Aus dem Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin der Universität Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Northoff

Kardiomyogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard Karls Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Georg Siegel

aus

Nürtingen

2011

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Northoff
2. Berichterstatter:	Professor Dr. M. Gawaz

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung - 1 -

1.1 Das Menschliche Herz - 1 -

1.1.1 Entwicklung und Anatomie - 1 -

1.1.2 Myokardinfarkt und Zelltherapeutische Ansätze - 2 -

1.1.3 Kardiale Markergene - 5 -

1.1.3.1 Aktin - 5 -

1.1.3.2 Myosin - 5 -

1.1.3.3 Troponin - 6 -

1.2 Mesenchymale Stammzellen (MSCs) - 7 -

1.2.1 Geschichte, Definition und Charakterisierung von MSCs - 7 -

1.2.2 Plastizität von Stammzellen und MSCs - 9 -

1.2.3 Regulation der Stammzellpotenz - 11 -

1.2.4 Parakrine Eigenschaften von MSCs - 12 -

1.2.5 Immunologische Eigenschaften von MSCs - 13 -

1.2.6 Klinische Anwendung von MSCs - 14 -

1.3 Kardiale Anwendung von MSCs - 17 -

1.3.1 Kardiomyogene Differenzierung von MSCs - 17 -

1.3.2 Kardiale Applikation von MSCs - 19 -

1.4 Fragestellung und Ziele der vorliegenden Arbeit - 21 -

2 Materialien - 23 -

2.1 Geräte - 23 -

2.2 Verbrauchsmaterialien - 23 -

2.3 Medien und Additiva - 24 -

2.4 Sonstige Chemikalien, Reagenzien und Kits - 25 -

2.5 Software - 27 -

3 Methoden - 28 -

3.1 Zellkultur - 28 -

3.1.1 Isolation von MSCs aus dem Knochenmark - 28 -

3.1.2 Kultur der MSCs - 29 -

3.1.3 Passagieren - 30 -

3.1.3.1 Ablösen der adhärenten MSCs - 30 -

3.1.3.2 Zellzahlbestimmung - 31 -

3.1.3.3 Aussaat der MSCs - 31 -

3.1.4 Kryokonservierung von MSCs - 32 -

3.1.5 Einfrieren von MSCs zur RNA-Isolation - 33 -

3.1.6 Differenzierungen und Färbungen der MSCs zum Nachweis der Multipotenz - 33 -

3.1.6.1 Adipogene Differenzierung und Oil-Red-O-Färbung - 33 -

3.1.6.2 Osteogene Differenzierung und Nachweis der alkalischen Phosphatase - 35 -

3.1.6.3 Chondrogene Differenzierung und Nachweis saurer Glykosaminoglykane - 36 -

3.1.7 Kardiomyogene Differenzierungsprotokolle - 37 -

3.1.7.1 5-Azacytidin - 38 -

3.1.7.2 Noggin - 38 -

3.1.7.3 Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) und Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) - 38 -

3.1.7.4 Dimethylsulfoxid (DMSO) - 39 -

3.1.7.5 Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) - 39 -

3.1.7.6 Insulin, Transferrin, Ascorbat und Dexamethason (ITAD) - 40 -

3.2 Molekularbiologie - 40 -

3.2.1 RNA-Isolation - 40 -
3.2.1.1 Grundlagen der RNA-Isolation - 40 -
3.2.1.2 Durchführung der RNA-Isolation - 41 -
3.2.2 Reverse Transkription - 43 -
3.2.2.1 Grundlagen der reversen Transkription - 43 -
3.2.2.2 Durchführung der reversen Transkription - 43 -
3.2.3 Quantitative Real-time-PCR - 44 -
3.2.3.1 Grundlagen der PCR - 44 -
3.2.3.2 Quantitative RT-PCR und Detektionsformate - 47 -
3.2.3.3 Theorie der PCR-Quantifizierung - 48 -
3.2.3.4 Auswahl der Primer - 49 -
3.2.3.5 Der LightCycler - 50 -
3.2.3.6 Protokoll der SYBR Green I-basierten PCRs - 51 -
3.2.3.7 Protokoll der TaqMan-basierten PCRs - 53 -
3.2.4 Gelelektrophorese - 54 -
3.2.5 Herstellung der externen Standards für die TaqMan-PCRs - 55 -
3.2.5.1 Herstellung der Standards mittels QIAEX II Gel Extraction Kits - 56 -
3.2.6 Erstellung der Regressionsgeraden für die TaqMan-PCRs - 57 -
3.2.7 PCR-Quantifizierung, Auswertung und Statistik - 57 -
3.2.7.1 Berechnung von Genexpressionen - 58 -
3.2.7.2 Berechnung der Geninduktionen - 58 -
4 Ergebnisse - 59 -
4.1 Charakterisierung der MSCs - 59 -
4.1.1 Zellmorphologie der der untersuchten MSC-Populationen im Verlauf der Langzeitkultur - 59 -

4.1.2 Adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung: Nachweis mittels Färbung _____ - 60 -

4.1.3 Adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung: Nachweis mittels quantitativer RT-PCR _____ - 62 -

4.1.4 Flusszytometrische Antigenexpressionsanalyse _____ - 65 -

4.2 Etablierung der TaqMan-basierten PCRs für kardiale Marker____ - 65 -

4.2.1 Gelelektrophorese zum Nachweis der PCR-Spezifität _____ - 65 -

4.2.2 Sensitivität und Linearität der TaqMan-basierten PCRs _____ - 66 -

4.2.3 Effizienz der TaqMan-PCR-Assays _____ - 67 -

4.3 Etablierung der SYBR Green I-basierten PCRs _____ - 68 -

4.3.1 Spezifität der SYBR Green I-basierten Ansätze _____ - 68 -

4.3.2 Effizienz der SYBR Green I-basierten Ansätze _____ - 69 -

4.4 Zellmorphologie und Proliferation unter kardiomyogener Differenzierung _____ - 69 -

4.4.1 Zellmorphologie unter kardiomyogener Differenzierung _____ - 69 -

4.4.2 Zellproliferation unter kardiomyogener Differenzierung _____ - 70 -

4.5 Expression kardialer Marker durch undifferenzierte und differenzierte MSCs _____ - 71 -

4.5.1 Konstitutive Expression kardialer Marker durch undifferenzierte MSCs _____ - 71 -

4.5.1.1 Konstitutive Expression von Troponin I _____ - 71 -

4.5.1.2 Konstitutive Expression von kardialem Aktin _____ - 72 -

4.5.1.3 Konstitutive Expression von Myosinleichtketten_____ - 72 -

4.5.2 Regulation der kardiomyogenen Marker unter Differenzierung - 73 -

4.5.2.1 5-Azacytidin _____ - 73 -

4.5.2.2 Noggin _____ - 74 -

4.5.2.3 FGF2 + BMP2 _____ - 75 -

4.5.2.4 DMSO _____ - 75 -

4.5.2.5 PDGF+ FGF2 + VEGF _____ - 76 -

4.5.2.6 Insulin, Transferrin, Ascorbat und Dexamethason (ITAD) - 77 -

4.6 Expression Multipotenz-assoziierter Transkriptionsfaktoren durch MSCs _____ - 78 -

4.6.1 Konstitutive Expression Stammzell-assoziierter Transkriptionsfaktoren durch undifferenzierten MSCs _____ - 78 -

4.6.2 Oct-4 und Nanog unter adipogener und osteogener Differenzierung _____ - 79 -

4.6.3 Regulation der Expression von Oct-4 und Nanog in Abhängigkeit eines möglichen kardiomyogenen Differenzierungsstatus ___ - 80 -

5 Disskusion _____ - 82 -

5.1 Grundcharakterisierung der verwendeten MSCs _____ - 84 -

5.2 Aspekte der RT-PCR_____ - 86 -

5.3 Kardiomyogene Differenzierung von MSCs _____ - 87 -

5.4 Expression Multipotenz-assoziierter Faktoren durch MSCs _____ - 93 -

5.5 Zusammenfassung, Bewertung und Ausblick _____ - 95 -

6 Literaturverzeichnis _____ - 97 -

7 Anhang _____ - 117 -

7.1 Abbildungsverzeichnis_____ - 117 -

7.2 Tabellenverzeichnis_____ - 118 -

7.3 Abkürzungsverzeichnis _____ - 119 -

8 Danksagung _____ - 121 -

9 Lebenslauf _____ - 122 -

1 Einleitung

1.1 Das Menschliche Herz

1.1.1 Entwicklung und Anatomie

Das menschliche Herz hat die grundlegende Aufgabe, die Blutzirkulation im Körper aufrecht zu erhalten. Die Organogenese des Herzens beginnt bereits in der 3. Woche der embryonalen Entwicklung im sogenannten *Mesoderma cardiogenicum*, an der Grenze zwischen extra- und intraembryonalem Mesoderm. Dabei bildet sich zunächst der sogenannte Herzschlauch, aus welchem durch mehrere komplexe Faltungen erste Vorläufer des späteren Kammer- und Gefäßsystems entstehen. Am 23. Tag der Embryonalentwicklung beginnen erste peristaltische Kontraktionen und damit Pumpbewegungen den Herzschlauch zu durchlaufen, ab der 5. Woche ist eine wirksame Blutzirkulation im Embryo nachweisbar[1]. Diese frühe embryonale Entwicklung des Herzens wird über ein komplexes Netzwerk aus Wachstums- und Transkriptionsfaktoren gesteuert. Zunächst werden durch Mitglieder der FGF- und BMP-Familien im *Mesoderma cardiogenicum* die kardialen Transkriptionsfaktoren Nkx2.5, GATA4 und MEF2 induziert, welche ihrerseits zur Expression herzspezifischer Strukturproteine führen. Eine Regulation dieser Signalwege erfolgt durch die vom Notochord sezernierten endogenen BMP-Antagonisten Chordin und Noggin[2],

Die Kardiomyozyten, die Muskelzellen des Herzens, nehmen histologisch und funktionell eine Sonderstellung zwischen Skelettmuskulatur und glatter Muskulatur ein. Sie weisen eine Querstreifung auf und sind somit befähigt zur gerichteten Kontraktion. Im Gegensatz zu den ebenfalls gestreiften Skelettmuskelzellen weisen Kardiomyozyten einen meist mononukleären und strukturell verzweigten zellulären Aufbau auf. Untereinander sind sie durch Gap Junctions verknüpft, was eine schnelle Weiterleitung von Aktionspotentialen über das gesamte Myokard ermöglicht. Des Weiteren besitzt das Herz ein eigenständiges, vom Nervensystem des übrigen Organismus zwar beeinflussbares, ansonsten jedoch weitgehend autonomes Reizbildungs- und Reizleitungssystem, welches über den Sinusknoten angesteuert wird. Dieses

Reizleitungssystem besteht aus spezialisierten Kardiomyozyten, welche durch die Expression spezieller Ionenkanäle (z.B. des I_f-Natriumkanals) in der Lage sind, Aktionspotentiale zu bilden und mit hoher Geschwindigkeit weiterzuleiten[3, 4].

Nach klassischer Ansicht gehört das adulte menschliche Myokard zu den sogenannten postmitotischen Geweben, seine Zellen sind also nicht mehr in der Lage zur Regeneration[1, 3]. Neuere Untersuchungsergebnisse stellen dieses Dogma jedoch in Frage. So konnten Beltrami *et al.* in Biopsien aus Myokard benachbart zu frischen Infarkten mitotisch aktive Kardiomyozyten nachweisen[5]. Bergmann *et al.* konnten in einer eleganten Studie durch Quantifizierung von radioaktivem Kohlenstoff in der Kardiomyozyten-DNA die jährliche Erneuerungsrate menschlicher Kardiomyozyten auf 1% im jungen Erwachsenenalter und 0,45% im Alter von 75 Jahren schätzen[6]. Weitere Forschungsgruppen postulieren auch im adulten menschlichen Herzen einen Pool kardialer Stammzellen, aus welchem im Rahmen regenerativer Prozesse Kardiomyozyten heranreifen können[7-10]. Jedoch bleibt das Ausmaß der natürlichen Regenerationsfähigkeit des menschlichen Herzens insgesamt gesehen gering, was sich in der weitgehenden Irreversibilität myokardialer Schädigungen zeigt.

1.1.2 Myokardinfarkt und Zelltherapeutische Ansätze

Der Myokardinfarkt und die ihm in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle zugrundeliegende koronare Herzkrankheit gehören zu den Hauptursachen für Morbidität und Mortalität in den Industrienationen. So erleiden allein in Deutschland jährlich etwa 280.000 Menschen einen Herzinfarkt, in den USA war 2004 die koronare Herzkrankheit mit 52% die häufigste Todesursache unter den kardiovaskulären Erkrankungen und verursachte die höchsten direkten und indirekten Kosten[11].

Pathogenetisch wird im Falle eines Verschlusses einer Koronararterie das distal gelegene Myokard rasch ischämisch und beginnt bereits etwa 15 Minuten nach dem akuten Verschlussereignis irreversibel abzusterben. Im Verlauf entsteht aufgrund der nur äusserst limitierten Regenerationsfähigkeit des adulten

Myokards im infarzierten Bereich eine fibrotische Narbe aus Bindegewebe, welches einerseits nicht aktiv an der Herzarbeit teilnimmt, andererseits die elektrische Erregungsausbreitung stören kann. Daraus ergeben sich weitere Komplikationen, wie Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen, sowie die Bildung von Thromben und Aneurysmata. Des Weiteren führt die myokardiale Ischämie im Verlauf zum sogenannten Remodeling, der Fibrosierung primär nicht infarzierten Myokards und somit zu einer weiteren Verschlechterung der Pumpfunktion.

Trotz großer Fortschritte in der pharmakologischen, wie auch der interventionellen Therapie des Myokardinfarktes und seiner Folgen konnten in den letzten Jahrzehnten zwar Fortschritte, jedoch keine großen Durchbrüche im Patientenoutcome erreicht werden. Dies liegt in der Tatsache begründet, dass aufgrund der geringen physiologischen Regenerationsfähigkeit des menschlichen Herzens jegliche verfügbaren Therapieformen nur der Schadensbegrenzung und Verhinderung der Folgeerkrankungen, nicht aber dem Erreichen der *restitutio ad integrum* dienen können[12-14].

Naheliegend scheint daher der Ansatz, geschädigte Kardiomyozyten und minderwertiges Narbengewebe durch funktionell höherwertige Zellen zu ersetzen. In zahlreichen Tiermodellen, sowie einigen klinischen Studien wurden zu diesem Zweck unterschiedliche Zelltypen auf Sicherheit und Effektivität erprobt.

Zunächst erscheint dabei der klinische Ersatz von Kardiomyozyten durch Myoblasten oder Satellitenzellen der Skelettmuskulatur aufgrund der leichten (autologen) Verfügbarkeit und physiologischen Funktion dieser Zellen verlockend. Studien am Tiermodell, wie auch am Menschen zeigten jedoch nach Transplantation nur mäßigen positiven Einfluss auf die Pumpfunktion des Herzens, bei einem aufgrund fehlender oder unvollständiger elektrischer Integration erhöhten Risiko für Arrhythmien[15-17].

Weitere Studien beschäftigen sich mit der Transplantation von aus Knochenmark gewonnenen mononukleären Zellfraktionen in das infarzierte Myokard. Die entsprechenden Publikationen beschreiben eine Verbesserung der myokardialen Kontraktilität und Pumpfunktion, eine Verringerung der Größe

der Infarktnarbe und des Remodelings, eine verstärkte Revaskularisation des ischämischen Gewebes, sowie eine Verringerung von Morbidität und Mortalität[18-22]. Die verwendeten Knochenmarkspräparate enthielten bei dieser Technik naturgemäß ein Gemisch unterschiedlichster Zellpopulationen, wie hämatopoietische Progenitoren aller Linien und Entwicklungsstufen, endotheliale (Progenitor-)Zellen, sowie mesenchymale Stammzellen[20]. Ein Vorteil dieser Technik ist die relativ einfache Gewinnung autologen Knochenmarks und die sofortige Verfügbarkeit der zu transplantierenden Zellen bereits wenige Tage nach dem Infarkt ohne zwischenzeitliche *in vitro*-Expansion. Ob für die beobachteten positiven Effekte distinkte Zellpopulationen allein oder im Verbund verantwortlich sind, bleibt bei diesem Verfahren jedoch im Dunkeln.

Ebenfalls geprüft wurde der Einsatz von endothelialen Vorläuferzellen (EPCs) in der myokardialen Regeneration. Diese könnten insbesondere die Angioneogenese im kritisch ischämischen oder bereits infarzierten Myokard, beziehungsweise im Grenzgebiet des Infarkts induzieren, und somit durch eine Verkleinerung der Infarktnarbe und Verminderung des Remodellings unterstützend für andere Therapieoptionen wirken[23-25].

Interessant, jedoch bisher ausschließlich im Tiermodell erprobt, erscheint auch der Einsatz kardialer Stammzellen zum Ersatz infarzierten Myokards. Diese könnten durch Proliferation und Ausdifferenzierung zu vollwertigen Kardiomyozyten heranreifen[26]. Alternativ könnten auch residente kardiale Stammzellen aktiviert werden, um die in geringem Maße auch im adulten menschlichen Herz vorhandene Regenerationsfähigkeit zu steigern[27]. Nachteilig an diesen Ansätzen ist die, zumindest im humanen System, schwierige Gewinnung, Kultur und Charakterisierung dieses Zelltyps.

Eine mögliche Alternative stellen mesenchymale Stammzellen dar. Diese sind leicht aus einer Vielzahl unterschiedlicher adulter Gewebe zu isolieren, in Kultur stark expandierbar, zeigen ausgeprägte parakrine Aktivität und sind in andere Zelltypen differenzierbar. Auf Physiologie und therapeutische Anwendungen von MSCs soll daher in den folgenden Abschnitten ausführlich eingegangen werden.

1.1.3 Kardiale Markergene

Zur Charakterisierung von Kardiomyozyten, sowie von teilweise oder vollständig kardiomyogen differenzierten Stammzellen, kann die Expression kardiomyozytenspezifischer Markergene auf Transkriptions- und Proteinebene herangezogen werden. Dazu gehören insbesondere die für die Funktion des Herzens als Muskel unerlässlichen Strukturproteine des kontraktilen Apparats wie Aktin, Myosin und Troponin.

1.1.3.1 Aktin

Aktin kommt in sechs verschiedenen Isoformen in sämtlichen Zellen des menschlichen Organismus vor. Die β-Isoformen sind Bestandteil des Zytoskeletts aller Zellen, die α-Aktine dagegen sind eine der Hauptkomponenten des kontraktilen Apparats von Muskelzellen. In Letzteren bildet Aktin die Bindungsstelle für die Myosinköpfchen, welche hierdurch die eigentliche Kontraktionsbewegung vermitteln können.

Die Isoform „actin, alpha, cardiac muscle 1“ ist durch das Gen ACTC1 (NM_005159) kodiert. Dieses wird ausschließlich in Kardiomyozyten exprimiert und kann somit als Marker für diesen Zelltyp dienen[28]. Mutationen in diesem Gen stellen Ursachen von familiären Kardiomyopathien wie der dilatativen Kardiomyopathie Typ 1R oder der hypertrophen Kardiomyopathie Typ 11 dar[28].

1.1.3.2 Myosin

Myosin bildet als Motorprotein eine Hauptkomponente des kontraktilen Apparats von Muskelzellen. Die einzelnen Myosinmoleküle zeigen einen asymmetrischen Aufbau aus einem langen Schaft mit zwei am selben Ende liegenden Kopfdomänen. Diese Myosinköpfchen verfügen über eine enzymatische Aktivität, durch welche sie ATP hydrolytisch spalten und dabei eine Konformationsänderung durchlaufen können. Durch gleichzeitige Bindung der Myosinköpfchen an Aktinfilamente bewirkt diese Konformationsänderung eine Kontraktion der Myofibrillen, welche die molekulare Grundlage der Muskelkontraktion darstellt.

Strukturell setzt sich jedes Myosinmolekül aus je zwei schweren und vier leichten Ketten zusammen. Die schweren Ketten bilden die molekulare

Grundstruktur aus Schaft und Köpfchen, während die leichten Ketten der Aktivierung und Feinregulation der Kontraktion dienen. Sowohl von den schweren, als auch den leichten Ketten existieren zahlreiche Isoformen, welche jeweils in unterschiedlichen Kombinationen zusammengelagert werden können. Daraus ergibt sich eine große Vielfalt an unterschiedlichen Myosinmolekülen, welche sich in Eigenschaften wie beispielsweise ihrer ATPase-Aktivität und ihrer Verkürzungsgeschwindigkeit unterscheiden.
Die Myosinleichtketten-Isoform „Myosin, light chain 3“ wird durch das Gen MYL3 (NM_000258) kodiert, welches in Kardiomyozyten und in geringerem Maße in Skelettmuskulatur, nicht aber in glatter Muskulatur exprimiert wird und somit als Marker für quergestreifte Muskulatur dienen kann[28].

1.1.3.3 Troponin

Auch das Molekül Troponin ist Teil des kontraktilen Apparats der Muskulatur und hat die physiologische Funktion, zusammen mit Tropomyosin die Aktin-Myosin-Interaktion zu regulieren. Das Gesamtmolekül setzt sich dabei aus drei verschiedenen Untereinheiten zusammen: Dem Calcium bindenden Tropononin C, dem an Tropomyosin bindenden Troponin T, sowie dem inhibitorisch wirkenden, an Aktin bindenden Troponin I. Unterschiedliche Troponin-Isoformen werden in Herz- und Skelettmuskulatur exprimiert, nicht aber in glatter Muskulatur. Die Variante „Troponin I Type 3“ (TNNI3) wird ausschließlich in Kardiomyozyten exprimiert und kann somit als kardiales Markerprotein dienen. Besondere klinische Relevanz bekommt kardiales Troponin dabei durch seine Freisetzung aus infarziertem Myokard in das Blut. Im klinischen Alltag macht ein erhöhter Serumspiegel von Troponin I somit die Diagnose Herzinfarkt wahrscheinlich[3, 4, 29].
Mutationen im für Troponin I Type 3 kodierenden Gen (NM_000363) können Ursache bestimmter familiärer Formen von Kardiomyopathien sein[28].

1.2 Mesenchymale Stammzellen (MSCs)

1.2.1 Geschichte, Definition und Charakterisierung von MSCs

Der Begriff „Stammzelle“ wurde erstmals 1868 vom deutschen Arzt und Biologen Ernst Haeckel, einem Vertreter und Weiterentwickler der darwinistischen Evolutionslehre, in seinem Werk „Natürliche Schöpfungsgeschichte“ in der wissenschaftlichen Literatur eingeführt[30, 31]. In den 1880er Jahren vermutete der Pathologe Conheim den Ursprung von an der Wundheilung durch Kollagenbildung beteiligten Fibroblasten, welche aus heutiger Sicht treffenderweise als Stammzellen bezeichnet werden können, im Knochenmark[32, 33].

Die unmittelbare Entdeckung der heute als MSCs bekannten Zellen wird Alexander Friedenstein zugeschrieben. Er beschrieb 1966 die Bildung von neuem Knochengewebe bei Anzucht von Knochenmarksproben in speziellen Kulturkammern, sowie nach autologer intraperitonealer Transplantation von Knochenmark in Mäuse[34]. In weiteren Publikationen konnte Friedenstein zeigen, dass es sich bei den für die Knochenneubildung verantwortlichen Zellen um von hämatopoietischen Progenitoren unabhängige Populationen handelt, dass also im Knochenmark Stammzellen unterschiedlicher Potenz vorkommen müssen[35, 36]. Auch publizierte er 1982 eine Arbeit, in welcher er auf die heterogenen Eigenschaften von Stromazellen des Knochenmarks betreffs Größe, Morphologie und Potenz zur osteogenen Differenzierung hinwies, eine bis heute gültige und für weitere Forschungen grundlegende Beobachtung[37-39].

In der Folge befassten sich zahlreiche andere Arbeitsgruppen mit der Erforschung der *in vitro*-Differenzierung von MSCs in weitere, nicht-osteogene Richtungen. Dazu gehören beispielsweise adipogene[40, 41] und chondrogene Differenzierungen[33, 42].

Für den nunmehr immer besser charakterisierten Fibroblasten-artigen Zelltyp führten Caplan *et al.* in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts erstmals den Begriff „mesenchymale Stammzellen“ ein [43].

Weitere Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit der Frequenz von MSCs unter der Gesamtheit der mononukleären Zellen des Knochenmarks. Diese wurde dabei in verschiedenen Publikationen auf etwa $1:10^5$-$1:10^4$ geschätzt[44-46]. Dies

ist etwa um den Faktor 10 seltener als die ebenfalls im Knochenmark residenten hämatopoietischen Stammzellen.

Des Weiteren stellte sich heraus, dass MSCs keine auf das Knochenmark beschränkte Population darstellen. Inzwischen konnten MSCs aus zahlreichen weiteren Organen isoliert werden, so beispielsweise aus Fettgewebe[47, 48], Nabelschnurblut[49], Fruchtwasser[50], Zahnpulpa[51], Leber, Lunge, Milz[52], Plazenta[53] und Synovium[54].

Zahllose Publikationen über Experimente mit MSCs, isoliert aus unterschiedlichen Geweben, gewonnen und selektiert mit unterschiedlichen Verfahren, machten im Sinne der Vergleichbarkeit weiterer Studien eine neue und einheitliche Definition dieser Zellpopulation notwendig. Zunächst wurde von Horwitz *et al.* vorgeschlagen, aufgrund der von MSCs bis *dato* nicht voll erfüllten Kriterien zur Definition als Stammzellen (Langzeitengraftment, vollständige Selbsterneuerung) den Begriff „mesenchymal stem cells“ durch „multipotent mesenchymal stromal cells“ zu ersetzen. Das Akronym „MSCs“ blieb dabei bestehen[55].

Eine grundlegende Neudefinition erfolgte 2005 durch die *International Society for Cellular Therapy* (ISCT), in welcher drei elementare Kriterien von humanen MSCs festgelegt wurden[56]:

1. Plastikadhärenz

2. Spezifische Expression von Obeflächenantigen:

≥ 95 % der MSCs müssen die Marker CD73, CD90 und CD105 exprimieren.

≤ 2 % der MSCs dürfen CD34, CD45, CD14 oder CD11b, CD79α oder CD19 und HLA-DR exprimieren.

3. MSCs müssen in vitro adipogen, osteogen und chondrogen differenzierbar sein.

Plastikadhärenz ist eine in der Literatur gut dokumentierte Eigenschaft von MSCs, welche auch den üblichen Isolationsmethoden zugrunde liegt[57].

Die definierenden Oberflächenantigene von MSCs werden in Positiv- und Negativmarker unterteilt:

Exprimiert werden müssen CD73 (eine 5´Nukleotidase), CD90 (Thy-1, ein membrangebundenes Glykoprotein noch unbekannter Funktion, hoch exprimiert

auf Fibroblasten und Neuronen) und CD105 (Endoglin, ein Membran-Glykoprotein, Teil des TGFβ-Rezeptorkomplex).

Nicht exprimiert werden sollten Marker für Zellen hämatopoietischer beziehungsweise leukozytärer Abstammung. Dazu zählen CD34 (ein Marker für hämatopoietische Stammzellen und endotheliale Progenitoren), CD45 (ein panleukozytärer Marker), CD14 und CD11b (exprimiert auf Monozyten und Makrophagen), CD19 und CD79α (als B-Zell-Marker), sowie HLA-DR (exprimiert auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen).

Die als letztes Hauptkriterium genannte Fähigkeit der *in vitro*-Differenzierbarkeit in andere Zelltypen stellt schließlich das hauptsächliche Unterscheidungsmerkmal von MSCs zu anderen Stromazellen wie Fibroblasten und Chondrozyten dar. Gefordert werden nach der ISCT für MSCs die Fähigkeit der induzierten Differenzierung in Fettzellen (adipogen), Knochen (osteogen) und Knorpel (chondrogen).

Die genannten Eigenschaften stellen einen Minimalkonsens bezüglich der Definition von MSCs dar. Bereits für das Kriterium der Plastikadhärenz wurden Ausnahmen beschrieben, in welchen MSCs unter geeigneten Bedingungen nicht-adhärent kultiviert werden konnten[58]. Auch bleibt die Definition anhand der Expression von Oberflächenmarkern weiterhin schwierig, da die entsprechenden Markerkombinationen in dieser Form nicht ausschließlich auf MSCs exprimiert werden, sondern auch auf Stromazellen anderen Typs, wie beispielsweise Fibroblasten. Darüber hinaus wurden zwischenzeitlich zahlreiche mehr oder weniger spezifische immunphänotypische Marker gefunden, die jeweils Subpopulationen von MSCs definieren. Zu diesen zählen unter anderen CD271, GD2, SSEA-4 und MSCA-1[59-63].

1.2.2 Plastizität von Stammzellen und MSCs

Definierende Kriterien für Stammzellen allgemein stellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und die sogenannte Plastizität, die Differenzierbarkeit in andere Gewebe, dar. Stammzellen werden je nach Ausprägung ihrer Plastizität als totipotent, pluripotent oder multipotent bezeichnet[64]:

Totipotente Stammzellen: Können zu einem kompletten Organismus mit Geweben aller Keimblätter und somit zu jedem darin enthaltenen Zelltyp heranreifen. Dies vermögen lediglich embryonale Stammzellen bis spätestens zum 8-Zell-Stadium.

Pluripotente Stammzellen: Diese können sich in Gewebe aller drei Keimblätter (Ektoderm, Entoderm, Mesoderm) differenzieren, sind aber nicht mehr in der Lage, einen kompletten Organismus zu formen.

Multipotente Stammzellen: Diese können sich nach klassischer Vorstellung zu unterschiedlichen Zelltypen nur noch eines Keimblatts entwickeln. Neuere Studien zeigen jedoch, dass unter bestimmten Bedingungen auch eine Differenzierung über die Keimblattgrenzen hinweg möglich ist[65, 66].

Für MSCs wurde in zahlreichen Publikationen die *in vitro*-Differenzierbarkeit in verschiedene mesenchymale Richtungen, wie Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten („tri-lineage Differenzierung“) gezeigt. Diese Eigenschaft floss schließlich in die MSC-Definition ein [56]. Jedoch zeigte sich in anderen Arbeiten eine große Heterogenität zwischen einzelnen MSC-Präparationen betreffs der tri-lineage Differenzierung. So konnte demonstriert werden, dass innerhalb der MSC-Gesamtpopulation einzelne Subpopulationen existieren, welche zum Teil deutlich abweichende Differenzierungseigenschaften aufweisen. Beispielsweise zeigten Klonierungsexperimente die Existenz von mono-, di- und tripotenten MSCs betreffs adipogener, osteogener und chondrogener Differenzierbarkeit in allen möglichen Kombinationen, sowie deutliche Unterschiede in der Genexpression dieser Zellen[38, 39, 67].

Außer der Differenzierbarkeit in Fett, Knorpel und Knochen konnte in zahlreichen Studien eine zumindest partielle Transdifferenzierung in weitere Zelltypen wie Neurone[68, 69], Astrozyten[66], Hepatozyten[70] und Kardiomyozyten[71] demonstriert werden. Diese Vielseitigkeit, sowie ihre im Vergleich zu embryonalen Stammzellen relativ leichte Verfügbarkeit und ethische Unbedenklichkeit, machen MSCs zu einem für Forschung und mögliche klinische Anwendungen im Bereich Tissue Engineering hoch interessanten Zelltyp. Insbesondere auf die kardiomyogene Differenzierung von MSCs soll in einem separaten Abschnitt nochmals ausführlich eingegangen werden.

1.2.3 Regulation der Stammzellpotenz

In zahlreichen Studien wurde versucht, die für die sogenannte „Stemness“, also die Fähigkeit zur Differenzierung, verantwortlichen Faktoren und molekularen Signalwege verschiedener Stammzellpopulationen zu enthüllen. Young *et al.* konnten in diesem Zusammenhang 2005 für embryonale Stammzellen eine Schlüsselrolle der Transkriptionsfaktoren Oct-4, Sox2 und Nanog nachweisen[72]. Diese Transkriptionsfaktoren sind in der Lage, im Genom an die Promotorregionen zahlreicher anderer Gene zu binden und deren Expression positiv oder negativ zu regulieren. Zu den auf diese Weise aktivierten Genen gehören unter anderen diejenigen für Oct-4, Sox2 und Nanog selbst, sowie Schlüsselfaktoren des TGF-β- und Wnt-Signalwegs, welche Potenz und Fähigkeit zur Selbsterneuerung von Stammzellen steuern. Inhibierte Gene betreffen dagegen Faktoren, welche für die Ausdifferenzierung der Zellen verantwortlich sind. Daraus ergibt sich das Bild eines auf wenigen Faktoren beruhenden regulatorischen Netzwerks, über welches die fundamentalen Eigenschaften der Stammzellpotenz und Selbsterneuerung gesteuert werden.

Auf Basis dieser Erkenntnis gelang 2006 Yamanaka *et al.* die Reprogrammierung adulter Fibroblasten zu pluripotenten Stammzellen (sogenannten „Induced pluripotent stem cells“, iPSCs) durch Reaktivierung der endogenen Transkriptionsfaktoren Oct-4, Sox2, Klf4 und c-Myc[73]. Dieses Protokoll wurde in Bezug auf die verwendeten Faktoren in zahlreichen folgenden Publikationen reproduziert, modifiziert und vereinfacht, wobei unter anderem der Faktor Nanog hinzugezogen, auf das Protoonkogen c-Myc jedoch verzichtet werden konnte[74].

Ein weiteres mit embryonalen Stammzellen assoziiertes Gen ist DPPA4 (Developmental pluripotency associated 4). Dieses kann aufgrund seiner hohen Expression in pluripotenten Stammzellpopulationen als Marker für die Definition und Charakterisierung dieser Zellen herangezogen werden. Das entsprechende Protein scheint dabei Relevanz für die Modulation der Chromatinstruktur embryonaler Stammzellen zu haben, ist jedoch, wie knockout-Experimente im Tiermodell zeigten, für deren grundlegende Entwicklung entbehrlich[75, 76].

