

**Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin
(Department) Tübingen
Abteilung I
(Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger**

**Immunologische Eigenschaften Mesenchymaler
Stammzellen und klinische Anwendung bei sieben
Kindern**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Sandra Kordowich

aus

Stuttgart

2008

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. G. Bruchelt

2. Berichterstatter:

Privatdozentin Dr. B. Gückel

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
2	EINLEITUNG	6
2.1	IMMUNOLOGISCHE GRUNDLAGEN	6
2.2	DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM.....	7
2.3	DAS ERWORBENE/ADAPTIVE IMMUNSYSTEM	8
2.4	KNOCHENMARK UND HÄMATOPOESE	10
2.5	HLA/MHC ANTIGENE	11
2.6	TRANSPLANTATION	12
2.7	STAMMZELLTRANSPLANTATION/KNOCHENMARKTRANSPLANTATION	13
2.8	KOMPLIKATIONEN DER STAMMZELLTRANSPLANTATION	14
2.9	„MESENCHYMALE STAMMZELLEN“	15
2.9.1	<i>Allgemeines</i>	15
2.9.2	<i>Phänotypisierung</i>	17
2.9.3	<i>Andere Gewebe aus denen MSC gewonnen werden können</i>	19
2.9.4	<i>Unterstützung des Engraftments von HSC</i>	19
2.9.5	<i>Differenzierungspotential</i>	20
2.9.6	<i>Immunologische Eigenschaften</i>	20
2.9.7	<i>MSC aus pathologischen Situationen</i>	24
2.9.8	<i>Klinische Anwendung</i>	25
2.9.9	<i>Isolation und Kulturbedingungen</i>	28
2.10	ZIELE DIESER ARBEIT	30
3	MATERIAL UND METHODEN	31
3.1	GERÄTE.....	31
3.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	31
3.3	CHEMIKALIEN, REAGENZIEN, KITS	32
3.4	ANTIKÖRPER	34
3.5	MEDIEN	35
3.6	ZELLKULTUR UND ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	35
3.6.1	<i>Verwendete Zellen und deren Kultur</i>	35
3.6.2	<i>Lösen der adhärennten MSC</i>	36
3.6.3	<i>Einfrieren und Auftauen von Zellen</i>	36

3.6.4	<i>Zählen von Zellen</i>	37
3.6.5	<i>Gewinnung von MSC aus Knochenmark (MSC_{KM})</i>	38
3.6.6	<i>Gewinnung von MSC aus Synovialflüssigkeit (MSC_{SF})</i>	38
3.6.7	<i>Gewinnung von MSC aus Fettgewebe (MSC_{FAT})</i>	39
3.6.8	<i>Gewinnung von PBMC aus Heparin-Frischblut</i>	39
3.7	PROLIFERATIONSASSAYS UND DURCHFLUSSZYTOMETRIE	40
3.7.1	<i>BrdU Proliferationsassay</i>	40
3.7.2	<i>Durchflusszytometrie und FACS-Analyse</i>	42
3.7.3	<i>Immunphänotypisierung von MSC</i>	43
3.7.4	<i>CFSE-Proliferationsassay</i>	44
3.8	DIFFERENZIERUNGEN UND FÄRBUNGEN VON MSC	49
3.8.1	<i>Adipogene Differenzierung von MSC_{SF}</i>	49
3.8.2	<i>Osteogene Differenzierung von MSC_{SF}</i>	50
3.9	IN EINZELHEILVERSUCHEN MIT MSC BEHANDELTE PATIENTEN	52
4	ERGEBNISSE	53
4.1	VERGLEICH DER MORPHOLOGIE UND DES IMMUNPHÄNOTYPS VON MSC AUS VERSCHIEDENEN GEWEBEN	53
4.2	UNTERSUCHUNGEN DER IMMUNOLOGISCHEN EINFLÜSSE VON MSC	56
4.2.1	<i>BrdU-Proliferationsassay</i>	56
4.2.2	<i>CFSE-Proliferationsassay</i>	57
4.2.3	<i>Wirkung von MSC auf verschiedene Subpopulationen von PBMC</i>	60
4.2.4	<i>Untersuchungen zum Mechanismus der Inhibition: Transwell-System</i>	63
4.2.5	<i>Untersuchungen zum Mechanismus der Inhibition: Überstand</i>	65
4.3	ADIPOGENE UND OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG VON MSC_{SF}	66
4.4	EINZELHEILVERSUCHE	68
5	DISKUSSION	77
5.1	VERGLEICH MESENCHYMALER STAMMZELLEN AUS VERSCHIEDENEN GEWEBEN	78
5.2	NACHWEIS DER IMMUNMODULATORISCHEN EIGENSCHAFTEN VON MSC	79
5.2.1	<i>MSC_{FAT}</i>	80
5.2.2	<i>MSC_{FFPP}</i>	81
5.2.3	<i>MSC_{SF}</i>	82
5.2.4	<i>MSC_{SAA}</i>	84
5.2.5	<i>Subpopulationen</i>	85
5.2.6	<i>Untersuchungen zum Mechanismus der Inhibition</i>	86

