

Aus dem Institut für Klinische und Experimentelle
Transfusionsmedizin der Universität Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Northoff

Durchflusszytometrische Untersuchungen von
Oberflächenepitopen von mesenchymalen Stammzellen
unter kardiomyogener Differenzierung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard Karls Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Patrick Wolfgang Nowak

aus Stuttgart

2014

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Northoff

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. P. Wendel

S.E.W.A.

Inhalt

Einleitung	7
1 Stammzellen.....	8
1.1 Mesenchymale Stammzellen	10
1.2 Myokardinfarkt	12
1.3 Neue Therapieansätze eines infarzierten Myokards	13
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	14
2 Material	16
2.1 Geräte.....	16
2.2 Verbrauchsmaterialien	17
2.3 Medien und Chemikalien.....	17
2.4 Antikörper für die durchflusszytometrische Messung.....	20
2.5 Humanes Zellmaterial.....	21
2.6 Knochenmark.....	21
3 Methoden	21
3.1 Zellbiologische Methoden	21
3.2 Isolierung mononukleärer Zellen.....	22
3.3 Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen	23
3.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	23
3.5 Durchflusszytometrie.....	24
3.6 Oberflächenepitope und deren Funktion.....	28
3.6.1 CD10	28
3.6.2 CD31	29
3.6.3 CD45	29
3.6.4 CD71	29
3.6.5 CD73	29
3.6.6 CD90	30
3.6.7 CD105	30
3.6.8 CD106	30
3.6.9 CD117	30
3.6.10 CD243	31

3.6.11 CD309	31
3.6.12 GD2.....	31
3.7 <i>In vitro</i> Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen	31
3.7.1 Adipogene Differenzierung	32
3.7.2 Osteogene Differenzierung	32
3.7.3 Chondrogene Differenzierung.....	32
3.8 Kardiomyogene Differenzierungsmedien.....	33
3.8.1 5-Azacytidin.....	34
3.8.2 Noggin	34
3.8.3 FGF2+BMP2.....	34
3.8.4 DMSO	35
3.8.5 ITAD	35
3.8.6 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) + PDGF (Platelet-derived Growth Factor) + FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2).....	35
4 Ergebnisse	36
4.1 Kultur der MSC	36
4.1.1 h20.....	36
4.1.2 h21.....	36
4.1.3 h38.....	37
4.2 Zellmorphologie unter kardiomyogener Differenzierung.....	37
4.3 Nachweis der Adipogenese, Osteogenese und Chondrogenese.....	39
4.4 Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen.....	39
4.4.1 CD10	46
4.4.2 CD31	47
4.4.3 CD45	47
4.4.4 CD71	48
4.4.5 CD73	48
4.4.6 CD90	48
4.4.7 CD 105	49
4.4.8 CD106	49
4.4.9 CD117	49

4.4.10 CD243	50
4.4.11 GD2.....	50
4.4.12 CD309	51
4.5 Vergleich der Differenzierungsmedien – eine Übersicht	51
5 Diskussion.....	54
5.1 MSC.....	55
5.2 Kardiomyogene Differenzierung	56
5.3 Zusammenfassung und Ausblick	62
6 Abbildungsverzeichnis.....	65
7 Abkürzungen.....	65
8 Literaturverzeichnis.....	66

Einleitung

Der Lebenswandel in den industrialisierten Staaten hat sich in den letzten einhundert Jahren sehr verändert. Während vorher vornehmlich Infektionskrankheiten und Arbeitsunfälle zum Tode führten, sind es heute in verstärktem Umfang Erkrankungen des Herz- Kreislaufsystems. Die Veränderungen in unseren Lebensgewohnheiten stellen dabei die Hauptursache dar. Mangelnde Bewegung, Überangebot an Nahrung, Stress und das Zigarettenrauchen sind entscheidende Verursacher von Arteriosklerose, die wiederum zum Verschluss der Koronargefäße führen kann. Die so entstandene Mangelversorgung des Herzmuskelgewebes mit Sauerstoff führt zum Untergang der Kardiomyozyten. Tritt dies plötzlich auf, wird dies als Akutes Koronarsyndrom bezeichnet. Heute kann die verbesserte medizinische Versorgung, die schnellere Behandlung des Patienten und der Einsatz vielfältiger Medikamente zur Akutbehandlung oft den Tod verhindern. Die Sekundärprävention soll ein weiteres Ereignis verhindern.

Da bei einem Herzinfarkt irreversibel Herzmuskelzellen zugrundegehen und die anschließende Organisation des Gewebes oft die Bildung von Narbengewebe zur Folge hat, ist –abhängig vom Ausmaß des ischämischen Bezirkes- ein abnormes Bewegungsbild und damit verbunden eine reduzierte Leistung des Herzens die Folge. Eine Therapie, die eine Narbenbildung verhindern oder diese nachträglich in starkem Maße reduzieren kann, ist bislang nicht möglich. Zwar gibt es Medikamente, die nachweislich einen positiven Einfluss auf das sogenannte remodeling, also die Umorganisation des Gewebes, haben. Dadurch werden die Bewegungsfähigkeit und damit auch die Effizienz des Herzens verbessert.

Verschiedene Ansätze zur Verbesserung der Herzfunktion nach Myokardinfarkt wurden bereits unternommen. So wurden Myoblasten aus Skelettmuskulatur in ischämisches Myokard injiziert. Die in der Folge zu beobachtende Verbesserung der Herzfunktion war jedoch nur gering. Zudem zeigte sich ein erhöhtes Risiko für arrhythmische Ereignisse.^{1,2}

Verschiedene Arbeitsgruppen berichteten, dass durch die Injektion von mononukleären Zellen in das infarzierte Myokard eine Verbesserung der Pumpleistung gelang. Dies habe sich in einer Reduktion des ausgeschütteten NT-pro BNP und NT-pro ANP beobachten lassen.³

Eine Verkleinerung der Infarkt Narbe und eine verbesserte Revaskularisation wurden ebenso beschrieben. Des Weiteren konnte die Verringerung von Morbidität und Mortalität gezeigt werden.

Da hierbei mononukleäre Zellen aus Knochenmark injiziert und diese nicht fraktioniert wurden, waren hierin verschiedene Zellpopulationen enthalten, wie endotheliale und hämatopoetische Progenitorzellen und mesenchymale Stammzellen (MSC).^{4,5,6,7,8}

Versuche mit endothelialen Progenitorzellen, die in myokardiales Infarktgewebe injiziert wurden, zeigten ein verbessertes Remodeling durch Neovaskularisation.^{9,10}

Die Veröffentlichung von Tang et al. zeigte, dass eine Injektion von kardialen Progenitorzellen (CPC) eine Verbesserung der linksventrikulären Pumpleistung und des Remodelings an abgelaufenen Infarkten bewirken konnte.^{11,12} Dies beruhe auf reduzierter Fibrosierung im Nicht-Infarktgebiet und Zunahme vitaler Zellen im Narbengebiet. Zudem vermutete die Gruppe parakrine Effekte durch die CPC.

Versuche, in denen mesenchymale Stammzellen (MSC) injiziert wurden, zeigten ebenfalls eine Verbesserung der Herzfunktion.¹³ In diesem Versuchsaufbau wurden Ratten 24-48 h nach myokardialer Ischämie intravenös MSCs infundiert und echokardiographische Kontrollen der kardialen Pumpfunktion vorgenommen.

Aufgrund der leichten Isolierbarkeit von MSC, ihrer Fähigkeit, in andere Zelltypen zu differenzieren und ihrer parakrinen Eigenschaften, bieten diese Zellen weitere Therapieoptionen, weshalb die weitere Aufklärung ihrer Physiologie bedeutsam erscheint. Darauf soll im Weiteren eingegangen werden.

1 Stammzellen

Nach der Verschmelzung von Ei- und Samenzelle entwickelt sich in mehreren Teilungen die Blastozyste. Darin enthalten sind der Embryoblast bzw. die innere Zellmasse (IZM) und der Trophoblast. Daraus entwickeln sich der Embryo selbst und die extraembryonalen Strukturen wie Plazenta und Eihäute. Die IZM enthält pluripotente Stammzellen, die sich in alle embryonalen Strukturen differenzieren

können. Daraus entstehen die drei Keimblätter Ento-, Ekto- und Mesoderm. Aus dem Entoderm, dem inneren Keimblatt, entwickeln sich die Epithelien des Verdauungstrakts, der Leber, des Pankreas, der Schilddrüse, des Thymus, der Atmungstrakt sowie die Harnblase und Harnröhre. Aus dem oberen Keimblatt, dem Ektoderm, entstehen die Cutis, das Nervensystem und die Sinnesorgane. Das Mesoderm als mittleres Keimblatt dient als Ausgangsstufe für Knochen, Skelettmuskulatur, Bindegewebe, glatte Muskulatur, Herz, Blutgefäße, Milz, Lymphknoten, Nieren, Keimdrüsen und den inneren Geschlechtsorganen. ¹⁴

Stammzellen besitzen unterschiedliche Potenz zur Differenzierung. So spricht man von Pluri- und Multipotenz.

Pluripotente Stammzellen können nur im Embryonalgewebe nachgewiesen werden. Pluripotenz bedeutet, dass sich die Stammzellen in Gewebe aller 3 Keimblätter (Ento-, Ekto- und Mesoderm) differenzieren können.

Nach der Geburt spricht man von adulten Stammzellen, die keine Pluripotenz mehr aufweisen, sondern allenfalls multi- oder oligopotenz zu sein scheinen. Unter Multipotenz versteht man, dass die Stammzelle in viele verschiedene Zelltypen einer Zelllinie (Ento-, Ekto- oder Mesoderm) differenzieren kann.

Oligopotente Zellen können dagegen nur in 2 oder einige wenige Zelltypen einer Zelllinie differenzieren. Zuletzt findet man noch den Begriff der unipotenten Stammzelle oder Progenitorzelle, die nur einen Zelltyp hervorbringen kann. Da viele Gewebe wie die Epidermis der Haut, die Leber, die Blutzellen und das Epithel des Verdauungstraktes einem hohen Zellumsatz unterliegen, findet die Regeneration für absterbende Zellen durch diese adulten Stammzellen statt.

Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur asymmetrischen Zellteilung. Das heißt, die Stammzellen können durch Teilung zwei unterschiedliche Typen von Nachkommen erzeugen. Eine Tochterzelle stellt dabei immer das identische Abbild der ursprünglichen Mutterzelle mit den gleichen Eigenschaften und Fähigkeiten dar. Die zweite Zelle, die bei solch einer Teilung entsteht, entspricht nicht mehr dem Bild der Mutterzelle. Sie ist eine reifere und damit differenzierte Zelle. Damit kann sie im Organismus spezifische Aufgaben übernehmen, die unverzichtbar für das Funktionieren der vielfältigen

Stoffwechselfvorgänge sind. Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass die nun entstandene Zelle eine definierte Aufgabe erhält, die ihre Mutterzelle nicht erfüllen konnte. Diesen Vorgang nennt man Differenzierung.^{15, 16, 17}

1.1 Mesenchymale Stammzellen

AJ Friedenstein beschrieb in den 1960-er Jahren im Rahmen der Anzucht von Knochenmarkproben eine Neubildung von Knochengewebe. Dies zeigte sich auch nach intraperitonealer Injektion von autologem Knochenmark bei Mäusen. So konnte er zeigen, dass im Knochenmark nicht ausschließlich hämatopoetische Stammzellen zu finden sind, sondern auch Vorläuferzellen der Knochen- und Bindegewebszellen vorkommen müssen.^{18,19}

Andere Forschungsgruppen konnten zeigen, dass nicht ausschließlich Knochengewebe aus MSCs hervorgeht, sondern die adipogene^{20,21} und chondrogene²² Differenzierung hier ebenfalls ihren Ursprung haben muss und eine *in vitro*-Differenzierung möglich ist.

Caplan et al. bezeichneten Zellen, die aus dem Knochenmarkblut gewonnen wurden, aber keine hämatopoetischen Eigenschaften besitzen, als MSC (*mesenchymal stem cell*).²³ Diese MSCs können sich in verschiedene Gewebe ausdifferenzieren, wie Knochen-, Muskel-, Sehnen- und andere Bindegewebe^{24,25,26}. Man vermutet zudem, dass sich MSC *in vivo*^{27 28} in andere Zelllinien differenzieren können, darunter endotheliale²⁹, epitheliale³⁰ und (kardio)myogene Zellen^{31 32 33}.

MSC lassen sich aus Knochenmarkaspiraten isolieren. Ferner findet man sie auch im Fettgewebe, in der Plazenta und im Nabelschnurblut, wohingegen es bisher nicht gelang, sie im peripheren Blut nachzuweisen^{34,35,36,37,38,39,40}.

Mesenchymale Stammzellen können durch ihr adhärentes Wachstum *in vitro* angezüchtet werden. Nach der Materialgewinnung durch Knochenmarkaspiration können mononukleäre Zellen nach einem etablierten Verfahren mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und kulturiert werden. Aufgrund des adhärenen Wachstums der humanen mesenchymalen Stammzellen lassen sich die nichtadhärenen hämatopoetischen Stammzellen durch mehrmaliges Waschen entfernen. Durch

anschließende Differenzierung in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten und deren Anfärbung können sie als MSC bestimmt werden.

Um die Vergleichbarkeit dieser Zellen zu gewährleisten, wurde 2005 durch die International Society for Cellular Therapy (ISCT)⁴¹ festgelegt, welche Kriterien Zellen aufweisen müssen, um sie als MSC zu bezeichnen:

- Plastikadhärenz
- adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierungsfähigkeit
- Expression von Oberflächenantigenen:

CD 105, 73 und 90 müssen nachweisbar sein, wohingegen CD 45, 34, 14 oder 11b, 79α, 19 und HLA-DR nicht nachweisbar sein sollten.⁴²

Lässt man die MSC über 2-3 Wochen *in vitro* wachsen, so zeigen sie eine recht einheitliche Morphologie und exprimieren die o.g. Oberflächenmarker. Eine ausreichende Charakterisierung von MSC ist jedoch auf diese Weise nicht möglich, da auch den MSC ähnliche Zelltypen, wie beispielsweise Fibroblasten eine ähnliche Oberflächenstruktur aufweisen. Um sicher zu sein, dass es sich wirklich um MSC handelt, kann auf die Differenzierung in mindestens zwei Arten von Bindegewebe (Adipozyten, Osteoblasten oder Chondrozyten) nicht verzichtet werden.

Neuere Forschungsergebnisse stellten weitere Oberflächenmarker vor, die Subpopulationen der MSCs identifizieren könnten. Darunter CD 271, der in der Arbeit von Bühring et al.⁴³ als Parameter diente, die untersuchten Zellen in 2 Gruppen zu unterteilen. So konnte eine Gruppe mit schwacher CD271-Positivität mittels Zellsortierung von einer Gruppe starker Positivität getrennt werden. Nur die stark positive Gruppe exprimierte die geforderten MSCs-Nachweismarker CD 10, CD13, CD73 und CD105.

Weitere MSC-Marker sind MSCA-1⁴⁴, GD2⁴⁵ und SSEA-4⁴⁶.