Außer für embryonale Stammzellen konnte auch für verschiedene adulte Stammzellpopulationen die Expression von Multipotenz-assoziierten Genen wie Oct-4, Sox2 und Nanog nachgewiesen werden[50, 77]. So beschrieben Trubiani *et al.* eine Population von aus periodontalen Ligamenten gewonnenen MSCs, welche neben Oct-4 auch die embryonalen Marker SSEA-1, SSEA-4 und frizzled-9 exprimiert[78]. Die physiologische Bedeutung dieser Expression typischer embryonaler Marker in adulten Stammzellen ist nach dem derzeitigen Stand der Forschung noch unklar. Experimentell konnte jedoch gezeigt werden, dass eine exogen induzierte Überexpression dieser Gene in humanen Knochenmarks-MSCs zu einer Steigerung der Proliferationsfähigkeit, sowie zu einer verbesserten Differenzierbarkeit dieser Zellen führt[79].

1.2.4 Parakrine Eigenschaften von MSCs

In einem ihrer physiologischen Ursprungsgewebe, dem Stroma des Knochenmarks, wird MSCs eine fundamentale Bedeutung an der Bildung der sogenannten hämatopoetischen Nische zugesprochen. Dabei handelt es sich um die Formung des für die Hämatopoese unabdingbaren Milieus, welches neben der anatomischen Grundstruktur des hämatopoetisch aktiven Gewebes auch rezeptorvermittelte Effekte auf hämatopoietische Progenitoren, ebenso wie die Bereitstellung des optimalen hormonellen Umfelds beinhaltet. Von besonderer Relevanz ist dabei die Sekretion zahlreicher Zytokine wie G-CSF, M-CSF, SDF-1 und LIF[80-83].

Über ihre Bedeutung für die Hämatopoese hinaus wurde in diversen *in vitro*-Studien, wie auch in Tiermodellen verschiedener Erkrankungen, die Bedeutung der Sekretion zahlreicher Zytokine und Mediatoren durch MSCs, sowie deren Einfluss auf umliegende Zellen und Gewebe gezeigt[84]. So bewirken MSCs ausgeprägte antiapoptotische Effekte auf durch verschiedene Noxen geschädigte Zellen[85], sowie eine Suppression entzündlicher Reaktionen durch die Sekretion antiinflammatorischer Zytokine wie TGF-β1 und Interleukin 10[86].

Des Weiteren bewirkt die Transplantation von MSCs in hypoxische Gewebe die Induktion von Neovaskularisation, unter anderem durch die Ausschüttung proangiogenetischer Faktoren wie VEGF und Adrenomedullin[87]. Diese Effekte

konnten von Tang *et al.* unter anderem in einem Tiermodell an Ratten demonstriert werden, welchen nach Induktion eines Myokardinfarkts MSCs transplantiert wurden. Dieses Verfahren führte zu einer signifikanten Erhöhung der Kapillardichte und Vaskularisation im infarzierten Gewebe, sowie zu einer kleineren Infarktnarbe[88].

1.2.5 Immunologische Eigenschaften von MSCs

Außer durch ihre Fähigkeit zur Transdifferenzierung in andere Zelltypen stehen MSCs vor allem aufgrund ihrer immunologischen Eigenschaften im Zentrum des klinisch-wissenschaftlichen Blickfelds. So wurde *in vitro* in mixed lymphocyte reactions, wie auch *in vivo* im Tiermodell, die Suppression stimulierter T-Lymphozyten durch MSCs demonstriert[86, 89-95]. Weitere Studien konnten ähnliche supprimierende Effekte von MSCs auch für B-Lymphozyten und NK-Zellen zeigen[89, 96-101].

Interessanterweise führte die Transplantation allogener, also nicht-HLA-gematchter, MSCs in den meisten Fällen nicht zur Abstoßung durch das Immunsystem des Empfängers, die transplantierten Zellen konnten statt dessen im immunologisch fremden Organismus überleben[102, 103]. Einzelne Studien zeigten jedoch davon abweichende Ergebnisse mit Abstoßungsreaktionen gegen allogen transplantierte MSCs[104].

Die immunologischen Mechanismen, durch welche MSCs einerseits nicht den üblichen Abstoßungsreaktionen allogener Leukozyten unterliegen und andererseits selbst das Immunsystem beeinflussen können, sind weiterhin Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion[105]. Verschiedene Studien zeigten relevante Effekte durch Indolamin-2-3-Dioxygenase (IDO)-vermittelte Tryptophandepletion[106], die Sekretion von Prostaglandin E_2[107], Stickstoffmonooxid[108] und Insulin-like growth factor binding proteins[109], sowie durch die Expression und Sekretion von HLA-G[110]. Ebenfalls eine Rolle scheint die konstitutive und induzierbare Sekretion von verschiedenen antiinflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin 10, TGF-β1 oder HGF durch MSCs zu spielen[86].

Um ihre immunmodulatorischen Effekte ausüben zu können, benötigen MSCs zunächst direkten Kontakt zu Zellen des Immunsystems, insbesondere zu Monozyten. Des Weiteren scheint ein proinflammatorisches Zytokinmilieu Voraussetzung für eine Aktivierung der MSCs zu sein, wobei Interferon-γ eine Schlüsselrolle zukommt[98, 111]. Interessanterweise scheinen diese zunächst für MSCs beschriebenen immunologischen Phänomene keine exklusiven Eigenschaften dieses Zelltyps zu sein. So beschrieben Jones *et al.* 2007 vergleichbare Ergebnisse für *in vitro*-Versuche mit aus anderen Geweben gewonnenen Stromazellen wie dermalen und synovialen Fibroblasten sowie Chondrozyten, welche keinen Stammzellcharakter besitzen[111].

1.2.6 Klinische Anwendung von MSCs

Die aufgeführten Eigenschaften von MSCs, ihre Plastizität, ihre parakrinen Eigenschaften, sowie ihr Einfluss auf das Immunsystem, eröffnen ein weites Spektrum möglicher klinischer Anwendungen. Zahlreiche davon wurden in Tiermodellen, einige nach Demonstration ihrer Sicherheit und Wirksamkeit auch bereits am Menschen erprobt.

Ihre Plastizität legt einen klinischen Einsatz von MSCs im Rahmen des Tissue Engineerings nahe. So könnten zukünftig einzelne Zellen oder *in vitro* vorgefertigte und bereits vordifferenzierte ganze Gewebe auf Grundlage von MSCs zum Ersatz nicht regenerationsfähiger Organteile verwendet werden. Bereits in klinischer Erprobung befinden sich MSCs in Ansätzen Knorpel- oder Knochenschäden mit autologem Zellmaterial zu therapieren[112, 113].

In diesem Zusammenhang ebenfalls von großem Interesse ist der Einsatz von MSCs zur Therapie kardialer Erkrankungen, worauf in einem separaten Abschnitt ausführlich eingegangen werden soll.

Eine weitere Option ergibt sich aus dem weitestgehenden Fehlen immunologischer Abstoßungsreaktionen gegen MSCs. So können diese Zellen auch allogen transplantiert werden und als Zellersatz bei genetisch determinierten Erkrankungen dienen. Dominici *et al.* beobachteten positive klinische Effekte und histologisches Engraftment bei Verabreichung von

allogenen MSCs an unter *Osteogenesis imperfecta* leidende Kindern. Die transplantierten Zellen waren dabei noch bis zu einem Jahr nach der Transplantation histologisch im Knochen nachweisbar, bildeten dort gesunde Knochenmatrix und führten zu einem Rückgang der Zahl der Frakturen. Nachteilig bleibt dabei eine im zeitlichen Verlauf langsame Abnahme der Zahl der histologisch nachweisbaren transplantierten MSCs und deren therapeutischer Effekte[103, 114, 115]. In einer Einzelfallstudie wurde in der 32. Schwangerschaftswoche eine intrauterine Transplantation von allogenen fetalen MSCs in einen an einer schweren Form von *Osteogenesis imperfecta* leidenden Fetus unternommen. Nach Geburt zeigten Biopsien ein Engraftment und eine osteogene Differenzierung der transplantierten MSCs im Knochengewebe[116].

Ebenfalls von großem klinischem Interesse sind die metabolische Aktivität von MSCs, sowie deren parakrine Effekte auf umliegende Gewebe. So zeigt die Transplantation von MSCs in an mit bestimmten Enzymdefekterkrankungen leidenden Patienten eine positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufs. Die allogen transplantierten MSCs sezernieren dabei die im Empfänger durch einen Gendefekt ausgeschalteten Enzyme, wodurch die Anhäufung von toxischen Stoffwechselprodukten in Fällen der entsprechenden Speichererkrankung aufgehoben wird[117]. Diesbezüglich vielversprechende Ergebnisse wurden bisher für Patienten mit metachromatischer Leukodystrophie (Arylsulfatase A-Mangel) [118-120] und Hurler-Syndrom (α-L-Iduronidase-Mangel)[119] demonstriert.

Eine weitere klinische Anwendung für MSCs bietet deren Eigenschaft, über eine Bereitstellung von Stromagewebe und Wachstumsfaktoren, sowie über zellkontaktabhängige Mechanismen, das Engraftment von transplantierten hämatopoietischen Stammzellen zu fördern. Im Rahmen mehrerer Studien wurden autologe oder allogene *in vitro* expandierte MSCs zusammen mit hämatopoietischen Stammzellen transplantiert. Dies führte zu einer Reduzierung der Fälle von Transplantatversagen bei einem gleichzeitig beschleunigten Anstieg der Granulozyten- und Thrombozytenzahlen *post transplantationem*. Des Weiteren verringerte sich durch die Gabe von MSCs die

Häufigkeit und Schwere von graft-versus-host-Reaktionen, ohne dass zusätzliche Nebenwirkungen auftraten[121-124].

Der zuletzt genannte Effekt findet bereits klinische Anwendung in der gezielten Therapie und Prävention der akuten Graft-versus-Host-Krankheit (GvHD). In entsprechenden Untersuchungen zeigten sich dabei ausgesprochen positive Effekte auf den Verlauf dieser prognostisch sehr ungünstigen Erkrankung[125]. Hierbei wurden entweder *ex vivo* expandierte, vom HLA-Typ haploidente MSCs von Verwandten, oder aber MSCs von nichtverwandten nicht-gematchten Spendern eingesetzt. In beiden Fällen konnte eine positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufs beobachtet werden. Nebenwirkungen der Zelltherapie traten dabei bislang nicht auf[101].

Außer zur Behandlung der GvHD wird in aktuellen Studien untersucht, ob Abstoßungsreaktionen gegen transplantierte solide Organe durch Gabe von MSCs verringert, und damit deren Funktionstüchtigkeit verlängert werden kann. In dieser Hinsicht zum Teil vielversprechende Ergebnisse liegen bisher jedoch lediglich in Tiermodellen vor[126-128].

Naheliegend erscheint aufgrund ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften auch ein Einsatz von MSCs zur Therapie von Autoimmunerkrankungen. Im Tiermodell wurde für zahlreiche Modellerkrankungen für beispielsweise Multiple Sklerose, rheumatische Arthritis oder systemischen Lupus erythematodes eine Beeinflussbarkeit des Krankheitsverlaufs durch Verabreichung von MSCs beschrieben[129-131]. Für eine mögliche Anwendung am Menschen laufen derzeit mehrere Phase I/II-Studien. Im Fokus stehen dabei unter anderem ein Einsatz von MSCs im Rahmen der Therapie von Multipler Sklerose, systemischem Lupus Erythematodes und Diabetes mellitus Typ I, bisher liegen jedoch nur wenige und teils widersprüchliche Ergebnisse zur Wirksamkeit dieses Therapieansatzes vor[131-133].

1.3 Kardiale Anwendung von MSCs

1.3.1 Kardiomyogene Differenzierung von MSCs

Wie oben erwähnt, können MSCs *in vitro* außer in adipo-, osteo- oder chondrogene Richtung auch kardiomyogen differenziert werden.

Zunächst gelang die kardiomyogene Differenzierung adulter Stammzellen Wakitani *et al.* durch Behandlung von aus dem Knochenmark von Ratten gewonnenen MSCs mit 5-Azacytidin. Die Wirkung von 5-Azacytidin beruht auf einer Demethylierung von Cytosin in der genomischen DNA, was wiederum zu einer Aktivierung von für die Kardiomyogenese relevanten Gene führt. Die auf diese Weise behandelten Zellen zeigten in Kultur die Ausbildung von Myotubuli-artigen Strukturen, die Expression von α-Myosin, sowie spontane Kontraktionsbewegungen[134].

Die Wirksamkeit eines alternativen kardiomyogenen Differenzierungsprotokolls wurde von Shim *et al.* an aus humanem Knochenmark gewonnenen MSCs demonstriert. Das eingesetzte Differenzierungsmedium auf Basis von Insulin, Transferrin, Ascorbat und Dexamethason induzierte in den hiermit kultivierten MSCs die Expression von herzspezifischen Proteinen wie kardialem Troponin I, Tropomyosin und kardialem Titin, sowie in einem Teil der behandelten MSCs die Ausbildung quergestreifter Myofibrillen und Z-Banden[135].

Auch für verschiedene Zytokine konnte die Induktion von Markerproteinen der Kardiomyogenese in MSCs gezeigt werden. So demonstrierten Xaymardan *et al.* die Wirksamkeit einer Kombination aus PDGF, FGF2 und VEGF an aus murinem Knochenmark gewonnenen MSCs. Dieses Differenzierungsmedium induzierte in den darin kultivierten MSCs die Expression von α- und β-Myosin-Schwerketten, sowie von Connexin43 und führte nach Transplantation in ein Infarktmodell in Ratten zur Ausbildung von Gap Junctions zwischen vorbehandelten MSCs und Kardiomyozyten[136].

Andere Arbeitsgruppen beschrieben eine Induktion kardiomyogener Differenzierung von MSCs durch die Behandlung mit verschiedenen Wachstumsfaktoren wie VEGF, FGF, BMP oder IGF-I, durch physikalische Stimulation mittels mechanischer, elektrischer oder Temperaturreize, sowie durch speziell aufbereitete extrazelluläre Matrizes[137].

Ein alternativer Ansatz zur kardiomyogenen Differenzierung von MSCs mittels definierter Medien besteht darin, die MSCs mit fetalen oder adulten Kardiomyozyten zu cokultivieren. Über parakrine, wie auch über zellkontaktabhängige Mechanismen kann dabei eine Hochregulation kardiomyogener Marker in den MSCs erzielt werden[138-140]. Dieselbe Grundidee liegt auch zahlreichen *in vivo* Versuchen an Tiermodellen, sowie experimentellen Studien am Menschen zugrunde, wobei MSCs direkt in das Herz eingebracht wurden. Folgeuntersuchungen legen nahe, dass zumindest ein Teil der transplantierten Zellen die Fähigkeit besitzen könnte, im entsprechenden Milieu einen kardiomyogenen Phänotyp anzunehmen[71, 141-143].
Allen diesen Differenzierungsprotokollen ist gemeinsam, dass die auf diese Weise behandelten MSCs bestimmte Eigenschaften von Kardiomyozyten annehmen sollen. Dazu gehören eine Hochregulation sowohl von in der Kardiomyogenese relevanten Transkriptionsfaktoren wie Nkx2.5 und GATA4, als auch von myokardialen Strukturproteinen, wie verschiedenen Isoformen von Aktin, Myosin und Troponin[144, 145]. Des Weiteren nehmen die behandelten Zellen zumindest teilweise auch die speziellen elektrophysiologischen Eigenschaften von Kardiomyozyten an, was wiederum die Expression der entsprechenden Ionenkanalproteine, sowie die Ausbildung von Gap Junctions voraussetzt[146].
Weitere Protokolle zur kardiomyogenen Differenzierung *in vitro* wurden für embryonale Stammzellen etabliert. Dazu gehört unter anderem die Behandlung mit in der Kardiomyogenese relevanten Wachstumsfaktoren. So demonstrierten Kawai *et al.* die kardiomyogene Differenzierung embryonaler Stammzellen durch eine Kombination aus FGF2 und BMP2[147]. Ein alternatives Protokoll wurde von Yuasa *et al.* mittels des endogenen BMP-Antagonisten Noggin etabliert[148]. Auch bestimmte Chemikalien, wie das in der Zellkultur zur Kryokonservierung von Zellen eingesetzte DMSO, können die Kardiomyogenese in der als Modell für embryonale Stammzellen dienenden murinen Teratokarzinomzelllinie P19 induzieren[149].
Den zuletzt genannten Verfahren ist gemeinsam, dass ihre Effektivität zur Induktion kardiomyogener Differenzierung bisher lediglich für embryonale, nicht

aber für adulte Stammzellen wie MSCs demonstriert werden konnte. Im Besonderen ist hervorzuheben, dass bislang der entgültige Beweis aussteht, dass humane MSCs überhaupt die Fähigkeit besitzen, in funktionelle Kardiomyozyten zu differenzieren. So beobachteten Rose *et al.* zwar die Expression herzspezifischer Proteine durch kardiomyogen differenzierte MSCs, ohne dass diese jedoch Kardiomyozyten-spezifische elektrophysiologische Eigenschaften aufwiesen. Dies kann als Hinweis einer lediglich partiell abgelaufenen kardiomyogenen Differenzierung verstanden werden[150].

1.3.2 Kardiale Applikation von MSCs

Die kardiomyogene *in vitro*-Differenzierbarkeit, sowie die parakrinen Eigenschaften von MSCs legen einen klinischen Einsatz dieser Zellen bei kardialen Erkrankungen nahe. Mögliche Ansätze sind dabei der Ersatz von hypoxisch geschädigten Kardiomyozyten, Verminderung der Narbenbildung nach Herzinfarkt, Vermeidung unerwünschter Remodeling-Effekte, sowie eine verbesserte Neovaskularisierung kritisch ischämischen Myokardgewebes.
Im Tiermodell, wie auch in klinischen Studien wurden bislang unterschiedliche Verfahren zur Zelltherapie ischämischer myokardialer Erkrankungen erprobt: Ein in mehreren klinischen Studien angewandtes Verfahren ist die myokardiale Applikation von unfraktionierten, aus Knochenmark gewonnenen mononukleären Zellen, welche eine heterogene Mischung aus hämatopoietischen und endothelialen Stammzellen und –Progenitoren, sowie aus Stromazellen und MSCs darstellen[19, 20, 151-153]. Als Standardverfahren hat sich dabei die intrakoronare Applikation in den Bereich des Infarktes im Rahmen einer Koronarangiographie wenige Tage nach akutem Infarktereignis etabliert. Ein Vorteil dieser Technik ist die relativ einfache Gewinnung autologer Knochenmarkszellen und somit die zeitnahe Verfügbarkeit der zu transplantierenden Zellen bereits wenige Tage nach dem Infarkt ohne zwischenzeitliche *in vitro*-Expansion. Unklar bleibt dabei jedoch aufgrund des sehr heterogenen Transplantats die für die beobachtbaren Effekte

verantwortliche(n) Zellpopulation(en), jedoch ist zu vermuten, dass die im Knochenmark residenten MSCs zumindest teilweise daran teilhaben.

Die bisherigen Ergebnisse der mit mononuleären Knochenmarkszellen durchgeführten Studien zur Therapie nach akutem Myokardinfarkt fielen gemischt aus: In der größten randomisierten Studie (REPAIR-AMI, 204 Patienten) zeigte sich in der mit Zellen behandelten Gruppe innerhalb eines Jahres eine *versus* der Placebogruppe signifikant verbesserte linksventrikuläre Pumpfunktion, ein selteneres Eintreten erneuter Herzinfarkte, sowie eine verminderte Sterblichkeit[19]. Dagegen zeigte eine andere, 67 Patienten umfassende Studie bei vergleichbarem Versuchsaufbau keinen Einfluss der Zelltherapie auf die linksventrikuläre Pumpfunktion, jedoch eine Verringerung der Größe der Infarktnarbe und des Remodelings[151]. In der 60 Patienten umfassenden BOOST-Studie zeigte die wenige Tage nach Herzinfarkt durchgeführte Applikation von mononukleären Knochenmarkszellen eine Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion zum Zeitpunkt 6 Monate nach Behandlung. Dieser zunächst beobachtbare positive Effekt hatte sich jedoch bei einem weiteren Endpunkt nach 18 Monaten an die Kontrollgruppe angeglichen[153].

Ein alternativer Weg wurde durch Isolation, Aufreinigung, Inkulturnahme und nachfolgende kardiale Applikation von MSCs beschritten. So zeigt eine 69 Patienten mit akutem Myokardinfarkt umfassende randomisierte Studie positive Auswirkungen dieser MSC-Transplantationen auf die linksventrikuläre Pumpfunktion[154]. Daneben existieren zahlreiche Tiermodelle, in welchen die myokardiale Applikation aufgereinigter MSC-Präparate getestet wurde. Diese helfen insbesondere, die Mechanismen der myokardialen Regeneration aufzuklären. So demonstrierten mehrere Arbeitsgruppen in verschiedenen Tiermodellen die Differenzierung von in das Myokard transplantierten MSCs zu Kardiomyozyten[71, 141, 142]. Allerdings erfolgte eine kardiomyogene Differenzierung in diesen Studien nur in einem kleinen Teil der transplantierten Zellen.

Ein alternativer Mechanismus zur (scheinbaren) Transdifferenzierung von MSCs im Myokard stellt die Zellfusion dar, wobei transplantierte MSCs mit

residenten Kardiomyozyten verschmelzen, deren Phänotyp annehmen und wieder in den Zellzyklus eintreten können[155].

Nebenwirkungen der Therapie des Myokardinfarkts durch Zelltherapie traten bisher im humanen System nicht auf. Jedoch zeigten sich in einigen Tiermodellen nach MSC-Applikation myokardiale Verkalkungen, induziert durch eine osteogene Differenzierung der transplantierten Zellen[156, 157].

Um derartige Fehldifferenzierungen auch im zukünftigen klinischen Einsatz zu vermeiden, sowie um die Effizienz einer möglichen kardiomyogene Differenzierung der transplantierten MSCs zu verbessern, wurde der Ansatz einer kardiomyogenen *in vitro*-Differenzierung der zu transplantierenden Zellen vor Transplantation entwickelt. So konnten Tomita *et al.* in einem Infarktmodell an Ratten demonstrieren, dass sowohl unbehandelte, als auch *in vitro* mit 5-Azacytidin zur Induktion einer kardiomyogenen Differenzierung vorbehandelte MSCs nach Transplantation die Angiogenese in der erzeugten Narbe induzieren. Jedoch zeigte ausschließlich die Versuchsgruppe, welche kardiomyogen vorinduzierte MSCs erhalten hatte, eine gegenüber den Kontrollen signifikant verbesserte kardiale Pumpfunktion[158].

In einer weiteren Studie wurde ein alternatives Protokoll zur kardiomyogenen Differenzierung der MSCs vor Transplantation etabliert. Dabei wurde anstelle des potentiell mutagenen 5-Azacytidin zur Induktion der Differenzierung eine Kombination aus FGF2 und BMP4 eingesetzt. Auch die auf diese Weise vorbehandelten Ratten-MSCs zeigten eine Expression kardialer Markerproteine und verbesserten *in vivo* im Tiermodell signifikant die Pumpfunktion infarzierter Herzen[143].

1.4 Fragestellung und Ziele der vorliegenden Arbeit

Zum besseren Verständnis der kardiomyogenen Differenzierungsfähigkeit humaner MSCs ist eine systematische Evaluation der verschiedenen bereits etablierten und publizierten Differenzierungsmethoden und Protokolle unerlässlich. Deshalb sollten in dieser Arbeit bereits für die kardiomyogene Differenzierung von MSCs etablierte, sowie alternative, bislang lediglich zur kardiomyogenen Differenzierung von embryonalen Stammzellen beschriebene

Protokolle auf extensiv charakterisierte humane MSCs angewandt und auf ihre Effektivität getestet werden.

Um einen systematischen Vergleich der einzelnen Protokolle zu ermöglichen, sowie individuelle Unterschiede in der Physiologie einzelner MSC-Isolate zu erkennen, wurden alle Experimente an mehreren, aus dem Knochenmark von unterschiedlichen Spendern isolierten MSC-Populationen durchgeführt. Die Definition der verwendeten Zellpopulationen erfolgte hierzu gemäß den von der ISCT vorgegebenen Definitionskriterien für MSCs[56].

Um den Einfluss der *in vitro*-Kultivierung auf Differenzierung und Physiologie kardiomyogen differenzierter und undifferenzierter MSCs zu evaluieren, wurden die einzelnen Zellpopulationen bis zum Erreichen ihrer replikativen Seneszenz in Kultur gehalten. Begleitend wurden dabei in regelmäßigen Abständen Analysen der Proliferationsfähigkeit, der Genexpression und der charakteristischen Oberflächenmarker durchgeführt. Methodisch wurden zur Genexpressionsanalyse kardialer Marker auf Transkriptomebene hochsensitive und spezifische quantitative RT-PCR-Protokolle auf Basis von TaqMan-Sonden etabliert.

Darüber hinaus sollte im Rahmen dieser Arbeit das Zusammenspiel zwischen Differenzierungsstatus der MSCs und der Expression Multipotenz-assoziierter Transkriptionsfaktoren erforscht werden. Zu diesem Zweck wurden mittels quantitativer RT-PCR Expressionsanalysen dieser Transkriptionsfaktoren an differenzierten und undifferenzierten MSCs im Verlauf der Langzeitkultur durchgeführt, und die Resultate mit der Expression differenzierungsspezifischer Marker abgeglichen. Dieses Vorgehen soll zu einem besseren Verständnis der Regulation der Multipotenz sowie der Differenzierung von humanen MSCs beitragen.

Darüber hinaus kann die Kenntnis der optimalen Bedingungen für eine möglichst effektive kardiomyogene Differenzierung von MSCs *in vitro*, sowie die Evaluation der Differenzierung im Langzeitverlauf der Zellkultur zukünftig zur Entwicklung besserer Transplantationsschemata im Bereich des Tissue Engineerings des Herzens beitragen.

2 Materialien

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe	Greifenberger Antriebstechnik
Brutschrank HERAcell	Heraeus
Cell-Dyn Ruby System	Abbott
Cryo Freezing Container	Thermo Fisher Scientific
Digital Dry Block Heater	PMC
Electrophoresis Power Supply	Gibco BRL
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -80°C UF85-300s	Colora Messtechnik
Gelkammer Horizon 11.14	BRL
GeneAmp PCR System 9700	PE Applied Biosystems
Kühlschrank 4°C	Bosch
LightCycler 1.5 Instrument	Roche
Mikroskop Axiovert 200 mit AxioCam ICc3	Zeiss
Pipetten Research variabel	Eppendorf
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
REAX Top Vortexer	Heidolph
Spectrophotometer ND-1000	Thermo Scientific
Sterile Werkbank Hera Safe	Heraeus
Waage HF-4000	A&D
Zentrifuge Mikro 22R	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge Rotina 46 R	Hettich Zentrifugen

2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
6-Well Platte Multidish	Thermo Scientific/ Nunc

Cryo.s. Einfrierröhrchen	Greiner bio-one
Konisches Röhrchen, 15 ml und 50 ml	BD Biosciences, Falcon
LightCycler Capillaries, 20 µl	Roche
Neubauer improved Zählkammer C-Chip DHC-N01	Digital Bio
PCR-Tubes	Roche
Pipettenspitzen SafeSeal-Tips Premium, 10 µl, 100 µl und 1000 µl	Biozym
QIAshredder	Qiagen
Safe-Lock Tubes 1,5/2ml	EppendorfAG
Stripette 5 ml, 10 ml, 25 ml und 50 ml	Corning Life Sciences
Zellkulturflaschen EasyFlask Nunclon, 75 cm^2	Thermo Scientific/ Nunc
Zellkulturflaschen SoLoFlask Nunclon, 185 cm^2	Thermo Scientific/ Nunc
Zellsieb 70 µm	BD Biosciences, Falcon

2.3 Medien und Additiva

Substanz	**Hersteller**
5-Azacytidin	Sigma-Aldrich
α-MEM	Lonza / BioWhittaker
BMP2	R&D
Dexamethason	Sigma-Aldrich
DMSO	Merck
Fetal Bovine Serum (FCS)	Lonza / BioWhittaker
FGF2	R&D
Glycerol 2-phosphate disodium salt hydrate	Sigma-Aldrich
IMDM	Gibco
Indomethacin	Sigma-Aldrich
Insulin from bovine pancreas	Sigma-Aldrich

Isobutylmethylxanthin	Sigma-Aldrich
L-Ascorbic Acid 2-phosphate	Sigma-Aldrich
Linolsäure	Sigma-Aldrich
Lymphoflot	Biotest
MCDB-201	Sigma-Aldrich
Natriumselenit	Sigma-Aldrich
Noggin	R&D
Pasteur Capillary Pipettes	WU Mainz
PDGF-AB	R&D
Penicillin-Streptomycin	Lonza / BioWhittaker
Phosphat Buffered Saline (PBS)	Lonza / BioWhittaker
Rinderserum-Albumin	Sigma-Aldrich
TGF-β	Miltenyi
Transferrin (human)	Sigma-Aldrich
Unfraktioniertes Heparin	Ratiopharm
VEGF	R&D

2.4 Sonstige Chemikalien, Reagenzien und Kits

Substanz	**Hersteller**
Accutase	Lonza / BioWhittaker
Agarose	Sigma-Aldrich
Alcianblau 8GX 1% in 3%iger Essigsäure	Universitätsapotheke Tübingen
Ampuwa	Fresenius Kabi
DNA Molecular Weight Marker V	Roche
DNA Molecular Weight Marker XIV	Roche
Ethanol, 70%	Universitätsapotheke Tübingen
Formalin, 10% und 37%	Universitätsapotheke Tübingen
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich
Isopropanol, 99%	Sigma-Aldrich
Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit	Sigma-Aldrich
LightCycler FastStart DNA Master SYBR	Roche

Green I	
LightCycler TaqMan Master	Roche
LightCycler-Primer Set für RT-PCR • human GAPDH • human LPL • human alkaline Phosphatase • human Collagen II α 1 • human Oct-4 • human Nanog • human Sox2 • human DPPA4	Search-lc
Oil-Red-O Pulver	Sigma-Aldrich
PCR-Primer	Metabion
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen
RNase AWAY	Molecular BioProducts
RNase-Free DNase Set	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
TAE-Puffer	Universitätsapotheke Tübingen
TaqMan-Sonden, Nr. ▪ 10 ▪ 11 ▪ 60	Roche (Universal Probe Library)
Total RNA, Heart, Human	Stratagene
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche
Trypan Blue 0,5%	Biochrom AG

2.5 Software

Software	**Hersteller**
LightCycler Software Version 3.5	Roche
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft
Microsoft Office Word 2007	Microsoft
REST 2009	M. Pfaffl/ Qiagen

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Isolation von MSCs aus dem Knochenmark

Die Knochenmark-Proben für das vorliegende Projekt wurden über eine Kooperation mit der Klinik für Orthopädie am Universitätsklinikum Tübingen zur Verfügung gestellt. Bei ansonsten organgesunden Patienten mit medizinisch indiziertem operativem Eingriff im Bereich des Hüftgelenks wurde im Rahmen der Operation eine Entlastungsbohrung durchgeführt, bei welcher als Nebenprodukt Knochenmarksaspirat anfiel. Dieses wäre, sofern nicht für die Forschung verwendet, verworfen worden. Die Patienten wurden vor dem Eingriff über die Details der Knochenmarkentnahme, mögliche Risiken, sowie die Verwendung des entnommenen Materials für Forschungszwecke aufgeklärt. Die Entnahme des Knochenmarks fand intraoperativ unter aseptischen Bedingungen statt. Für dieses Vorgehen lag ein positives Votum der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Tübingen vor (Projektnummer 95/2005V).

Pro Spender (n=3) standen 8-12 ml Knochenmarksaspirat für die Isolation von MSCs zur Verfügung. Um die selbst im Knochenmark nur in verhältnismäßig geringer Zahl vorkommenden MSCs anzureichern, wurde die Technik der Dichtegradientenzentrifugation eingesetzt. Außerdem wurde die bei MSCs stark ausgeprägte und die Population definierende Eigenschaft der Plastikadhärenz zur weiteren Selektion genutzt.

Zur Aufbereitung wurden die frischen, mit Lithiumheparin antikoagulierten Knochenmarksaspirate im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt. Diese Lösung wurde vorsichtig über 20 ml in einem Falcon Tube vorgelegten und auf Raumtemperatur vorgewärmten Ficoll geschichtet. Anschließend wurde für 20 Minuten bei 1000 x g und Raumtemperatur ohne Einsatz der Rotorbremse zentrifugiert. Bei diesem Zentrifugationsschritt erfolgte eine Auftrennung der Blut- und Knochenmarksbestandteile nach ihrer Dichte: Erythrozyten sedimentierten als Pellet auf den Boden des Tubes, unmittelbar darüber lag eine Schicht aus Granulozyten. Über diesen wiederum folgte der eigentliche

Ficoll. An der Grenze zum darüber liegenden Plasma, in welchem die Thrombozyten verblieben, bildete sich ein dünner Ring, der die mononukleären Zellpopulationen enthielt. Beim Einsatz von Knochenmark sind dies Lymphozyten, Monozyten sowie die kleinen Populationen der MSCs und anderer Progenitorzellen. Dieser Ring wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette unter stetiger Drehung des Röhrchens vorsichtig abgenommen ohne die Schichtung der Flüssigkeiten zu stören. Nach Überführung in ein frisches 50 ml-Röhrchen wurden die mononukleären Zellen bei 350 x g abzentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen um verbleibende Ficollreste zu entfernen. Anschließend wurde ein Differentialblutbild der Probe erstellt und somit der prozentuale Anteil und die absolute Zellzahl der unterschiedlichen enthaltenen Zellpopulationen bestimmt. Nun wurden je Population $4{,}25 \times 10^6$ im Differentialblutbild als Leukozyten klassifizierte Zellen in einer 185 cm²-Kulturflasche ausplatiert, entsprechend einer Dichte von 23000 Zellen/cm². Ab diesem Schritt wurde für die weitere Kultur Standardkulturmedium verwendet, bestehend aus α-MEM + 10% FCS + 100 U/ml Penicillin + 100 U/ml Streptomycin. Die weitere Kultur der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2-Gehalt der wasserdampfgesättigten Luft.

