

Diplomarbeit

Erhebung von Daten über das Altern mesenchymaler Stammzellen in einem Langzeitexpansionsmodell

eingereicht von

Christoph-Maximilian Peter Drees

Mat.Nr.: 0534504

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

**Klinischen Abteilung für Pädiatrische Hämato-Onkologie
und dem Institut für Pathophysiologie und Immunologie**

Erstbetreuer

Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Schwinger

Zweitbetreuerin

Univ.-Ass.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ Ingeborg Stelzer

Graz, am 13.12.2010

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 13.12.2010

Christoph Drees

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt dabei Frau Univ.-Ass. Dr. Ingeborg Stelzer für ihre engagierte Betreuung, aber auch für die persönliche Unterstützung. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Schwinger möchte ich mich ganz herzlich sowohl für die Möglichkeit bei diesem Projekt mitzuarbeiten, als auch für die gewissenhafte Betreuung der Diplomarbeit bedanken.

Bei den MTAs Frau Sandra Czeloth, Elvira Kloibhofer, Anita Puregger und Andrea Raicht möchte ich mich für die Zusammenarbeit und die freundliche Unterstützung bei der Kultivierung und Passagierung der Zellen bedanken. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Zellkulturen stammen ebenfalls von ihnen.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Robert Fuchs dafür bedanken, dass er mir bei offenen Fragen immer weitergeholfen hat.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Sadjak und den Mitarbeitern des Instituts für Pathophysiologie möchte ich mich für die schöne Zeit am Institut ganz herzlich bedanken.

Mein größter Dank gebührt jedoch meinen Eltern, Silvia und Aloys Drees, die es mir ermöglicht haben dieses Hochschulstudium zu absolvieren und die mich in all meinen Vorhaben immer bedingungslos unterstützen.

Zusammenfassung

Hintergrund: Bei einer Stammzelltransplantation müssen die gespendeten hämatopoietischen Stammzellen durch Vermehrung und Differenzierung das gesamte hämatopoietische System des Empfängers aufbauen und dessen weitere Funktion aufrechterhalten. Es ist jedoch wenig erforscht, welche Auswirkungen diese massive Proliferation auf die Alterung der Stammzellen hat. In einem Langzeitkultur- und Expansionsmodell sollen deshalb Alterungsprozesse von hämatopoietischen und mesenchymalen Stammzellen erforscht werden.

Material und Methoden: Aus dem Knochenmark wurden mesenchymale Stammzellen isoliert und *ex vivo* expandiert. Wöchentlich wurden mit Hilfe des alkalischen Comet-Assays Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA in einer Einzelzellelektrophorese experimentell bestimmt. Nach der Färbung mit Ethidiumbromid oder DAPI bildeten die geschädigten Zellen „Kometen“ aus, wobei der Zellkern den Kopf und die DNA-Fragmente den Schweif des Kometen darstellten. Anhand der Größe des Schweifes ließ sich anschließend der sog. Comet-Score ermitteln. Der Comet-Assay konnte durch zwei zusätzliche Schritte weiter verbessert werden. Mittels einer durchflusszytometrischen Untersuchung wurde ebenfalls der Anteil der apoptotischen Zellen bestimmt.

Ergebnisse: Die Stammzellen konnten unterschiedlich lange kultiviert werden. In der Passage 3 lag der Median des Comet-Scores aller ausgewerteten Objektträger bei 13. Er stieg linear bis zur Passage 12 mit einem Wert von 217 an. Der lineare Zusammenhang zwischen Kultivierungsdauer und DNA-Schäden wird durch den Korrelationskoeffizient $(R^2)^{1/2}$ ausgedrückt, der einen Wert von 0,97 aufweist. Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen stieg im Mittel von 9,4 % in der Passage 3 auf 15,4 % in der Passage 9.

Diskussion: Mit zunehmender Dauer der *in vitro* Kultivierung häufen sich immer mehr DNA-Schäden in den Zellkernen der Stammzellen an, die durch Reperaturmechanismen nicht mehr kompensiert werden können. Auch der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen steigt im Laufe der Kultivierung. Dies sind Hinweise für die Alterung von *in vitro* kultivierten mesenchymalen Stammzellen.

Abstract

Background: Following transplantation, transplanted hematopoietic stem cells must replace all blood cells and sustain the hematopoietic system through proliferation and differentiation. However, only few data exists about the impact of this massive proliferation on stem cell aging. Therefore, aging processes of hematopoietic and mesenchymal stem cells are explored using a long-term cultivation and expansion model.

Material and Methods: Mesenchymal stem cells were isolated from the bone marrow and expanded *ex vivo*. With the alkaline comet-assay, single and double-strand DNA breaks were experimentally determined using a single cell electrophoresis once a week. After staining with ethidiumbromide or DAPI, the damaged cells developed „comets“, with the nucleus representing the head and the DNA fragments the tail of the comet. The comet score was determined based on the size of the comet's tail. The comet-assay used in this thesis was further improved by adding two additional steps. The proportion of apoptotic cells was determined using flow cytometry.

Results: Stem cells could be cultured for a varying long time. After the 3rd passage, the median of the comet-scores for all analysed slides was 13. The score increased linearly until the 12th passage, which had a median score of 217. The linear relationship between the culture duration and DNA damage is expressed through the coefficient of correlation $(R^2)^{1/2}$, with a value of 0,97. The proportion of apoptotic cells increased on average from 9,4 % in the 3rd passage to 15,4 % in the 9th passage.

Discussion: With prolonged duration of the *in vitro* culture, increasing DNA damage accumulates in the cell nucleus of mesenchymal stem cells, which can not be fully compensated by repair mechanisms. Over the course of *in vitro* cultivation, the proportion of apoptotic cells also increased. The results are an indicator for aging processes of *in vitro* cultured mesenchymal stem cells.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	ii
Zusammenfassung	iii
Abstract	iv
Inhaltsverzeichnis	v
Glossar und Abkürzungen	vii
Abbildungsverzeichnis	xi
1 Einleitung	1
1.1 Fragestellung	1
1.2 Eigenschaften und Funktionen von Stammzellen	2
1.3 Mesenchymale Stammzellen	3
1.3.1 Geschichte	3
1.3.2 Merkmale mesenchymaler Stammzellen	4
1.4 Hämatopoietische Stammzellen	6
1.4.1 Subpopulationen und Eigenschaften	6
1.4.2 Expansion hämatopoietischer Stammzellen <i>in vitro</i>	8
2 Material und Methoden	9
2.1 Isolation mononukleärer Zellen aus venösem Blut	9
2.2 Kultivierung und Passagierung der mesenchymalen Stammzellen	11
2.2.1 Isolierung und Primäransatz	11
2.2.2 Passagierung	12
2.3 Alkalischer Comet-Assay	13
2.4 Apoptosebestimmung mittels Annexin V und PI	19
2.5 Verwendete Puffer und Lösungen	20
2.5.1 Comet-Assay	20
2.5.2 Apoptosebestimmung mittels Annexin V und PI	22

3	Ergebnisse	23
3.1	Wachstum der MSC-Kulturen.....	23
3.2	Alkalischer Comet-Assay	23
3.3	Erfassung von apoptotischen Zellen	26
4	Diskussion.....	28
4.1	Alterung mesenchymaler Stammzellen <i>in vitro</i>	29
4.1.1	Morphologische Veränderungen.....	29
4.1.2	DNA-Schäden.....	30
4.1.2.1	Erfassung von DNA-Schäden durch den Comet-Assay	30
4.1.2.2	DNA-Schäden: weitere Ursachen und Reperaturmechanismen	32
4.1.3	Apoptose	34
4.1.4	Weitere Hinweise für eine Alterung mesenchymaler Zellen <i>in vitro</i> ..	36
4.2	Verbesserungen des Comet-Assays.....	37
4.3	Mesenchymale Stammzellen: klinische Anwendung	39
4.3.1	Immunmodulation	39
4.3.2	Engraftment nach Transplantation hämatopoietischer Stammzellen	40
4.3.3	Graft versus Host Disease.....	42
4.3.4	Regeneration geschädigter Gewebe	44
4.4	HSC Nische: Einfluss mesenchymaler Stammzellen	46
	Literaturverzeichnis	48

Glossar und Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ALCAM	activated leukocyte adhesion molecule
APC	antigen presenting cell
Aqua dest.	Aqua destillata
BAX	Bcl-2 associated X protein
bFGF	basic fibroblast growth factor
BFU	burst forming unit
CAD	Caspase-aktivierte Desoxyribonuklease
CCR	CC chemokine receptor
CD	cluster of differentiation
CFU	colony forming unit
CLP	common lymphoid progenitor
CMF-PBS	Calcium und Magnesium freier Phosphat Puffer
CMP	common myeloid progenitor
CXCR	CXC chemokine receptor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-Proteinkinase
ECD	phycoerythrin-Texas Red conjugate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FADD	fas-associated protein with death domain
FasL	Fas ligand
FCS	fetal calf serum
FITC	fluorescein isothiocyanate

FLT3-L	fetal liver tyrosin kinase 3-ligand
GMP	granulocyte monocyte progenitor
GVHD	graft versus host disease
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HLA	human leukocyte antigen
hMSC	human mesenchymal stem cell
HSC	hematopoietic stem cell
HSCT	hematopoietic stem cell transplantation
ICAD	Inhibitor der Caspase-aktivierten Desoxyribonuklease
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
ICAM	intercellular adhesion molecule
IL	Interleukin
INF-γ	Interferon γ
iPS	induced pluripotent stem cell
kg	Kilogramm
Ku70	Protein, welches für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen benötigt wird
Ku80	Protein, welches für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen benötigt wird; bildet mit Ku70 das sog. Ku heterodimer
l	Liter
LFA	lymphocyte function-associated antigen
LIN	lineage marker
LMA	low melting agarose
LT-HSC	long-term hematopoietic stem cell
LTR	long term repopulating
mA	milli Ampere
MDM2	mouse double minute 2
MEM	α-minimal essential serum
MEP	megacaryocyte erythroid progenitor

min	Minuten
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mMSC	mouse mesenchymal stem cell
MNC	mononuclear cell
MPC	mesodermal progenitor cell; multipotent progenitor cell
MSC	mesenchymal stem cell
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NHEJ	non-homologous end-joining
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NMA	normal melting agarose
NOD/SCID	non obese diabetic/severe combined immunodeficient
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂ ⁻	Hyperoxid-Anion
p16	Zyclin-abhängiger Kinase Inhibitor 2A
p21	Zyclin-abhängiger Kinase Inhibitor 1
p27	Zyclin-abhängiger Kinase Inhibitor 1B
p53	Protein, welches den Zellzyklus blockiert und die Apoptose einleitet
PCAM	platelet cell adhesion molecule
PCD	programmed cell death
PD	population doublings
PE	Phycoerythrin
PI	Probidiumjodid
RNA	Ribonukleinsäure
rOS	reactive oxygen species
rpm	revolutions per minute
SCA	stem cell antigen

SCF	stem cell factor
SDF-1	stromal cell-derived factor-1
SDS	sodium dodecyl
SH	src homology domain
Src	sarcoma
ST-HSC	short-term hematopoietic stem cell
SLAM	signaling lymphocyte activation molecule
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
Thy-1	thymocyte differentiation antigen 1
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
TPO	Thrombopoietin
V	Volt
VCAM	vascular cell adhesion molecule
W	Watt
XRCC4	X-ray repair complementing defective repair in chinese hamster cells 4

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stammzellen sind zur Selbst-erneuerung und Differenzierung.....	2
Abbildung 2: von einer totipotenter Zygote zur multipotenten Stammzelle	3
Abbildung 3: Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen.....	5
Abbildung 4: Differenzierung der hämatopoietischen Stammzelle	7
Abbildung 5: Isolation mononukleärer Zellen.....	10
Abbildung 6: : MSCs unter dem Auflichtmikroskop.....	12
Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopie nach durchgeführtem Comet-Assay.....	14
Abbildung 8: Vorbereitung der Objektträger für den Comet-Assay.....	16
Abbildung 9: Beurteilung der DNA-Schäden mit dem Comet-Assay	18
Abbildung 10: Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen	23
Abbildung 11: Comet-Scores der einzelnen Passagen	24
Abbildung 12: Auswertung des Comet-Assays.....	25
Abbildung 13: Comet-Scores der Kultur „03.21.18“	26
Abbildung 14: Auswertung der durchflusszytometrischen Untersuchung	27
Abbildung 15: Dotplot der Kultur „16.01.01“	28
Abbildung 16: Auswertung der Kultur „03.21.18“	28
Abbildung 17: Lichtmikroskopie der MSC-Kultur „16.01.01“	30
Abbildung 18: Ursachen der Apoptose	31
Abbildung 19: spontane Veränderungen der DNA	33
Abbildung 20: stark vereinfachte Darstellung der Apoptose	35
Abbildung 21: Precoating beim Comet-Assay	39

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswahl verschiedener Marker mesenchymaler Stammzellen.....	5
Tabelle 2: mittels Durchflusszytometer untersuchte CD-Marker.....	13
Tabelle 3: Berechnung des Comet-Scores.....	18
Tabelle 4: klinische Einteilung der GVHD.....	42

1 Einleitung

1.1 Fragestellung

Viele Erkrankungen lassen sich heute durch eine Transplantation hämatopoietischer Stammzellen (HSCT) therapieren. Neben genetisch bedingten Immunschwächen (Ataxia Telangiektasia, Wiskott-Aldrich Syndrom) können so auch Erkrankungen der roten Zellreihe (Thalassämie, Sichelzellanämie) und maligne Erkrankungen wie Leukämien und Lymphome behandelt werden [1].

Vor der Transplantation wird der Patient zunächst einer myeloablativen Therapie zugeführt. Durch eine hochdosierte Strahlen-, bzw. Chemotherapie werden alle hämatopoietischen Zellen im Knochenmark des Patienten zerstört. Nun können die gespendeten Stammzellen das Knochenmark neu besiedeln. Diesen Vorgang bezeichnet man als „Engraftment“. Durch Vermehrung und Differenzierung entstehen aus etwa $3 - 10 \times 10^6$ transplantierte Zellen pro Kilogramm Körpergewicht sämtliche Zellreihen des Blutes. Die Auswirkung der massiven Proliferation auf die Alterung der Stammzellen ist noch wenig erforscht. Vor allem bei einem großen Altersunterschied zwischen Spender und Empfänger, zum Beispiel wenn Erwachsene ihre Zellen für Kinder spenden, könnte sich im Laufe der Jahre ein proliferativer oder funktioneller Defekt für die transplantierten Zellen ergeben. Um dies besser einschätzen zu können, werden Alterungsprozesse von hämatopoietischen (HSC) und mesenchymalen Stammzellen (MSC) in einem Langzeitkultur- und Expansionsmodell erforscht. In dem Projekt arbeiten die Klinische Abteilung für Hämato-Onkologie aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde und das Institut für Pathophysiologie zusammen.

Diese Diplomarbeit beschäftigt sich speziell mit der Alterung mesenchymaler Stammzellen. Anhand der Erfassung von DNA-Schäden und Apoptosevorgängen soll ermittelt werden, ob und in welchem Ausmaß MSCs *in vitro* einem Alterungsprozess unterliegen. Dazu werden die Stammzellen so lange wie möglich kultiviert und vermehrt. Wöchentlich werden diese Parameter dann experimentell bestimmt.

1.2 Eigenschaften und Funktionen von Stammzellen

Stammzellen haben zwei wesentlichen Eigenschaften (s. Abb. 1). Sie sind einmal durch eine symmetrische Teilung in der Lage, zwei identische Tochterzellen mit erhaltenen Eigenschaften einer Stammzelle zu erzeugen („self-renewal“). Außerdem können sie sich durch asymmetrische Zellteilungen in verschiedene Zelltypen und Gewebe differenzieren. So kann der Organismus stetig neue Zellen produzieren, welche geschädigte oder abgestorbene Zellen ersetzen und die Regeneration von Gewebe und Zelllinien ermöglichen [2].

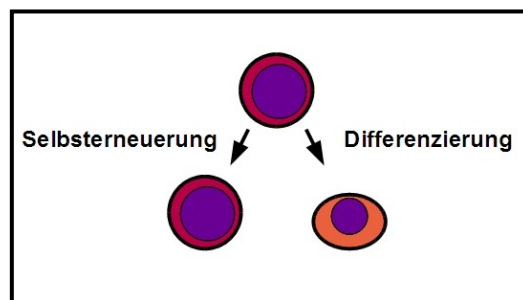


Abbildung 1: Stammzellen sind zur Selbst-erneuerung und Differenzierung fähig.

Man unterscheidet zwischen toti-, pluri-, und multipotenten Stammzellen (s. Abb. 2). Aus totipotenten Zellen kann sich ein kompletter lebensfähiger Organismus entwickeln, der aus embryonalem und extraembryonalem Gewebe besteht. Ein Beispiel hierfür ist eine befruchtete Eizelle (Zygote). Im Rahmen der Furchung entwickelt sich aus ihr eine Blastozyste, welche aus einer inneren Zellmasse (Embryoblast) und einer äußeren Zellmasse (Trophoblast) besteht.

Die Zellen des Embryoblasten sind ein Beispiel für pluripotente Stammzellen. Sie sind in der Lage, sich in alle Zelltypen der drei Keimblätter (Entoderm, Mesoderm und Ektoderm) zu differenzieren. Ihre Totipotenz haben sie allerdings verloren, da sie kein extraembryonales Gewebe (z.B. Plazenta) mehr bilden können. Multipotente Stammzellen sind in ihrer Entwicklungsvielfalt noch eingeschränkter. Beispiele hierfür sind die hämatopoietische Stammzelle, aus der sich nur noch Zellen des Blut- und Immunsystems herleiten, und die mesenchymale Stammzelle, welche sich in mesenchymales Gewebe wie Fett, Knorpel oder Knochen differenzieren kann [1–3].

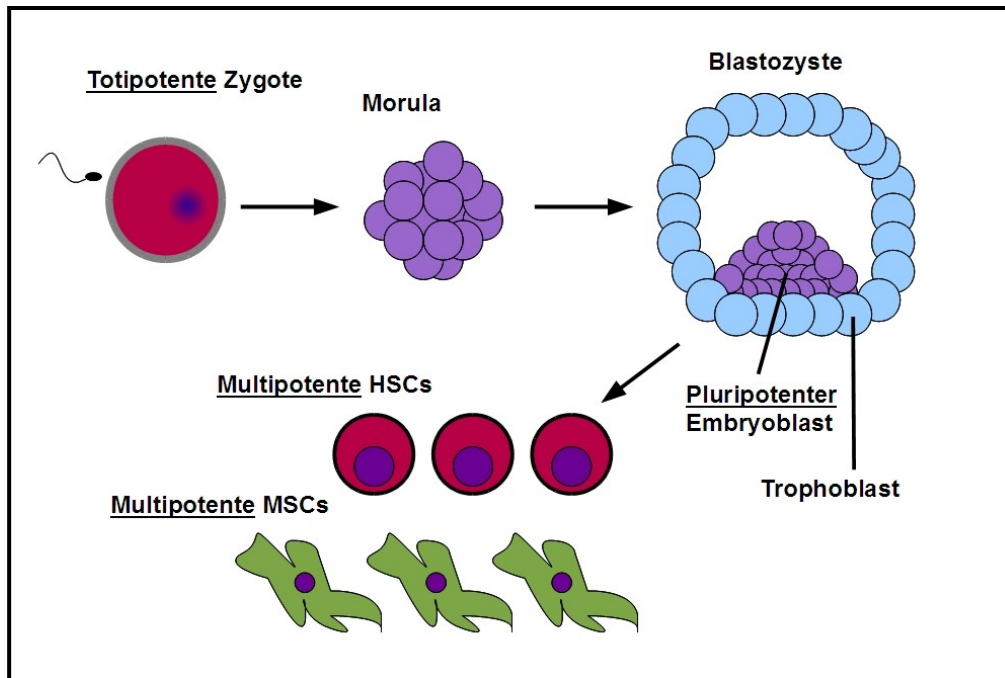


Abbildung 2: von einer totipotenten Zygote zur multipotenten Stammzelle; aus einer befruchteten Eizelle entstehen zunächst die pluripotenten Stammzellen des Embryoblasten und der Trophoblast. Aus dem Embryoblasten gehen multipotente Stammzellen hervor; aus dem Trophoblasten die Plazenta.

Mittlerweile ist es durch retrovirale Transduktion von Transkriptionsfaktoren *in vitro* sogar möglich, aus differenzierten Zellen pluripotente Stammzellen zu generieren: sog. „induced pluripotent stem cells“ (iPS) [4, 5]. Dadurch könnten in Zukunft die Verwendung von humanen embryonalen Stammzellen zur Forschung und die damit verbundene ethische und gesetzliche Kontroversen vermieden werden.

1.3 Mesenchymale Stammzellen

1.3.1 Geschichte

Der deutsche Pathologe Julius Friedrich Cohnheim zeigte 1867 in seinen Versuchen, dass zur Wundheilung Zellen nach dem Prinzip der Diapedese aus dem Blutstrom in das Wundgewebe einwandern [6]. Neben Entzündungszellen waren auch Zellen mit fibroblastenartiger Morphologie in dem Wundgewebe zu finden, welche zu Wundheilung beizutragen schienen.

Friedenstein kultivierte dann in den 70ern des letzten Jahrhunderts Knochenmarkszellen und entfernte die nicht am Plastik der Kulturgefäße

adhärenten Zellen. Die Zellen mit der stärksten Adhärenz waren in ihrer Morphologie spindelförmig. Nach einiger Zeit bildeten sie sogar Kolonien, welche kleinen Ablagerungen von Knochen und Knorpel ähnelten [7, 8].

