

Bone 13(1): 69 – 80.

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

Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow.

Bone 13(1): 81 – 88.

**Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI (1996)**

Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: Effects of dexamethasone and IL-1.

J Cell Physiol 166(3): 585 – 592.

**Heldin CH, Hammacher A, Nister M, Westermark B (1988)**

Structural and functional aspects of platelet-derived growth factor.

Br J Cancer 57(6): 591 – 593. Review.

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

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

Nat Med 5(3): 309 – 313.

**Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD, McCarville ME, Orchard PJ, Pyeritz RE, Brenner MK (2001)**

Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta.

Blood 97(5): 1227 – 1231.

**Hu Y, Winn SR, Krajchich I, Hollinger JO (2003)**

Porous polymer scaffolds surface-modified with arginine-glycine-aspartic acid enhance bone cell attachment and differentiation in vitro.

J Biomed Mater Res 64A(3): 583 – 590.

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

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

Exp Nephrol 9(1): 444 – 450.

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

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

J Cell Biochem 64(2): 295 – 312.

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

Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.

Nature 418(4): 41 – 49.

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

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

Exp Cell Res 238(1): 265 – 272.

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

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

Eur J Clin Invest 30(5): 429 – 437.

**Klein R, Dumble LJ (1993)**

Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion.

Lancet 341: 768.

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

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

J Clin Oncol 18(2): 307 – 316.

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

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

Bone Marrow Transplant 30(4): 215 – 222.

**Koller MR, Maher RJ, Manchel I, Oxender M, Smith AK (1998)**

Alternatives to animal sera for human bone marrow cell expansion: human serum and serum-free media.

J Hematother 7(5): 413 - 423.

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

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

J Biomed Mater Res 49(3): 328 – 337.

**Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG (1999)**

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

Proc Natl Acad Sci USA 96(19): 10711 – 10716.

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

Knochen und Knorpel aus der Zellkultur.

Die gelben Hefte 42(Suppl.2): 1 – 8.



**Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F (2003)**  
Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide.  
Blood 101(9): 3722 – 3729.

**Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D, Robey PG (1997)**  
Single-colony derived strain of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo.  
J Bone Miner res 12(9): 1335 – 1347.

**Kuznetsov SA, Mankani MH, Robey PG (2000)**  
Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation.  
Transplantation 70(12): 1780 – 1787.

**Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O (2003)**  
HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells.  
Exp Hematol 31(10): 890 – 896.

**Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O (2004)**  
Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells.  
Lancet 363: 1439 – 1441.

**Lecanda F, Avioli LV, Cheng SL (1997)**  
Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenic protein-2.  
J Cell Biochem 67(3): 386 - 396.

**Lemischka IR, Raulet DH, Mulligan RC (1986)**  
Developmental potential and dynamic behavior of haematopoietic stem cells.  
Cell 45(6): 917 – 927.

**Lennon DP (1996)**  
Human and animal mesenchymal progenitor cells from bone marrow: Identification of serum for optimal selection and proliferation.  
In vitro Cell Dev Biol 32: 602 - 611.

**Lennon DP, Haynesworth SE, Bruder SP, Jaiswal N, Caplan AI (1996)**  
Development of a serum screen for mesenchymal progenitor cells from bone marrow.  
In Vitro Cell Dev Biol 32(10): 602 – 611.

**Li IW, Cheifetz S, McCulloch CA, Sampath KT, Sodek J (1996)**  
Effects of osteogenic protein-1 (BMP-7) on bone matrix protein expression by fetal rat calvarial cells are differentiation stage specific.  
J Cell Physiol 169(1): 115 – 125.

**Lin H (1997)**  
The tao of stem cells in the germline.  
Annu Rev Genet 31: 455 – 491.

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

Regulation of osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells: interaction between transforming growth factor-beta and 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> in vitro. *Calcif Tissue Int* 65(2): 173 – 180.

**Loef EB, Proper JA, Gousin AS, Shipley GD, DiCorleto AE, Moses HL (1986)**

Induction of c-sis mRNA and activity similar to platelet-derived growth factor B: a proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 83(8): 2453 – 2457.