Nach 24 Stunden in Kultur wurde erstmalig das Medium gewechselt, um verbleibende nichtadhärente Zellpopulationen wie Erythrozyten und Granulozyten, sowie tote Zellen aus der Kultur zu entfernen.

3.1.2 Kultur der MSCs

Die Kultur der MSCs erfolgte für diese Arbeit in Zellkulturflaschen sowie in 6-well-Platten unter Verwendung verschiedener Medien, jeweils im Begasungsbrutschrank bei 37°C unter 5% CO_2 und 100% relativer Luftfeuchte. Als Standardkulturmedium diente dabei α-MEM mit einem Zusatz von 10% FCS sowie 100 U/ml Penicillin + 100 U/ml Streptomycin. Das Serum bot den Zellen dabei eine Vielzahl bisher nicht im Einzelnen bekannter Wachstumsfaktoren und Nährstoffe, die Antibiotika dienten der Vermeidung von Verkeimungen der Kulturen.

In den Kulturflaschen wurden folgende Volumina Kulturmedium eingesetzt (Tabelle 1):

Tabelle 1: Eingesetzte Medienvolumina

6-well Platte	3 ml
25 cm²-Flasche	6 ml
75 cm²-Flasche	13 ml
185 cm²-Flasche	25 ml

Das Wachstum der MSCs erfolgte definitionsgemäß adhärent an Kunststoffoberflächen, daher konnte beim alle drei bis vier Tage durchgeführten Medienwechsel das alte Kulturmedium mit einer Pipette abgezogen werden, ohne die Zellen zu verlieren. Nach einem Waschschritt mit PBS wurde, ohne zwischenzeitlich den Zellrasen austrocknen zu lassen, wieder frisches Medium zugegeben.
Zur Dokumentation der Zellmorphologie im Verlauf der Langzeitkultur wurden in jeder Passage native lichtmikroskopische Bilder der Zellen angefertigt.

3.1.3 Passagieren

Das Wachstum der Zellen am Boden der Kulturflaschen wurde mehrmals wöchentlich mittels Durchlichtmikroskopie kontrolliert. Nach jeweils zwei bis vier Wochen in Kultur wurden die im Monolayer wachsenden MSCs beim Erreichen von 80% Konfluenz enzymatisch von der Kulturflasche abgelöst, und nach Bestimmung der Zellzahl in geringerer Dichte (s.u.) neu ausgesät (passagiert). Dieses Verfahren war notwendig, da eine zu große Kulturdichte eine verfrühte Seneszenz und verminderte Proliferationsfähigkeit von MSCs zur Folge haben kann[159]. Des Weiteren konnte bei jeder Passage ein Teil der Zellen zur Analyse entnommen, oder für spätere Experimente eingefroren werden.

3.1.3.1 Ablösen der adhärenten MSCs

Nach dem abpipettieren des alten Kulturmediums wurden die Flaschen einmal mit PBS gewaschen, um Medienreste und das darin enthaltene FCS zu entfernen. Dies verhinderte eine Inhibition der folgenden enzymatischen

Reaktion durch freie Calcium-Ionen, sowie durch eventuell im FCS enthaltene Proteaseinhibitoren, wie beispielsweise Antitrypsin. Danach wurden pro Flasche 8 ml Accutase zugegeben und für fünf Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Durch leichtes Klopfen der Flasche konnten letzte noch adhärente Zellen mechanisch gelöst werden, eine Kontrolle der vollständigen Ablösung wurde im Durchlichtmikroskop durchgeführt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt, zum Stoppen der enzymatischen Reaktion mit 10 ml frischem Kulturmedium verdünnt, und für fünf Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Dies führt zur Sedimentation und Bildung eines Zellpellets am Boden des Gefäßes. Der Überstand konnte dann problemlos abpipettiert, und die Zellen durch leichtes Klopfen und Zugabe von frischem Medium resuspendiert werden.

3.1.3.2 Zellzahlbestimmung

Zum Zählen der MSCs wurde eine Neubauer-Zählkammer eingesetzt. Zunächst wurden 50 µl der Zellsuspension in einem Eppendorf-Gefäß mit derselben Menge Trypanblau versetzt. Die Zugabe dieses Farbstoffs diente der Differenzierung von vitalen und toten Zellen. Trypanblau wurde bei intakter Zellmembran nicht in das Zytoplasma aufgenommen, die Zellen bleiben ungefärbt. Tote Zellen dagegen erschienen infolge ihrer für Trypanblau durchlässigen Membran im Mikroskop blau. 10 µl der gefärbten Zellen wurden in eine Neubauer-Zählkammer überführt und unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung ausgewertet. Die Zellzahl der Ausgangslösung errechnet sich nach folgender Formel:

Zellzahl pro ml Suspension
= Mittelwert Zellzahlen in vier Großquadraten x Verdünnungsfaktor x 10^4/ml

Der Verdünnungsfaktor bezog sich auf die Verdünnung durch die Trypanblaulösung und betrug bei den verwendeten Volumina zwei.

3.1.3.3 Aussaat der MSCs

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die MSCs unter Zugabe von frischem Kulturmedium in neue Kulturflaschen in einer Dichte von 1000 Zellen/cm²

ausgesät und weiterkultiviert. Beim ersten Medienwechsel, drei Tage nach Passage, wurden tote und nicht-adhärente Zellen, sowie Zelltrümmer entfernt.

3.1.4 Kryokonservierung von MSCs

In jeder Passage wurden die für Neuaussaat und Analyse nicht benötigten MSCs zur Langzeitkonservierung in flüssigem Stickstoff bei -196°C eingefroren. Dazu wurden die Zellen nach dem Ablösen und Waschen mit Einfriermedium versetzt. Dieses setzte sich zusammen aus:

30% α-MEM
65% FCS
5% DMSO

Die Zellsuspension wurde auf eine Konzentration von $1x10^5$ - $1x10^6$ Zellen pro ml Einfriermedium eingestellt und zu je 2 ml in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese Kryoröhrchen wurden in auf -20°C vorgekühlten Kryoboxen im Gefrierschrank auf -80°C gekühlt, was ein langsames Gefrieren der intra- und extrazellulären Flüssigkeit sicherstellte. Der langsame Gefriervorgang, sowie das im Einfriermedium enthaltene DMSO verhinderten die Bildung von Eiskristallen in den Zellmembranen, was zur Schädigung der Zellen geführt hätte. Nach 24 h bei -80°C konnten die Röhrchen dann zur Langzeitkonservierung in den flüssigen Stickstoff überführt werden.
Um eingefrorene MSCs wieder aufzutauen und in Kultur zu nehmen, wurden die entsprechenden Proben unmittelbar nach Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden nach abgeschlossenem Auftauvorgang zur Entfernung des Einfriermediums zentrifugiert, mit PBS gewaschen und in frischem Kulturmedium in der gewünschten Dichte ausgesät.

3.1.5 Einfrieren von MSCs zur RNA-Isolation

Zur späteren Analyse mittels quantitativer RT-PCR wurden in jeder Passage $1x10^5$ MSCs zur späteren RNA-Isolation eingefroren. Zu diesem Zweck wurde nach Bestimmung und Einstellung der Zellzahl zentrifugiert (5 min, 300 x g) und das Zellpellet mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand sorgfältig abgezogen und das Zellpellet gemäß des RNeasy-Reagenzienkit-Protokolls in 350 µl des im RNeasy-Reagenzienkit enthaltenen RLT-Puffers resuspendiert. Dieser Puffer bewirkte eine Lyse der Zellen und stabilisierte gleichzeitig die freigesetzte RNA. Durch das im Puffer enthaltene Guanidinisothiocyanat wurden eventuell vorhandene RNasen inaktiviert. In dieser Form konnte das Lysat für die spätere RNA-Isolation (s. 3.2.1) bei -80°C eingefroren und für bis zu drei Monate gelagert werden.

3.1.6 Differenzierungen und Färbungen der MSCs zum Nachweis der Multipotenz

Ein Hauptcharakteristikum und Definitionskriterium der MSCs ist ihre Multipotenz, welche durch Differenzierung in einen adipogenen, osteogenen und chondrogenen Phänotyp nachgewiesen werden kann[56]. Die *in vitro*-Differenzierung der MSCs wird dabei durch Kultur in speziellen Differenzierungsmedien induziert, und durch Anfärbung von für den entsprechenden Zelltyp charakteristischen Strukturen nachgewiesen.

3.1.6.1 Adipogene Differenzierung und Oil-Red-O-Färbung

Zur adipogenen Differenzierung wurden MSCs in Duplikaten in 6-well Platten in einer Dichte von 1000 Zellen/cm² ausgesät und in Standardkulturmedium bis zum Erreichen von 80% Konfluenz kultiviert. Ab diesem Zeitpunkt wurde für weitere drei Wochen in adipogenem Differenzierungsmedium weiterkultiviert, wobei für den gleichen Zeitraum Zellen in zwei wells unter Standardkulturmedium als Negativkontrolle mitgeführt wurden. Das eingesetzte adipogene Differenzierungsmedium setzte sich zusammen aus[160]:

α-MEM
10% FCS
100 U/ml Penicillin + 100 U/ml Streptomycin
1 µM Dexamethason
0,5 mM IBMX
10 µg/ml Insulin
0,2 mM Indomethacin

Nach drei Wochen unter Differenzierung bei zweimal wöchentlichem Medienwechsel, wurden jeweils ein adipogen differenzierte MSCs, sowie ein undifferenzierte MSCs enthaltendes well mit Oil-Red-O angefärbt. Dies diente dem spezifischen Nachweis der für adipogen differenzierte MSCs charakteristischen, lichtmikroskopisch bereits nativ sichtbaren intrazellulären Fettvakuolen. Die Färbung wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt:

Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Dann erfolgte bei Raumtemperatur eine 30-minütige Fixierung mit 10%igem Formalin (2 ml pro well). Nach diesem Fixierungsschritt wurde das Formalin abgezogen und der Zellrasen mit destilliertem Wasser gewaschen. Das Formalin wurde ordnungsgemäß als Sondermüll entsorgt. Darauf folgte eine zweiminütige Inkubation mit 60%igem Isopropanol. Nach Absaugen des Isopropanols erfolgte der eigentliche Färbeschritt mit 2 ml Ölrot Gebrauchslösung. Diese musste unmittelbar vor der Färbung aus 3 Teilen Ölrot Stammlösung (hergestellt aus 150 mg Ölrotpulver + 50 ml 99% Isopropanol) und 2 Teilen destilliertem Wasser angesetzt, und zur Vermeidung von Verklumpung durch ein Filterpapier geleitet werden. Nach einer Färbezeit von 5 Minuten wurden die Zellen mehrfach mit Leitungswasser gespült und anschließend für eine Minute mit Hämatoxylin gegengefärbt um Zellstrukturen, insbesondere die Zellkerne, deutlicher hervorzuheben.

Die so gefärbten Zellen konnten lichtmikroskopisch semiquantitativ beurteilt sowie fotografiert werden, wobei sich die intrazellulär gelegenen Fettvakuolen der adipogen differenzierten MSCs rot darstellten.

Die adipogen differenzierten, sowie die undifferenzierten MSCs des zweiten well-Paars wurden zur späteren RNA-Isolation und Analyse mittels RT-PCR wie unter 3.1.5 beschrieben in RLT-Puffer eingefroren.

3.1.6.2 Osteogene Differenzierung und Nachweis der alkalischen Phosphatase

Wie für den Nachweis der Adipogenese, wurden auch für die osteogene Differenzierung die MSCs in 6-Well Platten in einer Dichte von 1000 Zellen/cm² ausgesät und bis zum Erreichen von 80% Konfluenz in Standardkulturmedium gehalten. Dann wurde wiederum unter Mitführung undifferenzierter Kontrollen für weitere drei Wochen in osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Dieses setzte sich zusammen aus:

α-MEM
10% FCS
100 U/ml Penicillin + 100 U/ml Streptomycin
1 µM Dexamethason
10 mM Glycerol-2-Phosphat
50 µM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat

Nach drei Wochen Differenzierung bei zweimal wöchentlichem Wechsel des Mediums wurde eine Färbung auf Basis eines Diazoniumsalzes durchgeführt. Dieses Salz wurde durch die typischerweise in osteogenen Zellen exprimierte alkalische Phosphatase umgesetzt und wies diese durch den dabei erfolgenden Farbumschlag spezifisch nach. Diese Färbung wurde mit dem Kit “alkalische Phosphatase“ von Sigma-Aldrich nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt:

Nach Entfernung des Nährmediums und zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden für eine Minute 2 ml Citrat-Fixierungslösung auf die Zellen gegeben. Diese musste zuvor aus 12,5 ml der im Kit enthaltenen Citratlösung, sowie 32,5 ml Aceton und 4 ml 37%igem Formaldehyd in einer Glasflasche angesetzt werden und war dann bei 4°C für vier Wochen verwendbar. Nach dem Fixieren wurden die Zellen mit destilliertem Wasser gewaschen und

anschließend für 30 Minuten mit 2 ml Alkalifarbstoffgemisch (unmittelbar vor der Färbung hergestellt aus den im Kit enthaltenen Komponenten: 0,5 ml Natriumnitrit + 0,5 ml FRV-Alkalilösung + 22,5 ml destilliertes Wasser + 0,5 ml Naphtol AS-BI Alkalilösung) unter Lichtschutz bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit Leitungswasser gespült und mit Hämatoxylin kurz gegengefärbt.

Die für alkalische Phosphatase positiv gefärbten Zellen stellten sich lichtmikroskopisch violett dar und konnten visuell semiquantitativ beurteilt, sowie fotografisch dokumentiert werden.

Wie von den adipogen differenzierten wurden auch von den osteogen differenzierten MSCs Proben zur späteren RNA-Isolation und Analyse mittels RT-PCR in RLT-Puffer eingefroren.

3.1.6.3 Chondrogene Differenzierung und Nachweis saurer Glykosaminoglykane

Zur weiteren Charakterisierung wurden MSCs chondrogen differenziert. Hierzu wurden $2{,}5x10^5$ Zellen in einem 15 ml-Falcon Röhrchen für 5 Minuten bei 350 x g zentrifugiert, was zur Bildung eines Zellpellets führte. Auf dieses wurde nach Entfernen des Standardkulturmediums 1 ml chondrogenes Differenzierungsmedium gegeben ohne dabei die Zellen zu resuspendieren. Als Differenzierungsmedium wurde “Differentiation Basal Medium-Chondrogenic“ aus dem “hMSCs Chondro BulletKit“ der der Firma Lonza verwendet, zu welchem noch der für die chondrogene Differenzierung essentielle Wachstumsfaktor TGF-β_3 in einer Konzentration von 10 ng/ml hinzugefügt wurde. Da TGF-β_3 eine im Medium nur kurze Halbwertszeit besitzt, durfte diese Substanz erst unmittelbar vor dem Medienwechsel aufgetaut und zum Basalmedium hinzugefügt werden. Die folgenden vier Wochen wurden die Zellen in diesem die Chondrogenese induzierenden Medium bei zweimal wöchentlichem Medienwechsel im Pellet kultiviert, was zur Bildung einer extrazellulären Matrix führte. Die in dieser enthaltenen, durch chondrogen differenzierte MSCs synthetisierten, sauren Glykosaminoglykane konnten durch eine Färbung mittels Alcianblau nachgewiesen werden.

Nach vier Wochen Differenzierung wurde das Medium durch vorsichtiges Absaugen entfernt ohne das Pellet zu verlieren oder zu beschädigen. Dann wurde das Pellet zweimal mit je einem ml PBS gewaschen und für 10 Minuten mit 70%igem Ethanol fixiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS wurde das Pellet für 30 min mit Alcianblau-Färbelösung angefärbt. Diese Färbelösung wurde hergestellt aus 0,5 g Alcianblau 8GX gelöst in 50 ml 3%iger Essigsäure. Nach dem Färben wurde mit destilliertem Wasser gespült bis der überschüssige Farbstoff nicht mehr sichtbar war. Das gefärbte Pellet wurde danach auf einen Objektträger überführt, mit der flachen Seite eines Skalpells flach ausgestrichen, und mit einem Deckglas abgedeckt. Die erfolgte Differenzierung konnte nun lichtmikroskopisch semiquantitativ beurteilt und photographisch dokumentiert werden. Dabei stellten sich im gefärbten Zell-Matrix-Pellet die für chondrogene Differenzierung typischen sauren Glykosaminoglykane türkis gefärbt dar.

Da sich die RNA-Isolation aus chondrogen differenzierten Pellet-Kulturen als ineffizient erwies, wurden MSCs zur Analyse mittels RT-PCR in 6-well-Platten chondrogen differenziert: Wie für die adipogene und osteogene Differenzierung wurden MSCs in Duplikaten in einer Dichte von 1000 Zellen/cm^2 ausgesät und bis zum Erreichen von 80% Konfluenz in Standardmedium gehalten. Dann wurde, wiederum unter Mitführung einer undifferenzierten Kontrolle, für weitere vier Wochen in chondrogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die differenzierten und undifferenzierten MSCs, wie unter 3.1.5 beschrieben, zur späteren RNA-Isolation in RLT-Puffer eingefroren.

3.1.7 Kardiomyogene Differenzierungsprotokolle

In dieser Arbeit wurden verschiedene, in der Literatur für die Induktion kardiomyogener Differenzierung von adulten oder embryonalen Stammzellen beschriebene, Protokolle auf humane Knochenmarks-MSCs angewandt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen nach dem Ende der Primärkultur, beim ersten Passagieren, in einer Dichte von 1000 Zellen/cm^2 neu in Kulturflaschen ausgesät und für 24 h bis zum erneuten Erreichen ihrer Adhärenz im

Brutschrank inkubiert. Ab diesem Zeitpunkt, dem Beginn der Passage 1 (P1), wurde mittels verschiedener Medien versucht, eine kardiomyogene Differenzierung der MSCs zu induzieren. Die einzelnen Differenzierungsprotokolle sollen in den folgenden Abschnitten erleutert werden.

3.1.7.1 5-Azacytidin

Die Induktion von Kardiomyogenese durch 5-Azacytidin wurde erstmals von Wakitani *et al*. für adulte Ratten-MSCs gezeigt[134]. Diese Wirkung beruhte auf einer Demethylierung der genomischen DNA der adulten Zellen, was zur Aktivierung von für die kardiomyogene Differenzierung relevanter Gene führte.
In der vorliegenden Arbeit wurden humane MSCs für 24 Stunden mit einem 5-Azacytidin-haltigen Medium behandelt: Zunächst wurde vom Standardkulturmedium zum kardiomyogenen Differenzierungsmedium gewechselt. Dieses setzte sich zusammen aus Standardkulturmedium, welchem 5-Azacytidin in einer Konzentration von 10 µM zugesetzt wurden. Nach 24 h wurde das Differenzierungsmedium entfernt und die Kultur wieder mit Standardkulturmedium fortgeführt.

3.1.7.2 Noggin

Yuasa *et al.* demonstrierten, dass die Behandlung mit dem Transkriptionsfaktor Noggin eine kardiomyogene Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen induzieren kann[148].
Zum Standardkulturmedium wurde Noggin in einer Konzentration von 150 ng/ml gegeben und die humanen MSCs für 72 h darin kultiviert. Nach Ablauf dieser Differenzierungszeit wurde wieder Standardkulturmedium ohne Noggin auf die Zellen gegeben und die Kultur darunter fortgeführt.

3.1.7.3 Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) und Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2)

Kawai *et al.* demonstrierten die Induktion von Kardiomyogenese in murinen embryonalen Stammzellen durch Behandlung mit den dem Kulturmedium zugesetzten Wachstumsfaktoren FGF2 und BMP2[147].

In Standardkulturmedium wurde FGF2 in einer Konzentration von 1 ng/ml und BMP2 in einer Konzentration von 0,2 ng/ml gelöst. Das resultierende Differenzierungsmedium wurde für 72 h auf humane MSCs angewandt. Nach Ablauf von 72 h Differenzierungszeit wurde wieder Standardkulturmedium ohne zusätzliche Wachstumsfaktoren auf die Zellen gegeben und die Kultur darunter fortgeführt.

3.1.7.4 Dimethylsulfoxid (DMSO)

Für die Chemikalie DMSO konnte die Induktion der Kardiomyogenese in einer murinen Teratokarzinom-Zelllinie gezeigt werden[161, 162].

Dem Standardkulturmedium wurde DMSO in einer Konzentration von 1% zugesetzt. Humane MSCs wurden für 96 Stunden in diesem Differenzierungsmedium kultiviert. Anschließend wurde die Kultur unter Standardkulturmedium ohne DMSO weitergeführt.

3.1.7.5 Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Xaymardan *et al*. demonstrierten die Induktion der kardiomyogenen Differenzierung von murinen MSCs durch ein die Wachstumsfaktoren PDGF, FGF2 und VEGF enthaltendes Kulturmedium[136].

Dieses setzte sich zusammen aus:

90% Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)
10% FCS,
100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin-Sulfat
50 µg/ml unfraktioniertes Heparin
10 ng/ml PDGF-AB
5 ng/ml FGF2
10 ng/ml VEGF

Dieses Medium wurde bei zweimal wöchentlichem Wechsel als Permanentmedium über die gesamte Dauer der Langzeitkultur auf humane MSCs angewandt.

3.1.7.6 Insulin, Transferrin, Ascorbat und Dexamethason (ITAD)

Shim *et al*. zeigten für ein Medium auf Basis von Insulin, Transferrin, Ascorbat und Dexamethason die Induktion von kardiomyogener Differenzierung in humanen Knochenmarks-MSCs[135].

Zusammensetzung des Mediums:

60% DMEM-LG
30% MCDB-201
10%FCS
100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin-Sulfat
50 mg/ml Rinderserum-Albumin
1 mg/ml Insulin
0,55 mg/ml Transferrin
10^{-4} M Ascorbinsäure-2-Phosphat
10^{-9} M Dexamethason
0,5 µg/ml Natriumselenit
0,47 µg/ml Linolsäure

Dieses Medium wurde bei zweimal wöchentlichem Wechsel als Permanentmedium über die gesamte Kulturdauer der humanen MSCs eingesetzt.

3.2 Molekularbiologie

3.2.1 RNA-Isolation

3.2.1.1 Grundlagen der RNA-Isolation

Zur späteren Analyse mittels quantitativer RT-PCR wurde zunächst die RNA aus den dafür vorgesehenen Zellen isoliert. Die Zellproben wurden hierzu im Verlauf der Langzeitkultur bei jeder Passage, wie oben beschrieben, bei -80°C in RLT-Puffer eingefroren. Die RNA-Isolation selbst wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dessen Grundprinzip beruht auf einer pH-abhängigen spezifischen Bindung von RNA

an die Silica-Membran eines Isolationsröhrchens. Durch Waschen mit den verschiedenen im Kit enthaltenen Puffern wurden unerwünschte Zellbestandteile wie Proteine, Lipide, Saccharide oder DNA entfernt, noch verbleibende DNA wurde durch Zugabe einer DNase hydrolysiert. Am Ende des Isolationsschrittes wurde die immer noch an der Säulchenmembran gebundene RNA im neutralen pH des zuletzt zugegebenen Wassers wieder eluiert.

Das für die RNA-Isolation verwendete RNeasy Mini Kit enthielt die meisten notwendigen Komponenten bereits gebrauchsfertig (RLT-Puffer, Puffer RW1, RPE-Puffer, RNase-freies Wasser). Lediglich 70%iges Ethanol musste noch zusätzlich eingesetzt werden. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Puffer gibt der Hersteller nicht an.

Der laut Herstellerprotokoll fakultative Schritt des DNase-Verdaus wurde mittels des RNase-free DNase Sets von Qiagen durchgeführt, um auch kleinste Verunreinigungen durch genomische DNA zu beseitigen.

3.2.1.2 Durchführung der RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde strikt nach dem im RNeasy Mini Handbook empfohlenen Protokoll für tierische und menschliche Zellen durchgeführt:

Zunächst wurde das bei -80°C eingefrorene Zelllysat für 15 Minuten in einem Heizblock bei 37°C aufgetaut. Dabei lösten sich eventuell aufgetretene Ausfällungen des RLT-Puffers. Dann folgten die eigentlichen Isolationsschritte:

1. Das Lysat wurde auf eine QIAshredder-Säule pipettiert und 2 Minuten bei 24000 x g zentrifugiert. Dies bewirkte eine Homogenisierung eventuell vorhandener Zellaggregate, sowie die vollständige Ruptur der Zellwände.
2. Nach Verwerfen der Shreddersäule wurde der Unterstand 1:1 mit 70%igem Ethanol gemischt.
3. Diese Lösung wurde auf die eigentliche RNeasy-mini-Säule überführt und für 15 s bei 14000 x g zentrifugiert. Dies bewirkte eine Bindung der in der Probe enthaltenen RNA an die Silica-Membran der Säule. Der Unterstand wurde verworfen.
4. Es folgte ein Waschschritt mit 700 µl RW1-Puffer, fünfminütiger Inkubation, sowie erneuter Zentrifugation (15 s, 14000 x g). Der

Unterstand, welcher nun die unerwünschten Zellbestandteile wie Saccharide und Proteine enthielt, wurde verworfen.

5. In einem Eppendorf-Gefäß wurden 10 µl DNase-Stocklösung mit 70 µl RDD-Puffer gemischt und dann direkt auf die Membran der Säule pipettiert. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, während der eventuell noch vorhandene genomische DNA durch die DNase verdaut wurde.
6. Ein erneuter Waschschritt mit 700 µl RW1-Puffer und anschließender Zentrifugation (15 s, 14000 x g) diente zur Entfernung der DNase. Der Unterstand wurde verworfen.
7. Es folgte zweimaliges Waschen mit je 500 µl RPE-Puffer. Nach dem ersten Schritt wurde für 15 s bei 14000 x g zentrifugiert, dann der Unterstand verworfen. Nach der zweiten Zugabe von RPE-Puffer wurde für zwei Minuten bei 14000 x g zentrifugiert, um die Säulchenmembran vollständig abzutrocknen.
8. Um die an die Silica-Membran gebundene reine RNA zurückzugewinnen, wurde das Säulchen auf ein im Kit beiliegendes Elutionsgefäß gesetzt und 30 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran pipettiert. Nach zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde bei 14000 x g für eine Minute zentrifugiert. Das Wasser löste dabei die RNA von der Membran und sammelte sich als Unterstand der Säule, welche nun verworfen werden konnte. Die gewonnene Lösung wurde unmittelbar nach der Elution auf Eis gestellt um die empfindliche RNA vor rascher Zersetzung zu schützen.

Die gewonnene RNA-Lösung wurde nun photometrisch auf ihre Konzentration untersucht. Hierzu wurde das Instrument NanoDrop 1000 benutzt, in welchem jeweils 1,5 µl unverdünnte RNA-Lösung eingesetzt werden konnten. Das Gerät maß die Extinktion der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm und errechnete vollautomatisch die Konzentration der RNA. Des Weiteren wurde das Verhältnis (Ratio) der Extinktionen bei 260 und 280 nm berechnet, welches die Reinheit der RNA (Absorptionsmaximum 260 nm) in Bezug auf Kontaminationen mit Proteinen (Absorptionsmaximum 280 nm) widerspiegelt.

Die Ratio qualitativ hochwertiger RNA-Proben sollte dabei im Bereich 1,8-2,1 liegen.
Nach Bestimmung der RNA-Konzentration wurden die Proben sofort bei -80°C eingefroren.

3.2.2 Reverse Transkription

3.2.2.1 Grundlagen der reversen Transkription

Um die Expression einer spezifischen mRNA in einer Zellpopulation mittels quantitativer RT-PCR messen zu können, muss zunächst die zuvor isolierte einzelsträngige mRNA enzymatisch in cDNA umgeschrieben werden. Dieses Vorgehen bezeichnet man als reverse Transkription. Zum Einsatz kommen dabei rekombinante virale Enzyme, sogenannte reverse Transkriptasen, welche in der Natur von Retroviren exprimiert werden.
In der vorliegenden Arbeit wurde für die reverse Transkription das Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Roche eingesetzt, welches alle benötigten Komponenten bereits enthält.

3.2.2.2 Durchführung der reversen Transkription

Zunächst wurden alle benötigten im Kit enthaltenen Komponenten, sowie die umzuschreibenden RNA-Proben langsam auf Eis aufgetaut. Von den RNA-Proben wurde eine Menge von 0,5 µg entnommen, und mit RNase-freiem Wasser (im Kit enthalten) in einem 200 µl-Eppendorf Gefäß auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt. Des Weiteren wurden zu jeder der Proben 1 µl Anchored-oligo$(dT)_{18}$ Primer pipettiert, entsprechend einer finalen Konzentration von 20 µM. Dieser Primer war komplementär zur Primärstruktur des Poly-A-Schwanzes der einzelsträngigen mRNA und diente als Ausgangspunkt für die cDNA-Synthese durch die reverse Transkriptase. Der Mix aus Probe und Primer wurde daraufhin in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 9700) für 10 Minuten auf 65°C erhitzt, was eine Öffnung von eventuell die anschließende reverse Transkription störenden

Sekundärstrukturen der mRNA bewirkte. Anschließend wurden die Proben sofort wieder auf Eis gestellt.

Zwischenzeitlich wurde ein Mastermix aus den weiteren benötigten Kitkomponenten erstellt. Dieser enthielt für jede Probe:

Tabelle 2: Pipettierschema der reversen Transkription

Komponente	Volumen pro Ansatz	Finale Konzentration
Reaction Buffer	4 µl	8 mM $MgCl_2$
Deoxynucleotide Mix	2 µl	Jeweils 1 mM
Protector RNase Inhibitor	0,5 µl	20 U
Reverse Transcriptase	0,5 µl	10 U
Gesamtvolumen	7 µl	

Von diesem Mastermix wurden jeweils 7 µl zu jeder der mit dem Primer vorinkubierten Proben pipettiert, entsprechend einem Gesamtvolumen von 20 µl. Sofort anschließend wurden alle Proben bei 50°C für eine Stunde im Thermocycler inkubiert, was der reversen Transkriptase die Möglichkeit gab, ausgehend von den oligo$(dT)_{18}$-Primern spezifisch die mRNA in cDNA umzuschreiben. Das eingesetzte Enzym besitzt eine RNase-H-Aktivität durch welche die RNA-Matrize unmittelbar im Anschluss an die Synthese der komplementären cDNA hydrolysiert wurde, und somit nicht mit im Anschluss durchgeführten PCR-Reaktionen interferieren konnte.

Nach Abschluss der Reaktion wurden die Proben für 5 Minuten auf 85°C erhitzt um die reverse Transkriptase zu inaktivieren, und dann bei -20°C eingefroren.

3.2.3 Quantitative Real-time-PCR

3.2.3.1 Grundlagen der PCR

Die Polymerase Chain Reaction (PCR), zu Deutsch „Polymerase-Kettenreaktion“, ist eine molekularbiologische Methode um spezifische DNA-Sequenzen unter Einsatz einer DNA-Polymerase zu vervielfältigen. Entscheidend ist dabei der Einsatz von hitzestabilen rekombinanten Enzymen, welche ursprünglich aus thermophilen, in Thermalquellen lebenden Bakterien

stammen. Das erste derart eingesetzte Enzym ist die Taq-Polymerase, isoliert aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*. Kary Mullis, der die PCR als Technik entwickelte und 1985 publizierte[163], wurde dafür 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.

Die Spezifität einer PCR-Reaktion wird durch die Sequenz der eingesetzten Primer bestimmt. Dies sind Oligonukleotide, welche eine komplementäre Basensequenz zu Beginn und Ende des zu vervielfältigenden DNA-Anschnitts aufweisen. Sie dienen dort als Startpunkt für die DNA-Polymerase, welche nur von einem doppelsträngigen DNA-Abschnitt ausgehend in 5‘-3‘-Richtung arbeiten kann.

Die PCR-Reaktion selbst wird in einem Thermocycler durchgeführt, in welchem durch Wechsel der Probentemperatur die gewünschten Reaktionen stattfinden können. Jeder PCR-Prozess besteht dabei aus unterschiedlichen Phasen:

Prä-Inkubation: Durch zehnminütiges Erhitzen auf 95°C wird das aktive Zentrum der DNA-Polymerase demethyliert und diese somit aktiviert.

Amplifikation: Durch zyklische Temperaturänderung findet die eigentliche PCR-Reaktion statt. Diese umfasst 40-45 Zyklen mit je drei Schritten:

Denaturierung (Denaturation, Schmelzen): Durch Erhitzen der Probe auf 95°C trennen sich die komplementären, in einer Probe enthaltenen DNA-Stränge durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Basenpaaren.

Primerhybridisierung (Primer annealing): Die Probentemperatur wird auf einige Grad Celsius unter die Schmelztemperatur der eingesetzten Primer abgesenkt. Dies ermöglicht eine spezifische Bindung der Primer an die Zielsequenz der cDNA. Die optimale Annealing-Temperatur liegt dabei meist 5-7°C unter der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer.

Im Rahmen einer sogenannten „Touchdown-PCR“ wird die Hybridisierungstemperatur zu Beginn der PCR höher gewählt und im Verlauf von Zyklus zu Zyklus auf den optimalen Wert erniedrigt. Dies ermöglicht bereits zu Beginn der PCR eine hohe Spezifität, zunächst zulasten der Effizienz. Die Letztere nähert sich aber bei im Verlauf zunehmend sinkenden Temperaturen ebenfalls rasch dem Optimum an.