Aus den Versuchen von Cohnheim und Friedenstein stammt die Erkenntnis, dass im Knochenmark multipotente Zellen existieren, die sich *in vitro* zu verschiedenen Zelltypen wie Osteoblasten, Chondroblasten, Adipozyten und Myozyten differenzieren können [9, 10]. Da sich all diese Gewebe aus dem embryonalen Mesenchym entwickeln, schlug Caplan 1994 für diese Zellen den Namen „Mesenchymale Stammzelle“ (engl.: mesenchymal stem cell, MSC) vor [11]. Mittlerweile ist es sogar möglich, *in vitro* eine Differenzierung in nicht vom Mesoderm abstammende Zellen wie Neuronen, Schwann-Zellen, oder Hepatozyten zu induzieren, was die Richtigkeit der Bezeichnung „mesenchymale Stammzelle“ in Frage stellt [12, 13]. Angesichts der uneinheitlichen Namensgebung in wissenschaftlichen Arbeiten, wie zum Beispiel MSCs (mesenchymal stem cells) [11], MPCs (mesodermal progenitor cells) [14], oder CFU-F (colony-forming unit fibroblast) [15] und den stark variierenden biologischen Eigenschaften wurde von der International Society for Cellular Therapie (ISCT) im Jahr 2005 schließlich „multipotente mesenchymale Stromazelle“ (engl.: multipotent mesenchymal stromal cell, MSC) als Bezeichnung vorgeschlagen [16].

1.3.2 Merkmale mesenchymaler Stammzellen

Neben der Fähigkeit in verschiedene Gewebe differenzieren zu können, weisen mesenchymale Stammzellen noch weitere Merkmale auf (s. Abb 3). Außerdem exprimieren mesenchymale Stammzellen eine Vielzahl verschiedener Oberflächenantigene (s. Tab 1) [9, 17–26].

Nach Boiret et al. sind CD73 und CD49a nach ein bis drei Tagen in Kultur die am häufigsten exprimierten Antigene [24]. Bis heute ist allerdings kein Marker gefunden worden, welcher spezifisch für diese Zellen ist [27].

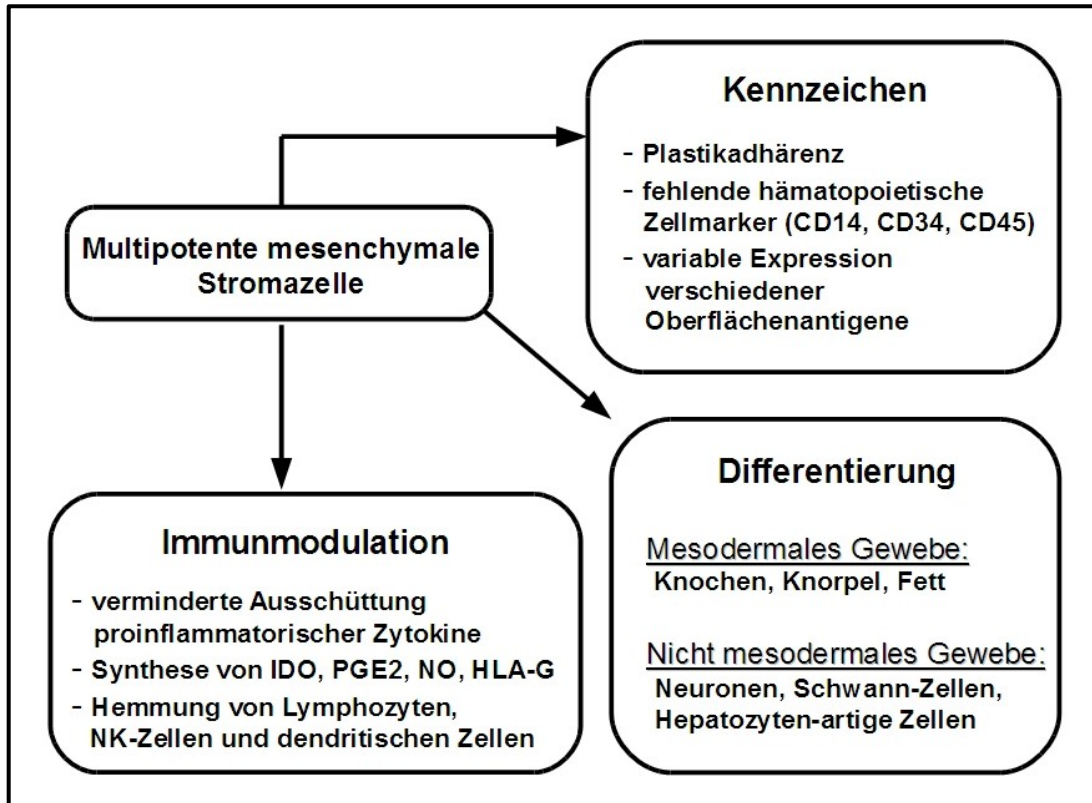


Abbildung 3: Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen; neben der Fähigkeit in verschiedene Gewebe differenzieren zu können, zeichnen MSCs eine immunmodulatorische Wirkung und das Vorhandensein bestimmter Antigene aus; CD, cluster of differentiation; IDO, Indolamin-2,3-Dioxygenase; PGE2, Prostaglandin E₂; NO, Stickstoffmonoxid; HLA-G, human leukocyte antigen-G.

	Positiv	Negativ
Cluster of Differentiation (CD)	CD44, CD29, CD71, CD73 (SH3/4), CD90 (Thy-1), CD105 (SH2), STRO-1	CD14, CD34, CD45 CD19, CD79a, Makrophage-1 Antigen (CD11b/CD18)
Kostimulierende Moleküle	-	CD40, CD80, CD86
Adhäsionsmoleküle	VCAM-1(CD106), ALCAM (CD166), ICAM1, ICAM2, LFA-3, Integrin-Untereinheiten CD49a und CD49e	LFA-1 (CD11a/CD18), PCAM-1 (CD31), Integrin-Untereinheit CD49d
Chemokinrezeptoren	CXCR1, CXCR2, CXCR4, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR7, CCR9	-
Major Histocompatibility Complex (MHC)	MHC I	MHC II

Tabelle 1: Auswahl verschiedener Marker mesenchymaler Stammzellen; VCAM, vascular cell adhesion molecule ALCAM, activated leukocyte cell adhesion molecule; ICAM, inter-cellular adhesion molecule; LFA, lymphocyte function-associated antigen; PCAM, platelet cell adhesion molecule; CXCR, CXC chemokine receptor; CCR, C-C chemokine receptor.

Da die Eigenschaften von MSCs in verschiedenen Kulturen voneinander abweichen können [28, 29], wurden 2006 von der ISCT drei Kriterien veröffentlicht, nach welchen multipotente mesenchymale Stromazellen definiert sind [30]:

- Plastikadhärenz unter standardisierten Kulturbedingungen
- Die MSC Population muss positiv sein für CD105, CD73, CD90 ($\geq 95\%$)
- Differenzierung *in vitro* zu: Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten

Die wesentliche Quelle zur Gewinnung von MSCs ist das Knochenmark. Jedoch können diese Stammzellen auch aus anderen Geweben wie zum Beispiel dem Fettgewebe [31], dem Periost [32], der Stimmlippe [33], Zahngewebe [34], der Nabelschnur [35], fetalem Gewebe (Leber, Lunge) [36] und aus dem peripheren Blut [37] isoliert werden. In der Tat deutet mittlerweile vieles darauf hin, dass sich Zellen mit den Merkmalen mesenchymaler Stammzellen in unterschiedlich großer Zahl aus fast jedem Organ und Gewebe isolieren lassen [9, 38].

1.4 Hämatopoietische Stammzellen

1.4.1 Subpopulationen und Eigenschaften

Hämatopoietische Stammzellen (HSCs) sind der Ursprung aller Zellen des Blutes und des Immunsystems. Sie finden sich primär im Knochenmark, bilden dort jedoch kein einheitliches Kompartiment. Es gibt mehrere Subpopulationen, welche in ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung, ihrem Differenzierungsverhalten, dem Reifegrad und der Kinetik nach Retransplantation sehr verschieden sind (s. Abb. 4).

Eine wichtige Unterscheidung ist die zwischen LT-HSCs (long-term repopulating hematopoietic stem cells) und ST-HSCs (short-term repopulating hematopoietic stem cells). LT-HSCs neigen stark zur symmetrischen Teilung (self-renewal) und sind deshalb für die langfristige Bildung der hämatopoietischen Zelllinien nach einer Transplantation wichtig. Sie sind in der Lage, nach der Transplantation in einen myeloablatierten Empfänger das hämatopoietische System nachhaltig wieder herzustellen (LTR, long-term repopulating activity) [2, 39].

ST-HSCs hingegen produzieren schnell und effizient Progenitorzellen, was vor allem in den ersten Wochen nach einer HSCT wichtig ist [2, 40, 41].

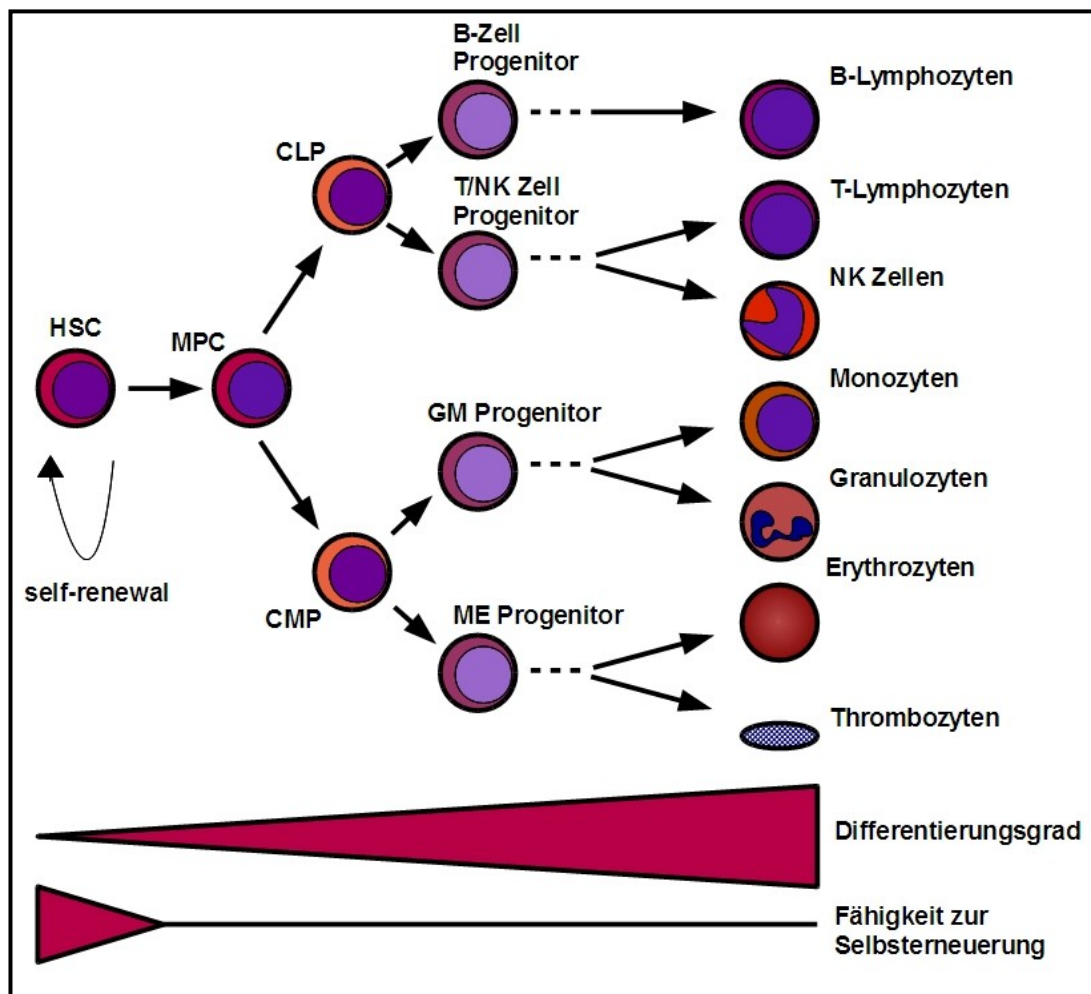


Abbildung 4: Differenzierung der hämatopoietischen Stammzelle; Mit zunehmendem Reifegrad können sich oligopotente Progenitorzellen nur noch zu bestimmten Zellen entwickeln. Je unreifer die Zellen sind, desto eher sind sie zur Selbsterneuerung fähig. HSC, hematopoietic stem cell; MPC, multipotent progenitor cell; CLP, common lymphoid progenitor; CMP, common myeloid progenitor; GM Progenitor, granulocyte/monocyte progenitor; ME Progenitor, megacaryocyte/erythroid progenitor.

Aus den Progenitorzellen der myeloischen Reihe (CMP, common myeloid progenitors) entwickeln sich schließlich alle myeloischen und erythroiden Zellen; aus den Progenitorzellen der lymphatischen Reihe (CLP, common lymphoid progenitors) alle lymphatischen Zellen. Die Progenitorzellen bilden in der Zellkultur Kolonien, wodurch die Begriffe BFU (burst forming unit) und CFU (colony forming unit) entstanden sind [42, 43]. Je weiter jedoch die Entwicklung von Progenitorzellen zu ausdifferenzierten Zellen heranschreitet, desto mehr geht das Potential verloren in unterschiedliche Zelltypen differenzieren zu können, und desto festgelegter ist ihre Weiterentwicklung.

Anhand des Verhältnisses von lymphatischen zu myeloischen Nachkommen einer hämatopoietischen Stammzelle kann man außerdem drei Klassen unterscheiden: balancierte, myeloisch-dominante und lymphatisch-dominante HSCs [44, 45].

Charakteristisch für HSCs ist die Expression von SCA1 (stem cell antigen 1), KIT (CD117, Rezeptor des stem cell factor) und das fehlen von Markern welche von reifen Zellen exprimiert werden (lineage markers, LIN): sog. LSK-HSCs. Neben KIT und SCA1 gilt vor allem die Expression von CD34 als wesentliches Merkmal von HSCs. Mittlerweile wurde aber auch eine Subpopulation CD34 negativer HSCs beschrieben. Diese Zellen scheinen jedoch wenig zu proliferieren, und können zu CD34 positiven HSCs aktiviert werden [46]. Neben CD34 sind die Zellen ebenfalls positiv für CD45, CD59, CD133, Thy1/CD90, c-kit/ CD117, und negativ bzw. nur schwach positiv für CD38. Es gibt jedoch Unterschiede zwischen einzelnen Spezies. So exprimieren aus dem Knochenmark von Mäusen isolierte HSCs CD38, sie sind aber nur schwach positiv für CD34 [47]. Aufgrund der unterschiedlichen Expression von Rezeptoren aus der SLAM (signaling lymphocyte activation molecule) Familie wie CD150, CD244 und CD48, ist es auch möglich zwischen primitiven HSCs und anderen Progenitorzellen zu unterscheiden [48, 49].

1.4.2 Expansion hämatopoietischer Stammzellen *in vitro*

Hämatopoietische Stammzellen können aus dem Knochenmark, aus Nabelschnurblut, oder nach der Mobilisierung mit G-CSF (granulocyte colony-stimulating-factor) aus dem peripheren Blut gewonnen werden [50]. Es ist jedoch *in vitro* schwierig, den primitiven Zustand der HSCs zu erhalten und eine Ausdifferenzierung der Zellen zu verhindern [51]. Deswegen ist die Zugabe von Zytokinen und anderer Faktoren wie SCF (stem cell factor), TPO (Thrombopoietin), FLT3-L (fetal liver tyrosine kinase-3 ligand), und Interleukinen (IL-3, IL-6) notwendig [52, 53]. Auch eine Simulierung der Stammzellnische durch Kokulturen mit Osteoblasten, sinusoidalen Endothelzellen oder MSCs kann die *ex vivo* Expansion von HSCs verbessern [50, 54–57].

2 Material und Methoden

Aus dem Knochenmark-Punktat von insgesamt 7 Personen wurden nach deren Zustimmung mesenchymale Stammzellen isoliert und *ex vivo* expandiert. Die Knochenmarkspunktionen wurden gemäß approbierten Studienprotokollen durchgeführt. Für dieses Projekt wurden mit dem Einverständnis der Eltern geringe Mengen Knochenmarksmaterial aus den Abnahmeinstrumentarien entnommen, das sonst verworfen wäre. Die einzelnen Zellkulturen wurden mit „01.12.20“, „07.19.15“, „16.01.01“, „19.03.08“, „11.15.12“, „01.09.07“ und „03.21.18“ gekennzeichnet. Da andere Zellen wie ebenfalls plastikadhärente Endothelzellen und Zellen der hämatopoietischen Reihe die Kultur in den ersten Passagen verunreinigen können [58], wurde erst ab der dritten Passage mit den Messungen begonnen. Im Rahmen der wöchentlichen Passage wurden 2×10^6 Zellen aus dem Medium entnommen und gleichmäßig in zwei Reagenzgefäße aufgeteilt. Von diesen wurden 5×10^5 Zellen für den Comet-Assay verwendet.

Die restlichen Zellen wurden bei -80°C eingefroren und gelagert. Dafür wurden unter sterilen Bedingungen 1 ml Medium mit 1×10^6 bzw. 0,5 ml Medium mit 5×10^5 Zellen in jeweils ein Cryo-Gefäß pipettiert und als Lösungsmittel 100 bzw. 50 μl 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) dazugegeben. Dabei muss darauf geachtet werden, dass das Medium mit den enthaltenen Zellen nicht zu schnell gefriert, da sich sonst Eiskristalle in den Zellen bilden könnten und diese dadurch zugrunde gehen. Die Cryo-Gefäße wurden deshalb mit Schaumstoff umhüllt, und dann in einer Styroporbox in den Gefrierschrank gestellt. Durch diese Isolierung konnte eine möglichst langsame Abkühlung erreicht werden.

2.1 Isolation mononukleärer Zellen aus venösem Blut

In Vorversuchen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation mononukleäre Zellen (MNCs) aus dem peripheren Blut isoliert. Dazu wurden zunächst 8 ml Blut von Frau Univ.-Ass.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ I. Stelzer (Zweitbetreuerin) aus einer peripheren Vene abgenommen. Unter sterilen Bedingungen wurde das Blut dann in ein 50 ml großes Falcon Reagenzgefäß pipettiert und zusätzlich 8 ml CMF-PBS Puffer dazugegeben.

In ein zweites Reagenzgefäß wurden 8 ml einer Ficoll-Lösung gegeben. Die 16 ml des Blut/CMF-PBS Gemisches wurden nun langsam auf das Ficoll pipettiert. Diesen Vorgang nennt man „Schichtung“.

Dabei sollte darauf geachtet werden, dass sich das Ficoll nicht mit dem Blut und dem Puffer vermischt, sondern zwei Schichten entstehen. Unten eine Ficoll-Schicht und darüber das Blut/CMF-PBS Gemisch. Das Reagenzgefäß enthält nun Blut, CMF-PBS Puffer und Ficoll in einem Verhältnis von 1:1:1 (s. Abb. 5).

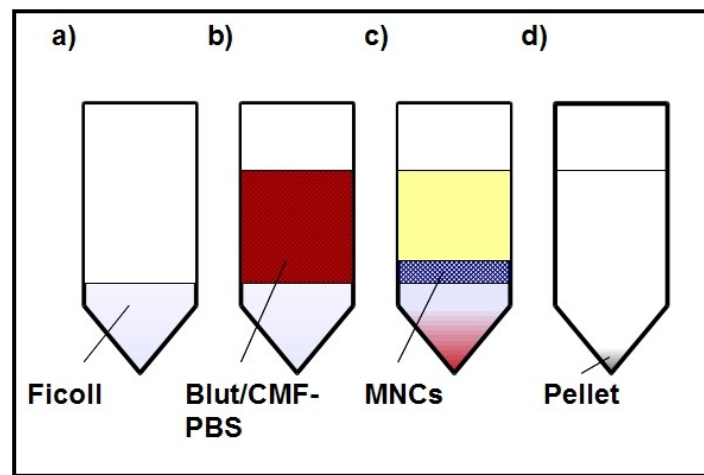


Abbildung 5: Isolation mononukleärer Zellen; a) Falcon-Gefäß mit 8 ml Ficoll; b) Blut/CMF-PBS auf Ficoll geschichtet; c) nach Dichtegradientenzentrifugation: untere Schicht mit Erythrozyten und Granulozyten, darüber MNCs und Serum; d) Zellpellet in CMF-PBS nach zweiter Zentrifugation.

Das Falcon-Gefäß wurde darauf bei 25° C für 30 min und 1400 rpm zentrifugiert. Bei dieser Dichtegradientenzentrifugation wird jede Zelle mit einer Dichte > 1077ρ, (Erythrozyten und Granulozyten) durch die Ficoll-Schicht nach unten gedrückt. MNCs wie Monozyten oder Lymphozyten mit einer Dichte < 1077 ρ gehen jedoch nicht durch das Ficoll hindurch, und bilden auf diesem eine eigene Schicht. Unter sterilen Bedingungen wurden die MNCs dann mit einer Pasteurpipette abgesaugt, in ein weiteres 50 ml Falcon pipettiert und 30 ml CMF-PBS Puffer dazugegeben.

