

**Plastizität humaner multipotenter mesenchymaler  
Stromazellen und ihre Präparation für die  
regenerationsmedizinische Anwendung in der Pädiatrie**

der Fakultät für Biologie  
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

von

**Martin Vaegler**  
aus Herzberg/Elster

vorgelegte  
D i s s e r t a t i o n

**2009**

Tag der mündlichen Prüfung: 23. September 2009

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Hanspeter A. Mallot

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Rupert Handgretinger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Hans-Georg Rammensee

## **Präambel**

Gesetzlich geschützte Warenzeichen werden ohne besondere Kennzeichnung verwendet.

Bei der Verwendung bestimmter Abkürzungen für Zellen, beispielsweise „MSC“ oder „PBMC“, steht die Nomenklatur hier für die Beschreibung der Zellpopulationen insgesamt. Auf eine zusätzliche Mehrzahlbildung durch das Anfügen eines „s“ wird demzufolge verzichtet.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>V</b>
------------------------------	----------

<b>TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>XI</b>
--	-----------

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
----------	------------------------	----------

<b>1</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>2</b>
----------	----------------	----------

<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
----------	-------------------	----------

2.1	HUMANE MULTIPOTENTE MESENCHYMALE STROMAZELLEN	3
-----	---	---

2.2	IMMUNPHÄNOTYP VON MESENCHYMALEN STROMAZELLEN	5
-----	--	---

2.3	ISOLATION VON MESENCHYMALEN STROMAZELLEN AUS GEWEBEN	7
-----	--	---

2.4	PLASTIZITÄT VON MESENCHYMALEN STROMAZELLEN	9
-----	--	---

2.5	PARAKRINE EFFEKTE MULTIPOTENTER MESENCHYMALER STROMAZELLEN	11
-----	--	----

2.6	IMMUNMODULATORISCHE EIGENSCHAFTEN VON MESENCHYMALEN STROMAZELLEN	12
-----	---	----

2.7	ZELLKONTAKTABHÄNGIGE INTERAKTIONEN VON MESENCHYMALEN STROMAZELLEN	15
-----	--	----

2.8	ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN MSC UND TUMORSTROMA	16
-----	--	----

2.9	KLINISCHES POTENTIAL VON MESENCHYMALEN STAMMZELLEN	18
-----	--	----

2.9.1	PRÄKLINISCHE ANWENDUNGEN IN EXPERIMENTELLEN TIERMODELLEN	21
-------	--	----

2.9.2	KLINISCHE ANWENDUNGEN	22
-------	-----------------------	----

2.9.3	LOKALE ANWENDUNG BEI AVASKULÄREN OSTEONEKROSEN	24
-------	--	----

2.10	MIGRATION UND HOMING VON MESENCHYMALEN STAMMZELLEN	25
------	--	----

2.11	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	27
------	---------------------------	----

<b>3</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>28</b>
----------	-----------------	-----------

3.1	PRIMÄRE ZELLKULTUREN UND BAKTERIENSTÄMME	28
-----	--	----

3.2	ZELLKULTURMEDIEN UND ZUSÄTZE	28
-----	------------------------------	----

3.2.1	ZELLKULTURMEDIEN	28
-------	------------------	----

---

3.2.2	MEDIUMZUSÄTZE	28
3.2.3	DIFFERENZIERUNGSZUSÄTZE	28
<b>3.3</b>	<b>NUKLEINSÄUREN</b>	<b>29</b>
<b>3.4</b>	<b>OLIGONUKLEOTIDE</b>	<b>29</b>
<b>3.5</b>	<b>ENZYME</b>	<b>31</b>
<b>3.6</b>	<b>PLASMIDE</b>	<b>31</b>
<b>3.7</b>	<b>KITS</b>	<b>31</b>
<b>3.8</b>	<b>ANTIKÖRPER</b>	<b>32</b>
3.8.1	PRIMÄRANTIKÖRPER	32
3.8.2	SEKUNDÄRANTIKÖRPER	32
3.8.3	ISOTYPEN	32
<b>3.9</b>	<b>CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN</b>	<b>33</b>
<b>3.10</b>	<b>VERBRAUCHSMATERIALIEN</b>	<b>34</b>
<b>3.11</b>	<b>FIRMENÜBERSICHT</b>	<b>35</b>
<b>3.12</b>	<b>LABORGERÄTE</b>	<b>37</b>
<b>3.13</b>	<b>SOFTWARE</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>METHODEN</b>	<b>38</b>
<hr/>		
<b>4.1</b>	<b>ALLGEMEINE ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN</b>	<b>38</b>
4.1.1	AGAROSEGELELEKTROPHORESE	38
4.1.2	SPEKTROPHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN	38
4.1.3	NUKLEINSÄUREAUFREINIGUNG DURCH PHENOL/CHLOROFORM-EXTRAKTION	38
<b>4.2</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN MIT RNA UND DNA</b>	<b>39</b>
4.2.1	ISOLATION VON RNA AUS EUKARYOTISCHEN ZELLEN	39
4.2.2	SYNTHESE VON cDNA DURCH RT-PCR	39
4.2.3	AMPLIFIKATION VON FRAGMENTEN AUS cDNA	40
4.2.4	CHIMÄRISMUSANALYSE DURCH AMPLIFIKATION VON MIKROSATELLITEN	40
4.2.5	ISOLIERUNG UND AUFREINIGUNG VON DNA AUS AGAROSEGELEN	41
4.2.6	RESTRIKTIONSVERDAU VON DNA	41
4.2.7	LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN	41
4.2.8	AMPLIFIKATION AUS BAKTERIENKOLONIEN („KOLONIE-PCR“)	42
4.2.9	SEQUENZIERUNG VON DNA	42
<b>4.3</b>	<b>ARBEITEN MIT PROKARYOTISCHEN ZELLKULTUREN</b>	<b>43</b>
4.3.1	KULTIVIERUNG UND KRYOKONSERVIERUNG VON E. COLI	43

---

---

4.3.2	TRANSFORMATION KOMPETENTER E. COLI	43
4.3.3	PLASMIDPRÄPARATIONEN AUS E. COLI	43
<b>4.4</b>	<b>ARBEITEN MIT EUKARYOTISCHEN ZELLKULTUREN</b>	<b>44</b>
4.4.1	ISOLATION, KULTIVIERUNG UND KRYOKONSERVIERUNG VON MSC	44
4.4.2	GABEKRITERIEN VON MSC ZUR KLINISCHEN ANWENDUNG	45
4.4.3	BESIEDLUNG VON POLYMERGERÜSTEN DURCH MSC	46
4.4.4	PROLIFERATIONSASSAY	46
4.4.5	IMMUNOPHÄNOTYPISIERUNG DURCH FACS-ANALYSE	47
4.4.6	IN VITRO DIFFERENZIERUNGEN UND FÄRBENACHWEISE VON MSC	47
4.4.7	IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNGEN	49
4.4.8	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN	50
4.4.9	NACHWEIS DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE	51
4.4.10	ZYTOKINASSAY	51
4.4.11	KOMPETTIVER RADIOIMMUNOASSAY	52
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>53</b>
<b>5.1</b>	<b>MESENCHYMALE STROMAZELLEN AUS ZAHNPAPILLEN</b>	<b>53</b>
5.1.1	MATERIAL UND ZELLISOLATION	53
5.1.2	KULTUR UND MORPHOLOGIE VON MSC AUS ZAHNPAPILLEN	53
5.1.3	VERGLEICH DER PROLIFERATION VON UNTERSCHIEDLICH PROPAGIERTEN MSC	54
5.1.4	IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG	55
5.1.5	DIFFERENZIERUNG VON MSC IN ADIPOZYTEN, CHONDROZYTEN UND OSTEOBLASTEN	56
5.1.6	RT-PCR VON DIFFERENZIERUNGSRELEVANTEN EXPRESSIONSMARKERN	58
5.1.7	DIFFERENZIERUNG VON MSC IN INSULINPRODUZIERENDE INSELZELLEN	59
5.1.8	IMMUNHISTOLOGISCHER NACHWEIS EMBRYONALER MARKER IN ZAHNPAPILLEN	60
<b>5.2</b>	<b>BIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN UND KLINISCHE ANWENDUNG VON MSC BEI STEROIDINDUZIERTEN KNOCHENDEFEKTEN</b>	<b>62</b>
5.2.1	OSTEOGENES POTENZIAL VON KM-MSC BEI PATIENTEN MIT AVN	63
5.2.2	NACHWEIS ALKALISCHER PHOSPHATASE BEI OSTEOGENER DIFFERENZIERUNG	64
5.2.3	INDUKTION DER VEGF-SEKRETION BEI MSC DURCH HYPOXIE UND IFN $\gamma$	65
5.2.4	SEKRETION VON IGF UND IGFBP UNTER HYPOXIEBEDINGUNGEN	66
5.2.5	CHROMOSOMALE STABILITÄT VON MSC IN STANDARDKULTUR	67
5.2.6	PATIENTENKOLLEKTIV MIT AVASKULÄRER OSTEONEKROSE	68

---

---

5.2.7	APPLIKATION DER MSC UND RADIOLOGISCHE VERLAUFSKONTROLLE BEI PATIENTEN MIT AVN	68
5.2.8	DREIDIMENSIONALE ZELLKULTUREN VON MSC AUF POLYMERGERÜSTEN	70
<b>5.3</b>	<b>MIGRATION UND HOMING VON MESENCHYMALEN STROMAZELLEN</b>	<b>71</b>
5.3.1	UNTERSUCHUNG DER MIGRATION VON MSC NACH TRANSFUSION	71
5.3.2	KONSTRUKTION EINES RETROVIRALEN TRANSFEKTIONSPLASMID FÜR FUT6	74
<b>6</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b><u>77</u></b>
<b>6.1</b>	<b>ISOLATION HUMANER MULTIPOTENTER MESENCHYMALER STROMAZELLEN AUS ZAHNPAPILLEN</b>	<b>78</b>
6.1.1	VERGLEICH DER BIOLOGISCHEN EIGENSCHAFTEN VON Z-MSC UND KM-MSC	78
6.1.2	EXPRESSIONSANALYSE VON EMBRYONALEN MARKERN AUF ZAHNPAPILLEN	82
6.1.3	DIFFERENZIERUNG VON KM-MSC IN INSULINPRODUZIERENDE INSELZELLEN	82
<b>6.2</b>	<b>THERAPEUTISCHES POTENZIAL VON KM-MSC</b>	<b>83</b>
6.2.1	BIOLOGISCHE GRUNDLAGEN	83
6.2.2	KLINISCHE ANWENDUNG VON KM-MSC BEI PATIENTEN MIT AVN	85
<b>6.3</b>	<b>MIGRATION UND HOMING VON MESENCHYMALEN STROMAZELLEN</b>	<b>88</b>
<b>6.4</b>	<b>BEWERTUNG DER VERSUCHE UND AUSBLICK</b>	<b>91</b>
	<b><u>REFERENZEN</u></b>	<b><u>93</u></b>
	<b><u>PUBLIKATIONEN</u></b>	<b><u>117</u></b>
	<b><u>DANKSAGUNG</u></b>	<b><u>118</u></b>
	<b><u>LEBENS LAUF</u></b>	<b><u>120</u></b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALCAM	Activated leukocyte cell adhesion molecule
Ak	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
ASA	Arylsulfatase A
AT	Ataxia teleangiectasia
AVN	Avaskuläre Osteonekrosen
bFGF	Basic fibroblast growth factor
bp	Basenpaar
BM-MSC	Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell
BMP	Bone morphogenic protein
BSP	Bone sialoprotein
BSA	Bovine serum albumin
CBF	Core binding factor
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
CFU-F	Colony-forming unit fibroblast
CGH	Comparative genomic hybridization
CMV	Cytomegalovirus
Col	Kollagen
cpm	Counts per minute
CT	Computertomographie
CTL	Cytotoxic T lymphocytes
CXCR	C-X-C motif receptor
DAB	3, 3'-Diaminobenzidin
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DC	Dendritic cells

---

ddH <sub>2</sub> O	doppelt deionisiertes Wasser
DEX	Dexamethason
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphat
DPDC	Dental papilla-derived cells
DPSC	Dental pulp stem cells
dsDNA	Double-stranded DNA
DSHB	Developmental studies hybridoma bank
E. coli	Escherichia coli
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	Enhanced green fluorescent protein
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ES	Embryonale Stammzellen
FA	Fanconi-Anämie
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FFP	Fresh frozen plasma, human
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Forward scatter
FUT	Fucosyltransferase
fwd	Forward primer
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
Gal(β1-4)GlcNAc	N-Acetyl-Laktosamin
GLD	Globoidzelleukodystrophie
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

---

---

GMP	Good manufacturing practice
GvHD	Graft-versus-host disease
HAV	Hepatitis A Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGF	Hepatocyte growth factor
HIF	Hypoxia-induced factor
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HOPE	HEPES glutamic acid buffer mediated organic solvent protection effect
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HSC	Hematopoietic stem cells
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP	IGF-binding protein
IL	Interleukin
INS	Insulin
IRES	Internal ribosomal entry site
ISCT	International society for cellular therapy
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
IU	International unit
Kb	Kilobasenpaare
KM-MSC	von Knochenmark abgeleitete mesenchymale Stromazellen
LB	Luria-Bertani
LFA	Lymphocyte function-associated molecule
LIF	Leukemia inhibitory factor
LPL	Lipoproteinlipase

---

---

LTR	Long terminal repeats
mAb	Monoclonal antibody
MACS	Magnetic bead cell sorting
MCAM	Melanoma cell adhesion molecule
MCS	Multiple cloning site
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MHC	Major histocompatibility complex
MLD	Metachromatische Leukodystrophie
MLR	Mixed lymphocyte reaction
MMP	Matrixmetalloproteasen
mPRED	Methylprednisolon
MRD	Minimal residual disease
mRNA	Messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomograph
MS	Multiple Sklerose
MSC	Multipotent mesenchymal stromal cell, syn. Mesenchymal stem cell
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium
NBS	Nijmegen-Breakage-Syndrom
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NHEJ	Non-homologous end joining
NK	Natürliche Killerzellen
NKG2D	Natural-killer group 2, member D
NOD/SCID	Non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency
OD	optische Dichte
OI	Osteogenesis imperfecta
ORF	Open reading frame
ori ColE1	Origin of replication of Colicin E1
OPLA	Open-cell polylactic acid
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline

---

---

PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PDLSC	Periodontal ligament stem cells
PD-MSC	Papilla dentalis-derived mesenchymal stromal cell
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	Pyrococcus furiosus
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PRED	Prednisolon
RA	Rheumatoide Arthritis
REM	Rasterelektronenmikroskop
rev	Revers primer
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SA	Streptavidin
SCAP	Stem cells from the apical papilla
SCID	Severe combined immunodeficiency
SDF	Stromal cell-derived factor
SHED	Stem cell from human exfoliated deciduous teeth
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
sLewis <sup>x</sup>	Sialyl-Lewis X
sO <sub>2</sub>	Sauerstoffsättigung
SOC	Super optimal catabolite
SSC	Side scatter
SSEA	Stage-specific embryonic antigen
STR	Short tandem repeats
Tab.	Tabelle

---

Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TGF	Transforming growth factor
TKZ	Thrombozytenkonzentrat
TNF	Tumornekrosefaktor
T-NHL	T-lymphoblastisches Non-Hodgkin-Lymphom
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
UV	Ultraviolett
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial-derived growth factor
VLA	Very late antigen
Z-MSC	von Weisheitszähnen abgeleitete mesenchymale Stromazellen
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZZMK	Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

## Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tab. 3-1:	Übersicht der Klonierungs- und Sequenzierungsprimer.	29
Tab. 3-2:	Übersicht der PCR-Primer zur Amplifikation aus cDNA.	30
Tab. 3-3:	Übersicht der PCR-Primer zur Chimärismusanalyse.	30
Tab. 5-1:	Übersicht der AVN-Patienten mit MSC-Applikation.	68
Tab. 5-2:	Übersicht der HLA-Typisierung der Empfänger und Spender.	73
Tab. 6-1:	Vergleich der Plastizität von DPDC, SCAP und Z-MSC.	81
Abb. 2-1:	Plastizität von multipotenten mesenchymalen Stromazellen.	10
Abb. 5-1:	Ursprungsgewebe von Z-MSC.	53
Abb. 5-2:	Morphologie von Z-MSC.	54
Abb. 5-3:	MTS-Proliferationsassay.	54
Abb. 5-4:	Immunphänotyp von Z-MSC.	55
Abb. 5-5:	Adipogene und osteogene Differenzierung von KM-MSC und Z-MSC.	57
Abb. 5-6:	Chondrogene Differenzierung von KM-MSC und Z-MSC.	58
Abb. 5-7:	RT-PCR-Analyse nach adipogener und osteogener Differenzierung.	59
Abb. 5-8:	RT-PCR-Analyse nach Induktion in insulinproduzierenden Inselzellen.	60
Abb. 5-9:	Indirekte Immunfluoreszenz bei Paraffinschnitten von Zahnpapillen.	62
Abb. 5-10:	MSC-Kultur unter GMP-Bedingungen.	62
Abb. 5-11:	Osteogene Differenzierung von MSC unter Einfluss von Hypoxie und IFN $\gamma$ .	63
Abb. 5-12:	Nachweis Alkalischer Phosphatase.	64
Abb. 5-13:	VEGF-Sekretion von MSC in Abhängigkeit von Hypoxie und IFN $\gamma$ .	65
Abb. 5-14:	Radioimmunoassay von IGF und IGFBP in MSC-Kulturen.	66
Abb. 5-15:	CGH-Array zur Analyse chromosomaler Stabilität von MSC.	67
Abb. 5-16:	Diagnostische Darstellung des Behandlungsverlaufs eines AVN-Patienten.	69
Abb. 5-17:	REM-Aufnahmen von Scaffolds vor und nach MSC-Besiedlung.	70
Abb. 5-18:	Chimärismusanalyse nach konsekutiven Transplantationen von HSC und MSC.	72
Abb. 5-19:	Detektion von Spender-MSC nach Transplantation in Empfängergeweben.	73
Abb. 5-20:	Vollständige Vektorkarte von MigR1 mit dem klonierten FUT6-Insert.	75
Abb. 5-21:	Gelelektrophoretische Analyse von DNA-Fragmenten.	75
Abb. 6-1:	Modell der beteiligten Faktoren und Ereignisse bei avaskulärer Osteonekrose.	87

# 1 Zusammenfassung

Humane multipotente mesenchymale Stromazellen (MSC) können in verschiedene Zelltypen differenzieren. Zusätzlich besitzen sie auch immunmodulatorische Eigenschaften und sekretorische Fähigkeiten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MSC nicht nur aus Knochenmark (KM-MSC), sondern auch aus den Papillen von noch retinierten Weisheitszähnen (Z-MSC) isoliert und propagiert werden können. Z-MSC unterscheiden sich nicht wesentlich von KM-MSC hinsichtlich Morphologie, Proliferation, Immunphänotyp und Differenzierung. Geringe Unterschiede waren lediglich im Zusammenhang mit der adipogenen Differenzierungskapazität der Z-MSC und bei der Expression des osteogenen Markers *Bone sialoprotein* (BSP) festzustellen. Dies veranschaulichte, dass Zahnpapillen leicht für die Gewinnung von MSC genutzt werden können.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der regenerationsmedizinischen, lokalen Anwendung von MSC bei steroidinduzierten avaskulären Osteonekrosen (AVN) des Knies. Es wurden unter anderem *in vitro* Experimente durchgeführt, die den Einfluss von Hypoxie und IFN $\gamma$  auf MSC bezüglich des osteogenen Differenzierungspotenzials und der Sekretion des angiogenetischen Faktors VEGF analysierten. Die Ergebnisse zeigten die uneingeschränkte osteogene Differenzierung von MSC bei reduziertem Sauerstoffpartialdruck von 3% und die Sekretion von VEGF bei zusätzlicher O $_2$ -Reduktion auf 1%. Daraufhin sollten MSC therapeutisch eingesetzt werden. An einer kleinen Kohorte von fünf pädiatrischen AVN-Patienten, denen expandierte autologe MSC während der konventionellen Therapie der *Core Decompression* in die nekrotische Läsion injiziert worden waren, konnte Verträglichkeit und Sicherheit des Transplantats demonstriert werden. Bei einem mittleren *Follow-up* von 29 Monaten konnte bei allen Patienten Schmerz reduziert, Beweglichkeit verbessert und die Knochenregeneration radiologisch beobachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte zu dem an einem Patienten mit akuter *Graft-versus-host disease* (GvHD) das *Engraftment* und die Verteilung in den Organen von systemisch applizierten MSC untersucht werden. Durch Detektion der HLA-Disparität von Empfänger und Spender-MSC konnten immunhistologisch transfundierte MSC in Leber und Teilen des Darms dargestellt werden. Damit verbunden, wurden erste Experimente zur Modifikation der Glykanstruktur von MSC unternommen, die auf die Verbesserung der Migrationseigenschaften zielen.

# 1 Summary

Human multipotent mesenchymal stromal cells (MSC) may differentiate into several different cell types. In addition, MSC display immunomodulatory and secretory properties. This work has shown that MSC can be isolated not only from bone marrow aspirates, but also from the *papilla dentalis* of retained wisdom teeth (PD-MSC). With regards to morphology, proliferation, immunophenotype and differentiation characteristics, BM-MSC and PD-MSC do not differ considerably from each other. Only slight differences in association with the adipogenic differentiation capacity of PD-MSC and the expression of the osteogenic differentiation marker bone sialo protein (BSP) were identified. These results illustrate that *papilla dentalis* may be easily be used as a source for MSC extraction.

A further section of this study focused on the regenerative aspects of the local administration of MSC for the treatment of steroid-induced avascular osteonecrosis (AVN) of the knee. Among others *in vitro* experiments were carried out to analyze relevant aspects such as the influence of hypoxia and IFN $\gamma$  on the osteogenic differentiation potential of MSC and the secretion of angiogenic factor VEGF. Results showed no effect on osteogenic differentiation of MSC under oxygen tension of 3% and no effect on secretion of VEGF at further reduced oxygen levels of 1%. These results lead us to use MSC for therapeutic treatment. A small cohort of five patients with AVN was treated by instillation of expanded autologous MSC to the site of necrotic lesion during conventional core decompression surgery. Application of MSC in this group demonstrated safety and feasibility. Within the median follow-up of 29 months pain was reduced and mobility was improved for all patients. Radiological findings showed regeneration of the treated bone.

Lastly, this work evaluated the engraftment and distribution of systemically applied MSC in different tissues of a patient treated for acute graft-versus-host disease (GvHD). Through detection of HLA-disparity between recipient and donor MSC the existence of transfused MSC in liver, colon and small intestine could be shown immunohistologically. In association with this, preliminary experiments were performed to modify particular MSC glycan structures with the aim of improving homing capacity.

## 2 Einleitung

### 2.1 Humane multipotente mesenchymale Stromazellen

Erstmals wurden humane multipotente mesenchymale Stromazellen (MSC, *multipotent mesenchymal stromal cell*) 1968 von Friedenstein *et al.* aus dem Knochenmark isoliert und beschrieben<sup>1</sup>. Diese Zellen wurden darauf folgend als plastikadhärent, fibroblastenähnlich und zu Knochen-vorläuferzellen, sprich osteogen, differenzierbar charakterisiert<sup>2</sup>. Auf diesen Arbeiten beruhend, wurde der Begriff der Knochenmarkstromazelle erstmals durch Maureen Owen geprägt<sup>3-5</sup>. In den 90er Jahren charakterisierte dann Caplan diese Zellpopulation weiter und bezeichnete sie als „Mesenchymale Stammzellen“<sup>6</sup>. In verschiedenen Studien konnte später gezeigt werden, dass es sich hierbei um eine eigenständige, aber heterogene Zellpopulation handelte, die in der Lage war, in verschiedene andere Zelltypen wie Chondrozyten, Myoblasten oder Tenozyten zu differenzieren<sup>7</sup>. Es stellte sich heraus, dass diese knochenmarkabgeleitete Population nicht-hämatopoetischen Ursprungs und multipotente mesenchymale Stromazellen waren. Der ursprünglich verwendete Begriff der „Mesenchymalen Stammzellen“ musste präzisiert werden. Zwar waren Eigenschaften der MSC wie Selbsterneuerung, die Fähigkeit, *in vivo* in multiple Zelltypen zu differenzieren und Regenerationsfähigkeit von verschiedenen Geweben unbestritten, jedoch lagen keine Experimente vor, die beispielsweise für hämatopoetische Stammzellen zum Anforderungskatalog der Definition „Stammzelle“ gehörten. So existiert bisher kein Nachweis des langlebigen *Engraftment* nach Transplantation und eine erfolgreiche Retransplantation wie es für hämatopoetische Stammzellen im *Non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency*-(NOD/SCID)-Mausmodell anerkannt wurden. Um weitere Konfusionen zu vermeiden und auch im Sinne der Vergleichbarkeit durchgeführter Studien mit MSC, wurde daher 2005 von der *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) der Begriff der „multipotenten mesenchymalen Stromazelle“ vorgeschlagen und verbreitet. Das Akronym MSC sollte dabei weiterhin Bestand haben<sup>8</sup>. Für die vorliegende Arbeit ist mit der Abkürzung MSC die Population der multipotenten mesenchymalen Stromazellen gemeint und zwar - sofern nicht ausdrücklich anders erwähnt - MSC humanen Ursprungs.

MSC können aus Knochenmarkaspiraten über Plastikadhärenz isoliert werden. Zuvor kann eine Erythrozytenlyse oder eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt werden<sup>9-11</sup>. Im Knochenmark weisen MSC jedoch nur eine Frequenz von 0,01% - 0,1% der kernhaltigen Zellen auf<sup>12</sup>. Das sind rund hundertmal weniger als hämatopoetische Stammzellen (HSC, *Hematopoietic stem cell*)<sup>13 14</sup>. Inzwischen konnten MSC auch aus einer Reihe anderer Gewebe isoliert werden. So

sind neben fetalem Gewebe der Leber, Lunge und Milz, der Plazenta, dem Fruchtwasser oder Nabelschnurblut MSC auch beispielsweise in Synovialflüssigkeit, Fettgewebe, Thymus und einzelnen Geweben von Zähnen wie Pulpa, Ligament oder Zahnfollikeln gefunden worden<sup>15-24</sup>. Dabei griff man auf unterschiedliche Methoden der Isolation und Expansion zurück. Möglich waren zum Beispiel die Dichtegradientenzentrifugation von mononukleären Zellen oder die Isolation über verschiedene Oberflächenmoleküle via Durchflusszytometrie (FACS, *Fluorescence activated cell sorting*) oder *Magnetic cell sorting* (MACS)<sup>25-28</sup>. Die so gewonnenen MSC stellten jedoch keine einheitliche Zellpopulation dar<sup>29,30</sup>. Für die Herstellung vergleichbarer Zellentitäten wurden daraufhin in einem zweiten *Position Paper* der ISCT Minimalkriterien formuliert, um die Identität der heterogenen Population von MSC zu beschreiben<sup>31</sup>. Es wurden drei maßgebende Kriterien festgelegt: Erstens sind alle MSC plastikadhärent, zweitens weisen sie ein charakteristisches Oberflächenexpressionsmuster von Proteinen auf, drittens verfügen MSC-Populationen über die multipotente Fähigkeit in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten zu differenzieren. Hinsichtlich der Expression von Oberflächenmarkern müssen MSC positiv für CD73 (Ecto-5' Nukleotidase), CD90 (Thy-1) und CD105 (Endoglin) sein. Im Gegensatz dazu sollten CD34 als Marker für hämatopoetische Vorläufer- und Endothelzellen, CD45 als Leukozytenmarker, CD14 oder CD11b als Monozyten- und Makrophagenmarker, CD19 oder CD79a als Marker für B-Zellen und HLA-DR im unstimulierten Zustand von MSC nicht auf der Oberfläche exprimiert sein. Eine Oberflächenexpression von HLA-DR ist erst nach Stimulation, zum Beispiel durch Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), detektierbar und sollte gesondert im experimentellen Kontext erwähnt werden. Über weitere Markerantigene, die für die MSC Isolation durch Antikörperselektion charakterisiert und diskutiert wurden, soll in einem der nachfolgenden Abschnitte separat und ausführlicher gesprochen werden. In der Tabelle ist ein Überblick aller maßgebenden Kriterien zur Identifizierung von MSC zusammengestellt.

**Tab. 2-1: Kriterien zur Identifizierung von MSC.**

Plastikadhärenz	
Immunphänotyp - positiv:	CD73, CD90, CD105, HLA-ABC
- negativ:	CD14, CD19, CD34, CD45, HLA-DR
Differenzierung ( <i>in vitro</i> )	Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten

Unabhängig von der Art der Isolationsmethode bilden MSC in Kultur Kolonien, die aus einzelnen Zellen hervorgehen, wenn isolierte Stromazellen in niedriger Dichte ausgebracht

werden. Diese Kolonien wurden als *Colony-forming unit fibroblast* (CFU-F) bezeichnet<sup>32,33</sup>. Innerhalb dieser Einzelzellkolonie konnten mindestens zwei unterschiedliche Zellarten gefunden werden: Zum einen kleine, schnell proliferierende Zellen und zum anderen größere, reife Zellen, die MSC, die sich weniger stark selbst erneuern<sup>34,35</sup>. Expandierte man einzelne dieser MSC-Kolonien, zeigten sich zwischen den Klonen unterschiedliche Präferenzen hinsichtlich ihrer Plastizität<sup>13</sup>. Mehrere Gruppen haben mit Hilfe immunphänotypischer Untersuchungen über die Existenz unterschiedlicher Subpopulationen von MSC berichtet. Für einzelne dieser definierten Zellfraktionen, die sich ausschließlich in allen vorhandenen CFU-F einer Kultur befanden, wurden zusätzlich Unterschiede im Differenzierungsverhalten demonstriert. So zeigte beispielsweise eine von Battula *et al.* durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern als MSCA<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> beschriebenen Subpopulation die Kapazität in Adipozyten zu differenzieren, wohingegen die MSCA<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>-Population diese Eigenschaft nicht besaß<sup>36</sup>. Weitere Subpopulationen wurden auch durch die Detektion von *frizzled-9* oder Stro-1 auf MSC publiziert<sup>29,37</sup>.

Als einen abschließenden Punkt bei der Charakterisierung von MSC gab das *Position Paper II* zu bedenken, dass eine lange und intensive Expansion von MSC, die Möglichkeit eventuell auftretender chromosomaler Aberrationen zur Folge hat<sup>31</sup>. Diese Beobachtung stand auch im Zusammenhang mit Analysen des Zellalterungsprozesses bei langzeitkultivierten MSC<sup>38</sup>. Die Untersuchungen zeigten Auswirkungen der Seneszenz auf alle relevanten Parameter, die zur Definition von MSC heran gezogen wurden, also auf Morphologie, Oberflächenexpression und Differenzierungseigenschaften der Zellen. Die Veränderungen der Morphologie gingen mit der Limitierung der Zellverdopplungsraten einher und endeten im Proliferationsstopp der MSC nach Langzeitkultur. Mit Beginn der Kultur wurden reproduzierbare Unterschiede in der Genexpression festgestellt, die auf einen kontinuierlichen und organisierten Ablauf des Zellalterungsprozesses bei MSC schlussfolgern ließen<sup>38</sup>. Die replikative Seneszenz beeinflusste auch das Differenzierungspotenzial von mesenchymalen Stromazellen. So wurde gezeigt, dass mit zunehmender Expansionsdauer die Fähigkeit, in Adipozyten zu differenzieren, verloren ging. Im Gegensatz dazu stieg das Potenzial zur osteogenen Differenzierung mit der Höhe der Passagenzahl<sup>38</sup>.

## 2.2 Immunphänotyp von mesenchymalen Stromazellen

Bislang ist kein einzelner spezifischer Marker bekannt, mit dem MSC hinreichend identifiziert und selektioniert werden könnten. Gegenwärtig ist dafür noch eine Kombination aus positiven und negativen Oberflächenantigenen notwendig.

Die ursprüngliche Unterscheidung von hämatopoetischen und mesenchymalen Vorläuferzellen des Knochenmarks wurde über die Expression von CD50 (ICAM-3, *Intercellular adhesion molecule 3*) getroffen. Aus CD50<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup> Progenitoren gehen Zellen der mesenchymalen Linie hervor, aus CD50<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> die der hämatopoetischen Linie<sup>39</sup>. Es wurde berichtet, dass die Expression von CD34 auf mesenchymalen Vorläuferzellen *in vitro* verloren geht<sup>13</sup>. Heute gelten sowohl CD34 als auch CD45 als ausschließlich hämatopoetische Marker, wobei CD34 auch auf Endothelzellen vorkommt. Sie dienen damit der Negativselektion von MSC. Eine gemeinsame Vorläuferzelle von HSC und MSC wurde bisher noch nicht identifiziert, obwohl experimentelle Hinweise ihrer Existenz vorliegen<sup>40</sup>. Weitere Phänotypisierungen brachten eine Vielzahl von positiven Markern zur Identifizierung von mesenchymalen Stromazellen hervor<sup>41</sup>. Neben Thy-1 (CD90) und Endoglin (CD105) wurde mehrfach Stro-1 als spezifischer MSC-Marker publiziert<sup>26 42 43</sup>. Es wurde gezeigt, dass Stro-1 alle existenten CFU-F einer Kultur detektieren konnte<sup>44</sup>.

Durch Deschaseaux *et al.* wurde ein weiterer potenzieller MSC-Marker charakterisiert, CD49a, die  $\alpha 1$ -Untereinheit des *Very late antigen 1* (VLA-1) Integrins<sup>45</sup>. Allerdings konnten hier auch nur in Kombination mit CD45 als Negativmarker MSC selektioniert werden<sup>27 45</sup>. Interessanterweise wiesen Stewart *et al.* in CD49a<sup>+</sup>-Zellen eine Co-Expression mit Stro-1 nach<sup>46</sup>. Darüber hinaus könnten folgende Antigene ebenfalls eine Rolle bei der Isolation von MSC aus Knochenmarkaspiraten spielen: CD44 (Hyaluronsäurerezeptor), CD56 (N-CAM, *Neuronal cell adhesion molecule*), CD63 (Protein der Tetraspaninfamilie), CD146 (MCAM, *Melanoma cell adhesion molecule*) bzw. CD166 (ALCAM, *Activated leukocyte cell adhesion molecule*)<sup>47-49</sup>. Aktuelle Kandidatenmoleküle sind beispielsweise CD271 (NGFR, *Low affinity nerve growth factor receptor*), CD140b (PDGFR- $\beta$ , *Platelet-derived growth factor receptor  $\beta$* ) und CD349 (*frizzled-9*), aber auch SSEA-4 (*Stage-specific embryonic antigen-4*), MSCA-1 (*Mesenchymal stem cell antigen-1*) oder GD2 (Disialogangliosid)<sup>29 36 50-53</sup>. Es bleibt dabei umstritten, GD2 als alleinigen Marker zur Identifizierung von MSC zu betrachten.

Da keine einzelnen spezifischen Oberflächenmarker für MSC bekannt sind, ist auch die Abwesenheit bestimmter Proteine für die Charakterisierung von MSC hilfreich. Neben einer Reihe hämatopoetischer Marker wie CD34, CD45, CD50 und CD133 (Prominin-1) sind sie für co-stimulatorische Moleküle wie CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) und CD40 negativ<sup>54-56</sup>. Weiterhin besitzen sie auch kein CD15 (Lewis X, SSEA-1) oder CD62 (E, L, P-Selektin), die wichtige Epitope bzw. Liganden beim *Homing* und der Migration von Zellen darstellen<sup>14</sup>. MSC exprimieren darüber hinaus zahlreiche Oberflächenmoleküle, deren jeweilige Liganden auf Zellen der hämatopoetischen Linie zu finden sind<sup>57</sup>. Hierzu gehören neben HLA-Klasse I auch ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule-1*, CD106), LFA-3 (*Lymphocyte function-associated molecule*, CD58) und verschiedene Integrine wie  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\alpha 5$  und  $\alpha 6$ <sup>54</sup>. Für eine

Expression von HLA-Klasse II ist erst eine Stimulation mit IFN $\gamma$  erforderlich<sup>58</sup>. Auf einzelne Interaktionen, die zum Beispiel immunmodulatorisch oder inhibitorisch sein können, wird im weiteren Verlauf dieser Einführung präziser eingegangen.

### 2.3 Isolation von mesenchymalen Stromazellen aus Geweben

Nachdem mesenchymale Stromazellen anfänglich nur aus dem Knochenmark isoliert worden sind, hat sich im Verlauf der letzten Jahre gezeigt, dass MSC in vielen verschiedenen Geweben des Organismus zu finden waren<sup>59</sup>. So konnten MSC zusätzlich auch aus den Trabekulärbälkchen und aus Fettgewebe isoliert werden<sup>60,61</sup>. Es handelt sich hierbei um zwei Gewebe, in welche MSC in Übereinstimmung mit dem *Position Paper* II der ISCT standardgemäß differenzieren können müssen<sup>31</sup>. Isolierte Zellen aus dem Periost, dem Kreuzband und aus Sehnen wurden als MSC-ähnlich beschrieben, da sie nur Teile der Eigenschaften von mesenchymalen Stromazellen besitzen<sup>62-64</sup>. Hier zeigte sich exemplarisch das wiederholt auftretende Problem, dass Populationen aus verschiedenen Geweben gewonnen werden, diese aber nicht vollständig, sondern nur teilweise die Charakteristik von MSC aufweisen<sup>59</sup>. Die Heterogenität der separierten Zelltypen könnte auch auf die unterschiedlichen Isolations- und Kultivierungsmethoden zurückgeführt werden. Allerdings zeigte sich auch die Population der MSC selbst, wie erwähnt, heterogen hinsichtlich Morphologie und Differenzierungspotenzial<sup>34</sup>. Insgesamt wird dabei nochmals das Problem des Fehlens eines universellen molekularen Markers für MSC deutlich<sup>65</sup>.

Im Zusammenhang mit verschiedenen Bindegewebsarten wie Sehnen und Bänder konnten weitere, aus anderen Bindegewebstypen isolierte mesenchymale Stromazellen beschrieben werden. Die Quellen, die wie jedes Bindegewebe mesodermalen Ursprungs sind, waren hier die Dermis, der skelettale Muskel und der Limbus corneae des Auges<sup>66-68</sup>. Weiter ist die erfolgreiche Isolation aus Synovium, Peripher- und Nabelschnurblut, Amnionflüssigkeit und Plazenta gezeigt worden<sup>16,69,70</sup>. Zusätzlich wurde an adulten Mäusen demonstriert, dass MSC aus allen postnatalen Organen und Geweben - Gehirn, Leber, Lunge, Niere, Pankreas und Thymus - abgeleitet werden konnten<sup>71</sup>.

Zähne und ihre verschiedenen Gewebebestandteile stellen allgemein einen besonders interessanten Ort für die Suche nach Stammzellnischen dar, da sie sich ganzheitlich aus zwei der drei Keimblätter entwickeln. Dabei bilden sich aus den Zahnknospen (Ektoderm) die eigentlichen Zähne, die in ihrem Inneren die Pulpa (Mesoderm) umschließen. Sie werden gemeinsam von den umliegenden Unterzungspeicheldrüsen und der Submucosa der Mundschleimhaut (Entoderm) umgeben. In unterschiedlichen Kompartimenten des Zahns und den angrenzenden Geweben sind in räumlicher Nähe Stammzellen entdeckt worden. Dies sind

im Einzelnen: Stammzellen der dentalen Pulpa (DPSC, *Dental pulp stem cells*), des periodontalen Ligaments (PDLSC, *Periodontal ligament stem cells*), dentaler Follikelvorläuferzellen von Weisheitszähnen sowie von ausgefallenen Milchzähnen (SHED, *Stem cells from human exfoliated deciduous teeth*) und dentalen Epithelzellen<sup>23 24 72-74</sup>.

Zuerst wurden von Gronthos *et al.* epithel- und fibroblastenähnliche Zellen aus der Pulpa des Zahns isoliert, deren Population als heterogen und von knochenmarkabgeleiteten Stammzellen (KM-MSC) zu unterscheiden waren<sup>75</sup>. Die DPSC zeigten starkes Proliferationsvermögen, die Fähigkeit zu mineralisierenden, den Odontoblasten ähnliche Zellen *in vitro* und *in vivo* zu differenzieren und eine mit den KM-MSC vergleichbare Proteinexpression. Jedoch wurden bekannte Oberflächenmarker von mesenchymalen Stromazellen wie CD73, CD90 und CD105 nicht berücksichtigt. Weiterführend konnte demonstriert werden, dass DPSC auch in Adipozyten und neuronähnliche Zellen differenzieren können<sup>72</sup>. Miura *et al.* entdeckten fast zeitgleich eine den DPSC ähnliche, aber dennoch eigenständige Stammzellpopulation, die SHED. Die Analyse der Eigenschaften wurde im Vergleich zu DPSC und KM-MSC betrachtet. Kennzeichnend waren dabei eine geringe Expression von Stro-1 und CD146 sowie die Differenzierung in funktionelle, den Odontoblasten ähnliche Zellen<sup>73</sup>. Darauf folgend wurde von Seo *et al.* die Existenz von Stammzellen im periodontalen Ligament bewiesen. Im Vergleich zu DPSC wurde die schwächere Ausbildung von Kalziumdepots *in vitro* nach osteogener Differenzierung beobachtet; gegenüber KM-MSC war hier ebenfalls eine stärkere Proliferationsfähigkeit festzustellen<sup>23</sup>. Die Analyse des molekularen Phänotyps der PDLSC zeigte eine positive Oberflächenexpression für CD44, CD90, CD105, CD166 und geringe für Stro-1. Der Anteil der Expression von CD34 und CD45, wie auch für KM-MSC bekannt, lag unter 2% der Gesamtpopulation<sup>76 77</sup>.

Diese Arbeiten konnten gemeinsam die Existenz von MSC in unterschiedlichen Bereichen des Zahns und in bestimmten assoziierten Geweben belegen. Die isolierten, eigenständigen Populationen wurden hinsichtlich ihrer Eigenschaften der Proliferation, der Expression stammzellrelevanter Marker, ihres Differenzierungspotenzials und der Regenerationsfähigkeit von Geweben *in vivo* untersucht und mit denen von KM-MSC verglichen. Es musste dabei festgestellt werden, dass keineswegs alle zu Grunde liegenden Kriterien von mesenchymalen Stromazellen im vollen Umfang erfüllt werden konnten. Jede untersuchte Stammzellpopulation zeigte dabei ihren individuellen Charakter mit unterschiedlich großen Abweichungen bezüglich der Definition von MSC<sup>31 72 73 77</sup>.

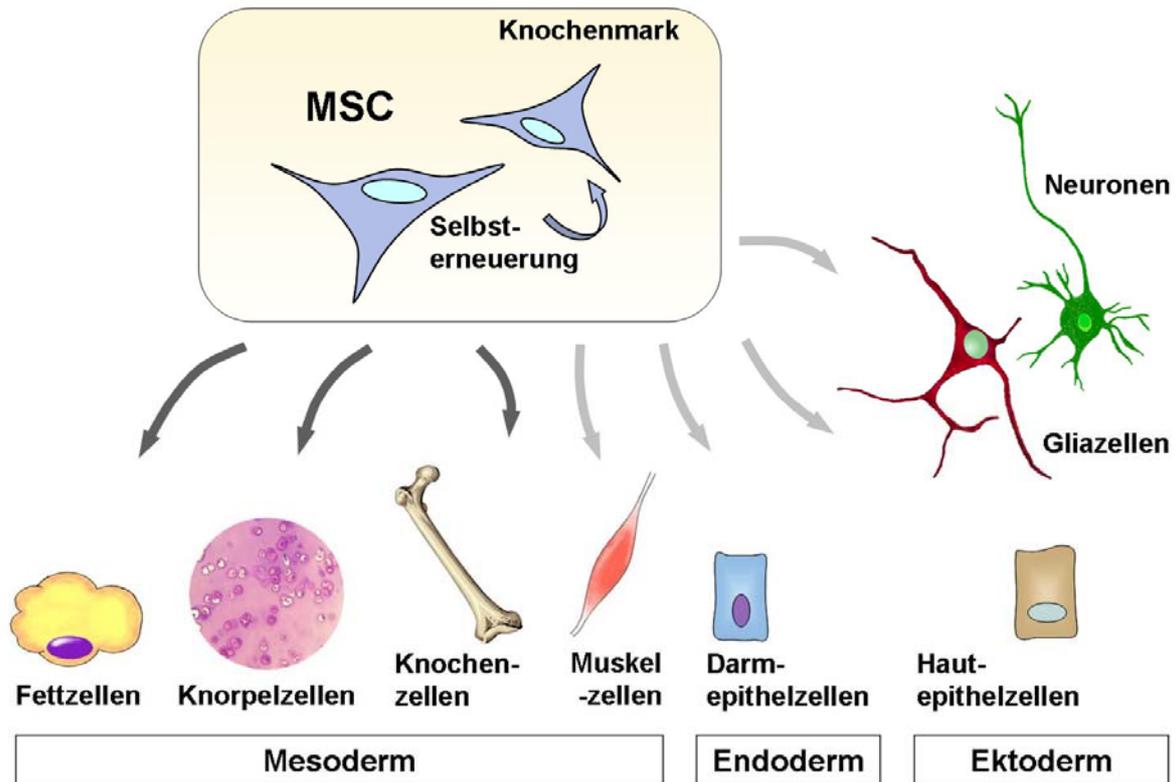
Ein Schwerpunkt der hier vorliegenden Arbeit liegt in der Isolation von MSC aus einem eigenen, assoziierten Zahngewebe, der Zahnhalpapille. Im weiteren Verlauf dieser Einführung wird deshalb immer wieder gesondert darauf eingegangen.