Elongation (Extending): Durch Erhitzen der Probe auf 72°C, das Temperaturoptimum der eingesetzten DNA-Polymerase, wird eine Amplifikation der von den Primern umspannten DNA-Sequenz ermöglicht. Die DNA-Synthese startet dabei immer an einem an die cDNA gebundenen Primer und synthetisiert in 5‘-3‘-Richtung die komplementären Basen an den einzelsträngigen Matrizenstrang. Nach Beendigung der Amplifikation startet ein neuer PCR-Zyklus mit dem Denaturierungsschritt.

Durch Wiederholung der genannten Schritte findet in jedem PCR-Zyklus eine Verdoppelung der Anzahl der eingesetzten DNA-Kopien statt, die DNA-Menge der Proben wächst also exponentiell (Abbildung 1).

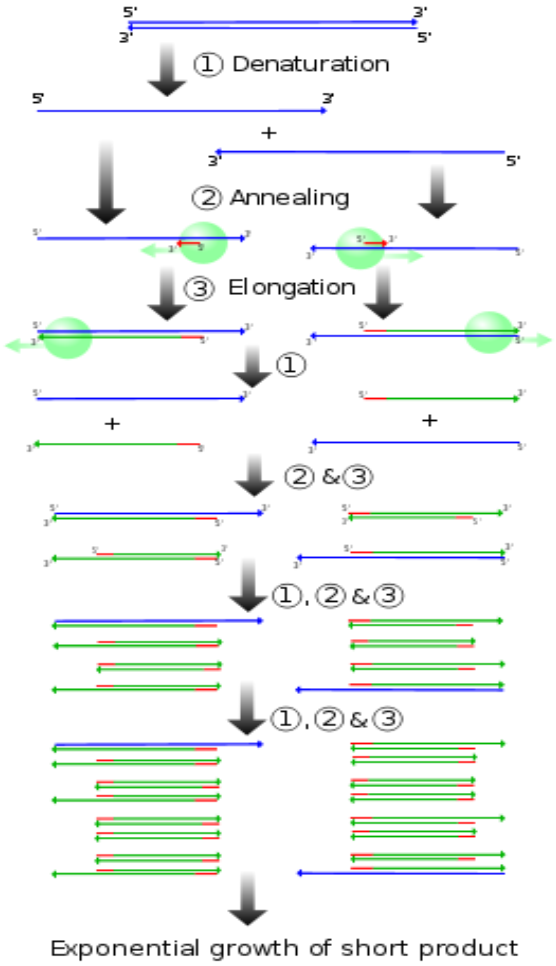


Abbildung 1: Schematischer Ablauf einer PCR-Reaktion[164]

3.2.3.2 Quantitative RT-PCR und Detektionsformate

Wird eine PCR anhand von durch reverse Transkription aus RNA erstellter cDNA durchgeführt, so spricht man von einer RT-PCR. Dieses Vorgehen hat meist eine Quantifizierung der eingesetzten cDNA und damit der komplementären RNA zum Ziel, und setzt wiederum den Einsatz der Real-Time-PCR-Technik voraus. Mit dieser lässt sich fluorimetrisch der DNA-Gehalt einer Probe in Echtzeit im Verlauf einer PCR erfassen. Ist dieser bekannt, so ist eine Rückrechnung auf die Ausgangsmenge einer spezifischen, in der Probe enthaltenen cDNA möglich.

Es existieren unterschiedliche Techniken und Formate, um die fluorimetrische Detektion von DNA zu ermöglichen, von denen in dieser Arbeit zwei angewandt wurden:

SYBR Green I: Diese Substanz gehört zur Gruppe der interkalierenden Farbstoffe und besitzt die Eigenschaft, sich in die „minor groove“ doppelsträngiger DNA einzulagern. Wird SYBR Green I mit blauem Licht einer Wellenlänge von 494 nm angeregt, so emittiert es dieses wieder im grünen Bereich des Spektrums bei 521 nm. Im an doppelsträngige DNA gebundenen Zustand verstärkt sich die Intensität der emittierten Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein Vielfaches. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist dabei direkt proportional zur Menge des gebundenen SYBR Greens, welches wiederum proportional zur Menge der in der Probe vorhandenen doppelsträngigen DNA ist. Die Fluoreszenz wird im Verlauf der Amplifikation jeweils am Ende der Elongationsphase eines jeden Zyklus gemessen, da zu diesem Zeitpunkt die maximale Menge doppelsträngiger DNA vorliegt. Derjenige Zyklus, in welchem sich die Probenfluoreszenz erstmalig signifikant von der Hintergrundfluoreszenz abhebt wird als Cp (Crossing Point) definiert und zeichnet sich durch eine in jeder Probe konstante DNA-Menge aus.

Nachteilig beim Einsatz von SYBR Green I ist, dass es mit jeglicher doppelsträngiger DNA interkaliert. So können auch unerwünschte Nebenprodukte, wie beispielsweise Primerdimere ein Fluoreszenzsignal emittieren, welches das Ergebnis der PCR verfälscht. Teilweise kompensieren

lässt sich dieser Nachteil durch die Möglichkeit der Erstellung einer Schmelzkurve der Proben im Anschluss an die PCR.

TaqMan Sonden: Die Funktionsweise von TaqMan-Sonden beruht darauf, dass an eine Oligonukleotid-Sonde am einen Ende eine Reporter- und am anderen eine Quencher-Substanz gekoppelt sind. Der Reporter, ein Fluoreszein-Derivat, fluoresziert bei Anregung in einer spezifischen Wellenlänge, welche gemessen werden kann. Jedoch werden die Fluoreszenzeigenschaften des Reporters bei räumlicher Nähe eines Quenchers, eines Rhodamin-Derivats, durch sogenannten Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), eine Form der strahlungsfreien Energieübertragung, unterdrückt. Diese räumliche Nähe ist durch die Bindung beider Moleküle an dasselbe Oligonukleotid gegeben.

Die Nukleotidsequenz der Sonde wird so gewählt, dass sie im Bereich der Zielsequenz zwischen den Primern an die Matrizen-DNA bindet. Synthetisiert nun die DNA-Polymerase während der Elongationsphase eines PCR-Zyklus von einem Primer ausgehend einen komplementären Strang und stößt dabei auf eine gebundene Sonde, so wird die 5‘-Exonuklease-Aktivität der Polymerase aktiviert, was zur Hydrolyse der Sonde führt. Dadurch wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher aufgehoben und der FRET unterbrochen, was unmittelbar zum Anstieg der Fluoreszenz führt. Die Probenfluoreszenz wird am Ende jeder Elongationsphase der Amplifikation gemessen und ist proportional zur Menge neu synthetisierten Amplifikats. Wiederum definiert der erste Anstieg der Fluoreszenz über den Hintergrund den Cp-Wert, welcher zur späteren Quantifizierung herangezogen werdeen kann.

3.2.3.3 Theorie der PCR-Quantifizierung

Im Verlauf einer Real-Time-PCR wird am Ende der Elongationsphase eines jeden Zyklus, wenn ein Maximum an doppelsträngiger DNA vorliegt, die Fluoreszenz jeder Probe gemessen. Die Werte werden gespeichert und lassen sich graphisch in einem Diagramm gegen die zugehörigen Zykluszahlen auftragen (Abbildung 11). Die dabei entstehende Kurve repräsentiert die unterschiedlichen Phasen einer PCR mit zunächst exponentieller Zunahme der Fluoreszenz, dann jedoch Übergang in ein Plateau (durch kompetitive

Hemmung der Amplifikation, Degradation der Polymerase, Verschiebung des pH-Werts und verminderte Edukt-Konzentrationen). Um verschiedene Proben quantitativ vergleichen zu können, muss in jeder PCR ein Zeitpunkt bekannt sein, zu welchem jede Probe dieselbe Menge Amplifikat enthält. Dieser Zeitpunkt muss in der exponentiellen Phase der PCR liegen, da nur hier die optimalen Reaktionsbedingungen vorliegen. Zu diesem Zweck wird der sogenannte Cp-Wert (Crossing Point) definiert (s.o.), welcher denjenigen Zyklus beschreibt, in welchem die emittierte Fluoreszenz einer Probe erstmalig über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Je früher der Cp in einer Probe eintritt, desto höher war die Konzentration der Ziel-DNA im Ausgangsmaterial.
Für die Quantifizierung der einzelnen Zielgene wird für jede Probe auch die Expression eines sogenannten Referenz- oder Housekeeping-Gens bestimmt, gegen welche die Expressionen der Zielgene normalisiert werden können. Ein ideales Housekeeping-Gen sollte in allen Zellproben konstant exprimiert werden und selbst keiner Regulation unterliegen. In der vorliegenden Arbeit wurde als Housekeeping-Gen GAPDH verwendet, welches als Regulator der Glykolyse von allen Zellen konstitutiv exprimiert wird.

3.2.3.4 Auswahl der Primer

Für die Zielgene TropI, cAct, MLC, sowie für GAPDH wurden PCR-Protokolle auf Basis von TaqMan-Sonden etabliert. Zunächst wurden die mRNA-Referenz-Sequenzen der Zielgene über die Suchfunktion der NCBI-Homepage „Nucleotide“ recherchiert. Die entsprechenden, den Zielgenen eindeutig zugeordneten NM-Nummern wurden zur Auswahl von Primern und PCR-Sonde auf der Internetseite „Universal ProbeLibrary“ der Firma Roche eingesetzt. Deren Suchfunktion erkennt anhand der NM-Nummer das gewünschte Zielgen der PCR und schlägt für dieses mehrere mögliche Kombinationen aus Primerpaaren und zugehörigen PCR-Sonden vor. Für jedes der Zielgene wurde ein Primerpaar ausgewählt, welches die Spleißstelle eines Introns in der jeweiligen DNA-Sequenz überspannte, was später eine sichere Differenzierung von cDNA und eventuell noch vorhandener genomischer DNA erlaubte. Die Primer wurden jeweils über die Firma Metabion in HPLC-gereinigter Qualität bezogen, die entsprechenden Sequenzen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Primersequenzen, Sonden und Amplifikatlängen der TaqMan-PCRs

Zielgen	Primersequenz (5' → 3')	Sonde Nr.	Amplifikatlänge [bp]
GAPDH NM_002046.2	AGCCACATCGCTCAGACAC GCCCAATACGACCAAATCC	60	66
Trop I NM_000363.3	AGGAGGACACCGAGAAGGA CAGTGCATCGATGTTCTTCC	10	62
cAct NM_005159.3	GCTTCCGCTGTCCTGAGA ATGCCAGCAGATTCCATACC	11	61
MLC NM_000258	GGCAGAAGTGCTCCGTGT AGTCCATCATCTTGGTATTGAGC	60	65

3.2.3.5 Der LightCycler

Das in dieser Arbeit zur Durchführung der quantitativen RT-PCR eingesetzte LightCycler Instrument ist aus einem Thermocycler und einer optischen Einheit aufgebaut. Der Thermocycler hat die Aufgabe, während der PCR die optimale Temperatur der Proben sicherzustellen, während über die optische Einheit die Fluoreszenzmessungen durchgeführt werden.

Die Regulation der Probentemperatur erfolgt im LightCycler im Gegensatz zu konventionellen Block-Cyclern über das Einblasen von entsprechend temperierter Luft. Dies wird durch einen Propeller erreicht, welcher Raumluft von außen ansaugt und über eine Heizspirale in das Innere des Geräts leitet. Dieses Verfahren ermöglicht eine sehr schnelle und präzise Änderung der Probentemperatur von bis zu 20°C/s bei einer Genauigkeit von ±0,3°C. Die schnelle Temperaturanpassung wird weiterhin begünstigt durch das große Verhältnis von Oberfläche zu Volumen der die Proben beinhaltenden Glaskapillaren. Die Detektion des Fluoreszenzsignals der Proben erfolgt über die optische Einheit des LightCyclers. Dabei wird das Probenkarussell durch einen Schrittmotor so eingestellt, dass sich die gewünschte Kapillare über der Linse der optischen Einheit befindet, wo der Fluoreszenzfarbstoff der Probe durch eine Photodiode angeregt wird. Die durch die Anregung hervorgerufene

Fluoreszenz wird wiederum an der Spitze der Kapillare durch einen Detektor gemessen. Die Messzeit liegt für jede Kapillare bei etwa 20 Millisekunden.

3.2.3.6 Protokoll der SYBR Green I-basierten PCRs

Die PCR-Experimente für Oct-4, Sox2, Nanog und DPPA4, sowie für LPL, PPAR-γ, ALP, Coll2 und GAPDH wurden mit kommerziell erhältlichen Kits der Firma Search-LC durchgeführt, welche einen stabilen und reproduzierbaren Ansatz garantiert. Die Protokolle für die entsprechenden PCR-Experimente wurden dabei vom Hersteller vorgegeben. Die Kits enthielten die benötigten Primer als Fertigmischung zusammen mit der optimalen Magnesiumchloridkonzentration. Des Weiteren wurden Positivkontrollen und Standards, sowie PCR-geeignetes Wasser (Nuklease-, DNA-, sowie RNA-frei) mitgeliefert.

Tabelle 4: Zielgene und Amplifikatlängen der SYBR Green I-basierten PCRs

Zielgen	**Amplifikatlänge [bp]**
GAPDH	304
PPAR-γ	286
LPL	283
ALP	151
Coll2	163
Oct-4	289
Sox2	143
Nanog	204
DPPA4	162

Zur Durchführung der PCR wurden zunächst alle Komponenten, sowie die zu untersuchenden Proben aufgetaut und auf Eis kühl gehalten. Zusätzlich wurden die Komponenten des LightCycler FastStart DNA Master SybrGreen I-Kits aufgetaut, welches die erforderliche DNA-Polymerase, sowie das SYBR Green I als Enzymmix enthielt. Dann wurde gemäß dem von Search-LC vorgegebenen Protokoll ein Mastermix erstellt. Dieser bestand pro Einzelansatz aus:

Tabelle 5: Pipettierschema der SYBR Green I-basierten PCRs

Komponente	**Volumen pro Ansatz**
H_2O	6 µl
Primer Set	2 µl
Enzymmix	2 µl
Gesamtvolumen Mastermix	**10 µl**
cDNA-Probe	10 µl
Gesamtvolumen pro Kapillare	**20 µl**

Vom Mastermix wurden jeweils 10 µl in eine LightCycler-Kapillare vorgelegt, und anschließend mit demselben Volumen der 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnten cDNA-Probe ergänzt.

Zur Vermeidung von Luftblasen im Reaktionsgemisch wurden die Kapillaren vor dem Einsetzen in das LightCycler-Karussell bei 650 x g für 30 s zentrifugiert.

Für jede Probe wurden Doppelbestimmungen in zwei separaten Kapillaren durchgeführt. Des Weiteren wurden in jedem PCR-Experiment zwei Negativkontrollen mit Wasser anstelle von cDNA-Lösung, sowie zwei Positivkontrollen mit der im Kit mitgelieferten Kontroll-cDNA mitgeführt. Außerdem wurde in jedem Lauf, wie in der Kitanleitung beschrieben, eine Standardverdünnungsreihe mit den mitgelieferten Standards mitgeführt.

Das jeweilige PCR-Experiment selbst wurde nach einem von Search-LC vorgegebenen Temperaturprotokoll durchgeführt:

Tabelle 6: Temperaturprotokoll der SYBR Green I-basierten PCRs

Phase		Temperatur [°C]	Zeitdauer [s]
Prä-Inkubation		95	600
Amplifikation (42 Zyklen)	Denaturierung	95	10
	Primerhybridisierung	68-58 (touchdown)	10
	Elongation	72	16
Schmelzkurve		58-95	0,1°C/s
Kühlen		40	30

Im Anschluss an eine Realtime-PCR auf Basis von SYBR Green I konnte eine sogenannte Schmelzkurve des PCR-Produkts erstellt werden. Dazu wurden die Proben zunächst auf 58°C gekühlt, was zum vollständigen Vorliegen der PCR-Produkte in doppelsträngiger Form führte. Dann wurde die Temperatur mit einer Geschwindigkeit von 0,1°C/s auf 95°C angehoben und dabei permanent die Fluoreszenzen aller Proben aufgezeichnet. Im Verlauf des Temperaturanstiegs kam es im Moment des Erreichens der Schmelztemperatur des spezifischen Produktes durch Freisetzung des SYBR Greens zu einem rapiden Abfall der Fluoreszenz der betreffenden Probe. Wurde nun ein Diagramm aus Temperaturwerten und Fluoreszenzintensitäten erstellt, so konnte daraus durch Vergleich mit einer mitgeführten Positivkontrolle die Spezifität des PCR-Produkts, beziehungsweise das Vorliegen oder die Abwesenheit von Nebenprodukten nachgewiesen werden. Spezifische Produkte zeigten dabei meist einen schmalen und spitzen Peak, da sie eine einheitliche Länge und Basenzusammensetzung besitzen. Dagegen bildeten unspezifische Produkte, wie beispielsweise Primerdimere, aufgrund ihrer Heterogenität eher breite, flache Peaks.
Zum Abschluss jedes PCR-Experiments wurden die Proben auf 40°C gekühlt, um sie gefahrlos aus dem Gerät entnehmen zu können.

3.2.3.7 Protokoll der TaqMan-basierten PCRs

Zunächst wurden die Primer, die TaqMan-Sonden und die Komponenten des LightCycler® TaqMan® Master-Kits langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurde in einem Eppendorf-Gefäß ein Mastermix aus Wasser, Primern, Sonde und Enzymlösung hergestellt. Dieser enthielt pro Einzelansatz:

Tabelle 7: Pipettierschema der TaqMan-basierten PCRs

Komponente	**Volumen pro Ansatz**	**Finale Konzentration**
H_2O	10,4 µl	
Primer upstream	0,2 µl	500 nM
Primer downstream	0,2 µl	500 nM
TaqMan-Sonde	0,2 µl	100 nM
Enzymmix	4,0 µl	
Gesamtvolumen Mastermix	**15,0 µl**	
cDNA-Probe	5,0 µl	
Gesamtvolumen pro Kapillare	**20,0 µl**	

Vom Mastermix wurden jeweils 15 µl in eine LightCycler-Kapillare vorgelegt. Dann wurden weitere 5 µl der jeweils 1:10 verdünnten cDNA-Proben zugegeben und die Kapillare vor dem Einsetzen in das LightCycler-Karussell bei 650 x g für 30 s zentrifugiert.

Für alle durchgeführten TaqMan-PCRs erwies sich nach ausführlicher Testung unterschiedlicher Einstellungen folgendes Temperaturprotokoll als optimal:

Tabelle 8: Temperaturprotokoll der TaqMan-basierten PCRs

Phase		Temperatur [°C]	Zeitdauer [s]
Prä-Inkubation		95	600
Amplifikation (42 Zyklen)	Denaturierung	95	10
	Primerhybridisierung	60	30
	Elongation	72	1
Kühlen		40	30

3.2.4 Gelelektrophorese

Zum Nachweis der Spezifität wurde für jede PCR exemplarisch ein Teil der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese analysiert. Das Prinzip dieser Technik

beruht darauf, dass die aufgrund ihrer Phosphatreste negativ geladenen DNA-Moleküle des PCR-Produkts in der netzartigen Struktur eines Agarosegels durch Anlegen einer elektrischen Spannung nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Kleinere Moleküle wandern dabei schneller als größere in Richtung der Anode. Nach dem Auftrennen können die Banden mittels Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

Für die Elektrophorese wurden die entsprechenden Proben nach der PCR aus dem LightCycler entnommen, der Deckel vorsichtig entfernt, und die Kapillaren umgekehrt in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße gesteckt. Durch Zentrifugation bei 650 x g für 30 s wurde das PCR-Produkt in das Gefäß überführt. Jeweils 10 µl des PCR-Produkts wurden mit 1 µl Ladepuffer gemischt und vorsichtig in die Taschen eines vorgefertigten 2%igen, in TAE-Puffer (40mM Tris-Acetat, pH 7,5, 2mM Na-EDTA) liegenden Agarosegels pipettiert. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte durch Anlegen einer Gleichspannung (150 V) an die Elektrophoresekammer.

Nach einer Stunde wurde das Gel nach Abschalten der Spannung aus dem Puffer genommen, für 10 Minuten in Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml) gefärbt und anschließend unter UV-Licht beurteilt. Die durch das Ethidiumbromid angefärbten DNA-Banden wurden dabei visuell sichtbar und konnten fotografiert und dokumentiert werden.

Bei jeder Elektrophorese wurde ein Marker mit Banden einer bekannten Größe mitgeführt, hierfür wurden entweder die DNA Molecular Weight Marker V oder XIV von Roche eingesetzt. Diese ermöglichten durch Vergleich mit den Banden der PCR-Produkte eine Abschätzung der Amplifikatlänge.

3.2.5 Herstellung der externen Standards für die TaqMan-PCRs

Für die mittels TaqMan-Sonden durchgeführten PCR-Experimente auf die Zielgene TropI, cAct, MLC, sowie GAPDH wurden jeweils zur Überprüfung von Sensitivität und PCR-Effizienz mittels Regressionsverdünnung externe Standards hergestellt. Diese wurden aus zuvor erstellten PCR-Produkten aufgearbeitet.

Zunächst wurde für jedes der Zielgene ein PCR-Lauf mit lediglich einer Positivkontrolle (revers transkribierte humane Herz-RNA, Stratagene) durchgeführt. Die dabei gewonnenen PCR-Produkte wurden, wie unter 3.2.4 beschrieben, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die in der spezifischen Bande jedes PCR-Produkts enthaltene DNA wurde anschließend unter Einsatz des QIAEX II Gel Extraction Kits rückgewonnen, die Konzentration bestimmt, und in einer zweiten PCR für die Erstellung der Regressionsgeraden eingesetzt.

3.2.5.1 Herstellung der Standards mittels QIAEX II Gel Extraction Kits

Nach Durchführung einer Gelelektrophorese wurden zunächst die spezifischen Banden der PCR-Produkte mittels eines sterilen Skalpells aus dem Agarosegel herausgetrennt und gewogen. Dann wurden in einem 2 ml-Eppendorf-Gefäß zu je 100 mg Agarosegel 600 µl des im Kit enthaltenen Puffers QX1, sowie insgesamt 10 µl QIAEX II-Suspension hinzugefügt. Diese Mischung wurde für 10 Minuten bei 50°C inkubiert, wobei sich das Agarosegel im Puffer löste, was wiederum eine Bindung der darin enthaltenen DNA-Moleküle an die QIAEX II-Partikel ermöglichte. Nach vollständiger Lösung der Agarose wurden die Proben abzentrifugiert und die QIAEX II-Partikel zunächst mit QX1-Puffer, dann zweimal mit PE-Puffer (im Kit enthalten) gewaschen. Durch diese Waschschritte wurden Agarosereste, Ethidiumbromid, sowie eventuell enthaltene Bestandteile des Elektrophoresepuffers entfernt und somit die PCR-Produkte aufgereinigt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand vollständig abpipettiert, das QIAEX II-Pellet für 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, dann 20 µl nukleasefreies Wasser hinzugefügt. Dies führte pH-abhängig zur erneuten Lösung der DNA im Wasser, welches nach einem weiteren Zentrifugationsschritt vom Pellet abgenommen werden konnte.
Die DNA-Konzentration dieser Lösung wurde nun, nach demselben Verfahren wie für RNA beschrieben (3.2.1.2), photometrisch bestimmt.

3.2.6 Erstellung der Regressionsgeraden für die TaqMan-PCRs

Zunächst wurde aus der bekannten DNA-Konzentration der aufgereinigten PCR-Produkte und der bekannten Amplifikatlänge die Anzahl der enthaltenen Kopien nach folgender Formel berechnet[165]:

1000bp dsDNA = 9,1 * 10^{11}Kopien/µg

Von den errechneten Kopienzahlen ausgehend, wurden für jedes Zielgen logarithmische Verdünnungsreihen von 10^{8}-10^{1} Kopien/µl erstellt. Mit diesen wurden unter Mitführung von Negativkontrollen PCR-Experimente nach dem Protokoll des jeweiligen Zielgens durchgeführt. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurde dabei die Standardverdünnungsreihe für jedes Zielgen mehrfach in mindestens Triplikaten erstellt.

Über die LightCycler-Software wurden die Daten ausgewertet. Dabei war die Linearität der PCR-Assays über den gesamten Konzentrationsbereich anhand des „Error"-Werts ersichtlich. Des Weiteren konnte die Sensitivität anhand der bekannten absoluten Kopienkonzentrationen abgeschätzt werden. Die PCR-Effizienz E jedes PCR-Laufs wurde aus der Steigung c der Regressionsgeraden nach der Formel $E=10^{-1/c}$ errechnet.

Eine Effizienz von 2,0 entsprach dem optimalen Fall einer Verdoppelung der Zielsequenz in jedem Amplifikationszyklus. Voraussetzung für die Errechnung aussagekräftiger Expressionswerte sind möglichst ähnliche PCR-Effizienzen von Zielgenen und Housekeeping-Gen.

3.2.7 PCR-Quantifizierung, Auswertung und Statistik

Die graphische Darstellung der PCR-Kinetik, der Schmelzkurven, sowie die Erstellung der Regressionsgeraden zur Effizienzbestimmung erfolgten mit Hilfe der LightCycler-Software (Version 3.5). Die CP-Werte der RT-PCRs konnten aus der LightCycler-Software in die Programme Microsoft Office Excel 2007 und REST exportiert und mit diesen ausgewertet werden.

3.2.7.1 Berechnung von Genexpressionen

Die Expressionen der Zielgene einer Probe wurde nach der ΔCP-Methode durchgeführt[166]. Die entsprechende Formel lautet:

$$\text{Expression} = 2^{-(\text{CP Zielgen-CP Referenzgen})}$$

Der Expressionswert gibt dabei die Expression des Zielgens in Vielfachen, respektive Bruchteilen der Expression des Referenzgens an. Zur Quantifizierung der PCRs mittels Expressionswerten wurden die Rohdaten in Form von CP-Werten in ein Microsoft Office Excel Arbeitsblatt übernommen (Microsoft Excel 2007). Dies ermöglichte die Berechnung der Werte mit der oben genannten Formel.

3.2.7.2 Berechnung der Geninduktionen

Die Induktionen der Zielgene wurden nach einer von Pfaffl *et al.* publizierten Formel berechnet. Diese beinhaltet eine rechnerische Korrektur von Unterschieden in den PCR-Effizienzen (E) von Zielg- und Referenzgen[166]:

$$\text{Induktion} = \frac{(\text{E Zielgen})^{\wedge}\,\text{CP Zielgen (Kontrolle- Behandlung)}}{(\text{E Referenzgen})^{\wedge}\,\text{CP Referenzgen (Kontrolle- Behandlung)}}$$

Der Induktionswert gibt die Regulation des Zielgens einer behandelten Probe (im vorliegenden Fall differenzierte Zellen) relativ zu einer unbehandelten Kontrollprobe (undifferenzierte MSCs) der gleichen Passage an.

Die Berechnungen der Geninduktion wurde mit Hilfe des von Pfaffl *et al.* für die relative Quantifizierung von PCR-Daten entwickelten Programms REST 2008 durchgeführt, welchem die oben für die Berechnung von effizienzkorrigierten Geninduktionen genannte Formel zugrunde liegt. Der Einsatz von REST ermöglicht bei Mehrfachbestimmungen gleichzeitig die Überprüfung der statistischen Signifikanz von Genregultionen[167]. Als statistisch signifikant wurden in der vorliegenden Arbeit p-Werte von <0,05 angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der MSCs

4.1.1 Zellmorphologie der der untersuchten MSC-Populationen im Verlauf der Langzeitkultur

Zum Vergleich der Zellmorphologie der einzelnen MSC-Populationen im Verlauf der Kultur wurden in jeder Passage lichtmikroskopische Bilder aufgenommen.
In den frühen Passagen P0 und P2 zeigten die adhärent wachsenden MSCs eine schmale, spindelförmige Struktur, wobei insbesondere die Primärkultur in P0 eine zum Teil heterogene Zellmorphologie aufwies. Ab P4 begannen sich die Zellen bei gleichzeitiger Zunahme ihrer Größe zu verbreitern. Diese Tendenz verstärkte sich bis in P6, wobei die Proliferationsgeschwindigkeit stetig abnahm und auch nach langer Passagedauer keine Konfluenz mehr erreicht wurde (Abbildung 2).

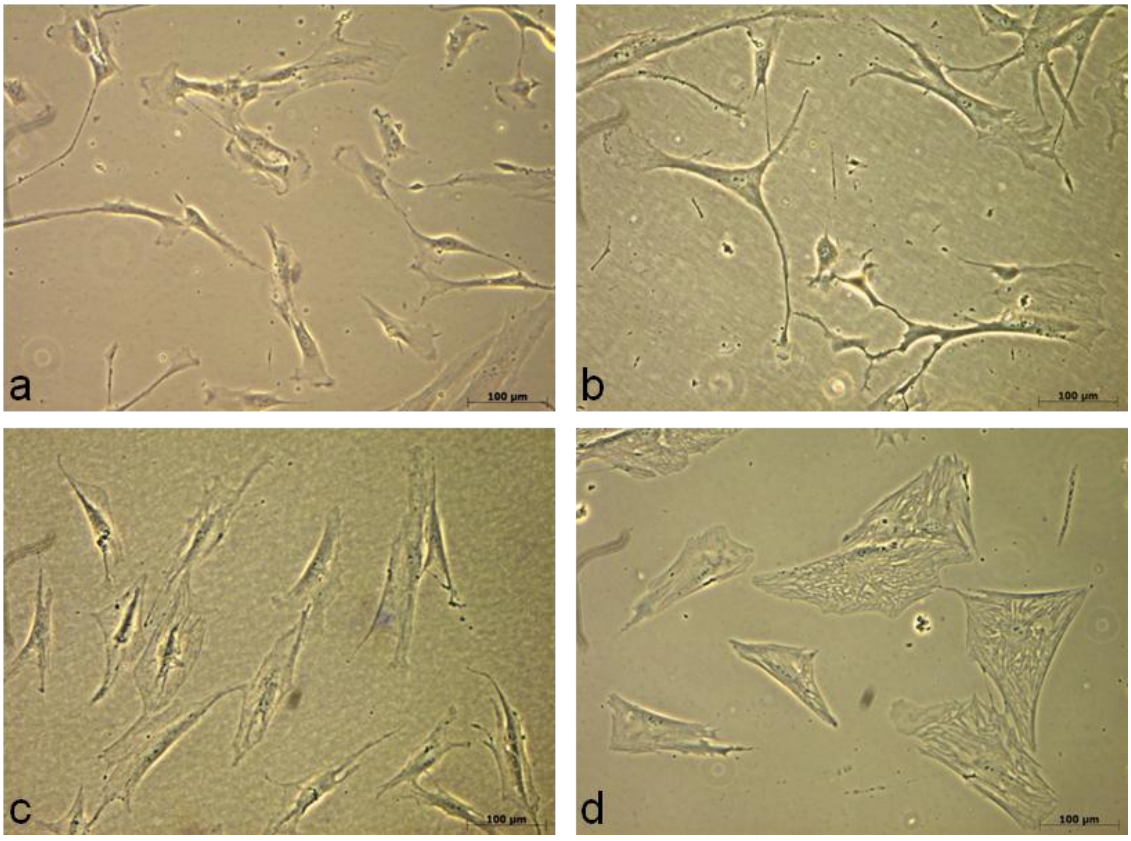


Abbildung 2: Undifferenzierte MSCs im Verlauf der Langzeitkultur
Native Aufnahmen ungefärbter MSCs in den Passagen P0 (a), P2 (b), P4 (c) und P6 (d), jeweils in 100-facher Vergrößerung.

4.1.2 Adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung: Nachweis mittels Färbung

In den adipogen differenzierten Zellen wurden die intrazellulären lipidhaltigen Vakuolen mit Oil-Red-O rot angefärbt. Die adipogene Differenzierbarkeit nahm bei allen getesteten Zellpopulationen im Verlauf der Langzeitkultur kontinuierlich ab (Abbildung 3).

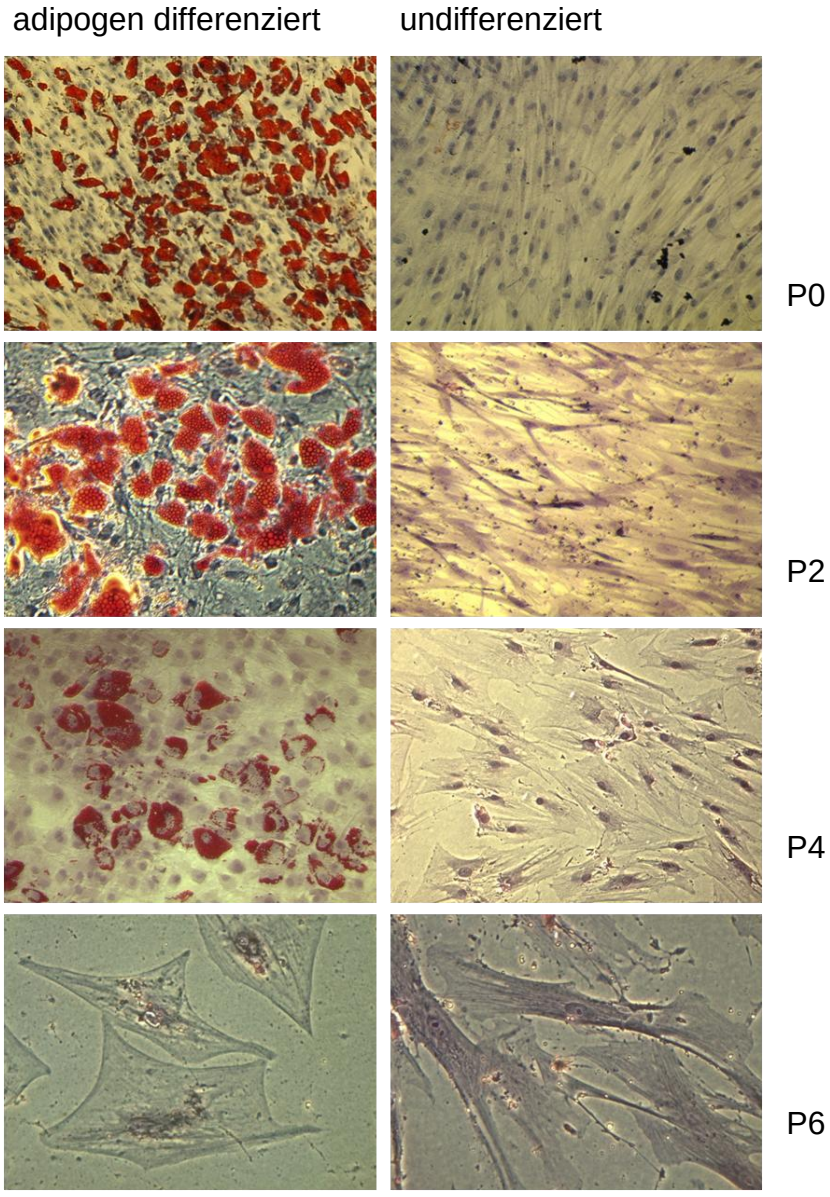


Abbildung 3: Adipogene Differenzierung im Verlauf der Langzeitkultur
Adipogene Differenzierung von MSCs (linke Spalte) und undifferenzierte MSCs (rechte Spalte) in den Passagen 0, 2, 4 und 6. Die Zellen wurden mit Oil-Red-O und Hämatoxylin angefärbt, und bei jeweils 100-facher Vergrößerung fotografiert.