Bei 10° C und 1380 rpm wurden die Zellen daraufhin für 10 min ein weiteres Mal zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bildete sich ein sog. Zell-Pellet an der Spitze des Reagenzgefäßes. Der Puffer wurde danach abgehoben, und die Zellen im Anschluß mit 1 ml CMF-PBS Puffer resuspendiert.

Hier sollte möglichst darauf geachtet werden langsam zu resuspendieren, um eine Aufschäumung der Zellsuspension zu vermeiden.

Mit einem Casy[®] Zellzähler wurden die MNCs dann gezählt. Dazu wurden 10 µl aus dem Reagenzgefäß in 10 ml Casyton-Lösung pipettiert und 2 Tropfen Zap-Oglobin hinzugegeben. Durch das Zap-Oglobin wurden in der Zellsuspension noch enthaltene Erythrozyten lysiert. Die Zellzählung erfolgte schließlich durch das Gerät automatisch.

2.2 Kultivierung und Passagierung der mesenchymalen Stammzellen

2.2.1 Isolierung und Primäransatz

Die mesenchymalen Stammzellen wurden durch eine Überschichtung mit Ficoll isoliert (s.o.). Die folgenden Mengenangaben stammen von der Zellkultur „11.15.12“. Die angewandte Methodik ist jedoch bei allen Zellansätzen gleich.

Um die mononukleären Zellen aus dem Punktat isolieren zu können wurden zunächst 2,25 ml heparinisiertes Knochenmark mit 5 ml PBS-Puffer verdünnt. In der Schicht der MNCs sind ebenfalls mesenchymale Stammzellen enthalten. Anschließend wurden die MNCs abpipettiert und nach einem Waschschrift mit 2,5 ml α -minimun essential medium (MEM)/10% fetal calf serum (FCS) resuspendiert. Die genaue Anzahl der Zellen wurde mikroskopisch mittels einer Zählkammer festgestellt. Bei „11.15.12“ waren dies zum Beispiel $1,4 \times 10^7$ Zellen/ml.

Es wurden 2 ml Zellsuspension in die Kulturflasche (225 cm²) überführt und die Zellen darauf mit 50 ml α -MEM/10% FCS verdünnt. Insgesamt waren also $2,8 \times 10^7$ Zellen in der 225 cm² Kulturflasche mit einer Dichte von $1,2 \times 10^5$ Zellen/cm² enthalten.

2.2.2 Passagierung

Die Passagierung der Stammzellen wurde jede Woche durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen mikroskopisch betrachtet und mittels Photos dokumentiert (s. Abb.6).

Aus dem Kulturgefäß wurde dann der Überstand mit den enthaltenen Zellen entfernt und die verbliebenen adhären Zellen mit 2×25 ml PBS-Puffer gewaschen. Um die Haftungsproteine der Zellen aufzulösen, wurden 5 ml einer Mischung aus EDTA und 0,5%igem Trypsin dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von ca. 15 Minuten bei 37° C konnte unter dem Mikroskop kontrolliert werden, ob sich die Zellen abgelöst hatten.

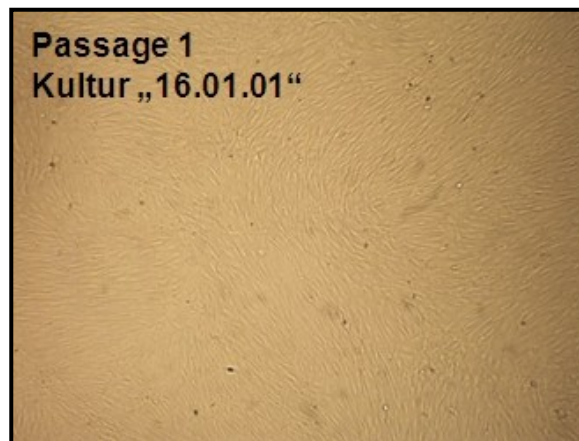


Abbildung 6: : MSCs unter dem Auflichtmikroskop (200-fache Vergrößerung).

Anschließend wurden 20 ml α -MEM/10% FCS in die Kulturflasche gegeben und die Zellen mit einer 10 ml Stripette durch mehrmaliges Pipettieren und Schaben abgelöst. Die Zellsuspension wurde nun in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt und die noch in der Kulturflasche verbliebenen Zellen durch die Zugabe von weiteren 10 ml α -MEM/10% FCS ebenfalls abgelöst und in das Falcon gegeben.

Bei 20° C und 1000 rpm wurde das Falcon-Gefäß dann zentrifugiert um die Zellen vom Medium zu trennen. Nachdem der Überstand abgehoben wurde, wurde das Zell-Pellet mit 10 ml α -MEM/10% FCS resuspendiert. Die Zellen wurden dann mit dem Casy-Zellzähler gezählt. Aus dem Falcon Gefäß wurden zwei mal je 1×10^6 Zellen für die einzelnen Versuche in ein Eppendorf-Gefäß gegeben. 1×10^5 Zellen wurden für eine durchflusszytometrische Messung verwendet.

Dabei wurden die Zellen auf das Vorhandensein hämatopoietischer Oberflächenrezeptoren untersucht um eine reine MSC-Kultur sicherzustellen (s. Tab. 2).

FITC	CD8	CD2	CD14	CD15
PE	CD4	CD56	CD22	CD30
ECD	CD45	-	-	-
PE5	CD19	CD7	HLA-DR	CD13
PECy7	CD3	CD19	CD34	-

Tabelle 2: mittels Durchflusszytometer untersuchte CD-Marker; so konnte eine reine MSC-Kultur sichergestellt werden. Die linke Spalte zeigt die verwendeten Fluoreszenzmoleküle: FITC, Fluoreszein-Isothiocyanat; PE, Phycoerythrin; ECD, phycoerythrin-Texas Red conjugate; PECy7, Phycoerythrin-Cy7.

Zur weiteren Passage wurden je nach gemessener Zellzahl mehrere ml der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche überführt. Zielvolumen waren 5×10^6 Zellen pro Flasche. Die Zellsuspension wurde darauf hin mit weiteren 50 ml α -MEM/10% FCS verdünnt und die Kulturflasche bis zur nächsten Passage bei 37° C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.3 Alkalischer Comet-Assay

Der Comet-Assay wurde 1984 von Ostling und Johanson eingeführt um DNA-Schäden in einzelnen Zellen erfassen zu können. Er wurde zunächst mit neutralen Puffern durchgeführt. So konnten allerdings nur Doppelstrangbrüche der DNA festgestellt werden. Die Methodik wurde deswegen von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander weiterentwickelt [59]. Im Gegensatz zur ursprünglichen Form weisen der Lysis- und der Elektrophorese-Puffer hier einen alkalischen pH-Wert auf, weshalb die Methodik auch „alkalischer Comet-Assay“ genannt wird. Da sich die DNA im alkalischen Milieu entwinden kann, können neben Doppel-, auch Einzelstrangbrüche der DNA festgestellt werden. Die Zellen werden zunächst auf einem Objektträger in Agarosegel eingebettet und lysiert.

Nach deren Lyse werden die Objektträger in eine Elektrophoresekammer gegeben und die Zellen einem elektrischen Feld ausgesetzt. Negativ geladene DNA Bruchstücke wandern zum Pluspol und legen je nach Größe eine bestimmte Strecke zurück. Je kleiner die Bruchstücke sind, desto weiter ist die zurückgelegte Strecke. Chromosomale DNA ist hingegen zu groß um aus dem Zellkern herauszuwandern. Nach der Färbung mit DNA-affinen Farbstoffen wie Ethidiumbromid (EtBr) oder 4',6 Diamidino-2-Phenylindole (DAPI), können die Objektträger unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Die geschädigten Zellen bilden „Kometen“ aus, wobei der Zellkern den Kopf, und die DNA-Fragmente den Schweif des Kometen bilden (s. Abb. 7).

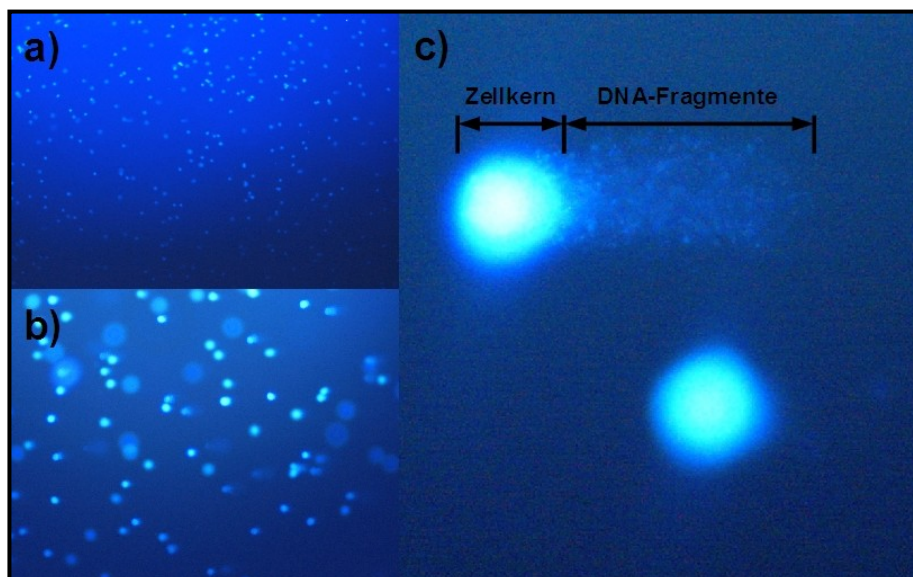


Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopie nach durchgeführtem Comet-Assay (DAPI-Färbung); a) 40-fache Vergrößerung: typischer „Sternenhimmel“ des Comet-Assays; b) 100-fache Vergrößerung: es lassen sich bereits Kometen erkennen; c) 200-fache Vergrößerung: der Zellkern bildet den Kopf des Kometen, die DNA-Fragmente den Kometenschweif.

Der hier verwendete Comet-Assay wurde durch zwei zusätzliche Arbeitsschritte weiter verbessert: Damit das Agarosegel besser an den Objektträger haftet und am Ende des Versuches nicht abschwimmen kann, wurden die Objektträger in einem zusätzlichen Schritt mit flüssiger „normal melting Agarose“ (NMA) vorbehandelt (precoating). Außerdem konnte die Zelldichte auf den Objektträgern erhöht und damit die Auswertung der Objektträger erleichtert werden, indem mittels eines vorbehandelten Deckglases eine Vertiefung im Agarosegel erzeugt wurde, in welche die Zellen dann pipettiert werden konnten.

a) Zellvorbereitung

Aus einem Reaktionsgefäß mit 1×10^6 Zellen in 1 ml Medium wurden unter sterilen Bedingungen 500 µl entnommen und ein separates Reaktionsgefäß pipetiert. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei Raumtemperatur und 1600 rpm wurde das Medium abpipetiert, und das Zellpellet mit 100 µl CMF-Puffer resuspendiert. Pro Objektträger wurden jeweils 5 µl von dieser Zellsuspension mit 5 µl CMF-Puffer gemischt und in ein separates Reagenzgefäß gegeben. Damit ergab sich eine Zellzahl von 25.000 pro Objektträger.

b) Vorbereitung der Objektträger

Das „low melting Agarose“ (LMA) enthaltende Reagenzgefäß wurde auf einer Heizplatte in einem Becherglas mit Wasser erhitzt und so die LMA verflüssigt. Die flüssige LMA konnte dann in einem Wasserbad konstant auf 37° C gehalten werden. Das Becherglas mit der enthaltenen Normal Melting Agarose (NMA) wurde ebenfalls auf einer Heizplatte bei 350° C verflüssigt.

- Precoating: Dieser Schritt beschreibt die erste Verbesserung des Comet-Assays. Die Objektträger wurden zunächst in die vorher erhitzte NMA getaucht, an der Unterseite mit Zellstoff abgewischt und auf eine 100° C heiße Heizplatte gelegt. Nach ca. 5 - 10 min war die Agarose auf den Objektträgern getrocknet. Durch diesen Schritt blieb das Agarosegel viel besser am Objektträger haften.
- Coating: Es wurden je 500 µl von der flüssigen NMA auf die Objektträger pipetiert und diese mit einem vorbereiteten Deckglas versehen.

Dies ist die zweite Modifikation des Comet-Assays. Auf ein 24 × 60 mm großes Deckglas wurde mit einem Tropfen NMA ein kleineres, 20 × 20 mm messendes Deckglas fixiert. Die Deckgläser wurden mit dem fixierten kleineren Deckglas nach unten auf die Objektträger gebracht. Hier musste darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen unter dem Deckglas entstehen. Die Objektträger wurden dann 10 min luftgetrocknet, bis die NMA erhärtet war.

Durch das kleinere Deckglas ist eine Vertiefung im Agarosegel entstanden, in welche die Zellen direkt pipettiert werden konnten und so auch eine hohe Zelldichte erreicht wurde.

- Zellen auftragen: Die Deckgläser wurden mit einer scharfen Klinge von den Objektträgern gelöst. Dann konnte die in den vorbereiteten Reaktionsgefäßen enthaltene Mischung aus 5 µl Zellsuspension und 5 µl CMF-Puffer mit jeweils 70 µl LMA gemischt, und in die im Agarosegel entstandene Vertiefung pipettiert werden. Im nächsten Schritt wurde ein kleines Deckglas (20 × 20 mm) auf die Objektträger aufgetragen. Hier war ebenfalls darauf zu achten, dass möglichst keine Luftblasen unter den Deckgläsern entstanden. Um die LMA zu erhärten wurden die Objektträger dann für 20 min bei 4° C abgekühlt.
- Fixierung: Die Deckgläser wurden zunächst wieder von den Objektträgern entfernt, und 100 µl LMA auf die Objektträger pipettiert. Nachdem ein weiteres Deckglas (24 × 60 mm) aufgetragen wurde, wurden die Objektträger für weitere 20 min bei 4° C im Kühlschrank gekühlt. Danach war die LMA wieder erhärtet und die Deckgläser konnten mit einer Klinge entfernt werden.

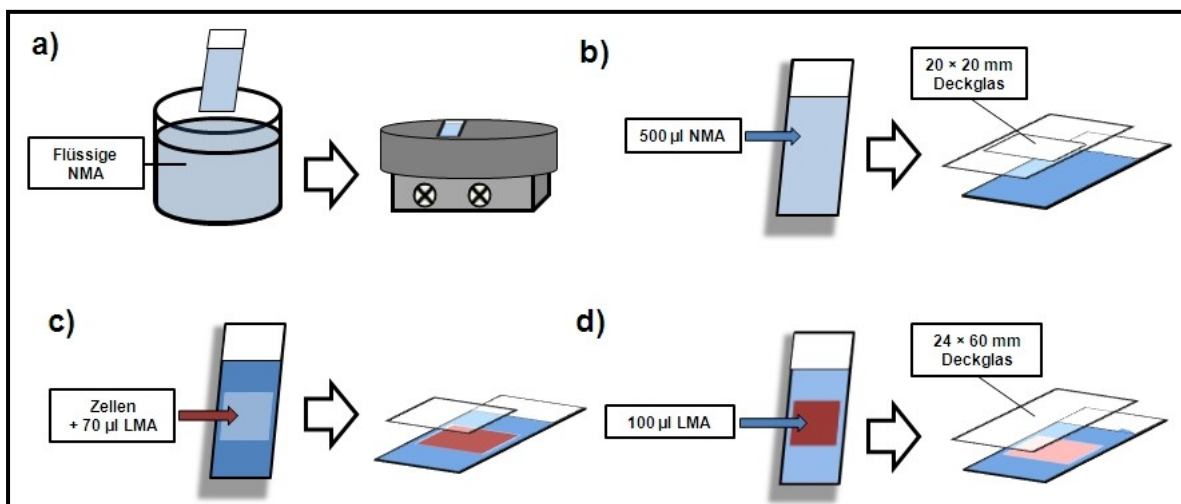


Abbildung 8: Vorbereitung der Objektträger für den Comet-Assay; a) Precoating mit NMA: der Objektträger wird zunächst in die NMA getaucht und dann sofort auf eine 100° C heiße Wärmeplatte gelegt bis die Agarose getrocknet ist; b) Coating mit 500 µl NMA: um eine Vertiefung im Agarosegel herzustellen, wird ein 20 × 20 mm großes Deckglas auf einem 24 × 60 mm großen Deckglas fixiert und dann auf die NMA gegeben; c) die Zellen werden mit 70 µl LMA in die Vertiefung pipettiert. Dadurch kann eine sehr hohe Zelldichte erreicht werden; d) Fixierung mit 100 µl NMA; NMA, normal melting agarose; LMA, low melting agarose.

c) Lyse

Zunächst wurde zu 99 ml Lysis-Puffer 1 ml Triton X gegeben und beides gut miteinander vermischt. Die Objektträger wurden dann in einen geeigneten Behälter wie zum Beispiel eine Farbe-Küvette gestellt und der fertige Lysis-Puffer dazugegeben. Es ist wichtig, dass später das Behältnis mit den Zellen abgedunkelt wird. So kann vermieden werden, dass durch Lichteinstrahlung zusätzliche DNA-Schäden in den Zellen entstehen. Die Zellen wurden dann eine Stunde bei 4° C im Kühlschrank lysiert.

d) Elektrophorese

Die Comet-Elektrophoresekammer ist eine spezielle Kammer, die dem stark alkalischen Elektrophoresepuffer standhält und völlig abgedunkelt ist. Zunächst wurde die Kammer mit dem vorher zubereiteten Elektrophorese-Puffer aufgefüllt, und die Objektträger unter Rotlicht nebeneinander hinein gelegt. Durch das Rotlicht konnten zusätzliche DNA-Schäden vermieden werden. Damit sich die DNA entwinden kann, wurden die Objektträger zunächst für 20 min in dem Elektrophoresispuffer belassen. Danach konnte die Elektrophorese für 20 min bei 20 V, 290 mA und 6 W durchgeführt werden. Wenn die Stromstärke in der Kammer zunächst geringer als 290 mA war, wurde mit einer Pasteurpipette noch so viel Puffer in die Kammer hinzugegeben, bis die erwünschte Stromstärke erreicht war. Allerdings mußte darauf geachtet werden, dass die Spannung nicht unter 20 V absinken konnte. Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger für 10 min in eine mit Neutralisationspuffer gefüllte Wanne gelegt um den alkalischen Elektrophoresepuffer zu neutralisieren.

e) Färbung

Die Färbung der Zellen erfolgte mit den kernaffinen Farbstoffen Ethidiumbromid und DAPI.

- Färbung mit Ethidiumbromid: In einem Reaktionsgefäß wurde 1 µl Ethidiumbromid mit 500 µl Aqua dest. verdünnt. Von dem Gemisch wurden jeweils 100 µl auf die Objektträger pipettiert und für 15 min einwirken

gelassen. Dann wurden die Objektträger einige Male in Aqua dest. getaucht um das überschüssige Ethidiumbromid herunter zu entfernen.

- Färbung mit DAPI: Für jeden zu färbenden Objektträger wurde 1 µl DAPI wird mit 1000 µl Aqua dest. verdünnt. Die Mischung wurde dann auf die Objektträger pipettiert und lichtgeschützt für 20 min belassen. Danach konnten die Objektträger mit Aqua dest. gewaschen werden.

Nachdem vorsichtig ein Deckglas auf die Objektträger gegeben wurde, konnten diese unter einem UV-Mikroskop betrachtet werden.

f) Auszählung

Um die DNA-Schäden in den Zellen erfassen zu können, wurde der sog. Comet-Score ermittelt. Dazu wurden pro Objektträger 3 × 100 Zellen ausgezählt und die Zellen je nach Größe des Kometenschweifes in 5 Gruppen unterteilt (s. Abb. 9).

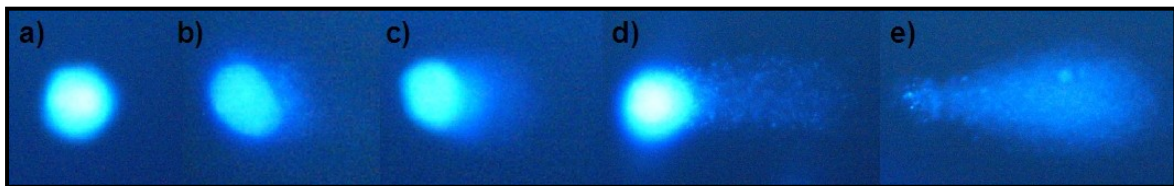


Abbildung 9: Beurteilung der DNA-Schäden mit dem Comet-Assay (DAPI-Färbung) bei 200 facher Vergrößerung; a) C0 b) C1 c) C2 d) C3 e) C4; bei e) ist fast die gesamte DNA aus dem Kern herausgetreten und es entsteht ein sog. "hedgehog comet".

Jeder Gruppe wurde ein Wert zugeordnet, mit dem die Zahl der Zellen in der Gruppe multipliziert wurde. Die Berechnung des Comet-Score ergibt sich aus der Formel $\text{Comet-Score} = \text{Anzahl der Zellen (AZ) aus C0} \times 0 + \text{AZ (C1)} \times 1 + \text{AZ (C2)} \times 2 + \text{AZ (C3)} \times 3 + \text{AZ (C4)} \times 4$ (s. Tab. 3).

Comet	Anzahl	Comet-Score
C0	23	0
C1	50	50
C2	14	28
C3	5	15
C4	8	32
		Gesamt: 125

Tabelle 3: Berechnung des Comet-Scores.