1.2 Myokardinfarkt

Unter normalen Blutdruckverhältnissen und Herzfunktion deckt der Herzmuskel 90 % seines Energiebedarfs durch oxidative Verberennung von freien Fettsäuren, Laktat und Glukose. Vom angebotenen Sauerstoff werden überdurchschnittlich hohe relative Mengen entnommen – so werden vom angebotenen Sauerstoff 70 - 80 % entnommen, während dem restlichen Organismus etwa 30 % bleiben. Die herzeigene Blut- und damit verbundene Sauerstoffversorgung ist über die zwei großen Herzkranzarterien gewährleistet. So leitet die rechte Herzkranzarterie das Blut zum rechten Herzen, zu Teilen des Septums und der linken Kammerhinterwand. Die linke Herzkranzarterie, die sich nach einem kurzen gemeinsamen Hauptstamm in den Ramus interventricularis anterior (RIVA) und Ramus circumflexus (RCX) teilt, versorgt das restliche Herz. Da es durch die Muskelkontraktion während der Systole zu einer Komprimierung der intramuskulären Gefäße kommt, findet die myokardiale Blutversorgung hauptsächlich während der Diastole statt. Eine Beschleunigung der Herzfrequenz, durch die im Allgemeinen die Mehrversorgung der Muskels mit Sauerstoff gelingen kann, verkürzt die Diastole⁴⁷. Bei bereits vorgeschädigten Herzkranzgefäßen, wie z.B. durch Arteriosklerose kann es so zu passageren Ischämien kommen, die sich durch Druckgefühl in der Brust und Kurzatmigkeit bemerkbar machen (Angina pectoris). Bereits hier ist medizinische Behandlung erforderlich, welche in einer guten Einstellung der kardiovaskulären Risikofaktoren (Blutdruckeinstellung, Senkung einer Hyperlipoproteinämie, Blutzuckerkontrolle, Nikotinkarenz) und interventioneller perkutaner transluminaler Coronarangioplastie (PTCA) besteht. Hierbei können Gefäßengstellen durch Dilatation und Stentimplantation aufgedehnt und stabilisiert werden. Werden die Warnsymptome nicht beachtet, kann es zu einem Myokardinfarkt kommen. Dies kann auch ohne vorherige Angina pectoris geschehen. Erklärbar ist dies durch einen akuten thrombotischen Verschluss eines oder mehrerer Herzkranzgefäße. Hierdurch kommt es distal des Verschlusses zu einer sistierten Durchblutung des Myokards und bereits nach 15 bis 20 Minuten zu einer irreversiblen Ischämie. Diese führt zu einer Gewebsnekrose, die makroskopisch nach etwa 8 Stunden sichtbar wird. Nach einer Woche bildet sich ein kapillarreiches Granulationsgewebe, der Nekroseabbau schreitet von peripher nach zentral fort. Durch Bildung von Kollagenfasern entsteht nach 6 bis 8 Wochen eine Myokardnarbe. Die klinische

Prognose hängt von Ausdehnung und Lokalisation des Infarktgebiets ab. Ist die vulnerable Phase von ca. 4 Wochen überstanden, ist die Sekundärprophylaxe, das heißt, die Vermeidung eines Folgeereignisses, obligat. Trotz Behandlung kann es zu zahlreichen Komplikationen im Rahmen eines akuten Koronarsyndroms kommen. So beobachtet man Herzrhythmusstörungen, Herzinsuffizienz des linken wie auch des rechten Herzens, Herzwandaneurysmata, Dressler-Syndrom, Perikarditis und thromboembolische Komplikationen⁴⁸. In der Frühphase und den Monaten nach einem Infarkt beobachtet man Umbauprozesse auch in Arealen, die nicht infarziert waren. Neben einer Abnahme der Wanddicke und Ausdehnung des infarzierten Bereichs ist eine fortschreitende Dilatation des Ventrikels möglich. Hierdurch kommt es zu einer Verschlechterung der systolischen Herzfunktion mit weiteren Umbauprozessen wie einer Hypertrophie, die selbst wieder zu einem erhöhten Sauerstoffbedarf des Myokards führt. Dieser Prozess wird als remodeling bezeichnet⁴⁹.

1.3 Neue Therapieansätze eines infarzierten Myokards

Die Forschung an mesenchymalen Stammzellen beschäftigt sich seit Jahrzehnten damit, die Verhaltensweise der Stammzellen *in vivo* und *in vitro* zu verstehen. Die entscheidenden Einflüsse auf die Differenzierung sind noch immer nicht geklärt. Auch ist die Hoch- und Herunterregulierung bestimmter Oberflächenmarker nicht hinreichend erklärt. Dies wiederum lässt neue Fragen aufkommen: Sind die Oberflächenmarker einheitlich für ein bestimmtes Reifestadium vorhanden oder nicht vorhanden? Ist das Vorhandensein einer bestimmten Oberflächenstruktur entscheidend für die Funktion einer Zelle und, damit verbunden, sind Zellen mit einer bestimmten Oberflächenstruktur besser für die therapeutischen Ansätze der Infarktregeneration geeignet?

Das Interesse an der Steuerbarkeit von Stammzellen ist aufgrund der daraus resultierenden, vielfältigen therapeutischen Möglichkeiten groß. Die Transplantation von MSC in infarziertes Herzmuskelgewebe sollte die sonst übliche Vernarbung und die damit verbundene Funktionseinschränkung reduzieren. Da nach einem Myokardinfarkt Fibroblasten in das geschädigte Gebiet einwandern und durch Bildung von kollagenem Gewebe eine Narbe entsteht, sind damit die ursprünglichen Gewebeeigenschaften wie

Elastizität und Erregungsleitungsfähigkeit nicht mehr wie ursprünglich gegeben. Dies erklärt die reduzierte Kontraktilität und Ejektionsfraktion und die möglichen Herzrhythmusstörungen nach einem Infarkt. Transplantierte MSCs könnten das infarzierte Areal möglicherweise durch Differenzierung in Herzmuskelzellen zu einem Teil ersetzen oder durch ihre Eigenschaften im Verbund mit kollagen Fasern für eine Verbesserung der Funktion des Herzens sorgen. Dabei bilden die MSC herzspezifische Proteine, lindern die kontraktile Dysfunktion, reduzieren die Ausdehnung des Infarktareals⁵⁰ und bewirken eine Aussprossung von Nervenfasern⁵¹. Die bisherigen Studien am Tiermodell zeigen, dass es möglich ist, aus Knochenmark gewonnene MSCs intravenös⁵² zu injizieren oder die Zellen direkt in das Infarktgebiet zu injizieren. Bei letzterem wurde unterschieden zwischen epi- und endokardialer und intrakoronarer Injektion. Eine Studie konnte zeigen, dass alle drei Applikationsarten zur Verbesserung der Herzfunktion führten. Dabei erbrachte die intrakoronare Anwendung die besten Ergebnisse, jedoch führte dies zu einem reduzierten Blutfluss. Das Einspritzen ins Endokard hatte den Vorteil, weniger Fremdkörperreaktionen auszulösen.⁵³

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Therapie mit MSCs die Auswirkungen eines Herzinfarkts durch folgende Effekte reduzieren kann: MSCs sorgen für Neovaskularisation und Nervensprossung, reduzieren das Narbengewebe und sorgen damit durch verbesserte Kontraktilität für eine verbesserte ventrikuläre Auswurffraktion^{54,55,56,57,58}.

Jedoch wurde auch über ossifizierende und kalzifizierende Areale berichtet. Dies wird durch eine unzureichende Inhibition der osteogenen bzw. der chondrogenen Differenzierung der MSCs im Infarktgebiet erklärt⁵⁹.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Wie oben beschrieben bietet das Gebiet der Stammzellforschung große Möglichkeiten im Hinblick auf die verbesserte Therapierbarkeit von Herzinfarktpatienten. Die Regeneration von nicht mehr funktionsfähigen Organen oder gar die Anzucht neuer Organe oder anderer Körperteile würde einen großen Fortschritt in der Medizin darstellen. Auch viele Forschungsprojekte im Bereich tissue engineering beschäftigen

sich mit diesem Thema. Nachdem heute die Herkunft der verschiedenen Gewebe und Organe weitgehend geklärt erscheint, haben sich dadurch aber auch viele neue Fragen ergeben. Wie unterscheidet sich die *in vitro* Differenzierung von der *in vivo* ablaufenden und unterscheiden sich deren Wirkung auf den Körper? In diesem Zusammenhang muss geklärt werden, inwiefern sich die Stammzellen auch in andere Zelllinien transdifferenzieren lassen und wie es gelingen kann, die Differenzierung der Stammzellen gezielt in eine Richtung zu lenken.

Viele Projekte haben sich mit der letzten Frage beschäftigt. In einer Vielzahl von Studien wurden unterschiedliche Medienformulierungen, die eine Differenzierung von MSCs in Kardiomyozyten erzielen sollten, untersucht. Allerdings wurden meist nur die Auswirkungen eines Differenzierungsmediums an einer MSC-Populationen untersucht. Ziel dieser Arbeit ist es, die Expressionsprofile von MSCs mehrerer Spender unter der Behandlung mit unterschiedlichen kardiomyogenen Differenzierungsmedien zu untersuchen und zu vergleichen.

2 Material

2.1 Geräte

Zentrifuge Varifuge RF	Heraeus, Hanau, Deutschland
Durchflusszytometer FACScan	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Brutschränke HERA Cell	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Flow Hera safe	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Hermle Z 513 K	Hermle Labortechnik, Wehingen, Deutschland
Mikroskop Zeiss Axiovert 200	Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Deckgläser 24x60	Fa. R. Langenbrinck
Feinwaage AS200	Fa. Ohaus
Neubauer-Zählkammer	Fa. Assistent
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
10µl /20µl /100µl /200µl/1000µl	
Pipettierhilfe pipetus akku	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Reax 2000 Vortexer	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Reax top Vortexer	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Kühlschrank Liebherr	Liebherr, Biberach, Deutschland
Kühlschrank Kirsch KS (-30°C)	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Gefrierschrank UF 85-300S	Colora Messtechnik, Lorch, Deutschland
N2-Gefrierschrank (-170°C)	Taylor-Wharton, Theodore, Alabama, USA
K-series Cryostorage Systems (M305CE)	Taylor-Wharton, Theodore, Alabama, USA

2.2 Verbrauchsmaterialien

Falcon BlueCap 50 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Falcon BlueMax Jr. 15 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Nunc Zellkulturflaschen 25, 75 cm ²	Nalge Nunc Int., Rochester, NY, USA
Nunc surface 185 cm ²	Nalge Nunc Int., Rochester, NY, USA
Zellkulturplatten 6er, 24er, 96er	Nalge Nunc Int., Rochester, NY, USA
Cryo.S Kryoröhrchen	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten 1/5/10/25/50 ml	Corning, New York, NY, USA
Pipettenspitzen 2 – 200 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
50 – 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Safe-lock tubes 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einfrierröhrchen	Corning, New York, USA
Einmalhandschuhe	Ansell, München, Deutschland
Einmalpinzette	Servoprax, Wesel, Deutschland
Falcon Cell Scraper	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

2.3 Medien und Chemikalien

α-MEM	Lonza, Verviers, Belgien
Dulbeccos MEM (DMEM)	Gibco, Paisley, Großbritannien
IMDM	Gibco, Paisley, GB
PBS	Lonza, Verviers, Belgien

Lymphoflot	Biotest, Dreieich, Deutschland
Penicillin / Streptomycin	Cambrex Bio Science, East Rutherford, NJ, USA
FCS (fetal calf serum)	Cambrex, Verviers, Belgien
Dexamethason	Sigma, Steinheim, Deutschland
Indomethacin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Insulin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Isobutylmethylxanthine	Sigma, Steinheim, Deutschland
Glycerolphosphat	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ascorbinsäure	Sigma, Steinheim, Deutschland
Heparin (hochmolekular)	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Fibroblast Growth Factor-2	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Vascular Endothelial Growth Factor	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Platelet Derived Growth Factor-AB	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
MCDB-201	Sigma, Steinheim, Deutschland
Rinderserum-Albumin (BSA)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Humans Transferrin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natrium-Selenit	Sigma, Steinheim, Deutschland
Linolsäure	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ascorbat-Phosphat	Sigma, Steinheim, Deutschland
5-Azacytidin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hydrocortison	Sigma, Steinheim, Deutschland

Noggin	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
BMP2	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
RLT-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Trypan blue	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Oil Red O	Sigma, Steinheim, Deutschland
Accumaxx	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Formaldehyd-Lösung 4%	Universitätsapotheke Tübingen
Salzsäure	Universitätsapotheke Tübingen
3-Hydroxybuttersäure 95%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Citrat-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hämatoxylin-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Naphthol Alkaline Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Sodium Nitrite Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
FACS Flow	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
FACS Rinse	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
FACS Clean	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

2.4 Antikörper für die durchflusszytometrische Messung

IgG1 (PE) konjugiert, Maus	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
CD 10 (PE), MAH (Maus Anti-human)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
CD 31 (PE), MAH	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
CD 45 (PE), MAH	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
CD 73 (PE), MAH	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
CD 90 (PE), MAH	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
CD 106 (PE), MAH	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
CD 117 (PE), MAH	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
CD 309 (PE), MAH	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

IgG2a (PE), Maus	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
CD 71 (PE), MAH	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
CD 243 (PE), MAH	Chemicon (Millipore Corporation), Billerica, USA

IgG1 unkonjugiert, Maus	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
CD 43 (unkonjugiert), MAH	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
CD 105 (unkonjugiert), MAH	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
2. Antikörper: Ig (PE), Ziege-Anti-Maus, polyklonal	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

IgG2a (unkonjugiert), Maus	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
GD2 (unkonjugiert), MAH	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
2. Antikörper: Ig (PE), Ziege-Anti-Maus, polyklonal	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

2.5 Humanes Zellmaterial

Alle Versuche mit humanem Zellmaterial wurden mit Genehmigung der Ethikkommission der Universitätsklinik Tübingen durchgeführt. (Projektnummer 95/2005V)

2.6 Knochenmark

Etwa 80 bis 120 ml menschliches Knochenmark wurde von freiwilligen Spendern (2 männlich, 1 weiblich) im Rahmen orthopädischer Operationen von der Universitätsklinik für Orthopädie in Tübingen entnommen.

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten an MSCs wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in Brutschränken mit einer Temperatur von 37 °C und einem Kohlendioxidanteil von 5 %.

Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammern ermittelt. Dabei wurde den Zellen PBS und Accumax-Lösung zugegeben und mit Trypan Blau Färbelösung der Anteil vitaler und nicht vitaler Zellen bestimmt.

Berechnung der Zellzahl:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Zellzahl (4 Quadranten)} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10000$$

3.2 Isolierung mononukleärer Zellen

Das mit dem gerinnungshemmenden Mittel Liqueimin versetzte humane Knochenmark wurde zuerst mit PBS in einem Verhältnis 1:1 versetzt, das Ganze dann durchmischt und anschließend mit einem Zellsieb gefiltert, so dass die festen Bestandteile über 100 µm Größe separiert wurden. Die nun durchgeführte Dichtegradientenzentrifugation sollte die mononukleären Zellen von den übrigen Teilen der Knochenmarksuspension trennen. Vorbereitend gab man in ein 50 ml Blue Cap 20 ml Biocoll Separating Solution und schichtete die Knochenmarksuspension vorsichtig darauf. Das Gemisch zentrifugierte man nun bei Raumtemperatur bei 1000 x g für 20 Minuten ohne Bremsfunktion. Da sich Knochenfragmente, Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte als Sediment am Boden des Gefäßes ansammelten, waren die mononukleären Zellen bandförmig in der Interphase zu erkennen. Dort wurden die Zellen mit einer 10 ml Pipette abgesaugt und in vorgelegter PBS-Lösung gewaschen. Eine erneute, fünf minütige Zentrifugation des Zell-PBS-Gemisches bei 350 x g ließ die Zellen am Behälterboden sedimentieren. Dem so gewonnene Zellpellet wurde erneut PBS zugegeben und anschließend eine Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer durchgeführt.

3.3 Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen

Nachdem die mononukleären Zellen in einem ersten Arbeitsgang von anderen festen Blutbestandteilen getrennt wurden, erfolgte nun die Aussaat in einem Standard-Expansionsmedium (SM). Dieses bestand aus α -MEM, 10 % FCS und 100U/ml Penicillin und 100U/ml Streptomycin.

Die aus dem o.g. Prozess gewonnenen mononukleären Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^6 mononukleäre Zellen/ml in SM suspendiert. Anschließend erfolgte die Aussaat in Zellkulturflaschen in einer Dichte von $23000/\text{cm}^2$. So wurden die Flaschen für mind. 24 h belassen, bis ein erster Medienwechsel erfolgte. Dabei wurde das komplette Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend wieder Medium, in gleicher Menge wie zuvor abgesaugt wurde, zugegeben. Durch die Beschaffenheit der Flaschen war es den Zellen möglich, am Boden zu adhären und sich zu vermehren.