5.3	DIFFERENZIERUNG DER MSC _{SF}	87
5.4	KLINISCHER EINSATZ MESENCHYMALER STAMMZELLEN IN DER PÄDIATRIE .	88
5.5	SCHLUSSFOLGERUNG	90
6	ZUSAMMENFASSUNG	92
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	94
8	PUBLIKATIONEN.....	105
9	DANKSAGUNG	106
10	LEBENS LAUF	108

1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i> , Antigenpräsentierende Zelle
BrdU	Bromdesoxyuridin
c-ALL	Akute lymphatische Leukämie vom „common-Typ“
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> , Immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen
CFSE	<i>Carboxyfluorescein diacetate Succinimidyl Ester</i>
CML	Chronisch myeloische Leukämie
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , Medium für die Kultur von MSC
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV-LPD	<i>Epstein-Barr-Virus associated Lymphoproliferative Disease</i> , Epstein-Barr-Virus assoziiertes Lymphoproliferatives Syndrom
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> , Immunologisches Nachweisverfahren
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i> , Durchflusszytometrie
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , fetales Kälberserum
FFP	<i>Fresh Frozen Plasma</i> , Frisch gefrorenes Plasma
FFPP	<i>Fresh Frozen Plasma and Platelets</i> , Frisch gefrorenes Plasma und Thrombozyten
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
GvHD	<i>Graft versus Host Disease</i> , Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit
HSC	<i>Hematopoietic Stem Cell</i> , hämatopoetische Stammzelle
HSCT	<i>Hematopoietic Stem Cell Transplantation</i> , hämatopoetische Stammzelltransplantation
Ig	Immunglobulin
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
IL	Interleukin
JIA	Juvenile idiopathische Arthritis
KG	Körpergewicht
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MMFD	<i>Mismatched Family Donor</i> , nichtpassender familiärer Spender
MMUD	<i>Mismatched Unrelated Donor</i> , nichtpassender unverwandter Spender
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cell</i> , Mesenchymale Stammzelle <i>Multipotent mesenchymal Stromal Cell</i> , multipotente mesenchymale Stromazelle

MSC _{KM}	Mesenchymale Stammzelle, die aus Knochenmark gewonnen wurde
MSC _{FAT}	Mesenchymale Stammzelle, die aus Fettgewebe gewonnen wurde
MSC _{SF}	Mesenchymale Stammzelle, die aus Synovialflüssigkeit gewonnen wurde
MSD	<i>Matched Sibling Donor</i> , passender Geschwisterspender
MSCT	<i>Mesenchymal Stem Cell Transplantation</i> , mesenchymale Stammzelltransplantation
MUD	<i>Matched Unrelated Donor</i> , passender unverwandter Spender
OKT	Monoklonaler Antikörper gegen CD3
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> , Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBSC	<i>Peripheral Blood Stem Cells</i> , periphere Blutstammzellen
PHA	Phytohämagglutinin
RPMI	Medium welches am „ <i>Roswell Park Memorial Institute</i> “ entwickelt wurde
SAA	Schwere aplastische Anämie
Tab.	Tabelle
T-ALL	Akute lymphatische Leukämie, die T-Zellreihe betreffend
T _{H1} , T _{H2}	T-Helferzelle vom Typ 1 bzw. 2