Der Comet-Score drückt damit die Anzahl der Zellen mit DNA-Schäden und das Ausmaß dieser Schäden aus. Es ist ein maximaler Wert von 400 (100 Zellen mit C4) und ein minimaler Wert von 0 (100 Zellen mit C0) möglich. Pro Objektträger wurden 3 mal 100 Zellen ausgezählt und dann ein Mittelwert aus den errechneten Gesamtwerten gebildet.

Für die statistische Auswertung und die Verarbeitung der Messdaten wurde das Program Excel 2010 verwendet.

2.4 Apoptosebestimmung mittels Annexin V und PI

Im frühen Verlauf der Apoptose wird Phosphatidylserin von der Innenseite auf die Aussenseite der eukaryotischen Zellmembran umgelagert. So kann es an bestimmte Rezeptoren von Makrophagen binden, welche die apoptotischen Zellen dann intrazellulär abbauen [60, 61].

Annexin V ist ein Protein, welches Calcium-abhängig an Phospholipide wie Phosphatidylserin bindet [62]. Propidiumjodid (PI) baut sich in die DNA ein, kann jedoch nur durch die Zellmembran von nekrotischen Zellen diffundieren.

Mittels einer Durchflusszytometrie kann man nun über das FITC markierte Annexin V und PI apoptotische Zellen und nekrotische Zellen unterscheiden. Nicht apoptotische Zellen färben sich weder mit PI noch mit Annexin V. Apoptotische Zellen lassen sich nur mit Annexin V anfärben; nekrotische hingegen mit Annexin V und PI.

a) Vorbehandlung der Zellen

Von jeder Passage wurden zwei Eppendorf-Gefäße mit 5×10^5 Zellen in 0,5 ml bzw. 1×10^6 Zellen in 1 ml bei -80°C eingefroren. Die Gefäße mit 1×10^6 Zellen wurden dann gesammelt für diesen Versuch in einem $37,5^\circ \text{C}$ warmen Wasserbad aufgetaut. Bei diesem Schritt galt es zu beachten, dass der Auftauvorgang möglichst rasch durchgeführt wurde, da die Zellen ansonsten geschädigt werden konnten. Unter sterilen Bedingungen wurden die MSCs dann jeweils in ein 50 ml

Falcon-Gefäß überführt und 10 ml CMF-PBS Puffer dazugegeben. Die Falcon-Gefäße wurden dann für 10 min bei 10°C und 1360 rpm zentrifugiert. Danach konnte der Überstand unter sterilen Bedingungen dekantiert werden. In jedes Falcon-Röhrchen wurden nun 500 µl der mit Aqua dest. 1:10 verdünnten Annexin V Puffer-Lösung dazu gegeben.

b) Färbung und Durchflusszytometrie

Zunächst wurde ein neues Falcon-Gefäß mit einem Cell Strainer versehen und die Zellsuspension darauf pipettiert. Der Cell Strainer wirkt als Filter und befreit die Suspension von Zell-Aggregaten. Diese könnten durch eine verstärkte Fluoreszenz das Ergebnis der durchflusszytometrischen Untersuchung verfälschen, oder auch die Saugvorrichtung des Durchflusszytometers verstopfen.

Danach wurden pro Passage zwei FACS®-Röhrchen vorbereitet. Eines für die Kontrollgruppe und eines mit den gefärbten Zellen als Probe. In dieses wurden jeweils 5 µl Annexin V und 5 µl PI pipettiert. Nach kurzer Durchmischung mit einem Vortex wurden dann in beide Röhrchen 100 µl der vorbereiteten MSC-Zellsuspension gegeben. Zusätzlich wurden noch in jedes Röhrchen 200 µl der 1:10 verdünnten Annexin V Puffer-Lösung pipettiert. Nachdem die Zellen 15 min inkubiert waren, konnte die Messung mit dem Durchflusszytometer beginnen.

Für die statistische Auswertung und die Verarbeitung der Daten wurden die Programme Excel 2010 und WinMDI 2.9 verwendet.

2.5 Verwendete Puffer und Lösungen

2.5.1 Comet-Assay

- *Calcium und Magnesium freier Phosphatpuffer (CMF-PBS) (1 l)*

NaCl	8 g
KCl	0,3 g
Glukose × 1 H ₂ O	2 g
KH ₂ PO ₄	20 mg
Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O	91,4 g
pH	7,4

- *Lysis Puffer (500 ml)*

NaCl (2,5 M)	73,5 g
EDTA (100 mM)	18,6 g
Trizma [®] Base (10 mM)	0,6 g
NaOH	0,6 g
pH	10,1

Die Stoffe wurden zunächst in ein 1000 ml Reagenzgefäß gegeben und das Gefäß mit Aqua dest. auf 445 ml aufgefüllt. Nachdem mit HCL (37% ig) und NaOH ein pH von 10,1 eingestellt wurde, konnte die Lösung im Kühlschrank gelagert werden. Vor dem Gebrauch wurde noch Triton-X (1 ml pro 100 ml Lysis Lösung) dazu gegeben.

- *Elektrophorese Puffer (1 l)*

NaOH	12 g
EDTA	372,2 mg
pH	> 13

Der Puffer sollte für jeden Versuchsdurchgang frisch angefertigt werden. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

- *Neutralisationspuffer*

Es wurden 12,1 g Trizma[®] Base in 200 ml Aqua dest. gelöst und mit HCL auf 250 ml aufgefüllt. Dann wurde mit HCL (37% ig) ein pH von 7,4 eingestellt.

- *Agarosegele*

Herstellung von 250 ml 1% iger LMA: Es wurden 2,5 g (1 g auf 100 ml) Biozym LE eingewogen und in einem Becherglas in 250 ml Aqua dest. gelöst. Gelagert wurde die LMA bei 4° C.

Herstellung von 1% iger NMA: Für 100 ml wurden 1 g NMA abgewogen und in 100 ml CMF-PBS Puffer gelöst. Die Lösung wurde dann ca. 30 min mit einem Rührknochen vermischt und weitere 30 min aufgekocht, bis sich das Agarosepulver komplett aufgelöst hat. Gelagert wurde die NMA bei 4° C.

2.5.2 Apoptosebestimmung mittels Annexin V und PI

Für diese Diplomarbeit wurde das FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I der Firma BD Biosciences verwendet. Darin enthalten waren FITC Annexin V, Propidiumjodid und der Annexin V Binding Puffer. Der Puffer wurde vor der Anwendung 1:10 mit Aqua dest. verdünnt.

3 Ergebnisse

3.1 Wachstum der MSC-Kulturen

Mit 33 Wochen konnte die Kultur „03.21.18“ mit Abstand am längsten kultiviert werden; die anderen Zellreihen stellten nach 8 („16.01.01“) bis 12 („19.03.08“) Passagen ihr Wachstum ein (s. Abb.10).

Im Rahmen jeder Passage wurde ebenfalls die aktuelle Zellzahl der jeweiligen MSC-Kultur bestimmt und aus den Werten für jede Passage der Median gebildet. Die Kurve der Abbildung 10 beschreibt damit das mediane Wachstum der Zellen. Die bei jeder Passage aus dem Kulturgefäß entnommenen Zellen wurden in der Wachstumskurve ebenfalls berücksichtigt, indem sie zu den im Kulturgefäß verbliebenen Zellen immer dazu addiert wurden. Es fällt auf, dass sich die Zellen gerade zu Beginn der Kultivierung sehr stark vermehrt haben. Aus $1,8 \times 10^5$ Zellen zu Beginn der Kultivierung wurden durch Zellteilungen $2,0 \times 10^8$ Zellen in der Passage 6. Ab der 7. Passage ist die Wachstumskurve flacher und die Zellzahl stieg nur mehr von $3,1 \times 10^8$ (Passage 7) auf $3,4 \times 10^8$ Zellen (Passage 9).

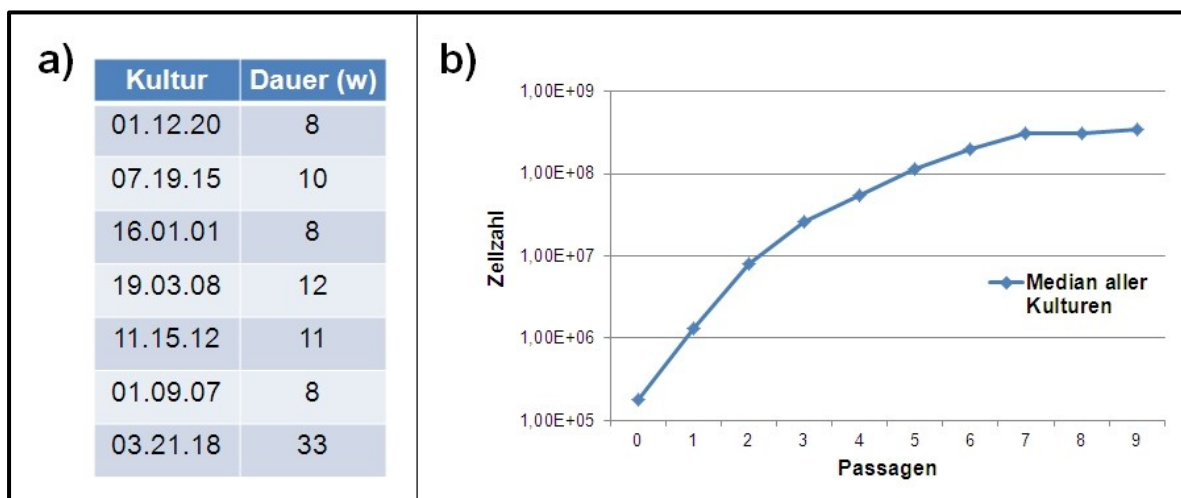


Abbildung 10: Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen; a) zeigt die Dauer aller MSC-Kulturen in Wochen; b) beschreibt das mediane Wachstum aller MSC-Kulturen; nach starker Vermehrung zu Beginn der Kultivierung flacht die Kurve ab der 7. Passage ab.

3.2 Alkalischer Comet-Assay

Die Abbildung 11 zeigt sämtliche ermittelten Comet-Scores von Passage 3 bis Passage 33. Die Kultur „01.09.07“ wurde für die Auswertung des Comet-Assays

nicht berücksichtigt, da aus verschiedenen Gründen nur 3 Passagen ausgezählt werden konnten.

Ab der Passage 12 sind nur noch die Werte von „03.21.18“ eingezeichnet. Von allen Kulturen hatte „16.01.01“ in der Passage 3 mit 5 den niedrigsten Ausgangswert; bei „01.12.20“ war er mit 88 am höchsten. Keine Kultur zeigt für sich betrachtet einen kontinuierlichen Anstieg des Comet-Scores; es sind in jeder Schwankungen zu beobachten. Der Wert der jeweils letzten Passage war mit 255 in der Kultur „19.03.08“ am höchsten (Passage12); „16.01.01“ hatte mit 108 den niedrigsten Wert nach der letzten Passage (Passage 8).

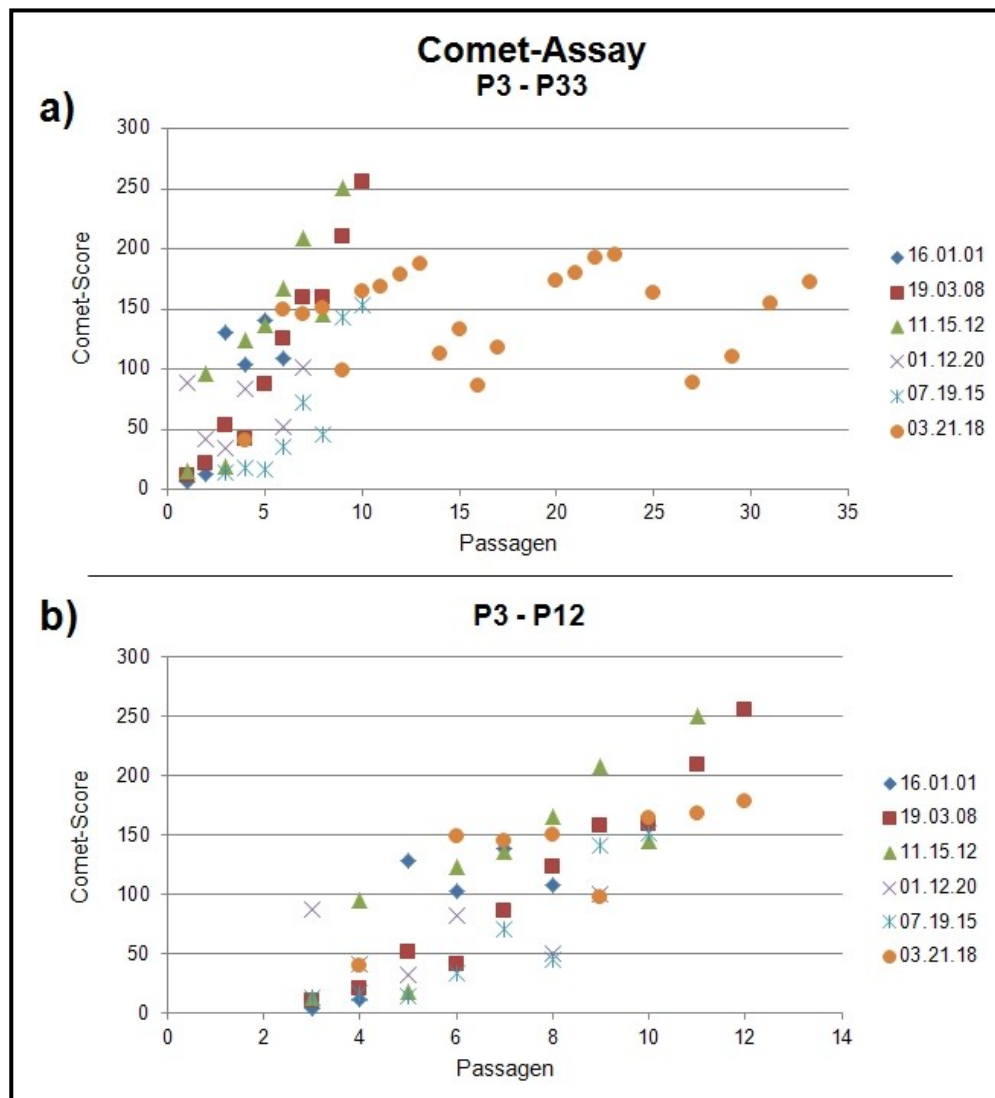


Abbildung 11: Comet-Scores der einzelnen Passagen; in a) sind die Comet-Scores aller Passagen (P3 - P33) zu sehen. Ab der Passage 12 sind nur noch die Werte der Kultur „03.21.18“ eingetragen, da nur diese über die 12. Passage hinaus kultiviert werden konnte; b) zeigt die Comet-Scores bis zur Passage 12; von Beginn der Messungen bei Passage 3 fällt eine stetige Zunahme des Comet-Scores bis zur Passage 12 auf.

Trotzdem ist deutlich zu erkennen, dass der Comet-Score im Laufe der *in vitro* Kultivierung zunimmt. Um diese Zunahme besser beurteilen zu können wurde für jede Passage aus allen gemessenen Werten der Median gebildet (s. Abb. 12).

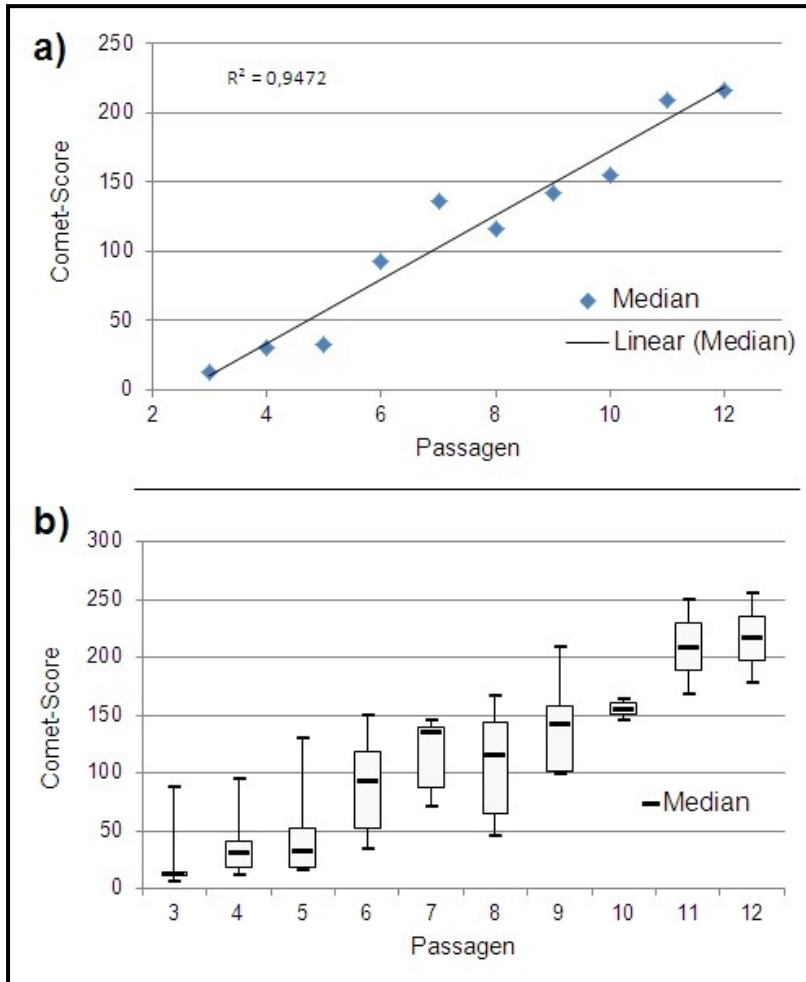


Abbildung 12: Auswertung des Comet-Assays; a) zeigt die Mediane aller Comet-Scores; eine ebenfalls eingezeichnete Trendlinie zeigt einen linearen Zusammenhang zwischen Comet-Scores und Passagen, ausgedrückt durch das Bestimmungsmaß R^2 .

b) zeigt einen Boxplot; es sind die jeweils höchsten bzw. niedrigsten Werte, die 1. bzw. 3. Quartile als Box und der Median für jede Passage eingezeichnet. Der Graph zeigt, dass mit Anzahl der Passagen auch der Comet-Score ansteigt. Dies bedeutet, dass immer mehr DNA-Schäden in den Zellen entstehen, je länger sie *in vitro* kultiviert werden.

Die Grafik zeigt eine Zunahme des Medians von Passage 3 (13) bis zur Passage 12 (217). Dass der Comet-Score linear von P3 bis P12 ansteigt, wird durch das Bestimmungsmaß R^2 ausgedrückt, der hier einen Wert von 0,95 aufweist. Damit ist der Korrelationskoeffizient $(R^2)^{1/2}$ ca. 0,97 und der lineare Zusammenhang zwischen Kulivierungsdauer und Comet-Score auch statistisch signifikant. Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt bei $< 0,001\%$ [63]. Die Standardabweichung bei den Auszählungen beträgt durchschnittlich 40 Pkt des Scores und schwankt zwischen 8 (Passage 10) und 54 (Passage 12).

Wenn man die Zellkultur „03.21.18“ gesondert betrachtet, fällt ein wellenförmiger Verlauf der Comet-Werte auf (s. Abb. 13).

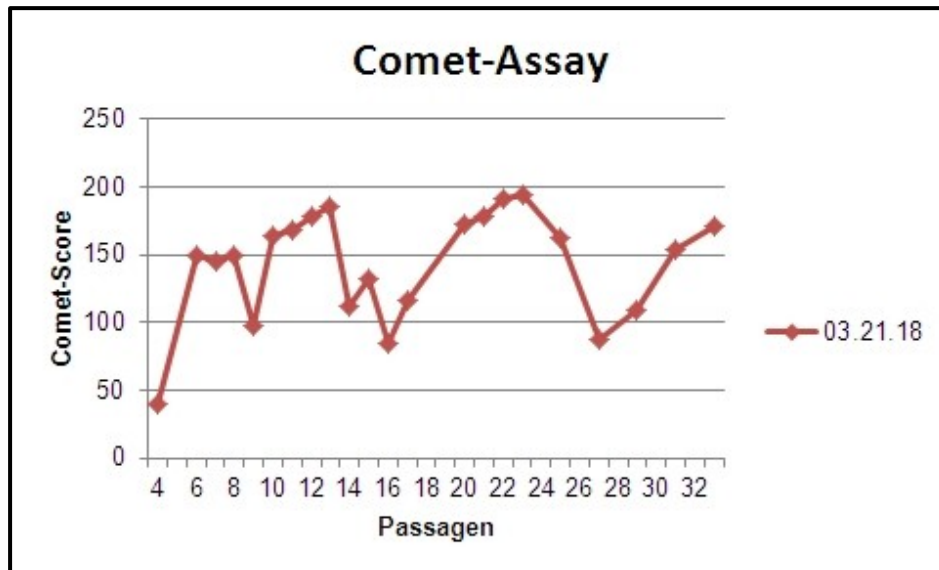


Abbildung 13: Comet-Scores der Kultur „03.21.18“; diese MSC-Kultur konnte mit 33 Wochen mit Abstand am längsten kultiviert werden. Auffällig ist ein wellenförmiger Verlauf des Comet-Scores.

Die höchsten Werte wurden mit 186 in der Passage 13, bzw. mit 194 in der Passage 22 ermittelt. Im Laufe der Kultivierung konnten auch drei sehr niedrige Werte festgestellt werden: die Passage 9 hatte einen Score von 98, bei der Passage 16 lag der Wert bei 85 und die Passage 27 wies einen Comet-Score von 88 auf. Ab der Passage 23 wurde bei dieser Kultur der Comet-Assay nur alle zwei Wochen durchgeführt, da sich die Zellen ab dieser Passage nur noch sehr langsam vermehrt hatten. Diese Zellen dieser Kultur waren die einzigen von einem gesunden Spender, und auch die einzigen, welche über die 12. Passage hinaus kultiviert werden konnte.