Mit Erreichen der Sub-Konfluenz (ca. 80-90%) wurden die Zellen abgelöst. Dies geschah durch Zugabe des Enzyms Accutase. Nach 5 minütiger Inkubationszeit konnten die nun losen Zellen abgesaugt werden. Nach Zentrifugation mit $300 \times g$ konnte das gewonnene Zell-Pellet in SM resuspendiert werden. Ein Teil der Zellen wurde analysiert und ein kleinerer Teil erneut ausgesät ($1000 \text{ Zellen} / \text{cm}^2$). Der Zeitraum von der Aussaat bis zum Erreichen der Sub-Konfluenz und dem anschließenden Ablösen wurde als Passage bezeichnet. Der Differenzierungsprozess mit den verschiedenen Medien wurde mit allen MSC-Populationen in gleicher Weise durchgeführt (s.u.).

3.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Konservierung der abgelösten, vitalen Stammzellen wurden diese mit Zugabe von Einfriermedium tiefgefroren. Dieses bestand aus 65% FCS, 30 % α -MEM und 5 % DMSO.

Die abgelösten Zellen wurden zunächst für 5 Minuten bei $300 \times g$ zentrifugiert und in PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend nach Zugabe von Einfriermedium in ein Einfrierröhrchen überführt und dieses in eine mit Isopropanol

gefüllte Einfrierdose gestellt. Diese wurde für 24 Stunden in einem Gefrierschrank bei -80 °C tiefgefroren. Durch das Isopropanols konnte ein zu schneller Temperaturabfall vermieden werden, was der Vitalität der Zellen nach dem Auftauen zu Gute kam. DMSO wurde zur Verhinderung der Bildung von Eiskristallen hinzugemischt. Nach einem Tag bei -80 °C konnten die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt werden und bei -196 °C konserviert werden.

Nach Entnahme der Zellen aus dem Stickstofftank wurden diese in einem 37 °C warmen Wasserbad erwärmt und der aufgetauten Zellsuspension SM zugegeben. Nach mehrmaligem Zentrifugieren und Waschen mit PBS konnten die Zellen für die anschließende durchflusszytometrische Messung vorbereitet werden. Dem vorausgegangen war eine erneute Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer.

3.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das für die Untersuchung von festen Zellen entwickelt wurde. Damit können verschiedene Eigenschaften der Zellen näher untersucht werden, darunter die Zellgröße und ihre Binnenstruktur (Größe des Zellkerns, Granularität des Zytoplasmas).

Ebenso wird die Fluoreszenzintensität der Zelle gemessen, wobei die Lichtemissionen auf der Eigenfluoreszenz der Zelle beruhen können oder von der Markierung mit einem fluoreszierenden Antikörper herrühren können. Zellzyklus-Analysen und Apoptose-assays können mit Hilfe von RNA/DNA-Farbstoffen erstellt werden. Klinisch hat die Durchflusszytometrie Bedeutung für die Verlaufsbeobachtung von Krankheiten wie beispielsweise Leukämien oder Immunschwächekrankheiten.

Zur Analyse werden Zellen, nach Antikörpermarkierung, in Einzelzellsuspension bezüglich ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Dabei wird die Zellsuspension in die aus Quarzglas bestehende Messküvette geleitet, wo sie von einem Trägerstrom umgeben wird, der dazu dient, dass die Zellen den Messpunkt einzeln durchlaufen. Dieser Vorgang wird „hydrodynamische Fokussierung“ genannt.

Auf die Zellen trifft am Analyse- oder Messpunkt ein gebündelter Laserstrahl mit definierter Wellenlänge, zum Beispiel ein Argon-Ionen-Laser, dessen Hauptlinie im blauen Wellenbereich bei 488 nm liegt. Dieser regt die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes an und hebt sie dadurch auf ein höheres Energieniveau. Da die Elektronen dieses Energieniveau nicht halten können, fallen sie wieder, kaum dass sie den Laserbereich passiert haben, unter Abgabe von Energie (Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die Menge an abgegebenen Photonen wird mittels Photodetektor registriert. Das Signal verhält sich dabei proportional zu den gebundenen Antikörpern, das heißt, je mehr Antikörper auf der Oberfläche gebunden sind, desto höher die Photonenkonzentration. Zusätzlich wird die Lichtbeugung und -streuung gemessen, die Aufschluss über die Zellgröße und Zellgranularität geben können. Dabei nutzt man das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) zur Messung der Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) gibt Aufschluss über die intrazelluläre Granularität.

Die Verwendung mehrerer Antikörper pro Probe ist ebenfalls möglich, da diese zwar alle vom selben Laser angeregt werden können, jedoch unterschiedliche Emissionsspektren besitzen, durch die man sie getrennt nachweisen kann.⁶⁰

Die angezüchteten Zellen konnten sofort nach Ablösen von der Zellkulturflasche im Falle einer Konfluenz mit dem Durchflusszytometer gemessen werden. Ebenso konnten auch tiefgefrorene Zellen nach dem Auftauprozess und anschließender Spülung untersucht werden. In beiden Fällen wurde nach der Zellzahlbestimmung FACS-Puffer in Kombination mit Accumax (1:1) zugegeben und die Zellmenge gemäß der Menge an zu untersuchenden Antikörpern auf eine 96-well-Platte verteilt. Darauf folgte das Zentrifugieren für 3 min bei 400 x g ohne Bremsfunktion. Die nun erhaltenen Pellets wurden von der Flüssigkeit getrennt und die jeweiligen sterilen Antikörper den Zellen zugegeben. Bei Raumtemperatur im Dunkeln ließ man das Zell-Antikörper-Gemisch 20 min inkubieren. Dem folgten zwei Waschschrte, um die sich nicht mit der Zelloberfläche verbundenden Antikörper zu entfernen. Nach erneuter Zugabe von FACS-Puffer/Accumax überführte man die Zellen in die FACS-Röhrchen und gab nochmals 100 µl Flüssigkeit hinzu. Anschließend konnte mit der durchflusszytometrischen Analyse begonnen werden.

Zur Untersuchung wurde das FACScan von Becton Dickenson benutzt. Die Emissionen der Photonen waren mit ihrer Wellenlänge für die verwendeten Antikörper (Fluorochrome) spezifisch. Nach Trennung der einzelnen Wellenlängen durch einen Interferenzfilter gelangen diese auf hochempfindliche Lichtsensoren. Die verschiedenen Signale einer Zelle wurden elektronisch weiterverarbeitet und konnten so graphisch dargestellt werden.

Durch Einstellung eines Rasters konnten zudem Zellklumpen und tote Zellen, die unspezifisch hohe positive Signale senden könnten, von der zu untersuchenden Fraktion getrennt werden. Als Software wurde Cell-Quest verwendet.

Im Rahmen der Messung wurden verschiedene Antikörper gemessen (CD10, CD31, CD45, CD71, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD243, CD309 und GD2). Zur verlässlichen Messung eines Antikörpers wurden jeweils mindestens 1×10^5 Zellen verwendet.

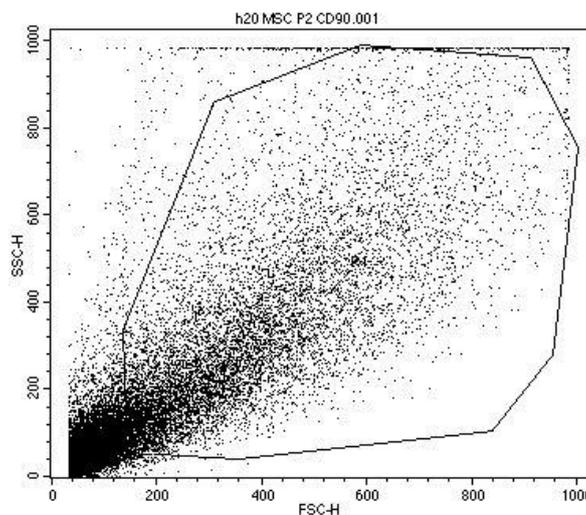


Abb. 1: Das Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung: Auf der Abszisse (FSC-"forward scatter") ist die Größe der Zellen angegeben, die Ordinate (SSC-"sideward scatter") zeigt die Granularität der Zellen. Das gewählte Raster wird eingesetzt, um beispielsweise Erythrozyten, tote Zellen oder Zelltrümmer von der Untersuchung auszuschließen.

Die Zellen wurden mit den fluoreszenz-aktivierten Antikörpern für das jeweils zu untersuchende Oberflächenepitop zusammengeführt und nach etwas Inkubationszeit durchflusszytometrisch gemessen. Als Grundlage diente die Messung des jeweiligen Isotyps. Dieser musste auf die jeweiligen Antikörper abgestimmt sein. So war beispielsweise der Isotyp G1 die Referenzmessung für die untersuchten CDs 10, 31, 45, 73, 90, 106, 117 und 309.

Nach Anlage eines Raster, in dem 95 Prozent der Zellen lagen und eines weiteren zweiten Rasters, das die restlichen 5 Prozent umfasste, folgte nun die Messung bzgl. der Oberflächenepitope. Anhand dieses, nach wie vor gesetzten Raster, konnte die Positivität oder Negativität bzgl. des untersuchten Oberflächenepitops festgestellt werden.

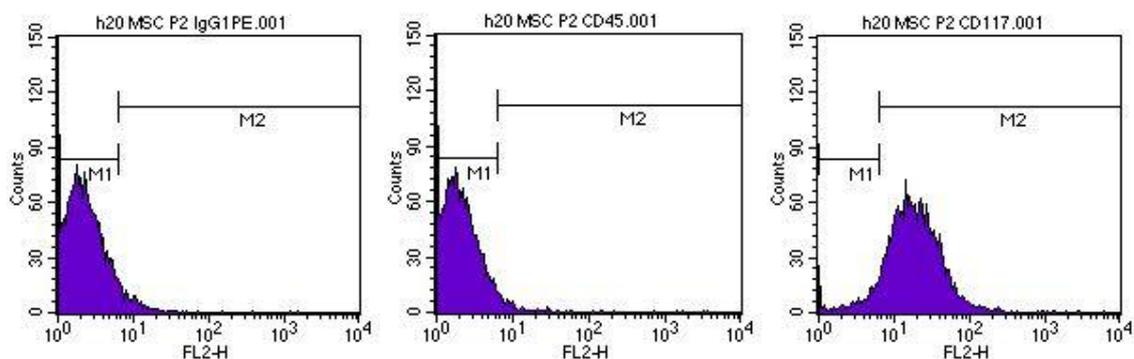


Abbildung 2: Messung der h20 Passage 2 undifferenzierte MSC: Links zu sehen die Referenzmessung mit IgG1 und den Rastern (M1 - 95 Prozent und M2 - 5 Prozent der Zellen); in der Mitte die Messung mit weiter bestehenden Rastern: CD 45 ist auf der Oberfläche der untersuchten Zellen kaum vorhanden, was in der klaren Verteilung im Raster M1 zu sehen ist. Rechts liegen die Zellen mehrheitlich im Raster M2, so dass die Expression von CD117 als positiv bezeichnet wird.

3.6 Oberflächenepitope und deren Funktion

Die Oberflächenantigene werden auch als CD-Marker bezeichnet. Hierbei handelt es sich in der Regel um membrangebundene (Glyko)Proteine. Manche Oberflächenepitope, wie z.B. CD45 (s.u.), werden auf der Zellmembran von fast allen Zellen des hämatopoetischen Systems gefunden, mit Ausnahme der Erythrozyten. Demgegenüber stehen Oberflächenmarker, die ausschließlich von bestimmten Zellen ausgebildet werden und deshalb unter Umständen sehr spezifische Funktionen im Stoffwechsel dieser Zellen wahrnehmen. Dies kann bedeuten, dass ein Oberflächenmerkmal als Rezeptor fungiert oder enzymatische Aktivität besitzt. Auch ein Mitwirken bei der Kommunikation zwischen den Zellen wurde nachgewiesen.

Der Bestimmung dieser Oberflächenmarker fällt heute in der Diagnostik von malignen Erkrankungen, wie Leukämien und Lymphomen, aber auch bei autoimmunen Prozessen, wie Rheuma etc. große Bedeutung zu. Die Therapie kann durch diese Methode gezielter und effektiver durchgeführt und kontrolliert werden, was die Prognose verbessern kann.

Im Anschluss folgt eine Aufstellung der von uns untersuchten CDs, die zum Teil stammzellassoziierte Marker sind und zum anderen Teil als Rezeptor oder als Teil des Zytoskeletts fungieren.

3.6.1 CD10

Dieses Oberflächenmerkmal wird auch als MME (**m**embrane **m**etallo-**e**ndopeptidase) bezeichnet. Andere Namen sind Atriopeptidase, CALLA, EPN oder Neutral Endopeptidase. Gefunden wird es auf unreifen und einigen reifen B-Zellen, lymphoiden Vorläuferzellen und Granulozyten und in großer Zahl auf B-Vorläuferstufen bei der akuten lymphatischen Leukämie. Die Endopeptidase inaktiviert verschiedene Hormone wie Glukagon, Enkephalin, Substanz P, Oxytocin u.a. ⁶¹

3.6.2 CD31

Dieser cluster of differentiation wird auch als PECAM1 (**p**latelet/**e**ndothelial **c**ell **a**dhesion **m**olecule) bezeichnet. Es wird vermutet, dass dieses Zelladhäsionsmolekül auch ein intrazelluläres Signalmolekül ist. Außerdem soll er an der Leukozytenmigration und –adhäsion und der Angiogenese beteiligt sein.⁶²

3.6.3 CD45

CD45, oder auch **p**rotein **t**yrosine **p**hosphatase **r**eceptor **t**ype **c** genannt, gehört zur Gruppe der Tyrosinkinase, die als Signalmoleküle bekannt sind. In ihrer Funktion steuern sie vielfältige Prozesse in der Zelle, darunter Zellwachstum, Differenzierung, Mitosezyklus und onkogenetische Umwandlungen.⁶³

Die Tyrosinkinase besitzen eine transmembranes Segment und zwei intrazelluläre enzymatisch wirksame Domänen. Diese spezielle Tyrosinkinase wird vornehmlich auf hämatopoetischen Zellen gefunden und reguliert die B- und T-Zell-Antigenrezeptorsignale.

3.6.4 CD71

Als CD71 wird der Transferrinrezeptor bezeichnet. Dabei handelt es sich um einen membranständigen Rezeptor, der mit Eisen beladenes Transferrin durch Endozytose in die Zelle aufnimmt.⁶⁴

3.6.5 CD73

Ecto **5'**-**n**ucleotidase ist der andere Name für dieses Oberflächenmerkmal. Dieses Enzym katalysiert in neutralem Milieu die Umwandlung von Mononukleotiden zu Nucleosiden, wobei das bevorzugte Substrat AMP zu sein scheint. Ein Teil dieses Enzyms ragt durch die Plasmamembran auf die extrazelluläre Seite. CD73 wird auf MSC und auch auf Lymphozyten nachgewiesen.⁶⁵

3.6.6 CD90

Dieses Oberflächenmerkmal wird auch als THY-1 cell surface antigen bezeichnet. CD90 zeigt sich auf der Oberfläche von MSC, Nervenzellen, einem Teil der CD34 positiven Zellen, einem Teil der fetalen Leber- und Thymuszellen, Fibroblasten und aktivierten endothelialen Zellen. Seine Funktion besteht in der Regulierung von Adhäsionsprozessen und in der Verhinderung von Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen.⁶⁶

3.6.7 CD105

CD105 wird auch als **endoglin** bezeichnet, wobei es sich um ein Transmembranprotein handelt. Dieses Glykoprotein findet man hauptsächlich im vaskulären Endothel sowie auf MSCs. Dort bildet es einen Teil des transforming growth factor beta receptor complex und bindet TGFB1 und TGFB3 mit hoher Affinität.⁶⁷

3.6.8 CD106

Dieser Marker wird auch als vascular cell adhesion molecule 1 bezeichnet und dieses Sialoglykoprotein wird u.a. auf Zytokin-aktiviertem Endothel exprimiert. Es reguliert die Adhäsion von Leukozyten am Endothel und die Signalweitergabe. Außerdem könnte es bei der Entstehung von Arteriosklerose und Rheumatoider Arthritis eine Rolle spielen.⁶⁸

3.6.9 CD117

CD117 wird auch c-KIT genannt. Dieser Marker gehört zur Familie der Protoonkogene. Es ist ein Transmembranrezeptor, der auf Anwesenheit von Mastzell-Wachstumsfaktor, auch stem cell factor genannt, reagiert. Eine Störung in diesem System trägt zur Ausbildung von gastrointestinalen Stromatumoren, Mastzell dysfunktionen und akuter myeloischer Leukämie bei.⁶⁹

3.6.10 CD243

Dieses Oberflächenepitop wird auch als ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member1 bezeichnet. Dieses Glykoprotein ist ein aktiver Transporter, der unter ATP-Verbrauch toxische Stoffe aus der Zelle entfernt. Es wird auf dem MDR1-Gen kodiert, das auch für die Resistenz gegen verschiedene Medikamente verantwortlich ist.⁷⁰

3.6.11 CD309

VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor2) oder kinase insert domain receptor sind andere Bezeichnungen für dieses Antigen. VEGF ist ein bedeutender Wachstumsfaktor für Endothelzellen bzw. für die Angiogenese. VEGFR2 ist ein Tyrosinkinaserzeptor, der als wichtiger Regulator der VEGF-induzierten Endothelproliferation, des Zellwachstums sowie der Zellmigration fungiert.⁷¹

3.6.12 GD2

GD2 ist ein Gangliosid, das bei diversen neurologischen Erkrankungen, wie Tay-Sachs-Syndrom und verschiedensten malignen Erkrankungen (Melanom, ZNS-Tumore, Brustkrebs) vermehrt nachgewiesen wurde. Auch auf MSC konnte es auf der Oberfläche nachgewiesen werden.^{72,73,74}

3.7 *In vitro* Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

Die von den Spendern erhaltenen Stammzellen sollten, da sichere Oberflächenmarker nicht gegeben sind, durch zusätzliche *in vitro* Kultivierung in Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten differenziert werden, um diese als MSCs bezeichnen zu können (s.u.). Dazu wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche gegeben. Nach 21 Tagen Differenzierungsdauer folgte die Anfärbung mit für das jeweilige Gewebe passenden Farbstoffen. Die notwendigen Wechsel des Nährmediums wurden analog den anderen Medienwechseln zwei Mal wöchentlich durchgeführt.