## 2.4 Plastizität von mesenchymalen Stromazellen

Als ein wichtiges und maßgebendes Kriterium bei der Charakterisierung von mesenchymalen Stromazellen wird die Differenzierungsfähigkeit von MSC angesehen. Der Standard für die Eigenschaft in unterschiedliche Zelltypen und Gewebe zu differenzieren, wurde durch Dominici *et al.* zusammengefasst und beschreibt die adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierung bei MSC *in vitro*<sup>31</sup>. Zahlreiche Publikationen zeigen die zuverlässige Differenzierung von MSC in Adipozyten, Chondrozyten oder Osteoblasten<sup>78-80</sup>. Muraglia *et al.* definierte diese drei Differenzierungen *ex vivo* in einer hierarchischen Folge. Dabei wurden 185 Stromazellklone auf ihr Potenzial hin analysiert, adipogen, chondrogen bzw. osteogen zu differenzieren. Mit einer Ausnahme differenzierten alle Klone osteogen, nur rund 70% zeigten osteo-chondrogenes und etwa ein Drittel osteo-chondro-adipogenes Potenzial. Weder die Kombinationen osteo-adipogen oder chondro-adipogen, noch einzelne chondrogene bzw. adipogene Phänotypen wurden gefunden. Für ausgewählte Klone wurde zusätzlich die Differenzierungsfähigkeit über die Lebensdauer getestet: Mit steigender Anzahl an Zellverdopplungen ging zuerst das adipogene, dann das chondrogene Potenzial verloren. Dabei wurde gleichzeitig eine Altersabhängigkeit der Differenzierungsfähigkeit vom Spender demonstriert. MSC von jüngeren Spendern hatten eine höhere Wahrscheinlichkeit, in die drei beschriebenen Zelltypen zu differenzieren als MSC älterer Spender<sup>81</sup>.

Mesenchymale Stromazellen sind als multipotente, adulte Stammzellen in der Lage, nur in nah verwandte Zell- und Gewebetypen zu differenzieren. Im Gegensatz dazu werden Zellen dann als pluripotent betrachtet, wenn sie wie embryonale Stammzellen (ES) dazu befähigt sind, sich in Gewebe aller drei Keimblätter zu entwickeln<sup>65</sup>. Die drei verschiedenen Zelltypen der Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten entstammen gemeinsam dem Mesoderm. Obwohl es zugleich mehrere unabhängige Berichte darüber gibt, dass MSC auch in Zellen und Gewebe nicht-mesodermalen Ursprungs differenzieren, zum Beispiel in Hepatozyten (Entoderm) oder Neuronen (Ektoderm), bleibt das so bezeichnete Phänomen der Transdifferenzierung stark diskutiert<sup>65 82-85</sup>.

Im Folgenden ist eine Übersicht zu den bereits nachgewiesenen und noch strittigen Differenzierungsmöglichkeiten von MSC unter Bezug auf die drei Keimblätter (Abb. 2-1) gegeben.



**Abb. 2-1: Plastizität von multipotenten mesenchymalen Stromazellen.** MSC besitzen die Fähigkeit neben der Selbsterneuerung im Knochenmark in verschiedene Zellen und Gewebe der mesodermalen Linie zu differenzieren (dunkle Pfeile). Das Potenzial in Myozyten zu differenzieren oder über Keimblattgrenzen hinweg in Gewebe des Endo- bzw. Ektoderms zu transdifferenzieren (helle Pfeile), ist zwar beschrieben, bleibt aber kontrovers.

Experimentelle Tiermodelle zur Untersuchung der Effekte nach Transplantationen von MSC konnten bisher nicht klären, wie es zur Regeneration bestimmter geschädigter Gewebe kommt. Tögel *et al.* führten die positive Entwicklung bei Ratten mit akutem Nierenversagen, denen MSC infundiert wurden, auch auf die Transdifferenzierung der MSC zu Tubuli und Endothelzellen zurück<sup>86</sup>. Hier sollten detektierte mesenchymale Stromazellen die in der Niere zerstörten Tubuli ersetzt haben, indem sie über die Grenze der Keimblätter hinweg in Nierenzellen (Entoderm) differenzierten. Weitere Studien beschrieben die Regeneration von renalem Epithel oder die Generierung von Myokard aus MSC als weitere Beispiele für Transdifferenzierung<sup>87-89</sup>. Andere Arbeiten wiederum gingen nicht davon aus, dass Transdifferenzierungsereignisse stattgefunden hatten, da die Existenz von spenderspezifischen Genen oder Markern dafür keinen ausreichenden Beweis darstellte<sup>90-93</sup>. Vielmehr wurde inzwischen spekuliert, dass es sich dabei um ein anderes Phänomen handelt. Nicht die Differenzierung von MSC in Zellen des beschädigten Organs *in vivo*, sondern die Fusion von unterschiedlichen Zelltypen wurde als mögliches Ereignis in Betracht gezogen. Die spontane Zellfusionen *in vitro* und *in vivo* werden in diesem Kontext als Übernahme des jeweiligen Phänotyps der Zellen von Spender bzw. Empfänger beschrieben<sup>90-94</sup>.

Eine weitere Erklärung für die positiven Effekte von transplantierten MSC auf die degenerativen Gewebe, in die sie eingewandert sind, stellt die Sekretion von parakrin wirkenden Faktoren in die Gewebeumgebung dar. Die Expression von Wachstumsfaktoren und die Regulation von pro- und anti-inflammatorischen Chemokinen und Zytokinen von MSC wurden dabei als bedeutend erachtet<sup>86 95 96</sup>. Die Plastizität von mesenchymalen Stromazellen ist für die Ausprägung dieses Effekts allerdings nicht notwendig<sup>97</sup>. Auf die Interaktionen zwischen MSC und Geweben des Empfängers sowie auf die modulatorischen Effekte von MSC auf verschiedene Zellpopulationen des Immunsystems wird in nachfolgenden Abschnitten ausführlicher eingegangen.

## 2.5 Parakrine Effekte multipotenter mesenchymaler Stromazellen

Bei der Anwendung zur Geweberegeneration können MSC über zwei unterschiedliche Funktionen wirksam werden. Zum einen können sie selbst innerhalb des geschädigten Gewebes durch Differenzierung defekte Zellen durch neue ersetzen. Zum anderen können sie Effekte auf ihre Nachbarzellen durch die Sekretion von so genannten trophischen Faktoren ausüben<sup>98</sup>. Die parakrinen Effekte können dabei einerseits über intrazelluläre Signale direkt vermittelt werden oder die MSC veranlassen andererseits die Zellen in unmittelbarer Nähe dazu, selbst diese Faktoren freizusetzen. Sie wirken somit nur indirekt auf das Gewebe. Infolge dessen können unterschiedliche Mechanismen induziert werden, die angiogenetische, anti-apoptotische, chemotaktische, mitotische Effekte haben oder die Differenzierung und Proliferation modulieren. Die Mechanismen können dabei einzeln oder in Kombination auftreten und ihre protektive Wirkung entfalten<sup>86</sup>. Bei der indirekten Vermittlung der parakrinen Effekte bleibt die Produzentenzelle von den sezernierten Faktoren unbeeinflusst; sie selbst hält ihren undifferenzierten Status bei<sup>98</sup>. Der Anteil, den die MSC-abgeleiteten, neu differenzierten Zellen bzw. die sekretorischen Effekte im Einzelnen am gesamten Regenerationsprozess besitzen, bleibt dabei nur schwer zu ermitteln. Eine grundlegende Aufgabe der MSC liegt in der Unterstützung der Hämatopoese. Dies gelingt über die Produktion einer Reihe von hämatopoetischen Zytokinen wie G-CSF (*Granulocyte colony-stimulating factor*), M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*), SDF-1 (*Stromal-cell-derived factor 1*), LIF (*Leukemia inhibitory factor*), Interleukin 6 (IL-6) und IL-11<sup>99</sup>. Allgemein wird G-CSF als ein Faktor zur Mobilisierung von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark und SDF-1 als ein Chemoattraktor betrachtet<sup>100 101</sup>. Beispielhaft für die trophischen Effekte von MSC war auch ihr therapeutischer Einsatz in unterschiedlichen Tiermodellen hinsichtlich der Geweberegeneration nach Schlaganfällen, Myokardinfarkten oder Knorpelschäden<sup>102-104</sup>. Die auftretenden Gewebeschäden an Gehirn, Herzmuskel und Meniskus können hierbei experimentell durch Ratten- und Ziegen-MS

teilweise oder komplett behoben werden. Im Zusammenhang mit der Regeneration des Myokards nach Infarkten durch MSC sind inzwischen einige der beteiligten sekretorischen Faktoren bekannt: VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), HGF (*Hepatocyte growth factor*), PLGF (*Placental growth factor*), LIF, IL-6 und Adrenomedullin, ein starker angiogenetischer und kardioprotektiver Faktor<sup>105</sup>. Die parakrinen Fähigkeiten von MSC, insbesondere die der Sekretion von VEGF und HGF, spielen offensichtlich auch bei der erfolgreichen Behandlung von Leber- und Nierenerkrankungen eine entscheidende Rolle. In unterschiedlichen Rattenmodellen zur MSC-Transplantation bei Glomerulonephritis bzw. akutem Nierenversagen wurde hauptsächlich der VEGF-Sekretion die Vermittlung eines therapeutischen Effekts zugeordnet<sup>86 106</sup>. Der Wachstumsfaktor wirkt stark pro-angiogenetisch und fördert somit die Vaskularisierung der ischämischen Gewebe. Zusätzlich wurden auch TGF- $\beta$ 1 (*Transforming growth factor*), bFGF (*Basic fibroblast growth factor*) und HGF freigesetzt, die in Kombination zur Verbesserung der Nierenfunktion beitragen<sup>86</sup>. Die Sekretion von HGF durch MSC bei Leberfibrose in Ratten führte zur verstärkten Apoptoseinduktion der aktivierten, hepatischen Sternzellen (Ito-Zellen)<sup>107</sup>. Sie sind für die gestörte Synthese und Degradation der extrazellulären Matrix verantwortlich und prägen das histologische Krankheitsbild der Leber durch unregulierte Bindegewebs- und Narbenbildung. Dabei sezernierten die aktivierten Sternzellen IL-6 und stimulierten die MSC daraufhin zur Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10. In diesem dynamischen Prozess wurde die Proliferation der Sternzellen supprimiert und die weitere Kollagensynthese durch IL-10 und konstitutiv exprimiertes TNF $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ) synergistisch inhibiert. An dem Beispiel wurde deutlich, wie die MSC über parakrine Effekte indirekt die Aktivität dieser pathologisch wirkenden Zellen modulieren<sup>107</sup>.

Des Weiteren sind auch Faktoren bekannt, die direkt auf die Differenzierung und Proliferation von Zellen wirken. So sind hierzu beispielsweise Wnt-11 als parakriner Differenzierungsfaktor und IFN $\beta$  als Regulator der Proliferation und Differenzierung über kurze Distanzen zu nennen<sup>108</sup>. Die physiologische Rolle von IFN $\beta$  liegt in der Tumorsuppression über anti-angiogenetische und anti-proliferative Effekte.

## 2.6 Immunmodulatorische Eigenschaften von mesenchymalen Stromazellen

Für die Regeneration von geschädigten Zellen und Geweben durch MSC war bekannt, dass eine Vielzahl von löslichen Faktoren durch verschiedene Stimuli exprimiert und sezerniert werden<sup>86</sup>. Die Funktionen und Effekte von MSC gehen auf die Interaktion mit Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems zurück<sup>97</sup>. MSC exprimieren HLA-Klasse I konstitutiv, nach Inkubation mit IFN $\gamma$  auch HLA-Klasse II, aber keine co-stimulatorischen Moleküle<sup>58</sup>. Sie gelten

daher als wenig immunogen. Humane MSC lösten beispielsweise keine IFN $\gamma$ -Produktion in HLA-disparaten humanen PBMC (*Peripheral blood mononuclear cell*) aus<sup>109</sup>. Trotz dieser Eigenschaften konnten sie immunsuppressive Funktionen auf T-Zellen, B-Zellen, natürliche Killerzellen (NK) und dendritische Zellen (DC) ausüben<sup>110</sup>. In Anwesenheit von MSC wurde die jeweilige Proliferation dieser Zellpopulationen gehemmt<sup>111-114</sup>. Darüber hinaus werden weitere Funktionen durch MSC beeinflusst: Die Zytokinsekretion und Zytotoxizität von T-Zellen, die Reifung und Antikörpersekretion von B-Zellen, die Zytokinproduktion und Zytotoxizität von NK-Zellen und die Reifung, Aktivierung und Antigenpräsentation von DC<sup>112 114-118</sup>.

Die Inhibition der Proliferation von antigenspezifischen T-Zellen durch MSC war nicht vom MHC-Komplex abhängig, sondern konnte auch durch HLA-disparate MSC erreicht werden<sup>119</sup>. Der anti-proliferative Effekt der MSC ging dabei offensichtlich nicht mit der Induktion von Apoptose einher<sup>120</sup>. Als mögliche Erklärung wurde der Zellzyklusarrest der T-Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase genannt<sup>111</sup>. Es wurde zusätzlich die Meinung vertreten, dass die Inhibition sowohl durch direkten Zell-Zell-Kontakt, als auch durch die Freisetzung von löslichen Faktoren initiiert werden kann<sup>56 97 121</sup>. Beide Mechanismen werden auch für die Inhibition der Proliferation, der Differenzierung und der Expression von Chemokinrezeptoren von B-Zellen angenommen<sup>112 121</sup>. Krampera *et al.* konnten zeigen, dass MSC nicht *per se* die Proliferation von B-Zellen *in vitro* inhibierten, aber durch extern zugeführtes IFN $\gamma$  die Zellteilungsaktivität reduziert wurde<sup>122</sup>. Da B-Zell-Antworten jedoch hauptsächlich von T-Zellen abhängig sind, sind die Interaktionen von MSC und B-Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit davon beeinflusst<sup>97</sup>.

NK-Zellen sind bedeutende Effektorzellen des angeborenen Immunsystems. Ihre Funktionsaktivierung wird durch oberflächenständige Rezeptoren über ein aktivierendes oder inhibierendes Signal vermittelt. Die Erkennung der Zielzellen findet über die Bindung von exprimierten Liganden an spezifische, aktivierende NK-Zell-Rezeptoren statt. Durch nicht oder niedrig exprimiertes HLA-Klasse I auf der Zelloberfläche wird demzufolge die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen, also die Lyse der Zielzellen, induziert<sup>123 124</sup>.

Mesenchymale Stromazellen können aktiv die Expression der aktivierenden Rezeptoren NKp30 (CD337) und NKG2D (*Natural-killer group 2, member D*) herunter regulieren und somit die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen hemmen<sup>114</sup>. Dabei gibt es Unterschiede zwischen frisch isolierten NK-Zellen und nach vier bis fünf Tagen Co-Kultur mit MSC. Im ersten Fall bleibt die zytotoxische Aktivität durch MSC unbeeinflusst, im Zweiten ist die Lyse der Zielzellen weniger effizient<sup>122 125</sup>. MSC unterdrücken die IL-2 oder IL-15 vermittelte NK-Zell-Proliferation und die IFN $\gamma$ -Produktion durch NK-Zellen<sup>116 118</sup>. Sie können auch die Zytokinproduktion von NK-Zellen verändern, wobei diese signifikant geringere Mengen IFN $\gamma$ , IL-10 und TNF $\alpha$  nach Co-Kultur mit MSC produzieren<sup>125</sup>. Im Zusammenhang mit der geringen Expressionsdichte von

HLA-Klasse I auf mesenchymalen Stromazellen ist publiziert, dass IL-2 oder IL-15 aktivierte NK-Zellen MSC effektiv lysieren konnten<sup>114</sup>. Durch Inkubation mit IFN $\gamma$  konnten sich MSC zumindest zum Teil durch Erhöhung der Expression von HLA-Klasse I vor der NK-Zell-Lyse schützen<sup>114</sup>.

Für die Untersuchungen der hemmenden Effekte von MSC auf NK-Zellen, wie auch auf T- und B-Zellen, wurden Experimente im Transwellsystem durchgeführt. Hierbei waren die Populationen durch eine semipermeable Membran räumlich voneinander getrennt. Wurden nun Effekte festgestellt, gingen diese auf die Übertragung löslicher Faktoren zurück, wie es bei der Inhibition der Proliferation und der Zytokinproduktion von IL-15-stimulierten NK-Zellen durch MSC zu beobachten war. Für die Hemmung der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen war jedoch Zell-Zell-Kontakt mit den MSC notwendig<sup>125</sup>. Ob die Interaktion zwischen den verschiedenen Signalmolekülen beider Populationen essentiell für die Induktion inhibitorischer Faktoren in den MSC war, wurde nicht vollständig geklärt. Ein hemmender Effekt auf die Proliferation von NK-Zellen durch Inkubation mit allein von MSC konditioniertem Zellkulturüberstand ist bislang nicht veröffentlicht. Es ist jedoch bekannt, dass die Proliferation von PBMC in konditioniertem Medium aus MSC/PBMC-Co-Kultur deutlich gehemmt wird; in rein MSC-konditioniertem Medium ist die Hemmung etwas schwächer, aber dennoch nachzuweisen. Die Proliferation von B-Zellen konnte hingegen nicht mit Überstand von konfluent wachsenden MSC inhibiert werden. Daher wurde vermutet, dass für die Freisetzung von hemmenden Faktoren durch MSC parakrine Signale von B-Zellen notwendig sind<sup>112</sup>.

Die Proliferation von T-Zellen wird, wenn sie durch einen spezifischen Stimulus induziert wurde, in Anwesenheit von MSC inhibiert<sup>56 120</sup>. Das trifft auch auf die Proliferation von antigenspezifischen T-Zellen zu<sup>115</sup>. Allerdings induzierten MSC unter diesen Versuchsbedingungen keine Apoptose in T-Zellen<sup>120</sup>. Nach Berichten von Plumas *et al.* wirkten MSC jedoch apoptose-induzierend auf aktivierte T-Zellen<sup>126</sup>. Ein Ausbleiben der Immunantwort von T-Zellen in Gegenwart von MSC wurde als reversibel beschrieben und kann nach Entzug der MSC wiederhergestellt werden<sup>115</sup>. Rasmusson *et al.* zeigten, dass zwar die Bildung von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL, *Cytotoxic T lymphocytes*), aber nicht deren Aktivität selbst von MSC gehemmt wurde<sup>118</sup>. Potian *et al.* hingegen publizierten, dass diese zytotoxischen Eigenschaften von MSC direkt gehemmt wurden<sup>127</sup>. MSC konnten das Zytokinprofil von naiven Effektor-T-Zellen dahingehend verändern, dass ein anti-inflammatorischer Phänotyp entstand. So produzierten T<sub>H</sub>1-Zellen in Anwesenheit von humanen MSC weniger IFN $\gamma$ , T<sub>H</sub>2-Zellen dagegen mehr IL-4<sup>116</sup>. MSC verminderten die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\alpha$  und - $\beta$ , IFN $\gamma$  und

TNF $\alpha$  von T<sub>H</sub>1-Zellen und regulierten gleichzeitig die anti-inflammatorischen T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-3, IL-5, IL-10, IL-13 herauf<sup>128</sup>. Nach Ramasamy *et al.* waren die immunsuppressiven Eigenschaften von MSC allein auf die anti-proliferativen Effekte zurückzuführen<sup>129</sup>.

Im Zusammenhang mit den immunsuppressiven Eigenschaften von MSC und den voranstehenden interzellulären Interaktionen ist neben Zell-Zell-Kontakten auch die Freisetzung von löslichen Faktoren publiziert. Die Vermittlung bestimmter inhibierender Effekte resultierte aus den Wechselwirkungen der beteiligten Zellen, die unter anderem auf HGF, TGF- $\beta$ 1, Prostaglandin E2, LIF, Stickstoffmonoxid (NO), IGFBP und IDO (Indolamin-2,3-dioxygenase) zurückgehen<sup>14 130 131</sup>. MSC präsentieren außerdem ein breites Zytokinprofil. Sie exprimieren IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, IL-27, G-CSF, GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) und M-CSF<sup>99 116 127 132</sup>. Hingegen konnten IL-2, IL-4 und IL-10 in Kulturen von unstimulierten MSC nicht nachgewiesen werden<sup>55 133 134</sup>.

## 2.7 Zellkontaktabhängige Interaktionen von mesenchymalen Stromazellen

Eine Vielzahl von Experimenten stimmt darin überein, dass die inhibierenden Effekte von MSC auf Zellen des Immunsystems nicht auf konstitutiv freigesetzten Faktoren beruhen, sondern durch Wechselwirkungen mit Lymphozyten erst induziert werden. In mehreren Experimenten allein mit konditioniertem murinem oder humanem MSC-Kulturüberstand wurde gezeigt, dass es zu keiner Hemmung der Lymphozytenproliferation kommt<sup>121 127</sup>. Nur wenn MSC zusammen mit Lymphozyten in einer MLR (*Mixed lymphocyte reaction*) co-kultiviert wurden, sollten inhibierende Effekte beobachtbar sein<sup>109 130</sup>. Andere Untersuchungen belegten, dass die Lymphozytenproliferation sowohl in konditioniertem Co-Kulturmedium von humanen MSC und PBMC als auch in reinem MSC-konditioniertem Medium unterschiedlich stark, aber dennoch gehemmt wurde. Seither sind zahlreiche unterschiedliche Liganden und Rezeptoren beschrieben worden, die bei der Vermittlung der hemmenden Wirkungen von MSC eine Rolle spielen sollten. Dazu gehörten eine Reihe von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen, Chemokinrezeptoren sowie Rezeptoren für verschiedene Wachstumsfaktoren<sup>54</sup>. Majumdar *et al.* identifizierten verschiedene Integrin  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta$ 1,  $\beta$ 3,  $\beta$ 4,  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 5 und  $\alpha$ 6) gemeinsam mit den zellulären Adhäsionsmolekülen (CAM, *Cellular adhesion molecule*) ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, ALCAM, LFA-3 auf der Oberfläche von mesenchymalen Stromazellen. Integrine spielen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Signalen für die Migration, das Wachstum und das Überleben von Zellen<sup>135-137</sup>. Seither sind mehrere Rezeptoren auf MSC bekannt geworden, deren Liganden auf T-Lymphozyten existieren. Einige davon sind CD2, CD6, sLewis<sup>x</sup>, LFA-1 $\alpha$  und  $\alpha$ 4-Integrin, die

mit LFA-3, ALCAM, L-Selektin, ICAM-1/-2 und VCAM-1 ihren oder einen ihrer Rezeptoren auf MSC besitzen<sup>54,57</sup>. Besonders die Interaktion VCAM-1: $\alpha$ 4-Integrin scheint eine tragende Rolle bei dem Signalaustausch zwischen MSC und T-Zellen zu besitzen. Bindungsassays mit Hilfe eines blockierenden Antikörpers gegen  $\alpha$ 4-Integrin führten zu einer Verminderung der Bindungsaktivität von aktivierten T-Lymphozyten an MSC um 80%<sup>54</sup>. Die Interaktion von VCAM-1 und  $\alpha$ 4-Integrin beim interzellulären Kontakt von T-Lymphozyten mit anderen Zelltypen wurde bereits gut dokumentiert und bedingt eine Vielzahl wichtiger Prozesse<sup>54</sup>. Zum Beispiel wird durch VCAM-1-Expression die Rekrutierung von Leukozyten durch Endothelzellen, die Adhäsion von Thymozyten an Epithelzellen oder auch die modellhafte Rollen von Leukozyten entlang des basalen Endothels bei Migrationsvorgängen in verschiedene Gewebe möglich<sup>138-141</sup>. Mesenchymale Stromazellen sind nach Ruster *et al.* ebenfalls dazu befähigt, über die Integrinbindung VCAM-1/VLA-4 mit Endothelzellen zu interagieren und koordinierte Rollen an ihnen auszuführen. Darüber können MSC in unterschiedliche Organe extravadiieren<sup>142</sup>. Die Expression von E-, L- oder P-Selektin auf MSC konnte bislang nicht gezeigt werden. Sie besitzen ähnliche Aufgaben beim Mechanismus der Gewebewanderung<sup>14,54</sup>.

## 2.8 Zusammenhänge zwischen MSC und Tumorstroma

Der Entstehungsprozess von soliden Tumoren ähnelt in vielen Prozessen dem von verletzten Geweben<sup>143</sup>. Tumore resultieren aus dem Umbau von Geweben und der starken Proliferation von mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten oder Endothelzellen<sup>144</sup>. Tumorgewebe werden im Vergleich mit heilenden Wunden als potente Quelle inflammatorischer Signale betrachtet, die sich aus verschiedenen Zytokinen, Chemokinen und Chemoattraktoren zusammensetzen<sup>145</sup>. Der Tropismus von MSC in Tumoren wird dabei häufig mit der Migration von Leukozyten als Antwort auf Verletzungen von Geweben assoziiert<sup>146</sup>. Die Migration von MSC in das Tumorgewebe gilt dabei als selektiver Prozess. Das *Engraftment* in Tumoren ist allerdings keine immanente Eigenschaft von MSC, sondern ist vielmehr von externen Signalen abhängig, die vom entsprechenden Tumor ausgehen<sup>147</sup>. Die tumorgenerierten, inflammatorischen Signale regulieren Invasion, Beweglichkeit und Interaktion der extrazellulären Matrix über autokrine Effekte und steuern die Zellmigration durch parakrine Sekretion<sup>148</sup>. Es werden hohe Konzentrationen an unterschiedlichen Wachstumsfaktoren wie bFGF, EGF (*Epidermal growth factor*), PDGF (*Platelet-derived growth factor*), TGF- $\beta$  und weitere freigesetzt<sup>149</sup>.

Viele Tumore unterliegen durch ihr rasches Wachstum einer relevanten Hypoxie, bei der es zur Expression von pro-angiogenetischen Zytokinen kommt. Der durch Hypoxie induzierte Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  (*Hypoxia-induced transcription factor*) aktiviert eine Reihe von Genen,

inklusive VEGF, TNF $\alpha$ , IL-6 und eine Vielzahl anderer Zytokine und Chemokine<sup>150</sup>. Hypoxie und IFN $\gamma$  induzierten synergistisch mesenchymale Stromazellen *in vitro* zur Sekretion von VEGF<sup>151</sup>. In inflammatorischen Umgebungen ist IFN $\gamma$  eines der am häufigsten auftretenden Zytokine. Da die Sekretion von VEGF bei der Vaskularisierung von Geweben bedeutend ist, konnte daraus abgeleitet werden, dass MSC Auswirkungen auf die Bildung und das Wachstum von Tumoren haben könnten<sup>141</sup>.

Tatsächlich wurde von gegensätzlichen Funktionen und Effekten von MSC, das heißt sowohl von Inhibition als auch von Stimulation der Proliferation der Tumorzellen, berichtet. Houghton *et al.* zeigten erstmalig, dass aus knochenmarkabgeleiteten Zellen, also auch MSC, *in vivo* ein epithelialer Tumor entstehen konnte<sup>152</sup>. Eine andere Studie demonstrierte in einem murinen Tiermodell ebenso, dass humane wie Maus-MSCs die Progression des Tumors förderten, wenn sie mit Melanomzellen subkutan co-injiziert wurden<sup>130</sup>. Ramasamy *et al.* und Zhu *et al.* beschrieben unabhängig voneinander, dass immundefiziente Mäuse, denen verschiedene Tumorzellen, darunter mehrere humane hämatopoetische Leukämiezelllinien, eine Bronchial-, eine Kolonkarzinomzelllinie und eine mutierte humane fetale KM-MSCs-Zelllinie, zusammen mit humanen MSC verabreicht wurden, eine höhere Inzidenz zur Tumorausbildung hatten und ein schnelleres und zeitlich früher einsetzendes Tumorstadium zeigten als die Kontrolltiere ohne MSC-Co-Injektion<sup>153 154</sup>. Dem gegenüber stehen Studien, die mit allogenen MSC das Tumorstadium von Gliomen, Melanomen, Lungen- und Kolonkarzinomen in Transplantationsmodellen der Maus und Ratte inhibieren können<sup>155-157</sup>. In einem Modell des Kaposi Sarkoms wurde verdeutlicht, dass MSC die Tumorstadiumprogression verhindern<sup>158</sup>. Dabei konnte die suppressive Wirkung von humanen MSC jeweils nach Co-Injektion mit malignen Zellen bzw. nach Administration der MSC in Mäuse mit ausgeprägten subkutanen Sarkomen gezeigt werden. Mit der Entdeckung, dass intravenös verabreichte MSC bevorzugt zu malignen Zellen migrieren, dort überleben und proliferieren und auch direkt in die Architektur von Tumorgewebe eingebunden werden, eröffnete sich zugleich die Möglichkeit der therapeutischen Anwendung genetisch modifizierter MSC<sup>130 149</sup>. Diese wurde mehrfach für den Transport von unterschiedlichen anti-tumoral wirkenden Proteinen zu den Tumoren in verschiedenen Modellen eingesetzt. Stagg *et al.* beschrieben erstmals in einem immunkompetenten Mausmodell die Anwendung von modifizierten, IL-2 produzierenden MSC bei etablierten Melanomen. Hier zeigte sich die Generierung einer CD8<sup>+</sup>-T-Zell- und NK-Zell-vermittelten tumorspezifischen Immunantwort und ein daraus resultierendes verzögertes Tumorstadium<sup>159</sup>. Ähnliche Experimente mit lentiviral transduzierten MSC von Kyriakou *et al.* stützten sich auf ein Modell immundefizienter Mäusen mit Burkitt-Lymphom. Auch hier beeinträchtigt die MSC-Expression des verkürzten löslichen VEGF-Rezeptors (tsFlk-1) das Wachstum des Lymphoms *in vivo*<sup>160</sup>. Der

inhibierende Effekt ging dabei auf die gehemmte Angiogenese durch VEGF zurück, das durch den sezernierten Rezeptor gebunden wird<sup>161</sup>. Ren *et al.* behandelten ebenfalls immunkompetente Mäuse mit Lungenmelanometastasen mittels allogener, systemischer Anwendung von IFN $\alpha$  transduzierten murinen MSC. In Folge dessen reduzierte die erzeugte konstitutive Expression von murinem IFN $\alpha$  das Wachstum der Lungenmetastasen durch die gesteigerte Apoptose und die verminderte Proliferation der Tumorzellen<sup>162</sup>. Weitere Studien gehen auf die Transfektion des IFN $\beta$ -Gens in MSC und deren Transplantation in Mäuse zurück. In Analogie zu ihrem IFN $\alpha$ -Modell wendeten Ren *et al.* ihre Methode auch in Bezug auf die Expression von IFN $\beta$  durch allogene, murine MSC bei Prostatakrebs in Mäusen therapeutisch an<sup>163</sup>. Hier zeigten sich die Reduktion des Tumolvolumens, die Abnahme der Proliferation und die Steigerung der Apoptose der Tumorzellen im Zusammenhang mit der IFN $\beta$ -Expression der transduzierten MSC. Die anti-neoplastisch und anti-proliferativ wirkende Sekretion von IFN $\beta$  fand auch in einem xenogenen Mausmodell von Studeny *et al.* ihre erfolgreiche Anwendung. Nach systemischer Applikation der mit humanem IFN $\beta$  genetisch veränderten, humanen MSC integrierten sich diese in das Tumorstroma. Die induzierten Melanome wurden daraufhin durch die lokale MSC-Expression von IFN $\beta$  in den Mäusen supprimiert<sup>149</sup>. Zusätzlich zeigten Studeny *et al.* und Nakamizo *et al.* diesen speziellen Transplantationsansatz bei der Inhibition der Angiogenese und des Tumorwachstums von Brustkrebs und Gliomen<sup>147 164</sup>. Diese Versuche geben Hinweise auf das außerordentliche Potenzial der MSC auch im Einsatz einer zellulären Tumorthherapie.

## 2.9 Klinisches Potential von mesenchymalen Stammzellen

Neben der Möglichkeit MSC als *Shuttle* zur Sekretion von anti-tumoral wirkenden Proteinen einzusetzen, bietet sich auf Grund der beschriebenen Eigenschaften von MSC eine Vielzahl von Anwendungsgebieten. Dabei können MSC die Regulation von Proliferation und Differenzierung induzieren oder regenerativ durch parakrine Sekretion, Enzymproduktion und Angiogenesestimulation wirken. Die Interaktionen zwischen MSC und den infiltrierten Geweben finden zum einen auf der Ebene des direkten Zellkontaktes statt, werden aber hauptsächlich auch über ein breites Spektrum von löslichen, regulatorischen Faktoren bewerkstelligt<sup>59</sup>. Tritt eine Schädigung von Geweben auf, zum Beispiel durch Entzündung, Hypoxie oder Ischämie, reagieren MSC mit der Freisetzung von immunmodulatorischen Zytokinen, Chemokinen, Wachstums- und anderen Faktoren auf diese lokalen Stimuli<sup>86</sup>. Inflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 und IL-1 $\beta$  stimulieren die Sekretion von Matrixmetalloproteasen (MMP) bei MSC, über die die Fähigkeit die Basalmembran zu durchqueren reguliert wird<sup>165</sup>. Ein weiteres inflammatorisches Signal zur

Attraktion von MSC in geschädigte Gewebe wird durch die Expression von SDF-1 vermittelt<sup>101</sup>. Dessen Rezeptor CXCR4 (*C-X-C motif receptor 4*) wird auf der Oberfläche von MSC exprimiert<sup>166</sup>. Der Einfluss der umgebenden Gewebe auf MSC zeigt sich exemplarisch an der Aktivierung von Toll-*like*-Rezeptoren, die von mesenchymalen Stromazellen exprimiert werden. Über die entsprechenden Liganden wird die Proliferation und Differenzierung der MSC moduliert<sup>167</sup>. MSC unterstützen ihrerseits über die Sekretion von trophischen Faktoren die Rekrutierung von lokalen Vorläuferzellen, die mittels Teilung und Differenzierung die Regeneration und das Überleben betroffener Zellen und Gewebe leisten<sup>168</sup>.

Ein weiteres Anwendungsgebiet stellt die Behandlung von dysfunktionalen und degenerativen Erkrankungen durch MSC dar. So erhöht die Applikation von MSC in einem Rattenmodell für akutes Nierenversagen die Genesung der Nierenfunktion<sup>86</sup>. Hierbei wird davon ausgegangen, dass auf parakrinem Wege durch die Sekretion von verschiedenen Wachstumsfaktoren wie VEGF, HGF und IGF-I (*Insulin-like growth factor I*) über den Prozess der Neovaskularisierung die Nierenfunktion verbessert werden kann<sup>169</sup>. In einem Modell der Lungenfibrose wirkt die Transfusion von MSC entzündungshemmend und reduziert die Kollagenablagerung im Lungengewebe - ein degenerativer Prozess, der unbehandelt zum Tod führen kann<sup>170</sup>.

MSC exprimieren zusätzlich verschiedene lysosomale und peroxisomale Enzyme konstitutiv, wie zum Beispiel signifikant hohe Mengen an Arylsulfatase A (ASA) und  $\alpha$ -L-Iduronidase<sup>171 172</sup>. Dieses Charakteristikum rechtfertigt den Einsatz von MSC bei Patienten mit Metachromatischer Leukodystrophie (ASA-defizient) oder Hurler Syndrom ( $\alpha$ -L-Iduronidase-defizient) als endogene Enzymersatztherapie. Diese Therapieform wurde bereits zusätzlich zur Knochenmarkstransplantation bei folgenden Enzymdefizienzen erfolgreich durchgeführt: Morbus Gaucher<sup>173</sup>, Globoidzelleukodystrophie (GLD)<sup>174</sup>, Hurler Syndrom<sup>175</sup>, Maroteaux-Lamy Syndrom<sup>176</sup> und Metachromatische Leukodystrophie (MLD)<sup>177</sup>. Die untersuchten Expressionslevel von Arylsulfatase A und  $\alpha$ -L-Iduronidase bei MSC wurden von Koç *et al.* als vergleichbar mit denen von HSC beschrieben. In Konsequenz konnte daher wenig später erstmals von der erfolgreichen Infusion allogener MSC bei Patienten mit Metachromatischer Leukodystrophie und Hurler Syndrom gegen die endogenen Enzymdefizienzen berichtet werden<sup>178</sup>.

Die Fähigkeit zur Modulation und Suppression von Immunantworten bietet auch den Einsatz von MSC bei der Behandlung von unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen<sup>179</sup>. In experimentellen Tiermodellen zur Behandlung von Diabetes, Rheumatoider Arthritis (RA), Systemischem Lupus Erythematoses (SLE) und Multipler Sklerose (MS) konnten anti-inflammatorische und protektive Effekte beschrieben werden<sup>95 180-183</sup>. Die intravenöse

Injektion von MSC in diabetische NOD/SCID-Mäuse resultierte in dem Anstieg der Zahl der pankreatischen Inseln und der insulinproduzierenden Zellen<sup>95</sup>.

Als Folge hämatopoetischer Stammzelltransplantationen (HSCT, *Hematopoietic stem cell transplantation*) kann es einerseits zu Abstoßungsreaktionen gegen das Transplantat und andererseits zu Immunreaktionen von Spenderzellen gegen Empfängergewebe wie Leber, Lunge, Haut oder Darm als so genannte *Graft-versus-host disease* (GvHD) kommen. Auf Grund ihrer immunsuppressiven Eigenschaften werden MSC als potenzielles Mittel gegen dieses Phänomen der GvHD betrachtet<sup>184</sup>. Es ist berichtet worden, dass MSC auch im Zusammenhang mit HSCT nachfolgend transplantiert wurden, um der Transplantatabstoßung vorzubeugen<sup>185 186</sup>. Inzwischen gibt es eine Reihe von klinischen Versuchen, MSC zur Linderung und Bekämpfung von GvHD einzusetzen, auf die in Abschnitt 2.9.2 detaillierter eingegangen wird.

Auf Grund der immunologisch geprägten Phänotypen verschiedener klinischer Syndrome kommt die HSCT auch hier als Behandlungsmöglichkeit in Frage. Ein Beispiel stellt der DNA-Ligase IV-Defekt dar. Der seltene Defekt geht auf unterschiedliche Mutationen im DNA-Ligase IV-Gen (*LIG4*) zurück und wird autosomal rezessiv vererbt. Die DNA-Ligase IV spielt eine essentielle Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch den Mechanismus des nicht-homologen *Endjoining* (NHEJ), bei dem fehlende Abschnitte vom Schwesterchromosom ohne homologes *Template* übertragen werden. Weltweit sind bislang nur 13 Fälle von Patienten mit DNA-Ligase IV-Defekt beschrieben. Pathophysiologisch sind sie oftmals mit Wachstums- und Entwicklungsstörungen, Mikrozephalie, mentaler Retardation, extremer Radiosensitivität, chromosomaler Instabilität, aber auch mit Lymphopenie, Panzytopenie oder unterschiedlich ausgeprägter Immundefizienz assoziiert. Die Phänotypen der beschriebenen Patienten überlappen häufig mit anderen bekannten Syndromen, beispielsweise mit Ataxia teleangiectasia (AT), Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS), Fanconi-Anämie (FA) oder SCID (*Severe combined immunodeficiency*). Tatsächlich sind einzelne Patienten via HSCT behandelt worden<sup>187-189</sup>. Bei zwei der fünf Patienten konnte die Transplantation erfolgreich durchgeführt werden. Drei Patienten starben in Folge post-transplantationaler Komplikationen.

Im thematischen Rahmen dieser Dissertation nimmt die Anwendung von MSC zur Regeneration von Knochendefekten wie zum Beispiel Osteonekrosen eine Sonderstellung ein. Sie wird in Abschnitt 2.9.3 genauer betrachtet. Im Folgenden werden nun einzelne Beispiele für den therapeutischen Einsatz von MSC sowohl im Tiermodell als auch in der Klinik besprochen.

### 2.9.1 Präklinische Anwendungen in experimentellen Tiermodellen

Die Fähigkeit von mesenchymalen Stromazellen, Immunantworten zu modulieren, wurde *in vivo* an verschiedenen Tiermodellen untersucht. In der ersten Studie hierfür wurden von Bartholomew *et al.* allogene MSC in Primaten systemisch angewendet<sup>190</sup>. Dabei konnte gezeigt werden, dass intravenös applizierte, knochenmarkabgeleitete MSC in einem MHC-disparaten Empfänger die Abstoßung von Hauttransplantaten hinaus zögern. Zusätzlich wurde demonstriert, dass die Spender-MSZ auf eine Vielzahl verschiedener Organe verteilt waren. In den meisten experimentellen Tiermodellen zur Untersuchung von Defekten an Niere, Lunge und Nerven schlussfolgerte man, dass der therapeutische Effekt von MSC nicht mit der Differenzierung in den jeweilig umliegenden Gewebetyp verbunden ist, sondern hauptsächlich aus dem parakrinen Effekt der MSC resultiert<sup>86 170 191</sup>. Diese parakrinen Effekte sollen das vorhandene Gewebemilieu am Ort des Defekts von einem pro-inflammatorischen in einen anti-inflammatorischen Zustand modifiziert haben<sup>86 170 183 190</sup>. Ähnliche Ergebnisse konnten kürzlich Nauta *et al.* an einem murinen allogenen Knochenmarktransplantationsmodell erzielen. Die Co-Infusion von syngenem MSC des Knochenmarkempfängers konnte die Zeit bis zur Abstoßung des Stammzelltransplantats signifikant erhöhen<sup>192</sup>. Liechty *et al.* konnten durch intrauterine Transplantation von humanen MSC in Schafe demonstrieren, dass MSC einen Weg in zahlreiche Organe fanden, sich dort einnisteten (*Engraftment*) und dort auch spezifische Differenzierungen in Richtung des vorhandenen Gewebes stattfanden<sup>193</sup>. Bei diesem vielseitigen Transplantationsmodell für Großtiere kann dabei unter normalen physiologischen Konditionen das natürliche Migrationsverhalten der transplantierten MSC und deren Verteilung im gesamten Organismus studiert werden. Es ist dabei frei von genetischen oder verletzungsbedingten Dysfunktionen<sup>194</sup>. Neben den Untersuchungen durch die Transfusion von MSC ein besseres *Engraftment* der eingesetzten Transplantate zu erreichen, existieren auch Studien, die die Kapazität von MSC, Autoimmunreaktionen zu verhindern, bestimmen sollten. In diesem Zusammenhang arbeiteten Zappia *et al.* an einem Mausmodell für die induzierbare experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), die eine durch T-Zellen und Makrophagen vermittelte Autoimmunerkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS) darstellt und mit dem Krankheitsbild der Multiplen Sklerose beim Mensch vergleichbar ist<sup>183</sup>. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass systemisch verabreichte, syngene MSC effektiv zur Behandlung von EAE in Mäusen durch Induktion von peripherer T-Zell-Anergie benutzt werden konnten. Dieser bemerkenswerte Therapieansatz ging mit der Minderung des Schweregrads der Krankheit verbunden mit der geringeren Infiltration des ZNS durch Makrophagen, B- und T-Zellen und der Reduktion der Demyelinisierung einher<sup>195</sup>. Die Modulation pathogener T-Zellantworten durch den *in vivo* Einsatz von MSC konnte ebenfalls von Urban *et al.* in einem Mausmodell für Diabetes

erfolgreich genutzt werden<sup>196</sup>. Die mit Knochenmark co-infundierten MSC inhibierten die Proliferation von isolierten,  $\beta$ -Zell-spezifischen T-Zellen und normalisierten die Insulin- und Glukosespiegel über die Induktion der Regeneration der pankreatischen  $\beta$ -Zellen ohne Anzeichen von Transdifferenzierung der MSC.