3.3 Erfassung von apoptotischen Zellen

Für die Erfassung der Apoptose wurden die Kulturen „16.01.01“, „01.09.07“, „07.19.15“ und „03.21.18“ verwendet. Die Abbildung 14 zeigt das Ergebnis der durchflusszytometrischen Untersuchung. Man erkennt deutlich, dass der Anteil der apoptotischen MSCs im Laufe der Kultivierung zunimmt.

In der dritten Passage waren bei „16.01.01“ 6,5 % der Zellen apoptotisch; in der Passage 7 waren es hingegen 13,3 %. Bei der Kultur „01.09.07“ stieg der Anteil der apoptotischen Zellen von anfangs 6,1 % (Passage 4) auf 21,4 % (Passage 8). Auch bei „07.19.15“ konnten in der Passage 9 mehr apoptotische MSCs erfasst werden (23,1 %) als in der Passage 3 (14,1 %). Die Kultur „03.21.18“ zeigte im Laufe der Kultivierung eine geringere Zunahme der apoptotischen Zellen. Nach einem Abfall von 7,7 % (Passage 3) auf 3,3 % (Passage 4) stieg der Anteil schließlich auf 7,8 % in der Passage 9.

Durchschnittlich stieg der prozentuale Anteil der apoptotischen MSCs von 9,4 % in der Passage 3 auf 15,4 % in der Passage 9.

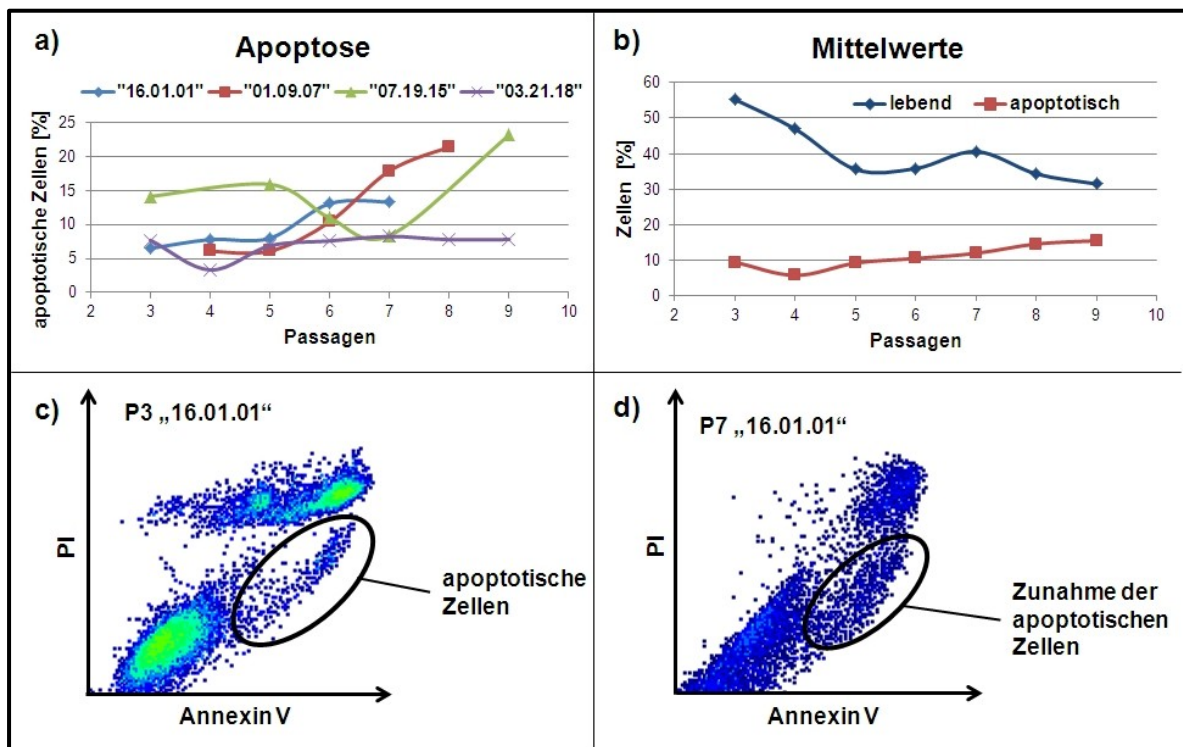


Abbildung 14: Auswertung der durchflusszytometrischen Untersuchung; a) zeigt den prozentualen Anteil der apoptotischen MSCs im Laufe der *in vitro*-Kultivierung bis zur Passage 9. Es sind die Kulturen „16.01.01“, „01.09.07“, „07.19.15“ und „03.21.18“ eingezeichnet. Auf der Abbildung b) wurde der Mittelwert der apoptotischen Zellen berechnet; sie zeigt ebenfalls den prozentualen Anteil der noch lebenden Zellen; der Anteil nekrotischer Zellen (positiv für PI und Annexin V) wurde nicht in die Grafik übernommen c) und d) zeigt einen Density-Plot der Kultur „16.01.01“ in den Passagen 3 und 7; es sind die noch lebenden Zellen (unten links im Schema), die nekrotischen Zellen (oben rechts) und die apoptotischen Zellen eingezeichnet. Es ist erkennbar, dass der Anteil der apoptotischen Zellen in der Passage 7 größer ist als in Passage 3.

Des Weiteren war auffällig, dass die mesenchymalen Stammzellen bei der durchflusszytometrischen Untersuchung eine sehr hohe Eigenfluoreszenz aufgewiesen haben (s. Abb. 15).

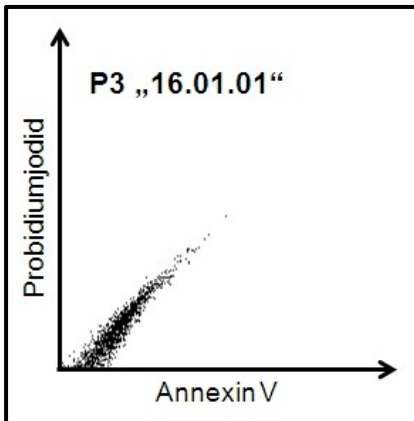


Abbildung 15: Dotplot der Kultur „16.01.01“; Die Abbildung zeigt die ungefärbte Kontrolle der Passage 3 nach der durchflusszytometrischen Untersuchung. Die stark ausgeprägte Autofluoreszenz der mesenchymalen Stammzellen zeigt sich dadurch, dass die Zellen nicht gesammelt im linken unteren Quadranten des Schemas erscheinen.

Die Abbildung 16 zeigt, wie sich der prozentuale Anteil der lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen im Laufe der langen Kultivierung von „03.21.18“ geändert hat. Auf der Abbildung wird ebenfalls die Änderung der apoptotischen MSC mit dem Verlauf des Comet-Scores verglichen.

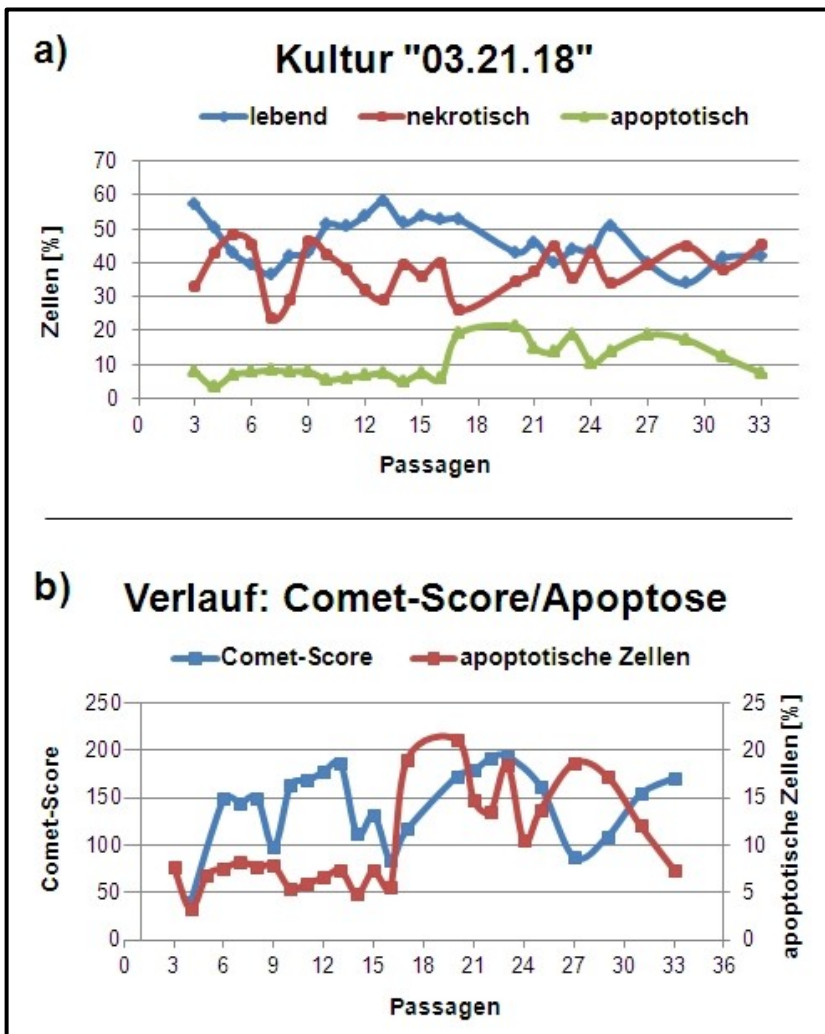


Abbildung 16: Auswertung der Kultur „03.21.18“; a) zeigt, wie sich im Laufe der Kultivierung der prozentuale Anteil der lebenden, nekrotischen und apoptotischen Zellen geändert hat. Der Anteil der lebenden Zellen ging von 57 % in der Passage 3 auf 41,8 % in der Passage 33 zurück. Der Anteil der apoptotischen MSCs stieg jedoch von 7,7 % (Passage 3) auf 21,1 % (Passage 20). In der Passage 33 waren wieder weniger Zellen apoptotisch (7,4 %).

b) zeigt zwei Kurven: für jede Passage sind einmal der Comet-Score und zusätzlich der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen eingezeichnet. Ab der Passage 17 steigen sowohl der Comet-Score, als auch der Anteil der apoptotischen Zellen an. Ab der Passage 27 nehmen die beiden Kurven einen entgegengesetzten Verlauf.

4 Diskussion

4.1 Alterung mesenchymaler Stammzellen *in vitro*

Hayflick zeigte bereits in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts, dass sich ausdifferenzierte Zellen auf Grund ihrer Alterung *in vitro* nicht mehr als 50 ± 10 mal teilen können (Hayflick-Limit) [64, 65]. Damit widersprach er der von Alexis Carrel lange verbreiteten Meinung, dass somatische Zellen unendlich lange in Kultur gehalten werden können; ein Absterben dieser sei nur Folge einer fehlerhaften Kultivierung [66, 67]. Auch bei der Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen hat sich gezeigt, dass das Wachstum der Zellen mit zunehmender Kultivierungszeit abgenommen hat (s. Abb. 10, S. 23).

Nach Hayflick gibt es zwei mögliche Ursachen für die Alterung von Zellen: sie ist einmal das Resultat eines gezielten Programmes welches durch Gene gesteuert wird, oder die Folge von stochastischen oder zufälligen Ereignissen [68]. Wahrscheinlich ist jedoch ein Zusammenspiel von beiden Faktoren [69]. Zufällige Ereignisse sind zum Beispiel DNA-Schäden, die sich im Laufe der Kultivierung ansammeln und einen apoptotischen Zelltod oder einen Zellzyklus-Arrest bewirken können.

Da selbst aus dem Knochenmark nur eine relativ geringe Zahl mesenchymaler Stammzellen (ca. 0,01 - 0,001 % aller nukleären Zellen des Knochenmark-Aspirats) gewonnen werden können [70], ist für die klinische Anwendung eine Expansion dieser Zellen *in vitro* erforderlich. Diese könnte aber einen Einfluss auf die regenerativen Eigenschaften der MSCs haben. Auch Mesenchymale Stammzellen unterliegen *in vitro* nämlich einem Alterungsprozess.

4.1.1 Morphologische Veränderungen

MSCs verlieren im Laufe der Kultivierung immer mehr ihr spindelförmiges Aussehen. Sie werden größer, zeigen eine unregelmäßige Begrenzung, bekommen ein granuläres Zytoplasma mit Zelleinschlüssen und es lässt sich vermehrt Zelldetritus im Medium nachweisen [64, 71–73]. Diese Veränderungen gehen einher mit einer stetig verminderten Proliferationsrate bis die Zellen

schließlich ihr Wachstum ganz einstellen [74–76]. Auch bei den für diese Arbeit durchgeführten Zellkulturen konnte dies mit steigender Kultivierungszeit festgestellt werden (s. Abb.17).

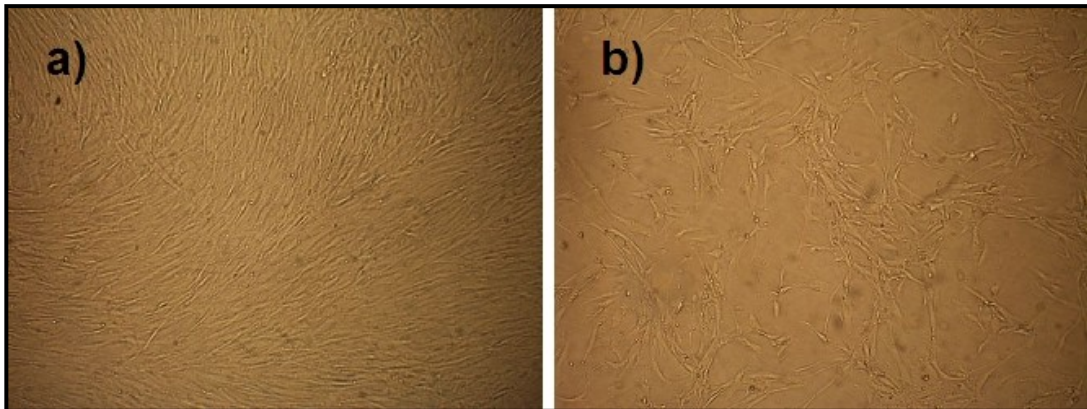


Abbildung 17: Lichtmikroskopie der MSC-Kultur „16.01.01“ (200-fache Vergrößerung);
a) Passage 3 b) Passage 8; Es fallen eine verminderte Zelldichte sowie vergrößerte Zellen mit Einschlüssen bei Passage 8 im Vergleich zu Passage 3 auf.

Es muss jedoch beachtet werden, dass es viele verschiedene Einflüsse auf das Wachstum der Zellen *in vitro* gibt. Das sind beispielsweise die Zelldichte [77], oder auch die Oxygenierung der Kultur; milde Hyperoxie scheint die Vermehrung der Zellen zu hemmen [78], während sie unter Hypoxie eine vermehrte Proliferation aufweisen. Dies geht unter anderem mit einer verminderten p16 (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) Expression einher. Dieses Protein spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung des Zellzyklus [79].

4.1.2 DNA-Schäden

4.1.2.1 Erfassung von DNA-Schäden durch den Comet-Assay

Der alkalische Comet-Assay ist eine sensitive Methode um in einzelnen Zellen sowohl Einzel-, als auch Doppelstrangbrüche der DNA erfassen zu können. Die Auswertung zeigt, dass die gemessenen DNA-Schäden ab der ersten ausgewerteten Passage linear zur Kultivierungsdauer ansteigen und nicht mehr durch Reparaturmechanismen kompensiert werden können. Das weist darauf hin, dass die Stammzellen von Beginn der *ex vivo* Kultivierung an einem Alterungsprozess unterworfen sind. Eine geschädigte DNA bedeutet für die Zellen neben einer funktionellen Beeinträchtigung auch eine erhöhte Mortalität [80].

Zu Strangbrüchen kann es zum Beispiel kommen, wenn energiereiche Strahlung (z.B. γ -Strahlen) auf die DNA im Zellkern trifft. Durch UV-Strahlen bilden sich Thymindimere, welche die DNA destabilisieren und so ebenfalls einen Strangbruch verursachen können. Außerdem ist es möglich, dass Sauerstoffradikale (rOS) wie H_2O_2 oder O_2^- die DNA schädigen [81–83]. Im Rahmen zellulärer Reparaturmechanismen können durch eine Basen-, oder Nukleotidexzision ebenfalls Einzelstrangbrüche entstehen, die mit dem Comet-Assay gemessen werden können [84]. Die im Laufe der Kultivierung steigende Anzahl von DNA-Fragmenten kann aber auch Folge einer durch Zellalterung verringerten Aktivität verschiedener zellulärer Reparaturmechanismen sein [80, 85, 86].

Bei einem zu großem Schaden wird entweder der Zellzyklus gestoppt, oder die Zellen gehen in die Apoptose beziehungsweise werden nekrotisch (s. Abb. 18) [81, 82].

In diesen Zellen steigt dann die Konzentration des Proteins p53 stark an, indem dessen Abbau durch MDM2 (mouse double minute 2) gehemmt wird [59, 87]. P53 kann durch eine Induktion des p21-Gens und der resultierenden Hemmung von CDK4 und CDK6 einen Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase bewirken [81]. Außerdem induziert p53 durch die Aktivierung von BAX (Bcl-2 associated X protein) einen apoptotischen Zelltod. Es werden zunächst kaskadenartig verschiedene Caspasen aktiviert, und schließlich Cytochrom c aus der inneren Mitochondrienmembran in das Zytosol der Zelle freigesetzt. Unterstützt wird diese Freisetzung durch das Protein BAX. Die Fragmentierung der DNA geschieht durch die Caspase-aktivierte Desoxyribonuklease (CAD), deren Inhibitor (ICAD) durch die Caspase 3 abgebaut wird [81, 88, 89].

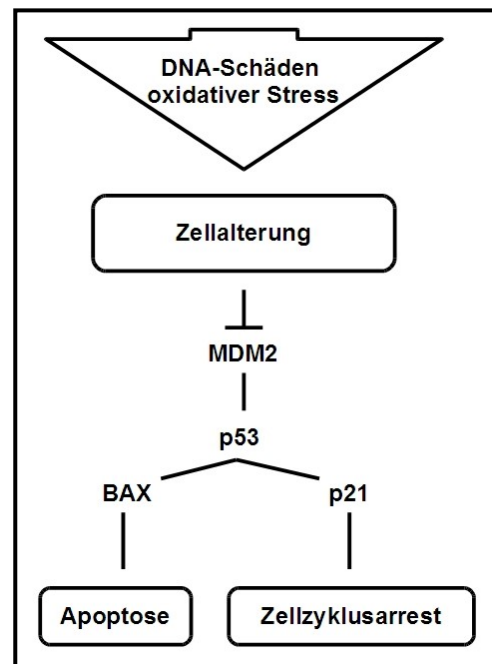


Abbildung 18: Ursachen der Apoptose; DNA-Schäden und oxidativer Stress können einen Zellzyklus-arrest oder eine Apoptose bewirken; MDM2, mouse double minute 2; BAX, Bcl-2 associated X protein.

Es bleibt die Frage, weshalb die Zellen der Kultur „03.21.18“ über einen so viel längeren Zeitraum kultiviert werden konnten als alle anderen MSCs.

Der wellenförmige Verlauf der Comet-Werte von „03.21.18“ könnte dadurch zustande gekommen sein, dass die Zellen zeitweise ihren Zellzyklus gestoppt haben. Durch eine Kontaktinhibition wird zum Beispiel p27 in den Zellen aktiviert. Durch dieses Protein werden vor allem D- und E-Cykline gehemmt, was dazu führt, dass die Zellen in die G0-Phase des Zellzyklus eintreten [81]. In dieser „Ruhephase“ findet keine Zellteilung statt und angefallene DNA-Schäden könnten wieder behoben werden [83]. Die Folge ist, dass die DNA-Fragmente weniger werden und somit auch der Comet-Score sinkt. Außerdem könnten die Zellen über einen von p21 mediierten Mechanismus (s.o.) ihren Zellzyklus in der G1-Phase gestoppt haben.

Es sollte aber auch bedacht werden, dass die Comet-Scores aller Zellen im Laufe der *in vitro* Kultivierung schwanken. Nur sind diese gerade bei „03.21.18“ sehr auffällig, da die Kultur als einzige über die 12. Passage hinaus kultiviert werden konnte.

4.1.2.2 DNA-Schäden: weitere Ursachen und Reperaturmechanismen

Die DNA einer Zelle kann auch auf andere Weise also durch Strangbrüche geschädigt werden. So gibt es zum Beispiel spontane Veränderungen einzelner Basen. Durch eine Desaminierung entsteht aus der Base Cytosin Uracil und aus Adenin Hypoxanthin. Uracil und Hypoxanthin kommen jedoch normalerweise nicht in der DNA vor und können deshalb durch Reparaturproteine erkannt werden. Bei der spontanen Despurinierung wird die Bindung zwischen einer Purinbase und der Deoxyribose gespalten und es bleibt ein depurinierter Zuckerrest zurück. Diese Schädigungen betreffen nur einen der beiden DNA-Stränge und können ebenfalls behoben werden. Eine beschädigte Base wird durch eine Glykosylase entfernt.