In osteogen differenzierten Zellen wurde die exprimierte alkalische Phosphatase durch einen Farbumschlag nach pink nachgewiesen. Wie die adipogene Differenzierberkeit, nahm auch die osteogene Differenzierbarkeit der untersuchten MSCs im Verlauf der Kultur ab (Abbildung 4).

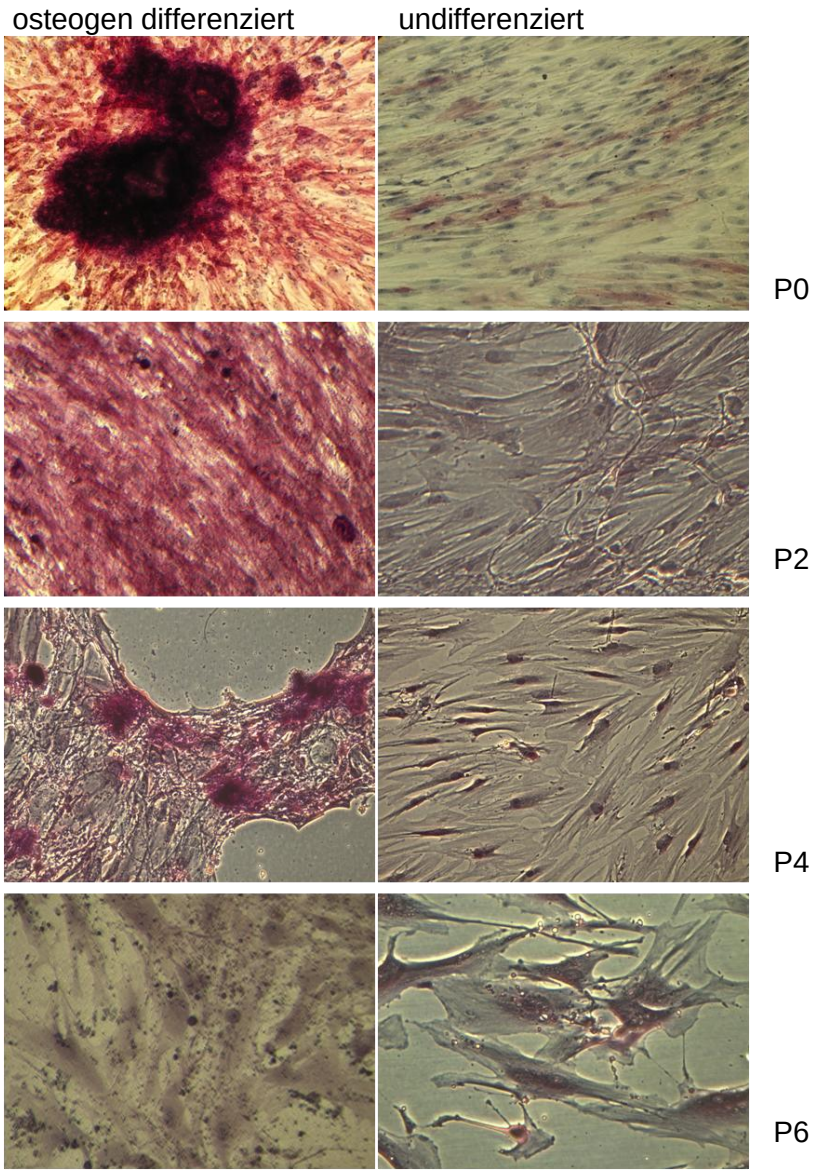


Abbildung 4: Osteogene Differenzierung im Verlauf der Langzeitkultur
Osteogene Differenzierung von MSCs (linke Spalte) und undifferenzierte MSCs (rechte Spalte) in den Passagen 0, 2, 4 und 6. Alkalische Phosphatase-positive Zellen stellen sich pink dar, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Jeweils in 100-facher Vergrößerung fotografiert.

Im chondrogen differenzierten Micromass-Pellet stellten sich die charakteristischen sauren Glykosaminoglykane unter Alcianblau-Färbung lichtmikroskopisch türkisblau dar (Abbildung 5).

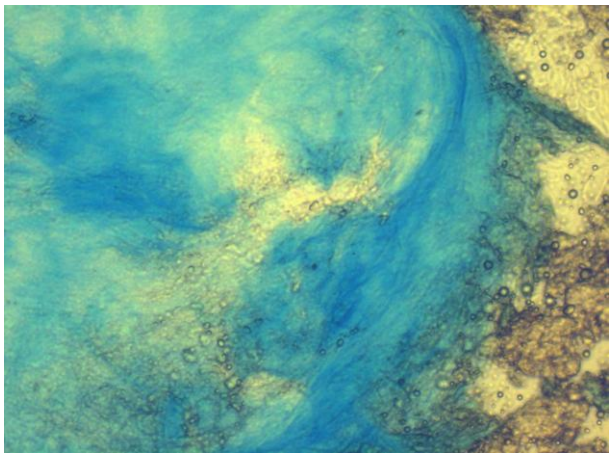


Abbildung 5: Chondrogen differenziertes Micromass-Pellet.
Die für die chondrogene Differenzierung charakteristischen Glykosaminoglykane stellen sich durch Alcianblau gefärbt türkisblau dar. (25-fach vergrößert)

4.1.3 Adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung: Nachweis mittels quantitativer RT-PCR

Zur Quantifizierung der adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierung wurde in den Passagen 2, 4 und 6 die Expression der jeweiligen charakteristischen Markergene in differenzierten, sowie in undifferenzierten MSCs bestimmt. Diese Untersuchungen wurden mittels quantitativer RT-PCR auf mRNA-Ebene durchgeführt.

Unter adipogener Differenzierung konnte für die beiden Zielgene PPAR-γ und LPL eine gegenüber den undifferenzierten Zellen signifikante Induktion gezeigt werden, welche jedoch mit zunehmender Passagenzahl eine abnehmende Tendenz aufwies (Abbildung 6, Abbildung 7). Für PPAR-γ nahm die konstitutive Expression in undifferenzierten Zellen von P2 auf P4 ab, undifferenzierte MSCs in P6 zeigten keine nachweisbare PPAR-γ-Genexpression mehr. Unter adipogener Differenzierung lagen die Werte signifikant höher, zeigten jedoch ebenfalls eine mit der Kulturdauer abnehmende Tendenz (Abbildung 6).

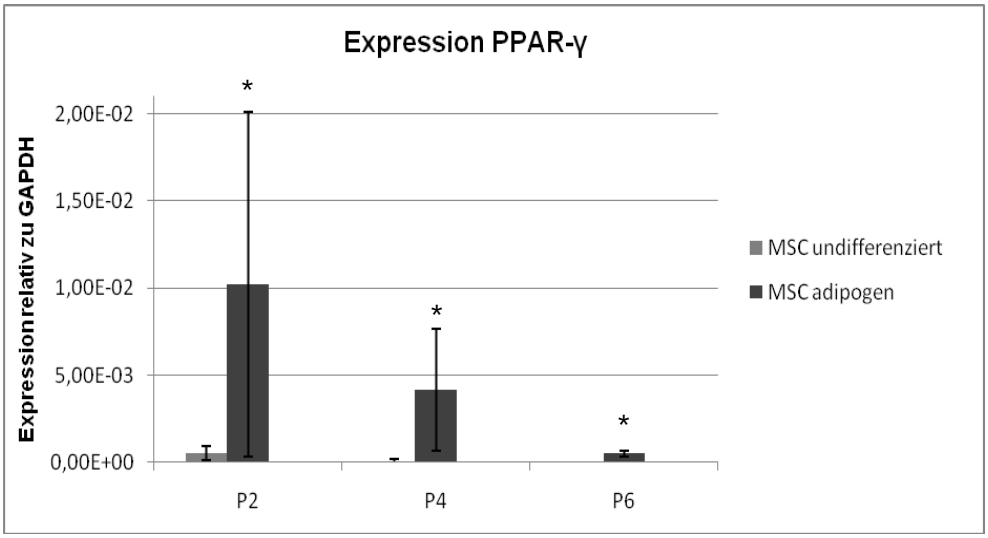


Abbildung 6: Expression von PPAR-γ
Expression durch undifferenzierte und adipogen differenzierte MSCs relativ zum Housekeeping-Gen GAPDH im Verlauf der Langzeitkultur. Mit * markierte Daten unterscheiden sich statistisch signifikant von der jeweiligen unbehandelten Kontrolle gleicher Passage

LPL-spezifische mRNA war in keiner der untersuchten Passagen in undifferenzierten Zellen nachweisbar. Jedoch konnte dieses Gen unter adipogener Differenzierung in P2 und P4 signifikant induziert werden (Abbildung 7).

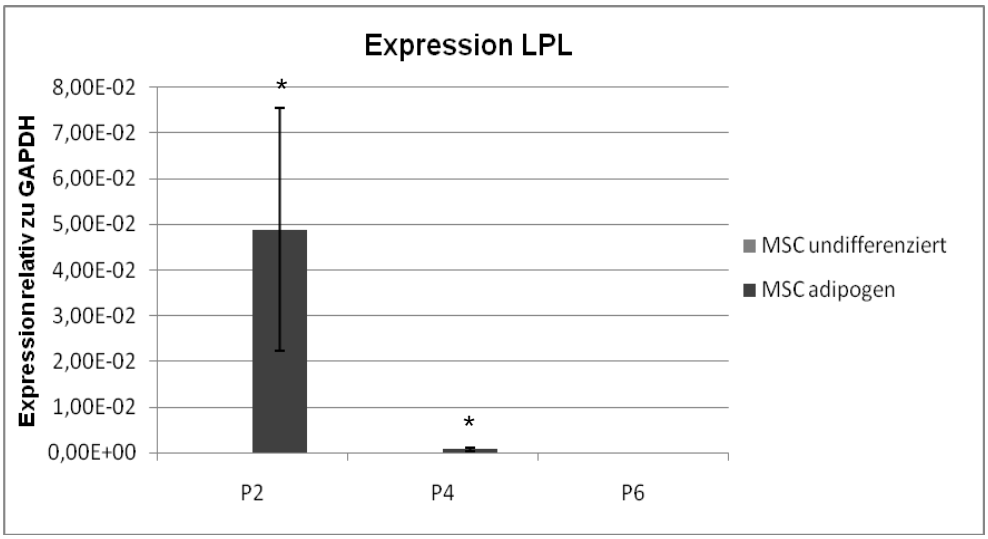


Abbildung 7: Expression von LPL
Expression durch undifferenzierte und adipogen differenzierte MSCs relativ zum Housekeeping-Gen GAPDH im Verlauf der Langzeitkultur. Mit * markierte Daten unterscheiden sich statistisch signifikant von der jeweiligen unbehandelten Kontrolle gleicher Passage

Zur Quantifizierung der Osteogenese wurde die Expression des in der zugehörigen Färbung auf Proteinebene nachgewiesenen Gens ALP mittels quantitativer PCR in undifferenzierten, sowie in osteogen differenzierten MSCs bestimmt.

Dabei zeigten auch die undifferenzierten MSCs eine deutliche konstitutive Expression von ALP auf mRNA-Ebene, welche in P2 diejenige der differenzierten Zellen übertraf. In P4 wurde ALP unter osteogener Differenzierung gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant induziert. Sowohl in osteogen differenzierten, als auch in undifferenzierten MSCs nahm die Expression von ALP mit zunehmender Kulturdauer ab (Abbildung 8).

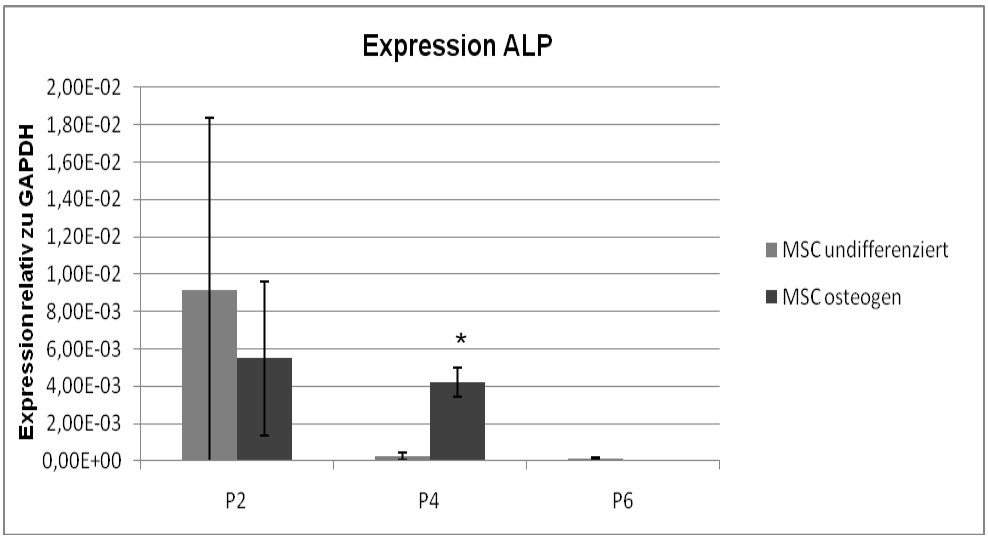


Abbildung 8: Expression von ALP
Expression durch undifferenzierte und osteogen differenzierte MSCs relativ zum Housekeeping-Gen GAPDH im Verlauf der Langzeitkultur. Mit * markierte Daten unterscheiden sich statistisch signifikant von der jeweiligen unbehandelten Kontrolle gleicher Passage

Zur Quantifizierung der chondrogenen Differenzierung wurde die Expression des Gens Coll2 in chondrogen differenzierten Monolayer-Kulturen, sowie in den zugehörigen undifferenzierten MSCs bestimmt.

Dabei zeigten die undifferenzierten MSCs eine von P2 auf P4 abnehmende Expression von Coll2, in P6 war diese nicht mehr nachweisbar. Im Gegensatz dazu zeigten die chondrogen differenzierten Zellen eine im Kulturverlauf nahezu

konstante Expression. Im Vergleich zwischen undifferenzierten und chondrogen differenzierten MSCs konnte lediglich in P6 eine signifikante Induktion von Coll2 unter Differenzierung gezeigt werden (Abbildung 9).

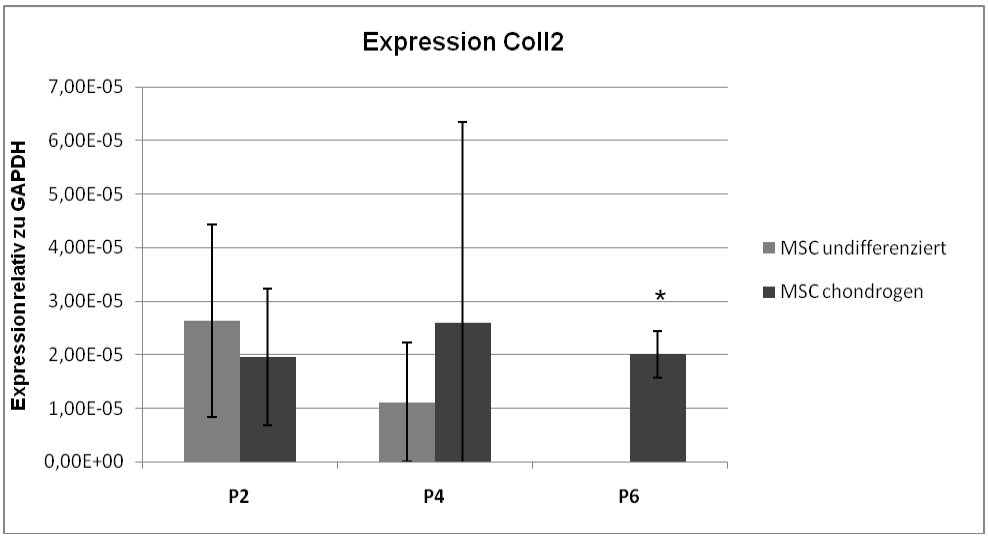


Abbildung 9: Expression von Coll2
Expression durch undifferenzierte und chondrogen differenzierte MSCs relativ zum Housekeeping-Gen GAPDH im Verlauf der Langzeitkultur. Mit * markierte Daten unterscheiden sich statistisch signifikant von der jeweiligen unbehandelten Kontrolle gleicher Passage

4.1.4 Flusszytometrische Antigenexpressionsanalyse

Die flusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker der in den Versuchen verwendeten MSC-Populationen erfolgte im Rahmen einer separaten Arbeit.
Dabei zeigte sich für alle verwendeten Populationen eine einheitlich hohe Expression von CD73, CD90 und CD105, sowie ein Fehlen der hämatopoetischen Marker CD11b, CD19, CD34, CD45 und HLA Klasse II.

4.2 Etablierung der TaqMan-basierten PCRs für kardiale Marker

4.2.1 Gelelektrophorese zum Nachweis der PCR-Spezifität

Für die neu etablierten PCR-Assays auf Basis von TaqMan-Sonden wurde die Spezifität durch Darstellung der spezifischen Produkte mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. Dabei wurde für jedes Zielgen das

PCR-Produkt einer Negativkontrolle (Wasser), einer aus undifferenzierten MSCs gewonnene Probe, sowie einer Positivkontrolle (humane Herz-cDNA) auf das Gel aufgetragen. In der fotografischen Auswertung zeigte sich jeweils eine einzelne Bande an der in Relation zum mitgeführten DNA-Längenmarker erwarteten Position (Tabelle 3). Semiquantitativ fielen die Banden der aus MSCs gewonnenen Proben schwächer aus als die der Positivkontrollen (Abbildung 10).

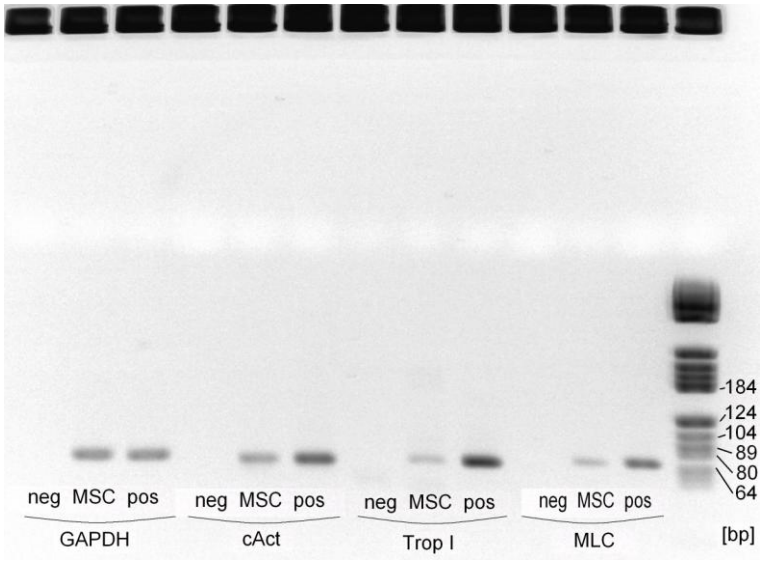


Abbildung 10: Gelelektrophorese der Produkte der TaqMan-basierten PCRs
Aufgetragen wurde für jedes Zielgen das PCR-Produkt einer Negativkontrolle (neg), einer aus undifferenzierten MSCs gewonnene Probe (MSC), sowie einer Positivkontrolle (pos). Das Originalfoto wurde zwecks deutlicherer Sichtbarkeit der Banden in Negativdarstellung abgebildet.

4.2.2 Sensitivität und Linearität der TaqMan-basierten PCRs

Aus den erstellten Regressionsgeraden konnte die absolute Sensitivität der PCR-Ansätze abgeschätzt werden. Im Rahmen aller TaqMan-basierten PCR-Experimente konnte eine Konzentration von 10 Genkopien/µl Ausgangsmaterial sicher detektiert werden (Abbildung 11).

Die einzelnen Regressionsgeraden zeigten einen über den gesamten Konzentrationsbereich linearen Verlauf mit nur geringer Streuung. Der von der LightCycler-Software errechnete Error-Wert war dabei wie gefordert stets <0,1.

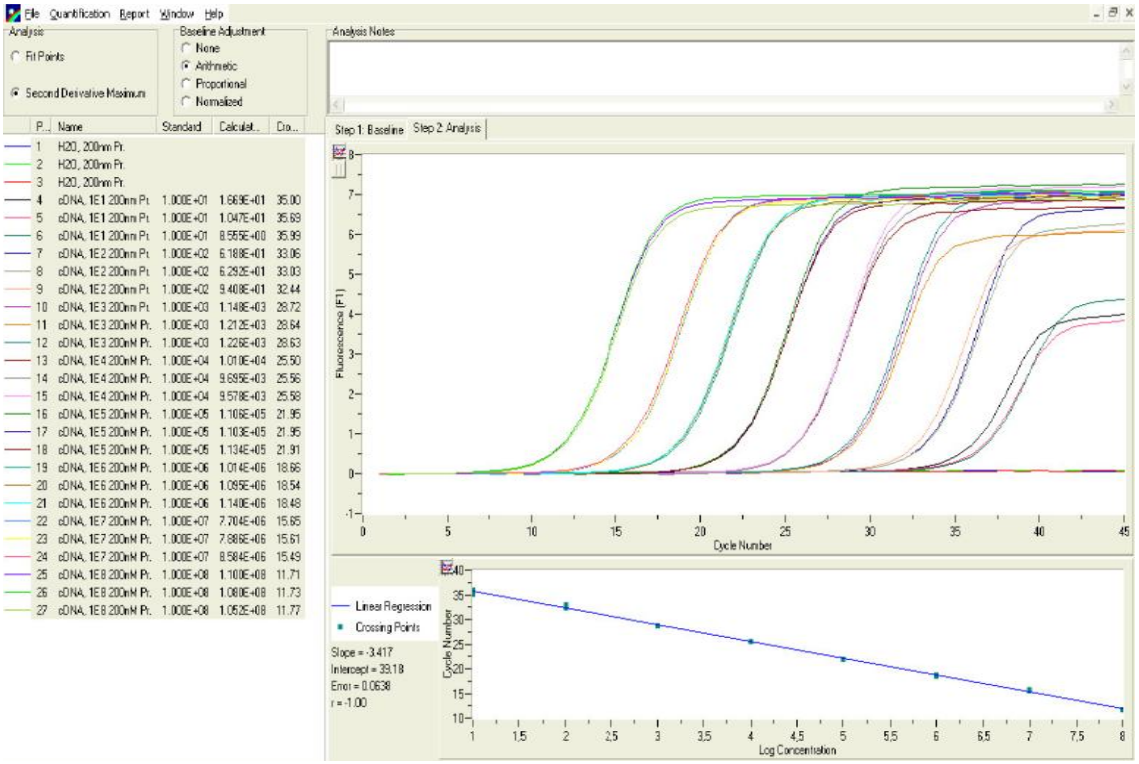


Abbildung 11: Regressionsgerade eines TaqMan PCR-Experiments
Eine repräsentative, mittels der LightCycler-Software erstellte und ausgewertete Regressionsgerade.

4.2.3 Effizienz der TaqMan-PCR-Assays

Die Effizienz der PCR-Assays konnte, wie oben beschrieben, aus den Steigungen der Regressionsgeraden berechnet werden. Zur Sicherstellung der Reproduzierbarkeit wurden für jedes Zielgen mehrere Regressionsgeraden erstellt und die Effizienzen gemittelt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Effizienzen der TaqMan-basierten PCRs

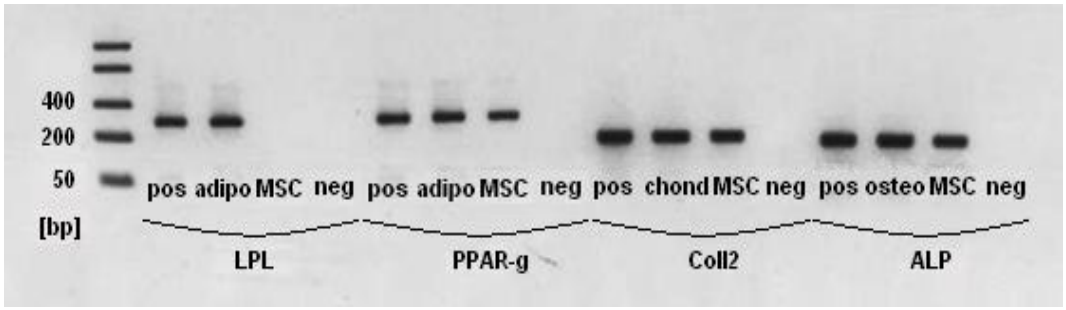
	GAPDH (n=4)	TropI (n=4)	cAct (n=5)	MLC (n=4)
Mittelwert Effizienz	1,908	1,959	1,841	1,787
Standardabweichung	0,033	0,057	0,039	0,043

4.3 Etablierung der SYBR Green I-basierten PCRs

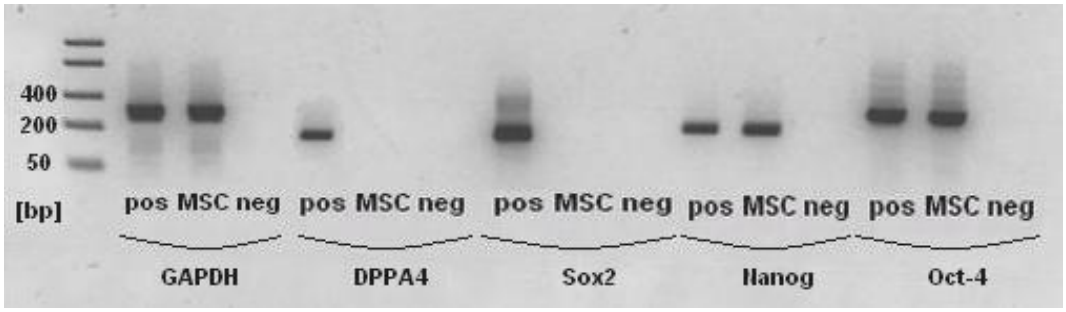
4.3.1 Spezifität der SYBR Green I-basierten Ansätze

Die PCR-Assays für Oct-4, Sox2, Nanog und DPPA4, sowie für LPL, PPAR-γ, ALP, Coll2 und GAPDH wurden mit kommerziell erhältlichen Kits der Firma Search-LC durchgeführt. Zur Sicherstellung der Spezifität wurden Produkte jeder PCR exemplarisch mittels Gelelektrophorese analysiert

Für alle Ansätze zeigte sich dabei eine hohe Spezifität mit jeweils einer einzelnen spezifischen Bande entsprechend der erwarteten Produktlänge (Abbildung 12, Tabelle 4).



a



b

Abbildung 12: Gelelektrophorese der Produkte der SYBR Green I-basierten PCR-Assays

a) Für jedes der Differenzierungs-Markergene wurde das PCR-Produkt einer Positivkontrolle (pos), einer aus der jeweiligen Differenzierung gewonnenen Probe (adipo, osteo, chond), einer aus undifferenzierten MSCs gewonnenen Probe (MSC), sowie eine Negativkontrolle (neg) aufgetragen.

b) Für jedes der untersuchten Multipotenz-assoziierten Gene, sowie für GAPDH wurde das PCR-Produkt einer Positivkontrolle (pos), einer aus undifferenzierten MSCs gewonnene Probe (MSC), sowie einer Negativkontrolle (neg) aufgetragen.

4.3.2 Effizienz der SYBR Green I-basierten Ansätze

Wie für die selbst etablierten TaqMan-basierten PCR-Assays, wurde auch für die kommerziell erworbenen PCR-Kits die jeweilige PCR-Effizienz bestimmt. Aus den mittels der in den Kits mitgelieferten Standards erstellten Regressionsgeraden errechneten sich folgende Effizienzen (Tabelle 10):

Tabelle 10: Effizienzen der SYBR Green I-basierten PCRs

	PPAR-γ (n=7)	LPL (n=7)	ALP (n=7)	Coll2 (n=7)
Mittelwert Effizienz	1,98	1,89	2,00	2,00
Standardabweichung	0,07	0,06	0,09	0,06

	GAPDH (n=16)	Oct-4 (n=3)	Nanog (n=3)	Sox2 (n=5)	DPPA4 (n=3)
Mittelwert Effizienz	1,93	1,89	1,98	1,88	2,00
Standardabweichung	0,08	0,06	0,14	0,07	0,07

4.4 Zellmorphologie und Proliferation unter kardiomyogener Differenzierung

4.4.1 Zellmorphologie unter kardiomyogener Differenzierung

Die in P1 mit den oben aufgeführten kardiomyogenen Differenzierungsprotokollen behandelten MSCs wurden wie auch die unbehandelten Kontrollen vor der zweiten Passage lichtmikroskopisch beurteilt und fotografisch dokumentiert. Eindeutige Veränderungen der Zellmorphologie zeigten dabei lediglich die mittels PDGF+FGF2+VEGF behandelten Zellen. Diese zeigten eine subkonfluente, netzfömige Wachstumsstruktur und intrazellulär gelegene Vakuolen. Des Weiteren zeigte diese Population an einzelnen Stellen knotenartig verdichtetes Wachstum (Abbildung 13), wohingegen die unbehandelten, beziehungsweise mit anderen Differenzierungsmedien behandelten MSCs einen unveränderten fibroblastoiden Phänotyp aufwiesen.

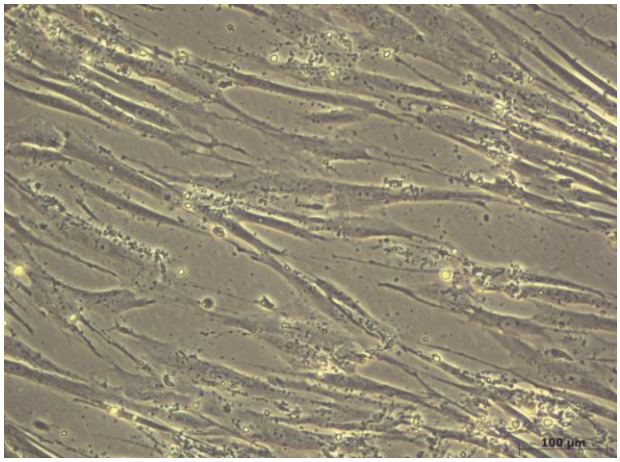


Abbildung 13: PDGF+FGF2+VEGF behandelte MSCs
Mikroskopische Ansicht nativer, mittels PDGF+FGF2+VEGF behandelter Zellen in P2, 100-fach vergrößert

4.4.2 Zellproliferation unter kardiomyogener Differenzierung

Die untersuchten MSCs zeigten im Verlauf der Langzeitkultur unter Behandlung mit den kardiomyogenen Differenzierungsmedien ein im Vergleich zu den unbehandelten MSCs deutlich verändertes Proliferationsverhalten. Am auffälligsten war dabei ein früheres Eintreten replikativer Seneszenz. Während dieser Zustand bei undifferenzierten MSCs erst in (je nach Population) P6 oder P7 erreicht wurde, war dies unter Behandlung mit ITAD in P5 und unter PDGF+FGF2+VEGF bereits in P2/P3 der Fall. Die anderen Behandlungen zeigten dagegen ein den undifferenzierten MSCs vergleichbares Proliferationsvermögen.

Detaillierte Analysen der Proliferationsgeschwindigkeit differenzierter und undifferenzierter MSCs wurden im Rahmen einer separaten Arbeit durchgeführt.

4.5 Expression kardialer Marker durch undifferenzierte und differenzierte MSCs

4.5.1 Konstitutive Expression kardialer Marker durch undifferenzierte MSCs

Die Analyse undifferenzierter MSCs mittels quantitativer RT-PCR bezüglich ihrer Expression der kardiomyogenen Markergene zeigte eine konstitutive Expression der für TropI, cAct und MLC kodierenden spezifischen mRNAs. Des Weiteren zeigte sich eine deutliche Variabilität dieser konstitutiven Expression im Verlauf der Langzeitkultur.

4.5.1.1 Konstitutive Expression von Troponin I

Die konstitutive Expression von TropI lag in den frühen und mittleren Passagen P0 bis P2 im Bereich von $3{,}9 \times 10^{-4}$ bis $5{,}81 \times 10^{-4}$ relativ zur Expression des Housekeeping-Gens GAPDH. In P3 erfolgte eine signifikante Downregulierung der Expression von TropI auf $1{,}66 \times 10^{-4}$, gefolgt von einem ebenfalls signifikanten Wiederanstieg in den späten Passagen P5 bis P7 in den Bereich $1{,}31\text{-}2{,}57 \times 10^{-3}$ (Abbildung 14).