Interessante Ergebnisse ergaben erste Versuche mit MSC im Mausmodell, die bei der Behandlung von GvHD nach allogener Stammzelltransplantation hemmende Wirkung auf die Abstoßungsreaktion der transplantierten Tiere zeigten. Bei Chung *et al.* verhinderte die Gabe von MSC nur in letal bestrahlten Mäusen eine GvHD<sup>197</sup>. Yanez *et al.* konnten beobachten, dass nur dann, wenn die systemischen Infusionen von *ex vivo* expandierten MSC kurz nach der Transplantation von haploidenten HSC in die Mäuse erfolgte, sie hinsichtlich der Kontrolle über die GvHD effektiv waren<sup>20</sup>. Darüber hinaus deutete sich an, dass wiederholte Gaben von mesenchymalen Stromazellen für eine dauerhafte Verbesserung der GvHD notwendig waren<sup>198</sup>. Nauta *et al.* zeigten mit dem Einsatz von murinen wirtseigenen MSC ein besseres Langzeit-*Engraftment* des allogenen Knochenmarktransplantats<sup>192</sup>. Dem gegenüber stehen Ergebnisse, die demonstrieren, dass MSC an sich nicht immunprivilegiert sind, sondern unter bestimmten Konditionen eine Gedächtnis-T-Zell-Anwort induzieren und die Abstoßung des allogenen Knochenmarktransplantats verstärkt hervorrufen können<sup>192</sup>. Hingegen fanden Sudres *et al.* keinen Einfluss von MSC auf die Entwicklung einer GvHD, wenn diese als Co-Transplantat zum Knochenmark bei Mäusen eingesetzt wurden<sup>199</sup>.

### 2.9.2 Klinische Anwendungen

Die erlangten Erkenntnisse aus diversen Tiermodellen lassen sich nur bedingt in das klinische Umfeld übertragen, da sich die immunmodulatorischen Mechanismen zwischen den einzelnen Spezies unterscheiden<sup>200</sup>. Die ersten klinischen Studien zur Anwendung von MSC beim Mensch zielten auf Sicherheit und Verträglichkeit des Zelltransplantats. Koç *et al.* zeigten beispielhaft in einer ersten Studie an Brustkrebspatientinnen, dass die Infusion von MSC sicher war und in einer schnellen hämatopoetische Rekonstitution resultierte<sup>201</sup>. Andere Studien der Phase I-II und verschiedene Einzelfallberichte konnten ebenfalls unmittelbar keine nachteiligen Effekte und Nebenwirkungen feststellen: Die intravenösen Gaben von allogenen, *ex vivo* expandierten MSC bei kleinen Kohorten von Patienten mit Metachromatischer Leukodystrophie (n=6) und Hurler Syndrom (n=5)<sup>178</sup>, die Anwendung allogener MSC bei sechs pädiatrischen Patienten mit *Osteogenesis imperfecta* (OI) nach Knochenmarktransplantation<sup>202</sup> oder die Infusion von haploidenten mesenchymalen Stromazellen bei einem Patienten mit schwerer, therapieresistenter, akuter GvHD des Darms und der Leber<sup>203</sup> sind Beleg dafür. Inzwischen steigt die Zahl der mit

MSC transplantierten Patienten stetig an. In den meisten Fällen wurden die MSC von einem allogenen HLA-disparaten Spender bezogen und im Zusammenhang mit einer HSCT gegen verschiedene maligne Erkrankungen oder angeborene Metabolismusdefekte verabreicht<sup>204</sup>. Die beschriebenen positiven Effekte der infundierten MSC auf unterschiedliche Krankheitsverläufe resultierten dabei vermutlich aus den Interaktionen der MSC mit den geschädigten Geweben. Mesenchymale Stromazellen stimulierten dabei die erreichten Zellen nachweislich zur gesteigerten Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10, bFGF oder TGF- $\beta$ . Hingegen wurden pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  herunter reguliert<sup>86</sup>. Bei zwei pathologischen Befunden konnte der Anteil der verbliebenen transplantierten MSC in den geschädigten Organen, das heisst im Knochen und Darm, prozentual bestimmt werden<sup>203 205</sup>.

Ein viel versprechendes Ergebnis erlangte Le Blanc *et al.* in einer Fallstudie hinsichtlich der Behandlung eines männlichen Patienten mit schwerer, therapieresistenter akuter GvHD des Darms und der Leber Grad IV<sup>203</sup>. Dort wurde berichtet, dass durch die zweimalige Gabe von  $1-2 \times 10^6$  aufgereinigten, haploidenten MSC (Spenderin war die Mutter des Patienten) am Tag 73 bzw. am Tag 170 nach allogener Stammzelltransplantation die (wieder) auftretende GvHD jeweils aufgehoben werden konnte. Die beobachteten Parameter der Bilirubinkonzentration und die Anzahl der täglichen Stuhlgänge normalisierten sich nach jeder MSC-Infusion. Noch ein Jahr nach der Behandlung war der Patient frei von GvHD und besaß keine *Minimal residual disease* (MRD) im Blut und Knochenmark mehr. Die Analyse des *Engraftment* via Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) konnte 4% weibliche Epithelzellen im Dickdarm feststellen<sup>203</sup>. Es folgten daraufhin erste Studien zur GvHD-Behandlung nach allogener HSCT mit kleineren Patientenkohorten. Eine Gruppe von Erwachsenen mit steroidrefraktärer (n=8) bzw. chronischer GvHD (n=1), die entweder MSC von HLA-identischen Geschwistern, haploidenten Verwandten oder von HLA-disparaten Fremdspendern bekamen, zeigten nach MSC-Infusion keine nachteiligen Effekte und eine verbesserte Überlebensrate im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei sechs von acht Patienten verschwand die akute GvHD komplett<sup>206</sup>. Eine Gruppe von sieben Kindern mit hämatologisch malignen Erkrankungen, die akute und chronische GvHD (n=6) bzw. Hämophagozytose (n=1) nach allogener HSCT entwickelten, wurde von Müller *et al.* mit *ex vivo* expandierten MSC behandelt. Dabei konnte allgemein die Sicherheit und gute Verträglichkeit der MSC-Transfusionen demonstriert werden und in einigen Fällen von Verbesserungen in der Symptomatik der GvHD berichtet werden. Eine Auflösung einer chronischen GvHD wurde bei keinem der behandelten Patienten beobachtet. Bemerkenswert war hier jedoch, dass erstmals die erfolgreiche Behandlung einer Patientin mit Hämophagozytose durch dreimalige MSC-Transfusion beschrieben werden konnte<sup>207</sup>. Eine weitere, jüngst veröffentlichte experimentelle Studie der Phase II mit größerer Patientenzahl untersuchte

ebenfalls die Sicherheit und Effizienz von MSC bei refraktärer akuter GvHD. Dabei zeigte sich, dass mehr als die Hälfte der pädiatrischen Patienten bereits nach einmaliger MSC-Gabe vollständig auf die Behandlung ansprachen. Weiter wurde abgeleitet, dass die Effektivität der MSC nicht von ihrer Herkunft abhängig war, also HLA-identisch, haploidentisch oder von Dritten. Es könnte somit zukünftig auf bereits expandierte und eingefrorene Zellen von Fremdspendern zurückgegriffen werden<sup>208</sup>.

Mesenchymale Stromazellen können außerdem auch zur Behandlung von Knochendefekten wie *Osteogenesis imperfecta* benutzt werden. Dabei handelt es sich um Funktionsstörungen mit heterogenem Krankheitsbild, das unter anderem extreme Knochenbrüchigkeit, skelettale Deformierungen oder Kleinwüchsigkeit beinhalten kann<sup>209</sup>. Fünf Patienten mit OI, die mit Knochenmarktransplantaten behandelt wurden, zeigten beispielsweise ein gutes *Engraftment* von Spenderosteoblasten, eine erhöhte Körperwachstumsgeschwindigkeit, größere Knochendichte sowie weniger Frakturen<sup>205 210</sup>. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass nach HSCT das *Engraftment* von funktionellen MSC bedingt oder zumindest unterstützt wurde<sup>200</sup>.

### 2.9.3 Lokale Anwendung bei Avaskulären Osteonekrosen

Bei der Therapie von pädiatrischen Patienten mit malignen Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen durch den Einsatz von Steroiden kommt es häufig zur Entwicklung von Osteonekrosen<sup>211</sup>. Aber auch bei Krankheitsbildern, die Veränderungen der Blutrheologie verursachen, wie Sichelzellanämie oder Koagulopathien, wird die Suszeptibilität für die Entstehung von avaskulären Osteonekrosen (AVN) erhöht<sup>212</sup>. Bei Kindern mit Leukämien ist vorrangig das Knie durch die Ausprägung von AVN betroffen<sup>213 214</sup>. Die Inzidenz für AVN liegt nach der Behandlung nach dem Akute Lymphatische Leukämie (ALL)-Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) Protokoll 95 bei Patienten unter zehn Jahren bei weniger als 0,2%. Das Risiko steigt jedoch bei gleichem Behandlungsprotokoll auf 16,7% bei Patienten älter als 15 Jahre<sup>211</sup>. In anderen Studien wurde das Risiko dafür sogar noch höher eingeschätzt<sup>215</sup>. Die aktuelle chirurgische Behandlungsmethode der Wahl vor dem letztendlichen Ersatz durch eine Prothese stellt die so genannte *Core Decompression* dar. Dabei wird in das betroffene Areal gebohrt, um mit der Ausräumung des Detritus und Reduktion des daraus entstandenen Druckes den Schmerz zu lindern sowie einen Regenerationsprozess im Rahmen der Verletzungsheilung einzuleiten. Der Behandlungserfolg der *Core Decompression* ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig und dadurch sehr variabel<sup>216-218</sup>. Zur Verbesserung der Methode wurden von Hernigou *et al.* und später auch von anderen Gruppen im Anschluss an die *Core Decompression* konzentriertes Knochenmark bzw. mononukleäre Zellen des Knochenmarks in die nekrotischen Läsionen

injiziert<sup>219-221</sup>. Einige Jahre zuvor wurde von Bruder *et al.* bereits in einem experimentellen Rattenmodell gezeigt, dass *ex vivo* expandierte MSC klinisch signifikante Knochendefekte regenerieren konnten<sup>222</sup>. Nachfolgende Versuche an weiteren Tiermodellen zeigten ebenfalls positive Effekte beim Einsatz von MSC<sup>223-225</sup>. Den ersten klinischen Beweis für die Anwendbarkeit von MSC bei Schädigungen des Knochengewebes führte Horwitz *et al.* mit der Behandlung von sechs pädiatrischen Patienten mit schwerer OI. Jedes Kind erhielt dabei nach konventioneller Knochenmarktransplantation zwei Infusionen allogener MSC. Fünf der Patienten zeigten sowohl ein *Engraftment* in ein oder mehreren Organen als auch eine Beschleunigung der Wachstumsgeschwindigkeit innerhalb der ersten sechs Monate nach Infusion<sup>202</sup>. Das osteogene Potenzial von MSC konnte daraufhin nochmals in einem weiteren klinischen Fall genutzt werden. Einem Fetus der 32. Schwangerschaftswoche mit intrauterin diagnostizierter schwerer *Osteogenesis imperfecta* und multiplen Frakturen wurden HLA-disparate, allogene, fetale MSC *in utero* transplantiert. Nach der Geburt konnte beim Empfänger das *Engraftment* der Spenderzellen und die Differenzierung der MSC in Knochen festgestellt werden<sup>226</sup>. Diese ersten klinischen Behandlungserfolge durch systemische Applikation von MSC bei Knochendefekten gemeinsam mit den durchgeführten Experimenten an verschiedenen Tiermodellen demonstrieren das therapeutische Potenzial hinsichtlich der Anwendung von mesenchymalen Stromazellen bei AVN.

## 2.10 Migration und Homing von mesenchymalen Stammzellen

Bei intravenöser oder intraarterieller, systemischer Infusion von MSC in Versuchstiere blieben diese auf Grund ihrer Größe oftmals in den Kapillarvenen vieler Organe, vorrangig in Lunge und Leber, hängen<sup>86 227</sup>. Es gab jedoch Beweise, dass MSC durchaus in der Lage waren, nach intravenöser Applikation in verschiedene geschädigte Gewebe zu gelangen (Migration), dort zu engraften und gewebespezifisch zu differenzieren<sup>193 228-230</sup>. In Experimenten mit radioaktiv markierten MSC wurde demonstriert, dass diese nach intravenöser Injektion in Ratten erst in der Lunge und im Anschluss in Leber, Nieren, Milz und Knochen detektiert werden konnten<sup>227</sup>. Mesenchymalen Stromazellen konnte nachgewiesen werden, dass sie im Zuge der Migration auch Endothelzellschichten überwandern<sup>231 232</sup>. Allerdings wurden auch Daten darüber veröffentlicht, die belegen, dass im Vergleich zu primären bei *ex vivo* expandierten MSC die Fähigkeit zum *Homing* und *Engraftment* dramatisch reduziert war. Dieser Effekt konnte bereits nach einer Kulturdauer von 48 h beobachtet werden<sup>233</sup>.

Die Vielzahl von exprimierten Oberflächenmolekülen auf MSC besitzen entscheidenden Anteil an den Migrationsprozessen<sup>234</sup>. Zusätzlich werden auch eine Reihe von Proteinen und löslichen,

pro-angiogenetischen Faktoren, die die Endothelzellmigration modulieren und den Gefäßwandumbau induzieren können, sezerniert<sup>59</sup>. Die Extravasation der MSC aus den Blutgefäßen beruht auf der Expression von bestimmten Adhäsionsmolekülen, zum Beispiel verschiedener Integrine<sup>54</sup>. Ruster *et al.* publizierten, dass MSC ein koordiniertes Verhalten beim Rollen und der Adhäsion an Endothelzellen zeigten, ähnlich dem, wie es bereits für die Diapedese von Lymphozyten oder Monozyten bekannt war. Dieser Mechanismus wurde dabei auf die Existenz von VLA-4 und VCAM-1 auf MSC zurückgeführt und resultierte schließlich in der Migration in unterschiedliche Gewebe<sup>142 235</sup>. Weiter wurde gezeigt, dass beispielsweise die Expression von  $\alpha 4$ -Integrin auf MSC von Mäusen zu einem verstärkten *Homing* der transplantierten Zellen in Knochen führte<sup>236</sup>. Der Osteotropismus von infundierten MSC wurde allgemein als gering beschrieben<sup>202 227 237</sup>. Die zelluläre Rekrutierung von MSC in den Knochen findet in speziellen Markgefäßen statt, die konstitutiv E-Selektin exprimieren<sup>238 239</sup>. E-Selektine erkennen sialofucosylierte Determinanten ihrer verschiedenen Liganden. Auf MSC konnte keine Expression von E-Selektin-Liganden nachgewiesen werden. Allerdings wurde eine native Glykoform des Typ 1 Transmembranglycoprotein CD44 auf MSC gefunden<sup>240</sup>. Durch die Arbeiten von Hayer *et al.* konnte CD44 eine wichtige Funktion beim Schutz vor schweren Gelenkschäden in Folge chronischer Entzündungen zugeordnet werden<sup>241</sup>. Diese werden durch die Überexpression des Tumornekrosefaktors induziert. Die Zerstörung von Zell-Matrix-Interaktionen ist Grundvoraussetzung für die Invasion von entzündlichen Zellen in Knochen. CD44 verbindet eine Vielzahl von extrazellulären Matrixproteinen mit der Zelloberfläche und steht somit dem Prozess der Zerstörung durch induzierte Entzündungsreaktionen gegenüber<sup>242</sup>. In einem TNF-induzierbaren CD44<sup>-/-</sup> Mausmodell wurde verdeutlicht, dass der Grad der Zerstörung der Gelenke in Abwesenheit von CD44 stark erhöht war und eine generalisierte Osteopenie von den Tieren entwickelt wurde. Die Funktion von CD44 konnte damit als Inhibitor des entzündungsvermittelten Verlustes von Knochengewebe bei Rheumatoider Arthritis beschrieben werden<sup>243</sup>. Sackstein *et al.* zeigten, dass CD44 eine  $\alpha$ -2,3-sialyl-Modifikation trägt, die mittels  $\alpha$ -1,3-Fucosyltransferase in einen E-Selektin/L-Selektin-Ligand konvertiert werden konnte. Diese modifizierte Form des CD44 besaß gesteigerten Tropismus in Knochen, sodass die infundierten MSC über den E-Selektin/L-Selektin-Ligand innerhalb von Stunden nach Infusion effektiver und schneller das Mark infiltrierten<sup>240</sup>. Es wurde somit demonstriert, dass durch gezielte Glykanmodifikation eine erhöhte zelluläre Migration in den Knochen generiert wurde.

## 2.11 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Isolation von humanen multipotenten mesenchymalen Stromazellen wird hauptsächlich aus Knochenmarkaspiraten durchgeführt. Es ist publiziert, dass in unterschiedlichen Teilen des Zahns ebenfalls MSC zu finden sind. Als eine gut zugängliche, alternative Quelle sollten deshalb Zahnpapillen von Weisheitszähnen auf die Existenz von MSC untersucht werden.

Allen MSC sind verschiedene Eigenschaften gemeinsam, die in der klinischen und regenerationsmedizinischen Anwendung von hohem therapeutischem Nutzen sein können. Der Fokus dieser Arbeit liegt hauptsächlich auf der osteogenen Differenzierung von MSC. Es ist zudem bekannt, dass es als Folge einer Steroidtherapie bei pädiatrischen Leukämiepatienten über 15 Jahre in 16,7% der Fälle zur Entwicklung einer Osteonekrose kommt. Im Vorfeld sollten zunächst die Eigenschaften der MSC unter Kulturbedingungen, wie sie in nekrotischen Läsionen vorherrschen, untersucht werden. Die lokale Anwendung von MSC sollte dann im Rahmen einer *Core Decompression* Operation hinsichtlich ihrer Sicherheit, Verträglichkeit und dem möglichen therapeutischen Effekt erprobt werden.

Im Zusammenhang mit der systemischen Applikation von MSC, wie sie beispielsweise zur Behandlung von therapieresistenten GvHD-Patienten angewandt wird, sind einzelne Beobachtungen über die Verteilung transfundierter MSC in den Empfängerorganen veröffentlicht worden. Durch die histopathologische Untersuchung eines verstorbenen MSC-Empfängers sollte die Verteilung der MSC im Körper analysiert werden. Über die Mechanismen und Faktoren, die an der Migration von MSC beteiligt sind, ist allerdings nur wenig bekannt. Es wurde jedoch gezeigt, dass durch gezielte Modifikation der Oberflächenglykane der Osteotropismus von MSC verstärkt werden konnte. Zur Verbesserung der Migrationseigenschaften der MSC sollten deshalb molekular- und zellbiologische Strategien entwickelt und eingesetzt werden.

Zusammengefasst beinhaltet diese Arbeit folgende Aufgabenschwerpunkte:

- I. Isolation von MSC aus Zahnpapillen und Evaluierung ihrer Charakteristik im Vergleich zu KM-MSK
- II. Untersuchung relevanter biologischer Eigenschaften von MSC und ihre Vorbereitung gemäß dem Arzneimittelgesetz unter GMP (*Good manufacturing practice*)-Bedingungen zur regenerationsmedizinischen Anwendung bei steroidinduzierten Osteonekrosen in der Pädiatrie
- III. Analyse des *Engraftment* von transfundierten MSC in verschiedenen Empfängerorganen
- IV. Modifikation der Glykanstruktur von MSC, um systemisch applizierte MSC in das knöcherne Kompartiment zu dirigieren

## 3 Material

### 3.1 primäre Zellkulturen und Bakterienstämme

MSC	aus Knochenmarkspiraten oder Zahnpapillen von Patienten
E. coli XL1-Blue	Stratagene

### 3.2 Zellkulturmedien und Zusätze

#### 3.2.1 Zellkulturmedien

Advanced DMEM (1x)	Gibco
Advanced DMEM/F12 (1x)	Gibco
F12 Nutrient Mixture (1x)	Gibco
H-DMEM	Lonza
L-DMEM	Lonza

#### 3.2.2 Mediumzusätze

FCS (fetales Kälberserum)	Biochrom
FFP ( <i>fresh frozen plasma</i> )	Blutbank, UKT
Gelantine	Sigma-Aldrich
Heparin (Canusal)	Wockhardt
L-Glutamin	Biochrom
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Thrombozytenkonzentrat (TKZ)	Blutbank, UKT

#### 3.2.3 Differenzierungszusätze

B27 (50x)	Stem Cell Technologies
bFGF	Invitrogen
$\beta$ -Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich
BMP-2	Tebu-Bio
Dexamethason (Fortecortin)	Merck
Indomethacin	Sigma-Aldrich

IBMX, 3-Isobutyl-1-methylxanthin	Sigma-Aldrich
Insulin (Actrapid)	Novo Nordisk
ITS Supplement-A (100x)	Stem Cell Technologies
ITS-X (100x)	Gibco
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma-Aldrich
N1 Supplement (100x)	Sigma-Aldrich
N2 Supplement (100x)	Sigma-Aldrich
N2-A (100x)	Stem Cell Technologies
Natriumpyruvat	Gibco
Nicotinamid	Calbiochem
TGF- $\beta$ 3	RayBiotech

### 3.3 Nukleinsäuren

DNA-Leiter peqGOLD 100 bp Plus	Peqlab Biotechnologie
DNA-Leiter peqGOLD 1 kb	Peqlab Biotechnologie
Größenstandard GeneScan 500 ROX	Applied Biosystems

### 3.4 Oligonukleotide

Die aufgeführten Oligonukleotide sind bei Eurofins MWG Operon zur Synthese in Auftrag gegeben worden. Für die unterschiedlichen Klonierungsarbeiten wurden modifizierte Oligonukleotide verwendet. Dabei stellen die hervorgehobenen Nukleotide eingefügte Restriktionsschnittstellen für *Xba*I (fwd) bzw. *Eco*RI (rev) dar. Durch Unterstreichung sind willkürlich angehängte Nukleotide gekennzeichnet. Alle weiteren liegen der entsprechen DNA-Sequenz zu Grunde.

**Tab. 3-1: Übersicht der Klonierungs- und Sequenzierungsprimer.** Die Restriktionsschnittstellen sind fett hervorgehoben und die zusätzlich angehängte Nukleotide durch Unterstreichung gekennzeichnet. Die Fragmente wurden jeweils bei einer Annealing-Temperatur von 62°C amplifiziert.

Amplikon	Primer (5' → 3')	Fragment
FUT6	fwd: <u>AAGCTTCTCGAG</u> TCCCAGATACTCTGACCCATGGAT rev: <u>AAGCTTGAATTC</u> AGGCAAACGAGTCCTTAGG	1215 bp
MigR1 (Leervektor)	fwd: CCCTTGAACCTCCTCGTTCGAC rev: AGAAGACAGGGCCAGGTTC	248 bp

Für Expressionsanalysen verschiedener Differenzierungsmarker kamen die nachfolgenden Oligonukleotide zum Einsatz.

**Tab. 3-2: Übersicht der PCR-Primer zur Amplifikation aus cDNA.**

Amplikon	Primer (5'→ 3')	Annealing	Zyklen	Fragment
BSP	fwd: GCTCAGCATTTTGGGAATGGC rev: CTGCATTGGCTCCAGTGACAC	62°C	30	614 bp
CBF $\alpha$ 1	fwd: AGAGGTACCAGATGGGACTGTGGTT rev: GGTAGCTACTTGGGGAGGATTTGTG	55°C	28	200 bp
GAPDH	fwd: CGGGAAGCTTGTGATCAATGG rev: GGCAGTGATGGCATGGACTG	45°C	25	358 bp
INS1	fwd: CTACCTAGTGTGCGGGGAAC rev: GCTGGTAGAGGGAGCAGATG	63°C	30	197 bp
LPL	fwd: GAGATTTCTCTGTATGGCACC rev: CTGCAAATGAGACACTTTCTC	55°C	28	270 bp
PPAR- $\gamma$	fwd: CAGTGGGGATGTCTCATAA rev: CTTTGGCATACTCIGTCAT	55°C	33	400 bp

Die Chimärismusanalysen mittels STR-PCR wurden unter Verwendung folgender fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide durchgeführt.

**Tab. 3-3: Übersicht der PCR-Primer zur Chimärismusanalyse.** Die fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide wurden bei diesen Annealing-Temperaturen eingesetzt: 1P32 bei 58°C, alle weiteren bei 62°C.

Primer	Länge	Primersequenz 5' → 3'	Fluorochrom
1P32	140-209 bp	fwd: TGGCGAGACTCCATCAAAG rev: CCTTTAAGCTGCAACAATTC	FAM (blau)
CD4	88-128 bp	fwd: GCCTGAGTGACAGAGTGAGAACC rev: TTGGAGTCGCAAGCTGAACTAGC	HEX (grün)
CYP19	154-178 bp	fwd: GCAGGTACTTAGTTAGCTAC rev: TTACAGTGTGCCAAGGTCGT	FAM (blau)
VWF II	139-167 bp	fwd: TGTACCTAGTTATCTATCCTG rev: GTGATGATGATGGAGACAGAG	FAM (blau)
D8S1179	203-247 bp	fwd: ATTGCAACTTATATGTATTTTGTATTTGATG rev: ACCAAATTGTGTTCATGAGTATAGTTTC	NED (gelb)
D13S317	169-201 bp	fwd: ATTACAGAAGTCTGGGATGTGGAGGA rev: GGCAGCCCCAAAAGACAGA	NED (gelb)

### 3.5 Enzyme

<i>Pfu</i> DNA-Polymerase		Promega
T4 DNA-Ligase		Promega
<i>Taq</i> DNA-Polymerase		Qiagen
<i>EcoRI</i> (EcoRI)	<b>G/AATTC</b>	New England Biolabs
<i>EcoRV</i> (NEB 2)	<b>GAT/ATC</b>	New England Biolabs
<i>KpnI</i> (NEB 1)	<b>GGTAC/C</b>	New England Biolabs
<i>NcoI</i> (NEB 3)	<b>C/CATGG</b>	New England Biolabs
<i>XhoI</i> (NEB 4)	<b>C/TCGAG</b>	New England Biolabs

Für sämtliche Enzyme wurden die vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer in Klammern aufgeführt. Für die Restriktionsenzyme sind die entsprechenden Erkennungssequenzen und Schnittstellen angegeben.

### 3.6 Plasmide

MigR1*	M. Dominici, Modena, Italien
* pMSCVneo Ableitung	Clontech Laboratories

### 3.7 Kits

CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation	Promega
CytoSet IFN $\gamma$ ELISA	Biosource
Dako REAL Detection System, APAAP, Mouse	Dako
E.Z.N.A. Total RNA Isolation	Omega Bio-Tek
QIAprep Spin Miniprep	Qiagen
QIAquick Gel Extraction	Qiagen
QIAquick Nucleotide Removal	Qiagen
QIAquick PCR Purification	Qiagen
The SuperScript III First-Strand Synthesis System	Invitrogen
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis	Roche
TriFast	Peqlab Biotechnologie
VECTASTAIN Elite ABC Universal	Vector Laboratories

Für die verschiedenen Anwendungen war das jeweilige Handbuch des Herstellers maßgebend. Abweichungen vom Protokoll werden im Text gesondert beschrieben.

### 3.8 Antikörper

#### 3.8.1 Primärantikörper

Antigen, Konjugat, Spezifität & Isotyp	Klon	Hersteller
$\beta$ -Catenin, mouse-anti-human IgG <sub>1</sub>	14/Beta-Catenin	BD Bioscience
CD34 PE, mouse-anti-human IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	563	BD Bioscience
CD45 FITC, mouse-anti-human IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	HI30	BD Bioscience
CD73 PE, mouse-anti-human IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	AD2	BD Bioscience
CD90 PE, mouse-anti-human IgG <sub>1</sub>	F15-42-1	Serotech
CD105 FITC, mouse-anti-human IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	N1-3A1	Ancell
CD271 PE, mouse-anti-human IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	C40-1457	BD Bioscience
HLA-A, B, C PE, mouse-anti-human IgG <sub>1</sub> , $\kappa$	G46-2.6	BD Bioscience
HLA-A01, mouse-anti-human IgM	-	One Lambda
HLA-B08, mouse-anti-human IgM	-	One Lambda
HLA-DR PE, mouse-anti-human IgG <sub>2a</sub> , $\kappa$	L243	Biolegend
Kollagen II, rabbit-anti-human Ig	NCL-COLL-IIp	Novocastra
Nanog, rabbit-anti-human IgG	H-155	Santa Cruz
Nestin, mouse-anti-human IgG <sub>1</sub>	10C2	Chemicon
Oct-4, mouse-anti-human IgG <sub>1</sub>	9E3	Chemicon
SSEA-4, mouse-anti-human IgG <sub>3</sub> , $\kappa$	MC-813-70	DSHB

#### 3.8.2 Sekundärantikörper

IgG Cy3, goat-anti-mouse	polyclonal	Jackson IR
IgG FITC, goat-anti-mouse	polyclonal	Jackson IR
IgG FITC, goat-anti-mouse	polyclonal	BD Bioscience
IgG Rhodamin, goat-anti-rabbit	polyclonal	Upstate

#### 3.8.3 Isotypen

mouse IgG <sub>1</sub> , $\kappa$ FITC	X40	BD Bioscience
mouse IgG <sub>1</sub> , $\kappa$ PE	MOPC-21	Biolegend

---

### 3.9 Chemikalien und Reagenzien

Agar	Difco Laboratories
Agarose SeaKem	Lonza
Alizarin Red-S	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Ampuwa	Fresenius Kabi
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
BSA, Bovines Serumalbumin	PAA Laboratories
DAB	Linaris
DePeX	Electron Microscopy Sciences
DMSO, Dimethylsulfoxid	Merck
Einbettmedium	Leica Instruments
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Gibco
FACS-Flow	BD Bioscience
FACS-Clean	BD Bioscience
FACS-Rinse	BD Bioscience
Formaldehyd	Roth
Formamid	Applied Biosystems
Glycerin	Sigma-Aldrich
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fluka
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Roth
HOPE I+II	DCS Diagnostics
Isopropanol	Merck
Ladepuffer (6x)	Peqlab Biotechnologie
LB-Medium	Roth
Lysepuffer	Universitätsapotheke Tübingen
Methanol	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Merck
Normalserum, Ziege und Kaninchen	Dako
Oil Red-O	Sigma-Aldrich

---

p-Nitrophenylphosphat	Linaris
Paraffin	DCS Diagnostics
PBS, Phosphate Buffered Saline	Gibco
PFA, Paraformaldehyd	Merck
Propidiumiodid	BD Bioscience
Saponin	Sigma-Aldrich
SOC, Super Optimal Catabolite	Invitrogen
Toluidinblau	Fluka
Trinatriumzitatridihydrat	Sigma-Aldrich
Triton-X 100	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Sigma-Aldrich
TrypLE	Gibco
Trypsin	PAA Laboratories
Tween 20	Roth
Universalagarose	Peqlab
Xylen	VWR
Zitronensäuremonohydrat	Merck

### 3.10 Verbrauchsmaterialien

Chamber Slide Systems	Nunc
Deckgläschen	Menzel-Gläser
Einmalskalpelle, steril	Braun
FACS-Röhrchen (5 ml)	BD Bioscience
Falcon-Tubes (15 ml & 50 ml)	BD Bioscience
Kryo-Tubes (1.5 ml)	Corning
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf
Multiwellplatten (6 well & 96 well)	BD Bioscience
Objektträger Super Frost Plus	Menzel-Gläser
Pasteurpipetten	WU Mainz
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One
Scaffolds (Kalziumphosphat, Kollagen, OPLA)	BD Bioscience
Zellkulturflaschen	Corning
Zellkulturpipetten	Corning

### 3.11 Firmenübersicht

Abimed, Langenfeld

Ancell Corporation, Bayport, MN, USA

Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

BD Bioscience, Heidelberg

Biochrom, Berlin

Bio-Rad Laboratories, München

Biolegend, San Diego, CA, USA

Biosource, Nivelles, Belgien

Braun, Melsungen

Calbiochem, San Diego, CA, USA

Chemicon, Schwalbach

Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA

Corning, Corning, NY, USA

Dako, Hamburg

DCS Diagnostics, Hamburg

Diagnostic Products Corporation, Gwynedd, UK

Difco Laboratories, Sparks, MI, USA

DSHB, Iowa City, IA, USA

Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA

Eppendorf, Hamburg

Eurofins MWG Operon, Ebersberg

Fluka, Seelze

Fresenius Kabi, Bad Homburg

GFL, Burgwedel

Gibco, Paisley, UK

Gilson, Middleton, WI, USA

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Heidolph Instruments, Schwabach

Heraeus Instruments, Osterode

Hettich GmbH, Tuttlingen

Invitrogen, Karlsruhe

Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA

Leica Instruments, Wetzlar

Linaris, Wertheim-Bettingen

Lonza, Wuppertal  
Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen  
Mediagnost, Reutlingen  
Menzel-Gläser, Braunschweig  
Merck, Darmstadt  
New England Biolabs, Frankfurt am Main  
Novocastra, Newcastle, UK  
Novo Nordisk Pharma, Mainz  
Nunc, Langenselbold  
Olympus, Hamburg  
Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA  
One Lambda, Canoga Park, CA, USA  
PAA Laboratories, Cölbe  
Peqlab Biotechnologie, Erlangen  
Promega, Madison, WI, USA  
Qiagen, Hilden  
Pharmacia Biotech, Cambridge, UK  
RayBiotech, Norcross, GA, USA  
Raytest, Straubenhardt  
Reichert-Jung, Nussloch  
Roche Diagnostics, Mannheim  
Roth, Karlsruhe  
Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg  
Serotec, Düsseldorf  
Sigma-Aldrich, München  
Stem Cell Technologies, Köln  
Stratagene, La Jolla, CA, USA  
Tebu-Bio, Offenbach  
Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA  
Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA  
VWR, Darmstadt  
Wockhardt, Wrexham, UK  
WTW, Weilheim  
WU Mainz, Bamberg

### 3.12 Laborgeräte

ABI PRISM 310C Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Begasungsbrutschrank HERA Cell	Heraeus Instruments
ELISA Reader Milenia Kinetic Analyzer	Diagnostic Products Corporation
FACS Calibur Flowcytometer	BD Bioscience
Geldokumentationssystem	Raytest
Gelelektrophoresesystem	Peqlab Biotechnologie
Inkubationsschüttler	GFL
Mikroskop IX50 & BX60	Olympus
Neubauer Zählkammer	Marienfeld-Superior
pH-Meter MultiCal pH538	WTW
Pipetten	Abimed & Gilson
Power PAC 200	Bio-Rad
Rotationsmikrotom Supercut 2050	Reichert-Jung
Spektrophotometer GeneQuant II	Pharmacia Biotech
Sterilbank HERA safe	Heraeus Instruments
Thermocycler GeneAmp 9700	Applied Biosystems
Thermomixer 5436 (95°C)	Eppendorf
Vortexer	Heidolph Instruments
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf
Zentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge Mikro 22 R	Hettich Zentrifugen

### 3.13 Software

CellQuest Pro 4.0.2	BD Bioscience
Cell <sup>^</sup> F 2.3	Soft Imaging Systems

## 4 Methoden

### 4.1 Allgemeine Arbeiten mit Nukleinsäuren

#### 4.1.1 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese wurden DNA-Moleküle bei konstanter Spannung von 120 V ihrer Größe nach aufgetrennt. Dabei kamen jeweils 3 µl eines Längenstandards zum Einsatz, der eine relative Größenbestimmung der vorhandenen DNA-Fragmente zulässt.

Es wurde ein horizontales Agarosegel von 1,5-2% mit 1x TBE-Puffer (10,8 g Tris, 7,09 g Borsäure, 0,74 g EDTA-Dinatriumdihydrat, 1 l ddH<sub>2</sub>O; pH 8,0) als Gel- und Elektrophoresepuffer im System eingesetzt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt, um eine Bildgebung unter UV-Licht zu gewährleisten. Für das Beladen der Geltaschen wurden die Proben mit 4 µl 6x Ladepuffer (10 mM Tris-HCl; pH 7,6, 60 mM EDTA, 0,03% Bromphenolblau, 0,03% Xylencyanol, 60% Glycerin) vermischt. Für die photographischen Aufnahmen wurde ein digitales Geldokumentationssystem verwendet.

#### 4.1.2 Spektrophotometrische Bestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren in wässriger Lösung lässt sich photometrisch bestimmen. Dabei werden je zwei UV-Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich von  $\lambda = 220-320$  nm aufgenommen. Die Konzentration der Nukleinsäuren errechnet sich aus der Extinktion bei  $\lambda = 260$  nm ( $OD_{260}$ ) und der Schichtdicke  $d$  der eingesetzten Küvette. Eine  $OD_{260}$  von 1,0 entspricht bei  $d = 1$  einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA, 33 µg/ml ssDNA bzw. 40 µg/ml RNA. Aus dem Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) lässt sich der Reinheitsgrad der Nukleinsäure ableiten. Für reine DNA liegt dieser Quotient zwischen 1,8 und 2,0, der für reine RNA zwischen 1,9 und 2,1. Bei Verunreinigungen durch Proteine sinkt dieser Wert. Abweichungen im Nachkommastellenbereich von 1,0 wurden toleriert. Bei größeren Unreinheiten wurde eine Aufreinigung der Nukleinsäuren, insbesondere von RNA, durch Phenol-/Chloroform-Extraktion durchgeführt.

#### 4.1.3 Nukleinsäureaufreinigung durch Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Methode beruhte auf der Einschnitt-Flüssigphasen-Separation unter Verwendung des Reagenzes TriFast. Eine einphasige Lösung enthält dabei Phenol und Guanidinisothiocyanat, worin die wässrig gelösten Nukleinsäuren aufgenommen wurden. Durch Zugabe von

Chloroform und nach anschließender Zentrifugation bildet sich aus dem Homogenat drei Phasen: die rote Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischen liegende Interphase. Die RNA ist ausschließlich in der wässrigen Phase angereichert, die DNA und die Proteine befinden sich in der Inter- und der Phenolphase.

Die wässrige Phase wurde mit 0,5 ml Isopropanol pro eingesetzten Milliliter Trifast vermischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 12000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Isopropanolüberstand wurde vorsichtig abgenommen und das RNA-Präzipitat zweimal mit 1 ml 75% Ethanol durch Vortexen und erneuter Zentrifugation gewaschen. Das luftgetrocknete RNA-Pellet wurde in mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltem Wasser gelöst.

## **4.2 Molekularbiologische Arbeiten mit RNA und DNA**

### **4.2.1 Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen**

Der Isolation von RNA aus adhärent kultivierten, eukaryotischen Zellen sowie aus humanen Gewebeproben ging allgemein die Lyse und Homogenisierung der Zielzellen voraus. Nur so konnte eine vollständige Freisetzung aller RNA gewährleistet werden. Dieser Vorgang wurde für adhärent wachsende Zellen durch Resuspension in der Kulturschale vorgenommen. Bei Gewebeproben wurde hingegen ein Glashomogenisator eingesetzt. Die Gewinnung von Gesamt-RNA wurde mit dem E.Z.N.A. Total RNA Isolation Kit durchgeführt. Bei allen Isolationsschritten war das Handbuch des Herstellers maßgebend. Die RNA lag abschließend in mit RNase-Inhibitor versetztem Wasser vor und wurde umgehend bei -20°C verwahrt.

### **4.2.2 Synthese von cDNA durch RT-PCR**

Für die Expressionsanalyse von ausgewählter Gene sowie für die Umsetzung bestimmter Klonierungsstrategien ist die Synthese von cDNA als *Template* notwendig. Die erforderliche reverse Transkription der isolierten RNA in komplementäre DNA folgte der Anleitung des Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kits. Dabei wurden jeweils RNA-Mengen zwischen 0,5-1 µg eingesetzt. Als unspezifische Primer in der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden Hexamere gewählt. Der eigentliche Syntheseschritt fand 30 min bei 55°C statt, anschließend wurde die Reverse Transkriptase (RT) bei 85°C für 5 min inaktiviert. Der Reaktionsstopp erfolgte auf Eis.

### 4.2.3 Amplifikation von Fragmenten aus cDNA

Unter Verwendung genspezifischer Primer und verschiedener thermostabiler DNA-Polymerasen konnten relevante Fragmente aus cDNA amplifiziert werden. Für Expressionsanalysen wurde die Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* eingesetzt. Für alle Klonierungsfragmente wurde die Polymerase von *Pyrococcus furiosus* die mit einer proof-reading Eigenschaft ausgestattet ist, verwendet. So konnte die Fehlerrate in der zu amplifizierenden Sequenz minimiert werden, jedoch war dafür eine Verlängerung der Elongationszeit bis 2 min erforderlich. Die *Annealing*-Temperatur ( $T_a$ ) für die Hybridisierung der Primer an die Matrizen-DNA wurde in Abhängigkeit des GC-Gehaltes der Primersequenz entsprechend der „4+2“-Regel  $\{T_a = T_m - 2^\circ\text{C}; T_m = 4^\circ\text{C} (\text{G+C}) + 2^\circ\text{C} (\text{A+T})\}$  bestimmt. Die Amplifikationen folgten dem Beispielschema des internen Standards, GAPDH: 25x (30 s bei 95°C, 30 s bei 45°C, 30 s bei 72°C).

Eine Liste der eingesetzten Oligonukleotide inklusive *Annealing*-Temperatur und Zyklenzahl ist unter Abschnitt 3.4 zu finden. Die PCR wurde in Thermocyclern mit beheizbarem Deckel durchgeführt, der die Bildung von Kondensat und den daraus resultierenden Volumenfehlern in den aufeinander folgenden Zyklen vermeiden sollte.

### 4.2.4 Chimärismusanalyse durch Amplifikation von Mikrosatelliten

Zur Bestimmung des Anteils von Spenderzellen im Blut oder verschiedenen Geweben eines Empfängers nach Stammzelltransplantation dient die Methode der PCR-Amplifikation von Mikrosatelliten, so genannte *Short tandem repeats* (STR), aus isolierter DNA<sup>244</sup>. Bei den STR handelt es sich um hoch polymorphe, repetitive, nicht kodierende Sequenzen von 2 - 7 bp Länge. Die Unterscheidung der Individuen ergibt sich aus der unterschiedlichen Anzahl der Wiederholungen dieser Sequenzen und den daraus resultierenden Fragmentlängen. Insgesamt erreichen die STR Längen von 80 bis 300 bp. Diese äußerst sensitive PCR-Methode benötigt dabei nur sehr geringe Menge DNA.

Die verwendeten Primer wurden mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (Tab. 3-3). Die Chimärismus-PCR folgte exemplarisch diesem Amplifikationsschema: 35x (60 s bei 95°C, 45 s bei 62°C, 90 s bei 72°C) + (30 min bei 60°C). Die amplifizierten Mikrosatelliten wurden nach Anleitung des Herstellers des ABI PRISM 310C Genetic Analyzer im Kapillargel elektrophoretisch aufgetrennt. Vorbereitend wurden die Proben mit Formamid für 2 min bei 90°C denaturiert, sofort abgekühlt und gleichzeitig mit dem Größenstandards GeneScan 500 ROX in das Gerät überführt.

#### 4.2.5 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Nach Auftrennung der amplifizierten Fragmente in einem Agarosegel von 1,5-2% und Färbung mit Ethidiumbromid wurden die gewünschten Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht, ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers aus dem Gel isoliert. Unter Verwendung von drei Volumen des Puffers QG und zuzüglich eines Volumens Isopropanol war das Protokoll auch zur Aufreinigung von enzymatischen Reaktionsansätzen geeignet.