3.7.1 Adipogene Differenzierung

Als adipogenes Differenzierungsmedium diente α -MEM, dem neben Penicillin und Streptomycin 10 % bovines Kälberserum, Dexamethason, Indomethacin, 2-Mercaptoethanol, Insulin und Isobutylmethylxanthine in berechneter Menge zugegeben wird. Der Medienwechsel wurde zwei Mal wöchentlich durchgeführt:

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

3.7.2 Osteogene Differenzierung

Das osteogene Differenzierungsmedium enthielt α -MEM, dem neben Penicillin und Streptomycin 10 % bovines Kälberserum, Dexamethason, 2-Mercaptoethanol, L-Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat in berechneter Menge zugegeben wurde. Der Medienwechsel wurde zwei Mal wöchentlich durchgeführt:

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

3.7.3 Chondrogene Differenzierung

Das osteogene Differenzierungsmedium enthielt DMEM, dem neben Penicillin und Streptomycin 1 % bovines Kälberserum, Insulin-Selen-Transferrin, Ascorbinsäure-2-

Phosphat, Natriumpyruvat und TGF- β 3 in berechneter Menge zugegeben wurde. Der Medienwechsel wurde zwei Mal wöchentlich durchgeführt:

DMEM

1 % FCS

100 U/ml Penicillin + 100 U/ml Streptomycin

1% Insulin-Selen-Transferrin+1

0,1 mM Ascorbinsäure-2-Phosphat

1 mM Natriumpyruvat

10 ng/ml TGF- β 3

3.8 Kardiomyogene Differenzierungsmedien

Die verschiedenen Zusätze, die eine kardiogene Differenzierung bewirken sollen, wurden bereits in anderen Forschungsgruppen verwendet. Sie lassen sich in zwei Gruppen untergliedern:

Die eine Gruppe wird den MSC für eine definierte Dauer zugegeben, dann entfernt und anschließend werden die MSC mit SM kultiviert. Dies sind die sogenannten Induktionsmedien.

In die zweite Gruppe gehören die Medien VEGF und ITAD, die den MSC permanent und in stets gleicher Konzentration zugegeben werden. Fortan Dauer- bzw. Permanentmedium genannt.

Im Besonderen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Induziert das jeweilige Medium eine kardiogene Differenzierung?
- Gibt es einen Unterschied zwischen Induktionsmedien und Dauermedien?

Im Folgenden werden die verwendeten Differenzierungsmedien vorgestellt:

3.8.1 5-Azacytidin

Erstmals von Wakitani et al.⁷⁵ zur Induktion der Kardiomyogenese an adulten Ratten verwendet. Hierbei wurde die genomische DNA durch Demethylierungsprozesse verändert, was die Aktivierung von Genen zur Folge hatte, die für die kardiomyogene Differenzierung von Bedeutung sind.

Durch Kultivierung des mit 5-Azacytidin-2-Deoxycytidin versetzten Mediums für 48 Stunden wird die Differenzierung induziert. Dazu wurde α -MEM 10 % fetales Kälberserum, 5 % Pferdeserum, 100 U/ml Penicillin + 100 U/ml Streptomycin, 50 μ M/l Hydrocortison und 10 μ M/l 5-Azacytidin zugesetzt. Nach 48 Stunden wurde das Medium entfernt und fortan der Medienwechsel mit SM durchgeführt.

3.8.2 Noggin

Zu 500 ml α -MEM wurden 10 % fetales Kälberserum und 100 U/ml Penicillin + 100 U/ml Streptomycin zugegeben. Zuvor wurden 150 ng/ml Noggin in je 7,5 ml PBS und BSA aufgelöst und dem Medium zugegeben. Das Differenzierungsmedium wurde für 72 Stunden auf den MSC belassen, dann entfernt und ab diesem Zeitpunkt mit SM kultiviert.

Noggin wurde zur Induktion der kardiomyogenen Differenzierung von Yuasa et al.⁷⁶ an embryonalen Stammzellen der Maus verwendet. Noggin gilt als Antagonist im BMP-Signalweg, der Bedeutung im Rahmen der embryonalen Herzentwicklung hat.

3.8.3 FGF2+BMP2

Dem α -MEM wurde 10 % fetales Kälberserum und 100 U/ml Penicillin + 100 U/ml Streptomycin zugegeben. Es wurden 1 ng/ml FGF2 (Fibroblast Growth Factor) und 0,2 ng/ml BMP2 (Bone Morphogenetic Protein) zugefügt. Die Inkubation mit diesem

Medium dauerte 72 Stunden. Anschließende Kultivierung mit SM ohne FGF2 und BMP2.

Dieses Medium wurde von Kawai et al.⁷⁷ ebenfalls an embryonalen Stammzellen der Maus angewandt, wodurch eine kardiogene Differenzierung erreicht werden konnte.

3.8.4 DMSO

DMSO (Dimethylsulfoxid) wurde als 1 %-ige Lösung in α -MEM gelöst. Zudem wurde 10% fetales Kälberserum und 100 U/ml Penicillin + 100 U/ml Streptomycin beigefügt. Das Medium beließ man für 96 Stunden auf den MSC, um nach anschließendem Spülen mit SM fortzufahren.

Es wurde von Paquin et al.⁷⁸ an Zellen der P19-Teratokarzinom-Zelllinie von Mäusen zur kardiomyogenen Induktion angewandt.

3.8.5 ITAD

Dieses Medium ist eines der zwei Dauermedien. Hierzu wird DMEM-LG Medium als Grundsubstanz verwendet (60 % der Gesamtmenge). Diesem wird 10 % fetales Kälberserum, 100 U/ml Penicillin G/100 μ g/ml Streptomycinsulfat, 30 % MCDB-201, 50 mg/ml Rinderserumalbumin zugegeben. Dazu kommen 1 mg/ml Rinder-Insulin, 0,55 mg/ml humanes Transferrin, 0,5 μ g/ml Na-Selenit, 0,47 μ g/ml Linolsäure, 10^{-4} M Ascorbinsäure-2-Phosphat und 10^{-9} M Dexamethason.

Shim et al.⁷⁹ zeigten eine Induktion der Kardiomyogenese an humanen Knochenmark MSCs.

3.8.6 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) + PDGF (Platelet-derived Growth Factor) + FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2)

Das zweite Permanentmedium, dem IMDM mit 90 % der Menge als Grundsubstanz dient. Hinzu kommen 10 % fetales Kälberserum, 100 U/ml Penicillin G, 100 μ g/ml Streptomycinsulfat. Des Weiteren 50 μ g/ml unfraktioniertes Heparin, 10 ng/ml VEGF,

5 ng/ml FGF-2 (fibroblast growth factor-2) und 10 ng/ml PDGF-AB (platelet derived growth factor).

Xaymardan et al.⁸⁰ beschrieben eine Induktion der Kardiomyogenese an MSC von Mäusen.

4 Ergebnisse

4.1 Kultur der MSC

Die Kultivierung und Differenzierung der MSCs wurde ebenfalls bei allen drei Spenden auf die gleiche Art und Weise durchgeführt. Die 3 MSC-Populationen verhielten sich in Bezug auf Wachstum und Passagierfähigkeit unterschiedlich.

4.1.1 h20

So konnte die erste Population (h20) insgesamt 5 Passagen lang angezüchtet werden. Während der 6. Passage konnte keine Konfluenz mehr erreicht werden. Mit dem Permanentmedium VEGF konnte nur in der ersten und zweiten Passage eine Konfluenz erzielt werden, mit dem Permanentmedium ITAD konnten lediglich fünf Passagen untersucht werden, da die nötige Zellzahl in Passage 6 nicht zur Verfügung stand.

4.1.2 h21

Diese Population wuchs bis zur Passage 6 bis zur Konfluenz. Danach konnten keine ausreichenden Zellzahlen mehr erreicht werden. Einzig das Medium ITAD wurde hier nicht verwendet. Das Permanentmedium VEGF wuchs nur während Passage 1. Aufgrund unzureichenden Wachstums in Passage 5, konnten wir die kultivierten MSC zwar erneut aussähen, jedoch reichte die Zellzahl für eine durchflusszytometrische Messung nicht aus.

4.1.3 h38

Für drei Passagen konnte diese Population mit ausreichender Konfluenz angezüchtet werden. Dabei führte das Medium ITAD nur während der ersten beiden Passagen, das Medium VEGF nur während der ersten Passage, zur Konfluenz.

4.2 Zellmorphologie unter kardiomyogener Differenzierung

Die Morphologie der MSCs veränderte sich im Verlauf der zunehmenden Passagen. So zeigten sie zu Beginn (P0) und in den frühen Passagen (P2) ein spindelförmiges und schmales Aussehen. Je länger die Kultivierung andauerte, das heißt, je öfter die Zellen abgelöst und in eine neue Passage überführt wurden, desto mehr verlangsamte sich die Proliferation der MSCs bis in P6 keine Konfluenz mehr erreicht wurde. Mit zunehmender Passagehöhe bis zu P6 veränderte sich das Aussehen der MSCs- so nahm die Zellgröße und -breite von P4 bis P6 zu.

Insgesamt zeigte sich die Zellstruktur und das Wachstumsverhalten für unbehandelte und mit Differenzierungsmedium behandelte Zellen gleich. Die mit dem Dauermedium VEGF+FGF2+PDGF behandelten Zellen wiesen eine netzförmige Wachstumsstruktur mit intrazellulären Vakuolen auf.

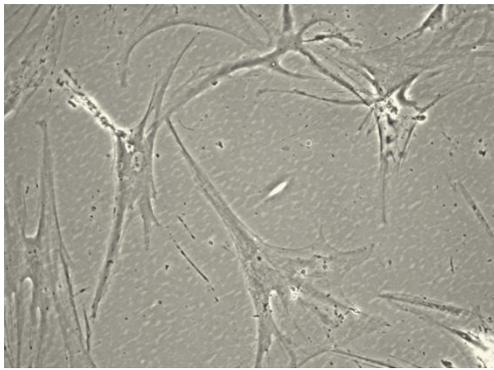
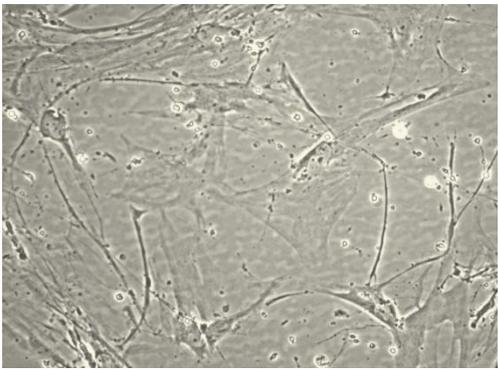


Abb.3: MSC ohne Differenzierungsmedium in Kultur (links oben 100x, rechts oben 200x) zum Zeitpunkt der Aussaat; links unten: MSC ohne Differenzierungsmedium zum Zeitpunkt P2 und unten rechts P6 (beide 100x).

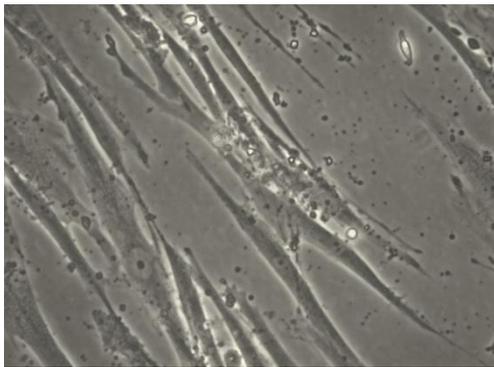
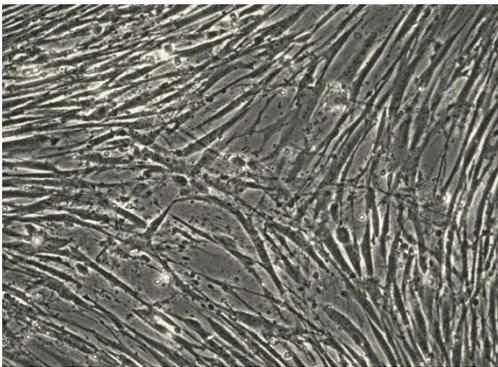


Abb.4: MSC unter VEGF-Differenzierungsmedium (links 100x, rechts 200x)

4.3 Nachweis der Adipogenese, Osteogenese und Chondrogenese

Die durch spezielle Differenzierungsmedien induzierte adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung zum Nachweis von MSCs wurde mittels Färbung im Rahmen separater Arbeiten durchgeführt.

4.4 Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen

Untersucht wurden mit der Durchflusszytometrie verschiedene Oberflächenepitope. Dies wurde jeweils nach Erreichen der Konfluenz getan. Somit stellten die nachfolgend in tabellarischer Form angegebenen Zahlen den Anteil der Zellen zum Zeitpunkt der Konfluenz dar, die das jeweilige Oberflächenmerkmal trugen. Dabei wurden nacheinander alle 3 Populationen betrachtet. Als erstes die MSCs der Population h20, danach h21 und als drittes die Population h38. Es sollte gezeigt werden, welche Oberflächenmerkmale gemessen wurden und wie sich dieses Merkmal quantitativ auf der Oberfläche der MSC mit der Zeit veränderte. Zusätzlich wurde das Expressionsprofil verschiedener Oberflächenmerkmale innerhalb einer Population unter Einfluss der applizierten Nähr- und Differenzierungsmedien analysiert.