**Long MW (2001)**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Makower AM, Wroblewski J, Pawlowski A (1988)**

Effects of IGF-I, EGF, and FGF on proteoglycans synthesized by fractionated chondrocytes of rat rib growth plate. *Exp Cell Res* 179(2): 498 – 506.

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

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

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

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

**Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI (1991)**

Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *J Orthop Res* 9(4): 465 – 476.

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

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

- Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS (2002)**  
Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells.  
J Orthop Res 20(5): 1060 – 1069.
- Oreffo ROC, Virdi AS, Triffitt JT (1997)**  
Modulation of osteogenesis and adipogenesis by human serum in human bone marrow cultures.  
Eur J Cell Biol 74(3): 251 – 261.
- Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, Werner C (2004)**  
Mesenchymale stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro.  
Stem Cells 22(3): 377 – 384.
- Owen ME, Cave J, Joyner CJ (1987)**  
Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of marrow CFU-f.  
J Cell Sci 87(Pt 5): 731 – 738.
- Owen M (1988)**  
Marrow stromal stem cells.  
J Cell Sci (Suppl) 10: 63 - 76.
- Piche JE, Graves DT (1989)**  
Study of the growth factor requirements of human bone-derived cells: a comparison with human fibroblasts.  
Bone 10(2): 131 - 138.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999)**  
Multilineage potential of adult mesenchymal stem cells.  
Science 284(5411): 143 – 147.
- Prockop DJ (1997)**  
Marrow stromal cells as stem cells for nonhaematopoietic tissue.  
Science 276(5309): 71 – 74.
- Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL (2003)**  
One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissue.  
Proc Natl Acad Sci (USA) 100(1): 11917 - 11923.
- Puleo DA (1997)**  
Dependence of mesenchymal stem cell responses on duration of exposure to bone morphogenetic protein-2 in vitro.  
J Cell Physiol 173(1): 93 – 101.
- Reyes M, Verfaillie CM (2001)**  
Characterization of multipotent adult progenitor cells. A subpopulation of mesenchymal stem cells.  
Ann N Y Acad Sci 938: 231 – 233.
- Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM (2001)**  
Purification and ex vivo expansion of postnatal human bone marrow mesodermal progenitor cells.  
Blood 98(9): 2615 – 2625.
-

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

Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow.  
J Clin Invest 109(3): 337 – 346.

**Rickard DJ, Sullivan TA, Shenker BJ, Leboy PS, Kazhdan I (1994)**

Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2.  
Dev Biol 161(1): 218 – 228.

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

Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow.  
J Bone Miner Res 11(3): 312 – 324.

**Robertson JA (2001)**

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

**Robey PG, Young MF, Flanders KC, Roche NS, Kondaiah A, Reddi AH, Termine JD, Sporn MB, Roberts AB (1987)**

Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type B (TGF-B) in vitro.  
J Cell Biol 105(1): 457 – 463.

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

The biology of platelet-derived growth factor.  
Cell 46(2): 155 – 169. Review.

**Sachs L (1987)**

The molecular control of blood cell development.  
Science 238(4832): 1374 – 1379.

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

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

**Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, Jones WK, Sasak H, Tucker RF, White K, Coughlin JE, Tucker MM, Pang RLH, Corbett C, Ozkaynak E, Oppermann H, Rueger DC (1992):**

Recombinant human osteogenic protein (BMP-7) induces new bone formation in vivo with specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro.  
J Biol Chem 267(28): 20352 – 20362.

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

Making bone: implant insertion into tissue-engineered bone for maxillary sinus floor augmentation – a preliminary report.  
J Cranio Maxillo Surg 31: 34 – 39.

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

Insulin-like growth factor I supports differentiation of cultured osteoblast-like cells.  
FEBS Lett 173(1): 48 – 52.

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

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

**Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA (1997)**

Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood* 89(3): 776 – 779.

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

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

**Shigeno Y, Ashton BA (1995)**

Human bone-cell proliferation in vitro decreases with human donor age. *J Bone Joint Surg (Br.)* 77(1): 139 – 142.