Für die Extraktion wurde das Gelstück in Puffer aufgenommen und unter Inkubation bei 50°C vollständig gelöst. Die Lösung wurde auf eine entsprechende Säule geladen und für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Es folgten verschiedene Wasch- und Zentrifugationsschritte. Die noch gebundene, gereinigte DNA wurde abschließend mit 20-30 µl ddH<sub>2</sub>O durch Zentrifugation eluiert und war nun weitgehend frei von Enzymen, Nukleotiden, Primern, Agarose, Salzen, Farbstoffen und Ethidiumbromid.

#### 4.2.6 Restriktionsverdau von DNA

Zur Herstellung von DNA-Fragmenten mit angehängten Restriktionsschnittstellen bzw. zur Linearisierung von Plasmiden zum Einsatz in Ligationen (präparativer Verdau) sowie zur Überprüfung von Ligationen (analytischer Verdau) wurde die Spaltung der DNA durch sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Dabei wird durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung die DNA fragmentiert.

Im analytischen Verdau wurden 1-2 µg, im präparativen Verdau 15-20 µg in H<sub>2</sub>O gelöste DNA eingesetzt. Den Vorgaben des Herstellers zur geeigneten Pufferwahl (siehe Abschnitt 3.5) wurde jeweils entsprochen. Die Inkubation erfolgte nach Zugabe von 10-20 U entsprechend 1 µl Enzymlösung für 10-90 min bei 37°C. Anschließend wurden die aus den analytischen Verdauen resultierenden DNA-Fragmente in Agarosegelen, wie aus den Abschnitten 4.1.1 und 4.2.5 zu entnehmen, aufgetrennt und isoliert. Die Ansätze aus präparativen Verdauen wurden vor ihrer weiteren Verwendung mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit von allen Reaktionskomponenten und DNA-Fragmenten <17 bp gereinigt.

#### 4.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten ist die T4 DNA-Ligase auf Grund der Eigenschaft sowohl überhängende Termini („*sticky ends*“) als auch glatte Termini („*blunt ends*“) ligieren zu können, besonders gut geeignet.

Die Methode der „*sticky/sticky*“-Ligation kommt insbesondere bei Klonierungen von DNA-Fragmenten in ein beliebiges Expressionsplasmid zur Anwendung. Bei der Verknüpfung von Vektor und DNA-Fragment wurde auf ein äquimolekulares Verhältnis von 1:3 geachtet. In einem Endvolumen von 10 µl kamen neben 150 ng Vektor, Insert und 1 µl T4 DNA-Ligase (3 U/µl) auch der entsprechende 10x Ligase-Puffer und ddH<sub>2</sub>O zum Einsatz. Die Inkubation fand entweder bei 4°C über Nacht oder auch bei Raumtemperatur für 4 h statt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das gesamte Volumen wie unter Abschnitt 4.3.2 beschrieben zur Transformation eingesetzt.

#### **4.2.8 Amplifikation aus Bakterienkolonien („Kolonie-PCR“)**

Die „Kolonie-PCR“ wurde zur Überprüfung transformierter Bakterienkolonien auf die Anwesenheit des Vektors zum einen und des Inserts im Vektor zum anderen angewendet. Dazu wurden einzelne Kolonien mit dem Zahnstocher direkt von der Agarplatte genommen und in 30 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Der Zahnstocher wurde daraufhin zum Animpfen einer Bakterienkultur von 4 ml LB-Medium benutzt. Die Suspension hingegen wurde über 5 min bei 95°C erhitzt, anschließend für 10 min auf Eis gestellt und letztlich für weitere 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde als *Template* mit 5 µl in der PCR eingesetzt. Das Reaktionsschema entsprach dabei 30x (30 s bei 95°C, 30 s bei 62°C, 45 s bei 72°C).

Als Primer dienten fragmentspezifischen Oligonukleotide, die das Insert von 1215 bp amplifizierten (Abschnitt 3.4). Diese boten dabei zusätzlich den Vorteil einer Negativkontrollfunktion bei Abwesenheit des Inserts. Es konnte also auf Grund der Tatsache, dass die Primersequenzen etwas vor bzw. nach den Insertionsstellen lagen, auch aus einem Vektor ohne Insertion ein Fragment von 248 bp Länge amplifiziert werden. Die qualitative Analyse des PCR-Produkts wurde über die elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel vorgenommen (Abschnitt 4.1.1).

#### **4.2.9 Sequenzierung von DNA**

Die Sequenzierung von DNA beruht auf dem Prinzip der Strangabbruchmethode, bei der die Neusynthese von DNA-Strängen nach dem statistischen Einbau von Didesoxynukleotiden (ddNTP) terminiert wird<sup>245</sup>. Als Matrize für die Sequenzier-PCR diente ein Einzelstrang der zu analysierenden DNA, wobei der Startpunkt der Synthese durch einen entsprechenden Primer bestimmt wurde. Die verschiedenen ddNTP waren dabei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert.

Die Sequenzierung der gewonnenen Plasmide wurde zu diesem Zweck kommerziell bei Eurofins MWG Operon Sequencing Department in Martinsried in Auftrag gegeben.

### **4.3 Arbeiten mit prokaryotischen Zellkulturen**

#### **4.3.1 Kultivierung und Kryokonservierung von *E. coli***

Der *E. coli* Stamm XL1-Blue wurde zur Kultivierung in LB-Medium (10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 1 l ddH<sub>2</sub>O; pH 7,5) angezogen. Die Inkubation erfolgte im Wärmeschüttler unter 150-200 rpm bei 37°C über Nacht. Zur Selektion wurde dem Medium 50-100 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Für Kryokonservierungen wurden zu 750 µl Bakterienkultur 250 µl Glycerin zugegeben und vermischt, bei -80°C tiefgefroren und bis zur weiteren Verwendung dort gelagert.

#### **4.3.2 Transformation kompetenter *E. coli***

Zur Transformation von Plasmiden in kompetente *E. coli* wurde das zu Grunde liegende Protokoll für den Bakterienstamm XL1-Blue der Firma Stratagene im Detail nachvollzogen. So wurden 1 µg aufgereinigte Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz zu 100 µl Bakterien-suspension vorsichtig hinzupipettiert. Der Ansatz wurde für 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 s und eine erneute Inkubation von 2 min auf Eis, bevor 900 µl SOC-Medium zugegeben wurden. Nach 1 h Inkubation im Wärmeschüttler bei 37°C wurden anschließend 50-100 µl des Ansatzes auf LB-Selektionsplatten (1,5% Agar) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C weiter inkubiert. Der Selektionsagar wurde zuvor in flüssiger Form autoklaviert und auf 55°C abgekühlt. Nach Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin konnten daraufhin die Platten gegossen werden.

#### **4.3.3 Plasmidpräparationen aus *E. coli***

Die Präparation von Plasmid-DNA, wie sie für Klonierungen, Sequenzierungen und/oder Transfektionen benötigt werden, wurde mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit nach den Angaben des Herstellers vorgenommen. Größere Mengen wurden mit dem Midi bzw. Maxi Kit des Herstellers isoliert. Die Isolierung liegt dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterienkulturen und der Adsorption an und der Elution der Plasmid-DNA von einer Harzsäule über Anionenaustausch durch Veränderung der Salzkonzentration und des pH-Wertes zu Grunde.

Für die Durchführung der Minipreps wurden Kulturen mit einem Volumen von 4-10 ml 16 h zuvor angeimpft. Alle verwendeten Puffer wurden vom Hersteller bereitgestellt. Die Elution erfolgte mit ddH<sub>2</sub>O.

#### 4.4 Arbeiten mit eukaryotischen Zellkulturen

##### 4.4.1 Isolation, Kultivierung und Kryokonservierung von MSC

Die Isolation mesenchymaler Stromazellen erfolgte sowohl aus Knochenmarkspiraten als auch aus Zahnpapillen extrahierter Weisheitszähne. Für die Zellgewinnung aus Geweben wurde steriles Präparationsbesteck, wie Skalpell und Pinzette, für deren Zerkleinerung verwendet. Gegebenenfalls wurde eine Quetschpräparation kleinerer Gewebestücke mit den Kolben von Einwegspritzen durchgeführt, um eine dichtere Zellsuspension zu erhalten. Zellen und verbleibende Gewebereste wurden im Anschluss zusammen in Kulturmedium aufgenommen. Die Aufarbeitung von Knochenmarkspiraten wurde mit der Eliminierung der Erythrozyten mittels Ammoniumchloridlyse begonnen. Hierfür wurden die Proben in einem Volumenverhältnis von 1:5 mit Lysepuffer (8,29 g Ammoniumchlorid, 1 g Kaliumhydrogencarbonat, 0,037 g Na<sub>2</sub>EDTA · H<sub>2</sub>O, 1 l ddH<sub>2</sub>O) aufgenommen und für 10 min bei Raumtemperatur rotierend inkubiert. Das Lysat wurde in den darauf folgenden Zentrifugationen für 5 min bei 400 g pelletiert, mit PBS gewaschen und in Kulturmedium resuspendiert.

Die Medien setzten sich standardgemäß aus DMEM (1 g/l Glukose) und den folgenden Zusätzen zusammen: entweder 5% (v/v) FFP, 1% (v/v) TKZ (ca.  $1 \times 10^7$  Thrombozyten) und 1 IU/ml Heparinsulfat oder 10% FCS. Beide Medien wurden mit 2 mM Glutamin und Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml) supplementiert. Die Kultivierung erfolgte standardgemäß im Begasungsbrutschrank bei 37°C unter wassergesättigter Atmosphäre mit 10% CO<sub>2</sub>.

Mesenchymale Stromazellen sind adhärent wachsende Zellen. Nach 48 h wurde das Medium vollständig erneuert, um andere Zellen und Gewebereste zu entfernen. Die Passage fand in der Regel erstmalig nach 7-10 Tage statt. Danach wurden die Zellen durchschnittlich alle 4 Tage bei einer Konfluenz von 90% mittels Trypsinlösung (PBS, 0,05% Trypsin) und kurzer Inkubation bei 37°C abgelöst und umgesetzt. Die Zelldichte und Teilungsverhältnisse ergaben sich vorrangig aus der jeweiligen Versuchsplanung.

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen pelletiert und in 1 ml FFP bzw. FCS mit je 10% DMSO aufgenommen und in Aliquots bei -80°C gelagert. Eingefrorene Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C, bis nur noch ein kleines Eisstückchen zu sehen war, aufgetaut, in vorgewärmtem Medium aufgenommen, bei 400 g für 5 min zentrifugiert und in Medium resuspendiert. Alle Zellkulturarbeiten wurden ausnahmslos unter Sterilbänken durchgeführt.

#### 4.4.2 Gabekriterien von MSC zur klinischen Anwendung

In Übereinstimmung mit dem Ethikkommissionsvotum 241/2005V und unter Voraussetzung der informierten Einwilligung der Patienten und/oder der Eltern wurde nach lokaler Desinfektion und Anästhesie 10 ml Knochenmark aus der *Spina iliaca posterior superior* aspiriert und heparinisiert. Die nachfolgenden Zellkulturarbeiten wurden unter GMP-Bedingungen in einem klinikeigenen Reinraumlabor durchgeführt. Die Erythrozytenlyse und alle weiteren Kultivierungsschritte entsprachen den unter Abschnitt 4.4.1 beschriebenen Vorgängen. Als wesentliche Änderung hierbei galt der Austausch jeglicher Proteine tierischen Ursprungs durch humane Blutprodukte und rekombinant hergestellte Proteine. Nach drei Passagen und einer maximalen Kulturdauer von vier Wochen wurden die MSC geerntet, gewaschen und für die Applikation in 3 ml physiologischer NaCl-Lösung (0,9%) mit 0,1% humanem Albumin aufgenommen.

Die Kriterien für die Gabe der MSC beinhalteten die Vitalität von >90%, die Abwesenheit von T-Zellen und die Expression von CD73 und CD105 bei mehr als 90% der Zellen. Die Überprüfung wurde mittels FACS-Analyse angestellt.

Initial wurden für die jeweiligen MSC-Spender serologische Gutachten beim Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Auftrag gegeben, um Infektionsrisiken auszuschließen. Hierfür wurde die mögliche Existenz von bakterien- und virusspezifischen Antikörpern (IgG und IgM) im Serum der Spender nachgewiesen. Immunglobulin (Ig) der Klasse M wurde als Zeichen einer akuten Infektion gewertet und galt damit als Ausschlussparameter. Im bakteriologischen Ergebnis mussten Antikörper gegen Toxoplasmose und *Treponema pallidum* einen negativen Befund aufweisen. In den virologischen Testungen wurden virusspezifische Antikörper gegen anti-HBs, anti-HAV und CMV, HCV und HIV untersucht. Es durften keine IgM-Antikörper für CMV und zusätzlich auch keine IgG für HCV und HIV detektiert werden. Bei positiven IgG Befunden für anti-HBs und anti-HAV galt ein Wert >200 IE/l als Zeichen protektiver Immunität nach zurückliegender Infektion oder einer aktiven/passiven Immunisierung. Außerdem wurden quantitative PCR für HCV und HIV angefertigt. Dabei mussten ebenfalls alle Parameter negativ sein. Zur Kontrolle der Sterilität wurden mit Beginn der Kultur und im Verlauf mikrobiologische Tests durchgeführt. Die abschließenden Sterilitätsprüfungen fanden jeweils mit der letzten Passage, also etwa eine Woche vor Gabe der MSC, statt. Es wurden ausschließlich MSC-Kulturen mit negativen Befunden in allen bakteriologischen Tests (aerobe, anaerobe und fungale Kultur; Mycoplasmen-PCR) transplantiert.

#### 4.4.2.1 Einschlusskriterien für die Behandlung von Patienten mit Osteonekrose

Die Einschlusskriterien für die klinische Anwendung von MSC bei Patienten mit AVN waren die der konventionellen Core Decompression und sind mit der radiologischen Diagnose, Schmerz, intakter kortikaler Knochenstruktur und dem Versagen nicht invasiver Methoden nach sechs Monaten definiert.

#### 4.4.2.2 Chirurgische Prozedur der Core Decompression

Unter radiologischer Kontrolle wurde die AVN lokalisiert und anschließend angebohrt. Zunächst wurde der Detritus abgesaugt und dann die autologen MSC über eine Knopfkanüle injiziert. Der Rückfluss der Suspension wurde durch den Verschluss des Bohrloches mit Fibrinkleber oder Knochenwachs verhindert.

#### 4.4.3 Besiedlung von Polymergerüsten durch MSC

In die Kavitäten von 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden unter sterilen Bedingungen die dreidimensionalen Polymergerüste einzeln gelegt. Die Aussaat der MSC erfolgte in einem Präinkubationsschritt, bei dem  $5 \times 10^4$  Zellen in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  Standardmedium auf die *Scaffolds* aufgetropft wurden und anschließend 2 h bei 37°C darauf adhärten. In einem zweiten Schritt wurden weitere 150  $\mu\text{l}$  des Standardmediums pro *Scaffold* in die Kavitäten pipettiert. Die osteogene Differenzierungen konnten nach zusätzlichen 3 h Inkubation induziert werden.

#### 4.4.4 Proliferationsassay

Die Proliferation von MSC wurde mittels des CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay bestimmt. Diesem liegt das Prinzip der Bio-reduzierung einer Tetrazolium-Verbindung (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium; MTS) durch stoffwechselaktive Zellen zu einem farbigen Formazankomplex zu Grunde. Die Quantifizierung erfolgte über die Messung der optischen Dichte in einem Mikrotiterplattenphotometer bei einer Absorption von 490 nm. Das Reaktionsprodukt galt als direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen.

Die MSC wurden initial in Tripletten in Dichten von 1000 Zellen pro Kavität in 96-Loch-Mikrotiterplatten in Standardmedium (5% FFP) kultiviert. Nach Erreichen einer Konfluenz von 90% wurde das Medium entfernt, mit PBS gewaschen und das MTS-Reagenz auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Begasungsbrutschrank mit 10% CO<sub>2</sub> für 1-4 h.

#### 4.4.5 Immunophänotypisierung durch FACS-Analyse

Die Analyse relevanter Oberflächenmoleküle von Zellen wurde am FACS Calibur realisiert. MSC wurden in definierten Zellzahlen von  $1-2,5 \times 10^5$  in FACS-Röhrchen gegeben und zweimal mit FACS-Puffer (PBS, 2% FCS, 0,01%  $\text{NaN}_3$ ) gewaschen. Die Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurde für 15 min unter Lichtausschluss bei  $4^\circ\text{C}$  durchgeführt. Nach dem Färbeschritt wurden die Zellen dreimal mit FACS-Puffer gewaschen und bis zur Messung auf Eis unter Lichtausschluss verwahrt. Für jeden Versuchsansatz wurden Vergleichsfärbungen mit Isotypkontrollantikörpern zum Ausschluss unspezifischer Wechselwirkungen angestellt.

Direkt vor den Einzelmessungen wurde Propidiumiodid, das die Möglichkeit besaß, tote Zellen anzufärben, zugegeben. Propidiumiodid wirkt dabei als DNA-Interkalator nachdem es perforierte Membranen nicht vitaler Zellen selektiv durchdrungen hat. So konnte sichergestellt werden, dass die Evaluierung der Oberflächenmarker ausschließlich an vitalen Zellen stattfand. Die Auswertung der Daten erfolgte über die Software CellQuest Pro 4.0.2. Eine Liste der verwendeten Antikörper wurde unter Abschnitt 3.8 aufgeführt.

#### 4.4.6 In vitro Differenzierungen und Färbenachweise von MSC

Zur **osteogenen Differenzierung** wurden subkonfluente MSC in 3 ml DMEM (1 g/l Glukose) mit 5% FFP, 1% TKZ und 1 IU/ml Heparinsulfat, 100 IU/ml Penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin, 2 mM Glutamin pro Kavität in 6-Loch-Mikrotiterplatten kultiviert. Die Induktion erfolgte biphasisch mit der Zugabe von 10 nM Dexamethason und 100  $\mu\text{M}$  L-Ascorbinsäure-2-phosphat für eine Woche und zusätzlich mit 10 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat und 100 ng/ml BMP-2 mit Beginn der Zweiten. Bei ausgewählten Differenzierungsexperimenten unter Hypoxie (3%  $\text{O}_2$ ) wurden zusätzlich 100 U/ml  $\text{IFN}\gamma$  zugefügt. Das Medium wurde alle drei Tage durch frisches ersetzt. Nach 14 Tagen konnte die Differenzierung gestoppt und der Nachweis mit Alizarinrot vorgenommen werden.

Nach zwei Wochen wurde bei den differenzierten MSC und den undifferenzierten Kontrollen das Medium entfernt, jeweils mit PBS gewaschen und mit eiskaltem Methanol (100%) 2 min fixiert. Es folgten anschließend ein kurzes Lufttrocknen und die umgehende Rehydratisierung mit  $\text{ddH}_2\text{O}$ . Die Nachweisfärbung der Kalziumpräzipitate erfolgte durch die Inkubation mit 0,5% Alizarinrot für 30-60 s bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Zellen 15 min mit PBS gewaschen, mit eiskaltem Ethanol (100%) dehydriert und getrocknet.

Die Induktion der **adipogenen Differenzierung** wurde an subkonfluenten MSC in 3 ml DMEM (1 g/l Glukose) mit 5% FFP, 1% TKZ und 1 IU/ml Heparinsulfat, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM Glutamin, supplementiert mit 1 µM Dexamethason, 60 µM Indomethacin, 0,5 µM IBMX und 10 µM Insulin pro Kavität in 6-Loch-Mikrotiterplatten durchgeführt. Das Medium wurde alle 4-5 Tage erneuert. Nach 2-5 Wochen konnten Fettvakuolen in den Zellen beobachtet werden. Der Färbenachweis erfolgte durch die Anwendung von Ölrot.

Der Differenzierungsnachweis beruhte auf der Färbung der entstandenen Fettvakuolen in den induzierten MSC. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und 10 min mit den Dämpfen von Formalin (40%) fixiert. Nacheinander wurde mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit 1% Ölrot für 3 min gefärbt. Um überschüssige Farbe zu entfernen, wurden die Zellen für 5 min unter fließendem Wasser gewaschen und anschließend getrocknet.

Die **chondrogene Differenzierung** von MSC wurde an Mikrozellmassen vorgenommen. Dafür wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in einem konischen 15 ml Falcon für 5 min bei 400 g zu einem Pellet zentrifugiert. Die Induktion erfolgte mit der Übersichtung von 2 ml H-DMEM (4,5 g/l Glukose) mit 5% FFP, 1 IU/ml Heparinsulfat, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM Glutamin, supplementiert mit 5 ng/ml TGF-β3, 50 µM L-Ascorbinsäure-2-phosphat, 100 nM Dexamethason, 1 mM Natriumpyruvat und 1x ITS. Das Medium wurde nach jeweils vier Tagen durch Zentrifugation ausgetauscht. Nach 4-5 Wochen kugelten sich die Zellmassen ab und konnten nach dem Verfahren der HOPE-Fixierung (*Hepes glutamic acid buffer mediated organic solvent protection effect*) in Paraffin eingebettet werden. Hierbei war das Herstellerprotokoll von DCS Diagnostics maßgebend.

Die Prozedur der Fixierung wurde unter strenger Einhaltung der Temperaturvorgabe von 0-4°C vorgenommen. Im Einzelnen wurde frisches Gewebe, hier die Mikrozellmasse, in HOPE I-Lösung für 12-72 h auf Eis inkubiert. Danach wurde die erste Lösung entfernt und das Gewebe zur Dehydratisierung für 2 h in eiskaltes Aceton mit 0,1% HOPE II gegeben. Im Intervall von 2 h wurden die Lösungen dreimal gegen reines eiskaltes Aceton ausgetauscht, sodass die Dehydratisierung nach insgesamt 8 h abgeschlossen werden konnte. Das Gewebe wurde nun unverzüglich in eine durchlässige Kassette gelegt und in vorgewärmtes niedrigschmelzendes Paraffin (52-54°C) getaucht. Dabei wurde darauf geachtet, dass Luftblasen möglichst entweichen konnten. Die vollständige Paraffinierung der Proben erfolgte über Nacht bei 54-55°C im Wärmeschränk oder Wasserbad. Die Paraffinblöcke wurden bis zu weiteren Verwendung im Kühlschrank verwahrt und gegebenenfalls am Mikrotom für die immunhisto-

chemische Evaluierung (Abschnitt 4.4.8) zu 4 µm dünnen Schnitten verarbeitet. Zur Nachweisfärbung wurde Toluidinblau verwendet.

Nach Abschluss der Differenzierung von MSC und Anfertigung der Mikrotomschnitte konnten die gebildeten Kollagenfasern und Proteoglykanen blau angefärbt werden. Hierfür wurde das Protokoll nach Trump *et al.* verwirklicht und eine Lösung von 0,1% Toluidinblau in 2,5% wässrigem Natriumcarbonat verwendet<sup>246</sup>. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte zweimal für 10 min in PBS gewaschen und umgehend über eine aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90% und 100%) und Xylen in je zwei Bädern für 10 s entwässert und zur Mikroskopie vorbereitet.

Für die **Inselzellendifferenzierung** von MSC in insulinproduzierende Zellen wurden die Kulturen mit einer Dichte von  $2-3 \times 10^4$  Zellen pro Kavität in 6-Loch-Mikrotiterplatten begonnen<sup>247</sup>. Die Aussaat erfolgte auch in Kavitäten mit Gelatine (0,1%) oder FFP *Coating*. Als serumfreies Kulturmedium wurde DMEM/F-12 (1,44 g/l Glukose/2,4 g/l Natriumbicarbonat/0,5 mM Glutamin) mit 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, B27, N2-A und 25 ng/ml bFGF supplementiert. Für serumhaltige Kulturbedingungen wurden zusätzlich FFP in verschiedenen Konzentrationen (0%, 1%, 2%, 3% oder 5%), 1% TKZ und 1 IU/ml Heparinsulfat zugegeben. Die Induktion erfolgte sechs Tage nach Kulturstart über den Ersatz des Supplements bFGF durch 10 mM Nicotinamid für weitere 6 Tage<sup>248</sup>. Ein Mediumwechsel fand alle drei Tage statt. Neben den angeführten Variationen in den Kulturbedingungen wurden auch unterschiedliche Glukosekonzentrationen des Mediums getestet und die Dauer der Differenzierung verlängert. Der Nachweis erfolgte über die Amplifikation eines 197 bp Fragments des Insulin-1 Gens via PCR. Die entsprechenden Oligonukleotide sind unter Abschnitt 3.4 aufgelistet.

#### 4.4.7 Immunfluoreszenzfärbungen

Für die Detektion der Marker β-Catenin, Nanog, Nestin, Oct-4 und SSEA-4 auf HOPE-fixierten, paraffineingebetteten Geweben wurden Schnitte von 4 µm Dicke an einem Mikrotom angefertigt. Die Entparaffinierung wurde über Xylen und einer absteigenden Ethanolreihe zur Rehydratisierung bewerkstelligt. Dazu wurden die Schnitte konsekutiv für jeweils 3 min in je zwei Bäder aus Xylen, 100%, 96% und 70% Ethanol gestellt. Zur vollständigen Wässerung wurden die Schnitte für 5 min in ddH<sub>2</sub>O gestellt. Daraufhin wurde mit PBS gewaschen und mit 1,5% Serum des Wirtes des Sekundärantikörpers geblockt. Gegebenenfalls musste zuvor mit 4% Paraformaldehyd fixiert, mit PBS gewaschen, dann mit 0,1% Triton X-100 die Zellmembranen permeabilisiert und nochmals gewaschen werden. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte

über Nacht bei 4°C. Nach zwei Waschschrinen von je 10 min mit PBS wurden die Sekundärantikörper für 1,5-2 h zugegeben. In den Kontrollexperimenten wurde nur mit den Sekundärantikörpern gefärbt. Zur Zellkernfärbung wurden abschließend für 30 s mit DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindol) inkubiert und erneut dreimal für 10 min mit PBS gewaschen.

#### **4.4.8 Immunhistochemische Färbungen**

Für den immunhistochemischen Nachweis von Kollagen II nach Abschluss der chondrogenen Differenzierung von MSC wurden die Schnitte nach Entparaffinierung mit 10 mM Zitratpuffer bei 100°C für 10 min zur Antigendemaskierung behandelt. Die endogene Peroxidaseaktivität der Gewebe wurde initial mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 10 min unterbunden. Dann wurden die Schnitte in PBS gewaschen und mit 5% Serum des Wirts des Sekundärantikörpers geblockt. Die Immunreaktivität konnte durch die Verwendung des VECTASTAIN Elite ABC Universal Kit dargestellt werden. Der Inkubation des Primärantikörpers folgte die Reaktion mit dem biotinyliertem Sekundärantikörper und der streptavidinkonjugierten Meerrettichperoxidase für jeweils 30 min bei RT. Alternierend wurden die Schnitte für 5 min mit PBS gewaschen. Für die Umsetzung der Substratlösung durch die Peroxidase wurden die Proben in Abhängigkeit des gewünschten Färbegrades mit DAB 2-10 min inkubiert und im Anschluss gründlich mit Leitungswasser gespült. Die Entwässerung über eine aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90% und 100%) und Xylen beendete diese Färbemethode. Die Kontrollen wurden nur mit Sekundärantikörper gefärbt. Zur Gegenfärbung diente Hämatoxylin. Eine Liste aller eingesetzten Antikörper ist in Abschnitt 3.8 zusammengestellt.

Die Bearbeitung von Kryoschnitten unterschiedlicher Gewebe wurde über die hoch sensitive APAAP (Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase)-Methode realisiert. Dabei fungiert ein präformierter, löslicher Enzym-Antikörper-Komplex aus Alkalischer Phosphatase und dem dagegen gerichteten anti-Alkalische Phosphatase-Antikörper als Nachweisreagenz. Über eine Enzym-Substratreaktion wird die Färbung des entsprechenden Antigens erreicht. Der Primärantikörper sowie der Antikörper des Enzym-Immun-Komplexes müssen aus derselben Spezies stammen - in diesen Versuchen monoklonale Maus-Antikörper. Beide werden durch einen polyklonalen Kaninchen-anti-Maus-Sekundärantikörper, einen so genannten Brückenantikörper, miteinander verbunden. Als Chromogen wurde Fuchsin verwendet, das ein rotes Reaktionsprodukt liefert. Eventuell vorhandene endogene AP-Aktivität im Gewebe kann durch Zugabe von Levamisol zur Substratlösung unterdrückt werden. Die Reaktionsintensität kann bei

dieser Technik durch wiederholte Inkubation mit dem Brückenantikörper und dem APAAP-Komplex gesteigert werden.

Die Färbeprozedur wurde unter Verwendung des Dako REAL Detection System, APAAP, Mouse Kit durchgeführt. Es beinhaltet sowohl den APAAP-Komplex und den Brückenantikörper, als auch das Substrat und Chromogen. Als Primärantikörper wurden die monoklonalen anti-HLA-A01- und anti-HLA-B08-Antikörper eingesetzt. Die Kryoschnitte wurden zu Beginn 30 min in Kaninchenserum inkubiert und anschließend 10 min in TBST-Puffer (60,55 g Tris, 85,2 g NaCl, 1 l ddH<sub>2</sub>O; pH 7,5 mit 0,1% Tween 20) gewaschen. Es folgten die Inkubationen des Primärantikörpers für 1 h, des Brückenantikörpers für 30 min und des APAAP-Komplexes für weitere 30 min. Dazwischen wurde jeweils für 5 min mit TBST gewaschen und überschüssige Flüssigkeit abgesaugt. Anschließend wurde die Färbereaktion mit dem nach Herstellerangaben vorbereiteten Fuchsin-Substrat-Chromogen/Levamisol-Gemisch über die Dauer von 10 min durchgeführt und erneut mit TBST gewaschen. Nach der Fixierung mit 4% Formalin für 2 sec und einem weiteren kurzen TBST-Waschschritt konnten die Gewebeschnitte mit Hämatoxylin für 30 sec gegengefärbt werden. Es folgten je ein Waschschritt mit TBST und ddH<sub>2</sub>O für 5 min bevor die Kryoschnitte in wasserlöslichem Eindeckelmedium eingebettet wurden.

#### 4.4.9 Nachweis der Alkalischen Phosphatase

Beginnend mit der Aussaat von  $5 \times 10^2$  Zellen pro Kavität einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde nach 24 h die osteogene Differenzierung der MSC, wie in Abschnitt 4.4.6 beschrieben, induziert. Nach zwei Wochen Differenzierung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Der Zugabe von 100 µl Lysepuffer (100 mM Natriumbicarbonat/Carbonatpuffer/0,1% Saponin) folgte eine Inkubation von 15 min bei RT. Das Substrat der Alkalischen Phosphatase, 5 mM p-Nitrophenylphosphat in 100 mM Natriumbicarbonat/Carbonatpuffer, wurde im gleichen Volumen in einer separaten 96-Loch-Mikrotiterplatte mit dem Zelllysat vermischt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Die abschließende Messung der optischen Dichte fand in einem Mikrotiterplattenphotometer bei einer Absorption von 405 nm und der Referenzwellenlänge von 650 nm statt.

#### 4.4.10 Zytokinassay

MSC wurden unter Normoxie (21% O<sub>2</sub>) bzw. Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) in Standardmedium kultiviert und der Überstand nach 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h abgenommen. Die Sekretion von VEGF wurden mit Hilfe des CytoSet IFN $\gamma$  ELISA Kits unter Herstelleranleitung bestimmt. In Analogie

wurden weiteren Ansätzen 100U/ml IFN $\gamma$  dem Kulturmedium zugegeben und quantitativ mittels Sandwich-ELISA bestimmt.

Die Konzentrationen der von MSC unter Normoxie oder Hypoxie sezernierten IGF-I, IGF-II, IGFBP-2 und -3 im Zellkulturüberstand wurde nach 8 h, 24 h, 96 h und 14 Tagen mittels kompetitivem Radioimmunoassay (RIA) ermittelt.

#### **4.4.11 Kompetitiver Radioimmunoassay**

Die Methode des kompetitiven Radioimmunoassays wurde eingesetzt, um IGF-I, IGF-II, IGFBP-2 und -3 in Zellkulturüberständen zu bestimmen. Dabei kam ein radioaktiv markiertes Antigen (Tracer) und ein antigenspezifischer polyklonaler Antikörper zum Einsatz. In der Probe lag das zu untersuchende Antigen unmarkiert vor. Die Probe, der Tracer und ein spezifischer Antikörper wurden gemeinsam inkubiert. Das Antigen in der Probe kompetitierte mit dem Tracer um die Bindung an den spezifischen polyklonalen Antikörper. Im zweiten Schritt wurde die Präzipitation des Antigen-Antikörper-Komplexes durchgeführt, wobei ein Sekundärantikörper gegen den antigenspezifischen Primärantikörper zugegeben wurde. Die gefällte Radioaktivität im Präzipitat konnte quantifiziert werden und diente als Maß für die eingesetzte Menge Antigen in der Probe.

Im Detail wurden 100  $\mu$ l Zellkulturüberstand mit 10  $\mu$ l Ansäuerungspuffer versetzt. Der Tracer wurde mit RIA-Puffer auf eine Konzentration von 150 000 cpm/ml eingestellt. Probe, Kontrolle oder Standard wurden in gleichen Volumina (100  $\mu$ l) zu Tracer und spezifischem Primärantikörper gegeben. Nach Inkubation von 48 h bei 4°C wurde 500  $\mu$ l RIA-Präzipitationsreagenz, inklusive Zweitantikörper, zu den Ansätzen gegeben und eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert. Die Präzipitate wurden durch Zentrifugation bei 3400 g für 15 min gewonnen, mit ddH<sub>2</sub>O (4°C) gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Radioaktivität des Präzipitats wurde im Gammazähler mit einer Zähldauer von 1 min gezählt. Anhand einer Standardreihe wurden die Probenkonzentrationen berechnet.

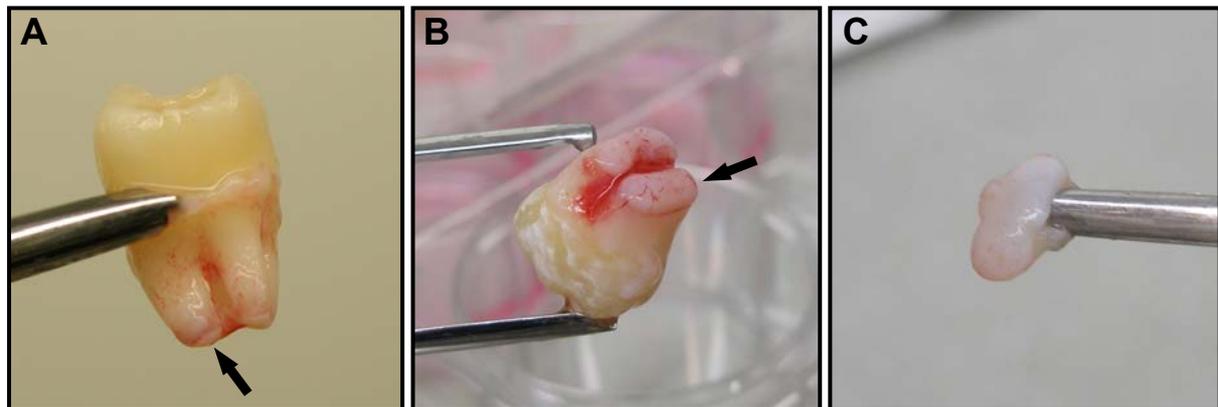
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Mesenchymale Stromazellen aus Zahnpapillen

#### 5.1.1 Material und Zellisolation

Die Gewinnung von mesenchymalen Stromazellen fand in der Regel aus pädiatrischen Knochenmarkaspiraten (etwa 0,5 - 2 ml) statt (Ethikkommissionsvotum 241/2005V). Zur Aufarbeitung (Abschnitt 4.4.1) wurden mittels Ammoniumchloridlyse die Erythrozyten aus dem Punktat eliminiert. Die verbleibenden Zellen wurden gewaschen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium mit 5% (v/v) FFP (*Fresh frozen plasma*) und 1% (v/v) TKZ (Thrombozytenkonzentrat) aufgenommen und kultiviert.

Für die Isolation mesenchymaler Stromazellen aus Zahnpapillen (*Papilla dentalis*) wurden gesunde Weisheitszähne von Individuen im Alter von 7-22 Jahren verwendet. Die extrahierten, retinierten Weisheitszähne wurden von Patienten des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (ZZMK) Tübingen zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden anonymisiert behandelt. Unter sterilen Bedingungen wurden die Papillen für die Zellgewinnung vorsichtig vom Zahnhals entfernt (Abb. 5-1).

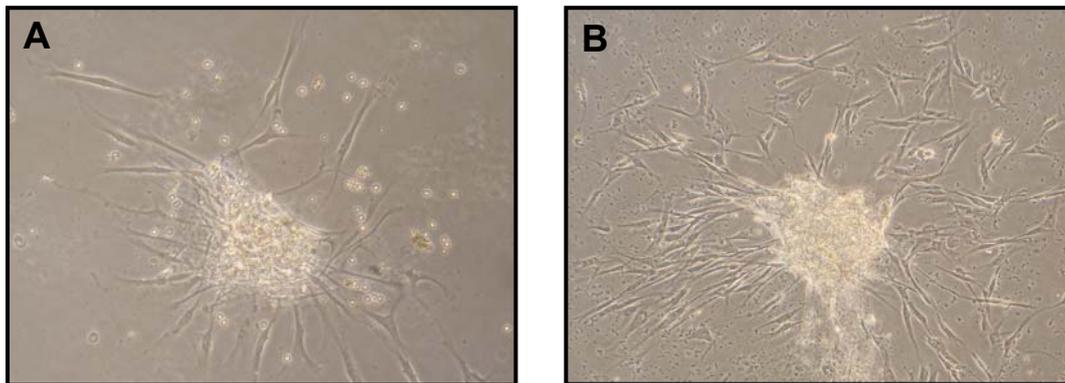


**Abb. 5-1: Ursprungsgewebe von Z-MSC.** Extrahierte, vollständig erhaltene Weisheitszähne (A und B). Die Zahnhälse werden von apikal aufsitzenden „Gewebekissen“, den Papillen, abgeschlossen (Pfeile). Diese wurden zur Isolation der mesenchymalen Stromazellen unter Berücksichtigung der Sterilität entfernt (C), zerkleinert und kultiviert.

#### 5.1.2 Kultur und Morphologie von MSC aus Zahnpapillen

Die Kultivierung von MSC aus Zahnpapillen fand ebenfalls in Medium mit 5% FFP und 1% TKZ, zusätzlich aber auch in Medium mit 10% (v/v) FCS (*Fetal calf serum*) statt. Die Ansätze

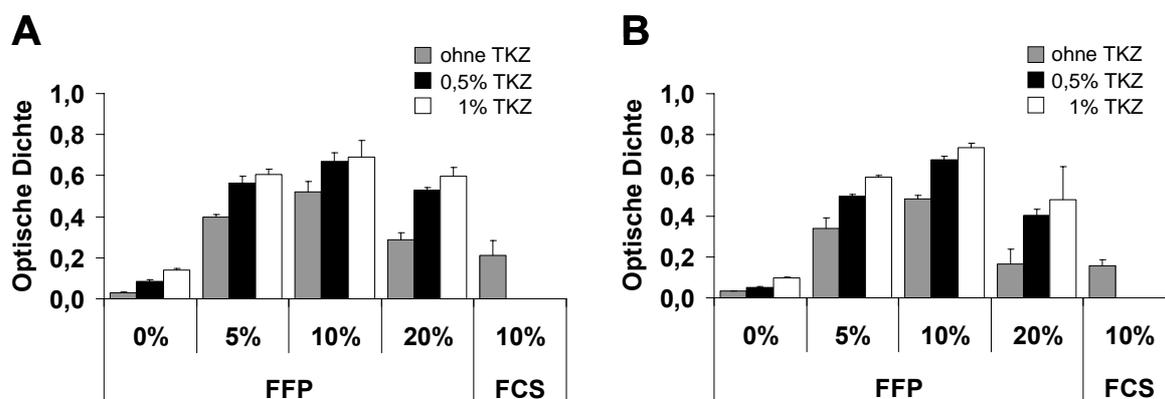
wurden parallel gestartet. Innerhalb der ersten 24 h wurden jeweils adhärenzte Zellen sichtbar. In den darauf folgenden Tagen bildeten sich jeweils Proliferationskolonien (Abb. 5-2), die sich über den Zeitraum von bis zu zwei Wochen zu einem einheitlichen *Monolayer* entwickelten. Aus beiden Kulturbedingungen gingen Zellpopulationen hervor. Die kultivierten Zellen waren unter mikroskopischer Beurteilung morphologisch von KM-MSK nicht zu unterscheiden.



**Abb. 5-2: Morphologie von Z-MSK.** Einzelkolonien proliferierender Zellen in unterschiedlichen Kulturmedien: Nach 48 h in Medium mit 10% FCS (A) und nach 72 h in Medium mit 5% FFP und 1% TKZ (B).

### 5.1.3 Vergleich der Proliferation von unterschiedlich propagierten MSC

Zur Bestimmung der Wachstumskinetik der expandierten und propagierten MSC wurde vergleichend mit aus Knochenmark generierten MSC (KM-MSK) ein MTS-Proliferationsassay durchgeführt. Dabei wurden die Zusätze FFP und TKZ dem Medium entweder entzogen oder in unterschiedliche Konzentrationen eingesetzt.

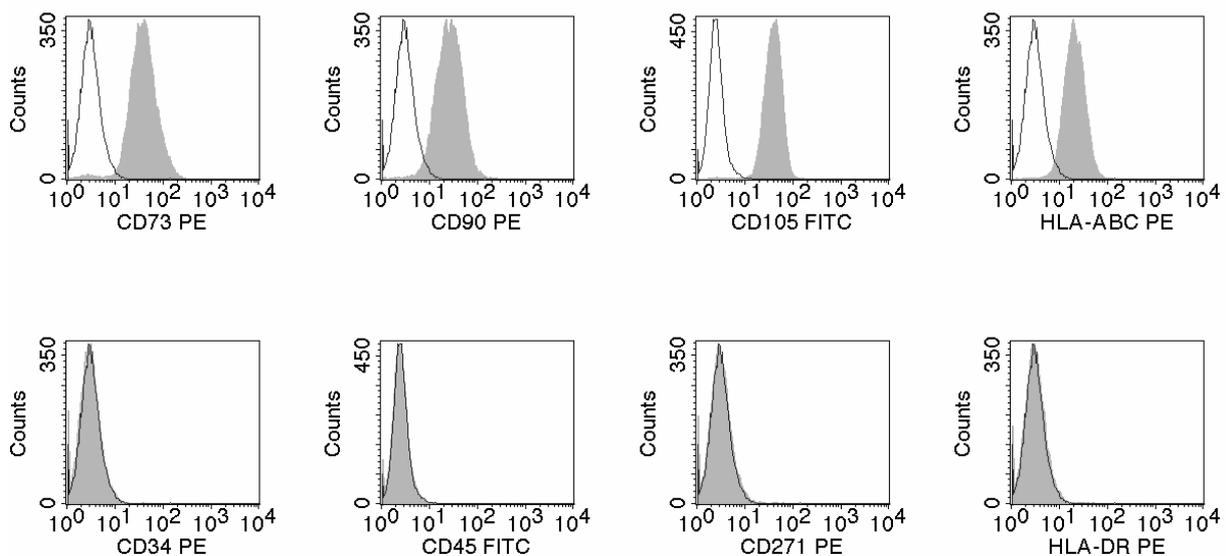


**Abb. 5-3: MTS-Proliferationsassay.** Densitometrische Bestimmung des Wachstumsverhaltens von KM-MSK (A) und Z-MSK (B) in Abhängigkeit der unterschiedlichen Mediumsupplemente FCS, FFP und TKZ. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus voneinander unabhängigen Versuchen (n=5).