Die hier gewonnenen Daten aus den verschiedenen durchflusszytometrischen Messungen sollen am Ende der gemessenen Oberflächenmerkmals durch ein Diagramm verdeutlicht werden. Daraus soll ersichtlich werden, wie sich der Anteil der Zellen mit bestimmten Oberflächenmerkmalen im Laufe der Zeit veränderte.

h20

% CD 10 +	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5
MSC UK	67,2	43,5	10,5	6,5	1
Aza	57	28	1	12,5	6
FGF2+BMP2	43,4	38	12	12	5,7
DMSO	41	35	6	29	1
Noggin	55	28	19	21	10
ITAD	88	88	70	65	
VEGF	74	50			

% CD 31 +	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5
MSC UK	7,4	1	1	1	1
Aza	1	1	1	1	1
FGF2+BMP2	1	1	1	1	5,1
DMSO	42	1	1	1	1
Noggin	1	1	1	1	8
ITAD	1	1	1	1	
VEGF	1	1			

% CD 45 +	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5
MSC UK	1	1	1	1	1
Aza	1	1	1	1	1
FGF2+BMP2	1	1	1	1	5,6
DMSO	1	1	1	1	1
Noggin	1	1	6	1	9
ITAD	1	1	1	5	
VEGF	1	1			

% CD 71 +	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5
MSC UK	77,3	82,8	64,1	73,9	12,3
Aza	64	75	65	72	24
FGF2+BMP2	66	81	65	75	32
DMSO	51	78	57	73	36
Noggin	60	79	68	72	30
ITAD	89	62	53	76	
VEGF	56	43,5			

% CD 73 +	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5
MSC UK	99	97,6	93,4	97	94
Aza	98	96	92	95	94
FGF2+BMP2	97	97	96	95	94
DMSO	98	97	93	97	86
Noggin	98	96	95	97	99
ITAD	1	94,5	88	95	
VEGF	95	86,5			

% CD 90 +	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5
MSC UK	100	100	99	99	99
Aza	100	100	99	99	97
FGF2+BMP2	47	100	99	99	80
DMSO	100	100	99	100	100
Noggin	100	100	99	99,5	100
ITAD	98	100	99	99	
VEGF	100	99			

% CD 105 +	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5
MSC UK	43,5	80,6	40,7	42	75
Aza	62	1	48	68	82
FGF2+BMP2	53	79	38	49	77
DMSO	60	68	35	52	70
Noggin	47	71,5	46	60	89
ITAD	59	49	85	95	
VEGF	37	53			

% CD 106 +	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5
MSC UK	27,2	17,4	1	1	1
Aza	17	22,5	1	1	1
FGF2+BMP2	10	21,5	5	6	7
DMSO	8	14	1	1	1
Noggin	13	16	6	1	7,7
ITAD	19	17	5	1	
VEGF	5,5	1			

% CD 117 +	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5
MSC UK	92,6	92,3	40,3	43	21
Aza	78	61	30	47	21,5
FGF2+BMP2	92	65	52,5	58	28
DMSO	73	50	41	57	25
Noggin	84	67	59,5	78	31
ITAD	75	85	54	44	
VEGF	71	46			

% CD 243 +	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5
MSC UK	72,5	97,6	88,3	88	63
Aza	100	93	39,5	95	56
FGF2+BMP2	100	95	89	97	60
DMSO	100	94	85	96	83
Noggin	100	97	92	96	69
ITAD	100	95	89	87	
VEGF	100	88			

% GD2 +	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5
MSC UK	88,5	80	69	56	1
Aza	76,5	87	51	59	11
FGF2+BMP2	95	86	57	61,5	1
DMSO	84	90	58	71	5,5
Noggin	91	89,5	48,5	68	7,6
ITAD	96	96	24	49	
VEGF	42	50			

% CD 309 +	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5
MSC UK	40	45	1	1	
Aza	36	36	1	1	
FGF2+BMP2	39	34,5	1	1	
DMSO	40	38	1	1	14,8
Noggin	36	38	1	1	15,8
ITAD	27	32	1	1	
VEGF	51	19			

h21

% CD 10+	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5	Passage 6
MSC UK	45	19	11	17	-	12
Aza	32	15	19	11	-	6,7
FGF2+BMP2	49	18	12	7,8	-	1
DMSO	35	13	17	10	-	1
Noggin	38	12	16	10	-	1
VEGF	52					

% CD 31+	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5	Passage 6
MSC UK	1	5,6	1	21	-	1
Aza	1	1	1	25	-	1
FGF2+BMP2	1	6,1	1	17	-	1
DMSO	1	5,5	1	21	-	1
Noggin	1	1	1	20	-	1
VEGF	5,7					

% CD 45+	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5	Passage 6
MSC UK	1	1	1	1	-	1
Aza	1	1	1	1	-	1
FGF2+BMP2	1	1	1	1	-	1
DMSO	1	1	1	1	-	1
Noggin	1	1	1	1	-	1
VEGF	1					

% CD 90+	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5	Passage 6
MSC UK	100	100	99	99	-	82
Aza	84	100	99	98	-	86
FGF2+BMP2	99	100	83	99	-	91
DMSO	100	100	99	95	-	80
Noggin	92	100	99	98	-	59
VEGF	90					

% CD 117+	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5	Passage 6
MSC UK	57	36	20	35	-	23
Aza	62	34	27	36	-	27
FGF2+BMP2	46	39	30	41	-	12
DMSO	83	40	22	30	-	28
Noggin	46	29	26	33	-	6,3
VEGF	14					

% GD2	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5	Passage 6
MSC UK	62	65	53	27	-	21
Aza	43	65	49	24	-	17
FGF2+BMP2	65	65	47	34	-	20
DMSO	64	65	46	14	-	23
Noggin	66	58	36	-	-	18
VEGF	72					

% CD 309+	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5	Passage 6
MSC UK	1	1	1	5,4	-	1
Aza	1	1	6,4	1	-	1
FGF2+BMP2	1	1	1	-	-	5,2
DMSO	1	1	1	1	-	1
Noggin	1	1	1	1	-	5,4
VEGF	1					

h38

% CD 10+	Passage 1	Passage 2	Passage 3
MSC UK	1	8	7,4
Aza	1	6	5,5
FGF2+BMP2	8,1	10	5,5
DMSO	7	9,7	1
Noggin	13,5	18	8
ITAD	22		
VEGF	38	50	

% CD 31+	Passage 1	Passage 2	Passage 3
MSC UK	1	1	1
Aza	1	1	1
FGF2+BMP2	1	1	1
DMSO	1	1	1
Noggin	1	1	1
ITAD	1	1	1
VEGF	1	1	

% CD 45+	Passage 1	Passage 2	Passage 3
MSC UK	1	1	5,7
Aza	1	1	1
FGF2+BMP2	1	1	1
DMSO	1	5,2	5,2
Noggin	6	1	1
ITAD	1	5,1	
VEGF	5,3		

% CD 71+	Passage 1	Passage 2	Passage 3
MSC UK	42	46	31
Aza	65	60	23
FGF2+BMP2	61	43	23
DMSO	58	50	28
Noggin	57,6	57	34
ITAD	71	46	
VEGF	41		

% CD 73+	Passage 1	Passage 2	Passage 3
MSC UK	87	95	91
Aza	95	97	92
FGF2+BMP2	92	97	96
DMSO	96	96,5	96
Noggin	92	97	99
ITAD	97	95	
VEGF	89	-	

% CD 90+	Passage 1	Passage 2	Passage 3
MSC UK	100	100	99
Aza	100	99	51
FGF2+BMP2	100	100	94,5
DMSO	100	100	6,3
Noggin	100	100	100
ITAD	100	100	
VEGF	100	-	

% CD 105+	Passage 1	Passage 2	Passage 3
MSC UK	31	46	74
Aza	44,5	43	60
FGF2+BMP2	48	47,5	83
DMSO	10,6	49	66
Noggin	41	45	87
ITAD	38,5	22	
VEGF	29		

% CD 106+	Passage 1	Passage 2	Passage 3
MSC UK	14,6	9	1
Aza	24	11,3	6,9
FGF2+BMP2	18	11,8	7,2
DMSO	27	14	1
Noggin	33	15,6	8,1
ITAD	31	12	
VEGF	12		

% CD 117+	Passage 1	Passage 2	Passage 3
MSC UK	49	36	35
Aza	58	33	1
FGF2+BMP2	60	65	22,4
DMSO	68	46,5	21,4
Noggin	85	49	32
ITAD	71	44	
VEGF	76		

% CD 243+	Passage 1	Passage 2	Passage 3
MSC UK	98,5	88	77
Aza	100	78	64
FGF2+BMP2	100	88	61
DMSO	99	84	71
Noggin	100	86	85
ITAD	100	83	
VEGF	97,5		

% CD 271+	Passage 1	Passage 2	Passage 3
MSC UK	1	1	1
Aza	1	1	1
FGF2+BMP2	1	1	1
DMSO	9	1	5,4
Noggin	1	1	1
ITAD	1	1	
VEGF	1		

% GD2 +	Passage 1	Passage 2	Passage 3
MSC UK	59	41,5	15,4
Aza	67	38	5,6
FGF2+BMP2	33	32	10
DMSO	59	39	10
Noggin	80	43	16,6
ITAD	96	78	
VEGF	42		

% CD 309+	Passage 1	Passage 2	Passage 3
MSC UK	1	1	18
Aza	1	1	12,2
FGF2+BMP2	1	1	20
DMSO	1	1	22
Noggin	1	1	15,4
ITAD	1	1	
VEGF	1		

4.4.1 CD10

Das Oberflächenepitop CD 10 ließ sich bei allen beobachteten Kulturen in beträchtlicher Menge nachweisen. Dabei schwankte die nachgewiesene Menge zwischen 88 Prozent (ITAD) und 41 Prozent (DMSO). Dabei zeigten die Medien ITAD und VEGF die größte Zahl an CD10-exprimierenden Zellen. Die unbehandelten MSCs lagen mit 67 Prozent an dritter Stelle. Am geringsten ausgeprägt waren mit 41 Prozent CD10-Anteil die Zellen unter Noggin-Einfluss. Allen gemeinsam war der Abfall der CD10-Expressivität in den Folgepassagen. Dieser ging kontinuierlich bis zur Passage 3 zurück, um dann bei den MSCs unter AZA, DMSO und Noggin in Passage 4 erneut anzusteigen und dann wieder abzufallen. Die Zellen des Mediums VEGF zeigten ab Passage 3 keine ausreichende Konfluenz.

Dasselbe ließ sich in der h21-Reihe sehen. Auch hier starteten die verschiedenen Medienkulturen ähnlich hoch in der Expressivität, um dann, mit kleinem Expressionsanstieg in Passage 3, erneut weiter abzunehmen. Eine Ausnahme bildeten hier die undifferenzierten MSCs, die ebenfalls einen Anstieg in Passage 3 zeigten.

In der h38 Population dagegen niedrige CD10-Positivität zu Beginn bei den undifferenzierten MSC und den MSCs unter der Wirkung fast aller Induktionsmedien.

Außnahme bildete Noggin mit etwas höherer Expression von CD10 zu Beginn und deutlichem Anstieg in Passage 2. Die Dauermedien ITAD und VEGF zeigten deutlich höhere Werte schon in der ersten Passage, ITAD stieg sogar auf 50% CD10-positive Zellen in Passage 2 an.

4.4.2 CD31

Zu Beginn der Untersuchungen ließ sich CD 31 nur bei den MSC UK und den Zellen unter DMSO in relevantem Maße nachweisen. Ab Passage 2 fiel der Anteil der CD 31 positiven Zellen bei beiden Medien auf 1 Prozent ab. Alle anderen Medienkulturen zeigten keinen Anstieg dieses Anteils und blieben auf ihrem Ausgangsniveau. Die Messungen der Zellen der 6. Passage zeigten einen Anstieg der CD 31 positiven Zellen bei den Medien FGF2 und Noggin.

Die Zellen der h21-Reihe zeigten keinen Nachweis von CD 31 mit Ausnahme vom Medium VEGF, bei dem 5,7 Prozent der Zellen dieses Oberflächenepitop exprimierten. Auch zeigte sich interessanterweise hier ein steiler Anstieg des CD 31 Nachweises in Passage 4 bei allen gemessenen Medien, um dann erneut auf 1 Prozent in Passage 6 abzufallen.

Die Zellen der h38-Population zeigten zu Beginn keine Expression von CD31, was sich über die gesamte Kulturdauer nicht änderte.

4.4.3 CD45

CD 45 ließ sich auf der Oberfläche der h20-Population zu Beginn kaum nachweisen. Die Medien 5-AZA, DMSO, VEGF und MSC UK behielten dies bei. Die Zellen unter Noggin-Kultur wiesen hier einen Anstieg auf 6 % in Passage 3 auf, um dann in Passage 4 abzufallen und in Passage 5 erneut 9 %-Expressivität zu zeigen. Unter ITAD ist ein Anstieg in Passage 4 auf 5 % zu beobachten, die fehlende Zellzahl verhinderte eine weitere Messung in Passage 5. FGF2 zeigte eine ähnliche Entwicklung mit Anstieg der Expressivität auf 5,6 % in Passage 5.

In der h21-Population war während der ganzen Zeit kein CD 45 exprimiert worden.

Ebenfalls keine nennenswerte CD45-Positivität in der h38-Population.

4.4.4 CD71

Zu Beginn zeigte die Mehrheit der Zellen eine Expressivität von CD 71. Dabei war in der h20-Population ein Zickzack-Verlauf zu beobachten. Anstieg von P1 zu P2, Abfall zu P3, Wiederanstieg zu P4 und erneuter, diesmal starker Abfall zu P5. Einzig die Medien ITAD und VEGF folgten diesem Muster nicht und fielen zu P2 ab und ITAD stieg erst zu Passage 4 wieder an, um dann leicht über den Werten der anderen Medien und der undifferenzierten MSCs zu liegen.

Die h38-Population zeigte zu Beginn eine deutliche Positivität bzgl. des Oberflächenmarkers CD71, dabei ITAD mit der höchsten Rate von 71%. Im Verlauf der 3 Passagen ließ sich der Marker bei allen MSCs unter Differenzierung und undifferenzierten MSCs weniger nachweisen.

4.4.5 CD73

h20: Nahezu jede Zelle aller verwendeten Medien exprimierte CD 73. Dies ließ auch unter Kultivierung in den Folgepassagen kaum nach. ITAD zeigt hier einen nur geringen Anteil in Passage 1, der im Hinblick auf die anderen Medien als Messfehler interpretiert werden muss.

Ebenfalls fast jede Zelle der 38-Population exprimierte CD73, was im Verlauf konstant blieb mit sogar noch leichter Zunahme auf Werte zwischen 90 und 99 Prozent.

4.4.6 CD90

Auch CD 90 ließ sich bei allen Medien auf fast jeder Zelle nachweisen. Dies veränderte sich in den Folgepassagen kaum. In der h20 Reihe bildeten nur Zellen unter FGF2 eine Ausnahme. Hier exprimierten in P1 47 % der Zellen CD 90, um dann bei nahezu 100 % zu liegen und in P5 auf 80 % abzufallen.

In h21 ein ähnliches Bild mit durchgehend hoher Expressivität für CD 90 unabhängig vom applizierten Medium. Eine Ausnahme bildete hier das Medium Noggin mit Abfall auf 59 % in P5.

Hoher Anteil der CD90 positiven Zellen auch in der h38-Population ohne Veränderung über die Passagen hinweg.

4.4.7 CD 105

h20: Es zeigte sich ein Anstieg zu Passage 2 und darauf folgend ein Abfall zu Passage 3. In den Folgepassagen bis zur Passage 5 ist dann erneut ein Anstieg zu verzeichnen. Zellen unter ITAD zeigten dieselbe Entwicklung bereits eine Passage früher mit einem Abfall bereits in Passage 2.

Die h38-Population bot eine mittelmäßige CD105-Positivität mit Werten unterhalb 50%. Bei allen Zellen kam es im Verlauf zu einem deutlichen Anstieg auf Werte von mindestens 60%.

4.4.8 CD106

Die Zellen unter 5-AZA, FGF2, DMSO und Noggin zeigten einen Anstieg in Passage 2. Dann fielen die MSC unter 5-AZA und DMSO auf 1 % in den Folgepassagen ab. Zellen unter FGF2 und Noggin blieben bei 7 bzw. 7,7 % in Passage 5. Zellen unter ITAD und VEGF sowie die undifferenzierten MSCs fielen von Passage 1 zu 2 ab, um dann im weiteren auf 1 % abzufallen.

h38: Im Durchschnitt nur jede fünfte Zelle exprimierte CD106. Die Werte nahmen im Verlauf der Passagen noch deutlich ab auf Werte unter 10%.

4.4.9 CD117

Die Expression in Passage 1 lag zwischen 73 % und 92 %. Es zeigte sich ein Abfall bis zur Passage 3, um dann zu Passage 4 wieder anzusteigen und dann erneut abzufallen.