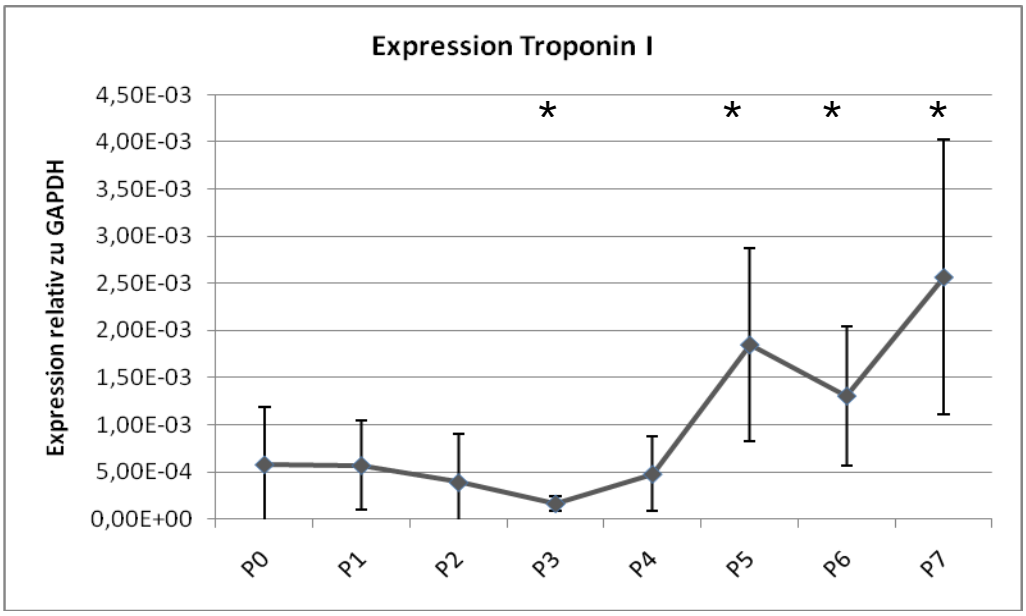


Abbildung 14: Konstitutive Expression von TropI durch MSCs
Die relative Expression mit Standardabweichung der für TropI kodierenden mRNA durch unbehandelte MSCs im Zeitverlauf. Auf der X-Achse wurden die einzelnen Passagen der Langzeitkultur, auf der Y-Achse die Genexpression relativ zum Housekeeping-Gen GAPDH aufgetragen. Zum Ausgangswert in P0 signifikante Veränderungen der Genexpression sind durch * markiert ($p<0{,}05$).

4.5.1.2 Konstitutive Expression von kardialem Aktin

Die konstitutive Expression von kardialem Aktin durch undifferenzierte MSCs zeigte während der Langzeitkultur einen zweigipfligen Verlauf. Der Ausgangswert der Expression lag dabei in P0 bei $5{,}35 \times 10^{-3}$ relativ zu GAPDH, stieg in P2 auf $3{,}26 \times 10^{-2}$, und fiel in den Passagen 3 und 4 zurück auf den Bereich des Ausgangswerts. In den Passagen 5 und 6 zeigte sich ein erneuter, wenn auch schwächerer, Anstieg der Aktin-Expression bis auf $1{,}63 \times 10^{-2}$ (Abbildung 15).

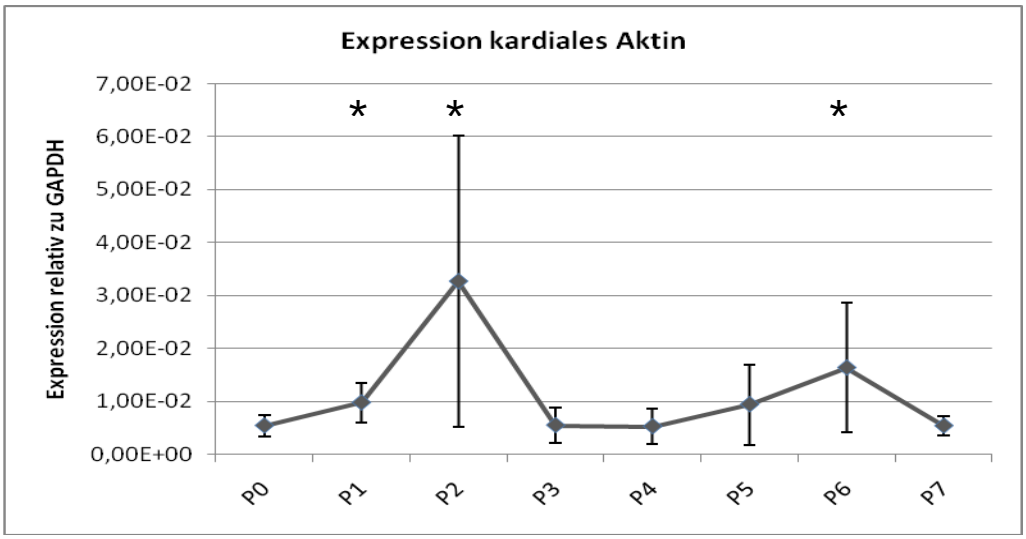


Abbildung 15: Konstitutive Expression von cAct durch MSCs
Die relative Expression mit Standardabweichung der für cAct kodierenden mRNA durch unbehandelte MSCs im Zeitverlauf. Auf der X-Achse wurden die einzelnen Passagen der Langzeitkultur, auf der Y-Achse die Genexpression relativ zum Housekeeping-Gen GAPDH aufgetragen. Zum Ausgangswert in P0 signifikante Veränderungen der Genexpression sind durch * markiert ($p<0{,}05$).

4.5.1.3 Konstitutive Expression von Myosinleichtketten

Unbehandelte MSCs zeigten im Verlauf der Langzeitkultur in den Passagen P0 bis P6 eine konstant niedrige Expression der für MLC kodierenden mRNA. Diese lag in P0 bei $3{,}07 \times 10^{-4}$ relativ zur Expression von GAPDH. Ein signifikanter Anstieg zeigte sich erst mit dem Ende der Kultur in Passage 7 durch einen Anstieg dieser Expression auf einen Wert von $2{,}51 \times 10^{-3}$ (Abbildung 16).

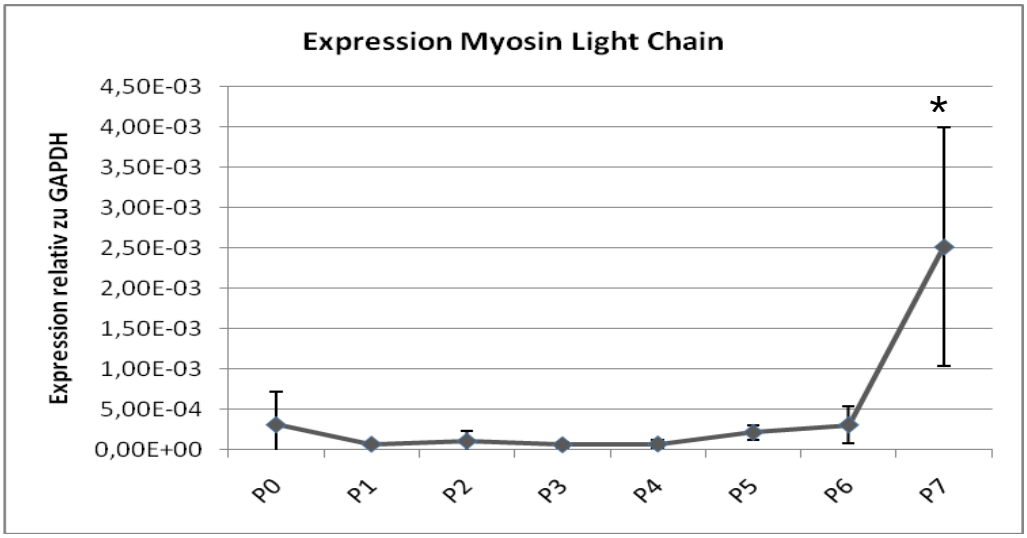


Abbildung 16: Konstitutive Expression von MLC durch MSCs
Die relative Expression mit Standardabweichung der für MLC kodierenden mRNA durch unbehandelte MSCs im Zeitverlauf. Auf der X-Achse wurden die einzelnen Passagen der Langzeitkultur, auf der Y-Achse die Genexpression relativ zum Housekeeping-Gen GAPDH aufgetragen. Zum Ausgangswert in P0 signifikante Veränderungen der Genexpression sind durch * markiert ($p<0,05$).

4.5.2 Regulation der kardiomyogenen Marker unter Differenzierung

Der kardiomyogene Differenzierungsstatus der MSCs wurde in der Langzeitkultur ab Passage 1 (Behandlung mit Differenzierungsmedien) in jeder weiteren Passage bis zum Erreichen der replikativen Seneszenz mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Als Surrogatmarker einer kardiomyogenen Differenzierung dienten hierbei die Expressionen der spezifisch für TropI, cAct und MLC kodierenden mRNAs. Mittels der REST-Software wurden effizienzkorrigierte Induktionen der einzelnen Zielgene relativ zum Housekeeping-Gen GAPDH und zu undifferenzierten MSCs errechnet. Induktionen >2,5 beziehungsweise <0,4 wurden dabei als relevant betrachtet.

4.5.2.1 5-Azacytidin

Für die Expression der kardialen Markergene zeigten sich nach der Behandlung mit 5-Azacytidin folgende Geninduktionen (Tabelle 11):

Tabelle 11: Behandlung mit 5-Azacytidin

Passage	Induktion **TropI**	σ	Induktion **cAct**	σ	Induktion **MLC**	σ
P1	1,51	1,19	0,94	0,30	0,82	0,45
P2	1,90	2,18	1,06	1,17	0,81	0,63
P3	***2,60***	1,05	1,95	1,93	0,73	0,31
P4	2,35	3,41	1,83	1,68	0,86	0,55
P5	0,49	0,41	0,64	0,20	1,36	0,75
P6	0,47	0,13	0,73	0,36	0,74	0,48
P7	3,06	4,57	0,51	0,27	0,42	0,16

Die Induktion der Gene TropI, cAct und MLC unter Behandlung mit 5-Azacytidin relativ zu unbehandelten MSCs der gleichen Passage im Verlauf der Langzeitkultur. Signifikante Geninduktionen ($p<0,05$) sind hervorgehoben. n = 3, σ = Standardabweichung

Während die Gene cAct und MLC nur geringe Induktionen nach der Behandlung mit dem kardiomyogenen Differenzierungsmedium aufwiesen, zeigte sich für TropI in P3 und P7 eine Induktion auf das 2,6-, beziehungsweise das 3,06-fache der unbehandelten Kontrollen. Dabei erwies sich die Induktion in P3 als statistisch signifikant ($p<0,05$).

4.5.2.2 Noggin

Auch unter Behandlung mit Noggin zeigte sich im Verlauf der Kultur eine Regulation der kardiomyogenen Markergene (Tabelle 12):

Tabelle 12: Behandlung mit Noggin

Passage	Induktion **TropI**	σ	Induktion **cAct**	σ	Induktion **MLC**	σ
P1	3,12	2,77	0,68	0,32	1,28	1,13
P2	1,30	0,56	0,76	0,47	1,83	1,76
P3	0,86	1,07	1,15	0,63	0,57	0,44
P4	0,71	0,56	1,24	0,45	1,55	1,18
P5	5,44	5,21	***2,72***	1,54	***4,95***	6,00
P6	***3,67***	2,72	1,46	1,54	n.d.	
P7	***6,63***	2,08	***0,36***	0,08	n.d.	

Die Induktion der Gene TropI, cAct und MLC unter Behandlung mit Noggin relativ zu unbehandelten MSCs der gleichen Passage im Verlauf der Langzeitkultur. Signifikante Geninduktionen ($p<0,05$) sind hervorgehoben. n = 3, σ = Standardabweichung

So erwiesen sich cAct und MLC in P5 als signifikant induziert, ebenso wie TropI in P6 und P7. In P7 zeigte sich dagegen eine signifikante Downregulation von

cAct. Die vergleichsweise hohen Induktionen von TropI in P1 und P5 erwiesen sich aufgrund starker Streuung zwischen den einzelnen untersuchten Zellpopulationen als statistisch nicht signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. MLC war in P6 und P7 in den mit Noggin behandelten MSC-Populationen nicht mehr detektierbar.

4.5.2.3 FGF2 + BMP2

Unter Behandlung mit FGF2 und BMP2 zeigten sich insbesondere für MLC starke passageabhängige Schwankungen der Geninduktion (Tabelle 13):

Tabelle 13: Behandlung mit FGF2 + BMP2

Passage	Induktion **TropI**	σ	Induktion **cAct**	σ	Induktion **MLC**	σ
P1	1,49	1,47	0,82	0,38	1,53	0,82
P2	1,44	2,07	1,10	1,12	0,74	0,22
P3	2,65	3,47	2,00	0,84	4,12	1,21
P4	0,20	0,22	2,37	2,77	3,67	5,16
P5	1,87	1,31	1,40	0,45	1,40	0,66
P6	0,43	0,36	1,63	1,78	0,22	0,21
P7	0,59	0,42	0,77	0,42	***0,10***	0,06

Die Induktion der Gene TropI, cAct und MLC unter Behandlung mit FGF2 + BMP2 relativ zu unbehandelten MSCs der gleichen Passage im Verlauf der Langzeitkultur. Signifikante Geninduktionen ($p<0,05$) sind hervorgehoben. n = 3, σ = Standardabweichung

Während in P3 und P4 MLC unter Differenzierung eine Induktion auf 4,1 beziehungsweise auf 3,7 aufwies, zeigte sich in P6 und P7 eine negative Regulation desselben Gens auf 0,22 und 0,1 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dabei erwies sich die Downregulation von MLC in P7 als statistisch signifikant. Die anderen beiden Markergene zeigten im Verlauf der Kultur nur geringe Schwankungen, die erhöhten und verminderten Induktionen von TropI in P3 und P4 erwiesen sich als nicht signifikant.

4.5.2.4 DMSO

Nach Behandlung mit DMSO zeigten die untersuchten MSCs nur geringe Regulationen ihrer Expressionen der kardialen Markergene (Tabelle 14):

Tabelle 14: Behandlung mit DMSO

Passage	Induktion **TropI**	σ	Induktion **cAct**	σ	Induktion **MLC**	σ
P1	1,06	0,76	0,99	0,49	1,48	0,89
P2	1,66	1,16	0,73	0,52	0,79	0,97
P3	1,06	0,63	2,39	1,71	0,82	0,72
P4	2,01	2,33	1,57	0,86	***0,20***	0,18
P5	0,82	0,63	1,01	0,52	0,95	0,82
P6	1,43	0,65	1,05	0,82	1,35	0,97
P7	1,64	1,20	0,96	0,32	***0,37***	0,24

Die Induktion der Gene TropI, cAct und MLC unter Behandlung mit DMSO relativ zu unbehandelten MSCs der gleichen Passage im Verlauf der Langzeitkultur. Signifikante Geninduktionen ($p<0,05$) sind hervorgehoben. n = 3, σ = Standardabweichung

Lediglich in P4 und P7 zeigte sich unter DMSO eine mäßige, jedoch signifikante Downregulation von MLC auf 0,2, respektive 0,37 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.5.2.5 PDGF+ FGF2 + VEGF

Unter Behandlung mit PDGF, FGF2 und VEGF stellten die untersuchten MSCs bereits in P3 die Proliferation ein. Dabei erwiesen sich die untersuchten kardiomyogenen Markergene als folgendermaßen reguliert (Tabelle 15):

Tabelle 15: Behandlung mit PDGF + FGF2 + VEGF

Passage	Induktion **TropI**	σ	Induktion **cAct**	σ	Induktion **MLC**	σ
P1	2,30	2,86	***0,07***	0,03	0,95	0,36
P2	3,55	2,70	***0,07***	0,05	2,93	2,31
P3	***22,94***	28,51	0,26	0,10	n.d.	

Die Induktion der Gene TropI, cAct und MLC unter Behandlung mit PDGF+ FGF2+VEGF relativ zu unbehandelten MSCs der gleichen Passage im Verlauf der Langzeitkultur. Signifikante Geninduktionen ($p<0,05$) sind hervorgehoben. n = 3, σ = Standardabweichung, n.d. = nicht detektierbar

Während unter Behandlung das Zielgen cAct in allen Passagen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe eine Downregulation im Bereich 0,07 bis 0,26 aufwies (signifikant in P1 und P2), zeigte das Zielgen TropI insbesondere in P3 eine starke, signifikante Geninduktion um den Faktor 23. MLC war in den ersten beiden Passagen nicht signifikant reguliert und in der dritten Passage nicht mehr detektierbar.

4.5.2.6 Insulin, Transferrin, Ascorbat und Dexamethason (ITAD)

Auch unter Behandlung mit einer Formulierung aus Insulin, Transferrin, Ascorbat und Dexamethason (ITAD) zeigten die untersuchten MSC-Populationen eine Regulation in ihrer Expression der kardiomyogenen Marker (Tabelle 16):

Tabelle 16: Behandlung mit ITAD

Passage	Induktion **TropI**	σ	Induktion **cAct**	σ	Induktion **MLC**	σ
P1	0,75	0,71	0,62	0,40	0,54	0,05
P2	1,30	0,94	0,44	0,45	2,28	0,50
P3	0,49	0,41	1,71	0,49	0,67	0,38
P4	n.d.		20,00	25,41	6,90	9,91
P5	n.d.		***25,90***	3,66	***17,65***	11,04

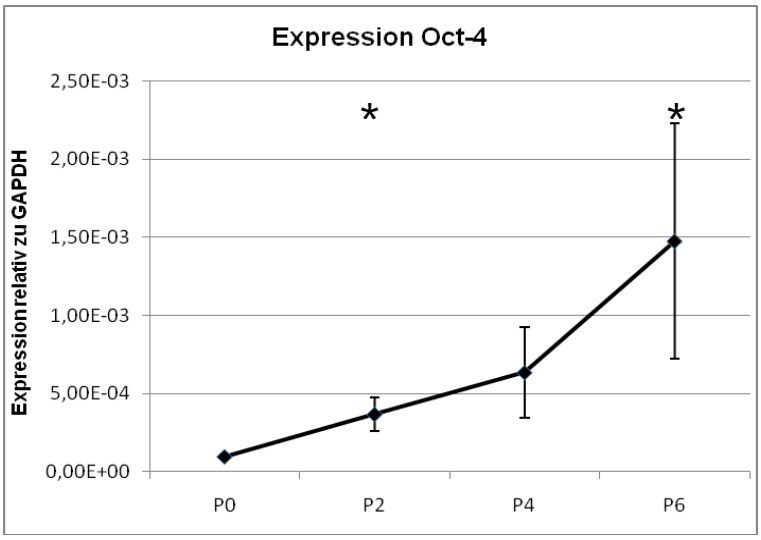
Die Induktion der Gene TropI, cAct und MLC unter Behandlung mit Insulin, Transferrin, Ascorbat und Dexamethason (ITAD) relativ zu unbehandelten MSCs der gleichen Passage im Verlauf der Langzeitkultur. Signifikante Geninduktionen ($p<0,05$) sind hervorgehoben. $n = 3$, σ = Standardabweichung

Während TropI in der mit ITAD behandelten Gruppe in P1-P3 keine signifikanten Regulationen der Genexpression aufwies, jedoch ab P4 nicht mehr detektierbar war, zeigte sich für cAct und MLC in P4 und P5 eine deutliche Geninduktion. In P4 war bezüglich der Geninduktion von cAct und MLC aufgrund großer Schwankungen zwischen den untersuchten MSC-Populationen keine statistische Signifikanz gegeben, dagegen zeigten sich in P5 eine statistisch signifikante Induktionen von cAct um den Faktor 25,9 und von MLC um den Faktor 17,65 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

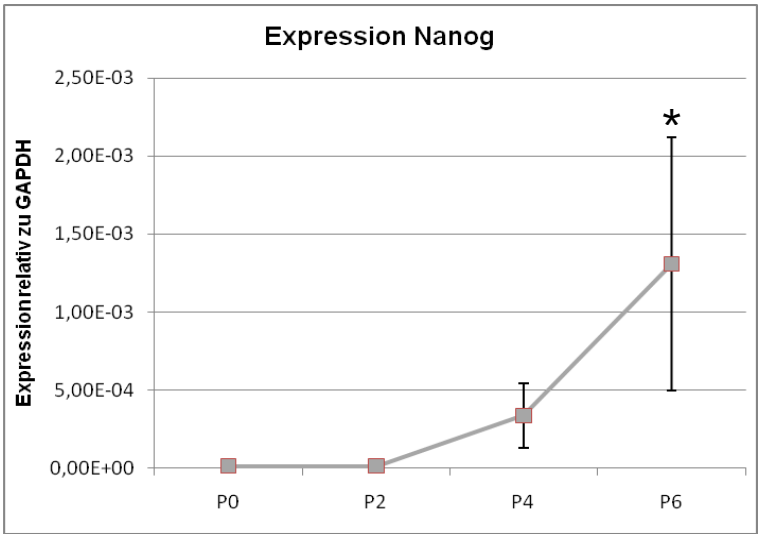
4.6 Expression Multipotenz-assoziierter Transkriptionsfaktoren durch MSCs

4.6.1 Konstitutive Expression Stammzell-assoziierter Transkriptionsfaktoren durch undifferenzierten MSCs

Zur Untersuchung ihrer Bedeutung für den Erhalt und die Regulation der Multipotenz von MSCs wurde die Expression der Stammzell-assoziierten Transkriptionsfaktoren Oct-4, Nanog, Sox2 und DPPA4 auf mRNA-Ebene analysiert. Die entsprechenden Ansätze wurden in den Passagen P0, P2, P4 und P6 mittels quantitativer RT-PCRs an undifferenzierten MSCs durchgeführt.
In keiner der untersuchten MSC-Populationen und Passagen konnte mit dieser Technik eine Expression von Sox2 und DPPA4 detektiert werden (Abbildung 12b).
Dagegen zeigten undifferenzierte MSCs über die gesamte Kulturdauer hinweg eine Expression von für Oct-4 und Nanog kodierender mRNA. Diese war für beide Zielgene über die verschiedenen Passagen hinweg einer Regulation unterworfen:
Die Expression von Oct-4 zeigte von P0 ausgehend einen Anstieg, dabei war in P2 und P6 eine signifikante Geninduktion gegenüber P0 gegeben ($P<0,05$). Auch die Expression von Nanog erhöhte sich im Verlauf der Passagen, wobei lediglich in P6 eine signifikante Zunahme der Expression gegenüber P0 zu verzeichnen war. Beiden Zielgenen gemeinsam war dabei eine, vor allem in den höheren Passagen, große Streuung zwischen den untersuchten Populationen (Abbildung 17a und b).



a



b

Abbildung 17: Konstitutive Expression von Oct-4 und Nanog durch unbehandelte MSCs
Die relative Expression mit Standardabweichung der für Oct-4 (a) und Nanog (b) kodierenden mRNA durch unbehandelte MSCs. Auf der X-Achse wurden die einzelnen Passagen der Langzeitkultur, auf der Y-Achse die Genexpression relativ zum Housekeeping-Gen GAPDH aufgetragen. Zum Ausgangswert in P0 signifikante Veränderungen der Genexpression sind durch * markiert ($p<0,05$).

4.6.2 Oct-4 und Nanog unter adipogener und osteogener Differenzierung

Um den Einfluss der adipogenen und osteogenen Differenzierung auf die Expression der Multipotenz-assoziierten Faktoren Oct-4 und Nanog zu analysieren, wurden entsprechend differenzierte MSCs in P2 mittels quantitativer RT-PCR untersucht.

Dabei zeigte sich eine signifikante Downregulation der Expression von sowohl Oct-4 als auch Nanog unter adipogener Differenzierung. Unter osteogener Differenzierung blieben die Expressionen beider Gene dagegen nahezu unverändert (Abbildung 18).
Auch in diesen Experimenten war eine starke Streuung der Werte zwischen den einzelnen MSC-Populationen zu beobachten.

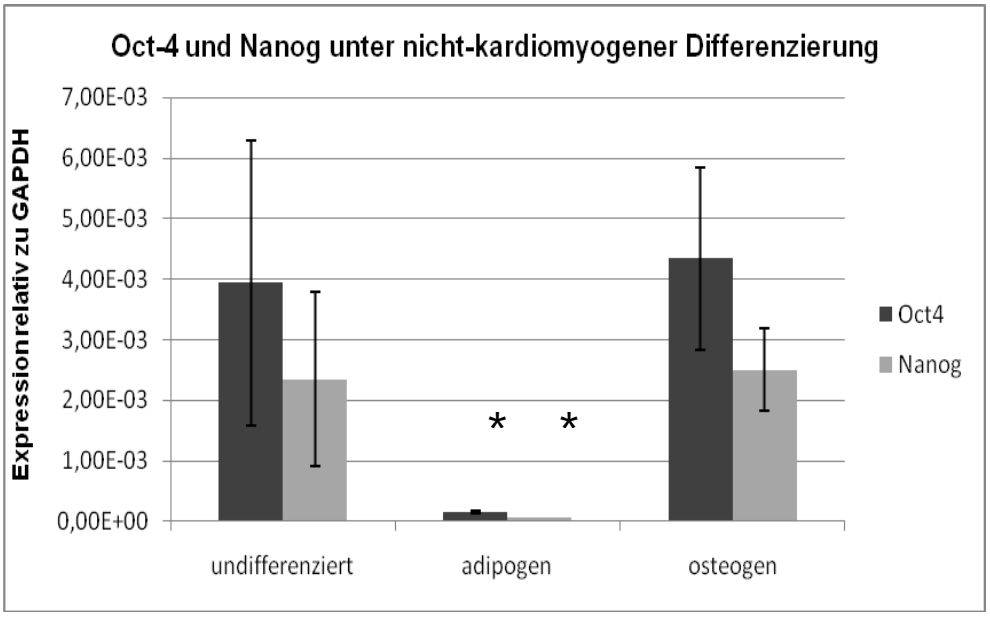


Abbildung 18: Oct-4 und Nanog unter nicht-kardiomyogener Differenzierung
Die relative Expression mit Standardabweichung der für Oct-4 und Nanog kodierenden mRNA durch undifferenzierte, sowie adipogen oder osteogen differenzierte MSCs. Die Genexpression wurde relativ zum Housekeeping-Gen GAPDH aufgetragen. Die relativ zu den undifferenzierten MSC-Populationen signifikanten Veränderungen der Genexpression sind durch * markiert ($p<0,05$).

4.6.3 Regulation der Expression von Oct-4 und Nanog in Abhängigkeit eines möglichen kardiomyogenen Differenzierungsstatus

Zur Klärung des Einflusses einer durch die oben beschriebenen Protokolle induzierten kardiomyogenen Differenzierung auf die Expressionen der Multipotenz-assoziierten Gene Oct-4 und Nanog, wurden diese in den dafür relevanten Passagen mittels quantitativer RT-PCR auf mRNA-Ebene gemessen. Diese Expressionsanalysen wurden exemplarisch an MSC-Einzelpopulationen in denjenigen Passagen durchgeführt, in welchen unter

kardiomyogenen Differenzierungsbedingungen eine besonders ausgeprägte Induktion kardialer Markergene nachweisbar war. Als relevant wurden dabei wiederum Geninduktionen von >2,5 beziehungsweise <0,4 relativ zur unbehandelten Kontrolle erachtet.

Die in den MSC-Einzelpopulationen h20 und h21 untersuchten Differenzierungen PDGF+FGF2+VEGF in P2, 5-Azacytidin in P3, ITAD in P5, FGF2+BMP2 in P3, sowie Noggin in P5 und P6 zeigten dabei vergleichsweise starke Induktionen der kardiomyogenen Marker. Ungeachtet dessen unterlagen jedoch die Expressionen der Multipotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren Oct-4 und Nanog in denselben Proben keiner systematischen Regulation. Lediglich in zwei der untersuchten Proben zeigte sich eine Downregulation der Multipotenz-assoziierten Gene: In der Probe h21 P3 FGF2+BMP2 zeigte sich eine Downregulation von Oct-4 auf 0,23 relativ zur unbehandelten Kontrolle, in der Probe h21 P5 Noggin war keine Expression von Nanog detektierbar. (Tabelle 17).

Tabelle 17: Interaktion zwischen kardiomyogener Differenzierung und Expression Multipotenz-assoziierter Gene

Zielgen	h20 P2 PDFG+ FGF2+VEGF	h20 P3 5-Azacytidin	h20 P5 ITAD	h21 P3 FGF2+BMP2	h21 P5 Noggin	h21 P6 Noggin
TropI	**2,84**	**3,70**	n.d.	**5,20**	**8,11**	**4,20**
cAct	0,09	0,92	**27,84**	2,21	1,25	0,34
MLC	**5,66**	n.d.	**15,54**	2,28	**12,40**	n.d.
Oct-4	1,01	0,80	1,50	**0,23**	1,73	1,82
Nanog	2,38	0,74	0,80	0,58	**n.d.**	0,56

Die Geninduktionen der kardialen Marker, sowie der Multipotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren Oct-4 und Nanog in ausgewählten Populationen und Passagen unter kardiomyogener Differenzierung relativ zu den jeweiligen unbehandelten Kontrollen gleicher Passage. Hervorgehoben wurden Induktionswerte >2,5 bzw. <0,4. n.d. = nicht detektierbar

5 Disskusion

In der Regenerativen Medizin, welche sich mit der Erneuerung geschädigter Zellpopulationen oder ganzer Organe beschäftigt, erhält die Therapie mittels Stammzellen eine zunehmende Bedeutung. Insbesondere MSCs stehen dabei aufgrund ihrer verhältnismäßig leichten Verfügbarkeit und Inkulturnahme, ihrer ethischen Unbedenklichkeit, sowie ihrer, nach bisheriger Studienlage, nebenwirkungsarmen klinischen Anwendung im Mittelpunkt des Interesses.

Obwohl bislang aus zahlreichen Geweben des menschlichen Körpers erfolgreich MSCs isoliert werden konnten[47-54], ist die Anzucht der Zellen aus Knochenmark immer noch eines der gängigsten Verfahren. Der Vorteil dieses Ursprungsgewebes liegt darin, dass im Rahmen einer individualisierten Therapie und somit einer angestrebten autologen Zelltransplantation Knochenmark leicht und in ausreichender Menge durch in der klinischen Routine etablierte Punktionstechniken gewonnen werden kann. Alternativen hierzu stellen Isolationsverfahren von MSCs aus anderen leicht zugänglichen Geweben wie Haut oder subkutanem Fettgewebe dar.

Die bisher publizierten Studien, in welchen MSCs zur klinischen Anwendung am Menschen kamen, konzentrieren sich hauptsächlich auf zwei Bereiche: Einerseits wird versucht, den immunmodulatorischen beziehungseise parakrinen Einfluss von MSCs auf andere Gewebe zu nutzen. So werden MSCs eingesetzt, um unerwünschte immunologische Prozesse wie die akute GvHD zu therapieren und um das Engraftment co-transplantierter hämatopoietischer Stammzellen zu verbessern[101, 121-123, 125]. Andererseits wird versucht, die eigentlichen Stammzelleigenschaften der MSCs, nämlich die Fähigkeit zur Differenzierung in andere Zelltypen zu nutzen. In diesem Bereich scheinen insbesondere Ansätze zur Knochen- und Knorpelregeneration durch Transplantation von MSCs vielversprechend[103, 112-114, 168].

Ebenfalls konnte in einigen klinischen Studien durch Gabe von Knochenmark oder *in vitro* expandierten MSCs eine Verbesserung der kardialen Funktion nach Herzinfarkt erzielt werden[19, 151-154]. Die dafür verantwortlichen Mechanismen stehen aktuell unter Diskussion. So könnten einerseits parakrine Effekte, wie durch MSCs vermittelte antiapoptotische Mechanismen, eine durch

MSCs induzierte Neovaskularisation, oder eine Verminderung des Remodellings nach Infarkt für die klinische Wirksamkeit von transplantierten MSCs verantwortlich sein. Für die Vermittlung dieser Effekte wird insbesondere den zahlreichen durch MSCs sezernierten Wachstumsfaktoren wie VEGF, HGF, Adrenomedullin, Placental growth factor und TGF-β große Bedeutung beigemessen[87, 88]. Andererseits berichten zahlreiche Studien über die kardiomyogene Differenzierung von MSCs *in vitro*[134-136, 169], sowie im Rahmen von Tiermodellen *in vivo*[136]. Das Ausmaß dieser Differenzierung bleibt dabei jedoch umstritten: Während in einigen *in vitro*-Studien eine weitreichende kardiomyogene Differenzierung von MSCs bis hin zu spontan schlagenden Zellen beobachtet wurde[136], konnten Rose *et al.* in einem Tiermodell, in welchem adulte murine MSCs in zuvor infarzierte Herzen von Mäusen appliziert wuden, eine lediglich partielle Differenzierung der transplantierten MSCs beobachten[150].

Ob humane MSCs in der Lage sind, eine funktionelle kardiomyogene Differenzierung zu erlangen, wird derzeit kontrovers diskutiert. In den bislang publizierten Studien zur kardiomyogenen *in vitro*-Differenzierung von MSCs mittels Kulturmedien wurde zumeist jeweils nur der Effekt einer einzelnen Substanz(kombination) evaluiert[134-136]. Aufgrund von nicht standardisierten Isolations- und Kulturbedingungen wird die Vergleichbarkeit dieser Veröffentlichungen jedoch deutlich erschwert. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden deshalb erstmals systematisch aus humanem Knochenmark gewonnene MSCs mit diversen kardiomyogenen Differenzierungsmedien behandelt und bezüglich ihrer kardiomyogenen Differenzierungspotenz im direkten Vergleich zu unbehandelten MSCs der gleichen Passage evaluiert.