Die Titrationsstufen des Supplements FFP entsprachen der einfachen, doppelten und vierfachen Normalkonzentration. Beim Supplement TKZ wurde die einfache bzw. die Hälfte der Normalkonzentration getestet. Im Vergleich wurde auch Medium mit 10% FCS untersucht. Die Analyse der Daten brachte ein vergleichbares Ergebnis beider MSC-Populationen hervor (Abb. 5-3). Die Wachstumsraten der aus Weisheitszähnen generierten MSC (Z-MSC) proliferierten in Abhängigkeit der aufsteigenden Konzentrationen von FFP und Thrombozyten identisch zu den KM-MSC. Der wachstumsfördernde Effekt des Plasmas erreichte dabei sein Maximum bei einer Konzentration um 10%. Der steigende TKZ-Anteil unterstützte ebenfalls das Zellwachstum. Teilweise konnte sogar der Effekt einer niedrigeren Plasmakonzentration auf das Wachstum mit einem erhöhten TKZ-Anteil kompensiert werden. Die Werte für serumhaltiges Medium (10% FCS) waren bei beiden MSC-Populationen jeweils kleiner als alle Werte einer FFP-Konzentration mit und ohne TKZ. Die Expansion der Z-MSC wurde daraufhin allein in Medium mit 5% FFP und 1% TKZ fortgesetzt. Dies entspricht dem Standardmedium für KM-MSC.

#### 5.1.4 Immunphänotypisierung

Zur Charakterisierung der Z-MSC hinsichtlich der Expression spezifischer Oberflächenmarker wurden Analysen am Durchflusszytometer vorgenommen. Dabei lag das allgemein verwendete Profil von expandierten KM-MSC zu Grunde: positiv für die Marker CD73, CD90, CD105 und HLA-ABC (Klasse I) und negativ für CD34, CD45, CD271 und HLA-DR (Klasse II).



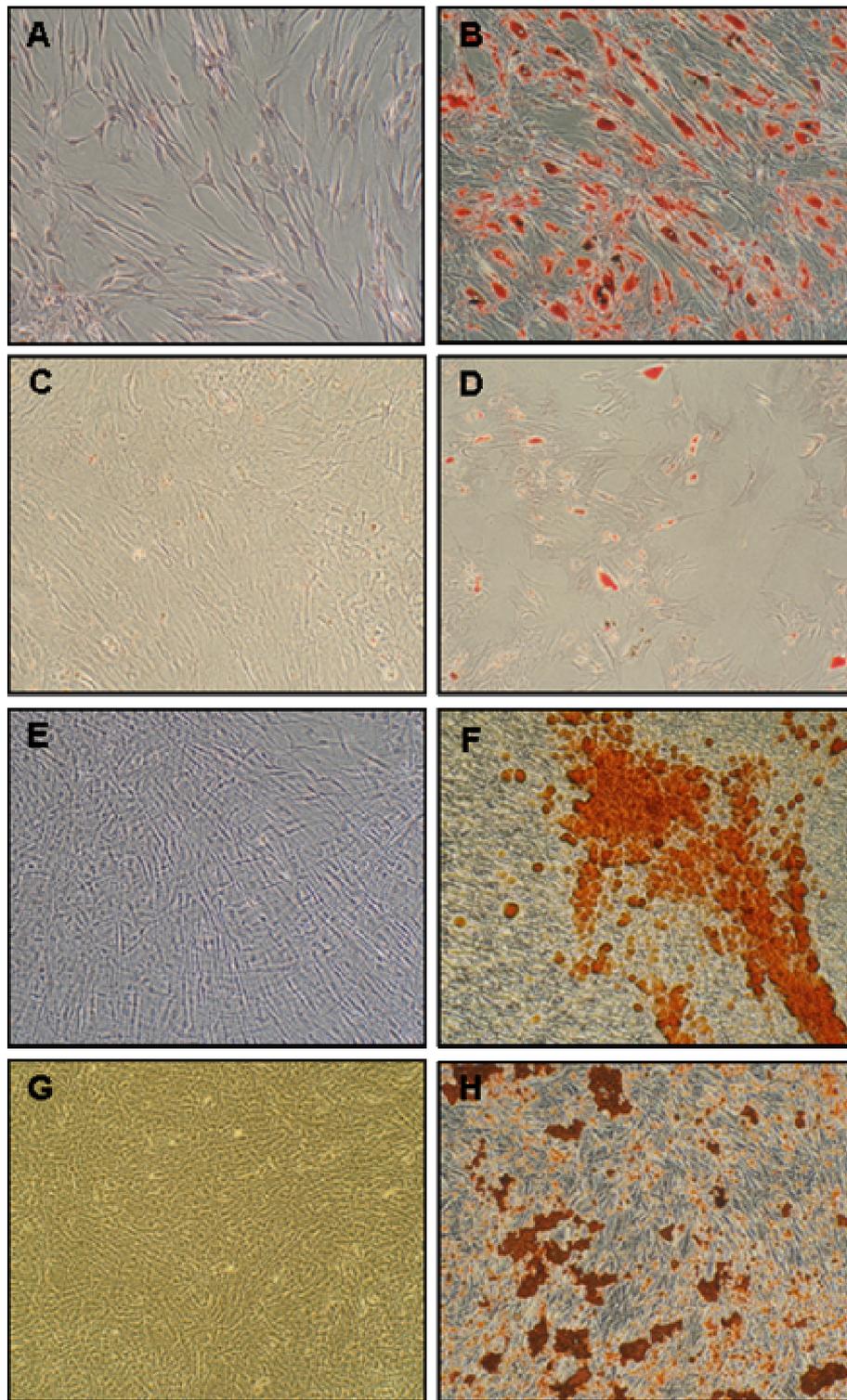
**Abb. 5-4: Immunphänotyp von Z-MSC.** Das charakteristische Expressionsmuster von MSC konnte auch auf Z-MSC detektiert werden. Die Marker (graue Fläche) sind einzeln ihrem Isotyp (schwarze Linie) in den jeweiligen Histogrammen gegenübergestellt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus voneinander unabhängigen Versuchen (n=5).

Mit der FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass die isolierten Z-MSC einen identischen Phänotyp aufweisen (Abb. 5-4).

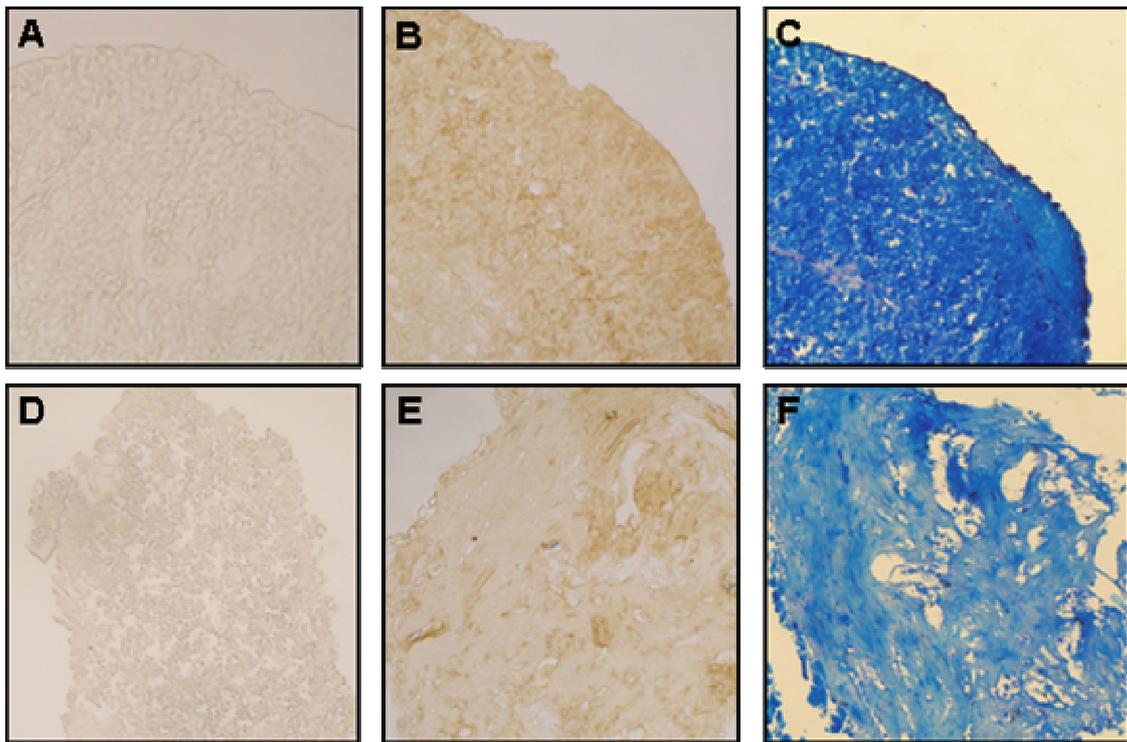
### **5.1.5 Differenzierung von MSC in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten**

Es ist vielfach demonstriert worden, dass KM-MSC in der Lage sind, in unterschiedliche Zelltypen und Gewebe zu differenzieren. Im Allgemeinen gelten die Standarddifferenzierungen in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten als eindeutiger Beweis für die Plastizität und damit auch der biologischen Aktivität von MSC. Die aus Zahnpapillen isolierten und expandierten Z-MSC wurden deshalb ebenfalls diesen drei Differenzierungen unterzogen (Abschnitt 4.4.6). Nach Abschluss der entsprechenden Differenzierungen konnten bereits bei den adipogen und osteogen induzierten MSC mikroskopisch morphologische Unterschiede beobachtet werden. Charakteristischerweise bildeten Osteoblasten Kalziumpräzipitate, Adipozyten intrazelluläre Fettvakuolen (Abb. 5-5) und Chondrozyten eine Kollagenmatrix aus (Abb. 5-6). Mit Hilfe chemischer und histologischer Nachweisverfahren wurden diese Differenzierungsmerkmale gefärbt (Abschnitt 4.4.6). Dabei wurden die gebildeten Kalziumpräzipitate mit Alizarinrot, die Fettvakuolen mit Ölrot und die entstandenen Proteoglykane mit Toluidinblau bzw. das Kollagen II mit einem anti-Kollagen II-Antikörper detektiert.

Mit den Differenzierungsprotokollen für Chondrozyten wie auch für Osteoblasten konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Hinsichtlich der Differenzierung in Adipozyten zeigte sich, dass sich Z-MSC nur schwach und langsamer im Vergleich zu KM-MSC in den induzierten Zelltyp entwickelten. Auch musste die Dauer der Induktion auf 4 bis 5 Wochen ausgedehnt werden. Variationen, die auf unterschiedliche Spendereigenschaften zurückgeführt werden könnten, traten insgesamt nur untergeordnet in Erscheinung.



**Abb. 5-5: Adipogene und osteogene Differenzierung von KM-MSC und Z-MSC.** Die photographischen Aufnahmen dokumentieren die in Adipozyten (A-D) und Osteoblasten (E-H) differenzierten KM-MSC und Z-MSC nach den entsprechenden chemischen Färbereaktionen. Es sind jeweils Ausschnitte einer Vergrößerung (20x) abgebildet. Die linke Spalte zeigt die Kontrollen, die rechte die jeweiligen Differenzierungen. Die adipogene Differenzierung der Z-MSC (D) fiel dabei durchschnittlich schwächer als bei den KM-MSC (B) aus (n=12). Die osteogenen Differenzierungen waren sowohl bei den KM-MSC (F) als auch bei den Z-MSC (H) jeweils deutlich ausgeprägt (n=6). Die Fettvakuolen der Adipozyten wurden mit Ölrot identifiziert, die Kalziumpräzipitate der Osteoblasten hingegen mit Alizarinrot dargestellt. Die Abbildungen zeigen repräsentative Ergebnisse aus voneinander unabhängigen Versuchen.

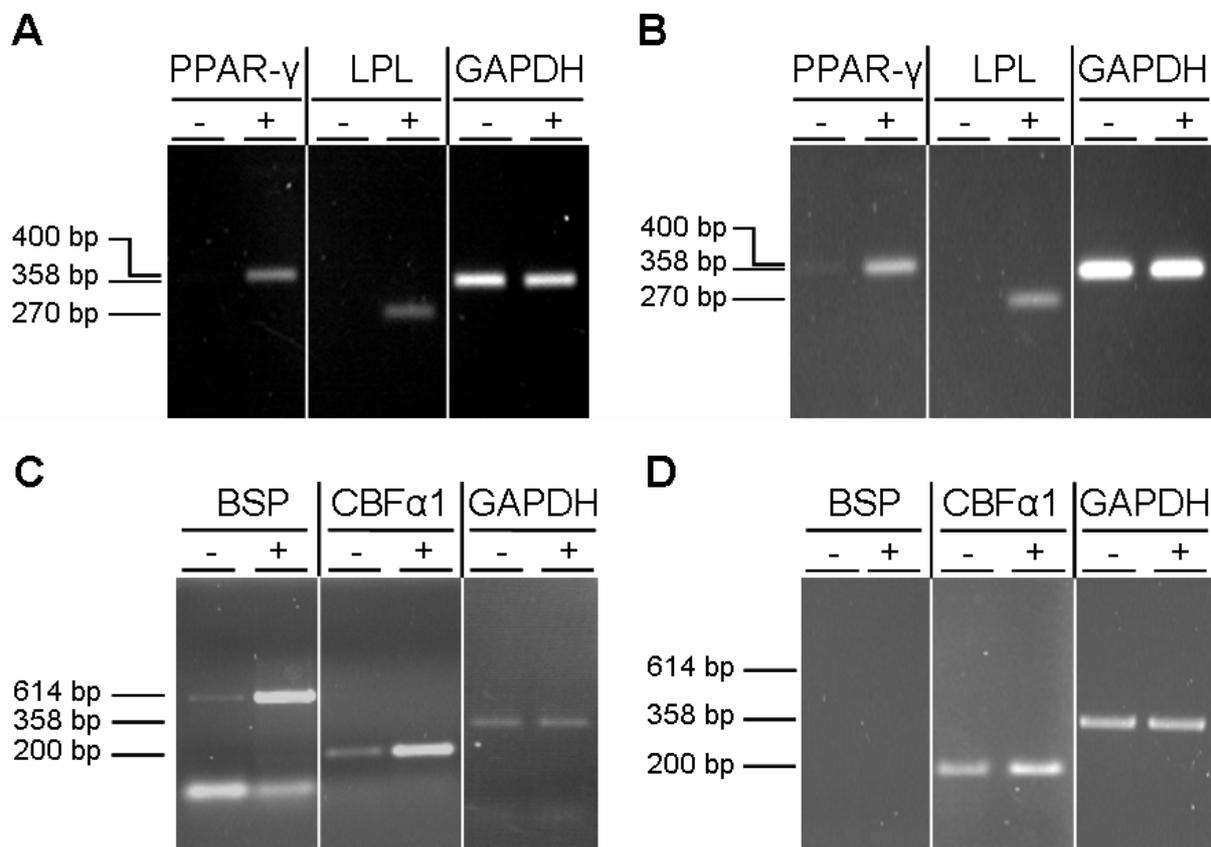


**Abb. 5-6: Chondrogene Differenzierung von KM-MSK und Z-MSK.** KM-MSK (A-C) und Z-MSK (D-F) wurden als Mikrozellmassen kultiviert und differenziert. Von den sphäroiden Zellpellets wurden abschließend Paraffinschnitte angefertigt und auf die Existenz von gebildetem Kollagen II bzw. Proteoglykanen untersucht. Das für Knorpelgewebe typische Kollagen Typ II wurde immunhistologisch durch indirekte Färbung enzymgekoppelter Zweitantikörper detektiert (B und E) und ihren entsprechenden Kontrollen (A und D) gegenübergestellt. Zusätzlich konnte die Anfärbung der gebildeten Proteoglykane der Knorpelmatrix beider MSC-Populationen durch Toluidinblau (C und F) gezeigt werden. Es sind von einzelnen Paraffinschnitten jeweils Ausschnitte einer Vergrößerung (20x) abgebildet. Die Abbildungen zeigen repräsentative Ergebnisse aus voneinander unabhängigen Versuchen (n=5).

### 5.1.6 RT-PCR von differenzierungsrelevanten Expressionsmarkern

Zusätzlich zu den (histo)chemischen Färbenaufweisen wurden Unterschiede im Expressionsmuster differenzierter MSC untersucht. Die Differenzierung in Adipozyten und Osteoblasten lassen sich jeweils an Hand der Regulation der Expression bestimmter Markergene verfolgen. Adipogen induzierte MSC exprimieren PPAR- $\gamma$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) und LPL (Lipoproteinlipase), osteoblastisch differenzierte MSC exprimieren vermehrt BSP (*Bone sialoprotein*) und CBF $\alpha$ 1 (*Core binding factor alpha 1*). Die Transkriptionsanalysen wurden durch RNA Isolation und RT-PCR realisiert. In der Analyse der adipogen differenzierten KM-MSK und Z-MSK (Abb. 5-7 A und B) zeigte sich eine deutliche Expressionsinduktion der relevanten Marker PPAR- $\gamma$  und LPL. Die Indikatoren für die osteogene Differenzierung, BSP und CBF $\alpha$ 1, konnten nach Differenzierung der KM-MSK (Abb. 5-7 C) mit erhöhter Expression amplifiziert werden. Aus den osteogen differenzierten Z-MSK resultierte ebenfalls ein verändertes Expressionsmuster. Allerdings war hier die CBF $\alpha$ 1-Expression nach Differenzierung im

Vergleich zu undifferenzierten Z-MSK nur leicht gesteigert. Die Amplifikation von BSP konnte weder aus undifferenzierten noch aus differenzierten Z-MSK gezeigt werden (Abb. 5-7 D).

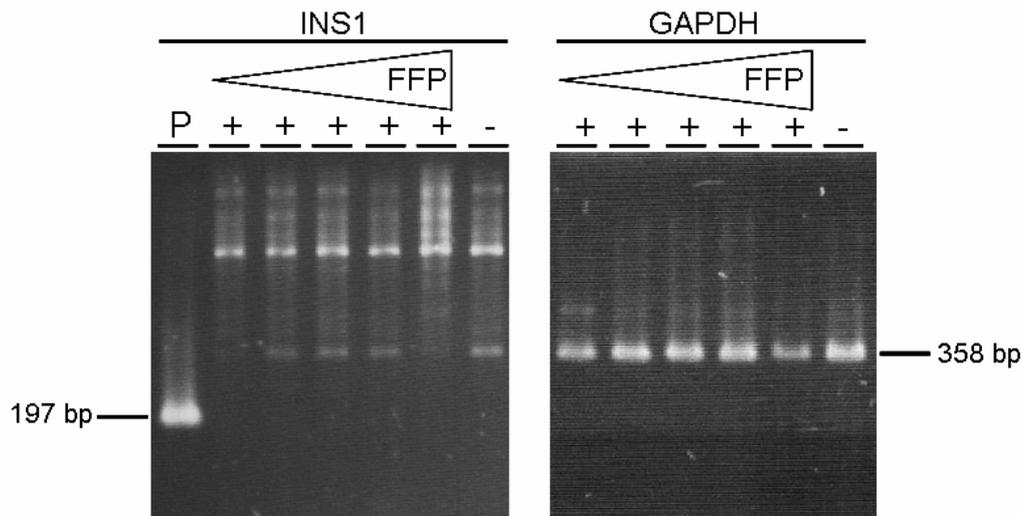


**Abb. 5-7: RT-PCR-Analyse nach adipogener und osteogener Differenzierung.** Nach der Differenzierung der MSC in Adipozyten (A und B) bzw. Osteoblasten (C und D) wurde RNA isoliert und spezifische Marker untersucht. Die Transkriptionslevels wurden für KM-MSK (A) und Z-MSK (B) vergleichend evaluiert. Es wurden jeweils undifferenzierte (-) und differenzierte (+) Zellen analysiert. Als interne Kontrolle diente GAPDH (358 bp). Beide MSC-Populationen exprimierten nach adipogener Differenzierung sowohl PPAR- $\gamma$  (400 bp) als auch LPL (270 bp). Im Verlauf der osteogenen Differenzierung von KM-MSK (C) wurde die Expression von BSP (614 bp) und CBF $\alpha$ 1 (200 bp) induziert. Für osteogen induzierte Z-MSK konnte lediglich eine leicht erhöhte CBF $\alpha$ 1-Expression gezeigt werden. Die relevanten Bandengrößen sind entsprechend gekennzeichnet.

### 5.1.7 Differenzierung von MSC in insulinproduzierende Inselzellen

Von embryonalen Stammzellen ist bekannt, dass diese in insulinproduzierende Inselzellen differenziert werden können. In verschiedenen Ansätzen ist deshalb versucht worden, die etablierten Protokolle auch auf MSC anzuwenden<sup>247-249</sup>. Als kritische Parameter für eine erfolgreiche Induktion in insulinproduzierende Zellen galten dabei der Serum- und der Glukosespiegel im Medium. So wurden ES-Zellen größtenteils in serumfreien Medium mit hohem Glukoseanteil und unter Zugabe von verschiedenen Supplementen differenziert. Diese und anderer Parameter wurden in einer Vielzahl von unterschiedlichen Experimenten bei

steigender Serumkonzentration im Medium getestet. Eine Übersicht der variablen Komponenten und Kulturbedingungen ist in Abschnitt 4.4.6 aufgeführt. Es zeigte sich jedoch, dass keine der Differenzierungsbedingungen MSC nachweislich in den gewünschten Zelltyp überführte. Zur Überprüfung der Transdifferenzierung diente der Nachweis von Transkripten des Insulingens (*INS1*) via RT-PCR (Abb. 5-8). Die Existenz dieser Transkripte nach Differenzierung konnte nicht belegt werden.

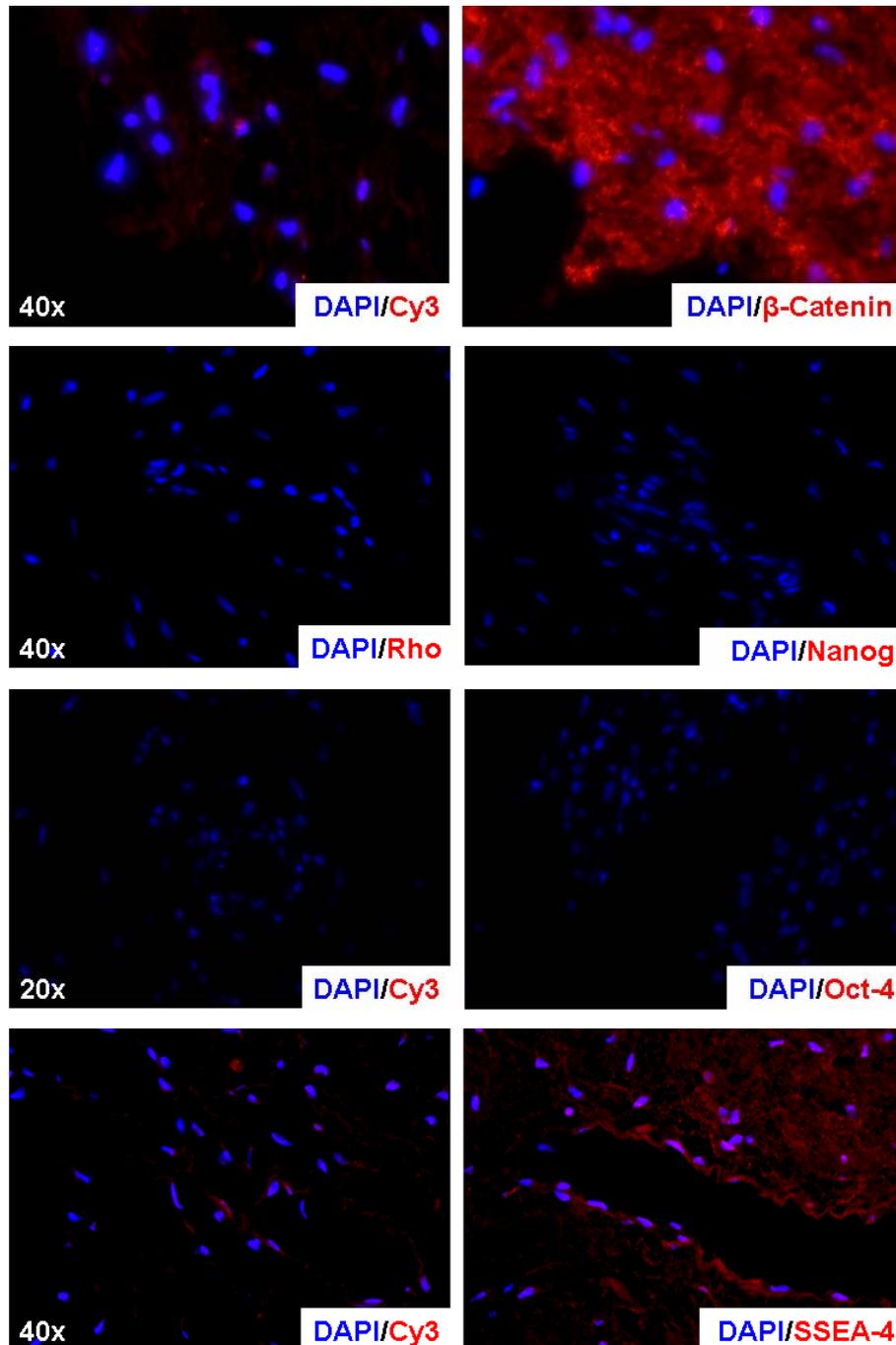


**Abb. 5-8: RT-PCR-Analyse nach Induktion in insulinproduzierenden Inselzellen.** Exemplarisch ist der Ansatz mit variabler FFP-Konzentration (+) (0%, 1%, 2%, 3%, 5%) gezeigt. Die undifferenzierten Kontrollzellen sind mit (-) gekennzeichnet. Als Referenz für die Amplifikation von *INS1* (197 bp) diente Pankreas-RNA (P). *GAPDH* (358 bp) bildete den internen PCR-Standard. Zusammenfassend konnte kein Differenzierungsansatz als erfolgreich bewertet werden. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus voneinander unabhängigen Versuchen abgebildet (n=9).

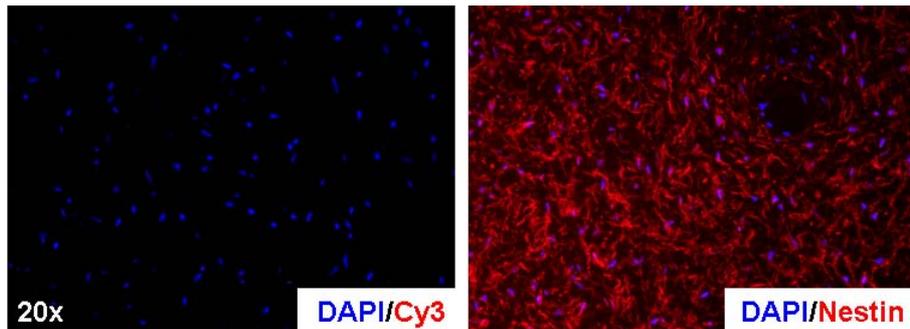
### 5.1.8 Immunhistologischer Nachweis embryonaler Marker in Zahnpapillen

Die Gewebeanteile von Zähnen werden mit allen drei embryonalen Keimblättern in Verbindung gebracht. Deshalb wurde versucht, pluripotente Stammzellen in den Papillen dadurch zu identifizieren, die für embryonale Stammzellen typischen Genprodukte wieder zu finden. Zur Identifikation von pluripotenten Stammzellen dient die Expression von *Nanog*, *Nestin*, *Oct-4* (Octamer-4) und *SSEA-4*<sup>250 251</sup>. Die Expression von *Nanog* und *Oct-4* geht mit der Differenzierung von pluripotenten Zellen verloren. *Nestin*, ursprünglich ein neuronaler Marker, ist neben embryonalen Stammzellen ebenfalls auf mesodermalen Geweben zu finden<sup>59</sup>. In den Experimenten wurden unkonjugierte Antikörper eingesetzt und indirekt mittels fluorochrommarkierten Zweitantikörpern detektiert (Abb. 5-9).

Als Referenzmarker wurde  $\beta$ -Catenin verwendet. Für alle Antigene konnten unterschiedlich starke Expressionen ermittelt werden. Dabei war SSEA-4 nur schwach, Nestin jedoch stark exprimiert auf den Gewebeschnitten zu finden. Hingegen konnte keine Expression von Nanog oder Oct-4 im Zellkern lokalisiert werden.



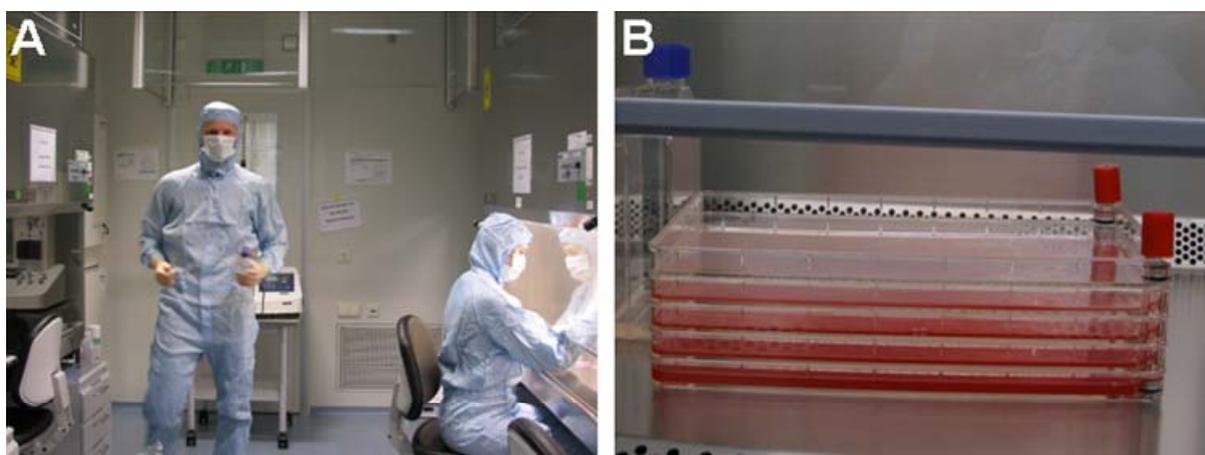
[Fortsetzung auf nächster Seite]



**Abb. 5-9: Indirekte Immunfluoreszenz bei Paraffinschnitten von Zahnpapillen.** Es sind die Expressionen von Nanog, Oct-4, SSEA-4 und Nestin dargestellt (rechte Spalte). Als Positivkontrolle wurde  $\beta$ -Catenin gefärbt. Die Detektion erfolgte indirekt mit fluorochromkonjugierten Sekundärantikörpern (rot). Die Kontrollen (linke Spalte) wurden jeweils nur mit Sekundärantikörper (Cy3 bzw. Rhodamin) allein gefärbt. DAPI diente der Kernfärbung (blau). Für Nanog und Oct-4 konnte keine Expression gezeigt werden. SSEA-4 wurde nur schwach, Nestin dagegen stark exprimiert. Jeweils links sind die Vergrößerungen angegeben. Es sind jeweils repräsentative Aufnahmen aus unabhängig von einander durchgeführten Experimenten abgebildet (n=4).

## 5.2 Biologische Eigenschaften und klinische Anwendung von MSC bei steroidinduzierten Knochendefekten

Für die Anwendung von MSC *in vivo* ist die Herstellung der MSC unter GMP-Bedingungen unerlässlich. Hier muss nach den Richtlinien der EU und des Paul-Ehrlich-Instituts der Einsatz von Kulturkomponenten tierischen Ursprungs vermieden werden. Bereits für den labor-experimentellen Bereich wurde humanes Plasma (FFP) und Thrombozytenlysate (TKZ) statt fetales Kälberserum (FCS) zur Herstellung von MSC als zelluläre Transplantate verwendet. Die Kulturbedingungen wurden unter Beachtung der GMP-Regularien für die klinische Anwendung übernommen.



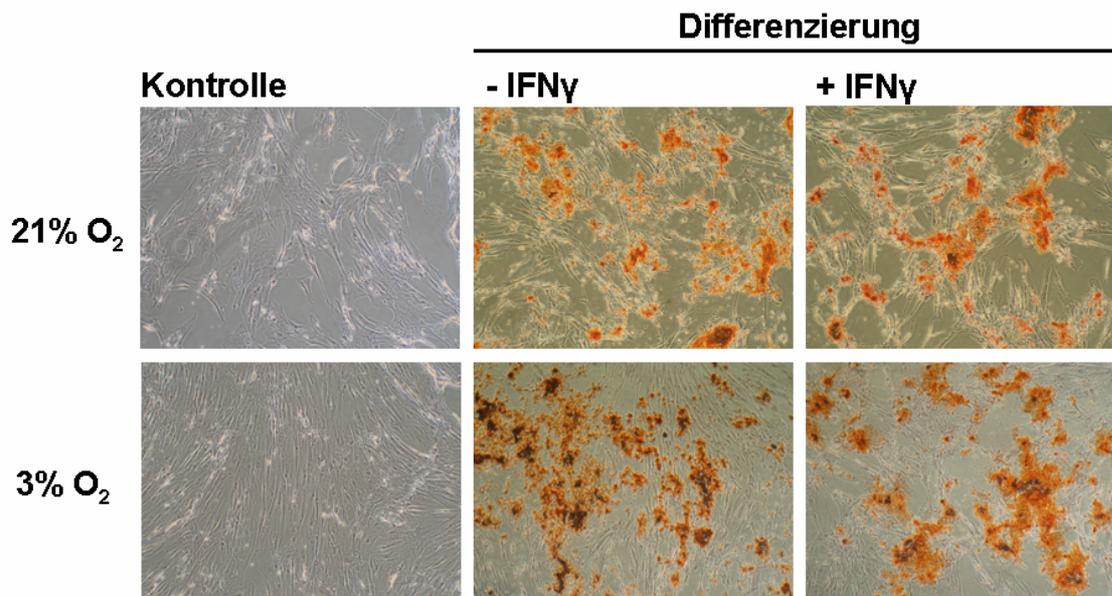
**Abb. 5-10: MSC-Kultur unter GMP-Bedingungen.** Die Kultur der MSC fand zur Prävention von Kontaminationen in einem Reinraumlabor statt (A). Es wurden so genannte Cell Stacks, die in mehreren Etagen (hier: fünf) eine größere Oberfläche pro Kulturgefäß bieten, verwendet (B).

Für diesen Zweck liegt eine Herstellungserlaubnis (241/2005V) für MSC durch das Paul-Ehrlich-Institut vor. Die Isolation von MSC zur Anwendung in Patienten wurde aus Knochenmarkaspiraten durchgeführt. Die Kultur der Zellen fand unter strengen Sterilitätsauflagen in so genannter Reinraumumgebung statt (Abb. 5-10 A). Über den gesamten Kulturverlauf wurden Sterilproben zum Ausschluss von aeroben, anaeroben und fungalen Kontaminationen entnommen. Zusätzlich wurden Mycoplasmentests durchgeführt. Um die Zahl der Passagen und damit das Kontaminationsrisiko auf ein Minimum zu senken, wurden spezielle Kulturgefäße, so genannte *Cell Stacks*, eingesetzt, die durch mehrere Etagen über eine besonders große Oberfläche verfügen (Abb. 5-10 B).

### 5.2.1 Osteogenes Potenzial von KM-MSK bei Patienten mit AVN

Knochenmarkabgeleitete mesenchymale Stromazellen können *in vitro* effizient in Osteoblasten differenzieren. Auf Grund dessen könnten sie sich nicht nur zur Behandlung von angeborenen Knochenstoffwechselstörungen, sondern auch von erworbenen Osteonekrosen eignen.

Vor der klinischen Anwendung bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) sollte das Potenzial der autologen MSC, entlang der osteogenen Linie zu differenzieren, untersucht werden. Von nekrotischen Arealen ist bekannt, dass sie in Folge der gestörten Blutzufuhr hinsichtlich des Nähr- und Sauerstofftransports unterversorgt sind.

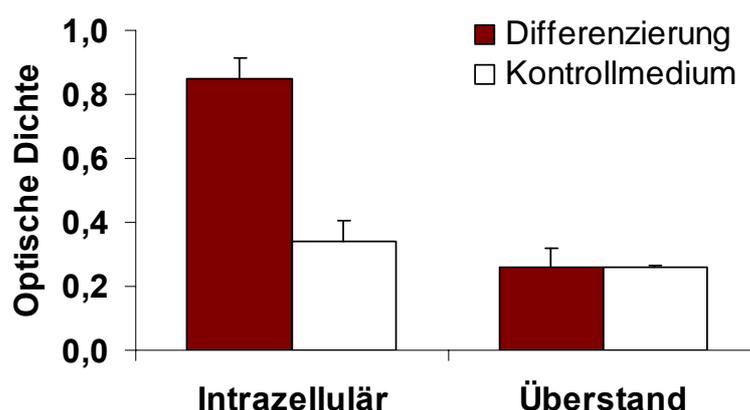


**Abb. 5-11: Osteogene Differenzierung von MSC unter Einfluss von Hypoxie und IFN $\gamma$ .** MSC von ALL-Patienten mit AVN wurden unter atmosphärischen Kulturbedingungen (21%) und Hypoxie (3%) osteogen differenziert. Das Differenzierungspotenzial blieb unter hypoxischen Bedingungen unverändert. Die Zugabe von IFN $\gamma$  zeigte ebenfalls keinen Effekt auf die Differenzierung *in vitro*. Es sind die photographischen Aufnahmen der gebildeten Kalziumpräzipitate der MSC nach Färbung mit Alizarinrot dargestellt. Die Abbildungen stellen ein repräsentatives Ergebnis von unabhängigen Versuchen dar (n=3).

Deshalb wurden die Differenzierungen der Patienten-*MSC* in Osteoblasten bei Kulturbedingungen mit unterschiedlichem Sauerstoffanteil durchgeführt: Zum einen bei atmosphärischer (21%) und zum anderen bei reduzierter Sauerstoffsättigung (3%, Hypoxie). Da es sich bei den nekrotischen Grenzflächen von AVN um inflammatorische Bereiche handelt, wurde gleichzeitig der Einfluss von  $\text{IFN}\gamma$  als ein häufiges inflammatorisches Zytokin auf das osteogene Potenzial von *MSC* ermittelt. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die osteogene Differenzierungsfähigkeit der *MSC in vitro* weder bei einer  $\text{O}_2$ -Sättigung von 3%, noch unter dem Einfluss von  $\text{IFN}\gamma$  beeinträchtigt ist (Abb. 5-11).

### 5.2.2 Nachweis Alkalischer Phosphatase bei osteogener Differenzierung

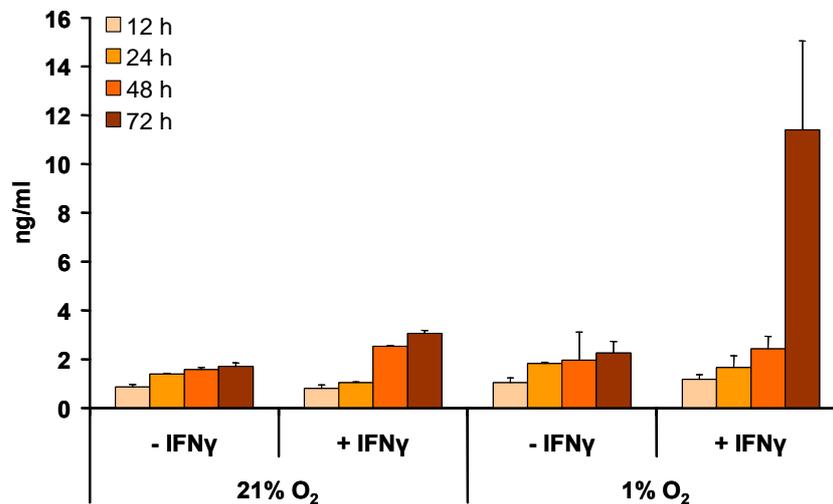
Als ein weiterer Beleg für das osteogene Potenzial von *MSC* gilt die gesteigerte Bildung von Alkalischer Phosphatase. Durch die Hydrolyse des Substrats der Alkalischen Phosphatase, der synthetische *p*-Nitrophenylphosphatester, wird *p*-Nitrophenolat als Anion freigesetzt. Im alkalischen pH-Bereich resultiert daraus ein gelber Farbumschlag, der durch Bestimmung der optischen Dichte bei 405 nm gemessen werden kann. Im Versuch wurde sowohl die Existenz der Alkalischen Phosphatase im Kulturüberstand als auch intrazellulär nach Lyse analysiert. Im Vergleich zu den undifferenzierten Kontrollzellen konnte ein deutlicher Anstieg der Alkalischen Phosphatase bei den osteogen differenzierten *MSC* von AVN-Patienten intrazellulär festgestellt werden. Eine Zunahme des Enzyms im Überstand wurde nicht zu messen (Abb. 5-12).



**Abb. 5-12: Nachweis Alkalischer Phosphatase.** Die Enzym-Substrat-Reaktion wurde bei osteogen differenzierten (rote Balken) und undifferenzierten KM-*MSC* von AVN-Patienten in Kontrollmedium (weiße Balken) analysiert. Dabei wurden in Überstand freigesetztes und intrazelluläres Enzym gegenübergestellt. Das Substrat der Alkalischen Phosphatase, *p*-Nitrophenylphosphat, konnte lediglich nach erfolgter Lyse in osteogen differenzierten *MSC* beobachtet werden, jedoch nicht im Überstand. Die photometrische Bestimmung erfolgte über Triplikate (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus voneinander unabhängigen Versuchen ( $n=3$ ).

### 5.2.3 Induktion der VEGF-Sekretion bei MSC durch Hypoxie und IFN $\gamma$

In Verbindung mit der klinischen Anwendung von MSC bei Patienten mit AVN stellte sich die Frage, ob MSC Faktoren sezernieren, die die Vaskularisierung der nekrotischen Areale verbessern könnten.



**Abb. 5-13: VEGF-Sekretion von MSC in Abhängigkeit von Hypoxie und IFN $\gamma$ .** MSC produzierten nur geringe Mengen VEGF *in vitro*. Durch Reduzierung der O<sub>2</sub>-Sättigung in Kombination mit der Zugabe von 100 U/ml IFN $\gamma$  konnte ein starker Anstieg der VEGF-Sekretion synergistisch induziert werden. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus voneinander unabhängigen Versuchen dargestellt (n=3).

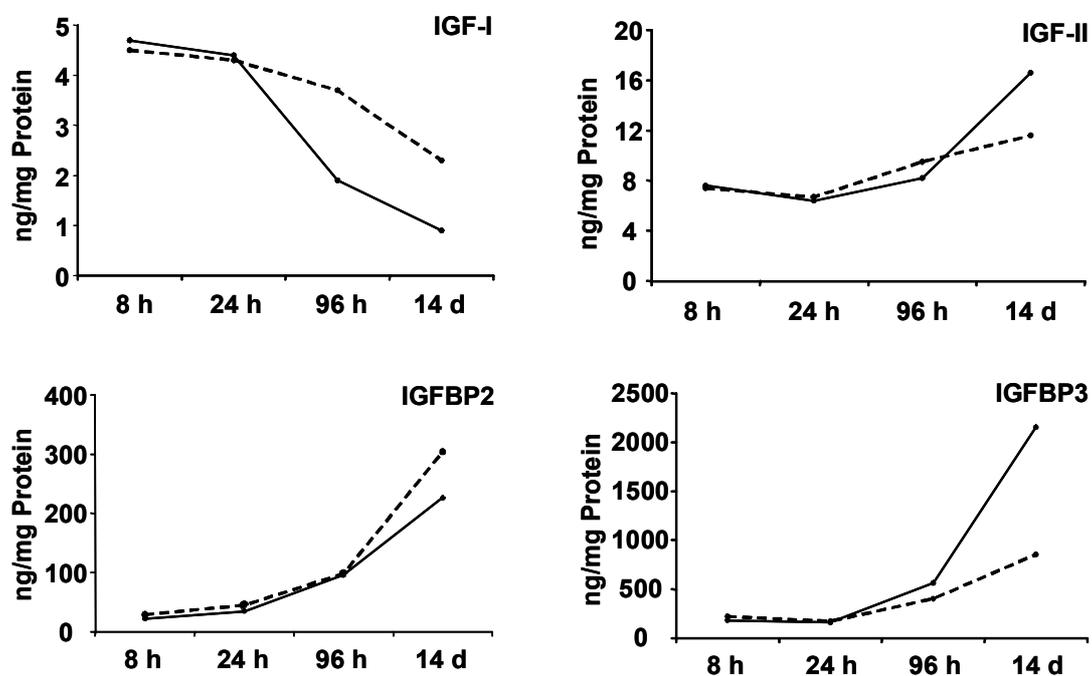
Daher wurde die Konzentration von VEGF im Überstand von MSC-Kulturen unter atmosphärischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen Bedingungen (1% O<sub>2</sub>) mittels ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) in Zusammenarbeit mit C. Holzwarth gemessen (Abb. 5-13).