ITAD in der Population h20 zeigte auch hier einen Anstieg der Expression eine Passage früher, welche in den weiteren 2 Passagen abfiel.

CD 117 wurde von der h38-Population in deutlichem Maße exprimiert. Der Marker fiel über die nächsten beiden Passagen stetig ab.

4.4.10 CD243

Hier lag die Expressivität bei nahezu 100 % in allen Differenzierungsmedien. Die Expressivität fiel dann bis zur Passage 3 kontinuierlich ab bis zu einem Minimalwert von 39,5 % (Noggin), um in Passage 4 erneut kräftig anzusteigen und dann erneut zu fallen. MSC UK begann mit niedrigerer Expressivität, stieg dann auf 97,6 % an und fiel in den weiteren 3 Passagen auf 63 % in P5.

Nahezu jede Zelle der h38-Population war in Passage 1 CD243-positiv. Im Verlauf schwächte sich der Anteil etwas ab, blieb aber nach wie vor auf hohem Niveau.

4.4.11 GD2

h20: Von Passage 1 an zeigte sich eine hohe Expression an GD2. Dabei fielen unter den Differenzierungsmedien mit Ausnahme von 5-Aza und DMSO die Werte konstant bis Passage 3 ab, stiegen in Passage 4 erneut an und fielen erneut beträchtlich in Passage 5 ab. MSC UK fiel über die Zeit konstant mit jeder weiteren Passage ab. 5-Aza und DMSO stiegen bereits zu Passage 2 an, um dann der Entwicklung der Zellen der anderen Differenzierungsmedien zu folgen.

h21 zeigt zu Beginn deutlich niedrigere Expressivität. 5-Aza und DMSO zeigen auch hier einen Anstieg der Werte in Passage 2, fallen dann ab bis zum Minimum (5-AZA) bzw. steigen in Passage 6 erneut an (DMSO). Die restlichen Medien zeigen einen konstanten Abfall der Expression von GD2, im Gegensatz zum 2. Gipfel in Passage 4 der h20-Population.

Im Gegensatz zur niedrigeren Ausgangsexpression in der h21-Linie, bildeten die Zellen unter VEGF-Dauerlösung eine deutlich höhere Expressivität in Passage 1.

Die h38-Zellen zeigten ebenfalls eine hohe Expression von GD2 mit deutlich abnehmendem Anteil bis zu Passage 3. Einzig die MSCs unter ITAD-Dauermedium zeigten in Passage 2 mit 78% nach wie vor einen hohen Anteil GD2-positiver Zellen.

4.4.12 CD309

Erneut zeigten sich Unterschiede zwischen h20 und h21. So gab es unter der h21-Population kaum Expression von CD 309 zu Beginn der Kulturerung. MSC UK und 5-Aza zeigten einen Gipfel von 5,4 % bzw. 6,4 % in Passage 4 bzw. 3. FGF2 und Noggin stiegen erst in Passage 6 auf Werte um 5 %.

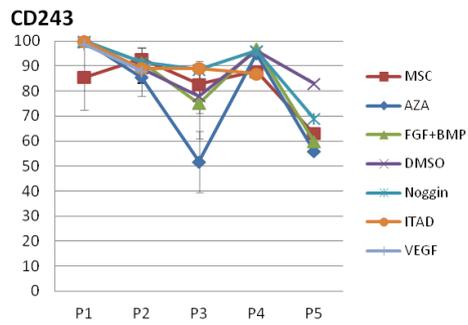
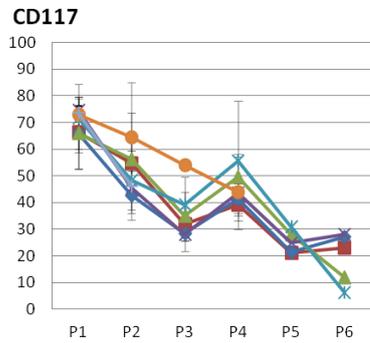
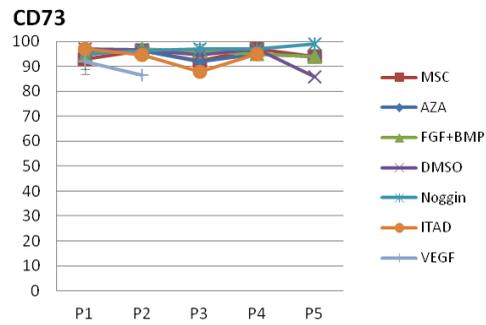
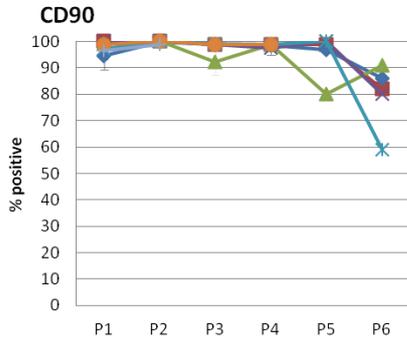
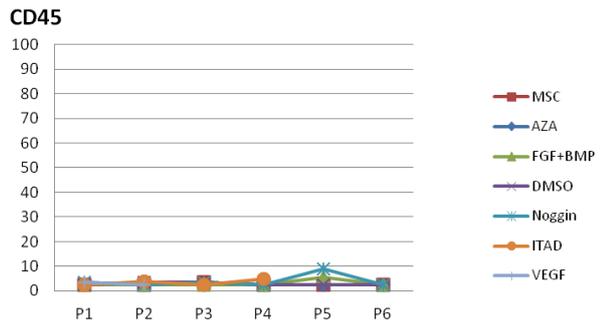
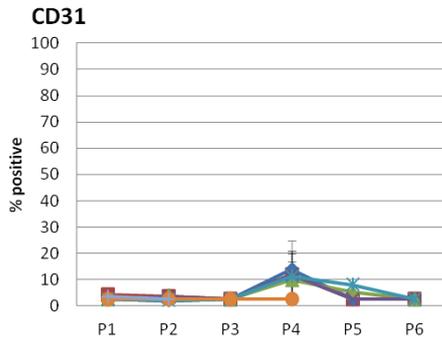
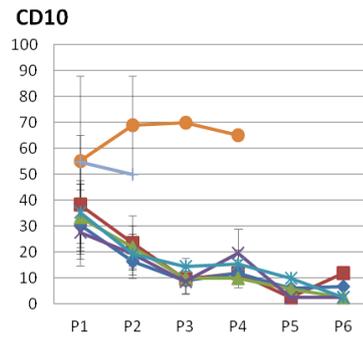
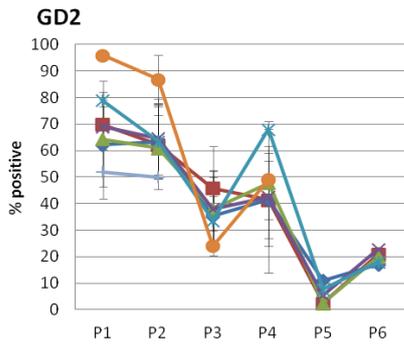
In der h20-Population deutlich höhere Expression in Passage 1 mit Werten zwischen 36 und 51 %. Ab Passage 3 bzw. 4 Abfall auf 1 %. Erneuter Anstieg der Expression dieser Zellreihe zur Passage 5 bei den Medien FGF2, DMSO und Noggin.

Keine Expression in der h38-Population zu Beginn, was sich über die Passage 2 hinweg hielt. In der Messung der MSCs zum Zeitpunkt der dritten Passage deutlicher Anstieg aller Medien auf 12 bis 22 Prozent.

4.5 Vergleich der Differenzierungsmedien – eine Übersicht

In den folgenden Grafiken sollen nochmals die Oberflächenepitope gezeigt werden. Dieses Mal wurden jedoch die 3 Populationen h20, h21 und h38 zusammengefasst und die Ausprägung der Oberflächenepitope insgesamt beobachtet.

Ziel dieser Aufstellung ist, die Veränderung der Oberflächenstruktur der MSC im Ganzen zu sehen. Zudem kann die Wirksamkeit der applizierten Medien, eine Kardiogenität der MSC zu induzieren, dadurch besser veranschaulicht werden.⁸¹



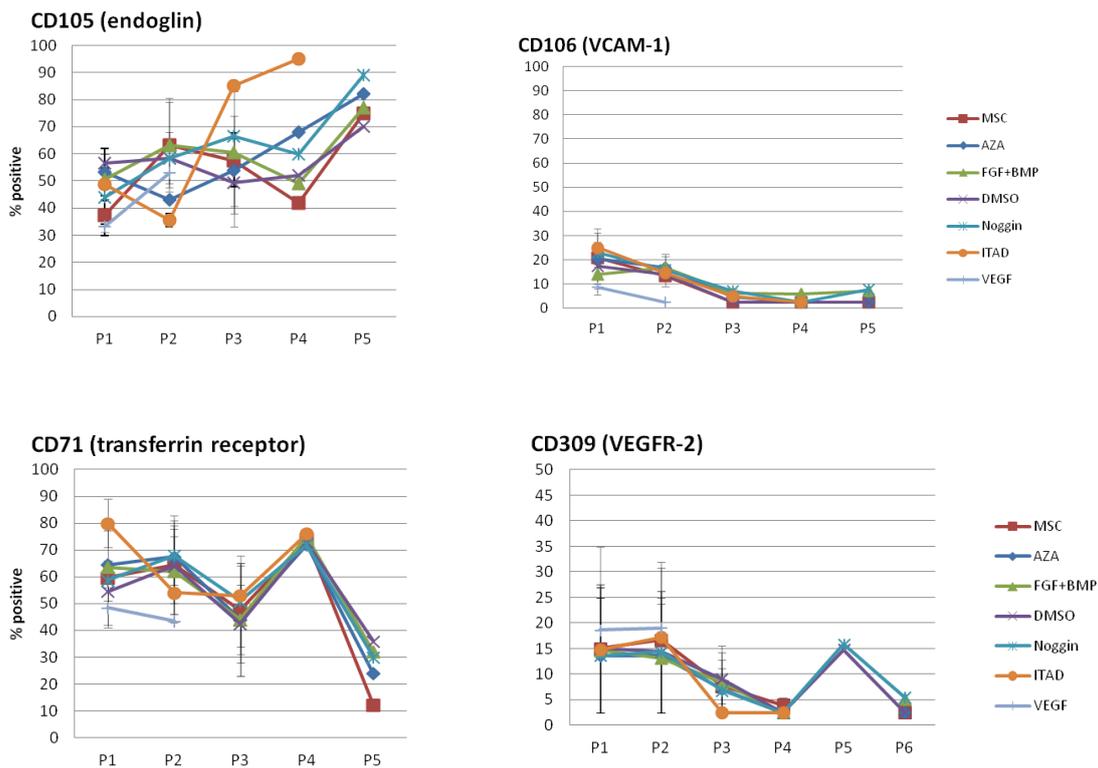


Abb. 5: Gesamtübersicht

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zellen zu Beginn der Studie positiv bezüglich der Oberflächenepithope CD10, CD71, CD90, CD105, CD106, CD117, CD243, CD309 und GD2 waren. Sehr gering bzw. nicht exprimiert waren CD31 und CD45.

Mit Dauer der Kultrierung zeigten sich Veränderungen in den Oberflächenepitopen unabhängig des zugegebenen Differenzierungsmediums. Auch zeigten die unbehandelten MSCs eine ähnliche Veränderung wie die Zellen unter Differenzierungsmedium. So blieben die Oberflächenepitope CD45, CD73, CD90, CD106, CD243 und CD309 im Verlauf unverändert. CD71, CD117 und GD2 ließen sich mit zunehmender Passagezahl weniger nachweisen. Dies jedoch an unbehandelten wie behandelten Zellen gleichermaßen.

CD105 ließ sich im zeitlichen Verlauf vermehrt nachweisen, hier zeigte sich ein stärkerer und früherer Anstieg unter dem Medium ITAD. Ebenso bildete letztgenanntes Medium eine Sonderstellung bezüglich des Oberflächenepitops CD10. Unter ITAD-Behandlung erschien das Antigen CD10, im Gegensatz zu den anderen Differenzierungsmedien bzw. SM, verstärkt exprimiert.

5 Diskussion

Die Idee des tissue engineering könnte zu einem neuen Zeitalter in der Medizin führen. Von der Therapie einer Alopezie über Hauttransplantationen von Verbrennungsoptionen bis zur Anzucht neuer Organe im Falle eines Versagens. Das Interesse an der Isolierung von multi- oder pluripotenten Stammzellen und die Beeinflussbarkeit ihrer Differenzierung ist daher groß. So könnte aus Stammzellendifferenzierung gewonnenes Knorpel- und Knochengewebe orthopädischen Operationen neue therapeutische Optionen bieten. In Bezug auf unser Forschungsprojekt, das die kardiomyogene Differenzierbarkeit untersucht, ist die Verbesserung der Herzfunktion nach Myokardinfarkt durch Verminderung des remodelling-Effekts interessant.

Die Gewinnung von mesenchymalen Stammzellen gelang bislang aus verschiedenen Geweben. Vor allem die Gewinnung von MSCs aus Knochenmark ist aufgrund der relativ einfachen und komplikationsarmen Punktionstechnik interessant.

Eine Transplantation dieser Zellen könnte autolog verlaufen, was das Risiko einer Abstoßungsreaktion reduzieren und die damit zusammenhängende Einnahme von Medikamenten zur Immunsuppression überflüssig machen könnte.

Zuvor sind jedoch einige Überlegungen anzustellen: Welche Zellen werden in das Infarktgebiet injiziert? Welchen Ursprungs sind sie und in welchem Differenzierungsgrad befinden sie sich? Damit zusammenhängend ist auch zu klären, welchen Einfluss die Potenz der Zellen auf Funktionalität und Risiken hat. Im

Zusammenhang mit dem therapeutischen Einsatz sollte geklärt sein, welche Mechanismen zur Verbesserung der Herzfunktion führen.

Durch die Applikation von Zellen aus unterschiedlichen Ursprungsgeweben konnte, wie oben gezeigt, eine Verbesserung der Herzfunktion erreicht werden. Erklärt werden konnte jedoch nicht, warum dies trotz unterschiedlicher Differenzierungsstadien und Herkunft der Zellen gelang. Es ist zu vermuten, dass alle verwendeten Zellen Gemeinsamkeiten aufweisen, die durch gemeinsame Entwicklungsstufen oder gleiches Ansprechen auf bestimmte Mediatoren zu erklären sein könnten. So könnte tatsächlich das remodeling reduziert worden sein. Alternativ ist auch eine Neubildung von Gefäßen durch Freisetzen von Wachstumsfaktoren durch die MSCs oder die Sezernierung von Stoffen, die dem Zelluntergang entgegenwirken, denkbar. Hier sind verschiedene Stoffe wie VEGF, TGF- β , placental growth factor, HGF und Adrenomedullin vorbeschrieben^{82,83,84}

5.1 MSC

Das von uns untersuchte Knochenmark der 3 Spender wurde mittels Dichtezentrifugation und anschließender Aussaat in Zellkulturflaschen zur Expansion gebracht. Um nachzuweisen, dass es sich bei den erhaltenen Zellen um MSCs handelt, wurden sie anhand der von der ISCT⁸⁵ gegebenen Minimal Kriterien für MSC, bewertet. So wird als erstes Kriterium die Plastikadhärenz gefordert. Diese konnte durch die Aussaat und den nach 24 h adhären gewordenen Zellen, die zur weiteren Untersuchung weiterkultiviert wurden, gezeigt.

Als zweites Kriterium wird die adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierungsfähigkeit gefordert. Alle drei von uns verwendeten Zelllinien wurden mittels adipogener, chondrogener und osteogener Differenzierungsmedien behandelt. Der Nachweis einer abgelaufenen Differenzierung konnte in der darauf folgenden immunzytochemischen Anfärbungen erbracht werden.

Der Nachweis wurde in regelmäßigen Abständen wiederholt. So wurde die Differenzierungsfähigkeit in Passage 0, 2, 4 und 6 geprüft. In den Passagen 0, 4 und 6 mittels adipogener und osteogener Differenzierung, in Passage 2 mittels chondrogener

Differenzierung. So konnte die erhaltene Multipotenz auch im zeitlichen Verlauf dokumentiert werden, womit das zweite Kriterium für das Vorliegen von MSC erfüllt war. Dieser Nachweis wurde im Rahmen einer separaten Arbeit erbracht.