Das übrig gebliebene Desoxyribosephosphat wird durch eine Endonuklease aus dem DNA-Strang abgespalten. Mit dem vollständigen zweiten Strang als Matrize kann nun das fehlende Nukleotid wieder eingebaut werden (s.Abb.19) [81, 82].

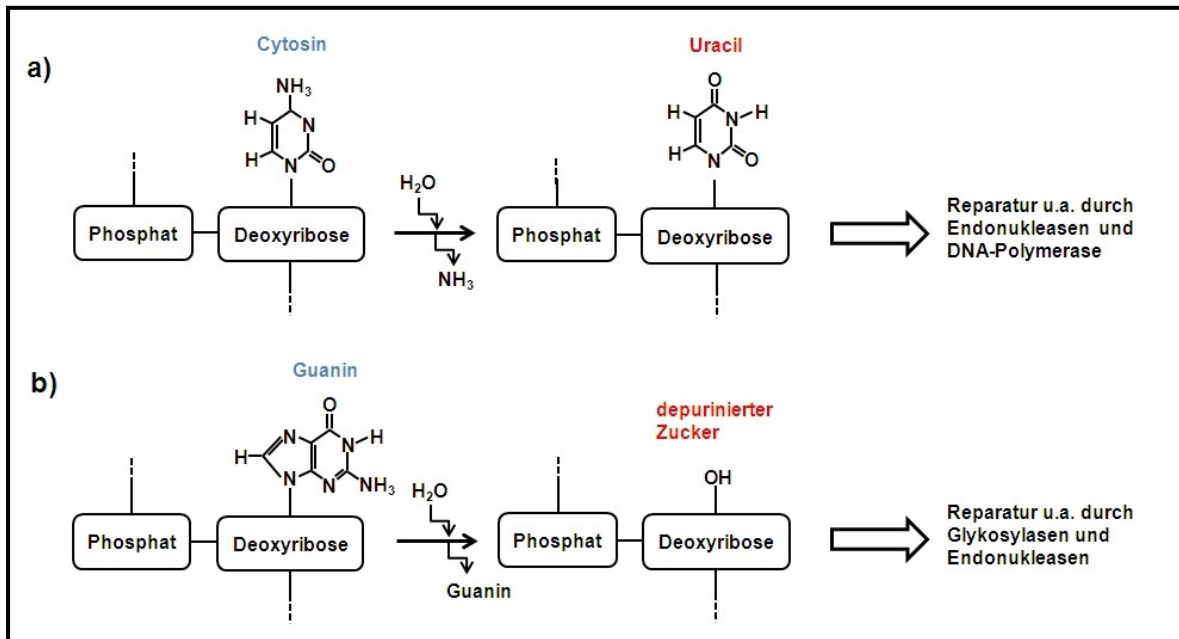


Abbildung 19: spontane Veränderungen der DNA; a) bei einer Desaminierung wird zum Beispiel aus Cytosin die Base Uracil; b) bei einer Depurinierung werden Guanin oder Adenin spontan abgespalten.

Auch während der DNA-Replikation können fehlerhafte Basenpaarungen entstehen. Durch eine Korrekturfunktion der DNA-Polymerase können diese jedoch in den allermeisten Fällen erkannt und beseitigt werden [81].

Um einen dauerhaften Schaden und somit Mutationen zu verhindern, sind in den Zellen verschiedene Reparaturmechanismen vorhanden. Bei Schädigungen eines einzelnen DNA-Stranges kann der Komplementärstrang als Matrize für die Reparatur verwendet werden. Eine DNA-Polymerase baut zunächst fehlende Nucleotide wieder in die DNA ein. Durch eine DNA-Ligase kann das Nucleotidstück dann mit der alten DNA verbunden werden [81].

Bei Doppelstrangbrüchen fehlt jedoch der zweite unbeschädigte Strang als Matrize. Man unterscheidet hier zwischen einer homologen und einer nicht homologen Reparatur (engl. non-homologous end-joining, NHEJ). Die homologe Reparatur findet vor allem während oder kurz nach der S-Phase statt. Durch das Prinzip der homologen Rekombination werden hier die DNA-Sequenzen des zweiten, homologen Chromosoms übernommen [81].

Bei der nicht homologen Reparatur bilden verschiedene Proteine und Enzyme wie DNA-PK, Ku70 und Ku80 einen Enzymkomplex am Strangbruch.

Es werden zunächst einige Nukleotide abgebaut, bis beide Stränge wieder miteinander übereinstimmen. Dann kann ein LigaseIV/XRCC4 Komplex die beiden DNA-Stücke wieder miteinander verbinden. Eine wichtige Aufgabe haben ferner die Proteine MRE11, Rad50 und NBS1 (MRN-Komplex). Sie machen den Doppelstrangbruch in der DNA ausfindig und entwinden die entsprechende Sequenz. Nur so können nämlich beide Enden wieder aneinander gefügt werden [81, 85].

Wenn Beschädigungen der DNA nicht behoben werden können besteht die Gefahr, dass es durch die Transkription fehlerhafter Proteine zu verschiedenen Erkrankungen (Malignome, Enzymdefekte) kommt. Wenn Mutationen ohne Folgen bleiben spricht man von sog. stummen Mutationen.

4.1.3 Apoptose

Das Wort „Apoptose“ hat seinen Ursprung in der griechischen Sprache (απο: von...weg; πτωσις: Fall, Sturz) und *beschreibt* vom Baum fallende Blätter. Die Apoptose wird auch als programmierter Zelltod (PCD) bezeichnet, da sie im Gegensatz zur Nekrose ein genetisch determinierter und durch verschiedene Faktoren geregelter Prozess ist.

Der apoptotische Zelltod kann durch bestimmte Faktoren von außen (FasL/CD95L, TNF- α , Retinsäure, ↓Wachstumsfaktoren) oder durch Vorgänge innerhalb der Zelle (DNA-Schäden, O₂-Mangel) ausgelöst werden (s. Abb. 20) [81].

Morphologisch ist die Apoptose unter anderem durch das Ausbleiben einer Entzündungsreaktion, einer Schrumpfung des Zellkerns mit Chromatinverdichtung und DNA-Fragmentierung, und schließlich durch die Ausbildung sog. „apoptotic bodies“ gekennzeichnet [61].

Der apoptotische Zelltod ist ein physiologischer Prozess und wichtig für die Entwicklung und Homöostase verschiedener Gewebe.

Er ist aber ebenfalls ein Ausdruck von Zellalterung, weshalb die Erfassung von apoptotischen MSCs einen Hinweis auf deren Alterung *in vitro* sein kann [90].

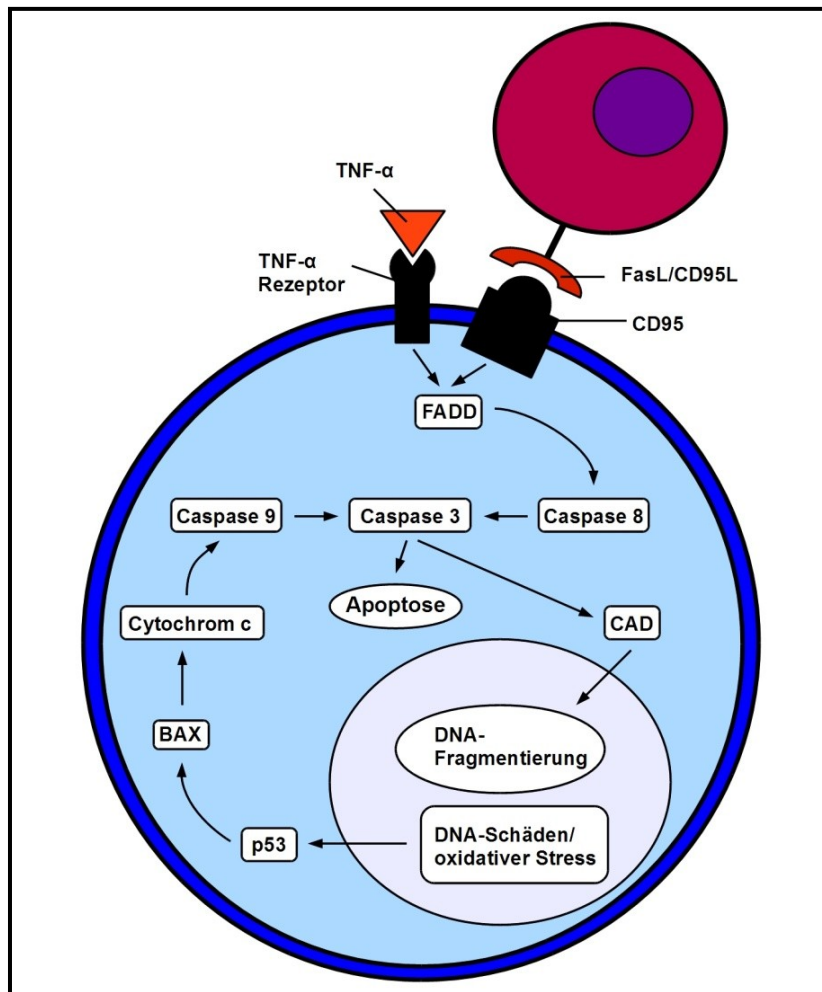


Abbildung 20: stark vereinfachte Darstellung der Apoptose; TNF- α und FasL aktivieren über FADD die Adaptercaspase 8. Die Caspase 8 aktiviert die Effektorcaspase 3, welche die Apoptose und die DNA-Fragmentierung durch CAD einleitet. P53 wiederum aktiviert das Protein BAX, welches Cytochrom c aus der Mitochondrienmembran freisetzt. Über die Adaptercaspase 9 wird ebenfalls die Caspase 3 aktiviert. TNF- α , Tumornekrose-Faktor α ; FADD, Fas-associated protein with death domain; CAD, caspase-aktivierte Desoxyribonukleinas; BAX, Bcl-2 associated X Protein.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen der mesenchymalen Stammzellen haben ergeben, dass der Anteil der apoptotischen Zellen im Laufe der Kultivierung immer größer wird. Gleichzeitig sank der Anteil der lebenden Zellen. Dies ist ebenfalls ein Hinweis für Alterungsprozesse der MSCs *in vitro* und kann eine direkte Folge der ebenfalls im Laufe der Kultivierung zunehmenden DNA-Schäden der Zellen sein (s.o.).

4.1.4 Weitere Hinweise für eine Alterung mesenchymaler Zellen *in vitro*

Das Alter der Stammzellspender scheint ebenfalls eine Rolle für die Alterung mesenchymaler Stammzellen *in vitro* zu spielen. So weisen Zellen älterer Spender eine geringere Proliferationsrate und ein geringeres Potential zur osteogenen Differenzierung auf als MSCs von jungen Spendern [76, 91, 92]. Außerdem lässt sich im Tiermodell aus dem Knochenmark älterer Tiere eine geringere Anzahl MSCs isolieren, als aus dem von jungen [93]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass MSCs auch *in vivo* einem Alterungsprozess unterworfen sind.

Desweiteren lässt sich bei anhaltender Kultivierung von MSCs ein Verlust ihrer Differenzierungsfähigkeit beobachten. Dies trifft vor allem auf die Differenzierung in Adipozyten zu, wobei das osteogene Potential in späten Passagen eher gesteigert zu sein scheint [72–74].

Je länger mesenchymale Stammzellen kultiviert werden, desto höher ist außerdem die Expression der senescence-associated- β -Galaktosidase. Dieses Enzym ist vor allem in gealterten Zellen aktiv [94] und ist ebenfalls ein Hinweis für Alterungsprozesse *in vitro* [71, 73, 75, 93].

Auch die Expression einiger Gene verändert sich im Laufe der Kultivierung. So werden vor allem Gene hochreguliert, welche die Differenzierung der Zellen steuern und an Vorgängen wie Apoptose und Zelltod beteiligt sind. Eine down-Regulation kann man vor allem für Gene nachweisen, welche für Mitose, Proliferation, DNA-Replikation und DNA-Reparatur der kultivierten Zellen benötigt werden. Es ist ebenfalls eine vermehrte Expression von microRNA (kurze, nicht kodierende RNA, welche eine Rolle in der Genregulation spielen) nachgewiesen. Dies könnte einen Einfluss auf das Methylierungsmuster in der Zelle haben, was ebenfalls eine Rolle für die Alterung der Zellen spielen soll [73].

Wichtig ist, dass sich die Aktivitätsänderung der mit Alterung assoziierten Gene nicht auf späte Passagen beschränkt, sondern ein kontinuierlicher Vorgang während der *in vitro* Expansion ist. Dies bedeutet, dass MSCs ab dem Beginn der Kultivierung einem Alterungsprozess unterworfen sind [69, 73], was durch den Comet-Assay bestätigt werden konnte (s.o.).

Einen weiteren Hinweis auf die Alterung *in vitro* gibt die gemessene Telomerlänge der Zellen. Das Hayflick-Limit (s.o.) kommt unter anderem dadurch zustande, dass bei jeder Zellteilung DNA Sequenzen an den Telomeren verloren gehen [95]. Dies kann jedoch durch das Enzym Telomerase verhindert werden, welches am 3' Ende der DNA repetitive Sequenzen anfügt und somit eine Verkürzung der Telomere verhindert [96]. Da pluripotente Stammzellen oder Tumorzellen eine hohe Aktivität dieses Enzyms aufweisen, ist ihre Proliferation theoretisch nicht limitiert [97, 98]. Die Telomerlänge nimmt bei mesenchymalen Stammzellen *in vitro* ab [72, 75, 76]. Im Gegensatz zu MSCs von Mäusen (mMSCs), weisen nämlich vom Menschen gewonnene MSCs (hMSCs) keine Telomeraseaktivität auf [99]. Somit lassen sich mMSCs auch viel länger in Kultur halten, als hMSCs [100, 101]. Trotzdem existiert eine kontroverse Debatte, ob nicht zumindest eine Subpopulation von MSCs eine geringe Telomeraseaktivität aufweisen könnte, welche allerdings unter der Nachweisgrenze heutiger Verfahren liegt [99]. Diese Überlegung ergibt sich daraus, dass das Enzym neben der Zellreplikation auch eine Rolle für das Differenzierungspotential der Stammzellen spielt [102]. Baxter et al. beschrieben außerdem Kulturen von MSCs, in welchen nach initialer Verkürzung der Telomerlänge, diese für über 40 PD konstant gehalten werden konnte [76].

Jedoch hat nicht nur die Expression von Telomerase einen Einfluss auf die Telomerlänge und die Vermehrung *in vitro*. So sind auch hMSCs durch Zugabe von Wachstumsfaktoren wie basic fibroblast growth factor (bFBG) in der Lage wesentlich länger in Kultur gehalten zu werden und zusätzlich ihre Telomerlänge zu erhalten [103].

4.2 Verbesserungen des Comet-Assays

Der Comet-Assay ist eine sensitive Methode um DNA-Schäden von Zellen messen zu können. Jedoch müssen dafür einige Faktoren berücksichtigt werden.

Es ist vor allem wichtig im Laufe des Versuches keine neuen DNA-Schäden in den Zellen herbeizuführen. Diese können beispielsweise entstehen wenn:

- nicht möglichst bald nach der Passage mit dem Comet-Assay begonnen wird und die Zellen zu lange lagern.
- die mit den Zellen auf die Objektträger pipettierte LMA > 37° C heiß ist.
- nach Beginn der Lyse noch Licht auf die Zellen trifft.

Wenn die Objektträger nach dem Auftragen der Agarose nicht lange genug im Kühlschrank gelegen sind, kann es außerdem vorkommen, dass diese noch nicht vollständig erstarrt ist. Das führt dazu, dass man beim Herunternehmen des Deckglases Teile der Agarose mitentfernt. Somit sind die Objektträger nicht mehr gleichmäßig mit Agarose bedeckt, was die Wanderung der DNA-Fragmente während der Elektrophorese beeinflusst.

Als problematisch hat sich ebenfalls herausgestellt, dass das Agarosegel nicht sehr gut an den Objektträgern haften bleibt und dadurch das Gel vor allem bei der Elektrophorese abschwimmt.

Damit sich die DNA der Zellen gut entwinden kann, müssen die Objektträger während der 20 minütigen Wartezeit vor der Elektrophorese vollständig im Elektrophoresepuffer eingetaucht sein. Nur bei entwundener DNA können nämlich neben Doppel-, auch Einzelstrangbrüche nachgewiesen werden.

Bei der Auszählung der Objektträger ist darauf zu achten, dass man die Zellen systematisch auszählt. Außerdem sollten keine Zellen in der Umgebung von Luftblasen oder am Rand des Objektträgers ausgewertet werden, da hier eher falsch hohe Werte zu erwarten sind [84].

Einige der Schwierigkeiten bei der Durchführung des Comet-Assays konnten durch die oben beschriebenen Veränderungen in der Methodik jedoch behoben werden [159].

- Das Precoating bewirkt, dass das Agarosegel viel besser an den Objektträgern haftet und sich nicht mehr so ablösen kann. So können auch viel mehr Objektträger auch ausgewertet werden (s. Abb. 21).
- Da das 24 × 60 mm große Deckglas vor dem Auftragen auf die NMA mit einem kleineren, 20 × 20 mm messenden Deckglas versehen wurde,

entsteht eine Vertiefung im Agarosegel. Wenn die Zellen nun in diese Vertiefung pipettiert werden, kann selbst mit einer geringeren Zellzahl (hier $2,5 \times 10^4$ statt 5×10^4) noch eine ausreichende Zelldichte erreicht werden. Außerdem liegen die Zellen nun nicht mehr am Rande des Objektträgers, wo häufig falsch hohe Comet-Werte gemessen werden.

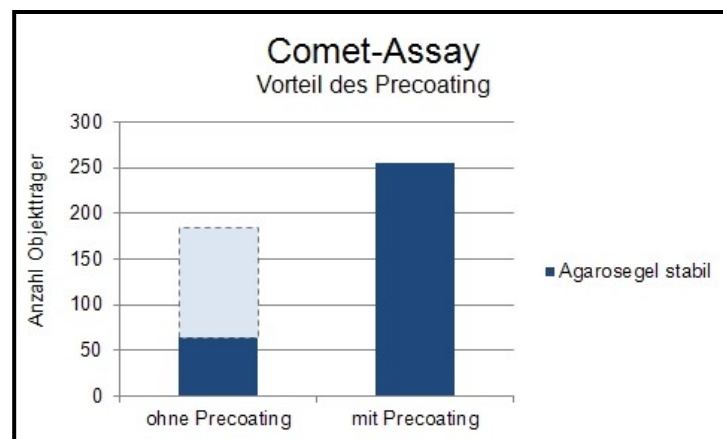


Abbildung 21: Precoating beim Comet-Assay; von insgesamt 256 Objektträgern sind nach dem Precoating der OT keine Agarosegele abgeschwommen; ohne Precoating waren es 120 Gele bei 184 OT (65 %).

4.3 Mesenchymale Stammzellen: klinische Anwendung

Es gibt viele Gründe, weshalb mesenchymale Stammzellen auch klinisch zur Behandlung verschiedener Erkrankungen eingesetzt werden könnten. Einige davon sind zum Beispiel eine vergleichsweise einfache Isolierung, eine gute Vermehrungsfähigkeit *in vitro*, und die Möglichkeit sich in verschiedene Gewebe entwickeln zu können.

4.3.1 Immunmodulation

Da neben MHC II auch kostimulierende Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 auf mesenchymalen Stammzellen fehlen (s. Tab. 1, S.5), werden diese als nicht immunogen betrachtet.

Durch mehrere Faktoren wirken MSCs *in vitro* und *in vivo* sogar immunsuppressiv (s. Abb. 3, S.5) [104].

In Kokulturen mit T-Zellen bewirken sie in den Lymphozyten neben der Hochregulation von p27 auch eine verminderte Cyclin D2 Expression und damit einen Zellzyklus-Arrest in der G0/G1 Phase. Dadurch wird die Vermehrung aktivierter Lymphozyten verhindert [105]. Die Funktion von B-Zellen wird ebenfalls beeinflusst. MSCs beeinträchtigen *in vitro* die Produktion von Antikörpern und damit die Fähigkeit zur Opsonierung [106].

Die immunsuppressive Wirkung wird unter anderem durch die Synthese von NO, Prostaglandin E2, HLA-G und dem Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) erreicht. IDO katalysiert den Abbau von Tryptophan zu Kynurenin; die gesteigerte Synthese von IDO bewirkt also einen Mangel an Tryptophan. Tryptophan wird jedoch vor allem von stimulierten und sich vermehrenden T-Zellen benötigt [107]. HLA-G ist ein immunsuppressiv wirkendes Protein, welches beispielsweise auch von Trophoblasten gebildet wird und so zur feto-maternalen Toleranz beiträgt [108]. Auch die Funktion von antigen-präsentierenden dendritischen Zellen wird beeinflusst. So bewirken MSCs neben einer verminderten Expression von kostimulierenden Molekülen (CD80, CD86) [109, 110] auch eine verminderte Synthese pro-inflammatorischer Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) und Interferon γ (INF- γ) [9, 58, 111–115].

4.3.2 Engraftment nach Transplantation hämatopoietischer Stammzellen

Durch das Engraftment von HSCs entstehen im Knochenmark innerhalb weniger Wochen nach Transplantation neue Blutzellen. Bemerkenswert ist, dass die Stromazellen im Knochenmark (MSCs) durch die vor der Transplantation durchgeführte myeloablative Therapie nicht zerstört werden. Sie können somit die von den transplantierten Zellen ausgehende Hämatopoese durch Wachstumsfaktoren, Zellinteraktionen und Zytokine unterstützen.