Es konnte festgestellt werden, dass MSC geringe Mengen VEGF von 1-2 ng/ml unter atmosphärischen Bedingungen über den Verlauf von 72 h produzieren. Vergleichbare Mengen konnten auch unter hypoxischen Kulturbedingungen gefunden werden. Es kam hier zu keiner signifikanten Erhöhung in der Produktion von VEGF. Durch die Zugabe von 100 U/ml IFN $\gamma$  stieg der VEGF-Spiegel unter identischen Bedingungen im Kulturverlauf bis 72 h, jedoch nur unter Hypoxie, stark auf das 5-6fache an. Weder Hypoxie noch IFN $\gamma$  allein konnten ähnliche Effekte erzielen. Die MSC waren nachweislich in der Lage, das vaskularisierende Zytokin VEGF in hypoxischer Umgebung, die vergleichbar mit der inflammatorischen Randzone der AVN ist, zu sezernieren.

#### 5.2.4 Sekretion von IGF und IGFBP unter Hypoxiebedingungen

In hypoxischer Umgebung (1% O<sub>2</sub>) kultivierte MSC wurden auch hinsichtlich der produzierten Mengen von *Insulin-like growth factors* (IGF) und ihren Bindungsproteinen (IGFBP) untersucht. Diese Proteine sind dafür bekannt, maßgeblich an der Regulation des Knochenmetabolismus beteiligt zu sein, indem IGF und IGFBP gemeinsam beispielsweise die Proliferation der Osteoblasten stimulieren und die Knochenbildung unterstützen.

Die Analyse wurde in Kooperation mit Dr. B. Schütt (Kolling Institut für Medizinische Forschung, Sydney, Australien) via RIA durchgeführt. Sie zeigte, dass MSC in Hypoxiekultur signifikante Mengen sowohl an IGF-I als auch IGF-II sezernieren (Abb. 5-14). Beide Faktoren wiesen eine sichtbare Kinetik auf. Die Menge an IGF-I fiel über die Zeit ab, während IGF-II sich im Zellkulturüberstand ansammelte. Die Unterschiede waren zwischen den Kulturen mit 1% bzw. 21% O<sub>2</sub>-Gehalt jedoch nur gering. Es fand gleichzeitig eine Expression der IGFBP-2 und IGFBP-3 durch MSC *in vitro* statt. Über die Zeit betrachtet, steigerten beide Bindeproteine ihre Anteile an der Gesamtproteinmenge in den unterschiedlichen Kulturmedien. Es wurde somit deutlich, dass die Faktoren der IGF/IGFBP-Gruppe in den Kulturüberständen von MSC unter atmosphärischen und hypoxischen Bedingungen vorhanden waren.

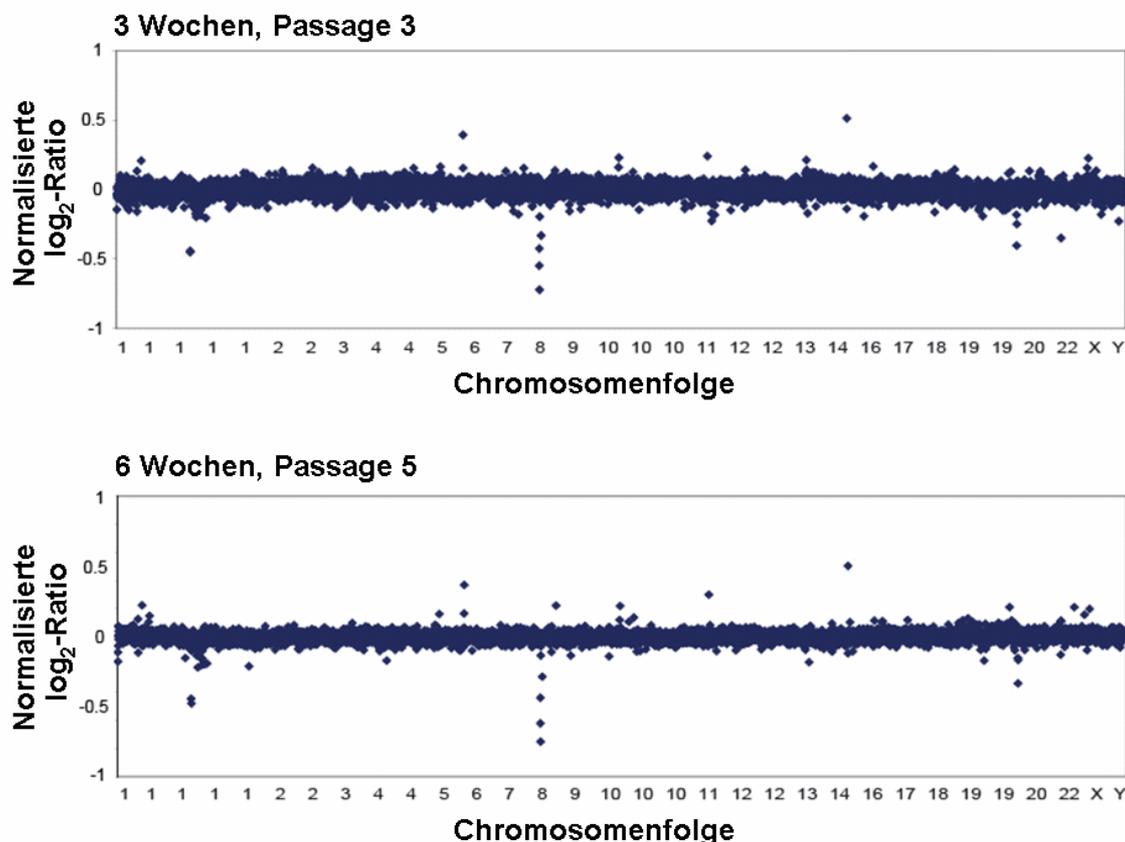


**Abb. 5-14: Radioimmunoassay von IGF und IGFBP in MSC-Kulturen.** MSC sezernierten IGF-I, -II, IGFBP2 und IGFBP3 in den Überstand. Die Proteinmengen der MSC unter atmosphärischen (gestrichelte Linie) und hypoxischen (feine Linie) Bedingungen zeigten im Zeitverlauf eine sichtbare Kinetik. Die Expression von IGF-I nahm dabei ab, die von IGF-II stieg. Hypoxie hatte hier nur partielle Effekte. IGFBP-2 und -3 wurden ebenfalls bei 1% und 21% O<sub>2</sub>-Gehalt exprimiert. Beide Mediatoren steigerten ihre Mediumkonzentrationen im Kulturverlauf. Insbesondere IGFBP-3 zeigte einen deutlichen Unterschied. Das Ergebnis ist repräsentativ aus voneinander unabhängigen Versuchen dargestellt (n=3).

### 5.2.5 Chromosomale Stabilität von MSC in Standardkultur

Um putative Chromosomenanomalien von MSC während des Kulturverlaufs aufzudecken, wurden MSC in Zusammenarbeit mit C. Holzwarth unter Standardkulturbedingungen bei 21% O<sub>2</sub>-Gehalt mit 5% FFP und 1% TKZ in mehrere Passagen über Wochen expandiert.

Die Analyse wurde in Kooperation mit Dr. S. Pfister (Abteilung für Molekulare Genetik, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) durchgeführt. Unter Anwendung eines hoch auflösenden, matrixbasierenden CGH-Arrays (*Comparative genomic hybridization*) konnte demonstriert werden, dass es zu keinen chromosomalen Abnormalitäten abseits üblicher Polymorphismen bei den MSC eines Patienten im Vergleich von Kurz- und Langzeitkultur kam (Abb. 5-15). Die DNA wurde hierfür mit rund 8000 degenerierten, immobilisierten Oligonukleotiden, die das gesamte menschliche Genom abdecken, hybridisiert. Als Referenz wurde DNA aus PBMC (*Peripheral blood mononuclear cells*) gesunder Spender untersucht. Auch nach 12 Wochen waren keine Aberrationen im Genom festzustellen. Die Kulturdauer für den klinischen Einsatz der MSC beträgt indes maximal vier Wochen.



**Abb. 5-15: CGH-Array zur Analyse chromosomaler Stabilität von MSC.** Expandierte MSC zeigten keine strukturellen Genomabnormalitäten. Es wurden die Kulturen nach drei (oben) und sechs Wochen (unten) verglichen. Als Referenz diente frisch isolierte DNA von PBMC gesunder Spender. Das gezeigte individuelle Muster eines Patienten blieb während des Kulturverlaufs konstant. Die Abbildung stellt ein repräsentatives Ergebnis aus voneinander unabhängigen Versuchen dar (n=3).

### 5.2.6 Patientenkollektiv mit avaskulärer Osteonekrose

Vor dem Hintergrund der viel versprechenden Eigenschaften von MSC bezüglich ihres Differenzierungspotenzials und der Proteinsezernierung wurde der klinische Einsatz autologer MSC an fünf Patienten mit Osteonekrose nach Steroidtherapie erprobt (Tab. 5-1). Diese Reihe von Einzelheilversuche diente vorrangig zur Überprüfung von Verträglichkeit und Sicherheit der eingesetzten, expandierten MSC. Die Applikation fand während der konventionellen *Core Decompression* statt. Das Volumen der Zellsuspension war dabei in allen genannten Fällen größer als die nekrotische Höhle.

**Tab. 5-1: Übersicht der AVN-Patienten mit MSC-Applikation.** ALL = Akute lymphatische Leukämie, DEX = Dexamethason, Caput femoris = Hüftkopf, Condylus lateralis femoris = Gelenkkopf, mPRED = Methylprednisolon, PRED = Prednisolon, T-NHL = T-lymphoblastisches Non-Hodgkin-Lymphom

Patient	Alter	Diagnose	Steroid- therapie vor AVN	AVN Diagnose	Lokalisation	Operation	MSC total (1x10 <sup>6</sup> )
					Symptome		
1. ♂	21	T-NHL	PRED	04.12.2003	Condylus lat., rechts	23.11.2006	112
			DEX		unkontrollierter Schmerz		
2. ♀	27	Sichelzellanämie mit β-Thalassämie Eigenschaften	mPRED	20.01.2005	Condylus lat., rechts >> links	10.02.2006	98.5
			PRED		persistierende Schmerz- attacken im Knochen		
3. ♀	21	ALL	PRED	10.11.2005	Caput femoris, links	27.03.2007	155
4. ♀	17	Juvenile Dermatomyositis	mPRED PRED	25.07.2005	Condylus lat., links	14.09.2006	31
5. ♂	9	Uveitis	PRED	24.10.2006	Condylus lat., rechts	19.12.2006	240
					Schmerz		

### 5.2.7 Applikation der MSC und radiologische Verlaufskontrolle bei Patienten mit AVN

Für die klinische Anwendung von MSC sind zunächst verschiedene biologische Eigenschaften *in vitro* untersucht worden. Zu den getesteten Eigenschaften von MSC zählten die Proliferation und Differenzierung unter hypoxischen Bedingungen, die osteoblastische Differenzierung in An- und Abwesenheit von IFN $\gamma$  (Abschnitt 5.2.1 und 5.2.2) und die Sekretion von IGF, IGFBP und VEGF (Abschnitt 5.2.3 und 5.2.4) unter Einfluss von Hypoxie und IFN $\gamma$ .

Zur Identifikation der nekrotischen Läsion wurden Magnetresonanztomograph (MRT) und konventionelles Röntgen eingesetzt (Abb. 5-16). Unter radiologischer Kontrolle wurde die

Zellsuspension der MSC (3-5 ml) über eine Knopfkanüle in die nekrotische Läsion lokal injiziert und das Bohrloch abschließend mit Fibrinkleber verschlossen.

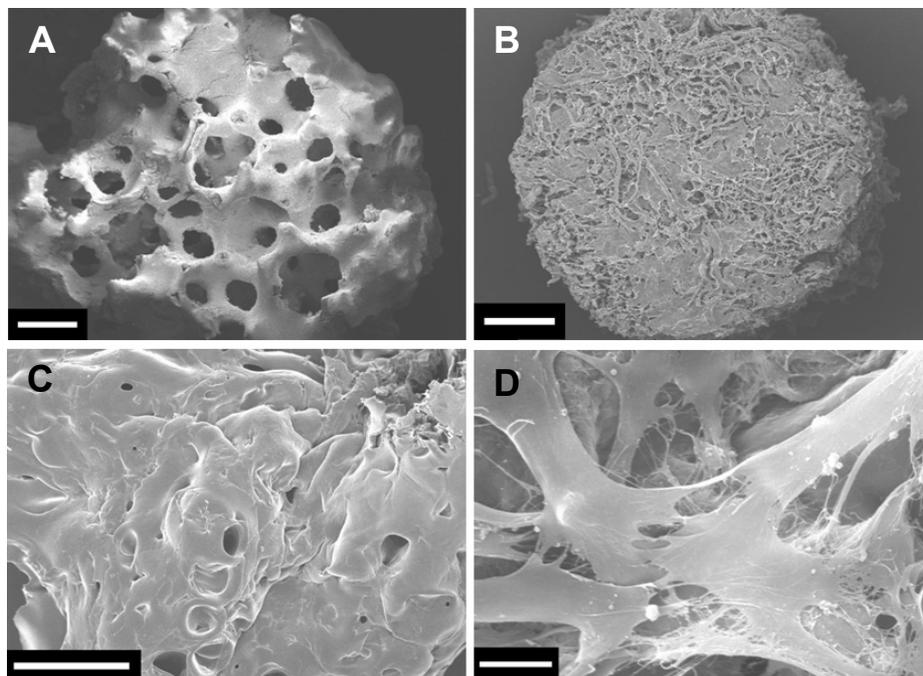
Der Eingriff zeigte bei keinem der behandelten Patienten negative Effekte wie intraoperative Komplikationen oder Infektionen. Das Transplantat kann somit als gut verträglich und sicher betrachtet werden. Unter klinischen Gesichtspunkten kam es zu keiner Verschlechterung im mittleren, klinischen *Follow-up* von 29 Monaten (24-38 Monate). Bei allen Patienten konnte der Schmerz reduziert werden, auch verbesserte sich die Beweglichkeit zunehmend. Darüber hinaus konnte bislang in einem Fall der Wiederaufbau des defekten Knochenareals durch Kalzifizierung computertomographisch diagnostiziert werden (Abb. 5-16 D). In der Abbildung sind einzelne Aufnahmen des Kniegelenks des Patienten 1 (Tab. 5-1) vor, während und nach der Operation zusammengefasst (Abb. 5-16 A-C).



**Abb. 5-16: Diagnostische Darstellung des Behandlungsverlaufs eines AVN-Patienten.** Die Abbildung zeigt Magnetresonanzaufnahmen der nekrotischen Läsion vor (A) und nach (C) der Operation. Die Injektion der MSC über eine Knopfkanüle während der Core Decompression wurde radiologisch kontrolliert (B). Die Aufnahme 72 d nach der Behandlung (C) zeigte eine postoperative Reaktion im Randbereich der Osteonekrose. Die Computertomographie 24 Monate nach der Operation (D) zeigte die Kalzifizierung der nekrotischen Läsion.

### 5.2.8 Dreidimensionale Zellkulturen von MSC auf Polymergerüsten

Für weitere mögliche Anwendungen von MSC *in vivo* stellt sich das Problem, die Zellen gezielt lokal zu applizieren und deren Verbleib dort zu gewährleisten. Eine besondere Herausforderung stellt beispielsweise der Ersatz von geschädigten oder zerstörten Kieferknochen auf dem Gebiet der Zahnchirurgie dar. Um die Rekonstruktion des Kieferknochens mit Hilfe von MSC zu erreichen, muss das Implantat in diesem *Setting* von Anfang an belastungsstabil sein, damit der umgebende Knochen nicht atrophiert. Als ein viel versprechender Lösungsansatz steht die Verwendung von dreidimensionalen Gerüsten, so genannten *Scaffolds*, die durch natürliche oder synthetische Polymerstrukturen eine Grundlage für proliferierende oder differenzierende Zellen bieten. In dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche *Scaffolds* von 3 x 5 mm Kantenlänge verwendet (Abb. 5-17): Einerseits die natürlichen Polymere aus mineralisiertem Kalziumphosphat oder einem Geflecht verschiedener Kollagenfibrillen, andererseits die synthetisch hergestellte Struktur OPLA (*Open-cell polylactic acid*). Alle drei *Scaffolds* besitzen die strukturelle Eigenschaft, dass MSC sowohl auf der Oberfläche als auch im Inneren der Polymergerüste adhärent kultiviert werden konnten. In ersten Experimenten wurden MSC von gesunden Spendern zur Besiedlung der *Scaffolds* in Zellsuspensionen aufgetropft und versucht in Standardmedium zu kultivieren.



**Abb. 5-17: REM-Aufnahmen von Scaffolds vor und nach MSC-Besiedlung.** Es sind die verschiedenen 3D-Polymere und ihre Oberflächen dargestellt: Kalziumphosphat (A), Kollagen (B und D) und OPLA (C). MSC wuchsen erfolgreich auf OPLA- und Kollagen-Scaffolds (D). Die Messbalken entsprechen einer Länge von 600  $\mu\text{m}$  (A-C) bzw. 15  $\mu\text{m}$  (D). Die Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit dem ZZMK, Abt. Medizinische Werkstoffkunde & Technologie, Leitung Prof. Dr. J. Geis-Gerstorfer, erstellt.

Die Abbildung gibt einen Überblick über die verwendeten Polymergerüste und zeigt sowohl deren Oberflächenstrukturen als auch die Besiedlung durch adhärente MSC im Detail. Als Resultat konnte mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops (REM) beobachtet werden, dass die MSC die verschiedenen *Scaffolds* mit deutlichen Unterschieden besiedelten. So waren auf Kalziumphosphat-*Scaffolds* keine MSC zu finden. Die Gerüste aus Kollagen und OPLA wurden hingegen gut von MSC besiedelt. Daraus lässt sich eine mögliche Anwendung von dreidimensional kultivierten und expandierten MSC auf Kollagen- oder OPLA-*Scaffolds* ableiten. Für die Anwendung als Ersatz von Kieferknochenanteilen kommen allerdings auf Grund der geforderten Belastungsstabilität der *Scaffolds* nur die Polymergerüste aus OPLA in Frage.

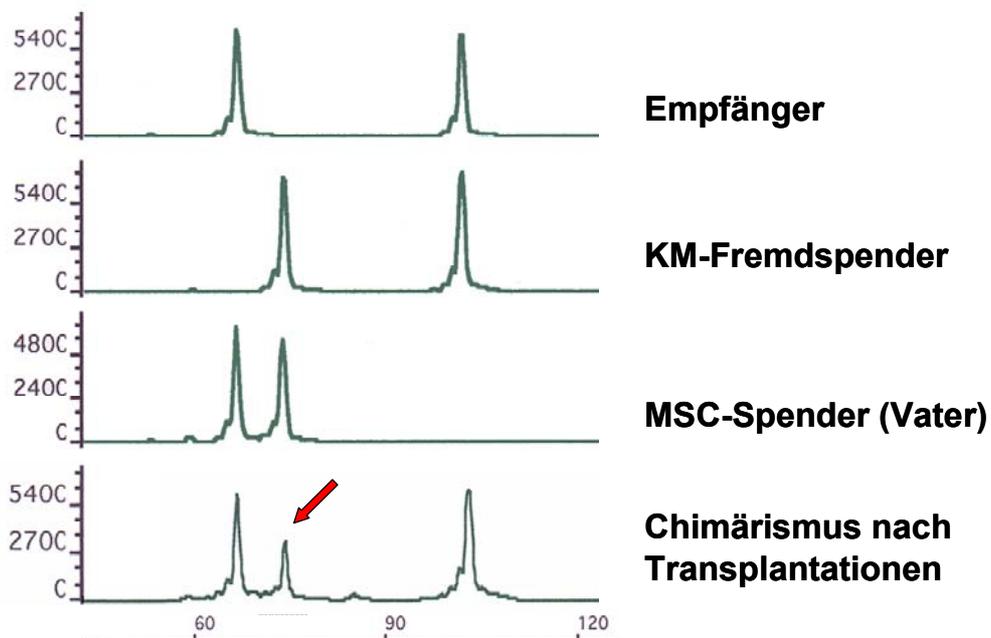
### 5.3 Migration und Homing von mesenchymalen Stromazellen

#### 5.3.1 Untersuchung der Migration von MSC nach Transfusion

Im Folgenden wird der Fall eines Patienten mit DNA-Ligase IV-Defekt in seinem Krankheitsverlauf und der daraus resultierenden Behandlung beschrieben: Bei einem zwei Jahre alten männlichen Patienten ist der DNA-Ligase IV-Defekt molekulargenetisch nachgewiesen worden. Das Kind zeigte Gedeihstörung, schwere Diarrhö und eine Mikrozephalie. Als Therapie wurde dem Patient im Alter von 2 Jahren und 8 Monaten allogenes Knochenmark von einem HLA-identen Fremdspender transplantiert. Daraufhin entwickelte der Patient zunächst eine akute Darm-GvHD Grad IV mit starken gastrointestinalen Blutungen, eine ausgeprägte VOD (*Veno-occlusive disease*) der Leber und auf Grund massiver Immunsuppression anschließend eine pulmonale Aspergillose. Zur Behandlung der Darm-GvHD wurden zweimal expandierte MSC des Vaters transfundiert. Inzwischen breitete sich die Aspergillose auch cerebral aus, was schließlich zum Tode führte. Der Patient verstarb zwei Wochen nach der zweiten MSC-Gabe. Bei der durchgeführten Obduktion konnten Gewebeproben der durch die GvHD betroffenen und anderer Organe entnommen werden.

In Folge dessen wurden daraus zum einen histologische Gewebeschnitte angefertigt und zum anderen DNA für Chimärismusanalysen isoliert. Zusätzlich konnte auf DNA aus dem Peripherblut der Spender und des Empfängers vor HSCT zurückgegriffen werden. Die Chimärismusanalyse (Abschnitt 4.2.4) basiert auf der Methode der PCR-Amplifikation von *Short tandem repeats* (STR-PCR) und dient zur Bestimmung des Anteils der Spenderzellen im Empfänger (Abb. 5-18). Die PCR-Produkte ergeben nach elektrophoretischer Auftrennung im Kapillargel entsprechend ihrer Größe ein individuelles Muster. Hierfür stand der Diagnostik eine Reihe von etablierten Primerpaaren (Tab. 3-3) zur Verfügung. Nach erfolgter Transplantation wurden Empfänger und Spender gegenübergestellt, um den eventuell vorliegenden Chimärismus und den

Anteil sowie die Verteilung der transfundierten MSC in den einzelnen Organen bestimmen zu können. Dabei wurden die PCR-Fragmente unterschiedlicher Größe den beteiligten Personen zugeordnet und das entstehende Muster der *Peaks* vor und nach Transplantation verglichen. Ein zusätzlicher *Peak* im Histogramm des Empfängers nach Transplantation wurde als Chimärismus bewertet (Abb. 5-18). In diesem besonderen Fall diente die Methode ferner auch der Unterscheidung zwischen dem *Engraftment* von transplantierten HSC und MSC. Nach den Analysen musste konstatiert werden, dass zwar ein Chimärismus detektiert werden konnte, aber keines der untersuchten Primerpaare ein eindeutiges Ergebnis hinsichtlich der Spenderzuordnung erzielte. Es blieb daher bis zu diesem Zeitpunkt offen, welche Spenderzellen für die Detektion allogener Anteile an der Empfänger-DNA verantwortlich waren.



**Abb. 5-18: Chimärismusanalyse nach konsekutiven Transplantationen von HSC und MSC.** Die Abbildung zeigt die graphische Auswertung des PCR-Chimärismus des SCID-Patienten. Es sind die Histogramme des Empfängers vor (oben, aus PBMC) und nach (unten, aus Lymphknoten) der Transplantation sowie die der jeweiligen Spender (aus PBMC) dargestellt. Da keine Primer zur Verfügung standen, die KM- und MSC-Spender ohne gemeinsames Amplikon unterscheiden konnten, könnte aus der geringeren Höhe des gekennzeichneten Peaks (roter Pfeil) im Vergleich zu den flankierenden Peaks indirekt geschlossen werden, dass in dem Lymphknoten MSC des Vaters vorhanden gewesen sein könnten. Andere Methoden sind notwendig, um diesen Hinweis zu überprüfen.

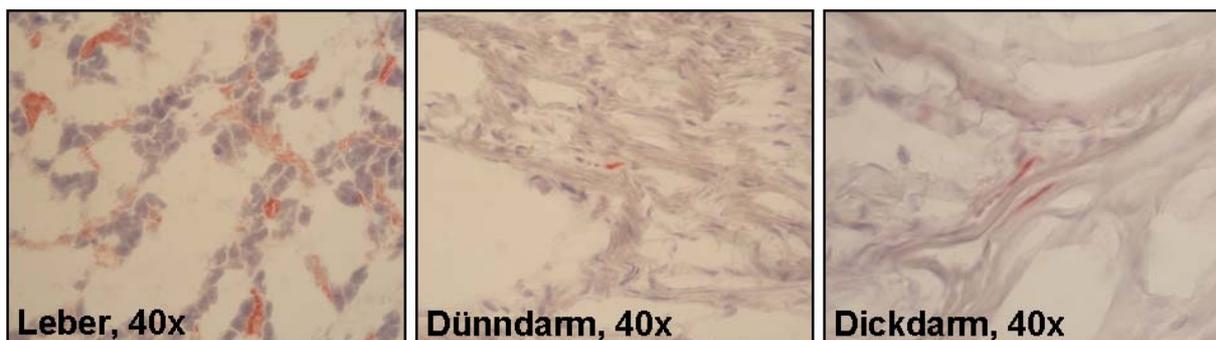
Einen Ausweg aus der Problematik der ungenügenden Separation der beteiligten Spender in der Chimärismusanalyse sollte die immunhistologische Aufarbeitung von Gewebeschnitten der entnommenen Organproben liefern. Hierfür wurden die vorliegenden HLA-Typisierungen der Spender und des Empfängers verglichen, um Disparitäten der einzelnen HLA-Loci zu finden (Tab. 5-2). Darauf basierend sollte mittels spezifischer HLA-Antikörper eine eindeutige

Zuordnung der engrafteten Zellen erreicht werden. Für die ausschließliche Detektion der paternalen Spender-MSC wurden die spezifischen unkonjugierten Antikörper anti-HLA-A01 und anti-HLA-B08 getestet.

**Tab. 5-2: Übersicht der HLA-Typisierung der Empfänger und Spender.**  
Die Analyse bildete die Grundlage für die Wahl der HLA-A01 und HLA-B08 spezifischen Antikörper zur Verwendung bei immunhistologischen Färbungen.

	HLA-A*	HLA-B*
Empfänger	*0201/*3001	*0704/*1302
KM-Fremdspender	*0201/*3001	*0702/*1302
MSC-Spender (Vater)	*01/*3001	*08/*1302

Die Gewebeproben wurden in Kooperation mit Dr. S. Schott von der Allgemeinen Pathologie des UKT (Leitung Prof. Dr. F. Fend) bearbeitet. Für die immunhistologischen Färbungen der Gewebeschnitte von Leber, Lunge, Lymphknoten, Gehirn, Dick- und Dünndarm wurde einheitlich der HLA-A01-spezifische Antikörper verwendet. Die vorangegangenen Tests zeigten hier deutlich weniger Hintergrundfärbung gegenüber dem anti-HLA-B08-Antikörper. Mit Hilfe der existierenden HLA-Disparität zwischen Empfänger und den beiden Spendern konnte somit ein zuverlässiges Färbeprotokoll etabliert werden, das der APAAP-Methode zu Grunde liegt (Abschnitt 4.4.8).



**Abb. 5-19: Detektion von Spender-MSC nach Transplantation in Empfängergeweben.** Die Abbildung zeigt die immunhistologische Chimärismusanalyse von Gewebeschnitten unterschiedlicher Organe eines Empfängers. Die MSC des Spenders (rot) wurden über die Bindung eines HLA-spezifischen Antikörpers (anti-HLA-A01) dargestellt. Das Lebergewebe zeigte mehrere väterliche Zellen. In Dünndarm und Dickdarm waren Spender-MSC nur vereinzelt zu finden.

Ein Chimärismus konnte in einigen der untersuchten Organe diagnostiziert werden. In Lunge und Lymphknoten ließen sich keine Spender-MSC finden, in Dick- und Dünndarm konnten hingegen vereinzelt MSC des Vaters entdeckt werden. Die Leber zeigte im Vergleich dazu eine

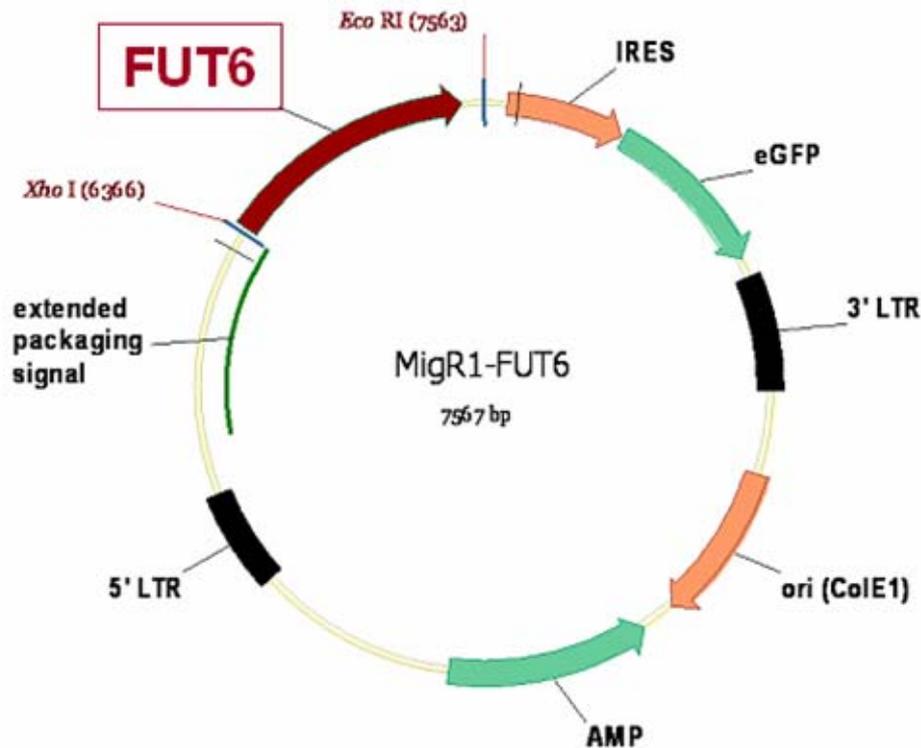
hohe Frequenz von paternalen Zellen (Abb. 5-19). Insgesamt konnte für diesen besonderen klinischen Fall festgestellt werden, dass MSC hier ausschließlich in den inflammatorischen Geweben (Darm und Leber) wieder zu finden waren, in anderen (Lunge und Lymphknoten) jedoch nicht detektiert wurden.

### 5.3.2 Konstruktion eines retroviralen Transfektionsplasmid für FUT6

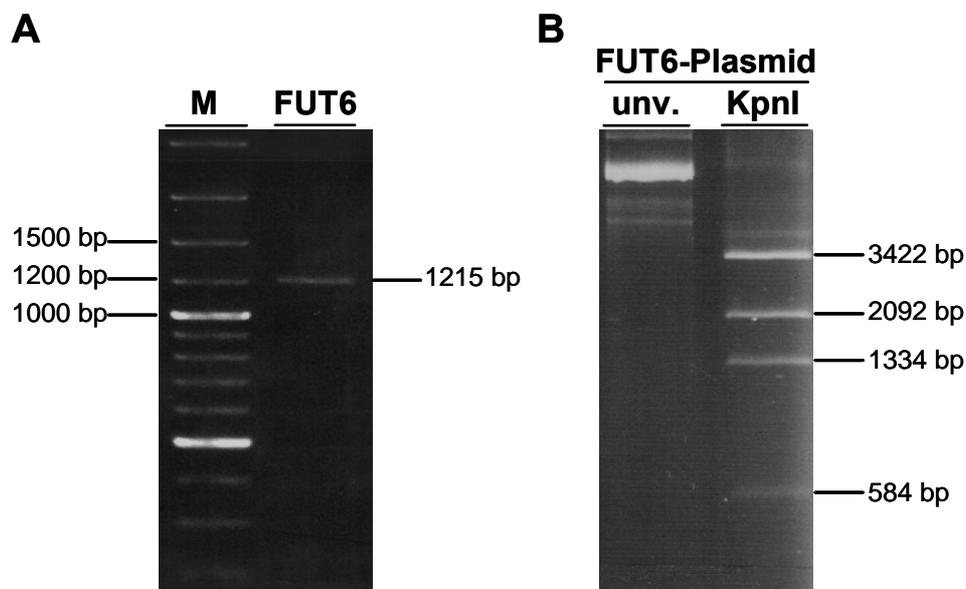
Der Osteotropismus von infundierten MSC ist gering. Die Rekrutierung der MSC zum Knochen findet durch die Bindung an E-Selektine statt, die sialofucosylierte Liganden erkennen. Auf MSC kann keine Expression von E-Selektin-Liganden nachgewiesen werden. Allerdings wird eine native Glykoform von CD44 auf MSC exprimiert, die mittels einer  $\alpha$ -1,3-Fucosyltransferase in einen E-Selektin-Ligand konvertiert werden kann<sup>240</sup>. Um eine Behandlung von Knochendefekten wie Osteonekrosen durch Applikation von MSC auch systemisch realisieren zu können, muss der Osteotropismus gesteigert werden. Durch die retrovirale Transfektion eines Expressionsplasmids mit der kodierenden Sequenz der  $\alpha$ -1,3-Fucosyltransferase VI (FUT6) in Feederzellen soll die Migration von MSC in Knochen effektiv erhöht werden. Die transfizierten Zellen sollen danach FUT6 konstitutiv exprimieren und in den Kulturüberstand freisetzen. In Co-Kultur soll dann durch Fucosylierung von CD44 die Sialyl-Lewis X (sLewis<sup>X</sup>, CD15s), ein E-Selektin-Ligand, auf MSC synthetisiert werden.

Zur Herstellung des retroviralen Expressionsplasmids wurde als Ausgangsvektor MigR1 verwendet. Dieser ist eine Ableitung des Vektors pMSCVneo und beinhaltet neben einer Reihe notwendiger retroviraler Elemente zur Genomintegration auch eine Ampicillinresistenzkassette, die kodierende Sequenz für eGFP (*Enhanced green fluorescent protein*), den bi-cistronischen Promoter ori ColE1 (*Origin of replication of colicin E1*) und eine *Multiple cloning site*. In der Übersicht ist die endgültigen Vektorkarte inklusive der FUT6-Insertion und aller vorhandenen Elemente graphisch dargestellt (Abb. 5-20).

Die zu klonierende Sequenz der Fucosyltransferase VI (NCBI-Datenbank *Nucleotide*, Sequenz NM\_000150) wurde mittels *Pfu*-Polymerase und spezifischen Primern mit angehängten Restriktionsschnittstellen (Abschnitt 3.4) aus cDNA von MSC amplifiziert (Abb. 5-21 A). Das Fragment der Größe 1215 bp und der MigRI-Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* verdaut und konnten anschließend gerichtet kloniert werden. Die Selektion der Positivklone erfolgte unter Verwendung vektorspezifischer Primer durch PCR (Tab. 3-1). Dabei ergab sich ein Fragment der Größe 1463 bp bei Plasmiden mit Insert und ein Fragment der Größe 248 bp bei Plasmiden ohne Insert.



**Abb. 5-20: Vollständige Vektorkarte von MigR1 mit dem klonierten FUT6-Insert.** Im retroviralen Transfektionsplasmid ist einerseits das Insert mit den zugehörigen Insertionsschnittstellen *Eco*RI und *Xho*I, andererseits alle zur Integration und Replikation notwendigen Elemente dargestellt. FUT6, Fucosyltransferase VI; IRES, Internal ribosomal entry site; eGFP, Enhanced green fluorescent protein; LTR, Long terminal repeats; ori, Origin of replication; Amp, Ampicillinresistenzkassette.



**Abb. 5-21: Gelelektrophoretische Analyse von DNA-Fragmenten.** (A) Nach der Amplifikation aus cDNA wurde das PCR-Produkt von FUT6 mit einer Größe von 1215 bp in einem 1,5% Agarosegel dargestellt. Zum Vergleich ist zusätzlich ein Längenstandard (M) aufgetragen worden. (B) Das isolierte Plasmid mit FUT6-Insert wurde zur Analyse mit *Kpn*I verdaut und zusammen mit unverdaulichem Plasmid (unv.) in einem 1,5% Agarosegel aufgetragen. Das Bandenmuster entsprach den erwarteten Größen von 3422 bp, 2092 bp, 1334 bp und 584 bp.

Die Verifizierung der aufgereinigten, positiven Plasmide fand durch den enzymatischen Verdau mit *KpnI* und der Analyse der daraus resultierenden Bandenmuster nach gelelektrophoretischer Auftrennung statt (Abb. 5-21 B). *KpnI* besaß zwei Restriktionsschnittstellen im Insert und drei im Vektor, wodurch folgende Fragmentgrößen erwartet werden konnten: 135 bp, 584 bp, 1334 bp, 2092 bp und 3422 bp.

Zur hinreichenden Kontrolle wurde das erfolgreich getestete Plasmid abschließend zur Sequenzierung in Auftrag gegeben (Firma Eurofins MWG Operon, Martinsried). Die resultierende Sequenz wurde basierend auf der theoretischen Grundlage der Sequenzen von Vektor und Fragment verifiziert. Das korrekte Plasmid stand daraufhin für Transfektionsexperimente zur Verfügung.

## 6 Diskussion

Die Isolation und die Expansion von humanen multipotenten mesenchymalen Stromazellen *ex vivo* gelingt heutzutage einfach und schnell aus Knochenmarkaspiraten. Die im Vergleich zu HSC geringere Frequenz im Knochenmark überwinden MSC innerhalb von wenigen Tagen durch starke Proliferation *in vitro*<sup>12</sup>. Trotz der allgemein akzeptierten Kenntnis über die Heterogenität der Population der MSC sind Parameter für eine Definition dieser Zellpopulation gefunden worden. Für eine Charakterisierung von MSC sind Minimal Kriterien vorgeschlagen worden, die sich neben der Plastikadhärenz aus dem Immunphänotyp CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup> und der Differenzierungsfähigkeit in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten zusammensetzen<sup>31</sup>. Auf Grund ihres Differenzierungspotenzials werden MSC erfolgreich in der regenerativen Medizin, vorrangig bei Knorpel- und Knochendefekten therapeutisch, eingesetzt<sup>205 252</sup>. Darüber hinaus qualifizieren sich MSC durch ihre immunmodulatorischen Eigenschaften für die klinische Anwendung. Sie können die Proliferation von T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen unterdrücken und sowohl die Antigenpräsentation als auch die Reifung von dendritischen Zellen inhibieren<sup>184</sup>. Die immunsuppressiven Effekte können MSC zum einen direkt durch Zell-Zell-Kontakt, zum anderen indirekt über die Sekretion von parakrin wirkenden Faktoren vermitteln<sup>121</sup>. Zusätzlich gelten MSC weitestgehend als nicht immunogen<sup>253</sup>. Es ist auch bekannt, dass MSC als Co-Transplantat mit Knochenmarkstransplantationen das *Engraftment* der HSC und die Hämatopoese unterstützen können. Im Zusammenhang mit HSCT kann eine *Graft-versus-host disease* gegen Empfängergewebe wie Leber, Lunge, Haut oder Darm auftreten. Hier werden MSC auf Grund ihrer immunsuppressiven Eigenschaften bei HSCT-Patienten zur Linderung von auftretenden GvHD eingesetzt<sup>254</sup>. Erste, viel versprechende Fälle, die unter anderem auch durch die Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen beschrieben worden sind, zeigen MSC-Transfusionen bisher positive Effekte auf den Verlauf von entstandenen GvHD<sup>203 208</sup>. Mögliche Kontraindikationen und potentielle Gefahren der MSC-Transplantation müssen noch besser untersucht werden.

Für die klinische Anwendung von *ex vivo* expandierten MSC ist es notwendig, dass die Kultivierung in Abwesenheit von jeglichen tierischen Proteinen stattfindet. So werden inzwischen und nicht zuletzt durch die Forschungsarbeit der Kinder- und Jugendmedizin des UKT die hier verwendeten MSC in Medium mit humanem FFP und Thrombozytenlysat statt FCS kultiviert und propagiert<sup>9</sup>. Abgesehen von Knochenmarkaspiraten werden inzwischen MSC auch aus einer Reihe anderer Gewebe isoliert. Dazu gehören beispielsweise Nabelschnurblut, die Plazenta und andere fetale Gewebe, aber auch Synovialflüssigkeit, Fettgewebe, Haarfollikel und Zähne<sup>69 72 255 256</sup>.

Ein Hauptteil der vorgestellten Arbeit beschäftigt sich mit der Gewinnung von MSC aus Zahnpapillen von Weisheitszähnen und verfolgt dabei das Ziel, die isolierten Zellen mit knochenmarkabgeleiteten MSC zu vergleichen. Ein weiterer Teil zeigt Untersuchungen zu relevanten biologischen Eigenschaften von MSC im Zusammenhang mit der klinischen Applikation bei Patienten mit steroidinduzierten avaskulären Osteonekrosen. Abschließend soll die Analyse von Migration und *Homing* der MSC nach erfolgter systemischer Anwendung anhand eines klinischen Fallbeispiels beschrieben und diskutiert werden.

## **6.1 Isolation humaner multipotenter mesenchymaler Stromazellen aus Zahnpapillen**

Aus 0,5 bis 2 ml Knochenmarkpunktat können ausreichend plastikadhärente Zellen isoliert werden, damit sich daraus eine kontinuierlich proliferierende Primärkultur von KM-MSC expandieren lässt. Für die vorliegende Arbeit konnten MSC aus einzelnen Zahnpapillen (Z-MSC) gewonnen werden, die ursprünglich als kleines Gewebekissen auf den Zahnwurzeln von extrahierten, noch retinierten Weisheitszähnen apikal aufsaßen (Abb. 5-1). Zahnpapillen sind mit der Pulpa im Inneren der Zahnwurzel verbunden. Das Gewebematerial wurde von Patienten des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (ZZMK) Tübingen im Alter von 7-22 Jahren zur Verfügung gestellt. In den folgenden Abschnitten werden die Experimente besprochen, die zusammen eine fundierte Aussage darüber machen sollen, ob es sich bei den isolierten Z-MSC um Zellen handelt, die im Vergleich identische Eigenschaften wie KM-MSC besitzen.

### **6.1.1 Vergleich der biologischen Eigenschaften von Z-MSC und KM-MSC**

Die Z-MSC können wie auch KM-MSC erfolgreich sowohl in Medium mit 10% FCS, als auch in Medium mit 5% FFP und 1% TKZ kultiviert und in gebräuchlichen Zellkulturmaßstäben propagiert werden (Abb. 5-2). Gleichzeitig erfüllen die Z-MSC das erste Minimalkriterium für mesenchymale Stromazellen, das auf der Eigenschaft der Plastikadhärenz begründet ist<sup>31</sup>. Hinsichtlich ihrer Morphologie unterscheiden sie sich mikroskopisch nicht von KM-MSC. Dabei konnte mit Beginn der Kultivierung beobachtet werden, dass bei allen Spendern die Kulturansätze früher einen *Monolayer* ausbildeten, bei denen die Z-MSC in mit TKZ supplementiertem FFP-Medium gehalten wurden. Diese Beobachtung konnte hinsichtlich der Proliferation von KM-MSC bereits zuvor durch Müller *et al.* gemacht werden<sup>9</sup>. Das beschleunigte Wachstum steht im Zusammenhang mit dem vorhandenen PDGF im Zellkulturmedium, das von Thrombozyten natürlich sezerniert wird<sup>257</sup>. KM-MSC und Z-MSC besitzen vergleichbare Wachstumskinetiken. Nicht nur die Wachstumsraten in Abhängigkeit von der Konzentration der humanen Supplemente FFP und TKZ, sondern auch der Vorteil der gesteigerten Proliferation

gegenüber MSC, die in FCS-haltigem Medium kultiviert wurden, zeigen ein nahezu kongruentes Ergebnis. Die Oberflächencharakterisierung kennzeichnet expandierte Z-MSK als positiv für CD73, CD90, CD105, HLA-ABC und negativ hinsichtlich der Expression von CD34, CD45, CD271, HLA-DR (Abb. 5-4). Ihr Phänotyp ist mit dem von KM-MSK identisch. Sie erfüllen somit auch das für MSK formulierte zweite Minimalkriterium<sup>31</sup>.