Als drittes Kriterium forderte das ISCT die Expression von CD 105, CD 73 und CD 90. Die MSC exprimierten in hohem Maße CD 73 und CD90, CD 105 wurde ebenfalls auf mehr als jeder zweiten Zelle exprimiert. CD34, CD45, CD14 oder CD11b, CD 79 α oder CD19 und HLA-DR sollten nicht exprimiert werden. Von uns wurde nur CD 45 an allen Zellen untersucht. Der Marker wurde auf nahezu keiner Oberfläche der MSCs gefunden.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellen wurden nicht auf alle hämatopoietischen Marker, die von der ISCT aufgeführt wurden, getestet. Der positive Nachweis von CD73, CD90 und CD105 sowie das Fehlen des „common leucocyte antigens“ CD45 kann, in Zusammenschau mit der adipo-, osteo-, und chondrogenen Differenzierungspotenz als hinreichend zur Basischarakterisierung der MSCs angesehen werden.

5.2 Kardiomyogene Differenzierung

Die von uns verwendeten Differenzierungsprotokolle beziehen sich auf Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen, die für ihr verwendetes Differenzierungsmedium eine kardiomyogene Differenzierung nachweisen konnten. So untersuchten beispielsweise Wakitani et al. die MSC in ihrem Versuchsaufbau mit 5-Azacytidin. Shim et al. verwandten für ihre Zellen das Differenzierungsmedium ITAD. Das bisher nachgewiesene Differenzierungspotential wurde jedoch stets nur mit einem verwendeten Differenzierungsmedium untersucht, zudem wurden meist keine humanen MSCs verwendet. Zum Vergleich der verschiedenen Protokolle für eine kardiomyogene Induktion, verglichen wir diese Differenzierungsmedien an drei Zelllinien unter identischen Wachstumsbedingungen.

Der Nachweis einer stattgefundenen kardiomyogenen Differenzierung wurde durch drei unterschiedliche Untersuchungsmethoden vorgenommen. Zum einen wurde im Rahmen einer separaten Arbeit eine RT-PCR durchgeführt, um Actin, Myosin LC und Troponin

nachzuweisen⁸². Im Rahmen einer weiteren Arbeit wurden mittels kardiomyozytenspezifischer Antigene immunzytochemische Untersuchungen angestellt⁸⁶.

Diese Arbeit konzentrierte sich auf die Veränderung der Oberflächenepitope im zeitlichen Verlauf und auf Unterschiede bzgl. der Herauf- bzw. Herunterregulierung der verschiedenen, untersuchten Differenzierungsmedien.

Mittels Durchflusszytometrischer Analyse wurden im Rahmen dieser Arbeit die Oberflächenmerkmale der verschiedenen MSC-Populationen unter Wirkung kardiogener Differenzierungsmedien untersucht. Als Kontrollen wurden demgegenüber auch unbehandelte MSCs untersucht. Ziel war es, eine mögliche Veränderung der Oberflächenmarker im zeitlichen Verlauf festzuhalten und damit zusammenhängend die Wirksamkeit der verwendeten Induktionsmedien und Dauermedien auf diese Oberflächenmarker zu untersuchen. Zusätzlich wurde nach einer Methode gesucht, um zukünftig undifferenzierte und sich in Differenzierung befindliche MSCs mittels Durchflusszytometrie zu identifizieren und ggf. separieren zu können.

Wie sich in den Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen zeigte, ist die Suche nach Kardiomyozyten und deren Vorläuferstufen, nicht ohne weiteres möglich. Eine spezifische Oberflächenstruktur, die zur klaren Bestimmung der jeweiligen Zelle dienen könnte, fehlt bislang. Aus diesem Grund sind die erhaltenen Daten in Ergänzung zu den Ergebnissen der RT-PCR Messung einer separaten Arbeit, unter Verwendung derselben Zelllinien, zu sehen.⁸⁷

So zeigten sich Veränderungen der Oberflächenmerkmale unter Hinzugabe von Differenzierungsmedien. Spezifische Veränderungen, die kausal mit einer bestimmten Substanz der verwendeten Differenzierungsmedien in Zusammenhang stehen, konnten nicht beobachtet werden. Zudem zeigten sich die Veränderungen meist bei den behandelten MSCs wie auch bei den unbehandelten Zellen, was vermuten lässt, dass der Einfluss der Differenzierungsmedien auf die beobachteten Antigene nur gering zu sein scheint. Des Weiteren korreliert die Expression kardialer Markergene nicht mit einer Veränderung der von uns gemessenen Oberflächenmoleküle. Dies spricht entweder dafür, dass die in dieser Arbeit verwendeten Marker durch eine kardiale Differenzierung

keiner Beeinflussung unterliegen oder die Veränderung der Oberflächenstrukturen zur Identifizierung von Kardiomyozyten nicht die geeignete Methode darstellt.

So wurden Zellen der P19-Teratokarzinomzellen von Mäusen in einer Arbeit von Seung-Cheol et.al⁸⁸ mit 5-Azacytidin in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt.

Kontraktionen an Zellclustern konnten nach 12 Tagen beobachtet werden. Dabei zeigten sich Kontraktionen sowohl an den unbehandelten Zellen wie auch an den mit 5-Azacytidin behandelten Zellen. Die Zellen unter 5-Aza Einfluss zeigten dies in signifikant höherer Zahl als die Kontrollgruppe. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), BMP-4, Bmpr1a und Smad1 von diesen Zellen exprimiert wurden. Kardiale Marker wie GATA-4, Nkx2.5, Troponin I und Desmin wurden in Folge von einer Höherregulierung vermehrt nachgewiesen.⁸⁴

Bei den von uns mit 5-Aza behandelten MSCs, konnten wir keine Spontankontraktionen, wie sie von Fukada⁸⁹ oder Seung-Cheol et al.⁹⁰ beschreiben worden sind, beobachten. Jedoch wurde in diesen Arbeiten mit der P19 embryonal carcinoma cell line bzw. mit MSCs aus Mäusen gearbeitet und nicht an humanen MSCs. Die verwendeten embryonalen Stammzellen besitzen womöglich eine potentere Differenzierungsfähigkeit gegenüber den adulten humanen MSCs.

Seung-Cheol et al.⁸¹ beschrieben eine kardiogene Differenzierung unter 5-Aza durch die Demethylierung der DNA. So komme es zu einer Expression kardialer Markergene durch die Induktion im BMP pathway. Eine Aussage zur Oberflächenstruktur wurde nicht gemacht.

In der Arbeit von Fukada et al.⁹¹ beschrieben die Autoren eine kardiomyogene Zelllinie, deren Differenzierung durch 5-Aza induziert werden konnte. Die Dynamik der kardialen Markergene ließ vermuten, dass sich die Zellen in der Entwicklung zwischen Progenitorzellen und differenzierten Kardiomyozyten befanden. Oberflächenmerkmale wurden nicht untersucht.

Die von uns untersuchten Oberflächenmerkmale zeigten unter der 5-Aza Behandlung nach dem Protokoll von Wakitani et al.⁹² keine spezifische Veränderung, die sie von den anderen verwendeten Differenzierungsmedien oder SM unterschied.

Yuasa et al.⁹³ zeigten, dass BMP (bone morphogenetic protein) in der Signalkaskade der Herzentwicklung von Bedeutung ist. Während der Gastrulation, der Bildung der Keimblätter während der Embryonalentwicklung, ist der BMP-Antagonist Noggin in der Herzregion verstärkt messbar. Dies führe zur verstärkten Induktion einer kardiomyogenen Differenzierung.

Die von uns mit dem Protokoll nach Yuasa et al.⁸⁴ behandelten MSCs zeigten bezüglich der von uns untersuchten Oberflächenmerkmale keinen Unterschied zu den MSCs anderer Differenzierungsmedien bzw. SM.

Durch Hinzugabe von FGF (fibroblast growth factor) und BMP (bone morphogenetic protein) zu undifferenzierten embryonalen Stammzellen, sollte gemäß der Arbeit von Kawai et al.⁹⁴ eine Induktion kardiogener Differenzierung gefördert werden. Eine vermehrte Genexpression kardialer Markergene konnte unter Anwesenheit beider Substanzen gemessen werden. Fehlten diese, so wurde die Differenzierung unterdrückt. Wir konnten keine abweichende Expression der Marker gegenüber den Zellen anderer Differenzierungsmedien bzw. SM beobachten.

Durch Dimethylsulfoxid soll eine kardiomyogene Differenzierung induziert werden, wie verschiedene Arbeitsgruppen herausgefunden haben. So beschrieben Paquin et al.⁹⁵ eine P19 carcinoma Zelllinie, die unter DMSO- und Oxytocineinfluss eine kardiomyogene Differenzierung begann.

Auch hier zeigten sich die Oberflächenmarker unserer MSCs nicht anders als unter Wirkung anderer Differenzierungsmedien oder SM.

Als weiteres Differenzierungsprotokoll wurde ein Medium, das VEGF, PDGF2, sowie FGF2 enthielt, getestet (nach Xaymardan et al.⁷⁶). Dabei handelte sich um ein Permanentmedium, das den Zellen dauerhaft als Kultur- und Differenzierungsmedium verabreicht wurde und nicht nur für eine definierte Zeit auf den Zellen belassen wurde. Es zeigte sich eine abnehmende Kinetik der Zellteilung, was dazu führte, dass eine Konfluenz ab Passage 3 nicht mehr erreicht werden konnte. Makroskopisch zeigte sich ein verändertes Bild im Vergleich zu den restlichen MSCs.

Die Oberflächenmarker waren auch hier im Vergleich zu den Markern anderer Differenzierungsmedien und SM nicht auffallend anders.

Das von Shim et al.⁷⁵ publizierte Protokoll beinhaltete u.a. Rinderinsulin, Dexamethason, Ascorbat und Transferrin. Unter diesem Protokoll wurde CD 10 verstärkt exprimiert.

Bezüglich CD105 beobachteten wir einen Abfall in Passage 2. Ab Passage 3 kam es zu einem Anstieg auf Werte oberhalb derer anderer Differenzierungsmedien, um in Passage 4 noch weiter anzusteigen. Die zuletzt genannten Ergebnisse konnten nur bei einer der untersuchten Populationen gesehen werden.

Dies könnte darauf hindeuten, dass es sich hierbei um eine Subpopulation handelte, die sich im Verlauf stärker vermehrte, was die erhöhte Messung von CD105 exprimierenden Zellen erklären könnte. Ebenso könnte sich diese Subpopulation in eine andere Richtung spontan differenzieren, was ebenfalls die Mehrexpression von CD105 Oberflächenmarker erklären könnte.

Eine Spontandifferenzierung in vitro könnte auch dafür verantwortlich sein, dass sich eine kardiomyogene Differenzierung nicht in ausgeprägtem Maße einstellte.

Eine Selektion dieser Subpopulationen könnte Inhalt weiterer Arbeiten sein. Darin könnte ihr Einfluss auf die anderen kultivierten MSCs weiter untersucht werden.

Außerdem könnte eine Möglichkeit zur Separation dieser Subpopulationen zukünftig helfen, weitere Einblicke in die Funktionsweise von MSCs und deren

Differenzierungsverhalten zu gewinnen. Erste Marker könnten mit CD 271, MSCA-1⁹⁶,

GD2⁹⁷ und SSEA-4⁹⁸ gefunden sein (s.o.). Da beispielsweise MSCA-1 positive Zellen vornehmlich eine chondrogene Differenzierung einschlagen, ist dieser Marker zur Detektion von MSCs im Allgemeinen unter Umständen hilfreich. Zellen mit hohem kardiomyogenen Differenzierungspotential sind damit mutmaßlich nicht zu selektieren.

Ein Blick auf die von uns untersuchten MSCs, die keinem der oben genannten Differenzierungsmedien ausgesetzt wurden. Sie erhielten über die ganze Beobachtungsdauer ausschließlich SM zur Kultivierung. Diese Zellen würden erwarten lassen, dass sie sich in ihrem Expressionsprofil von den MSC unter kardiomyogener Differenzierung unterscheiden. Gemäß den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analyse entsprach ihr Oberflächenprofil weitgehend dem der anderen Zellen. Dies kann mehrere Ursachen haben:

Zum Einen ist es möglich, dass die von uns untersuchten Oberflächenmarker die Bestimmung von Zellen unter kardiomyogener Differenzierung nicht zulassen. Dies würde bedeuten, dass die untersuchten Oberflächenmarker keiner Veränderung durch die ablaufende Differenzierung unterliegen oder dass die Differenzierung unserer MSCs nicht fortgeschritten genug war, um eine beobachtbare Veränderung zu zeigen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass sich die unbehandelten MSCs in ähnlichem Maße durch Spontandifferenzierung kardiomyogen differenzierten. Denkbar wäre auch, dass eine Subpopulation der unbehandelten MSCs einer kardiomyogenen Differenzierung unterlag.

Dies kann mit den vorliegenden Daten nicht geklärt werden, weshalb weitere Oberflächenmarker, die spezifisch die kardiomyogene Differenzierung anzeigen könnten, notwendig sind.

5.3 Zusammenfassung und Ausblick

Bislang muss sich die Therapie des Akuten Koronarsyndroms, insbesondere im Falle eines Myokardinfarktes, auf die Reperfusion des ischämischen Myokardareals beschränken. Ebenso verhält es sich mit der chirurgischen Reperfusion mittels Bypass-Operation. Des Weiteren müssen die kardiovaskulären Risikofaktoren und evtl. aufgetretene Herzrhythmusstörungen behandelt werden. Eine Restitutio ad integrum ist mit all diesen Maßnahmen nicht möglich. Eine vorstellbare therapeutische Alternative könnte die Behandlung mit Kardiomyozyten bzw. mesenchymalen Stammzellen darstellen. Diese könnten die Pumpfunktionseinschränkung, wie sie durch Ischämie und in deren Folge entstehende Fibrosierung und remodeling hervorgerufen wird, möglicherweise begrenzen..

Dazu ist es Voraussetzung, die Kardiomyozyten bzw. MSCs therapeutisch sicher einsetzen zu können. Hier könnten MSCs aus Knochenmark eine interessante Methode darstellen, da sie einfach zu gewinnen sind und aufgrund ihrer Multipotenz die Fähigkeit zur kardiomyogenen Differenzierung haben.

Viele Forschungsgruppen beschäftigen sich hiermit bereits: So wurden undifferenzierte MSC in ein Infarktareal injiziert. Auch Zellen, die sich bereits in kardiomyogener Differenzierung befanden, wurden in ihrer Wirkungsweise untersucht. Allen gemein ist die nachgewiesene Verbesserung der Pumpleistung, die teilweise jedoch zeitlich begrenzt war oder beispielsweise die Komplikation von Arrhythmien nach sich zog.

Ziel dieser Arbeit war es, die zahlreichen vorbeschriebenen kardiomyogenen Differenzierungsmedien, durch Anwendung an einer Population miteinander zu vergleichen. Des Weiteren sollte mit dieser Arbeit untersucht werden, inwiefern sich das Expressionsprofil der Oberflächenepitope im zeitlichen Verlauf und unter zunehmender kardiomyogener Differenzierung veränderte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die von uns verwendeten Oberflächenmerkmale zur Suche von Zellen, die sich in kardiomyogener Differenzierung befinden, nicht geeignet sind. So korrelierten die Ergebnisse der RT-PCR, die in der Arbeit von Georg Siegel zu finden sind, nicht mit den Messungen

mittels Durchflusszytometrie. Das heißt, eine Induktion von kardialen Markergenen und eine damit zusammenhängende kardiale Differenzierung konnte mittels der von uns untersuchten Oberflächenmarker nicht nachvollzogen werden.

Die MSCs definierenden Parameter CD105, CD90 und CD73 können gemäß dieser Arbeit nicht zum Nachweis einer kardiomyogenen Differenzierung dienen, da sich mit Induktion einer kardiomyogenen Differenzierung die Expression der Oberflächenmoleküle nicht änderte. Es kann jedoch gesagt werden, dass die ursprünglich zur Bestätigung der MSC geforderte Markerkonstellation gemäß ISCT auch während der Kultur mit kardiomyogenen Differenzierungsmedien erhalten blieb.