2 Einleitung

2.1 Immunologische Grundlagen

Das Immunsystem des Menschen besteht aus einer Vielzahl verschiedener Komponenten und schützt vor zahlreichen Infektionserregern, wie Viren, Bakterien, Pilzen und anderen Fremdstrukturen. Hierbei spielt die Haut als mechanische Barriere eine ebenso wichtige Rolle, wie Proteine des Blutes oder immunologisch wirksame Zellen.

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Arten des Immunsystems: das angeborene und das erworbene (adaptive) Immunsystem. In beiden Gruppen gibt es jeweils lösliche und zelluläre Bestandteile. So beinhaltet das angeborene Immunsystem zum Beispiel Faktoren des Komplementsystems in seinem löslichen Anteil. Zu seinem zellulären Teil zählen Granulozyten und Makrophagen. Die löslichen Anteile des erworbenen Immunsystems belaufen sich unter anderem auf Antikörper, während B- und T-Lymphozyten den zellulären Teil dieses Systems bilden.

Die einzelnen Komponenten des Immunsystems stehen in ständiger Interaktion untereinander und kommunizieren auch mit Organen, die eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Entwicklung der einzelnen Bestandteile spielen. Hierbei ist das Knochenmark als hauptsächlicher Ursprungsort für die Zellen des Immunsystems zu nennen und der Thymus als ein wichtiger Reifungsort für T-Lymphozyten. Aber auch die Leber mit ihrer Komplementfaktorenbildung und die Lymphknoten als Zwischenstation der Lymphozyten tragen wichtige Rollen.

2.2 Das angeborene Immunsystem

Um bereits von Geburt an vor Erkrankungen durch Mikroorganismen geschützt zu sein, existieren zahlreiche keimbahnkodierte Barrieren. So halten unter anderem die Haut mit einem Säureschutzmantel und der Magensaft durch keimtötende Salzsäure Schädlinge vom Eintreten in den Körper ab. Schleimhautepithelien verhindern durch antimikrobielle Enzyme und Peptide eine Adhäsion von Bakterien. Sekrete, wie Tränenflüssigkeit oder die der Nase und des Darmes, enthalten beispielsweise das Enzym Lysozym, das durch eine Zerstörung der Bakterienoberfläche vor einer ungewünschten Besiedlung mit Krankheitserregern schützt.

Dringt trotz allem ein Infektionserreger in den Körper ein, werden sofort Vorgänge ausgelöst, die dem angeborenen Immunsystem angehören. Makrophagen erkennen über sogenannte *Pattern Recognition Receptors (PRR)* allgemeine Bestandteile von z. B. Bakterienoberflächen, wie sich wiederholende Lipid- oder Kohlenhydratgruppen (Aderem and Ulevitch, 2000; Janeway, Jr. and Medzhitov, 2002). Daraufhin werden sie aktiviert und beginnen mit einer massiven Zytokin- und Chemokinausschüttung. Durch diese werden zum einen immunologisch wirksame Zellen aktiviert, zum anderen Zellen der Peripherie zum Ort des Geschehens gelockt, um dort eine Entzündungsreaktion hervor zu rufen. Die Freisetzung der Mediatoren führt zu einer erhöhten Permeabilität der Blutgefäße, so dass Blut ins Gewebe tritt und somit zu Schwellung (Tumor), Überwärmung (Calor) und Rötung (Rubor) führt. Des Weiteren tritt durch die Wirkung der Zyto- und Chemokine eine Reizung der Nervenfasern auf. Es resultiert eine Schmerzwahrnehmung (Dolor) im betroffenen Gebiet. Zytokine bewirken zusätzlich eine erhöhte Adhäsionskraft des Endothels, so dass vorbeikommende Zellen hängen bleiben und zur Entzündungsstelle einwandern.