Man unterscheidet zwischen einer autologen Transplantation (Patient ist Spender und Empfänger) und einer allogenen Transplantation (Fremdspender). Bei der Wahl eines Fremdspenders ist auf eine möglichst große Übereinstimmung der HLA Gene zu achten. Nur so ist eine gute Interaktion zwischen neu entstandenen

T-Zellen und antigen-präsentierenden Zellen des Patienten möglich, was eine ausreichende Immunantwort gewährleistet. Außerdem kann so das Risiko einer graft-versus-host Reaktion vermindert werden (s.u.). Ein Graftversagen ist eine frühe Komplikation der allogenen Transplantation und ist die Folge einer immunologischen Reaktion (HLA-mismatching, HLA-Alloimmunisierung) gegen die transplantierten Zellen, bzw. einer zu geringen Zahl transplantiertes hämatopoietischer Stammzellen [1, 116].

Mit klinischen Studien wird nun untersucht, ob sich das Risiko eines Graftversagens nach HSCT durch die Ko-Transplantation von MSCs minimieren lässt. So zeigten Tierversuche mit NOD/SCID Mäusen, dass mesenchymale Stammzellen das Engraftment unterstützen können [117, 118]. Die sichere Durchführbarkeit der *ex vivo* Expansion und Reinfusion mesenchymaler Stammzellen beim Menschen zeigten Lazarus et al. schon 1995 [119]. Sie isolierten aus dem Knochenmark von 23 Patienten mit hämatologischen Malignomen in Remission MSCs und infundierten nach 4-7 Wochen in Kultur bei 15 Patienten die autologen Zellen ohne auftretende Nebenwirkungen.

Bei einer großen Studie wurden 46 Patienten 4 Stunden vor der HSCT *in vitro* expandierte MSCs ($1,0 - 5,0 \times 10^6/\text{kg}$) transfundiert. Auch hier konnten keine Nebenwirkungen nach MSC Gabe beobachtet werden. Allerdings konnte in dieser Studie das Engraftment der hämatopoietischen Zellen im Vergleich mit Kontrollgruppen nicht signifikant beschleunigt werden. Auch das Risiko einer GVHD war im Vergleich mit einer Kontrollgruppe nicht geringer [120].

Jedoch zeigten andere Studien vielversprechendere Ergebnisse: Ball et al. zeigten, dass im Vergleich von 15% Graftversagen bei 47 Kontrollen, es bei der Ko-Transplantation von haploidenten HSCs und *ex vivo* expandierten MSCs zu einem anhaltenden Engraftment und keinem Auftreten von Nebenwirkungen kam [121]. In einer anderen Studie konnte durch eine zusätzliche Transplantation von MSCs bei drei Patienten mit einem vorherigen Graftversagen ein schnelles Engraftment bei einer zweiten HSCT erreicht werden. Bei dieser Studie wurden ebenfalls erfolgreich vier weiteren Patienten mit einer primären HSCT zusätzlich MSCs infundiert [122].

Mesenchymale Stammzellen wurden des Weiteren zwei Patienten mit schwerer aplastischer Anämie zusätzlich zu den HSCs verabreicht. Die Patienten erlitten bei einer zuvor durchgeführten HSCT mit HSCs von denselben Spendern ein Graftversagen. Die zweite HSCT zeigte dann sowohl ein gutes Engraftment, als auch keine klinisch ausgeprägte GVHD [123].

4.3.3 Graft versus Host Disease

T-Lymphozyten im Transplantat allogener hämatopoietischer Stammzellen können eine Gefahr für den Transplantatempfänger darstellen. Sie können nämlich im Rahmen einer graft-versus-host-reaction (GVHD) gegen als „fremd“ erkannte human leucocyte antigen (HLA) des Empfängers reagieren. Die alloreaktiven Zellen gelangen aus der Blutbahn in die sekundären lymphatischen Organe und werden dort durch eine Interaktion mit antigen-präsentierenden Zellen (APCs) aktiviert. Die aktivierten Zellen schädigen vor allem Gewebe, welches durch die vor der Transplantation durchgeführte Chemo-, und Radiotherapie am meisten beeinträchtigt wurde: Haut, Leber und Gastrointestinaltrakt. Es wird zwischen einer akuten (Aufreten von Symptomen <100 Tagen nach Transplantation) und einer chronischen Form (Aufreten von Symptomen >100 Tagen nach Transplantation) unterschieden. Desweiteren lässt sich die Erkrankung in 4 Stadien einteilen (Grading, s. Tab. 4) [1].

	Haut (Exanthem)	GI-Trakt (Diarrhö / Tag)	Leber (Bilirubin in mg/dl)
Grad I	25% der Körperoberfläche	500 – 1000 ml	2 – 3
Grad II	25 - 50% der Körperoberfläche	1000 – 1500 ml	3 – 6
Grad III	Erythrodermie	> 1500 ml	6 – 15
Grad IV	Desquamation und Blasenbildung	Ileus	> 15

Tabelle 4: klinische Einteilung der GVHD; die GVHD kann abhängig von der Schädigung von Haut, GI-Trakt und Leber in vier Grade eingeteilt werden.

Die graft-versus-host Reaktion ist eine häufige Komplikation und eine Hauptursache für die Letalität nach einer Knochenmarkstransplantation.

Als Therapie werden zurzeit vor allem Glukokortikoide (MPD) und andere Immunsuppressiva wie Cyclosporin A (CsA), Tacrolimus und Methotrexat (MTX), sowie monoklonale Antikörper (Infliximab, Daclizumab) verwendet.

Die Chance für das Auftreten einer GVHD lässt sich durch eine selektive Entfernung von T-Zellen im Transplantat verringern. Dies ist zum Beispiel durch selektiv an T-Zellen bindende monoklonale Antikörper möglich. Allerdings führte dies in klinischen Studien auch zu einer höheren Rate an Grafversagen und Erkrankungsrezidiven, da die alloreaktiven T-Zellen auch gegen maligne Zellen des Patienten reagieren können: sog. graft-versus-leukemia (GVL) Effekt [116, 124, 125].

Da MSCs ebenfalls in der Lage sind eine Immunantwort abzuschwächen (s.o.), können diese auch zur Behandlung einer GVHD eingesetzt werden. So wurden im Rahmen einer Phase II Studie 55 Patienten mit einer schweren steroid-resistenten Form der akuten GVHD mit der Gabe von *ex vivo* expandierten MSCs behandelt (mittlere Dosis: $1,4 \times 10^6$ Zellen/ kg Körpergewicht) [126]. Die Patienten erhielten zwischen ein und fünf Dosen MSCs als Infusion. Die Spender waren einmal Geschwister (5 \times HLA-identent, 18 \times haploident) und Drittpersonen (60 \times HLA-mismatch). Von den 55 Patienten erlangten 30 eine komplette Remission und 9 eine Verbesserung der Symptomatik. Bemerkenswert ist ebenfalls, dass keine Nebenwirkungen während oder unmittelbar nach der Infusion auftraten, und die Wirksamkeit unabhängig vom HLA-match war.

Fang et al. zeigten, dass auch aus dem Fettgewebe isolierte MSCs eingesetzt werden können [127]. Die Zellen wurden 6 Patienten mit einer schweren steroid-resistenten GVHD Grad III-IV intravenös verabreicht ($1,0 \times 10^6$ Zellen pro kg Körpergewicht). Bei 5 Patienten kam es zu einer kompletten Remission; nach 40 Monaten waren noch 4 Patienten am Leben. Auch bei dieser Studie kam es zu keinen akuten Nebenwirkungen der Therapie. Andere Studien kamen jedoch zu weniger beeindruckenden Ergebnissen, wobei bei diesen auch andere Faktoren wie eine andere Methodik der *ex vivo* Expansion, Dosierung der Zellen, Anzahl der Infusionen und das Intervall zwischen dem Auftreten der Erkrankung und der ersten Infusion der Zellen eine Rolle spielen könnten. Außerdem zeigte eine randomisierte Studie, in welcher 10 Patienten zusätzlich zu einer HSCT mit MSCs

behandelt wurden, dass im Vergleich mit einer Kontrollgruppe (15 Patienten) es zwar zur signifikanten Reduktion der GVHD, gleichzeitig jedoch zu einer erhöhten Rate an Rezidiven kam [128–130].

Trotzdem zeigen diese Studien, dass die Therapie schwerer Formen der GVHD mit MSCs eine sichere Alternative zu den bisherigen Behandlungsmöglichkeiten sein könnte.

Mittlerweile befindet sich mit Prochymal®, aus Knochenmark gesunder Spender gewonnene MSCs, auch ein Medikament in einer Phase III Erprobung. Es soll neben der steroid-refraktären GVHD auch bei Mb. Crohn, Diabetes Mellitus Typ I, und Herzerkrankungen eingesetzt werden können. Nach erfolgsversprechenden Ergebnissen einer Phase II Studie, in welcher die Wirksamkeit von Prochymal® als Mittel der ersten Wahl Behandlung gegen akute GVHD erprobt wurde [131], wurde von der FDA im Dezember 2007 für Prochymal® der „Fast-Track“ Status für eine schnellere Zulassung verliehen.

4.3.4 Regeneration geschädigter Gewebe

Da mesenchymale Stammzellen das Potential besitzen in verschiedenem Gewebe zu differenzieren, wird zurzeit auch der Einsatz für nicht-hämatologische Erkrankungen untersucht.

Osteogenesis Imperfecta (OI) wird durch Mutationen von Kollagen Typ I und dadurch resultierende Störungen im Kollagenstoffwechsel hervorgerufen. Die Patienten leiden vor allem unter Skelettdeformitäten, Frakturneigung, Osteopenie und Minderwuchs [43, 132].

Horwitz et al. zeigten 1999 erstmals bei drei Patienten, dass drei Monate nach allogener Knochenmarktransplantation und Engraftment der mesenchymalen Stammzellen eine gesteigerte Knochendichte, verbessertes Wachstum und eine reduzierte Rate an Knochenbrüchen auszumachen war [133]. Die mögliche Behandlung der Krankheit mit MSCs konnte auch in weiteren Studien belegt werden [132, 134].

Auch die Transplantation allogener gewonnener fetaler MSCs *in utero* bei einer Patientin mit schwerer OI und multiplen intrauterinen Frakturen zeigte Erfolg. Die Patientin wurde ab dem vierten Monat zusätzlich mit Bisphosphonaten behandelt und zeigte mit zwei Jahren eine normale psychomotorische Entwicklung und ein normales Wachstum [135].

Eine Therapie mit mesenchymalen Stammzellen könnte ebenfalls sinnvoll sein um die ventrikuläre Leistung nach einem Myokardinfarkt zu verbessern. *In vitro* konnte eine Differenzierung von MSCs in Kardiomyozyten durch die Behandlung mit 5-Azacytidin nachgewiesen werden [136]. Auch Tiermodelle zeigten, dass *in situ* injizierte MSCs nach einer Woche Differenzierungsmerkmale von Kardiomyozyten aufweisen können [137], bzw. nach einer Vorbehandlung mit 5-Azacytidin die Herzfunktion des zuvor geschädigten Herzens verbessern können. Auch konnte neben einer vermehrten Angiogenese im Vergleich mit einer Kontrollgruppe [138, 139] eine Reduktion der Infarktgröße und ein veringertes ventrikulärer Umbau festgestellt werden [140].

In klinischen Versuchen konnte bisher jedoch noch kein eindeutiger Nutzen festgestellt werden: In einer randomisierten Studie wurden 47 Patienten mit einem Vorderwandinfarkt neben einer PCI (percutaneous coronary intervention) auch mit einer intracoronaren Injektion autologer MSCs behandelt. Im Vergleich mit einer Kontrollgruppe von 50 Patienten konnte nach sechs Monaten kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) oder der Infarktgröße festgestellt werden [141].

Andere Studien zeigten aber, dass die zusätzliche Injektion von MSCs zu einem besseren Ergebnis führt als eine alleinige PCI. Chen et al. zeigten in einer randomisierten Studie mit insgesamt 48 Patienten mit schwerem ischämischen Herzversagen, dass eine Stammzelltherapie zu einer signifikant verbesserten Herzleistung führt (↑ LVEF, ↓ enddiastolisches linksventrikuläres Volumen, ↑ Belastbarkeit) [142].

Auch Cao et al. beschrieben nach einem follow-up von 4 Jahren eine signifikant verbesserte Herzfunktion bei Patienten mit einem Myokardinfarkt und Transplantation autologer MSCs im Vergleich mit einer Kontrollgruppe [143].

Zurzeit werden viele weitere Indikationen für die Therapie mit mesenchymalen Stammzellen erforscht, wie zum Beispiel Diabetes Mellitus Typ I [144], Morbus Crohn [145], neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson [146], Autoimmunerkrankungen wie Systemischer Lupus Erythematoses (SLE) [147] und viele weitere [27]. Der vielfältige Einsatz dieser Stammzellen beruht vor allem auf der Fähigkeit zur Differenzierung und Immunmodulation.

Trotzdem sind noch viele Fragen zum Beispiel bezüglich der Dosierung, Einfluss der *in vitro* Expansion und Langzeitfolgen der Transplantation zu beantworten, bevor MSCs regulär als Therapeutikum eingesetzt werden können.

4.4 HSC Nische: Einfluss mesenchymaler Stammzellen

Für die Erhaltung hämatopoietischer Stammzellen und zur Regulation von self-renewal und Differenzierung sind zelluläre, parakrine und humorale Faktoren notwendig. Diese interagieren mit den Stammzellen in definierten Kompartments des Knochenmarks, sog. Stammzell-Nischen (engl.: stem cell niche) [2].

Eine wichtige Rolle nehmen hier Osteoblasten des Endosteums ein. Das Endosteum ist die zelluläre Auskleidung des Knochenmarkes [2, 148]. HSCs stehen mit den Osteoblasten durch Adhäsionsmoleküle wie N-Cadherin und β -Catenin in Kontakt und werden von diesen durch eine Vielzahl von Faktoren wie Chemokinen (CXCL12, wichtig für Motilität und Migration der HSCs) und dem KIT-Liganden (membran gebundener SCF) beeinflusst [2, 149]. Die Aktivität der Osteoblasten wiederum wird einerseits durch BMP (bone morphogenic protein) reguliert [150], und andererseits durch PTH (parathormone) gesteigert [151]. Auch die HSCs selbst nehmen Einfluss auf die Stammzell-Nische, indem sie beispielsweise die Differenzierung von Zellen des Knochenmarkstromas in Osteoblasten regulieren [149].

Eine enge Beziehung wurde auch für HSCs und dem fenestrierten Endothel sinusoidaler Gefäße im Knochenmark beschrieben [49]. Die Interaktion zwischen den Zellen lässt sich einmal durch eine gemeinsame Precursorzelle erklären [152].

Eine *in vitro* Expansion von HSCs kann auch durch Endothelzellen unterstützt werden, die aus dem Dottersack oder der Aorta/Gonaden/Mesonephros Region gewonnen wurden [153, 154]. Außerdem ist auffällig, dass alle Organe mit sinusoidalem Endothel (Leber, Milz, Knochenmark) zur Hämatopoese fähig sind [48].

Auch mesenchymale Stammzellen üben im Knochenmark einen Einfluss auf HSCs aus. In der Erhaltung primitiver HSCs scheint vor allem der Zell-Zell-Kontakt eine wichtige Rolle zu spielen [54]. So sind MSCs *in vitro* unter anderem durch eine β 1-Integrin abhängige Adhäsion in der Lage, HSCs eher zur Selbsterneuerung als zur asymmetrischen Teilung anzuregen und so im primitiven Zustand zu halten [155]. Vor allem aus dem Knochenmark gewonnene MSCs scheinen sowohl durch eine vermehrte Expression von Adhäsionsproteinen wie VCAM1 (vascular cell adhesion molecule 1), NCAM1 (neural cell adhesion molecule 1) und Integrinen, als auch durch exkretorische Faktoren wie IGFBP (insulin-like growth factor binding protein), Pleiotrophin (PTN) und Osteopontin (SPP1) HSCs zu beeinflussen [55].

Jing et al. beschreiben in einem *in vitro* Versuch drei Schichten, in welchen sich HSCs relativ zu MSCs befinden: nicht adhärenente HSCs, an der Oberfläche von MSCs adhärenente Zellen (phase-bright cells) und eine Schicht von HSCs, welche sich unter der MSC-Schicht befand (phase-dim cells) [50]. In diesem Modell behielten vor allem phase-dim cells einen primitiven Status und teilten sich signifikant weniger als HSCs in den anderen Schichten. Außerdem scheint für die Verteilung der Zellen sowohl die Interaktion zwischen dem Chemokinrezeptor CXCR4 und SDF-1 (stromal cell-derived factor-1), als auch die Adhäsion über Integrine eine wichtige Rolle zu spielen.

Hämatopoietischen Stammzellen werden aber noch durch weitere Faktoren beeinflusst. So haben neben den Zellen auch die extrazellulären Matrix [156] und die nervale Versorgung des Knochenmarks [157, 158] einen Einfluss auf die Hämatopoese.

Literaturverzeichnis

- [1] Parham P. The Immune System. 3rd ed. London, New York: Garland Science; 2009.
- [2] Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6(2):93–106. Available from: URL: doi:10.1038/nri1779.
- [3] Sadler TW, Langman J, Drews U. *Medizinische Embryologie: Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen.* 10., korrigierte Aufl. Stuttgart: Thieme; 2003. Available from: URL: <http://www.gbv.de/dms/hebis-darmstadt/toc/109094867.pdf>.
- [4] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5):861–72. Available from: URL: doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.
- [5] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448(7151):313–7. Available from: URL: doi:10.1038/nature05934.
- [6] Cohnheim J. *Über Entzündung und Eiterung.* Leipzig: Barth; 1914. (Klassiker der Medizin).
- [7] Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol.* 1974; 2(2):83–92.
- [8] Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* 1976; 4(5):267–74.
- [9] Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007; 25(11):2739–49. Available from: URL: doi:10.1634/stemcells.2007-0197.
- [10] Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1980; (151):294–307.

- [11] Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994; 21(3):429–35.
- [12] Liu Z, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* 2009; 106(6):984–91. Available from: URL: doi:10.1002/jcb.22091.
- [13] Stock P, Brückner S, Ebensing S, Hempel M, Dollinger MM, Christ B. The generation of hepatocytes from mesenchymal stem cells and engraftment into murine liver(*). *Nat Protoc* 2010; 5(4):617–27. Available from: URL: doi:10.1038/nprot.2010.7.
- [14] Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001; 98(9):2615–25.
- [15] Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 1980; 56(2):289–301.
- [16] Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7(5):393–5. Available from: URL: doi:10.1080/14653240500319234.
- [17] Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonné A, Delorme B, Héroult O et al. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 2007; 25(7):1737–45. Available from: URL: doi:10.1634/stemcells.2007-0054.
- [18] Ringe J, Strassburg S, Neumann K, Endres M, Notter M, Burmester G et al. Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J. Cell. Biochem.* 2007; 101(1):135–46. Available from: URL: doi:10.1002/jcb.21172.
- [19] Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells* 2006; 24(4):1030–41. Available from: URL: doi:10.1634/stemcells.2005-0319.
- [20] Bobis S, Jarocho D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2006; 44(4):215–30.

- [21] Gronthos S, Zannettino ACW, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J. Cell. Sci.* 2003; 116(Pt 9):1827–35.
- [22] Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991; 78(1):55–62.
- [23] Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell. Physiol.* 1999; 181(1):67–73. Available from: URL: doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199910)181:1<67::AID-JCP7>3.0.CO;2-C.
- [24] Boiret N, Rapatel C, Veyrat-Masson R, Guillouard L, Guérin J, Pigeon P et al. Characterization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow. *Exp. Hematol.* 2005; 33(2):219–25. Available from: URL: doi:10.1016/j.exphem.2004.11.001.
- [25] Anker PS in 't, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FHJ, Willemze R et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 2003; 102(4):1548–9. Available from: URL: doi:10.1182/blood-2003-04-1291.
- [26] Motaln H, Schichor C, Lah TT. Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies. *Cancer* 2010. Available from: URL: doi:10.1002/cncr.25056.
- [27] Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells* 2010; 28(3):585–96. Available from: URL: doi:10.1002/stem.269.
- [28] Wagner W, Ho AD. Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev* 2007; 3(4):239–48. Available from: URL: doi:10.1007/s12015-007-9001-1.
- [29] Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell. Mol. Med.*; 8(3):301–16.
- [30] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.

- Cytherapy 2006; 8(4):315–7. Available from: URL: doi:10.1080/14653240600855905.
- [31] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, Ugarte DA de, Huang JI, Mizuno H et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 2002; 13(12):4279–95. Available from: URL: doi:10.1091/mbc.E02-02-0105.
- [32] Nakahara H, Dennis JE, Bruder SP, Haynesworth SE, Lennon DP, Caplan AI. In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp. Cell Res.* 1991; 195(2):492–503.
- [33] Hanson SE, Kim J, Johnson BHQ, Bradley B, Breunig MJ, Hematti P et al. Characterization of mesenchymal stem cells from human vocal fold fibroblasts. *Laryngoscope* 2010; 120(3):546–51. Available from: URL: doi:10.1002/lary.20797.
- [34] Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J. Dent. Res.* 2009; 88(9):792–806. Available from: URL: doi:10.1177/0022034509340867.
- [35] Zeddou M, Briquet A, Relic B, Josse C, G Malaise M, Gothot A et al. The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood. *Cell biology international* 2010. Available from: URL: doi:10.1042/CBI20090414.
- [36] Anker PS in 't, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* 2003; 88(8):845–52.
- [37] Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2000; 2(6):477–88.
- [38] da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell. Sci.* 2006; 119(Pt 11):2204–13. Available from: URL: doi:10.1242/jcs.02932.
- [39] Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996; 273(5272):242–5.