Somit stellen sich weitere Fragen:

Welche Oberflächenmerkmalkombination ist zum Nachweis von Kardiomyozyten und deren Vorstufen notwendig?

Es liegen solch Minimalkriterien, wie sie von der International Society for Cellular Therapy (ISCT) für mesenchymale Stammzellen beschlossen sind, für Kardiomyozyten und deren Vorläuferzellen nicht vor, was den Nachweis via Durchflusszytometrie momentan noch nicht zulässt.

Ist eine Veränderung der Oberflächenmoleküle unter kardiogener Differenzierung überhaupt zu erwarten?

Wie in dieser Arbeit zu sehen ist, kommt es unter dem Einfluß von ITAD zu einer Konstellation mit erhöhter CD10 und CD105 Oberflächenexpression. Somit könnten zwei erste Parameter gefunden sein, die eine Zellsortierung möglich machen, um mögliche Subpopulationen weitergehend untersuchen zu können.

Eine Veränderung des Expressionsprofils konnte während unserer Langzeitkulturierung für einige Oberflächenmarker beobachtet werden. Fände man Oberflächenmarker, die

eine Unterscheidung zwischen undifferenzierten MSC und sich in kardiomyogener Differenzierung befindlichen Zellen zuließe, könnte mittels Durchflusszytometrie der Zeitpunkt für eine maximal erreichbare Differenzierung bzw. das „Ernten“ von Kardiomyozyten eingegrenzt werden.

Ist die *in vitro* Differenzierung sinnvoll?

Die *in vitro* Anzucht von MSC ist eine mittlerweile etablierte Methode. Es besteht jedoch das Problem, dass Subpopulationen mit einer anderen Wachstums- und Differenzierungskinetik andere Zellen verdrängen könnten. Dies könnte die ursprüngliche Differenzierungsfähigkeit bzw. -richtung beeinflussen. Eine Technik zur Zellseparation und damit zur Erstellung einer „Reinkultur“ wäre wünschenswert.

Solange die gezielte Differenzierung in eine bestimmte Gewebeart noch nicht verstanden und damit einhergehend nicht beeinflussbar ist, erscheinen *in vivo*-Studien am Menschen moralisch nicht vertretbar. Solange Zellteilung und Spontandifferenzierung nicht kontrollierbar sind, ist die Gefahr bezüglich Tumorentstehung bzw. unerwünschter Differenzierung nicht kalkulierbar. So könnten sich MSCs *in vivo* an einer Stelle osteogen differenzieren, an der Knochengewebe nicht zu finden sein sollte. Anhand unserer Arbeit nach Injektion in ein Infarktgebiet, wäre eine möglicherweise noch schlechterer Pumpfunktion des Myokards durch Ossifikation die Folge. Zudem könnte das Gewebe Arrhythmien fördern oder unterhalten.

Als weiterer Punkt wäre die potentiell ungerichtete Zellteilung und damit das erhöhte onkogene Risiko bei *in vivo* Experimenten zu bedenken.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Das Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung.....	S.26
Abb. 2 Messung der h20 Passage 2 undifferenzierte MSC	S.27
Abb. 3 MSC ohne Differenzierungsmedium in Kultur.....	S.38
Abb. 4 MSC unter VEGF-Differenzierungsmedium.....	S.38
Abb. 5: Gesamtübersicht der durchflusszytometrischen Messungen ⁸¹	S.52

7 Abkürzungen

α -MEM	α -Modified Eagle's Medium
Aza	5-Azacytidin
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSA	Bovine Serum Albumine
CD	Cluster of Differentiation
CPC	Kardiale Progenitorzelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (acid)
EPC	Endotheliale Progenitorzelle
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Erdbeschleunigung
ISCT	International Society for Cellular Therapy
IZM	Innere Zellmasse
ITAD	Insulin, Transferrin, Ascorbat, Dexamethason
M	Mol, molar
MSC	Mesenchymale Stammzelle
MSCA-1	Mesenchymal stem cell antigen-1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PTCA	Perkutane transluminale Coronarangioplastie
RCX	Ramus circumflexus
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SM	Standardmedium
TGF- β	Transforming growth factor beta
VEGF	Vascular endothelial growth factor

8 Literaturverzeichnis

- ¹ 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.
- ² 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.
- ³ Assmus B, Fischer-Rasokat, Honold J et al. Transcoronary transplantation of functionally competent BMCs is associated with a decrease in natriuretic peptide serum levels and improved survival of patients with chronic postinfarction heart failure: results of the TOPCARE-CHD Registry. *Circ Res.* 2007 Apr 27;100(8):1234-41.
- ⁴ 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.
- ⁵ 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.
- ⁶ 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.
- ⁷ 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.
- ⁸ 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.
- ⁹ Dubois C, Liu X, Claus P, Marsboom G, Pokreisz P, Vandewijngaert 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.

¹⁰ Murasawa S, Asahara T. Cardiogenic potential of endothelial progenitor cells. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2008 October;2(5):341-8.

¹¹ 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;121(2):293-305.

¹² Tang XL, Rokosh DG, Guo Y, Bolli R. Cardiac progenitor cells and bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells for cardiac repair after myocardial infarction. *Circ J*. 2010 Mar;74(3):390-404. Epub 2010 Jan 18.

¹³ López Y, Lutjemeier B, Seshareddy K, Trevino EM, Hageman KS, Musch TI, Borgarelli M, Weiss ML. Wharton's jelly or bone marrow mesenchymal stromal cells improve cardiac function following myocardial infarction for more than 32 weeks in a rat model: A Preliminary Report. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2012 Dec 24.

¹⁴ Keith Moore et al. *Embryologie: Entwicklungsstadien - Frühentwicklung - Organogenese – Klinik*. Urban & Fischer. 2007

¹⁵ Bjerknes M, Cheng H. The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. II. Evidence from paneth cells in the newborn mouse. *Am J. Anat*. 1981; 160:65-75

¹⁶ Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100 Suppl. 1:11830-11835

¹⁷ Goh E, Ma D, Ming G, Song H. Adult neural stem cells and repair of the adult central nervous system. *J Hematother Stem Cell Res*. 2003; 12:671-679

¹⁸ Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966 December;16(3):381-90.

¹⁹ 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.

²⁰ 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.

²¹ 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.

²² 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.

²³ Caplan et al. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991 September; 9(5):641-50

²⁴ J.J. Minguell, A. Erices, P. Conget, Mesenchymal stem cells, *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 226 (2001) 507-520

²⁵ S. Gronthos, A.C. Zannettino, S.J. Hay, S. Shi, S.E. Graves, A. Kortessidis, P.J. Simmons, Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow, *J. Cell Sci*. 116 (2003) 1827-1835

²⁶ J.E. Dennis, P. Charbord, Origin and differentiation of human and murine stroma, *Stem Cells* 20 (2002) 205-214

- ²⁷ S. Tomita, R.K. Li, R.D. Weisel, D.A. Mickle, E.J. Kim, T. Sakai, Z.Q. Jia, Autologous transplantation of bone marrow cells improves damages heart function, *Circulation* 100 (1999) II247- II256
- ²⁸ H. Kawada, J. Fujita, K. Kinjo, Y. Matsuzaki, M. Tsuma, H. Miyatake, Y. Muguruma, K. Tsuboi, Y. Itabashi, Y. Ikeda, S. Ogawa, H. Okano, T. Hotta, K. Ando, K. Fukuda, Nonhematopoietic mesenchymale stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction, *Blood* 104 (2004) 3581-3587
- ²⁹ M. Reyes, A. Dudek, B. Jahagirdar, L. Koodie, P.H. Marker, C.M. Verfaillie, Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow, *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 337-346
- ³⁰ R.G. Harris, E.L. Herzog, E.M. Bruscia, J.E. Grove, J.S. Van Arnem, D.S. Krause, Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia, *Science* 305 (2004) 90-93
- ³¹ S. Wakitani, T. Saito, A.I. Caplan, Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymale stem cells exposed to 5-azacytidine, *Muscle Nerve* 18 (1995) 1417-1426
- ³² S. Makino, K. Fukada, S. Miyoshi, F. Konishi, H. Kodama, J. Pan, M. Sano, T. Takahashi, S. Hori, H. Abe, J. Hata, A. Umezawa, S. Ogawa, Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro, *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 697-705
- ³³ W.S. Shim, S. Jiang, P. Wong, J. Tan, Y.L. Chua, Y.S. Tan, Y.K. Sin, C.H. Lim, T. Chua, M. Teh, T.C. Liu, E. Sim, Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324 (2004) 481-488
- ³⁴ Gimble J., Guilak F., Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* (2003);5:362-369
- ³⁵ Zuk P., Zhu M, Ashjian P et al., Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* (2002) 13:4279-4295
- ³⁶ Fukuchi Y., Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K, Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells* (2004) 22:649-658
- ³⁷ Erices A, Conget P, Minguell J, Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* (2000) 109:235-242
- ³⁸ Lee O, Kuo T, Chen W, Lee K, Hsieh S, Chen T. Isolation of multipotent mesenchymale stem cells from umbilical cord blood. *Blood* (2004) 103:1669-1675
- ³⁹ Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica* (2001) 86:1099-1100
- ⁴⁰ Wexler S, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows J. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol.* (2003) 121:368-374
- ⁴¹ Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7

- ⁴² Carvalho JM, Souza MK, Buccheri V et al. CD 34-positive cells and their subpopulations characterized by flow cytometry analysis on the bone marrow of healthy allogenic donors. *Sao Paulo Med J*. 2009 Jan; 127(1):12-8
- ⁴³ 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.
- ⁴⁴ 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.
- ⁴⁵ 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.
- ⁴⁶ 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.
- ⁴⁷ Lang, Florian. *Basiswissen Physiologie*. Springer-Verlag Berlin. 2000
- ⁴⁸ Thomas, C. *Spezielle Pathologie*. Schattauer-Verlag. 1996
- ⁴⁹ Renz-Polster, Krautzig, Braun. *Basislehrbuch Innere Medizin*. Elsevier GmbH, Urban&Fischer. 2004
- ⁵⁰ 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) 73 (6):1919-1925
- ⁵¹ Pak HN, Qayyum M, Kim DT, Hamabe A, Miyauchi Y, Lill MC, Frantzen M, Takizawa K, Chen LS, Fishbein MC, Sharifi BG, Chen PS, Makkar R. Mesenchymal stem cell injection induces cardiac nerve sprouting and increased tenascin expression in a Swine model of myocardial infarction. *J Cardiovasc Electrophysiol*. (2003) 8:841-848
- ⁵² Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, Yamagishi M, Mori H, Kangawa K, Kitamura S. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2004) 6:2670-2676
- ⁵³ Freyman T, Polin G, Osman H, Crary J, Lu M, Cheng L, Palasis M, Wilensky RL. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J*. (2006) 9:1114-1122
- ⁵⁴ Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*. 2004 Jul 9;95(1):9-20.
- ⁵⁵ Bhatia R, Hare JM. Mesenchymal stem cells: future source for reparative medicine. *Congest Heart Fail* (2005) 2:87-91
- ⁵⁶ Guarita-Souza LC, Carvalho KA, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, Furuta M, Miyague N, Francisco JC, Olandoski M, Faria-Neto JR, Oliveira SA, Brofman PR. Cell transplantation: differential effects of myoblasts and mesenchymal stem cells. *Int J Cardiol* (2006) 3:423-429

- ⁵⁷ Wolf D, Reinhard A, Krause U, Seckinger A, Katus HA, Kuecherer H, Hansen A. Stem cell therapy improves myocardial perfusion and cardiac synchronicity: new application for echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* (2007) 5:512-520
- ⁵⁸ Zhu H, Song X, Jin LY, Jin P, Guan R, Liu X, Li XQ. Comparison of Intra-coronary Cell Transplantation after Myocardial Infarction: Autologous Skeletal Myoblasts versus Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *J Int Med Res.* (2009) 2:298-307
- ⁵⁹ Breitbach M, Bostani T, Roell W, Xia Y, Dewald O, Nygren JM, Fries JW et al. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood* (2007) 4:1362-1369
- ⁶⁰ Bruhn, Junker, Schäfer, Schreiber. *Labor Medizin.* Schattauer Verlag Stuttgart. 2011
- ⁶¹ HGNC:7154; Gene ID:4311
- ⁶² HGNC: 8823; Gene ID: 5175
- ⁶³ HGNC: 9666; Gene ID: 5788
- ⁶⁴ HGNC: 11763; Gene ID: 7037
- ⁶⁵ HGNC: 8021; Gene ID: 4907
- ⁶⁶ HGNC: 11801; Gene ID: 7070
- ⁶⁷ HGNC: 3349; Gene ID:2022
- ⁶⁸ HGNC: 12663; Gene ID: 7412
- ⁶⁹ HGNC: 6342; Gene ID: 3815
- ⁷⁰ HGNC: 40; Gene ID: 5243
- ⁷¹ HGNC: 6307; Gene ID: 3791
- ⁷² Battula VL, Shi Y, Evans KW, Wang RY, Spaeth EL, Jacamo RO, Guerra R, Sahin AA, Marini FC, Hortobagyi G, Mani SA, Andreeff M. Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2012 Jun 1;122(6):2066-78. doi: 10.1172/JCI59735. Epub 2012 May 15.
- ⁷³ Iwamori M, Nagai Y. Ganglioside-composition of brain in Tay-Sachs disease: increased amounts of GD2 and N-acetyl-beta-D-galactosaminyl GD1a ganglioside. *J Neurochem.* 1979 Mar;32(3):767-77.
- ⁷⁴ 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. Epub 2007 Jan 30. Erratum in: *Blood.* 2007 Aug 1;110(3):826.
- ⁷⁵ Wakitani et al. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve.* 1995 Dec;18(12):1417-26.
- ⁷⁶ Yuasa et al. Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2005 May;23(5):607-11.
- ⁷⁷ Kawai et al. Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ J.* 2004 Jul;68(7):691-702.
- ⁷⁸ Paquin et al. Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jul 9;99(14):9550-5. Epub 2002 Jul 1.
- ⁷⁹ 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.

- ⁸⁰ 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.
- ⁸¹ Siegel G, Krause P, Wöhrle S, Nowak P, Ayturan M, Kluba T, Brehm BR, Neumeister B, Köhler D, Rosenberger P, Just L, Northoff H, Schäfer R. Bone marrow-derived human mesenchymal stem cells express cardiomyogenic proteins but do not exhibit functional cardiomyogenic differentiation potential. *Stem Cells Dev.* 2012 Sep 1;21(13):2457-70. doi: 10.1089/scd.2011.0626. Epub 2012 Mar 13.
- ⁸² 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 cograftering 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.
- ⁸³ Di NM, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese 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.
- ⁸⁴ 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.
- ⁸⁵ Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7
- ⁸⁶ Stefanie Wöhrle. Kardiomyogene Differenzierungspotenz und Wachstumskinetik von adulten humanen mesenchymalen Stammzellen. 2012
- ⁸⁷ Georg Siegel. Kardiomyogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen. 2011
- ⁸⁸ Seung-Cheol Choi, Jihyun Yoon, Wan-Joo Shim, Young-Moo Ro and Do-Sun Lim. 5-azacytidine induces cardiac differentiation of P19 embryonic stem cells. *Experimental and Molecular medicine* (2004) 6: 515-523
- ⁸⁹ Fukada. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artificial Organs.* 2001 25(3):187-193
- ⁹⁰ Seung-Cheol et. al. 5-azacytidine induces cardiac differentiation of P19 embryonic stem cells. *Experimental and Molecular Medicine.* 2004 Dec. 36(6):515-523
- ⁹¹ Fukada. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artificial Organs.* 2001 25(3):187-193
- ⁹² Wakitani et al. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve.* 1995 Dec;18(12):1417-26.
- ⁹³ Yuasa et al. Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2005 May;23(5):607-11.

⁹⁴ Kawai et al. Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ J.* 2004 Jul;68(7):691-702.

⁹⁵ Paquin et al. Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jul 9;99(14):9550-5. Epub 2002 Jul 1.

⁹⁶ 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.

⁹⁷ 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.

⁹⁸ 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.