Die herausragende Eigenschaft von mesenchymalen Stromazellen liegt in ihrer multipotenten Differenzierungsfähigkeit. Hier herrscht allgemeiner Konsens darüber, dass MSK in der Lage sind, in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten zu differenzieren. Dieses Charakteristikum bildet zugleich das dritte Minimalkriterium, das für die Definition von MSK festgelegt wurde<sup>31</sup>. Die drei Zelltypen entstammen gemeinsam dem Mesoderm.

Die Differenzierung in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten folgt dabei einer hierarchischen Reihenfolge<sup>81</sup>. Hinsichtlich der Isolation von MSK aus verschiedenen Kompartimenten von Zähnen oder angrenzenden Geweben wurde ebenfalls über unterschiedliches Differenzierungspotenzial der einzelnen Populationen berichtet. So zeigten die Autoren der so genannten SHED, die aus ausgefallenen Milchzähne isolierten wurden, mit lediglich ~5% eine nur äußerst geringe adipogene Differenzierungskapazität ihrer Zellpopulation. Die osteogene Induktion gelang in diesem Zusammenhang nicht<sup>73</sup>. Isolierte MSK aus der Zahnpulpa (DPSC) differenzierten im Gegensatz zu den SHED in Osteoblasten. Allerdings war hier anfänglich keine Induktion der adipogenen Differenzierung zu beobachten<sup>75</sup>. Erst mit Verlängerung der Differenzierungsdauer auf fünf Wochen zeigten sich Fettvakuolen in den DPSC<sup>72</sup>. Bei weiteren Populationen konnten MSK ebenfalls nur osteogen differenziert werden oder der Anteil der erfolgreich adipogen oder osteogen induzierten Zellen lag bei nur ~20% bzw. ~30%<sup>24 77</sup>. Keine der hier angesprochenen MSK-Populationen konnte dabei chondrogen differenziert werden. In einer aktuellen Publikation wird dagegen die Differenzierung von DPSC und SHED in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten proklamiert, jedoch bleibt auch hier die Demonstration der multipotenten Differenzierungskapazität über *in vitro* Experimente unvollständig<sup>258</sup>.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Z-MSK wurden in adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierungsexperimenten (Abb. 5-5 und Abb. 5-6) eingesetzt. Die Induktion der MSK in Adipozyten und Osteoblasten führt zu mikroskopisch beobachtbaren, morphologischen Unterschieden. Im Vergleich mit der gut ausgeprägten adipogenen Differenzierung der KM-MSK zeigt sich eine nur schwache Ausprägung der intrazellulären Fettvakuolen bei den Z-MSK. Der Anteil der adipogen differenzierten Z-MSK ist mit etwa 5%

ähnlich groß wie der, der für SHED publiziert wurde. Hier lässt sich vermuten, dass eine längere Stimulation der adipogenen Differenzierung der Z-MSK deshalb notwendig ist, weil Adipozyten nicht zu den natürlich vorhandenen Zelltypen im Zahn und den assoziierten Geweben gehören. Entscheidende Rezeptoren zur Signalvermittlung könnten anfänglich nur in nicht genügender Zahl vorhanden sein und so zur Verzögerung der einsetzenden Differenzierung beitragen. Die Versuche zur osteogenen Induktion von KM-MSK und Z-MSK bringen ein vergleichbares Ergebnis zutage. Sowohl bei KM-MSK als auch bei Z-MSK ist die Bildung von Kalziumpräzipitaten *in vitro* über den gesamten *Monolayer* festzustellen. Die Differenzierung von MSK in Osteoblasten war auch bei anderen, bereits beschriebenen Populationen wie die DPSC oder PDLSC eindeutig und am stärksten ausgeprägt. Hingegen waren SHED nicht in der Lage, in Osteoblasten zu differenzieren. Allerdings wurde gezeigt, dass SHED in so genannte Odontoblasten - eine dentinproduzierende Zellpopulation mesodermalen Ursprungs - differenzieren können. Ein Zusammenhang des osteogenen Differenzierungspotenzials von DPSC, PDLSC, SHED und Z-MSK mit der Herkunft ihrer Ursprungsgewebe ist auch hier anzunehmen. Die Assoziation der Gewebe, aus denen MSK isoliert werden, mit dem Kieferknochen als osteogenes Kompartiment beeinflusst deren Zytokinexpression, die wahrscheinlich ihre Antwort auf bestimmte Stimuli *in vitro* mitbestimmt<sup>259</sup>. Keine der angeführten Publikationen über die von Zahngeweben abgeleiteten MSK kann auf eine erfolgte chondrogene Differenzierung *in vitro* verweisen. Die gängige Methode macht von der Kultur und Differenzierung der MSK in Mikrozellmassen Gebrauch. Im Verlauf bildet sich ein sphäroides Zellpellet aus, in dem unter anderem Proteoglykane und das Kollagen II der Knorpelmatrix gebildet werden. Diese Bestandteile wurden zum einen mit Toluidinblau und zum anderen mit Hilfe eines anti-Kollagen II-Antikörpers nachgewiesen. Die angefertigten Experimente zeigten, dass die Induktion von KM-MSK sowie der Z-MSK in Chondrozyten hier erfolgreich *in vitro* durchgeführt werden kann. Unter den von verschiedenen Zahngeweben abgeleiteten MSK-Populationen differenzierten Z-MSK erstmalig chondrogen. Beide Nachweismethoden bestätigten die Ergebnisse mittels spezifischer Färbung der Proteoglykane und des Kollagen II (Abb. 5-6). Damit wird abschließend auch das dritte Minimalkriterium zur Definition von MSK von den Z-MSK erfüllt, wonach die Differenzierung in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten als Nachweis der Multipotenz erbracht werden muss<sup>31</sup>.

Erstmals wurde durch Ikeda *et al.* über die Existenz von MSK in der *Papilla dentalis* berichtet<sup>260</sup>. Dabei konnten die isolierten Zellen jedoch nur osteogen differenziert werden. In kürzlich erschienenen Publikationen wird ebenfalls die Isolation von MSK-ähnlichen Zellen aus humanen Zahnpapillen beschrieben und diese Population mit SCAP (*Stem cells from the apical papilla*) oder DPDC (*Dental papilla-derived cells*) bezeichnet<sup>261 262</sup>. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der

hier vorgestellten Experimente differenzieren SCAP zwar stark osteogen, aber nur marginal in Adipozyten. Die Differenzierung der SCAP in Chondrozyten wurde dagegen nicht gezeigt. Für DPDC ist nur die osteogene Differenzierung demonstriert worden; die adipogene und chondrogene Induktion fehlt (Tab. 6-1). Eine mögliche Erklärung für die Ursache der ausgeprägten adipogenen Differenzierung (Abb. 5-5) und der gezeigten chondrogenen Induktion (Abb. 5-6) könnte erneut die Wahl des Mediumsupplements sein. Bei allen zitierten Arbeiten wurde auf den Einsatz von 10-15% FCS entschieden. Hingegen wurden für die Experimente in dieser Arbeit das MSC-Medium mit 5% FFP und 1% TKZ supplementiert. Bei den chondrogenen Differenzierungsexperimenten wurde als Supplement nur FFP benutzt. Damit konnten Z-MSC nachweislich in alle drei nach MSC-Definition geforderten Zelltypen differenziert werden.

**Tab. 6-1: Vergleich der Plastizität von DPDC, SCAP und Z-MSC.**

	Osteoblasten	Adipozyten	Chondrozyten
DPDC	+++	-	-
SCAP	+++	+	-
Z-MSC	+++	++	+++

Als Ergänzung zu den spezifischen Färbenachweisen der unterschiedlichen Differenzierungen wurde die Expression von relevanten Markern auf Transkriptionsebene durch RT-PCR analysiert (Abb. 5-7). Bei adipogen induzierten KM-MSC und Z-MSC zeigte die Amplifikation der Transkripte von PPAR- $\gamma$  und LPL ein einheitliches Expressionsmuster, das innerhalb der Erwartungen lag. Beide Marker wurden im Verlauf der Differenzierung gesteigert exprimiert. Das Ergebnis belegt zusätzlich die Fähigkeit von KM-MSC und Z-MSC, in Adipozyten differenzieren zu können. Für osteoblastisch differenzierte KM-MSC konnten die induzierten Marker BSP und CBF $\alpha$ 1 detektiert werden. Dagegen konnte aus den differenzierten Z-MSC lediglich CBF $\alpha$ 1, aber nicht BSP amplifiziert werden. Eine denkbare Erklärung für das Ausbleiben des Amplifikats von BSP liegt in der Herkunft der verwendeten Gewebe und den daraus isolierten Z-MSC. Die extrahierten Weisheitszähne entstammen den Ober- und Unterkieferknochen, die strukturell den unregelmäßigen Knochen zugeordnet werden. Hingegen wird Knochenmark allgemein am Beckenkamm entnommen. Das Becken setzt sich aus platten Knochen zusammen. Beide Knochenarten sind anatomisch und funktionell unterschiedlich, sodass unter dem Einfluss des

---

umgebenden Knochens möglicherweise auch die Plastizität oder sogar das Transkriptionsprofil von MSC sich von denen aus anderen Arealen unterscheiden.

### 6.1.2 Expressionsanalyse von embryonalen Markern auf Zahnpapillen

Das ursprüngliche Gewebe, aus dem die Z-MSC isoliert werden konnten, sind die apikalen Zahnpapillen von Weisheitszahnwurzeln. Als kleines Gewebekissen beherbergen sie mesenchymale Stromazellen. Um herauszufinden, ob sich in den Zahnpapillen pluripotente Stammzellen befinden, wurden diese auf die Expressionen von typischen Genprodukten von ES-Zellen, wie Nanog, Nestin, Oct-4 und SSEA-4, hin untersucht. Dabei wurde SSEA-4 nur schwach, Nestin jedoch stark auf den Gewebeschnitten exprimiert gefunden. Dagegen konnte die Detektion von Nanog und Oct-4 nicht realisiert werden. Für die beiden Transkriptionsfaktoren Nanog und Oct-4 ist bekannt, dass sie zwar von undifferenzierten embryonalen Stammzellen, aber nicht von somatischen Zellen exprimiert werden<sup>251</sup>. Embryonale Stammzellen sind ebenfalls positiv für die Marker SSEA-4 und Nestin getestet worden<sup>250</sup>. Allerdings ist SSEA-4 nicht exklusiv auf ES-Zellen beschränkt, sondern wird beispielsweise auch als Marker von MSC exprimiert<sup>52 251</sup>. Nestin, ursprünglich als neuronaler Marker bekannt, wird neben embryonalen auch von einer Reihe mesodermalen Zelltypen exprimiert; so auch von MSC<sup>59 263</sup>. Daraus lässt sich zusammenfassend ableiten, dass in den Zahnpapillen keine Zellen mit Expressionsprofil von ES-Zellen für diese vier klassischen Marker gefunden werden konnten (Abb. 5-9). Auf Grund der gleichmäßigen Verteilung der Fluoreszenzsignale, insbesondere für Nestin und SSEA-4, kann auf eine hohe Dichte ein und desselben Zelltyps, faktisch den MSC, geschlossen werden. Die schwach ausgeprägten bzw. nicht vorhandenen Expressionen von SSEA-4, Oct-4 und Nanog stehen im Einklang mit dem für KM-MSC postuliertem Expressionsmuster<sup>247</sup>.

### 6.1.3 Differenzierung von KM-MSC in insulinproduzierende Inselzellen

Es sollte versucht werden, KM-MSC in insulinproduzierende Inselzellen zu differenzieren, die den  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas in ihrer Funktion ähneln. Mit einer erfolgreichen Induktion der Insulinproduktion bei *ex vivo* expandierten KM-MSC stünde hypothetisch eine Therapiemöglichkeit des juvenilen Diabetes zur Verfügung, die sich zum einen auf die immunmodulierenden Eigenschaften von MSC und zum anderen auf den Zellersatz stützt.

Die Differenzierungsstrategien wurden aus Protokollen der embryonalen Stammzellforschung entnommen und auf MSC-Kulturen übertragen<sup>248 249</sup>. Zudem konnte auf ein publiziertes Protokoll zur Differenzierung von MSC in insulinproduzierende Zellen zugegriffen werden<sup>247</sup>.

Als Differenzierungsnachweis diente die Amplifikation von *INS1*-Transkripten via RT-PCR (Abb. 5-8). Das Transdifferenzierungsereignis konnte bei keinem der durchgeführten Experimente unter unseren Kulturbedingungen beobachtet werden. Die Transkripte konnten nicht nachgewiesen werden. Trotz der detaillierten Protokolle, die erfolgreich auf embryonalen Stammzellen angewandt wurden, ließen sich KM-MSCs unter GMP-Kulturbedingungen nicht zur Insulinproduktion induzieren.

## 6.2 Therapeutisches Potenzial von KM-MSCs

Basierend auf der Fähigkeit, in Osteoblasten differenzieren zu können, sind MSC augenscheinlich gut dafür geeignet, zur Behandlung von angeborenen Knochenstoffwechselstörungen oder von erworbenen Osteonekrosen therapeutisch eingesetzt zu werden. In ersten klinischen Anwendungen konnte der Beweis erbracht werden, dass MSC tatsächlich bei Schädigungen von Knochengewebe erfolgreich verwendet werden können. Horwitz *et al.* behandelten sechs pädiatrische Patienten mit schwerer *Osteogenesis imperfecta* mit zwei Infusionen allogener mesenchymaler Stromazellen und erreichten damit bei fünf Patienten eine Beschleunigung der Wachstumsgeschwindigkeit<sup>202</sup>. Mit dem Ziel der klinischen Anwendungen von autologen MSC bei AVN-Patienten wurden zunächst die biologisch relevanten Eigenschaften genauer untersucht. Bei nekrotischen Arealen kommt es in Folge der gestörten Blutzufuhr zur Nähr- und Sauerstoffunterversorgung. Daher musste im Vorfeld der Transfusion sichergestellt sein, dass die applizierten MSC ihr Ziel erreichen und unter ischämischen Umgebungsbedingungen ihre Eigenschaften beibehalten. Dazu zählte die Aufrechterhaltung des osteogenen Differenzierungspotenzials bei Hypoxie in einem inflammatorischem Milieu. Für eine Verbesserung der Vaskularisierung nekrotischer Areale ist die Sekretion von VEGF außerordentlich wichtig. An der Regulation des Knochenmetabolismus sind wiederum IGF und IGFBP maßgeblich beteiligt. Abschließend sollte eine Aussage über die Gewährleistung der Chromosomenstabilität der expandierten MSC getroffen werden. Bei der Durchführung aller Experimente wurden expandierte MSC verwendet, die nach GMP-Bedingungen kultiviert worden sind.

### 6.2.1 Biologische Grundlagen

Der Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) *in vivo* ist von der Vaskularisierung der betrachteten Organe abhängig<sup>264</sup>. Bei Knochen wird eine Sauerstoffsättigung ( $sO_2$ ) zwischen 5% und 1% für unterschiedliche Bereiche kalkuliert<sup>265 266</sup>. Bei Frakturen wird von einer weiteren  $pO_2$ -Reduktion auf 0-2% ausgegangen<sup>267 268</sup>. Für die Untersuchung des osteogenen Differenzierungspotentials von Patienten-MSCs bei unterschiedlichem Sauerstoffpartialdruck wurden Kulturbedingungen mit

3% und 21% O<sub>2</sub>-Sättigung angelegt. Da es sich bei nekrotischen Grenzflächen um inflammatorische Bereiche handelt, wurde gleichzeitig der Einfluss von IFN $\gamma$  auf die Differenzierung in Osteoblasten *in vitro* untersucht. Es wurde gezeigt, dass weder die reduzierte O<sub>2</sub>-Sättigung von 3%, noch die Zugabe von IFN $\gamma$ , auch nicht die Kombination beider Faktoren, den Differenzierungsprozess in Osteoblasten beeinflussen (Abb. 5-10). Die Simulation einer hypoxischen und inflammatorischen Umgebung, wie sie in nekrotischen Läsionen zu erwarten ist, zeigte, dass die osteogene Differenzierbarkeit von MSC hier keiner Limitierung unterlegen war. Die Ergebnisse stehen im Gegensatz zu einigen publizierten Daten, die von einer Abschwächung der osteogenen Differenzierungskapazität von MSC bei 3% O<sub>2</sub>-Sättigung sprechen<sup>264</sup>. Andere Berichte stimmen darin überein, dass hypoxische Bedingungen auf die Differenzierung von MSC keinen Effekt haben<sup>269 270</sup>. Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe zeigen jedoch, dass die osteogene Differenzierung bei 1% O<sub>2</sub>-Sättigung stark eingeschränkt ist. Auf dieser Datengrundlage könnte auf folgendes Modell geschlossen werden: Am Randbereich einer nekrotischen Läsion ist die O<sub>2</sub>-Sättigung noch ausreichend, sodass MSC osteogen differenzieren können. Im Zentrum der Läsion ist der pO<sub>2</sub> weiter reduziert und verhindert die Differenzierung der MSC weitestgehend (Abb. 6-1). Vor diesem Hintergrund sollte die Frage beantwortet werden, ob es Faktoren gibt, die die Sauerstoffunterversorgung positiv beeinflussen könnten. So wurde die Sekretion des angiogenetisch wirkenden Faktors VEGF von MSC unter hypoxischen Bedingungen untersucht.

In diesem Experiment sollte geklärt werden, ob MSC unter Einfluss von Hypoxie und IFN $\gamma$  in der Lage sind, detektierbare Mengen VEGF zu produzieren. Dazu wurde die Konzentration von VEGF im Kulturüberstand von MSC bei 21% und 1% O<sub>2</sub>-Sättigung verglichen. Es konnten jedoch nur geringe Mengen VEGF unter atmosphärischen Bedingungen allgemein und unter hypoxischen Bedingungen in Abwesenheit von IFN $\gamma$  festgestellt werden (Abb. 5-13). Die limitierte Sekretion von VEGF steht im Einklang mit Ergebnissen, die beispielsweise von Potier *et al.* publiziert wurden<sup>271</sup>. Die Expression von VEGF unter Hypoxie resultiert dabei aus der Induktion durch HIF-1 (*Hypoxia-inducible factor 1*)<sup>272 273</sup>. Der gezeigte starke Anstieg der VEGF-Sekretion von MSC nach Zugabe von IFN $\gamma$  deutet eine synergistische Induktion in Abhängigkeit von Hypoxie und IFN $\gamma$  an. Innerhalb nekrotischer Läsionen könnte die synergistisch induzierte VEGF-Sekretion von transfundierten MSC die Neovaskularisierung des Knochendefekts regulieren und somit das verminderte Differenzierungspotential kompensieren (Abb. 6-1).

Neben VEGF sezernieren MSC unter atmosphärischen und hypoxischen Bedingungen auch IGF und IGFBP. Dies zeigten RIA-Messungen von Zellkulturüberstand (Abb. 5-14) von propagierten MSC bei O<sub>2</sub>-Sättigungen von 21% und 1%. So setzten MSC sowohl IGF-I und IGF-II als auch

ihre Bindungsproteine IGFBP-2 und -3 frei. Sie sind wichtige Schlüsselproteine bei der Regulation des Knochenmetabolismus und stimulieren die Knochenbildung<sup>274</sup>. Dabei wirken IGF sowohl als endokrine wie auch als parakrine/autokrine Faktoren<sup>275</sup>. Die Bedeutung dieser Faktoren unterstreichen Versuche im Tiermodell am Beispiel des IGFBP-2:IGF-II-Komplexes, wo gezeigt werden konnte, dass dieser Komplex zur Steigerung der Knochendichte beiträgt<sup>276</sup>. Zusammenfassend ist erneut hervorzuheben, dass VEGF die Neoangiogenese induzieren und darüber die Nähr- und Sauerstoffversorgung in den nekrotischen Bereichen ermöglichen könnte. Die Gruppe der IGF/IGFBP könnte zusätzlich die Osteoblastenproliferation stimulieren und darüber zur Neubildung von Knochensubstanz beitragen.

Für den Einsatz *ex vivo* kultivierter, autologer MSC bei einer nicht lebensbedrohlichen Komplikation wie einer steroidinduzierten Osteonekrose ist besonders darauf zu achten, dass keine erhöhten Risiken von den MSC ausgehen, wie zum Beispiel maligne Transformation durch genetische Instabilität<sup>277 278</sup>. Der Vergleich von MSC nach Kurz- und Langzeitkultur zeigte lediglich die üblichen Polymorphismen, aber keine chromosomalen Abnormalitäten (Abb. 5-15). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit vergleichbaren Analysen zur chromosomalen Stabilität von humanen MSC *in vitro*<sup>279</sup>.

### 6.2.2 Klinische Anwendung von KM-MSK bei Patienten mit AVN

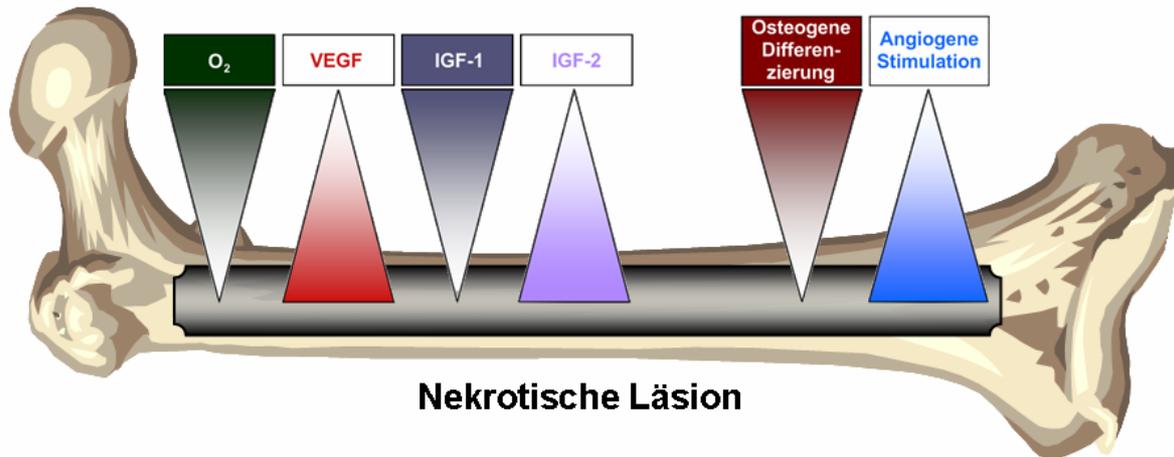
Sollen expandierte MSC zelltherapeutisch in der Klinik eingesetzt werden, dann ist die Herstellung der Zellen unter GMP-Bedingungen unabdingbar. Für die MSC-Kultur zur klinischen Anwendung ist die Herstellungserlaubnis durch das Paul-Ehrlich-Institut (241/2005V) erteilt worden.

Durch die untersuchten biologischen Eigenschaften könnten MSC zur Behandlung von Osteonekrosen zusätzliche, unterstützende Effekte beitragen, die eine Regeneration des nekrotischen Knochengewebes begünstigen. In der Vergangenheit konnte bereits in einem experimentellen Rattenmodell gezeigt werden, dass *ex vivo* expandierte mesenchymale Stromazellen klinisch signifikant Knochendefekte regenerieren konnten<sup>222</sup>. Erstmals behandelten Horwitz *et al.* erfolgreich sechs pädiatrische Patienten mit schwerer *Osteogenesis imperfecta* durch die Anwendung allogener MSC nach HSCT<sup>202</sup>. Des Weiteren konnten einem Fetus mit intrauterin diagnostizierter schwerer *Osteogenesis imperfecta* HLA-disparate, fetale MSC *in utero* transplantiert werden<sup>226</sup>. Bei beiden Anwendungen konnte sowohl die Verträglichkeit als auch ein Knochenwachstum erzielt werden.

Auf diesen Beobachtungen basierend sollte durch lokale Applikation autologer MSC die Effizienz der Knochenregeneration verbessert werden. In einer Reihe von Einzelheilversuchen wurden fünf Patienten mit steroidinduzierter AVN durch Instillation von *ex vivo* expandierten, autologen MSC behandelt. Die Anwendungen fanden nach konventionellen *Core Decompression* statt und dienten vorrangig zur Überprüfung von Verträglichkeit und Sicherheit des Transplantats. Bei einem mittleren *Follow-up* von nun mehr 29 Monaten (24-38 Monate) konnte bei keinem der behandelten Patienten eine klinische Verschlechterung festgestellt werden. Zusätzlich konnte Schmerz reduziert und die Beweglichkeit zunehmend verbessert werden. In wieweit sich der therapeutische Erfolg beim Einsatz von MSC in Folge der *Core Decompression* von der alleinigen Durchführung der konventionellen Behandlungsmethode unterscheidet, muss zukünftig an größeren Patientenkollektiven im Vergleich evaluiert werden. Hierfür sind Studien der Phase II notwendig.

Die vermuteten Mechanismen, über die die Effekte vermittelt werden könnten, setzen sich wahrscheinlich aus der Sekretion von Faktoren wie VEGF und IGF, die Geweberekonstruktion modulieren können und dem osteogenen Differenzierungspotenzials der verabreichten MSC zusammen. In der Summe gehen diese beiden Effekte womöglich auch auf die Tatsache zurück, dass die MSC lokal angewendet wurden. In einem Fall der behandelten AVN-Patienten konnte der Verlauf der Therapie über MRT- und CT-Aufnahmen dokumentiert werden (Abb. 5-16). Hier zeigte sich erst im Randbereich der nekrotischen Höhle eine postoperative Reaktion und zu späterem Zeitpunkt zusätzlich sogar eine mögliche Regeneration des Knochendefekts durch Kalzifizierung. Diese Beobachtung kann durchaus als Ergebnis des gemeinsamen Wirkens beider vermuteter Effekte gedeutet werden.

In Zusammenfassung aller untersuchten biologischen Eigenschaften und der beobachteten klinischen Resultate ergibt sich folgendes theoretisches Modell für die beteiligten Faktoren und Ereignisse bei der avaskulären Osteonekrose (Abb. 6-1).



**Abb. 6-1: Modell der beteiligten Faktoren und Ereignisse bei avaskulärer Osteonekrose.** Osteonekrotische Läsionen werden als hypoxische und inflammatorische Areale betrachtet. Innerhalb der nekrotischen Höhle nimmt der  $pO_2$  zum Zentrum hin ab. So existiert in der Randzone noch Sauerstoff und die osteogene Differenzierungskapazität ist uneingeschränkt. Mit der  $O_2$ -Sättigung nimmt dann auch die Differenzierbarkeit der MSC ab. Im Zentrum besitzt die Sekretion angiogenetischer Faktoren wie VEGF einen bedeutenden Einfluss auf den Regenerationsprozess. VEGF stimuliert die Neovaskularisierung der nekrotischen Läsion. Gleichzeitig werden von den injizierten MSC IGF-I und IGF-II sezerniert, die zur Knochenbildung beitragen.

Die Fähigkeit der MSC, in Osteoblasten differenzieren zu können, und die Möglichkeit ihrer Anwendung zur Knochenregeneration macht sie auch für den Einsatz bei geschädigten oder zerstörten Kieferknochen auf dem Gebiet der Zahnchirurgie attraktiv. Die Verwendung von dreidimensionalen Gerüsten, die mit KM-MSK besiedelt wurden, gewährleistet nicht nur den lokalen Verbleib der Zellen, sondern würde auch den Anforderungen des Kieferknochens entsprechen, früh postoperativ mechanischen Belastungen standzuhalten. Aus diesem Grund wurden erste Versuche für eine dreidimensional Kultur und Expansion von KM-MSK auf Kalziumphosphat-, Kollagen- und OPLA-*Scaffolds* unternommen. Diese zeigten ein erfolgreiches Anwachsen der KM-MSK auf den *Scaffolds* aus Kollagen und OPLA (Abb. 5-17). In diesem Zusammenhang existieren gleichfalls Berichte über weitere *Scaffolds*, die alternativ für die Verwendung mit MSC benutzt worden sind. Dabei kamen verschiedene Materialien zum Einsatz: *Scaffolds* aus synthetischen Polymere und natürlichen resorbierbaren Materialien (Gelantine, Kollagen, Koralle) sowie Keramik-*Scaffolds* (Hydroxyapatit/ $\beta$ -Trikalziumphosphat, Silikon)<sup>280-284</sup>. Weiterführend sind Daten aus *in vitro* Untersuchungen zur osteogenen Differenzierung von humanen MSC auf einigen dieser *Scaffolds* publiziert worden<sup>285-286</sup>. Dabei wurden dreidimensional kultivierte MSC auch auf Kollagen- und Polymer-*Scaffolds* osteogen differenziert. In Bezug auf das osteogene Differenzierungspotenzial von KM-MSK und der Eignung der in dieser Arbeit verwendeten *Scaffolds* - auf Grund der hohen Stabilität insbesondere der OPLA-Gerüste - werden hier genauere Analysen benötigt. Erste Anwendungen von autologen MSC auf verschiedenen

*Scaffolds* zur Rekonstruktion von Knochengewebe allgemein und speziell des Kiefers wurden bereits in einzelnen Tiermodellen erprobt<sup>281 287 288</sup>. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass nicht selbst heilende Segmentdefekte der langen Knochen bei Schafen durch Transplantation von MSC/Korallen-*Scaffolds* repariert wurden<sup>281</sup>. Zur Behandlung von Kieferknochendefekten wurden in einem experimentellen Kaninchenmodell MSC/*Scaffolds* in die defekten Mandibeln platziert<sup>288</sup>. Dabei konnte sowohl die Verträglichkeit als auch die Neubildung des Kieferknochens viel versprechend demonstriert werden. In Hinsicht auf die Anwendung der KM-*MSC/Scaffolds* für die Rekonstruktion von Kieferknochen beim Mensch sind weitere Untersuchungen auch im Bereich der GMP-konformen Herstellung der möglichen Transplantate notwendig.

### 6.3 Migration und Homing von mesenchymalen Stromazellen

Mit der systemischen Applikation von MSC konnte mehrfach unabhängig beschrieben werden, dass MSC durchaus in der Lage sind, in verschiedene geschädigte Gewebe zu migrieren und dort ein *Engraftment* zeigen<sup>228 230</sup>. Es gibt auch Berichte darüber, dass im Zuge der Migration auch Endothelzellschichten von MSC überwunden wurden<sup>231 232</sup>. Die Extravasation der MSC aus den Blutgefäßen beruht auf der Expression von verschiedenen Integrinen und der Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren. Insbesondere über die Integrinbindung VCAM-1/VLA-4 sind MSC nach Ruster *et al.* dazu fähig, mit Endothelzellen zu interagieren und ein koordiniertes Rollen an ihnen auszuführen<sup>142</sup>. Der Mechanismus, der dem *Homing* zu Grunde liegt, wird mit der Diapedese von Lymphozyten oder Monozyten verglichen. Darüber können MSC in unterschiedliche Organe extravadiieren<sup>235</sup>.

Die Beobachtung, dass MSC nach systemischer Transfusion verschiedene geschädigte Organe erreichen, konnte an auch einem seltenen klinischen Fall nachvollzogen werden. Bei einem Patienten mit DNA-Ligase IV-Defekt sind nach Transplantation von HSC eines HLA-identen Fremdspenders und der Entwicklung einer schweren akuten Darm-GvHD Grad IV nachfolgend zweimal MSC des Vaters transfundiert worden. Nach kompliziertem Krankheitsverlaufs verstirbt der Patient zwei Wochen nach der letzten MSC-Gabe. Mit der Obduktion wurden Gewebeproben von einer Reihe, meist entzündlicher Organe entnommen und sowohl DNA zur Verwendung für Chimärismusanalysen isoliert als auch histologische Gewebeschnitte angefertigt. Nachdem die Chimärismusanalyse via STR-PCR kein eindeutiges Ergebnis hinsichtlich der Unterscheidung zwischen dem *Engraftment* von transplantierten HSC und MSC lieferte, wurden die Gewebeschnitten von Leber, Lunge, Lymphknoten, Gehirn, Dick- und Dünndarm immunhistologisch aufgearbeitet. Unter Verwendung eines HLA-spezifischen Antikörpers konnte gezeigt werden, dass die haploidenten MSC ausschließlich in den inflammatorischen

Gewebe (Darm und Leber) wieder zu finden waren, nicht aber in anderen Geweben wie Lunge und Lymphknoten. Die Leber zeigte dabei das höchste *Engraftment* bezüglich der paternalen MSC. Die Bearbeitung der Gewebeschnitte des Gehirns gestaltete sich gegenüber allen anderen Geweben schwierig. So zeigten verschiedene eingesetzte HLA-IgM-Antikörper das Problem von nicht spezifischen Bindungen. Diese Problematik begründet sich vermutlich zum einen auf der Tatsache, dass das Gehirngewebe alleinig in Paraffin eingebettet wurde, zum anderen auf die eingeschränkte Wahl des Antikörperisotyps. Beides könnte die Bindung dadurch verhindern, dass der Antikörper auf Grund seiner Pentamerstruktur und die Art der Gewebeeinbettung methodisch nicht kompatibel sind.

Über die Gründe, warum MSC dieses bestimmte Verteilungsmuster über die gesamten Organe zeigen und weshalb sie bevorzugt in inflammatorische Gewebe migrieren, lässt sich nur spekulieren. In Experimenten mit radioaktiv markierten, intravenös injizierten MSC in Ratten wurde demonstriert, dass diese erst in die Lunge und später dann in Leber, Nieren, Milz und Knochen gelangten<sup>227</sup>. Ringden *et al.* schlussfolgerten aus ihren Beobachtungen bei GvHD-Patienten die Präferenz von infundierten MSC, in das Kolon zu migrieren<sup>206</sup>. Durch Detektion mit Hilfe der FISH-Methode konnten Le Blanc *et al.* zeigen, dass der Anteil der engrafteten weiblichen Spenderzellen im Kolonepithelium eines männlichen Empfängers bei 4% lag<sup>203</sup>. In keinen anderen Geweben konnten in diesem Zusammenhang weitere Spenderzellen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Detektion von Spender-MSK wurden über eine andere Methode, die erstmalig für diese Fragestellung angewendet worden war, erzielt. Dabei wurde hinsichtlich der Lokalisation demonstriert, wie die existierende HLA-Disparität zwischen dem väterlichem MSC-Spender und dem Empfänger durch die Wahl des anti-HLA-Antikörpers methodisch genutzt werden kann. Darüber hinaus eignet sich diese Detektionsmethode zusätzlich dafür, eine mögliche Differenzierung *in situ* nachzuweisen.

Eine Hierarchie der Migration in die einzelnen Organe lässt sich allerdings aus den vorliegenden Daten nicht ableiten. Vielmehr erscheint die Tatsache offensichtlich, dass die inflammatorischen Signale, die von den betroffenen Organen ausgehen, für die Rekrutierung der MSC verantwortlich sind. Die gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen, auch auf Grund der Aktivität von IFN $\gamma$ , könnte das Migrationsverhalten der MSC verstärken. Für die sehr geringen prozentualen Anteile engrafteter MSC, beispielsweise im Dick- und Dünndarm, könnte womöglich auch eine Abstoßung der Zellen verantwortlich sein. Unter Umständen spielt die vergangene Zeit nach der letzten Transfusion der MSC eine entscheidende Rolle. Bei einer anderen klinischen Anwendung von MSC - hier das Beispiel der Behandlung von therapieresistenter GvHD - konnten die Spenderzellen nach drei Wochen beim Vergleich zweier

unterschiedlicher Empfänger nur einmal detektiert werden<sup>206</sup>. Für den Verlust der Proliferationsfähigkeit von MSC nach intravenöser Applikation sind entgegen anders lautenden Berichten keine konkreten Beweise ersichtlich<sup>226</sup>. Ein letzter Grund für die Schwierigkeit der Detektion der transfundierten MSC liegt eventuell auch bei den vorhandenen technischen Problemen solch stark durch die GvHD veränderte, lytische Gewebe zu bearbeiten.

Die detektierten, prozentual niedrigen Spenderanteile in den Geweben von Leber und Darm stehen im Kontext mit entsprechenden Beobachtungen an Transplantationsmodellen von Maus und Mensch<sup>203 236</sup>. Hier lag zum einen das anteilige *Engraftment* der syngen transplantierten Maus-MSK in den untersuchten, gesunden Organen bei rund 5%<sup>236</sup>. Zum anderen konnten humane, haploident transplantierte MSC bislang nur im Kolonepithel eines GvHD-Patienten wieder gefunden werden<sup>203</sup>. So bleibt abschließend festzuhalten, dass bei dem beschriebenen Fall der Transfusion von haploidenten MSC zur Behandlung schwerer akuter Darm-GvHD erstmals die Migration von Spenderzellen in verschiedene inflammatorische Empfängerorgane mittels spezifischem anti-HLA-A01-Antikörper histologisch gezeigt werden konnte.

Da der Osteotropismus von infundierten MSC allgemein als gering beschrieben wird, wurden weitere Experimente darauf ausgerichtet, die Migration von MSC *in vivo* zu verbessern<sup>227 237</sup>. Die zelluläre Rekrutierung von MSC in den Knochen findet in speziellen Markgefäßen statt, die konstitutiv E-Selektin exprimieren<sup>238 239</sup>. E-Selektine erkennen sialofucosylierte Determinanten ihrer verschiedenen Liganden. Selektine besitzen wichtige Aufgaben beim Mechanismus der Gewebewanderung. Die Expression von E-, L- oder P-Selektin auf MSC konnte bislang nicht gezeigt werden<sup>14 54</sup>. Es gibt jedoch Berichte darüber, dass eine native Glykoform des Typ 1 Transmembranglycoprotein CD44 auf MSC zu finden ist<sup>240</sup>. Sackstein *et al.* zeigten, dass CD44 eine  $\alpha$ -2,3-sialyl-Modifikation trägt, die mittels  $\alpha$ -1,3-Fucosyltransferase in einen E-Selektin/L-Selektin-Ligand konvertiert werden konnte. Die modifizierte Form des CD44 besaß in diesen Experimenten einen gesteigerten Tropismus in Knochen.

Um eine Behandlung von Knochendefekten wie Osteonekrosen durch Applikation von MSC auch systemisch realisieren zu können, muss der Osteotropismus gesteigert werden. Die Möglichkeit wird nun durch verschiedene Methoden der Glykanmodifikation bei MSC geboten. Mit der abgeschlossenen Herstellung eines retroviralen Transfektionsplasmids, das mit der kodierenden Sequenz der  $\alpha$ -1,3-Fucosyltransferase VI ausgestattet ist (Abb. 5-20 und Abb. 5-21), lässt sich durch Fucosylierung von CD44 die Sialyl-Lewis X, ein E-Selektin-Ligand, auf MSC synthetisieren. Hierfür sollen zukünftig Feederzellen mit dem Plasmid transfiziert werden, die als Resultat FUT6 konstitutiv exprimieren und in den Kulturüberstand freisetzen. In Co-Kultur

könnte dann durch Konjugation von Fukose an ein *N*-Acetyl-Laktosamin (Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc) die Synthese von Sialyl-Lewis X auf MSC stattfinden.

Gelingt es durch die gezielte Modifikation von CD44 das terminale Tetrasaccharid Sialyl-Lewis X (NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-4)G[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc( $\beta$ 1-R)) als potenziellen E-Selektin-Ligand auf MSC zu synthetisieren, könnte es in Folge dessen zu einer Steigerung des Osteotropismus von MSC kommen. Die Migration und Infiltration von MSC in Knochen würde eventuell auch dann effektiv sein, wenn die Expression von Sialyl-Lewis X auf der Zelloberfläche nur transient etabliert wäre und CD44 unter Umständen in seine native Glykoform rückgebildet werden würde<sup>240</sup>. Dieser experimentelle Ansatz bietet somit das Potenzial, glykanmodifizierte MSC bei regenerativen Therapien zum Beispiel bei skelettalen Erkrankungen einzusetzen. Insbesondere könnten somit Erkrankungen wie *Osteogenesis imperfecta* oder Osteonekrosen womöglich durch die systemische Applikation der modifizierten MSC behandelt werden. Zusätzlichen Behandlungserfolg verspricht in diesem Zusammenhang auch die Beobachtung bei Primaten, dass E-Selektin von ischämischen und inflammatorischen Geweben konstitutiv gebildet wird<sup>289</sup>.

#### 6.4 Bewertung der Versuche und Ausblick

Die Differenzierungsfähigkeit von humanen multipotenten mesenchymalen Stromazellen zusammen mit den immunsuppressiven und sekretorischen Eigenschaften bietet das Potential für den Einsatz in regenerationsmedizinischen und anderen klinischen Therapien, zum Beispiel bei der Behandlung von Knochendefekten oder GvHD.

In dieser Arbeit wurden Ergebnisse zur lokalen, therapeutischen Anwendung von MSC bei einer kleinen Kohorte von fünf Patienten mit avaskulären Osteonekrosen vorgestellt. Dabei konnten erste Behandlungserfolge radiologisch aufgezeigt werden. Zusätzliche Verlaufskontrollen bei allen behandelten Patienten sind erstrebenswert. Bislang blieb in diesem Zusammenhang die Frage unbeantwortet, inwieweit die beginnende Rekonstruktion des Knochens der Instillation der MSC zuzuschreiben ist. Hierfür würde bei gleichzeitiger konventioneller Behandlung der Vergleich mit und ohne MSC-Applikation sicher aufschlussreich sein. Zukünftig sollen weitere Anwendungen bei größeren Patientenkollektiven stattfinden, auch um eine Aussage über die Signifikanz der Effekte treffen zu können. Die im Vorfeld der klinischen Anwendung durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass der angiogenetische Faktor VEGF, IGF und ihre Bindungsproteine unterschiedliche Funktionen bei der Neovaskularisierung und bei der Knochenneubildung ausüben könnten. Über das vermutete Zusammenspiel der einzelnen Mechanismen konnte ein erstes Modell formuliert werden. Der Einfluss weiterer Faktoren und die Anpassung der MSC an die therapeutischen Umgebungsbedingungen bleiben allerdings noch offen.

Die Arbeit konnte ebenfalls Ergebnisse darüber liefern, welche Organe ein *Engraftment* von MSC nach systemischer Applikation bei GvHD zeigen. Erstmals wurde auf der Basis der HLA-Disparität die Detektion der Spenderzellen demonstriert. Es konnten MSC in den inflammatorischen Geweben von Leber und Darm gefunden werden. Nach Überwindung der technischen Schwierigkeiten sollte nun versucht werden, diese Methode weiter zu optimieren, um andere Gewebe, in denen MSC vermutet werden, zuverlässig zu untersuchen.

In Hinsicht auf die Verbesserung der Migrationseigenschaften von MSC sind hier zusätzlich Versuche vorgestellt worden, die die Grundlage für viel versprechende Experimente zur Glykanmodifikation darstellen. Dabei stehen umfangreiche Funktionsanalysen, retrovirale Transfektionen von Feederzellen und Co-Kulturversuche mit MSC aus. Die angestrebte Synthese von Sialyl-Lewis X auf MSC durch Fucosylierung von CD44 soll zur Steigerung des Osteotropismus beitragen. Das osteogene Differenzierungspotenzial der MSC liegt auch im Zusammenhang mit der Regeneration von nicht selbständig heilenden Knochendefekten, beispielsweise im Kiefer, im Fokus. Ein vielfach untersuchter Aspekt ist hierbei der Einsatz von stabilen *Scaffolds* als Implantat, auf denen zuvor MSC ausgesät worden sind. Als mögliche Quelle für die Gewinnung geeigneter Zellen könnten die in dieser Arbeit beschriebenen Zahnpapillen dienen, die MSC beherbergen. Ein entscheidender Vorteil könnte daraus entstehen, dass die MSC aus einem Bereich isoliert worden sind, der anatomisch mit dem Zielgewebe verbunden ist und womöglich durch den Einfluss der Umgebung bereits einigen Anforderungen bezüglich Differenzierung und Proteinexpression entspricht.