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

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

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

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

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

Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol* 20(6): 592 – 596.

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

Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241(4861): 58 – 62.

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

Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol Ther* 9(5): 747 – 756.

**Tenenbaum HC, Limeback H, McCulloch CA, Mamujee H, Sukhu B, Torontali M (1992)**

Osteogenic phase-specific co-regulation of collagen synthesis and mineralization by beta-glycerophosphate in chick periosteal cultures. *Bone* 13(2): 129 – 138.

**Trepagnier DM (2000)**

Human embryonic stem cell research: implications from an ethical and legal standpoint. *J La State Med Soc* 152(12): 616 – 624. Review.

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

Induction of protein kinase C activation and Ca<sup>2+</sup> mobilization by fibroblast growth factor in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett* 191(2): 205 – 210.

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

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

Hum Gem Ther 13(13): 1605 – 1610.

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

Unexpected potential of adult stem cells.

Ann N Y Acad Sci 996: 231 - 234.

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

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

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

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

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

Muscle Nerve 18(12): 1417 - 1426.

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

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

Blood 85(9): 2422 – 2435.

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

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

Bone 27(2): 185 – 195.

**Weissman IL (2000)**

Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution.

Cell 100(1): 157 – 168.

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

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

Br J Haematol 121(2): 368 – 374.

**Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG (1996)**

A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in UK.

Lancet 347: 921 – 925.

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

Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons.

J Neurosci Res 61(4): 364 – 370.

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

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

Transfusion 42(7): 921 – 927.

**Yamamoto N, Isobe M, Negishi A, Yoshimasu H, Shimokawa H, Ohya K, Amagasa T, Kasugai S (2003)**

Effect of autologous serum on osteoblastic differentiation in human bone marrow cells.  
J Med Dent Sci 50(1): 63 – 69.

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

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

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

Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair.  
J Orthop Res 16(4): 406 – 413.

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

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

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

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

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

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

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

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

## 9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. A. R. Zander danke ich für die Vergabe des Themas, die freundliche Unterstützung und für das zur Verfügung stellen aller benötigten Materialien.

Herrn Dr. med. N. Stute danke ich für die Anleitung und die Hilfestellungen im Umgang mit mesenchymalen Stammzellen, die Betreuung der wissenschaftlichen Arbeit und die anregenden Diskussionen bezüglich des Themas.

Herrn Dr. M. Bubenheim danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Frau Dr. C. Lange danke ich für die Durchführung und Auswertung der Flow-Zytometrie.

Den KMT - Koordinatorinnen Frau J. Schulz und Frau G. Amtsfeld danke ich für die freundliche Unterstützung und die Blutentnahmen.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. R. Schmelzle bedanke ich mich für das zur Verfügung stellen der Laboratorien der Nordwestdeutschen Kieferklinik.

Mein besonderer Dank gilt den freiwilligen Spendern von Knochenmark und Blut.

Abschließend danke ich meinem Mann für seine Unterstützung, seine nicht zu erschütternde Geduld und sein Verständnis. Du warst mir eine große Hilfe!



## 10. Lebenslauf

13. Mai 1976      Geboren in Herzberg / Elster als jüngstes von 2 Kindern der Eheleute Hans Jürgen Gardzielewski und Marita Irmgard Gardzielewski, geborene Herbst
- September 1982      Einschulung  
in die Polytechnische Oberschule in Falkenberg / E.
- Mai 1995      Bestehen des Abiturs  
am Städtischen Gymnasium in Falkenberg / E.
- August 1995      Freiwilliges Soziales Jahr im Familienentlastenden Dienst
- Oktober 1996      Beginn des Humanmedizinstudiums  
an der medizinischen Fakultät der Universität Leipzig
- Mai 2003      Bestehen der ärztlichen Prüfung  
an der medizinischen Fakultät der Universität Leipzig
- April 2004      Beginn der Tätigkeit als Ärztin im Praktikum

## **Erklärung**

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

Katja Holtz