Ein weiteres in diesem Zusammenhang relevantes Forschungsgebiet betrifft die Regulation der Stammzellpotenz, also die Fähigkeit, in andere Zellen zu differenzieren. Humane embryonale Stammzellen exprimieren Pluripotenz-erhaltenden und –regulierenden Transkriptionsfaktoren wie Oct-4[170], Sox2[171], Nanog[172], Klf4[173] und c-Myc[174]. In den letzten Jahren konnten große Fortschritte im Bereich der Reprogrammierung adulter Zellen zu pluripotenten Vorläufern erzielt werden. Die etablierten Reprogrammierungsprotokolle beinhalten dabei

die Induktion einer Re-Expression der endogenen Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren[72-74]. Da differenzierte adulte Zellen diese Transkriptionsfaktoren nicht exprimieren, kann von einer negativen Korrelation der Expression dieser Transkriptionsfaktoren mit dem Differenzierungsgrad der Zellen ausgegangen werden. Für Oct-4, Sox2 und Nanog konnte inzwischen eine intrinsische Expression auch in adulten Stammzellen wie MSCs nachgewiesen werden, deren biologische Relevanz bisher jedoch weitgehend im Dunkeln liegt[46, 77]. Da MSCs keine pluripotenten, sondern multipotente Eigenschaften aufweisen, ist es wahrscheinlich, daß die Expression dieser Transkriptionsfaktoren in MSCs allenfalls deren Multipotenz reflektiert. Neben der Induktion kardiomyogener, sowie nicht-kardiomyogener Differenzierung in MSCs soll daher die Beeinflussung der Expression von Multipotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren durch den Differenzierungsstatus der MSCs im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen.

5.1 Grundcharakterisierung der verwendeten MSCs

Um Ergebnisse unterschiedlicher an MSCs forschenden Arbeitsgruppen miteinander vergleichen zu können, ist eine einheitliche Definition und Charakterisierung der verwendeten Zellen unabdingbar. Entsprechende Kriterien wurden 2006 von der ISCT definiert und implizieren die Plastikadhärenz, ein charakteristisches Oberflächenantigenprofil, sowie die *in vitro*-Differenzierbarkeit von MSCs[56].

Diese Kriterien wurden auch auf die in der vorliegenden Studie verwendeten Zellpopulationen angewandt. Dabei zeigten alle verwendeten Populationen in den Kulturgefäßen adhärentes Wachstum und in der flusszytometrischen Analyse ein typisches Antigenprofil. Betreffs des Hauptmerkmals von Stammzellen, der Differenzierbarkeit, ist für aus Knochenmark gewonnene MSCs der Nachweis der adipogenen, osteogenen und chondrogenen *in vitro*-Differenzierung Grundvoraussetzung und Definitionskriterium[56]. Die Differenzierung in diese drei mesodermalen Zelltypen erfolgt dabei in hierarchischer Reihenfolge, so zeigten Klonierungsexperimente die Existenz von betreffs adipogener, osteogener und chondrogener Differenzierbarkeit

mono-, di- und tripotenter MSCs. Dabei ist nicht jeder Zellklon zu jedem Zeitpunkt seiner Entwicklung befähigt, in jede Richtung zu differenzieren[38, 67]. Somit kann davon ausgegangen werden, dass innerhalb der Gesamtheit der MSC-Population kleinere, jedoch betreffs Differenzierungspotential besonders potente Subpopulationen existieren.

Die in dieser Studie verwendeten MSC-Populationen wurden im Verlauf ihrer Langzeitkultur jeweils zu mehreren Zeitpunkten adipogenen, osteogenen und chondrogenen Bedingungen ausgesetzt. Dabei ließen sich die für die jeweiligen Differenzierungen typischen Strukturen mikroskopisch eindeutig nachweisen. Deutlich ausgeprägt war ein mit steigender Kulturdauer und Passage abnehmender Anteil der adipogen und osteogen differenzierbaren Zellen an der Gesamtpopulation. Gleichermaßen veränderte sich auch die Morphologie der undifferenzierten Zellen mit steigender Passage. Beides kann, zusammen mit einer in hohen Passagen reduzierten Proliferationsfähigkeit, als Zeichen für eine durch die fortgesetzte *in vitro*-Expansion ausgelöste Seneszenz der MSCs gewertet werden, welche in der Literatur bereits vielfach beschrieben wurde und eine Hauptlimitation der Kultur und Expansion von humanen MSCs darstellt[175].

Um die Differenzierbarkeit der MSCs zu quantifizieren, wurde mittels quantitativer RT-PCR die Expression der für die jeweiligen Differenzierungen typischen Zielgene gemessen. Dabei zeigten die für die adipogene Differenzierung charakteristischen Marker PPAR-γ und LPL das erwartete Ergebnis einer starken, jedoch mit der Passagenzahl abnehmenden Geninduktion unter Differenzierungsbedingungen. Unter osteogener und chondrogener Differenzierung konnte eine Induktion der jeweiligen Markergene ALP und Coll2 jedoch nur mit beschränktem Erfolg erzielt werden, da auch die undifferenzierten Kontrollzellen eine starke konstitutive Expression dieser Gene zeigten. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der Färbungen für alkalische Phosphatase, in welchen die zu den osteogenen Differenzierungen komplementären Negativkontrollen ebenfalls eine hohe Expression dieses Markers zeigten. Diese konstitutive Expression osteogener Marker oder (partielle) osteogene Spontandifferenzierung wurde auch von Felka *et al.* für humane MSCs beschrieben[176].

5.2 Aspekte der RT-PCR

Die zur Analyse einer möglichen kardiomyogenen Differenzierung von MSCs durchgeführten quantitativen RT-PCR-Assays auf Basis von TaqMan-Sonden wurden während der Etablierung einer ausführlichen Qualitätskontrolle unterzogen. Diese umfasste zur Sicherstellung der Spezifität auf das gewünschte cDNA-Segment, sowie des Ausschlusses einer Amplifikation unerwünschter Nebenprodukte, die Durchführung von Gelelektrophoresen. Durch den Nachweis von jeweils nur einer spezifischen Bande an der zu erwartenden Längenposition konnte diese Spezifität sichergestellt werden. Außerdem wurde für den Fall einer geringen Expression kardiomyogener Marker durch MSCs die Sensitivität der einzelnen Ansätze anhand einer Standardverdünnungsreihe bestimmt. Dabei zeigte sich eine Detektionsgrenze von etwa 10 cDNA-Kopien/µl Ausgangsmaterial. Dies belegt eine Sensitivität, welche nahe am theoretischen Optimum dieser Technik liegt und somit optimale Voraussetzungen für die durchgeführten Analysen bietet[166, 177]. Des Weiteren konnten anhand der erstellten Regressionsgeraden die PCR-Effizienzen berechnet, sowie die Linearität der PCR-Kinetik über den gesamten Konzentrationsbereich nachgewiesen werden, was besonders bei stark unterschiedlichen Expressionenen zwischen Zielgen und Housekeeping-Gen von Bedeutung ist[178]. Neben einer hohen Sensitivität zeichneten sich alle in dieser Arbeit verwendeten PCR-Assays durch Effizienzen nahe dem theoretischen Optimum von 2,0, sowie durch eine hohe Reproduzierbarkeit aus. Kleinere Unterschiede zwischen den Effizienzen der einzelnen PCR-Assays wurden mittels der von Pfaffl *et al.* entwickelten PCR-Quantifizierungssoftware REST mathematisch nivelliert[167].

Auch beim Einsatz der kommerziell erwerblichen PCR-Kits wurden exemplarisch Gelelektrophoresen der PCR-Produkte, sowie Effizienzbestimmungen durchgeführt, welche ebenfalls eine optimale Sensitivität sowie Spezifität belegten.

Die Analyse der Expression bestimmter Linien-spezifischer Gene mittels quantitativer RT-PCR kann eine Aussage über den Differenzierungszustand der untersuchten Stammzellpopulation ermöglichen. Diesem Prinzip liegt zugrunde,

dass die für diesen Zweck ausgewählten Gene charakteristisch für denjenigen Zelltyp sind, in welchen eine Differenzierung induziert werden soll. Die entsprechenden Gene, beziehungsweise die aus ihnen transkribierten mRNAs, vermitteln eine charakteristische physiologische Funktion der Zellen in der „Zieldifferenzierung“, beispielsweise in Form von Enzymen oder Strukturproteinen, oder steuern als Transkriptionsfaktoren Entwicklungs-, Reifungs- und Differenzierungprozesse. Durch Mitführung einer unbehandelten Kontrollpopulation erhalten die Genexpressionen der behandelten Zellen einen Bezugswert. Jedoch stellt die mittels quantitativer RT-PCR bestimmte Expression eines Gens immer einen Mittelwert für alle zur RNA-Isolation eingesetzte Zellen da. So kann anhand der gewonnenen Daten keine Aussage getroffen werden, ob eine kleine Subpopulation der untersuchten Zellen eine starke, oder der Großteil der Zellen eine schwächere Änderung der Genexpression unter Behandlung erfährt. Sehr kleine Subpopulationen mit von der Mehrheit der Zellen abweichender Genexpression und somit anderem Differenzierungsstatus entgehen unter Umständen der Detektion vollständig. Darüber hinaus muss bedacht werden, dass die Ergebnisse einer RT-PCR lediglich eine Aussage auf Ebene des Transkriptoms, also der Gesamtheit der mRNA der eingesetzten Zellen erlauben. Posttranskriptionale und translationale Regulationen der Genexpression bleiben dabei unberücksichtigt.

Aus diesen Gründen können die Analysen von Zellpopulationen durch RT-PCR mit ergänzenden Untersuchungen auf Proteinebene ergänzt werden. Methodisch bieten sich dafür Antikörper-basierte Verfahren wie Flusszytometrie oder Immunfluoreszenz an. Letztere Technik erlaubt zusätzlich die Evaluation der Proteinexpression auf Einzelzellebene. Entsprechende vergleichende Analysen zu den Experimenten dieser Arbeit wurden in gesonderten Arbeiten mittels Immunfluoreszenz sowie Flusszytometrie durchgeführt.

5.3 Kardiomyogene Differenzierung von MSCs

Zur qualitativen und quantitativen Analyse der exogen induzierten Kardiomyogenese durch MSCs wurden in dieser Arbeit die Expressionen der für Troponin I, kardiales Aktin, sowie MLC kodierenden Gene mittels

quantitativer RT-PCR gemessen. Diese Gene kodieren für Strukturproteine, welche in Kardiomyozyten einen Teil des kontraktilen Apparats bilden und somit für die Funktion dieses Zelltyps unabdingbar sind. Die analysierten Isoformen von kardialem Aktin und von Troponin I sind dabei spezifisch für Kardiomyozyten, diejenige von MLC wird sowohl in Kardiomyozyten, als auch in Skelettmuskelfasern exprimiert[179]. Diese Auswahl der analysierten Gene erlaubt somit die Detektion einer Differenzierung sowohl in kardiomyogene Richtung, wobei eine Induktion aller analysierter Gene zu erwarten wäre, als auch in Richtung Skelettmuskel, bei welcher lediglich MLC hochreguliert wäre.

Die Untersuchung unbehandelter MSCs über den Verlauf der Langzeitkultur zeigte eine intrinsische Expression der getesteten kardiomyogenen Markergene durch MSCs, welche im Verlauf der untersuchten Passagen einer deutlichen Regulation unterlag. Während für TropI und MLC ein Anstieg der Expression in den hohen Passagen der Kultur erfolgte, war dies für cAct zu einem früheren Zeitpunkt in P1 und P2 zu beobachten. Eine derartige *in vitro*-Expression kardialer Marker durch unbehandelte humane MSCs wurde bereits von Bayes-Genis *et al.* 2005 beschrieben[180]. Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals eine Kinetik der Expression kardialer Marker im Verlauf der Langzeitkultur unbehandelter humaner MSCs beschrieben werden. Diese kann durch zwei Mechanismen bedingt sein: Einerseits könnte die relativ unphysiologische Langzeit-*in vitro*-Kultur über zahlreiche Passagen eine (partielle) kardiomyogene Spontandifferenzierung eines Teils der MSCs induzieren, ein Phänomen, welches bereits in osteogener Richtung beobachtet wurde[181]. Andererseits könnten die spezifischen Bedingungen der Langzeitkultur zur Selektion einzelner MSC-Subpopulationen mit *per se* hoher konstitutiver Expression kardialer Marker geführt haben. Die Untersuchung der jeweiligen Relevanz dieser Mechanismen ist mit der von uns verwendeten Technik der quantitativen RT-PCR schwierig und wird daher zukünftig Analysen auf Einzelzellniveau, beispielsweise flusszytometrisch oder immunhistochemisch erfordern. Die endogene Expression von Troponin I, kardialem Actin und MLC durch unbehandelten MSCs aus dem Knochenmark

belegt jedoch, dass diese Gene nicht exklusiv in Kardiomyozyten transkribiert werden.

Unabhängig von den oben genannten Mechanismen könnte die Kenntnis des Zeitpunkts der maximalen Expression kardiomyogener Marker durch kultivierte MSCs zukünftig eine Optimierung klinisch zur kardialen Regeneration eingesetzter Zelltransplantate erlauben.

Einige der in dieser Arbeit vergleichend auf adulte MSCs angewandten kardiomyogenen Differenzierungsprotokolle wurden ursprünglich ebenfalls für adulte MSCs, andere jedoch für embryonale Stammzellen beschrieben (Tabelle 18).

Tabelle 18: kardiomyogene Differenzierungsprotokolle

Protokoll	**Erstbeschreiber**	**Zelltyp**
5-Azacytidin	Wakitani *et al.*[134]	Adulte Knochenmarks-MSCs der Ratte
Noggin	Yuasa *et al.*[148]	Murine embryonale Stammzellen
FGF2+BMP2	Kawai *et al.*[147]	Murine embryonale Stammzellen
DMSO	Rudnicki *et al* .[161]	Murine Teratokarzinomazelllinie (P19)
PDGF+FGF2+VEGF	Xaymardan *et al.*[136]	Adulte murine Knochenmarks-MSCs
ITAD	Shim *et al.*[135]	Adulte humane Knochenmarks-MSCs

Die von Wakitani *et al.* erstbeschriebene kardiomyogene Differenzierung von aus Ratten gewonnenen Knochenmarks-MSCs mittels 5-Azacytidin beruht auf einem Eingriff dieser Substanz in den Methylierungsstatus der genomischen DNA von Zellen. Durch eine Veränderung der Methylierung können dabei Gene einer Zelle an- oder abgeschalten werden, was im Fall von MSCs zur Induktion einer kardiomyogenen Differenzierung führen soll[134]. Die in der vorliegenden Arbeit nach dem von Wakitani *et al.* publizierten Originalprotokoll mit 5-Azacytidin behandelten humanen MSC-Populationen zeigten jedoch nur an einem Datenpunkt in Passage 3 eine signifikante Induktion des Markers TropI.

Diese Beobachtung deckt sich mit den von Mastitskaya *et al.*[182] beschriebenen Ergebnissen, welche im Gegensatz zur Studie von Xu *et al.*[169] keine kardiomyogene Differenzierung humaner MSCs durch eine Behandlung mit ausschließlich 5-Azacytidin nachweisen konnten. Eine Wirksamkeit von 5-Azacytidin zur Induktion kardiomyogener Differenzierung von MSCs bleibt somit angesichts sich widersprechender Studienergebnisse fraglich. Möglicherweise werden diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse durch Unterschiede in der Technik der Isolation und Expansion der MSCs bedingt, welche zur Selektion bestimmter Subpopulationen führen könnten.

Die kardiomyogene Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen durch Behandlung mit Noggin wurde erstmals von Yuasa *et al.* beschrieben[148]. Noggin wirkt als Transkriptionsfaktor auf zahlreiche Signalwege der embryonalen Entwicklung und Zelldifferenzierung. So ist es unter anderem in die Entwicklung des Neuralrohrs, in die Skelettentwicklung, sowie die osteogenen Differenzierung von MSCs involviert[183, 184]. Von besonderer Bedeutung für die kardiomyogene Induktion von Stammzellen ist eine transiente antagonistische Wirkung auf die Wachstumsfaktoren BMP2 und BMP4, welche in der frühen kardiomyogenen Differenzierung eine inhibitorische Wirkung entfalten[2, 185]. In der vorliegenden Studie konnte eine Induktion kardiomyogener Gene in humanen MSCs durch Behandlung mit Noggin erzielt werden. Dies erfolgte jedoch erst in hohen Passagen ab P5, was durch die indirekte Wirkungsweise von Noggin auf multiple Signalkaskaden bedingt sein könnte.

Im Rahmen der kardiomyogenen Differenzierung von embryonalen Stammzellen wirken die Transkriptionsfaktoren BMP2 und BMP4 verstärkend auf die Differenzierung[186]. Kawai *et al.* konnten durch diese Faktoren, sowie durch Behandlung mit FGF2 eine kardiomyogene Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen *in vitro* erzielen[147]. Als am effektivsten wurde dabei eine Kombination von FGF2 und BMP2 beschrieben, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit in gleicher Weise auf adulte humane MSCs angewandt wurde. Dabei zeigte sich jedoch nur ein geringer Einfluss des Differenzierungsmediums auf die Expression kardiomyogener Markergene, so

dass eine mangelnde Suszeptibilität humaner MSCs auf die verwendeten Faktoren angenommen werden muss.

Die kardiomyogene Differenzierung der murinen Teratokarzinom-Zelllinie P19 durch Behandlung mit DMSO ist ein häufig als Alternative zu embryonalen Stammzellen eingesetztes Modellsystem[161, 162]. Der Wirkmechanismus der Chemikalie DMSO auf die Zelldifferenzierung ist jedoch noch nicht bekannt. In unserer Studie wurde ein zuvor erfolgreich auf P19-Zellen angewandtes Protokoll an MSC-Kulturen erprobt. Dabei zeigte sich jedoch kein Einfluss auf den kardiomyogenen Differenzierungsstatus dieser Zellen. Dieses Ergebnis ist insofern bedeutsam, da DMSO häufig zur Kryokonservierung von Zellen, sowie als Lösungsmittel für Kulturadditiva eingesetzt wird. Eine akzidentielle Differenzierung von MSCs durch diese Anwendungen ist nach den vorliegenden Ergebnissen nicht zu erwarten.

Durch eine Kombination der Wachstumsfaktoren PDGF, FGF2 und VEGF gelang es Xaymardan *et al.* adulte Ratten-MSCs kardiomyogen bis hin zu spontan schlagenden und kontraktilen Zellen zu differenzieren[136]. Auch dieses Protokoll wurde von uns auf humane MSCs angewandt. Unter dem entsprechenden Differenzierungsmedium zeigten die so behandelten Zellen einen gegenüber der unbehandelten Kontrollpopulation veränderten mikroskopischen Phänotyp, eine Einstellung der Proliferation in P3, sowie eine ausgeprägte Induktion von TropI. Zusammengenommen könnten diese Resultate für das Ablaufen einer kardiomyogenen Differenzierung sprechen, wobei die entsprechenden Zellen bereits früh einen postmitotischen Status erreichten. Jedoch konnte keine Induktion der Marker cAct und MLC erzielt werden und in keinem der durchgeführten Experimente waren spontan schlagende Zellen beobachtbar, so dass von einer lediglich partiellen Differenzierung ausgegangen werden kann.

Durch das von Shim *et al.* beschriebene kardiomyogene Differenzierungsprotokoll auf Basis von Insulin, Transferrin, Ascorbat und Dexamethason ließ sich bei Anwendung auf die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten humanen MSCs eine verstärkte Expression von kardiomyogenen Genen erzielen. So zeigte sich in den Passagen 4 und 5 eine Induktion der

Gene cAct und MLC, außerdem stellten die Zellen in P5 ihre Proliferation ein. Der genaue Wirkungsmechanismus dieses Protokolls ist noch unbekannt, jedoch spielen die Wirkungen von Dexamethason und Insulin eine wichtige Rolle in der Regulation der adipogenen, osteogenen und myogenen Differenzierung von MSCs[135, 187, 188].

Zusammenfassend ergaben die in der vorliegenden Studie evaluierten Differenzierungsprotokolle ein heterogenes Ergebnis: Als am effektivsten bezüglich des Endpunktes der Induktion kardialer Markergene erwiesen sich die Behandlungen mittels Noggin, der Wachstumsfaktoren PDGF, FGF2 und VEGF, sowie des Protokolls ITAD. Dabei ist zu bemerken, dass die beiden letzteren Protokolle als Permanentmedien über die gesamte Kulturdauer eingesetzt werden, und somit gerade für Langzeitkulturen effektiver sein könnten, als lediglich vorübergehend auf die Zellen aufgebrachte Induktionsmedia. Die durch Noggin induzierte verstärkte Expression von kardiomyogenen Genen in humanen MSCs ist in so fern von Bedeutung, als dass dieses Differenzierungsschema bisher lediglich für embryonale Stammzellen beschrieben wurde[148]. Die vorliegenden Ergebnisse deuten daraufhin, dass auch für die kardiomyogene Differenzierung adulter Stammzellen eine transiente, durch Noggin hervorgerufene Inhibition des BMP-TGF-β-Signalwegs von Bedeutung sein könnte. Weitere Untersuchungen von in diese Signalkaskade involvierten Faktoren wie NKX2.5, GATA4 und MEF2 sollten daher zukünftig angedacht werden.

Die nur vorrübergehende Induktion kardiomyogener Marker in einzelnen Passagen der Langzeitkultur (wie beispielsweise unter 5-Azacytidin) könnte darauf zurückzuführen sein, dass eine MSC-Subpopulation ihr Proliferationsvermögen mit ablaufender kardiomyogener Differenzierung einbüßt, und somit in der nächsten Passage von weniger differenzierten, jedoch proliferationsfreudigeren Zellen verdrängt wird.

Generell unterliegt die Expression von kardiomyogenen Genen durch humane MSCs starken interindividuellen Schwankungen. Dies wird mit bedingt durch die große Heterogenität der einzelnen als „MSCs“ zusammengefassten Zellpopulationen und Isolate, sowie durch das Fehlen einheitlich definierter und

für MSCs spezifischer Oberflächenmarker. Verschiedene MSC-Subpopulationen mit mehr oder minder spezifischen Markern wurden in den letzten Jahren beschrieben und auf ihr adipogenes, osteogenes und chondrogenes Differenzierungspotential getestet. So definieren die Marker CD271, CD140, CD146, MSCA-1, CD56[59, 60], GD2[62], und SSEA-4[63] MSC-Subpopulationen, deren spezifisches Differenzierungspotential die bevorzugte Differenzierung in bestimmte Zelltypen bedingt [38, 189]. Beispielsweise differenziert eine von Battula *et al.* beschriebene, für MSCA-1 und CD56 positive MSC-Population bevorzugterweise chondrogen[60], wohingegen eine Expression des embryonalen Markers SSEA-4 auf eine besonders unreife MSC-Subpopulation hinweist[63].

Schwankungen der Anteile einzelner Subpopulationen an der Gesamtheit der verwendeten MSCs führen je nach Versuchsaufbau zu heterogenen und schwer interpretierbaren Ergebnissen. Ebenfalls zu bedenken ist die vor allem in der Langzeitkultur mögliche Selektion einzelner besonders proliferativer MSC-Subpopulationen und -Klone. Zukünftig wäre daher die Isolation, Charakterisierung und kardiomyogene Differenzierung einzelner hochpotenter Subpopulationen von großem Interesse.

5.4 Expression Multipotenz-assoziierter Faktoren durch MSCs

Das Hauptmerkmal von Stammzellen, ihre Differenzierbarkeit in andere Zelltypen, wird durch ein komplexes Netzwerk von Transkriptionsfaktoren gesteuert, dessen Verständnis in der aktuellen Forschung große Aufmerksamkeit gewidmet wird. Durch Experimente zur Reprogrammierung adulter Zellen wie Fibroblasten in pluripotente Stammzellen wurde eine besondere Bedeutung der Transkriptionsfaktoren Oct-4, Nanog und Sox2 für die Aufrechterhaltung von Pluripotenz entdeckt[73, 74].

Inzwischen belegen zahlreiche Publikationen, dass die Expression von Oct-4, Nanog sowie möglicherweise von Sox2 nicht auf embryonale Stammzellen beschränkt, sondern auch in adulten Stammzellen wie MSCs nachweisbar ist[77, 79, 190-193]. Eine exogen induzierte Überexpression von Nanog und Sox2 in MSCs

geht dabei mit einer höheren Expandierbarkeit und Differenzierbarkeit dieser Zellen einher[79].

Ein Ziel der vorliegenden Studie war, die Expression dieser Multipotenz-assoziierten Gene durch adulte MSCs im Verlauf der Langzeitkultur, sowie deren Beeinflussung durch den Differenzierungsstatus der Zellen zu bestimmen. Die konstitutive Expression von Oct-4 und Nanog konnte von uns dabei eindeutig nachgewiesen werden. Dagegen zeigte keine der von uns untersuchten Zellpopulationen eine Expression von Sox2, womit die Expression dieses Gens durch adulte MSCs fraglich bleibt. Während einige Autoren eine solche postulieren[193], konnte dies anderen Studien nicht reproduziert werden[77, 192]. Eine mögliche Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten unterschiedliche Isolations- und Kulturprotokolle und eine daraus resultierende Selektion unterschiedlicher MSC-Subpopulationen darstellen.

Zur Expression von DPPA4 durch humane MSCs existieren bisher keine Publikationen. In dieser Studie wurde somit erstmals gezeigt, dass MSCs diesen embryonalen Marker nicht konstitutiv exprimieren. DPPA4 könnte somit zukünftig zur klaren Abgrenzung von MSC-Subpopulationen von (induzierten) pluripotenten oder embryonalen Stammzellen herangezogen werden.

Die in der vorliegenden Studie gezeigten Ergebnisse einer Induktion von Oct-4 und Nanog durch MSCs in den hohen Passagen der Langzeitkultur könnten ebenfalls durch die Selektion einer spezifischen pluripotenten Subpopulation durch die Kulturbedingungen bedingt sein. Dem gegenüber steht jedoch ein mit steigender Passagenzahl vermindertes adipogenes und osteogenes Differenzierungspotential. Für einen Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsstatus der MSCs und der Expression von Oct-4 und Nanog spricht die beobachtete Downregulation dieser Gene unter adipogener Differenzierung. Die nahezu unveränderte oder sogar erhöhte Genexpression von Oct-4 und Nanog unter osteogener Differenzierung wurde schon in einer weiteren Studien belegt[194].

Ein weiteres Augenmerk der vorliegenden Arbeit galt der Regulation der Multipotenz-assoziierten Gene Oct-4 und Nanog unter kardiomyogener Differenzierung. Dabei konnte jedoch keine Änderung der Expression dieser

Gene relativ zu undifferenzierten Kontrollen festgestellt werden. Dies könnte einerseits dadurch erklärt werden, dass diese Gene, äquivalent der unveränderten Expression unter osteogener Differenzierung, auch durch kardiomyogen differenzierte Zellen weiterhin exprimiert werden, oder andererseits Ausdruck einer unvollständigen kardiomyogenen Differenzierung sind. Weiterhin könnten unterschiedliche MSC-Subpopulationen entweder Oct-4 und Nanog exprimieren, oder aber eine kardiomyogene Differenzierung aufweisen, so dass sich in der quantitativen RT-PCR, welche immer einen Durchschnittswert der Genexpressionen aller Zellen der untersuchten Population widerspiegelt, ein Bild scheinbar unveränderter Genexpression zeigt.

Um insbesondere die Expression Multipotenz-assoziierter Marker in Bezug auf möglicherweise besonders hochpotente MSC-Subpopulationen zu bestimmen, sollten zukünftig entsprechende weiterführende Versuche durchgeführt werden.

5.5 Zusammenfassung, Bewertung und Ausblick

Die Differenzierungsfähigkeit, sowie die immunologischen und parakrinen Eigenschaften adulter humaner MSCs bieten aufgrund der verhältnismäßig leichten Verfügbarkeit, sowie der ethischen Unbedenklichkeit dieses Zelltyps großes Potential für die Regenerative Medizin. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, systematisch, anhand unterschiedlicher Protokolle, das kardiomyogene Differenzierungspotential aus Knochenmark gewonnener humaner MSCs zu evaluieren. Darüber hinaus sollten Informationen über die Bedeutung von durch MSCs exprimierte und mit Multipotenz assoziierte Transkriptionsfaktoren für den Differenzierungsstatus dieser Zellen gewonnen werden. Methodisch wurden zum Nachweis der Regulation relevanter Zielgene quantitative RT-PCR-Assays etabliert. Im Sinne einer guten Vergleichbarkeit der Experimente erfolgte eine Grundcharakterisierung der verwendeten Zellpopulationen nach den durch die ISCT empfohlenen Kriterien.

Demzufolge zeigten alle verwendeten Zellpopulationen eine gute Differenzierbarkeit in adipogener, osteogener und chondrogener Richtung. Für die untersuchten kardialen Markergene konnte auch bei unbehandelten MSCs

eine konstitutive Expression nachgewiesen werden, welche im Lauf der durchgeführten Langzeitkultur einer signifikanten Regulation unterlag. Unter den kardiomyogenen Differenzierungsschemata erwiesen sich vor allem das auf einer Kombination der Wachstumsfaktoren PDGF+FGF2+VEGF basierende Medium, sowie das Schema ITAD als vielversprechend, wobei die Induktion kardialer Markergene interessanterweise um einige Passagen zeitversetzt zum Beginn der Differenzierungsbehandlung erfolgte.

Von den untersuchten Multipotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren Oct-4, Nanog, Sox2 und DPPA4 konnte lediglich für die beiden erstgenannten eine Expression durch die untersuchten MSC-Populationen nachgewiesen werden. Dabei erfolgte im Verlauf der Langzeitkultur eine Hochregulation dieser Marker in den hohen Passagen.

Unter adipogener Differenzierung zeigten Oct-4 und Nanog eine signifikant reduzierte Genexpression. Dagegen blieb diese Expressionen durch die osteogene und die kardiomyogene Differenzierung unbeeinflusst.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten können für zukünftige zelltherapeutische Ansätze insbesondere im Bereich der kardialen Regeneration von großer Bedeutung sein. Darüber hinaus ist die Expression von Multipotenz-assoziierten Transkriptionsfaktoren durch MSCs von großem grundlagenwissenschaftlichem Interesse. Zukünftige Experimente werden daher ein besseres Verständnis der physiologischen Regulation der Multipotenz von MSCs, sowie des Beitrags einzelner Subpopulationen zu den Eigenschaften dieses heterogenen Zelltyps zum Ziel haben.

6 Literaturverzeichnis

(1) Lippert H. *Lehrbuch Anatomie*. 5. Auflage 2000. S. 220-222.

(2) Brand T. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol* 2003 June 1;258(1):1-19.

(3) Lüllmann-Rauch R. Histologie. 2003. S. 194-197.

(4) Klinke R SS. *Lehrbuch der Physiologie*. 4. Auflage 2003. S. 110-140.

(5) Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001 June 7;344(23):1750-7.

(6) Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisen J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 2009 April 3;324(5923):98-102.

(7) Anversa P, Kajstura J, Leri A, Bolli R. Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. *Circulation* 2006 March 21;113(11):1451-63.

(8) Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003 September;19;114(6):763-76.

(9) Hosoda T, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Mechanisms of myocardial regeneration. *Circ J* 2010 January;74(1):13-7.

(10) Bu L, Jiang X, Martin-Puig S, Caron L, Zhu S, Shao Y, Roberts DJ, Huang PL, Domian IJ, Chien KR. Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. *Nature* 2009 July 2;460(7251):113-7.

(11) Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern SM, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lloyd-Jones D, McDermott M, Meigs J, Moy C, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Sorlie P, Steinberger J, Thom T, Wilson M, Hong Y. Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008 January 29;117(4):e25-146.

(12) Fitchett D, Rockwood K, Chan BT, Schultz S, Bogaty P, Gillis A, Arnold M, Miller F, Graham MM, Ghali WA, Cartier R, Chow CM, Grymonpre R, Ogilvie R, Rochon P, Niznick J, Grover S, Kavanah T, Triscott J, Dafoe W, McCartney N, Rodney P, Howlett J, Chockalingam A, Dagenais G, Dalziel W, Fodor G, Goodman S, Kerr C, Power B, Murphy K. Canadian Cardiovascular Society Consensus Conference 2002: Management of heart disease in the elderly patient. *Can J Cardiol* 2004 May;20 Suppl A:7A-16A.:7A-16A.

(13) Cohen M, Diez JE, Levine GN, Ferguson JJ, III, Morrow DA, Rao SV, Zidar JP. Pharmacoinvasive management of acute coronary syndrome: incorporating the 2007 ACC/AHA guidelines: the CATH (cardiac catheterization and antithrombotic therapy in the hospital) Clinical Consensus Panel Report--III. *J Invasive Cardiol* 2007 December;19(12):525-38.

(14) Antman EM, Hand M, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Halasyamani LK, Hochman JS, Krumholz HM, Lamas GA, Mullany CJ, Pearle DL, Sloan MA, Smith SC, Jr., Anbe DT, Kushner FG, Ornato JP, Pearle DL, Sloan MA, Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Buller CE, Creager MA, Ettinger SM, Halperin JL, Hunt SA, Lytle BW, Nishimura R, Page RL, Riegel B, Tarkington LG, Yancy CW. 2007 focused update of the ACC/AHA 2004 guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2008 January 15;51(2):210-47.

(15) Ghostine S, Carrion C, Souza LC, Richard P, Bruneval P, Vilquin JT, Pouzet B, Schwartz K, Menasche P, Hagege AA. Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation* 2002 September 24;106(12 Suppl 1):I131-I136.

(16) Menasche P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, Vilquin JT, Marolleau JP, Seymour B, Larghero J, Lake S, Chatellier G, Solomon S, Desnos M, Hagege AA. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 2008 March 4;117(9):1189-200.

(17) Giraud MN, Flueckiger R, Cook S, Ayuni E, Siepe M, Carrel T, Tevaearai H. Long-Term Evaluation of Myoblast Seeded Patches Implanted on Infarcted Rat Hearts. *Artif Organs* 2010 May 7.