Die beschriebenen Eigenschaften und Effekte von MSC bieten insgesamt eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeit, die sowohl lokal wie auch systemisch zukünftig realisiert werden könnten.

## Referenzen

1. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;6(2):230-47.
2. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976;4(5):267-74.
3. Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 1988;10:63-76.
4. Owen ME, Cave J, Joyner CJ. Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of marrow CFU-F. *J Cell Sci* 1987;87 (Pt 5):731-8.
5. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 1988;136:42-60.
6. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991;9(5):641-50.
7. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276(5309):71-4.
8. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Müller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7(5):393-5.
9. Müller I, Kordowich S, Holzwarth C, Spano C, Isensee G, Staiber A, et al. Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy* 2006;8(5):437-444.
10. Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004;22(4):625-34.
11. Horn P, Bork S, Diehlmann A, Walenda T, Eckstein V, Ho A, et al. Isolation of human mesenchymal stromal cells is more efficient by red blood cell lysis. *Cytotherapy* 2008;10(7):676 - 685.
12. Ahrens N, Tormin A, Paulus M, Roosterman D, Salama A, Krenn V, et al. Mesenchymal stem cell content of human vertebral bone marrow. *Transplantation* 2004;78(6):925-9.
13. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284(5411):143-7.
14. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004;95(1):9-20.

- 
15. in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* 2003;88(8):845-52.
  16. Miao Z, Jin J, Chen L, Zhu J, Huang W, Zhao J, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int* 2006;30(9):681-687.
  17. Roubelakis MG, Pappa KI, Bitsika V, Zagoura D, Vlahou A, Papadaki HA, et al. Molecular and Proteomic Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Amniotic Fluid: Comparison to Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev* 2007;16(6):931-952.
  18. Lee OK, Kuo TK, Chen W-M, Lee K-D, Hsieh S-L, Chen T-H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004;103(5):1669-1675.
  19. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001;44(8):1928-1942.
  20. Yanez R, Lamana ML, Garcia-Castro J, Colmenero I, Ramirez M, Bueren JA. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* 2006;24(11):2582-91.
  21. Mouiseddine M, Mathieu N, Stefani J, Demarquay C, Bertho J-M. Characterization and Histological Localization of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in the Human Postnatal Thymus. *Stem Cells Dev* 2007;0(0):1-10.
  22. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 2003;18(4):696-704.
  23. Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Mark Bartold P, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;364(9429):149-155.
  24. Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol* 2005;24(2):155-165.
  25. Carrancio S, López-Holgado N, Sánchez-Guijo FM, Villarón E, Barbado V, Tabera S, et al. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp Hematol* 2008;36(8):1014-1021.
  26. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991;78(1):55-62.
-

- 
27. Deschaseaux F, Gindraux F, Saadi R, Obert L, Chalmers D, Herve P. Direct selection of human bone marrow mesenchymal stem cells using an anti-CD49a antibody reveals their CD45<sup>med,low</sup> phenotype. *Br J Haematol* 2003;122(3):506-517.
  28. Kuci S, Wessels JT, Bühring H-J, Schilbach K, Schumm M, Seitz G, et al. Identification of a novel class of human adherent CD34- stem cells that give rise to SCID-repopulating cells. *Blood* 2003;101(3):869-876.
  29. Battula VL, Treml S, Abele H, Bühring HJ. Prospective isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human placenta using a frizzled-9-specific monoclonal antibody. *Differentiation* 2008;76(4):326-36.
  30. Vogel W, Grunebach F, Messam C, Kanz L, Brugger W, Bühring H. Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica* 2003;88(2):126-133.
  31. Dominici M, Le Blanc K, Müller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7.
  32. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* 1976;47:327-359.
  33. Perkins S, Fleischman R. Stromal cell progeny of murine bone marrow fibroblast colony-forming units are clonal endothelial-like cells that express collagen IV and laminin. *Blood* 1990;75(3):620-625.
  34. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(14):7841-5.
  35. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(7):3213-3218.
  36. Battula VL, Treml S, Bareiss PM, Gieseke F, Roelofs H, de Zwart P, et al. Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1 (MSCA-1). *Haematologica* 2009;94(2):173-184.
  37. Dennis JE, Carbillet J-P, Caplan A, Charbord P. The STRO-1+ Marrow Cell Population Is Multipotential. *Cells Tissues Organs* 2002;170(2-3):73-82.
  38. Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, et al. Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process. *PLoS ONE* 2008;3(5):e2213.
-

- 
39. Waller E, Olweus J, Lund-Johansen F, Huang S, Nguyen M, Guo G, et al. The "common stem cell" hypothesis reevaluated: human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. *Blood* 1995;85(9):2422-2435.
  40. Dominici M, Pritchard C, Garlits JE, Hofmann TJ, Persons DA, Horwitz EM. Hematopoietic cells and osteoblasts are derived from a common marrow progenitor after bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(32):11761-11766.
  41. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000;28(8):875-84.
  42. Gronthos S, Simmons P. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood* 1995;85(4):929-940.
  43. Gronthos S, Simmons PJ. The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors. *J Hematother* 1996;5(1):15-23.
  44. Simmons PJ, Torok-Storb B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood* 1991;78(11):2848-53.
  45. Deschaseaux F, Charbord P. Human marrow stromal precursors are alpha 1 integrin subunit-positive. *J Cell Physiol* 2000;184(3):319-325.
  46. Stewart K, Monk P, Walsh S, Jefferiss CM, Letchford J, Beresford JN. STRO-1, HOP-26 (CD63), CD49a and SB-10 (CD166) as markers of primitive human marrow stromal cells and their more differentiated progeny: a comparative investigation in vitro. *Cell Tissue Res* 2003;313(3):281-90.
  47. Sorrentino A, Ferracin M, Castelli G, Biffoni M, Tomaselli G, Baiocchi M, et al. Isolation and characterization of CD146<sup>+</sup> multipotent mesenchymal stromal cells. *Exp Hematol* 2008;36(8):1035-1046.
  48. Joyner CJ, Bennett A, Triffitt JT. Identification and enrichment of human osteoprogenitor cells by using differentiation stage-specific monoclonal antibodies. *Bone* 1997;21(1):1-6.
  49. Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ, Jaiswal N, Zaia J, et al. Mesenchymal Stem Cell Surface Antigen SB-10 Corresponds to Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule and Is Involved in Osteogenic Differentiation. *J Bone Miner Res* 1998;13(4):655-663.
  50. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Deliliers GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol* 2002;30(7):783-91.
-

- 
51. Martinez C, Hofmann TJ, Marino R, Dominici M, Horwitz EM. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. *Blood* 2007;109(10):4245-8.
  52. Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* 2007;109(4):1743-51.
  53. Bühring HJ, Battula VL, Treml S, Schewe B, Kanz L, Vogel W. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1106:262-71.
  54. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci* 2003;10(2):228-41.
  55. Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW, et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci* 2005;12(1):47-57.
  56. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003;75(3):389-97.
  57. Clark EA, Ledbetter JA. How B and T cells talk to each other. *Nature* 1994;367(6462):425-428.
  58. Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol* 2007;28(5):219-26.
  59. Phinney DG, Prockop DJ. Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair Current Views. *Stem Cells* 2007;25(11):2896-2902.
  60. Tuli R, Seghatoleslami MR, Tuli S, Wang ML, Hozack WJ, Manner PA, et al. A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. *Mol Biotechnol* 2003;23(1):37-49.
  61. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7(2):211-28.
  62. Bi Y, Ehrlichou D, Kilts TM, Inkson CA, Embree MC, Sonoyama W, et al. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med* 2007;13(10):1219-27.
  63. Huang TF, Chen YT, Yang TH, Chen LL, Chiou SH, Tsai TH, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human anterior cruciate ligament. *Cytotherapy* 2008:1-9.

- 
64. Ringe J, Leinhase I, Stich S, Loch A, Neumann K, Haisch A, et al. Human mastoid periosteum-derived stem cells: promising candidates for skeletal tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2008;2(2-3):136-46.
  65. Wagner W, Ho AD. Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev* 2007;3(4):239-48.
  66. Xu YB, Ke CN, Qi SH, Li TZ, Huang B, Xie JL, et al. Isolation and differentiation characteristics of dermal multipotent stem cells from humans of different ages cultured in vitro. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi* 2007;23(1):62-5.
  67. Williams IV JT, Southerland SS, Souza J, Calcutt AF, Cartledge RG. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg* 1999;65(1):22-26.
  68. Polisetty N, Fatima A, Madhira SL, Sangwan VS, Vemuganti GK. Mesenchymal cells from limbal stroma of human eye. *Mol Vis* 2008;14:431-42.
  69. De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, Luyten FP. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol* 2003;160(6):909-18.
  70. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 2004;22(7):1338-45.
  71. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006;119(Pt 11):2204-13.
  72. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *J Dent Res* 2002;81(8):531-535.
  73. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(10):5807-5812.
  74. Morotomi T, Kawano S, Toyono T, Kitamura C, Terashita M, Uchida T, et al. In vitro differentiation of dental epithelial progenitor cells through epithelial-mesenchymal interactions. *Arch Oral Biol* 2005;50(8):695-705.
  75. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(25):13625-13630.
  76. Trubiani O, Di Primio R, Traini T, Pizzicannella J, Scarano A, Piattelli A, et al. Morphological and cytofluorimetric analysis of adult mesenchymal stem cells expanded ex vivo from periodontal ligament. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2005;18(2):213-21.
  77. Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, et al. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 2006;41(4):303-10.
-

- 
78. Hashimoto J, Kariya Y, Miyazaki K. Regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by laminin-5 (laminin-332). *Stem Cells* 2006;24(11):2346-54.
  79. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 1992;13(1):81-8.
  80. Goodwin HS, Bicknese AR, Chien S-N, Bogucki BD, Oliver DA, Quinn CO, et al. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001;7(11):581-588.
  81. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 2000;113(7):1161-1166.
  82. Jeong JA, Gang EJ, Hong SH, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, et al. Rapid neural differentiation of human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Neuroreport* 2004;15(11):1731-4.
  83. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418(6893):41-9.
  84. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284(5417):1168-70.
  85. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002;109(10):1291-302.
  86. Togel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289(1):F31-42.
  87. Morigi M, Imberti B, Zoja C, Corna D, Tomasoni S, Abbate M, et al. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(7):1794-804.
  88. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410(6829):701-5.
  89. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Fonsato V, Romanazzi GM, Camussi G. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med* 2004;14(6):1035-41.

- 
90. Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002;416(6880):542-545.
  91. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004;116(5):639-48.
  92. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004;428(6983):668-73.
  93. Lemischka I. A few thoughts about the plasticity of stem cells. *Exp Hematol* 2002;30(8):848-852.
  94. Ying Q-L, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002;416(6880):545-548.
  95. Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/SCID mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(46):17438-43.
  96. Gerdoni E, Gallo B, Casazza S, Musio S, Bonanni I, Pedemonte E, et al. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol* 2007;61(3):219-27.
  97. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2008;8(9):726-736.
  98. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006;98(5):1076-84.
  99. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* 1996;166(3):585-92.
  100. Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 2004;104(12):3581-7.
  101. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003;362(9385):697-703.
  102. Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res* 2003;73(6):778-86.

- 
103. Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 2003;9(9):1195-201.
  104. Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48(12):3464-74.
  105. Iso Y, Spees JL, Serrano C, Bakondi B, Pochampally R, Song YH, et al. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354(3):700-6.
  106. Kunter U, Rong S, Djuric Z, Boor P, Muller-Newen G, Yu D, et al. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(8):2202-12.
  107. Parekkadan B, van Poll D, Megeed Z, Kobayashi N, Tilles AW, Berthiaume F, et al. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;363(2):247-252.
  108. Wulf GG, Viereck V, Hemmerlein B, Haase D, Vehmeyer K, Pukrop T, et al. Mesengenic progenitor cells derived from human placenta. *Tissue Eng* 2004;10(7-8):1136-47.
  109. Maitra B, Szekely E, Gjini K, Laughlin MJ, Dennis J, Haynesworth SE, et al. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant* 2004;33(6):597-604.
  110. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 2006;36(10):2566-73.
  111. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005;105(7):2821-7.
  112. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006;107(1):367-72.
  113. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation* 2007;83(1):71-6.
  114. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 2006;107(4):1484-90.
  115. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003;101(9):3722-9.
-

- 
116. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105(4):1815-22.
117. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005;105(10):4120-6.
118. Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 2003;76(8):1208-13.
119. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 2003;57(1):11-20.
120. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002;99(10):3838-43.
121. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol* 2005;35(5):1482-90.
122. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for interferon- $\gamma$  in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24(2):386-98.
123. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, et al. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 1996;14(1):619-648.
124. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001;19(1):197-223.
125. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 2006;24(1):74-85.
126. Plumas J, Chaperot L, Richard MJ, Molens JP, Bensa JC, Favrot MC. Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. *Leukemia* 2005;19(9):1597-604.
127. Potian JA, Aviv H, Ponzio NM, Harrison JS, Rameshwar P. Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. *J Immunol* 2003;171(7):3426-34.
-

- 
128. Batten P, Sarathchandra P, Antoniw JW, Tay SS, Lowdell MW, Taylor PM, et al. Human mesenchymal stem cells induce T cell anergy and downregulate T cell allo-responses via the TH2 pathway: relevance to tissue engineering human heart valves. *Tissue Eng* 2006;12(8):2263-73.
  129. Ramasamy R, Tong CK, Seow HF, Vidyadaran S, Dazzi F. The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. *Cell Immunol* 2008;251(2):131-6.
  130. Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003;102(10):3837-44.
  131. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 2007;109(1):228-34.
  132. Silva WA, Jr, Covas DT, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Siufi JL, Zanette DL, et al. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2003;21(6):661-9.
  133. Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res* 2005;305(1):33-41.
  134. Gotherstrom C, West A, Liden J, Uzunel M, Lahesmaa R, Le Blanc K. Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Haematologica* 2005;90(8):1017-26.
  135. Shimizu Y, van Seventer GA, Horgan KJ, Shaw, S. Roles of Adhesion Molecules in T-Cell Recognition: Fundamental Similarities between Four Integrins on Resting Human T-Cells (LFA-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6) in Expression, Binding, and Costimulation. *Immunol Rev* 1990;114(1):109-143.
  136. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69(1):11-25.
  137. Meredith J, Jr, Fazeli B, Schwartz M. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* 1993;4(9):953-961.
  138. Miyake K, Weissman IL, Greenberger JS, Kincade PW. Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis. *J Exp Med* 1991;173(3):599-607.

- 
139. Salomon DR, Crisa L, Mojcik CF, Ishii JK, Klier G, Shevach EM. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed by cortical thymic epithelial cells and mediates thymocyte adhesion. Implications for the function of alpha 4 beta 1 (VLA4) integrin in T-cell development. *Blood* 1997;89(7):2461-71.
  140. Haraldsen G, Kvale D, Lien B, Farstad IN, Brandtzaeg P. Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells. *J Immunol* 1996;156(7):2558-65.
  141. Stagg J. Immune regulation by mesenchymal stem cells: two sides to the coin. *Tissue Antigens* 2007;69(1):1-9.
  142. Ruster B, Gottig S, Ludwig RJ, Bistrrian R, Muller S, Seifried E, et al. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood* 2006;108(12):3938-44.
  143. Ben-Baruch A. Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions. *Breast Cancer Res* 2003;5(1):31-6.
  144. Hasebe T, Sasaki S, Imoto S, Ochiai A. Highly proliferative fibroblasts forming fibrotic focus govern metastasis of invasive ductal carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 2001;14(4):325-37.
  145. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986;315(26):1650-9.
  146. Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther* 2008;15(10):730-8.
  147. Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN, et al. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(21):1593-603.
  148. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004;4(7):540-50.
  149. Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells as Vehicles for Interferon- $\beta$  Delivery into Tumors. *Cancer Res* 2002;62(13):3603-3608.
  150. Winner M, Koong AC, Rendon BE, Zundel W, Mitchell RA. Amplification of tumor hypoxic responses by macrophage migration inhibitory factor-dependent hypoxia-inducible factor stabilization. *Cancer Res* 2007;67(1):186-93.

- 
151. Müller I, Vaegler M, Holzwarth C, Tzaribatchev N, Pfister SM, Schutt B, et al. Secretion of angiogenic proteins by human multipotent mesenchymal stromal cells and their clinical potential in the treatment of avascular osteonecrosis. *Leukemia* 2008;22(11):2054-2061.
  152. Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, et al. Gastric Cancer Originating from Bone Marrow-Derived Cells. *Science* 2004;306(5701):1568-1571.
  153. Ramasamy R, Lam EW, Soeiro I, Tisato V, Bonnet D, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia* 2007;21(2):304-10.
  154. Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, Hu J, et al. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol* 2006;80(3):267-74.
  155. Maestroni GJM, Hertens E, Galli P. Factor(s) from nonmacrophage bone marrow stromal cells inhibit Lewis lung carcinoma and B16 melanoma growth in mice. *Cell Mol Life Sci* 1999;55(4):663-667.
  156. Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, Tsuda H, et al. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther* 2004;11(14):1155-1164.
  157. Ohlsson LB, Varas L, Kjellman C, Edvardsen K, Lindvall M. Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix. *Exp Mol Pathol* 2003;75(3):248-255.
  158. Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, Rovira, II, et al. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* 2006;203(5):1235-47.
  159. Stagg J, Lejeune L, Paquin A, Galipeau J. Marrow stromal cells for interleukin-2 delivery in cancer immunotherapy. *Hum Gene Ther* 2004;15(6):597-608.
  160. Kyriakou CA, Yong KL, Benjamin R, Pizzey A, Dogan A, Singh N, et al. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) expressing truncated soluble vascular endothelial growth factor receptor (tsFlk-1) following lentiviral-mediated gene transfer inhibit growth of Burkitt's lymphoma in a murine model. *J Gene Med* 2006;8(3):253-64.
  161. Lin P, Sankar S, Shan S, Dewhirst M, Polverini P, Quinn T, et al. Inhibition of tumor growth by targeting tumor endothelium using a soluble vascular endothelial growth factor receptor. *Cell Growth Differ* 1998;9(1):49-58.
  162. Ren C, Kumar S, Chanda D, Chen J, Mountz JD, Ponnazhagan S. Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells Producing Interferon- $\alpha$  in a Mouse Melanoma Lung Metastasis Model. *Stem Cells* 2008;26(9):2332-2338.

- 
163. Ren C, Kumar S, Chanda D, Kallman L, Chen J, Mountz JD, et al. Cancer gene therapy using mesenchymal stem cells expressing interferon- $\beta$  in a mouse prostate cancer lung metastasis model. *Gene Ther* 2008;15(21):1446-1453.
164. Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J, et al. Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Gliomas. *Cancer Res* 2005;65(8):3307-3318.
165. Ries C, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M, Neth P. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood* 2007;109(9):4055-4063.
166. Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, Mercurio A, Melzi R, Giordano T, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood* 2005;106(2):419-27.
167. Pevsner-Fischer M, Morad V, Cohen-Sfady M, Rousso-Noori L, Zanin-Zhorov A, Cohen S, et al. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood* 2007;109(4):1422-1432.
168. Munoz JR, Stoutenger BR, Robinson AP, Spees JL, Prockop DJ. Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(50):18171-18176.
169. Neuss S, Becher E, Woltje M, Tietze L, Jahnen-Dechent W. Functional Expression of HGF and HGF Receptor/c-met in Adult Human Mesenchymal Stem Cells Suggests a Role in Cell Mobilization, Tissue Repair, and Wound Healing. *Stem Cells* 2004;22(3):405-414.
170. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(14):8407-8411.
171. Koç ON, Peters C, Aubourg P, Raghavan S, Dyhouse S, DeGasperi R, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Exp Hematol* 1999;27(11):1675-1681.
172. Müller I, Kustermann-Kuhn B, Holzwarth C, Isensee G, Vaegler M, Harzer K, et al. In vitro analysis of multipotent mesenchymal stromal cells as potential cellular therapeutics in neurometabolic diseases in pediatric patients. *Exp Hematol* 2006;34(10):1413-1419.
173. Ringden O, Groth CG, Erikson A, Backman L, Granqvist S, Mansson JE, et al. Long-term follow-up of the first successful bone marrow transplantation in Gaucher disease. *Transplantation* 1988;46(1):66-70.
-

- 
174. Krivit W, Shapiro EG, Peters C, Wagner JE, Cornu G, Kurtzberg J, et al. Hematopoietic Stem-Cell Transplantation in Globoid-Cell Leukodystrophy. *N Engl J Med* 1998;338(16):1119-1127.
175. Peters C, Shapiro EG, Anderson J, Henslee-Downey PJ, Klemperer MR, Cowan MJ, et al. Hurler Syndrome: II. Outcome of HLA-Genotypically Identical Sibling and HLA-Haploidentical Related Donor Bone Marrow Transplantation in Fifty-Four Children. *Blood* 1998;91(7):2601-2608.
176. Krivit W, Pierpont M, Ayaz K, Tsai M, Ramsay N, Kersey J, et al. Bone-marrow transplantation in the Maroteaux-Lamy syndrome (mucopolysaccharidosis type VI). Biochemical and clinical status 24 months after transplantation. *N Engl J Med* 1984;311(25):1606-1611.
177. Krivit W, Lipton ME, Lockman LA, Tsai M, Dyck PJ, Smith S, et al. Prevention of deterioration in metachromatic leukodystrophy by bone marrow transplantation. *Am J Med Sci* 1987;294(2):80-5.
178. Koç ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant* 2002;30(4):215-22.
179. van Laar JM, Tyndall A. Adult stem cells in the treatment of autoimmune diseases. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45(10):1187-93.
180. Deng W, Han Q, Liao L, You S, Deng H, Zhao RCH. Effects of Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on T and B Lymphocytes from BXSb Mice. *DNA Cell Biol* 2005;24(7):458-463.
181. Djouad F, Fritz V, Apparailly F, Louis-Plence P, Bony P, Sany J, et al. Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52(5):1595-1603.
182. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56(4):1175-1186.
183. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005;106(5):1755-1761.
184. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007;110(10):3499-506.
-

- 
185. Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, Remberger M, Sundberg B, Arvidson J, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2007;21(8):1733-8.
  186. Barrett AJ, Le Blanc K. Prophylaxis of acute GVHD: manipulate the graft or the environment? *Best Pract Res Clin Haematol* 2008;21(2):165-76.
  187. Buck D, Moshous D, de Chasseval R, Ma Y, le Deist F, Cavazzana-Calvo M, et al. Severe combined immunodeficiency and microcephaly in siblings with hypomorphic mutations in DNA ligase IV. *Eur J Immunol* 2006;36(1):224-35.
  188. Enders A, Fisch P, Schwarz K, Duffner U, Pannicke U, Nikolopoulos E, et al. A severe form of human combined immunodeficiency due to mutations in DNA ligase IV. *J Immunol* 2006;176(8):5060-8.
  189. Gruhn B, Seidel J, Zintl F, Varon R, Tonnie H, Neitzel H, et al. Successful bone marrow transplantation in a patient with DNA ligase IV deficiency and bone marrow failure. *Orphanet J Rare Dis* 2007;2:5.
  190. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002;30(1):42-8.
  191. Bai L, Caplan A, Lennon D, Miller R. Human Mesenchymal Stem Cells Signals Regulate Neural Stem Cell Fate. *Neurochem Res* 2007;32(2):353-362.
  192. Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EG, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* 2006;108(6):2114-20.
  193. Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AB, Deans R, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000;6(11):1282-1286.
  194. Almeida-Porada G, Zanjani ED. A large animal noninjury model for study of human stem cell plasticity. *Blood Cells Mol Dis* 2004;32(1):77-81.
  195. Zhang J, Li Y, Chen J, Cui Y, Lu M, Elias SB, et al. Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. *Exp Neurol* 2005;195(1):16-26.
  196. Urban VS, Kiss J, Kovacs J, Gocza E, Vas V, Monostori E, et al. Mesenchymal Stem Cells Cooperate with Bone Marrow Cells in Therapy of Diabetes. *Stem Cells* 2008;26(1):244-253.

- 
197. Chung NG, Jeong DC, Park SJ, Choi BO, Cho B, Kim HK, et al. Cotransplantation of marrow stromal cells may prevent lethal graft-versus-host disease in major histocompatibility complex mismatched murine hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* 2004;80(4):370-6.
  198. Tisato V, Naresh K, Girdlestone J, Navarrete C, Dazzi F. Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leukemia* 2007;21(9):1992-9.
  199. Sudres M, Norol F, Trenado A, Gregoire S, Charlotte F, Levacher B, et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Suppress Lymphocyte Proliferation In Vitro but Fail to Prevent Graft-versus-Host Disease in Mice. *J Immunol* 2006;176(12):7761-7767.
  200. Le Blanc K, Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med* 2007;262(5):509-25.
  201. Koç ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000;18(2):307-16.
  202. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WKK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(13):8932-8937.
  203. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;363(9419):1439-41.
  204. Le Blanc K. Mesenchymal stromal cells: tissue repair and immune modulation. *Cytotherapy* 2006;8(6):559-61.
  205. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999;5(3):309-13.
  206. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnie H, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 2006;81(10):1390-7.
  207. Müller I, Kordowich S, Holzwarth C, Isensee G, Lang P, Neunhoffer F, et al. Application of multipotent mesenchymal stromal cells in pediatric patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 2008;40(1):25-32.

- 
208. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008;371(9624):1579-1586.
209. Silience DO, Rimoin DL, Danks DM. Clinical variability in osteogenesis imperfecta-variable expressivity or genetic heterogeneity. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1979;15(5B):113-29.
210. Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD, et al. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood* 2001;97(5):1227-31.
211. Burger B, Beier R, Zimmermann M, Beck JD, Reiter A, Schrappe M. Osteonecrosis: a treatment related toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL)--experiences from trial ALL-BFM 95. *Pediatr Blood Cancer* 2005;44(3):220-5.
212. Adekile AD, Gupta R, Yacoub F, Sinan T, Al-Bloushi M, Haider MZ. Avascular Necrosis of the Hip in Children with Sickle Cell Disease and High Hb F: Magnetic Resonance Imaging Findings and Influence of  $\alpha$ -Thalassemia Trait. *Acta Haematol* 2001;105(1):27-31.
213. Karimova EJ, Rai SN, Deng X, Ingle DJ, Ralph AC, Neel MD, et al. MRI of Knee Osteonecrosis in Children with Leukemia and Lymphoma: Part 1, Observer Agreement. *Am J Roentgenol* 2006;186(2):470-476.
214. Karimova EJ, Rai SN, Ingle D, Ralph AC, Deng X, Neel MD, et al. MRI of Knee Osteonecrosis in Children with Leukemia and Lymphoma: Part 2, Clinical and Imaging Patterns. *Am J Roentgenol* 2006;186(2):477-482.
215. Strauss AJ, Su JT, Dalton VMK, Gelber RD, Sallan SE, Silverman LB. Bony Morbidity in Children Treated for Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol* 2001;19(12):3066-3072.
216. Beltran J, Knight C, Zuelzer W, Morgan J, Shwendeman L, Chandnani V, et al. Core decompression for avascular necrosis of the femoral head: correlation between long-term results and preoperative MR staging. *Radiology* 1990;175(2):533-536.
217. Low K, Mont M, Hungerford D. Steroid-associated osteonecrosis of the knee: a comprehensive review. *Instr Course Lect* 2001;50:489-93.
218. Simank H-G, Brocai DRC, Strauch K, Lukoschek M. Core decompression in osteonecrosis of the femoral head: risk-factor-dependent outcome evaluation using survivorship analysis. *Int Orthop* 1999;23(3):154-159.
219. Hernigou P, Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clin Orthop Relat Res* 2002(405):14-23.
220. Gangji V, Hauzeur J-P, Matos C, De Maertelaer V, Toungouz M, Lambermont M. Treatment of Osteonecrosis of the Femoral Head with Implantation of Autologous Bone-Marrow Cells. A Pilot Study. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86(6):1153-1160.
-

- 
221. Yan ZQ, Chen YS, Li WJ, Yang Y, Huo JZ, Chen ZR, et al. Treatment of osteonecrosis of the femoral head by percutaneous decompression and autologous bone marrow mononuclear cell infusion. *Chin J Traumatol* 2006;9(1):3-7.
222. Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1998;16(2):155-62.
223. Ikeguchi R, Kakinoki R, Aoyama T, Shibata KR, Otsuka S, Fukiage K, et al. Regeneration of osteonecrosis of canine scapho-lunate using bone marrow stromal cells: possible therapeutic approach for Kienbock disease. *Cell Transplant* 2006;15(5):411-22.
224. Takahashi Y, Yamamoto M, Tabata Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and  $\beta$ -tricalcium phosphate. *Biomaterials* 2005;26(17):3587-3596.
225. Wang Z, Goh J, Das De S, Ge Z, Ouyang H, Chong JS, et al. Efficacy of bone marrow-derived stem cells in strengthening osteoporotic bone in a rabbit model. *Tissue Eng* 2006;12(7):1753-61.
226. Le Blanc K, Gotherstrom C, Ringden O, Hassan M, McMahon R, Horwitz E, et al. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation* 2005;79(11):1607-14.
227. Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The Dynamic in vivo Distribution of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells after Infusion. *Cells Tissues Organs* 2001;169(1):12-20.
228. Parr AM, Tator CH, Keating A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow Transplant* 2007;40(7):609-19.
229. Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 2002;59(4):514-23.
230. Airey JA, Almeida-Porada G, Colletti EJ, Porada CD, Chamberlain J, Movsesian M, et al. Human Mesenchymal Stem Cells Form Purkinje Fibers in Fetal Sheep Heart. *Circulation* 2004;109(11):1401-1407.
231. Schmidt A, Ladage D, Steingen C, Brixius K, Schinkothe T, Klinz FJ, et al. Mesenchymal stem cells transmigrate over the endothelial barrier. *Eur J Cell Biol* 2006;85(11):1179-88.
232. De Becker A, Van Hummelen P, Bakkus M, Vande Broek I, De Wever J, De Waele M, et al. Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Haematologica* 2007;92(4):440-9.
-

- 
233. Rombouts WJ, Ploemacher RE. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* 2003;17(1):160-70.
234. Simmons PJ, Levesque J-P, Zannettino ACW. Adhesion molecules in haemopoiesis. *Baillieres Clin Haematol* 1997;10(3):485-505.
235. Steingen C, Brenig F, Baumgartner L, Schmidt J, Schmidt A, Bloch W. Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44(6):1072-84.
236. Kumar S, Ponnazhagan S. Bone homing of mesenchymal stem cells by ectopic alpha 4 integrin expression. *FASEB J* 2007;21(14):3917-27.
237. Jin-Xiang F, Xiaofeng S, Jun-Chuan Q, Yan G, Xue-Guang Z. Homing efficiency and hematopoietic reconstitution of bone marrow-derived stroma cells expanded by recombinant human macrophage-colony stimulating factor in vitro. *Exp Hematol* 2004;32(12):1204-11.
238. Sipkins DA, Wei X, Wu JW, Runnels JM, Cote D, Means TK, et al. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature* 2005;435(7044):969-73.
239. Schweitzer KM, Drager AM, van der Valk P, Thijsen SF, Zevenbergen A, Theijssmeijer AP, et al. Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues. *Am J Pathol* 1996;148(1):165-75.
240. Sackstein R, Merzaban JS, Cain DW, Dagia NM, Spencer JA, Lin CP, et al. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nat Med* 2008;14(2):181-7.
241. Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2(6):473-488.
242. Lesley J, Hyman R, Kincade PW. CD44 and Its Interaction with Extracellular Matrix. *Advances in Immunology*. In: Dixon FJ, editor. *CD44 and Its Interaction with Extracellular Matrix*. *Advances in Immunology*. Volume 54 ed: Academic Press, 1993:271-335.
243. Hayer S, Steiner G, Gortz B, Reiter E, Tohidast-Akrad M, Amling M, et al. CD44 is a determinant of inflammatory bone loss. *J Exp Med* 2005;201(6):903-914.
244. Lawler M, Humphries P, McCann SR. Evaluation of mixed chimerism by in vitro amplification of dinucleotide repeat sequences using the polymerase chain reaction. *Blood* 1991;77(11):2504-14.
245. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(12):5463-7.
-

- 
246. Trump BF, Smuckler EA, Benditt EP. A method for staining epoxy sections for light microscopy. *J Ultrastruct Res* 1961;5(4):343-348.
247. Battula VL, Bareiss PM, Treml S, Conrad S, Albert I, Hojak S, et al. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation* 2007;75(4):279-91.
248. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of Embryonic Stem Cells to Insulin-Secreting Structures Similar to Pancreatic Islets. *Science* 2001;292(5520):1389-1394.
249. Blyszczuk P, Asbrand C, Rozzo A, Kania G, St-Onge L, Rupnik M, et al. Embryonic stem cells differentiate into insulin-producing cells without selection of nestin-expressing cells. *Int J Dev Biol* 2004;48(10):1095-104.
250. Busch C, Oppitz M, Wehrmann M, Schweizer P, Drews U. Immunohistochemical localization of nanog and Oct4 in stem cell compartments of human sacrococcygeal teratomas. *Histopathology* 2008;52(6):717-730.
251. Clark AT, Rodriguez RT, Bodnar MS, Abeyta MJ, Cedars MI, Turek PJ, et al. Human STELLAR, NANOG, and GDF3 Genes Are Expressed in Pluripotent Cells and Map to Chromosome 12p13, a Hotspot for Teratocarcinoma. *Stem Cells* 2004;22(2):169-179.
252. Scharstuhl A, Schewe B, Benz K, Gaissmaier C, Bühring HJ, Stoop R. Chondrogenic potential of human adult mesenchymal stem cells is independent of age or osteoarthritis etiology. *Stem Cells* 2007;25(12):3244-51.
253. Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2006;312(12):2169-79.
254. Le Blanc K, Ringdén O. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol* 2006;18(5):586-591.
255. in 't Anker PS, Noort WA, Kruisselbrink AB, Scherjon SA, Beekhuizen W, Willemze R, et al. Nonexpanded primary lung and bone marrow-derived mesenchymal cells promote the engraftment of umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2003;31(10):881-9.
256. Giovannini S, Brehm W, Mainil-Varlet P, Nestic D. Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells. *Differentiation* 2008;76(2):118-129.
257. Lange C, Cakiroglu F, Spiess AN, Cappallo-Obermann H, Dierlamm J, Zander AR. Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. *J Cell Physiol* 2007;213(1):18-26.
-

- 
258. Koyama N, Okubo Y, Nakao K, Bessho K. Evaluation of Pluripotency in Human Dental Pulp Cells. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67(3):501-506.
259. Shur I, Lokiec F, Bleiberg I, Benayahu D. Differential gene expression of cultured human osteoblasts. *J Cell Biochem* 2001;83(4):547-553.
260. Ikeda E, Hirose M, Kotobuki N, Shimaoka H, Tadokoro M, Maeda M, et al. Osteogenic differentiation of human dental papilla mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342(4):1257-1262.
261. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the Apical Papilla and Its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth: A Pilot Study. *J Endod* 2008;34(2):166-171.
262. Park B-W, Hah Y-S, Choi M-J, Ryu Y-M, Lee S-G, Kim DR, et al. In Vitro Osteogenic Differentiation of Cultured Human Dental Papilla-Derived Cells. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67(3):507-514.
263. Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Massy M, Mortier C, Delforge A, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 2004;72(7):319-326.
264. Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitingner S, Kloss F, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell* 2007;6(6):745-57.
265. Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. Modeling pO<sub>2</sub> distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J* 2001;81(2):685-96.
266. Antoniou ES, Sund S, Homsy EN, Challenger LF, Rameshwar P. A theoretical simulation of hematopoietic stem cells during oxygen fluctuations: prediction of bone marrow responses during hemorrhagic shock. *Shock* 2004;22(5):415-22.
267. Heppenstall RB, Grislis G, Hunt TK. Tissue gas tensions and oxygen consumption in healing bone defects. *Clin Orthop Relat Res* 1975(106):357-65.
268. Knighton DR, Silver IA, Hunt TK. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery* 1981;90(2):262-70.
269. Ren H, Cao Y, Zhao Q, Li J, Zhou C, Liao L, et al. Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;347(1):12-21.
270. Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B, Ma T. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J Cell Physiol* 2006;207(2):331-9.
-

- 
271. Potier E, Ferreira E, Andriamanalijaona R, Pujol J-P, Oudina K, Logeart-Avramoglou D, et al. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone* 2007;40(4):1078-1087.
272. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996;16(9):4604-13.
273. Okuyama H, Krishnamachary B, Zhou YF, Nagasawa H, Bosch-Marce M, Semenza GL. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 in Bone Marrow-derived Mesenchymal Cells Is Dependent on Hypoxia-inducible Factor 1. *J Biol Chem* 2006;281(22):15554-15563.
274. Boudignon BM, Bikle DD, Kurimoto P, Elalieh H, Nishida S, Wang Y, et al. Insulin-like growth factor I stimulates recovery of bone lost after a period of skeletal unloading. *J Appl Physiol* 2007;103(1):125-131.
275. Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev* 2001;22(1):53-74.
276. Conover CA, Johnstone EW, Turner RT, Evans GL, John Ballard FJ, Doran PM, et al. Subcutaneous administration of insulin-like growth factor (IGF)-II/IGF binding protein-2 complex stimulates bone formation and prevents loss of bone mineral density in a rat model of disuse osteoporosis. *Growth Horm IGF Res* 2002;12(3):178-83.
277. Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V, et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells* 2006;24(4):1095-103.
278. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005;65(8):3035-9.
279. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, et al. Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Do Not Undergo Transformation after Long-term In vitro Culture and Do Not Exhibit Telomere Maintenance Mechanisms. *Cancer Res* 2007;67(19):9142-9149.
280. Kanczler JM, Ginty PJ, Barry JJA, Clarke NMP, Howdle SM, Shakesheff KM, et al. The effect of mesenchymal populations and vascular endothelial growth factor delivered from biodegradable polymer scaffolds on bone formation. *Biomaterials* 2008;29(12):1892-1900.
281. Viateau V, Guillemain G, Bousson V, Oudina K, Hannouche D, Sedel L, et al. Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: A study on sheep. *J Orthop Res* 2007;25(6):741-749.
-

- 
282. Farrell E, O'Brien FJ, Doyle P, Fischer J, Yannas I, Harley BA, et al. A Collagen-glycosaminoglycan Scaffold Supports Adult Rat Mesenchymal Stem Cell Differentiation Along Osteogenic and Chondrogenic Routes. *Tissue Eng* 2006;12(3):459-468.
283. Mastrogiacomo M, Corsi A, Francioso E, Comite MD, Monetti F, Scaglione S, et al. Reconstruction of Extensive Long Bone Defects in Sheep Using Resorbable Bioceramics Based on Silicon Stabilized Tricalcium Phosphate. *Tissue Eng* 2006;12(5):1261-1273.
284. Mankani MH, Kuznetsov SA, Wolfe RM, Marshall GW, Robey PG. In Vivo Bone Formation by Human Bone Marrow Stromal Cells: Reconstruction of the Mouse Calvarium and Mandible. *Stem Cells* 2006;24(9):2140-2149.
285. Salvadè A, Belotti D, Donzelli E, D'Amico G, Gaipa G, Renoldi G, et al. GMP-grade preparation of biomimetic scaffolds with osteo-differentiated autologous mesenchymal stromal cells for the treatment of alveolar bone resorption in periodontal disease. *Cytotherapy* 2007;9(5):427-438.
286. Jäger M, Feser T, Denck H, Krauspe R. Proliferation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Cultured onto Three Different Polymers In Vitro. *Ann Biomed Eng* 2005;33(10):1319-1332.
287. Jafarian M, Eslaminejad MB, Khojasteh A, Mashhadi Abbas F, Dehghan MM, Hassanizadeh R, et al. Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105(5):e14-e24.
288. Guo H, Su J, Wei J, Kong H, Liu C. Biocompatibility and osteogenicity of degradable Ca-deficient hydroxyapatite scaffolds from calcium phosphate cement for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 2009;5(1):268-278.
289. Yao L, Setiadi H, Xia L, Laszik Z, Taylor FB, McEver RP. Divergent inducible expression of P-selectin and E-selectin in mice and primates. *Blood* 1999;94(11):3820-8.

## Publikationen

Müller I, Kustermann-Kuhn B, Holzwarth C, Isensee G, Vaegler M, Harzer K, *et al.*

In vitro analysis of multipotent mesenchymal stromal cells as potential cellular therapeutics in neurometabolic diseases in pediatric patients. *Exp Hematol* 2006;34(10):1413-1419.

Müller I, Vaegler M, Holzwarth C, Tzaribatchev N, Pfister SM, Schutt B, *et al.*

Secretion of angiogenic proteins by human multipotent mesenchymal stromal cells and their clinical potential in the treatment of avascular osteonecrosis. *Leukemia* 2008;22(11):2054-2061.

Tzaribachev N, Vaegler M, Schaefer J, Reize P, Rudert M, Handgretinger R, *et al.*

Mesenchymal stromal cells: a novel treatment option for steroid-induced avascular osteonecrosis. *Isr Med Assoc J* 2008;10(3):232-4.

Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, Pfister SM, Handgretinger R, Kerst G, Müller I.

Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *submitted* 2009

## Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt Dipl.-Biochem. PD Dr. med. Ingo Müller, der mir die Möglichkeit gab, Teil seiner Arbeitsgruppe zu werden und damit an stets interessanten und spannenden Projekten mitarbeiten zu können. Seine fortwährenden und beeindruckenden Ideen, seine wissenschaftlichen Anregungen und sein herausragendes Engagement haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danke für die angenehme Betreuung und den persönlichen Rat auch außerhalb von Labor und Klinik!

Der Stiftung des Fördervereins für krebskranke Kinder Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. Hans-Werner Stahl möchte ich für die ganzzeitliche Förderung durch ein Stipendium im besonderen Maß danken. Diese Arbeit wäre ohne ihre unbürokratische und direkte finanzielle Unterstützung sicher so nicht möglich gewesen.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee und Prof. Dr. Rupert Handgretinger für die kontinuierliche Betreuung und die Begutachtung dieser Arbeit.

Mein herzlichster Dank richtet sich an Nicola Glöckle und Philipp Maass. Ihr habt mir auf unschätzbare Art und Weise durch euer Zuhören, unsere Gespräche und die gemeinsame Zeit immer wieder Energie und Balance gegeben! Viele Dank auch für die zahlreichen fachlichen Diskussionen, die Mühe und die persönliche Unterstützung, die zu jeder Zeit ein wichtiger Teil dieser Arbeit waren.

Großer Dank gilt ausdrücklich meinen Laborkollegen, mit denen ich langjährig, zwischenzeitlich oder seit kurzem in sehr netter, umgänglicher und hilfsbereiter Atmosphäre arbeiten durfte. Euch allen danke ich für die herzliche Zusammenarbeit und den unkomplizierten Umgang: Friederike Gieseke, Nadja Fischer, Markus Haug, Susanne Viebahn, Philippa Mang, Inga Gondesen, Luciana Dannecker, Claudia Treuner, Maria Pechan, sowie Sandra Kordowich, Christina Holzwarth, Gesa Isensee, Pascal-David Johann und Anne Kruchen, Annika Erbacher, Andreas Hunczek, Daniela Schwörer, Susanne Haufe. Darüber hinaus möchte ich mich bei Karin Schilbach, Maya Andre, Ursula Holzer, Michaela Döhring und Nikolay Tzaribachev für die stets freundlichen Begegnungen in den Laboren bedanken.

Unseren Kooperationspartnern möchte ich ebenfalls für die funktionierende Zusammenarbeit danken: Prof. Dr. Dr. S. Reinert und Dr. Dr. D. Gülicher vom Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (ZZMK) Tübingen für die dauerhafte Bereitstellung des Zahnmaterials; Prof. Dr. F. Fend und Dr. S. Schott von der Allgemeinen Pathologie des UKT für die Hilfe bei der histologischen Bearbeitung von Gewebeschnitten.

Besonderer Dank richtet sich an meine Mutter und Großmutter, die mich jederzeit mit ihrem Herzen begleitet und durch ihre Fürsorge bedingungslos unterstützt und damit Kraft gegeben haben. Vielen lieben Dank!