- [40] Yang L, Bryder D, Adolfsson J, Nygren J, Månsson R, Sigvardsson M et al. Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood* 2005; 105(7):2717–23. Available from: URL: doi:10.1182/blood-2004-06-2159.
- [41] Christensen JL, Weissman IL. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001; 98(25):14541–6. Available from: URL: doi:10.1073/pnas.261562798.
- [42] Waldeyer A. *Anatomie des Menschen*: Gruyter; 2002.
- [43] Siegenthaler, Blum, editors. *Klinische Pathophysiologie*: Thieme, Stuttgart; 2006.
- [44] Sieburg HB, Cho RH, Dykstra B, Uchida N, Eaves CJ, Muller-Sieburg CE. The hematopoietic stem compartment consists of a limited number of discrete stem cell subsets. *Blood* 2006; 107(6):2311–6. Available from: URL: doi:10.1182/blood-2005-07-2970.
- [45] Müller-Sieburg CE, Cho RH, Thoman M, Adkins B, Sieburg HB. Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood* 2002; 100(4):1302–9.
- [46] Guo Y, Lübbert M, Engelhardt M. CD34- hematopoietic stem cells: current concepts and controversies. *Stem Cells* 2003; 21(1):15–20. Available from: URL: doi:10.1634/stemcells.21-1-15.
- [47] Kauser K, Andreeff M. Bone marrow-derived progenitors: [with 6 tables]. Berlin: Springer; 2007. (Handbook of experimental pharmacology; vol 180). Available from: URL: <http://www.gbv.de/dms/bs/toc/52222279x.pdf>.
- [48] Wagers AJ. Stem cell grand SLAM. *Cell* 2005; 121(7):967–70. Available from: URL: doi:10.1016/j.cell.2005.06.017.
- [49] Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 2005; 121(7):1109–21. Available from: URL: doi:10.1016/j.cell.2005.05.026.
- [50] Jing D, Fonseca A, Alakel N, Fierro FA, Muller K, Bornhauser M et al. Hematopoietic stem cells in coculture with mesenchymal stromal cells -

- modelling the niche compartments in vitro. *Haematologica* 2010. Available from: URL: doi:10.3324/haematol.2009.010736.
- [51] Sorrentino BP. Clinical strategies for expansion of haematopoietic stem cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4(11):878–88. Available from: URL: doi:10.1038/nri1487.
- [52] Heike T, Nakahata T. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines. *Biochim. Biophys. Acta* 2002; 1592(3):313–21.
- [53] Ueda T, Tsuji K, Yoshino H, Ebihara Y, Yagasaki H, Hisakawa H et al. Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J. Clin. Invest.* 2000; 105(7):1013–21. Available from: URL: doi:10.1172/JCI8583.
- [54] Alakel N, Jing D, Muller K, Bornhauser M, Ehninger G, Ordemann R. Direct contact with mesenchymal stromal cells affects migratory behavior and gene expression profile of CD133+ hematopoietic stem cells during ex vivo expansion. *Exp. Hematol.* 2009; 37(4):504–13. Available from: URL: doi:10.1016/j.exphem.2008.12.005.
- [55] Wagner W, Roderburg C, Wein F, Diehlmann A, Frankhauser M, Schubert R et al. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem Cells* 2007; 25(10):2638–47. Available from: URL: doi:10.1634/stemcells.2007-0280.
- [56] Li W, Johnson SA, Shelley WC, Yoder MC. Hematopoietic stem cell repopulating ability can be maintained in vitro by some primary endothelial cells. *Exp. Hematol.* 2004; 32(12):1226–37. Available from: URL: doi:10.1016/j.exphem.2004.09.001.
- [57] Mishima S, Nagai A, Abdullah S, Matsuda C, Taketani T, Kumakura S et al. Effective ex vivo expansion of hematopoietic stem cells using osteoblast-differentiated mesenchymal stem cells is CXCL12 dependent. *European journal of haematology* 2010. Available from: URL: doi:10.1111/j.1600-0609.2010.01419.x.
- [58] Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp. Hematol.* 2004; 32(5):414–25. Available from: URL: doi:10.1016/j.exphem.2004.02.004.

- [59] Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 1994; 8(21):2540–51.
- [60] Chaurio RA, Janko C, Muñoz LE, Frey B, Herrmann M, Gaipf US. Phospholipids: key players in apoptosis and immune regulation. *Molecules* 2009; 14(12):4892–914. Available from: URL: doi:10.3390/molecules14124892.
- [61] Schmidt, Lang, editors. *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie*: Springer Berlin; 2007.
- [62] Span LFR, Pennings AHM, Vierwinden G, Boezeman JBM, Raymakers RAP, Witte T de. The dynamic process of apoptosis analyzed by flow cytometry using Annexin-V/propidium iodide and a modified in situ end labeling technique. *Cytometry* 2002; 47(1):24–31.
- [63] *Wissenschaftliche Tabellen Geigy: Statistik.*: 8. Aufl. Basel; 1985.
- [64] HAYFLICK L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp. Cell Res.* 1965; 37:614–36.
- [65] HAYFLICK L, MOORHEAD PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 1961; 25:585–621.
- [66] Witkowski JA. Alexis Carrel and the mysticism of tissue culture. *Med Hist* 1979; 23(3):279–96.
- [67] Carrel A, Ebeling AH. AGE AND MULTIPLICATION OF FIBROBLASTS. *J. Exp. Med.* 1921; 34(6):599–623.
- [68] Hayflick L. Biological aging is no longer an unsolved problem. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007; 1100:1–13. Available from: URL: doi:10.1196/annals.1395.001.
- [69] Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Bork S, Guelly C, Obenauf AC et al. Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar under different culture conditions. *Haematologica* 2010. Available from: URL: doi:10.3324/haematol.2009.011692.
- [70] Kumar S, Chanda D, Ponnazhagan S. Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells. *Gene Ther.* 2008; 15(10):711–5. Available from: URL: doi:10.1038/gt.2008.35.

- [71] Fehrer C, Lepperdinger G. Mesenchymal stem cell aging. *Exp. Gerontol.* 2005; 40(12):926–30. Available from: URL: doi:10.1016/j.exger.2005.07.006.
- [72] Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol.* 2006; 7:14. Available from: URL: doi:10.1186/1471-2121-7-14.
- [73] Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS ONE* 2008; 3(5):e2213. Available from: URL: doi:10.1371/journal.pone.0002213.
- [74] Wagner W, Bork S, Horn P, Kronic D, Walenda T, Diehlmann A et al. Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS ONE* 2009; 4(6):e5846. Available from: URL: doi:10.1371/journal.pone.0005846.
- [75] Izadpanah R, Kaushal D, Kriedt C, Tsien F, Patel B, Dufour J et al. Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* 2008; 68(11):4229–38. Available from: URL: doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5272.
- [76] Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* 2004; 22(5):675–82. Available from: URL: doi:10.1634/stemcells.22-5-675.
- [77] Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000; 97(7):3213–8. Available from: URL: doi:10.1073/pnas.070034097.
- [78] Zglinicki T von, Saretzki G, Döcke W, Lotze C. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp. Cell Res.* 1995; 220(1):186–93. Available from: URL: doi:10.1006/excr.1995.1305.
- [79] Jin Y, Kato T, Furu M, Nasu A, Kajita Y, Mitsui H et al. Mesenchymal stem cells cultured under hypoxia escape from senescence via down-regulation of p16 and extracellular signal regulated kinase. *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun. 2010; 391(3):1471–6. Available from: URL: doi:10.1016/j.bbrc.2009.12.096.
- [80] Schumacher B, Garinis GA, Hoeijmakers JHJ. Age to survive: DNA damage and aging. *Trends Genet.* 2008; 24(2):77–85. Available from: URL: doi: 10.1016/j.tig.2007.11.004.
- [81] Horn F. *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium ; [ideal für die neue AO]. 3., grundlegend überarb. und erw. Aufl...* Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2005.
- [82] Alberts B. *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie. 3.Aufl...* Weinheim: Wiley-VCH-Verl.; 2005.
- [83] Chen J, Hales CN, Ozanne SE. DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(22):7417–28. Available from: URL: doi:10.1093/nar/gkm681.
- [84] Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 2004; 26(3):249–61. Available from: URL: doi:10.1385/MB:26:3:249.
- [85] Kenyon J, Gerson SL. The role of DNA damage repair in aging of adult stem cells. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(22):7557–65. Available from: URL: doi:10.1093/nar/gkm1064.
- [86] Vijg J. The role of DNA damage and repair in aging: new approaches to an old problem. *Mech. Ageing Dev.*; 129(7-8):498–502. Available from: URL: doi:10.1016/j.mad.2008.02.009.
- [87] Zhang H. Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging. *J. Cell. Physiol.* 2007; 210(3):567–74. Available from: URL: doi:10.1002/jcp.20919.
- [88] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35(4):495–516. Available from: URL: doi:10.1080/ 019262307-01320337.
- [89] Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, Ortiz C, Criollo A, Tasdemir E et al. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. *Gerontology* 2008; 54(2):92–9. Available from: URL: doi:10.1159/000129697.
- [90] Severin FF, Skulachev VP. [Programmed cell death as a target to interrupt the aging program]. *Adv Gerontol* 2009; 22(1):37–48.

- [91] D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J. Bone Miner. Res.* 1999; 14(7):1115–22. Available from: URL: doi:10.1359/jbmr.1999.14.7.1115.
- [92] Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 2003; 33(6):919–26.
- [93] Kasper G, Mao L, Geissler S, Draycheva A, Trippens J, Kühnisch J et al. Insights into mesenchymal stem cell aging: involvement of antioxidant defense and actin cytoskeleton. *Stem Cells* 2009; 27(6):1288–97. Available from: URL: doi:10.1002/stem.49.
- [94] Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995; 92(20):9363–7.
- [95] Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol.* 1973; 41(1):181–90.
- [96] Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 1985; 43(2 Pt 1):405–13.
- [97] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391):1145–7.
- [98] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266(5193):2011–5.
- [99] Zimmermann S, Voss M, Kaiser S, Kapp U, Waller CF, Martens UM. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia* 2003; 17(6):1146–9. Available from: URL: doi:10.1038/sj.leu.2402962.
- [100] Meirelles LdS, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br. J. Haematol.* 2003; 123(4):702–11.
- [101] Hiyama E, Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells. *Br. J. Cancer* 2007; 96(7):1020–4. Available from: URL: doi:10.1038/sj.bjc.6603671.

- [102] Liu L, DiGirolamo CM, Navarro PAAS, Blasco MA, Keefe DL. Telomerase deficiency impairs differentiation of mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* 2004; 294(1):1–8. Available from: URL: doi:10.1016/j.yexcr.2003.10.031.
- [103] Yanada S, Ochi M, Kojima K, Sharman P, Yasunaga Y, Hiyama E. Possibility of selection of chondrogenic progenitor cells by telomere length in FGF-2-expanded mesenchymal stromal cells. *Cell Prolif.* 2006; 39(6):575–84. Available from: URL: doi:10.1111/j.1365-2184.2006.00397.x.
- [104] Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol.* 2007; 28(5):219–26. Available from: URL: doi:10.1016/j.it.2007.03.001.
- [105] Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005; 105(7):2821–7. Available from: URL: doi:10.1182/blood-2004-09-3696.
- [106] Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006; 107(1):367–72. Available from: URL: doi:10.1182/blood-2005-07-2657.
- [107] Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004; 103(12):4619–21. Available from: URL: doi:10.1182/blood-2003-11-3909.
- [108] Carosella ED. [HLA-G: from fetomaternal tolerance to organ grafting]. *Bull. Mem. Acad. R. Med. Belg.* 2009; 164(3-4):87-99; discussion 99-101.
- [109] Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003; 101(9):3722–9. Available from: URL: doi:10.1182/blood-2002-07-2104.
- [110] Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol. Lett.* 2009; 126(1-2): 37–42. Available from: URL: doi:10.1016/j.imlet.2009.07.010.

- [111] Siegel G, Schäfer R, Dazzi F. The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Transplantation* 2009; 87(9 Suppl):S45-9. Available from: URL: doi:10.1097/TP.0b013e3181a285b0.
- [112] Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol.* 2003; 31(10):890–6.
- [113] Le Blanc K, Ringdén O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2005; 11(5):321–34. Available from: URL: doi:10.1016/j.bbmt.2005.01.005.
- [114] Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99(10):3838–43.
- [115] Fibbe WE, Noort WA. Mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cell transplantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003; 996:235–44.
- [116] Battiwalla M, Hematti P. Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy* 2009; 11(5):503–15. Available from: URL: doi:10.1080/14653240903193806.
- [117] Anker PS in 't, Noort WA, Kruisselbrink AB, Scherjon SA, Beekhuizen W, Willemze R et al. Nonexpanded primary lung and bone marrow-derived mesenchymal cells promote the engraftment of umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp. Hematol.* 2003; 31(10):881–9.
- [118] Zhou D, Huang S, Huang K, Wu Y, Bao R, Wei J et al. [Mesenchymal stem cells from human cord blood promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34+ cells in NOD/SCID mice]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2005; 26(12):732–5.
- [119] Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant.* 1995; 16(4):557–64.
- [120] Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal

- stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2005; 11(5):389–98. Available from: URL: doi:10.1016/j.bbmt.2005.02.001.
- [121] Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 2007; 110(7):2764–7. Available from: URL: doi:10.1182/blood-2007-04-087056.
- [122] Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, Remberger M, Sundberg B, Arvidson J et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2007; 21(8):1733–8. Available from: URL: doi:10.1038/sj.leu.2404777.
- [123] Fang B, Li N, Song Y, Li J, Zhao RC, Ma Y. Cotransplantation of haploidentical mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells and to reduce the risk of graft failure in two children with severe aplastic anemia. *Pediatr Transplant* 2009; 13(4):499–502. Available from: URL: doi:10.1111/j.1399-3046.2008.01002.x.
- [124] Wang L, Zhao RC. Mesenchymal stem cells targeting the GVHD. *Sci. China, C, Life Sci.* 2009; 52(7):603–9. Available from: URL: doi:10.1007/s11427-009-0091-7.
- [125] Peñas PF, Zaman S. Many faces of graft-versus-host disease. *Australas. J. Dermatol.* 2010; 51(1):1-10; quiz 11. Available from: URL: doi:10.1111/j.1440-0960.2009.00577.x.
- [126] Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008; 371(9624):1579–86. Available from: URL: doi:10.1016/S0140-6736(08)60690-X.
- [127] Fang B, Song Y, Liao L, Zhang Y, Zhao RC. Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Transplant. Proc.* 2007; 39(10):3358–62. Available from: URL: doi:10.1016/j.transproceed.2007.08.103.
- [128] Ning H, Yang F, Jiang M, Hu L, Feng K, Zhang J et al. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot

- clinical study. *Leukemia* 2008; 22(3):593–9. Available from: URL: doi:10.1038/sj.leu.2405090.
- [129] Bonin M von, Stölzel F, Goedecke A, Richter K, Wuschek N, Hölig K et al. Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transplant.* 2009; 43(3):245–51. Available from: URL: doi:10.1038/bmt.2008.316.
- [130] Müller I, Kordowich S, Holzwarth C, Isensee G, Lang P, Neunhoeffler F et al. Application of multipotent mesenchymal stromal cells in pediatric patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol. Dis.;* 40(1):25–32. Available from: URL: doi:10.1016/j.bcnd.2007.06.021.
- [131] Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, Holland K, Rowley S, McGuirk J et al. Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2009; 15(7):804–11. Available from: URL: doi:10.1016/j.bbmt.2008.03.012.
- [132] Horwitz EM, Gordon PL, Koo WKK, Marx JC, Neel MD, McNall RY et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002; 99(13):8932–7. Available from: URL: doi:10.1073/pnas.132252399.
- [133] Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat. Med.* 1999; 5(3):309–13. Available from: URL: doi:10.1038/6529.
- [134] Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD et al. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood* 2001; 97(5):1227–31.
- [135] Le Blanc K, Götherström C, Ringdén O, Hassan M, McMahon R, Horwitz E et al. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation* 2005; 79(11):1607–14.
- [136] Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 2004; 229(7):623–31.

- [137] Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105(1):93–8.
- 138] Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999; 100(19 Suppl):II247-56.
- [139] Mäkelä J, Ylitalo K, Lehtonen S, Dahlbacka S, Niemelä E, Kiviluoma K et al. Bone marrow-derived mononuclear cell transplantation improves myocardial recovery by enhancing cellular recruitment and differentiation at the infarction site. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2007; 134(3):565–73. Available from: URL: doi:10.1016/j.jtcvs.2007.05.004.
- [140] Armiñán A, Gandía C, García-Verdugo JM, Lledó E, Trigueros C, Ruiz-Saurí A et al. Mesenchymal stem cells provide better results than hematopoietic precursors for the treatment of myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010; 55(20):2244–53. Available from: URL: doi:10.1016/j.jacc.2009.08.092.
- [141] Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355(12):1199–209. Available from: URL: doi:10.1056/NEJMoa055706.
- [142] Chen S, Liu Z, Tian N, Zhang J, Yei F, Duan B et al. Intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery. *J Invasive Cardiol* 2006; 18(11):552–6.
- [143] Cao F, Sun D, Li C, Narsinh K, Zhao L, Li X et al. Long-term myocardial functional improvement after autologous bone marrow mononuclear cells transplantation in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: 4 years follow-up. *Eur. Heart J.* 2009; 30(16):1986–94. Available from: URL: doi:10.1093/eurheartj/ehp220.
- [144] Vija L, Farge D, Gautier J, Vexiau P, Dumitrache C, Bourgarit A et al. Mesenchymal stem cells: Stem cell therapy perspectives for type 1 diabetes. *Diabetes Metab.* 2009; 35(2):85–93. Available from: URL: doi:10.1016/j.diabet.2008.10.003.

- [145] Dryden GW. Overview of stem cell therapy for Crohn's disease. *Expert Opin Biol Ther* 2009; 9(7):841–7. Available from: URL: doi:10.1517/14712590902956615.
- [146] Venkataramana NK, Kumar SKV, Balaraju S, Radhakrishnan RC, Bansal A, Dixit A et al. Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Transl Res* 2010; 155(2):62–70. Available from: URL: doi:10.1016/j.trsl.2009.07.006.
- [147] Zhang H, Zeng X, Sun L. Allogenic bone-marrow-derived mesenchymal stem cells transplantation as a novel therapy for systemic lupus erythematosus. *Expert Opin Biol Ther* 2010. Available from: URL: doi:10.1517/14712591003769816.
- [148] Zhu J, Emerson SG. A new bone to pick: osteoblasts and the haematopoietic stem-cell niche. *Bioessays* 2004; 26(6):595–9. Available from: URL: doi:10.1002/bies.20052.
- [149] Barros APDN de, Takiya CM, Garzoni LR, Leal-Ferreira ML, Dutra HS, Chiarini LB et al. Osteoblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells control hematopoietic stem cell migration and proliferation in 3D in vitro model. *PLoS ONE* 2010; 5(2):e9093. Available from: URL: doi:10.1371/journal.pone.0009093.
- [150] Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong W et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003; 425(6960):836–41. Available from: URL: doi:10.1038/nature02041.
- [151] Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003; 425(6960):841–6. Available from: URL: doi:10.1038/nature02040.
- [152] Huber TL, Kouskoff V, Fehling HJ, Palis J, Keller G. Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature* 2004; 432(7017):625–30. Available from: URL: doi:10.1038/nature03122.
- [153] Li W, Johnson SA, Shelley WC, Ferkowicz M, Morrison P, Li Y et al. Primary endothelial cells isolated from the yolk sac and para-aortic splanchnopleura support the expansion of adult marrow stem cells in vitro. *Blood* 2003; 102(13):4345–53. Available from: URL: doi:10.1182/blood-2003-03-0729.

- [154] Ohneda O, Fennie C, Zheng Z, Donahue C, La H, Villacorta R et al. Hematopoietic stem cell maintenance and differentiation are supported by embryonic aorta-gonad-mesonephros region-derived endothelium. *Blood* 1998; 92(3):908–19.
- [155] Gottschling S, Saffrich R, Seckinger A, Krause U, Horsch K, Miesala K et al. Human mesenchymal stromal cells regulate initial self-renewing divisions of hematopoietic progenitor cells by a beta1-integrin-dependent mechanism. *Stem Cells* 2007; 25(3):798–806. Available from: URL: doi:10.1634/stemcells.2006-0513.
- [156] Klein G. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia* 1995; 51(9-10):914–26.
- [157] Iversen PO, Hjeltnes N, Holm B, Flatebo T, Strom-Gundersen I, Ronning W et al. Depressed immunity and impaired proliferation of hematopoietic progenitor cells in patients with complete spinal cord injury. *Blood* 2000; 96(6):2081–3.
- [158] Fuchs R, Stelzer I, Haas HS, Leitinger G, Schauenstein K, Sadjak A. The alpha1-adrenergic receptor antagonists, benoxathian and prazosin, induce apoptosis and a switch towards megakaryocytic differentiation in human erythroleukemia cells. *Ann. Hematol.* 2009; 88(10):989–97. Available from: URL: doi:10.1007/s00277-009-0704-z.
- [159] Fuchs R, Stelzer I, Drees CMP, Schraml E, Sadjak A, Schwinger W. How to stop comets from falling into water – A brief communication to improve efficiency of the Comet-Assay, demonstrated on human mesenchymal stem cells. (currently unpublished)