(18) Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002 October 8;106(15):1913-8.

(19) Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Werner N, Haase J, Neuzner J, Germing A, Mark B, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J* 2006 December;27(23):2775-83.

(20) Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002 December 10;106(24):3009-17.

(21) Assmus B, Honold J, Schachinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Teupe C, Pistorius K, Martin H, Abolmaali ND, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006 September 21;355(12):1222-32.

(22) Assmus B, Rolf A, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Tillmanns H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Tonn T, Dimmeler S, Dill T, Zeiher AM, Schachinger V. Clinical outcome 2 years after intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *Circ Heart Fail* 2010 January;3(1):89-96.

(23) Ward MR, Stewart DJ, Kutryk MJ. Endothelial progenitor cell therapy for the treatment of coronary disease, acute MI, and pulmonary arterial hypertension: current perspectives. *Catheter Cardiovasc Interv* 2007 December 1;70(7):983-98.

(24) Murasawa S, Asahara T. Cardiogenic potential of endothelial progenitor cells. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2008 October;2(5):341-8.

(25) Dubois C, Liu X, Claus P, Marsboom G, Pokreisz P, Vandenwijngaert S, Depelteau H, Streb W, Chaothawee L, Maes F, Gheysens O, Debyser Z, Gillijns H, Pellens M, Vandendriessche T, Chuah M, Collen D, Verbeken E, Belmans A, Van de WF, Bogaert J, Janssens S. Differential effects of progenitor cell populations on left ventricular remodeling and myocardial neovascularization after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2010 May 18;55(20):2232-43.

(26) Tang XL, Rokosh G, Sanganalmath SK, Yuan F, Sato H, Mu J, Dai S, Li C, Chen N, Peng Y, Dawn B, Hunt G, Leri A, Kajstura J, Tiwari S, Shirk G, Anversa P, Bolli R. Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation* 2010 January;19;121(2):293-305.

(27) Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De AA, Nurzynska D, Silvestri F, Beltrami CA, Bussani R, Beltrami AP, Quaini F, Bolli R, Leri A, Kajstura J, Anversa P. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 June 14;102(24):8692-7.

(28) http://biogps.gnf.org/. 2010.

(29) Löffler G, Petrides PE. *Biochemie & Pathobiochemie*. 7. Auflage ed. 2003. p. 1034-7.

(30) Haeckel E. *Natürliche Schöpfungsgeschichte*. 1868.

(31) Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell* 2007 June 7;1(1):35-8.

(32) Cohnheim JF. Über Entzündung und Eiterung. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin 40*. 1867. p. 1-79.

(33) Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997 April 4;276(5309):71-4.

(34) Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966 December;16(3):381-90.

(35) Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968 March;6(2):230-47.

(36) Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976 September;4(5):267-74.

(37) Friedenstein AJ, Latzinik NW, Grosheva AG, Gorskaya UF. Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges. *Exp Hematol* 1982 February;10(2):217-27.

(38) Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, Barrilleaux BL, Meyertholen KE, O'Connor KC. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells* 2010 April;28(4):788-98.

(39) Phinney DG, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N, Prockop DJ. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 1999 December 1;75(3):424-36.

(40) Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 1992 June;102(Pt 2):341-51.

(41) Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res* 1999 May;14(5):700-9.

(42) Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998 January 10;238(1):265-72.

(43) Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991 September;9(5):641-50.

(44) Ahrens N, Tormin A, Paulus M, Roosterman D, Salama A, Krenn V, Neumann U, Scheding S. Mesenchymal stem cell content of human vertebral bone marrow. *Transplantation* 2004 September 27;78(6):925-9.

(45) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999 April 2;284(5411):143-7.

(46) Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004 July 9;95(1):9-20.

(47) 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 November;24(11):2582-91.

(48) Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001 April;7(2):211-28.

(49) Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004 March 1;103(5):1669-75.

(50) Roubelakis MG, Pappa KI, Bitsika V, Zagoura D, Vlahou A, Papadaki HA, Antsaklis A, Anagnou NP. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2007 December;16(6):931-52.

(51) Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 2003 April;18(4):696-704.

(52) in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der KC, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, Beekhuizen W, Willemze R, Kanhai HH, Fibbe WE. 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 August;88(8):845-52.

(53) Miao Z, Jin J, Chen L, Zhu J, Huang W, Zhao J, Qian H, Zhang X. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int* 2006 September;30(9):681-7.

(54) De BC, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001 August;44(8):1928-42.

(55) Horwitz EM, Le BK, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7(5):393-5.

(56) Dominici M, Le BK, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7.

(57) 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 March 28;97(7):3213-8.

(58) Baksh D, Davies JE, Zandstra PW. Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. *Exp Hematol* 2003 August;31(8):723-32.

(59) 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 June;1106:262-71. Epub;%2007 Mar 29.:262-71.

(60) Battula VL, Treml S, Bareiss PM, Gieseke F, Roelofs H, de ZP, Müller I, Schewe B, Skutella T, Fibbe WE, Kanz L, Bühring HJ. Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica* 2009 February;94(2):173-84.

(61) Rozemuller H, Prins HJ, Naaijkens BA, Staal J, Bühring HJ, Martens AC. Prospective isolation of mesenchymal stem cells from multiple mammalian species using cross-reacting anti human monoclonal antibodies. *Stem Cells Dev* 2010 April 5.

(62) 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 May 15;109(10):4245-8.

(63) Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* 2007 February 15;109(4):1743-51.

(64) Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: hype and reality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002;369-91.

(65) Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, Kobune M, Sato T, Miyanishi K, Takayama T, Takahashi M, Takimoto R, Iyama S, Matsunaga T, Ohtani S, Matsuura A, Hamada H, Niitsu Y. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 2005 July 15;106(2):756-63.

(66) Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 September 14;96(19):10711-6.

(67) 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 April;113(Pt 7):1161-6.

(68) Danielyan L, Schäfer R, Schulz A, Ladewig T, Lourhmati A, Buadze M, Schmitt AL, Verleysdonk S, Kabisch D, Koeppen K, Siegel G, Proksch B, Kluba T, Eckert A, Kohle C, Schoneberg T, Northoff H, Schwab M, Gleiter CH. Survival, neuron-like differentiation and functionality of mesenchymal stem cells in neurotoxic environment: the critical role of erythropoietin. *Cell Death Differ* 2009 December;16(12):1599-614.

(69) Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000 August 15;61(4):364-70.

(70) Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004 December;40(6):1275-84.

(71) Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002 January 1;105(1):93-8.

(72) Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005 September 23;122(6):947-56.

(73) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006 August 25;126(4):663-76.

(74) Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, ntosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007 December 21;318(5858):1917-20.

(75) Madan B, Madan V, Weber O, Tropel P, Blum C, Kieffer E, Viville S, Fehling HJ. The pluripotency-associated gene Dppa4 is dispensable for embryonic stem cell identity and germ cell development but essential for embryogenesis. *Mol Cell Biol* 2009 June;29(11):3186-203.

(76) Masaki H, Nishida T, Sakasai R, Teraoka H. DPPA4 modulates chromatin structure via association with DNA and core histone H3 in mouse embryonic stem cells. *Genes Cells* 2010 April 1;15(4):327-37.

(77) Ulloa-Montoya F, Kidder BL, Pauwelyn KA, Chase LG, Luttun A, Crabbe A, Geraerts M, Sharov AA, Piao Y, Ko MS, Hu WS, Verfaillie CM. Comparative transcriptome analysis of embryonic and adult stem cells with extended and limited differentiation capacity. *Genome Biol* 2007;8(8):R163.

(78) Trubiani O, Zalzal SF, Paganelli R, Marchisio M, Giancola R, Pizzicannella J, Bühring HJ, Piattelli M, Caputi S, Nanci A. Expression profile of the embryonic markers nanog, OCT-4, SSEA-1, SSEA-4, and frizzled-9 receptor in human periodontal ligament mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2010 October;225(1):123-31.

(79) Go MJ, Takenaka C, Ohgushi H. Forced expression of Sox2 or Nanog in human bone marrow derived mesenchymal stem cells maintains their expansion and differentiation capabilities. *Exp Cell Res* 2008 March 10;314(5):1147-54.

(80) Reese JS, Koc ON, Gerson SL. Human mesenchymal stem cells provide stromal support for efficient CD34+ transduction. *J Hematother Stem Cell Res* 1999 October;8(5):515-23.

(81) Cheng L, Qasba P, Vanguri P, Thiede MA. Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *J Cell Physiol* 2000 July;184(1):58-69.

(82) Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev* 2006 May;20(3):161-71.

(83) Fouillard L, Bensidhoum M, Bories D, Bonte H, Lopez M, Moseley AM, Smith A, Lesage S, Beaujean F, Thierry D, Gourmelon P, Najman A, Gorin NC. Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma. *Leukemia* 2003 February;17(2):474-6.

(84) Wang M, Crisostomo PR, Herring C, Meldrum KK, Meldrum DR. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006 October;291(4):R880-R884.

(85) Drouet M, Mourcin F, Grenier N, Delaunay C, Mayol JF, Lataillade JJ, Peinnequin A, Herodin F. Mesenchymal stem cells rescue CD34+ cells from radiation-induced apoptosis and sustain hematopoietic reconstitution after coculture and cografting in lethally irradiated baboons: is autologous stem cell therapy in nuclear accident settings hype or reality? *Bone Marrow Transplant* 2005 June;35(12):1201-9.

(86) Di NM, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002 May 15;99(10):3838-43.

(87) Iso Y, Spees JL, Serrano C, Bakondi B, Pochampally R, Song YH, Sobel BE, Delafontaine P, Prockop DJ. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun* 2007 March 16;354(3):700-6.

(88) Tang J, Xie Q, Pan G, Wang J, Wang M. Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006 August;30(2):353-61.

(89) Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002 January;30(1):42-8.

(90) Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003 May 1;101(9):3722-9.

(91) Le BK, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003 October;31(10):890-6.

(92) Le BK, 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 January;57(1):11-20.

(93) 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 October 1;171(7):3426-34.

(94) 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 February 15;75(3):389-97.

(95) 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 April 1;105(7):2821-7.

(96) Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006 January 1;107(1):367-72.

(97) Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 2006 January;24(1):74-85.

(98) Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006 February;24(2):386-98.

(99) Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer cell proliferation, cytotoxicity and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 2007 October; 19

(100) Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, Nelson M, Patil S, Hardy W, Sturgeon C, Hewett T, Chung T, Stock W, Sher D, Weissman S, Ferrer K, Mosca J, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol* 2001 February;29(2):244-55.

(101) Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnies H, Marschall HU, Dlugosz A, Szakos A, Hassan Z, Omazic B, Aschan J, Barkholt L, Le BK. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 2006 May 27;81(10):1390-7.

(102) Kotobuki N, Katsube Y, Katou Y, Tadokoro M, Hirose M, Ohgushi H. In vivo survival and osteogenic differentiation of allogeneic rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs). *Cell Transplant* 2008;17(6):705-12.

(103) Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. 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 June 25;99(13):8932-7.

(104) Eliopoulos N, Stagg J, Lejeune L, Pommey S, Galipeau J. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood* 2005 December 15;106(13):4057-65.

(105) Siegel G, Schäfer R, Dazzi F. The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Transplantation* 2009 May 15;87(9 Suppl):S45-S49.

(106) Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004 June 15;103(12):4619-21.

(107) Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005 February 15;105(4):1815-22.

(108) Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 2007 January 1;109(1):228-34.

(109) Gieseke F, Schutt B, Viebahn S, Koscielniak E, Friedrich W, Handgretinger R, Müller I. Human multipotent mesenchymal stromal cells inhibit proliferation of PBMCs independently of IFNgammaR1

signaling and IDO expression. *Blood* 2007 September 15;110(6):2197-200.

(110) Nasef A, Mathieu N, Chapel A, Frick J, Francois S, Mazurier C, Boutarfa A, Bouchet S, Gorin NC, Thierry D, Fouillard L. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation* 2007 July 27;84(2):231-7.

(111) Jones S, Horwood N, Cope A, Dazzi F. The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *J Immunol* 2007 September 1;179(5):2824-31.

(112) Undale AH, Westendorf JJ, Yaszemski MJ, Khosla S. Mesenchymal stem cells for bone repair and metabolic bone diseases. *Mayo Clin Proc* 2009 October;84(10):893-902.

(113) El Tamer MK, Reis RL. Progenitor and stem cells for bone and cartilage regeneration. *J Tissue Eng Regen Med* 2009 July;3(5):327-37.

(114) Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999 March;5(3):309-13.

(115) Dominici M, Marino R, Rasini V, Spano C, Paolucci P, Conte P, Hofmann TJ, Horwitz EM. Donor cell-derived osteopoiesis originates from a self-renewing stem cell with a limited regenerative contribution after transplantation. *Blood* 2008 April 15;111(8):4386-91.

(116) Le BK, Gotherstrom C, Ringden O, Hassan M, McMahon R, Horwitz E, Anneren G, Axelsson O, Nunn J, Ewald U, Norden-Lindeberg S, Jansson M, Dalton A, Astrom E, Westgren M. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation* 2005 June 15;79(11):1607-14.

(117) Müller I, Kustermann-Kuhn B, Holzwarth C, Isensee G, Vaegler M, Harzer K, Krageloh-Mann I, Handgretinger R, Bruchelt G. In vitro analysis of multipotent mesenchymal stromal cells as potential cellular therapeutics in neurometabolic diseases in pediatric patients. *Exp Hematol* 2006 October;34(10):1413-9.

(118) Krivit W, Lipton ME, Lockman LA, Tsai M, Dyck PJ, Smith S, Ramsay NK, Kersey J. Prevention of deterioration in metachromatic leukodystrophy by bone marrow transplantation. *Am J Med Sci* 1987 August;294(2):80-5.

(119) Koc 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 August;30(4):215-22.

(120) Meuleman N, Vanhaelen G, Tondreau T, Lewalle P, Kwan J, Bennani J, Martiat P, Lagneaux L, Bron D. Reduced intensity conditioning haematopoietic stem cell transplantation with mesenchymal stromal cells infusion for the treatment of metachromatic leukodystrophy: a case report. *Haematologica* 2008 January;93(1):e11-e13.

(121) Maitra B, Szekely E, Gjini K, Laughlin MJ, Dennis J, Haynesworth SE, Koc ON. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant* 2004 March;33(6):597-604.

(122) Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM, Locatelli F, Fibbe WE. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 2007 October 1;110(7):2764-7.

(123) Macmillan ML, Blazar BR, DeFor TE, Wagner JE. Transplantation of ex-vivo culture-expanded parental haploidentical mesenchymal stem cells to promote engraftment in pediatric recipients of unrelated donor umbilical cord blood: results of a phase I-II clinical trial. *Bone Marrow Transplant* 2009 March;43(6):447-54.

(124) Fang B, Li N, Song Y, Li J, Zhao RC, Ma Y. Cotransplantation of haploidentical mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells and to reduce the risk of graft failure in two children with severe aplastic anemia. *Pediatr Transplant* 2009 June;13(4):499-502.

(125) Le BK, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004 May 1;363(9419):1439-41.

(126) Wang Y, Zhang A, Ye Z, Xie H, Zheng S. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibit acute rejection of rat liver allografts in association with regulatory T-cell expansion. *Transplant Proc* 2009 December;41(10):4352-6.

(127) Ge W, Jiang J, Baroja ML, Arp J, Zassoko R, Liu W, Bartholomew A, Garcia B, Wang H. Infusion of mesenchymal stem cells and rapamycin synergize to attenuate alloimmune responses and promote cardiac allograft tolerance. *Am J Transplant* 2009 August;9(8):1760-72.

(128) Reinders ME, Fibbe WE, Rabelink TJ. Multipotent mesenchymal stromal cell therapy in renal disease and kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2010 January;25(1):17-24.

(129) Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, Frassoni F, Mancardi G, Uccelli A. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005 September 1;106(5):1755-61.

(130) 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 April;56(4):1175-86.

(131) Sun L, Akiyama K, Zhang H, Yamaza T, Hou Y, Zhao S, Xu T, Le A, Shi S. Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. *Stem Cells* 2009 June;27(6):1421-32.

(132) Tyndall A, Gratwohl A. Adult stem cell transplantation in autoimmune disease. *Curr Opin Hematol* 2009 July;16(4):285-91.

(133) Carrion F, Nova E, Ruiz C, Diaz F, Inostroza C, Rojo D, Monckeberg G, Figueroa FE. Autologous mesenchymal stem cell treatment increased T regulatory cells with no effect on disease activity in two systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2010;19(3):317-22.

(134) Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995 December;18(12):1417-26.

(135) Shim WS, Jiang S, Wong P, Tan J, Chua YL, Tan YS, Sin YK, Lim CH, Chua T, Teh M, Liu TC, Sim E. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 November 12;324(2):481-8.

(136) Xaymardan M, Tang L, Zagreda L, Pallante B, Zheng J, Chazen JL, Chin A, Duignan I, Nahirney P, Rafii S, Mikawa T, Edelberg JM. Platelet-derived growth factor-AB promotes the generation of adult bone marrow-derived cardiac myocytes. *Circ Res* 2004 March; 19; 94(5):E39-E45.

(137) Heng BC, Haider HK, Sim EK, Cao T, Ng SC. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro. *Cardiovasc Res* 2004 April 1;62(1):34-42.

(138) Yoon J, Shim WJ, Ro YM, Lim DS. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes by direct cell-to-cell

contact with neonatal cardiomyocyte but not adult cardiomyocytes. *Ann Hematol* 2005 October;84(11):715-21.

(139) Peran M, Marchal JA, Lopez E, Jimenez-Navarro M, Boulaiz H, Rodriguez-Serrano F, Carrillo E, Sanchez-Espin G, de TE, Tosh D, Aranega A. Human cardiac tissue induces transdifferentiation of adult stem cells towards cardiomyocytes. *Cytotherapy* 2010 May;12(3):332-7.

(140) Wang T, Xu Z, Jiang W, Ma A. Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell. *Int J Cardiol* 2006 April 28;109(1):74-81.

(141) Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 2002 June;73(6):1919-25.

(142) Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, Muguruma Y, Tsuboi K, Itabashi Y, Ikeda Y, Ogawa S, Okano H, Hotta T, Ando K, Fukuda K. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 2004 December 1;104(12):3581-7.

(143) Yoon J, Min BG, Kim YH, Shim WJ, Ro YM, Lim DS. Differentiation, engraftment and functional effects of pre-treated mesenchymal stem cells in a rat myocardial infarct model. *Acta Cardiol* 2005 June;60(3):277-84

(144) Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif Organs* 2001 March;25(3):187-93.

(145) Fukuda K. Molecular characterization of regenerated cardiomyocytes derived from adult mesenchymal stem cells. *Congenit Anom (Kyoto)* 2002 March;42(1):1-9.

(146) Hakuno D, Fukuda K, Makino S, Konishi F, Tomita Y, Manabe T, Suzuki Y, Umezawa A, Ogawa S. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation* 2002 January 22;105(3):380-6.

(147) Kawai T, Takahashi T, Esaki M, Ushikoshi H, Nagano S, Fujiwara H, Kosai K. Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ J* 2004 July;68(7):691-702.

(148) Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, Tanaka T, Sugimura K, Kinoshita M, Hattori F, Fukami S, Shimazaki T, Ogawa S, Okano H, Fukuda K.

Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005 May;23(5):607-11.

(149) Hidaka K, Morisaki T, Byun SH, Hashido K, Toyama K, Mukai T. The MEF2B homologue differentially expressed in mouse embryonal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 August 15;213(2):555-60.

(150) Rose RA, Jiang H, Wang X, Helke S, Tsoporis JN, Gong N, Keating SC, Parker TG, Backx PH, Keating A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes in vitro. *Stem Cells* 2008 November;26(11):2884-92.

(151) Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van CJ, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de WF. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006 January 14;367(9505):113-21.

(152) Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006 September 21;355(12):1210-21.

(153) Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 2006 March 14;113(10):1287-94.

(154) Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S, Sun JP. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004 July 1;94(1):92-5.

(155) Matsuura K, Wada H, Nagai T, Iijima Y, Minamino T, Sano M, Akazawa H, Molkentin JD, Kasanuki H, Komuro I. Cardiomyocytes fuse with surrounding noncardiomyocytes and reenter the cell cycle. *J Cell Biol* 2004 October 25;167(2):351-63.

(156) Yoon YS, Park JS, Tkebuchava T, Luedeman C, Losordo DW. Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow

cells in acute myocardial infarction. *Circulation* 2004 June 29;109(25):3154-7.

(157) Breitbach M, Bostani T, Roell W, Xia Y, Dewald O, Nygren JM, Fries JW, Tiemann K, Bohlen H, Hescheler J, Welz A, Bloch W, Jacobsen SE, Fleischmann BK. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood* 2007 August 15;110(4):1362-9.

(158) Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999 November 9;100(19 Suppl):II247-II256.

(159) Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006 February;24(2):462-71.

(160) Schäfer R, Bantleon R, Kehlbach R, Siegel G, Wiskirchen J, Wolburg H, Kluba T, Eibofner F, Northoff H, Claussen CD, Schlemmer HP. Functional investigations on human mesenchymal stem cells exposed to magnetic fields and labeled with clinically approved iron nanoparticles. *BMC Cell Biol* 2010 April 6;11:22.:22.

(161) Rudnicki MA, Jackowski G, Saggin L, McBurney MW. Actin and myosin expression during development of cardiac muscle from cultured embryonal carcinoma cells. *Dev Biol* 1990 April;138(2):348-58.

(162) Paquin J, Danalache BA, Jankowski M, McCann SM, Gutkowska J. Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 July 9;99(14):9550-5.

(163) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988 January 29;239(4839):487-91.

(164) http://de.wikipedia.org/wiki/Pcr. 2010.

(165) Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 2001 December;25(4):386-401.

(166) Pfaffl M.W. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 2004;(1/04 10. Jahrgang):92-5.

(167) Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002 May 1;30(9):e36.

(168) Müller I, Vaegler M, Holzwarth C, Tzaribatchev N, Pfister SM, Schutt B, Reize P, Greil J, Handgretinger R, Rudert M. Secretion of angiogenic proteins by human multipotent mesenchymal stromal cells and their clinical potential in the treatment of avascular osteonecrosis. *Leukemia* 2008 November;22(11):2054-61.

(169) Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, Zhou H, Chen Y. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004 July;229(7):623-31.

(170) Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998 October 30;95(3):379-91.

(171) Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 2003 January 1;17(1):126-40.

(172) Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003 May 30;113(5):631-42.

(173) Li Y, McClintick J, Zhong L, Edenberg HJ, Yoder MC, Chan RJ. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* 2005 January 15;105(2):635-7.

(174) Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 2005 March;132(5):885-96.

(175) Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997 February;64(2):278-94.

(176) Felka T, Schäfer R, de ZP, Aicher WK. Animal serum-free expansion and differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2010 April;12(2):143-53.

(177) Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 2006;1(3):1559-82.

(178) Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 2005 June;6(4):279-84.

(179) biogps. http://biogps.gnf.org/. 2010.

(180) Bayes-Genis A, Roura S, Soler-Botija C, Farre J, Hove-Madsen L, Llach A, Cinca J. Identification of cardiomyogenic lineage markers in untreated human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 2005 November;37(9):4077-9.

(181) Seib FP, Franke M, Jing D, Werner C, Bornhauser M. Endogenous bone morphogenetic proteins in human bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells. *Eur J Cell Biol* 2009 May;88(5):257-71.

(182) Mastitskaya S, Denecke B. Human spongiosa mesenchymal stem cells fail to generate cardiomyocytes in vitro. *J Negat Results Biomed* 2009 November 10;8:11.:11.

(183) Valenzuela DM, Economides AN, Rojas E, Lamb TM, Nunez L, Jones P, Lp NY, Espinosa R, III, Brannan CI, Gilbert DJ, . Identification of mammalian noggin and its expression in the adult nervous system. *J Neurosci* 1995 September;15(9):6077-84.

(184) Rifas L. The role of noggin in human mesenchymal stem cell differentiation. *J Cell Biochem* 2007 March 1;100(4):824-34.

(185) Ladd AN, Yatskievych TA, Antin PB. Regulation of avian cardiac myogenesis by activin/TGFbeta and bone morphogenetic proteins. *Dev Biol* 1998 December 15;204(2):407-19.

(186) Sachinidis A, Fleischmann BK, Kolossov E, Wartenberg M, Sauer H, Hescheler J. Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cardiovasc Res* 2003 May 1;58(2):278-91.

(187) Rogers JJ, Young HE, Adkison LR, Lucas PA, Black AC, Jr. Differentiation factors induce expression of muscle, fat, cartilage, and bone in a clone of mouse pluripotent mesenchymal stem cells. *Am Surg* 1995 March;61(3):231-6.

(188) Feldman BJ. Glucocorticoids influence on mesenchymal stem cells and implications for metabolic disease. *Pediatr Res* 2009 February;65(2):249-51.

(189) Bühring HJ, Treml S, Cerabona F, de ZP, Kanz L, Sobiesiak M. Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets. *Ann N Y Acad Sci* 2009 September;1176:124-34.:124-34.

(190) Battula VL, Bareiss PM, Treml S, Conrad S, Albert I, Hojak S, Abele H, Schewe B, Just L, Skutella T, Bühring HJ. 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 April;75(4):279-91.

(191) Pochampally RR, Smith JR, Ylostalo J, Prockop DJ. Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood* 2004 March 1;103(5):1647-52.

(192) Pacini S, Carnicelli V, Trombi L, Montali M, Fazzi R, Lazzarini E, Giannotti S, Petrini M. Constitutive expression of pluripotency-associated genes in mesodermal progenitor cells (MPCs). *PLoS One* 2010 March 25;5(3):e9861.

(193) Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, Hoogduijn M, Jankovskis G, Muiznieks I, Muceniece R, Ancans J. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev* 2009 December;5(4):378-86.

(194) Hamid AA, Ruszymah BH, Aminuddin BS, Sathappan S, Chua KH. Differential gene expression of human adipose-derived stem cells in osteogenic induction. *Med J Malaysia* 2008 July;63 Suppl A:9-10.:9-10.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Ablauf einer PCR-Reaktion ..... - 46 -

Abbildung 2: Undifferenzierte MSCs im Verlauf der Langzeitkultur ..... - 59 -

Abbildung 3: Adipogene Differenzierung im Verlauf der Langzeitkultur ..... - 60 -

Abbildung 4: Osteogene Differenzierung im Verlauf der Langzeitkultur ..... - 61 -

Abbildung 5: Chondrogen differenziertes Micromass-Pellet. ..... - 62 -

Abbildung 6: Expression von PPAR-γ ..... - 63 -

Abbildung 7: Expression von LPL ..... - 63 -

Abbildung 8: Expression von ALP ..... - 64 -

Abbildung 9: Expression von Coll2 ..... - 65 -

Abbildung 10: Gelelektrophorese der Produkte der TaqMan-basierten PCRs ..... - 66 -

Abbildung 11: Regressionsgerade eines TaqMan PCR-Experiments ..... - 67 -

Abbildung 12: Gelelektrophorese der Produkte der SYBR Green I-basierten PCR-Assays ..... - 68 -

Abbildung 13: PDGF+FGF2+VEGF behandelte MSCs ..... - 70 -

Abbildung 14: Konstitutive Expression von TropI durch MSCs ..... - 71 -

Abbildung 15: Konstitutive Expression von cAct durch MSCs ..... - 72 -

Abbildung 16: Konstitutive Expression von MLC durch MSCs ..... - 73 -

Abbildung 17: Konstitutive Expression von Oct-4 und Nanog durch unbehandelte MSCs ..... - 79 -

Abbildung 18: Oct-4 und Nanog unter nicht-kardiomyogener Differenzierung ..... - 80 -

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eingesetzte Medienvolumina ..... - 30 -

Tabelle 2: Pipettierschema der reversen Transkription ..... - 44 -

Tabelle 3: Primersequenzen, Sonden und Amplifikatlängen der TaqMan-PCRs... ..... - 50 -

Tabelle 4: Zielgene und Amplifikatlängen der SYBR Green I-basierten PCRs..... ..... - 51 -

Tabelle 5: Pipettierschema der SYBR Green I-basierten PCRs ..... - 52 -

Tabelle 6: Temperaturprotokoll der SYBR Green I-basierten PCRs..... - 52 -

Tabelle 7: Pipettierschema der TaqMan-basierten PCRs ..... - 54 -

Tabelle 8: Temperaturprotokoll der TaqMan-basierten PCRs ..... - 54 -

Tabelle 9: Effizienzen der TaqMan-basierten PCRs..... - 67 -

Tabelle 10: Effizienzen der SYBR Green I-basierten PCRs ..... - 69 -

Tabelle 11: Behandlung mit 5-Azacytidin ..... - 74 -

Tabelle 12: Behandlung mit Noggin ..... - 74 -

Tabelle 13: Behandlung mit FGF2 + BMP2 ..... - 75 -

Tabelle 14: Behandlung mit DMSO ..... - 76 -

Tabelle 15: Behandlung mit PDGF + FGF2 + VEGF ..... - 76 -

Tabelle 16: Behandlung mit ITAD..... - 77 -

Tabelle 17: Interaktion zwischen kardiomyogener Differenzierung und Expression Multipotenz-assoziierter Gene ..... - 81 -

Tabelle 18: kardiomyogene Differenzierungsprotokolle..... - 89 -

7.3 Abkürzungsverzeichnis

α-MEM	α-Modified Eagle’s Medium
Aza	5-Azacytidin
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine
cAct	Actin, alpha, cardiac muscle 1
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Complementary DNA
Coll2	Kollagen II
CP	Crossing Point
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
DPPA4	Developmental pluripotency associated 4
DTT	1, 4-Dithio-DL-threitol Solution
EPC	Endotheliale Progenitorzelle(n)
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast growth factor
g	Schwerebeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GvHD	Graft versus Host Disease
HGF	Hepatocyte growth factor
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPLC	High performance liquid Chromatography
HSC	Hämatopoetische Stammzelle(n)
IDO	2,3-Dioxygenase
iPSC	Induced pluripotent stem cell
ISCT	International Society for Cellular Therapy
ITAD	Insulin, Transferrin, Ascorbat, Dexamethason
LIF	Leukemia inhibitory factor

LPL	Lipoproteinlipase
M	Molar
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MLC	Myosin, light chain 3
mRNA	Messenger Ribonucleinacid
MSC(s)	Mesenchymale Stamzelle(n)
MSCA-1	Mesenchymal stem cell antigen-1
Oct-4	Octamer binding transcription factor 4
P	Passage
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PPAR-γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SDF	Stromal Derived Factor
Sox2	sex determining region Y-box 2
SSEA	Stage-Specific Embryonic Antigen
TGF-β	Transforming growth factor beta
T_m	Schmelzpunkt
TropI	Troponin I Type 3
VEGF	Vascular endothelial growth factor

8 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. H. Northoff für die Annahme als Doktorand an seinem Institut, sowie für die Chance der weiterführenden Zusammenarbeit.

Bei Dr. med. Richard Schäfer möchte ich mich von Herzen für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung der Dissertation, die ausgezeichnete wissenschaftliche Zusammenarbeit, sowie das stetige Mentoring bedanken.

Ein besonderes Dankeschön gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Mesenchymale Stammzellen am Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin. Insbesondere möchte ich mich bei Ursula Hermanutz-Klein, bei Monika Hirlinger und bei Marianne Rädlein für die Einarbeitung im Labor, die vielseitige Unterstützung und das hervorragende Arbeitsklima bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir bei allem Tun Rückhalt geben.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Georg Siegel
Geburtsdaten:	30.10.1982 in Nürtingen
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulausbildung:

1989 - 1993:	Neugreuthschule Metzingen
1993 - 2002:	Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Metzingen, Abitur im Juli 2002

Studium:

2003 – 2009:	Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen
Ärztliche Vorprüfung:	18.03.2005
Forschungssemester:	März – September 2007 am Imperial College London, gefördert durch ein Stipendium der Landesstiftung Baden-Württemberg
Ärztliche Prüfung:	28.10.2009

Beruf:

Seit Januar 2010:	Assistenzarzt am Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin Tübingen (IKET), sowie am Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin Tübingen (ZKT)

Eigene Publikationen:

Schäfer R, Bantleon R, Kehlbach R, **Siegel G**, Wiskirchen J, Wolburg H, Kluba T, Eibofner F, Northoff H, Claussen CD, Schlemmer HP.
Functional investigations on human mesenchymal stem cells exposed to magnetic fields and labeled with clinically approved iron nanoparticles.
BMC Cell Biol. 2010 Apr 6;11:22.

Danielyan L, Schäfer R, Schulz A, Ladewig T, Lourhmati A, Buadze M, Schmitt AL, Verleysdonk S, Kabisch D, Koeppen K, **Siegel G**, Proksch B, Kluba T, Eckert A, Köhle C, Schöneberg T, Northoff H, Schwab M, Gleiter CH.
Survival, neuron-like differentiation and functionality of mesenchymal stem cells in neurotoxic environment: the critical role of erythropoietin.
Cell Death Differ. 2009 Dec;16(12):1599-614. Epub 2009 Jul 17.

Siegel G, Schäfer R, Dazzi F.
The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells.
Transplantation. 2009 May 15;87(9 Suppl):S45-9.

Schäfer R, Kehlbach R, Müller M, Bantleon R, Kluba T, Ayturan M, **Siegel G**, Wolburg H, Northoff H, Dietz K, Claussen CD, Wiskirchen J.
Labeling of human mesenchymal stromal cells with superparamagnetic iron oxide leads to a decrease in migration capacity and colony formation ability.
Cytotherapy. 2009;11(1):68-78.

Schäfer R, Ayturan M, Bantleon R, Kehlbach R, **Siegel G**, Pintaske J, Conrad S, Wolburg H, Northoff H, Wiskirchen J, Weissert R.
The use of clinically approved small particles of iron oxide (SPIO) for labeling of mesenchymal stem cells aggravates clinical symptoms in experimental autoimmune encephalomyelitis and influences their in vivo distribution.
Cell Transplant. 2008;17(8):923-41.