Die Frühboten am Ort einer Entzündung sind meist Granulozyten, die hauptsächlich der Aufnahme und Zerstörung körperfremder Zellen dienen. Kurze Zeit später treten auch Monozyten aus dem Blut ins Gewebe über und werden dort zu Makrophagen, die Zellen phagozytieren und die oben bereits

beschriebenen Mediatoren freisetzen. Durch diese werden weitere Botenstoffe, wie z. B. Akut-Phase-Proteine ausgeschüttet, die dann zu Fieber führen.

Ein anderer Weg, durch den eine Entzündung ausgelöst werden kann, ist die Komplementaktivierung. Das Komplementsystem besteht aus einer Vielzahl von Plasmaproteinen, die durch Berührung mit Oberflächen von Mikroorganismen eine Kaskade proteolytischer Reaktionen auslösen. Hauptziele der Komplementaktivierung sind Opsonierung von Pathogenen, so dass diese vom adaptiven Immunsystem erkannt werden können, Mobilisierung von Entzündungszellen und die direkte Abtötung des Pathogens durch Bildung von durchlässigen Poren in der Zellmembran (Carroll, 2004).

2.3 Das erworbene/adaptive Immunsystem

Trotz der angeborenen Immunabwehr gelingt es Keimen immer wieder, dieses System zu überwinden. Hier greift nun zusätzlich das adaptive Immunsystem, um den Körper vor Infektionen zu schützen. Den Hauptbestandteil dieses Abwehrsystems bilden die T- und B-Lymphozyten, von denen letztere die spezifischen Antikörper bilden. T- und B-Lymphozyten werden im Knochenmark gebildet. T-Lymphozyten wandern in den Thymus, wo sie sich zu so genannten zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen entwickeln. Hier findet auch eine negative Selektion statt, bei der T-Lymphozyten mit Rezeptoren gegen körpereigene Strukturen eliminiert werden. Ein Fehler bei dieser Auswahl kann zu schwerwiegenden Autoimmunkrankheiten führen. Über eine positive Selektion werden besonders stark an Fremdstrukturen bindende Zellen vor der Beseitigung bewahrt. Anschließend wandern die T-Lymphozyten in die lymphatischen Organe, wie z. B. die Milz, den lymphatischen Rachenring und vor allem die Lymphknoten ab, in denen sie vorübergehend verbleiben. Treffen sie nicht auf ein passendes Antigen, verlassen die Zellen das lymphatische Organ, um dann wieder in den Kreislauf zu gelangen, bevor sie schließlich auf ein entsprechendes Antigen treffen und ihre Wanderung beenden.

B-Lymphozyten verbleiben für ihre Reifung im Knochenmark, wandern aber danach ebenfalls in die lymphatischen Organe. In den Lymphknoten siedeln sie sich in so genannten Keimzentren an, in denen sie nach Kontakt mit einem entsprechenden Antigen zu proliferieren beginnen.

Die Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem stellen vor allem Dendritische Zellen, aber auch Makrophagen, her. Viele Pathogene besitzen eine Hülle, die es ihnen erlaubt, das angeborene Immunsystem zu umgehen. Dendritische Zellen können diese Keime über rezeptorunabhängige Makropinozytose aufnehmen und das Antigen über MHC II Komplexe präsentieren. Die antigenpräsentierenden Zellen (*Antigen Presenting Cells, APC*) zirkulieren über die Lymphe zum nächstgelegenen Lymphknoten, in dem sie auf die sich dort befindenden T- und B-Lymphozyten treffen. Durch den Kontakt eines B- oder T-Lymphozyten mit einem für seinen Rezeptor passenden Antigen, das ihm von einer Dendritischen Zelle präsentiert wird, kommt es zu einer Differenzierung von naiven Lymphozyten zu Effektorzellen (Guermontprez et al., 2002). Jeder Lymphozyt trägt einen anderen und nur für ein bestimmtes Antigen spezifischen Rezeptor. Allerdings existiert aber eine so umfangreiche Diversität, dass praktisch jedes Antigen von einem Rezeptor erkannt werden kann. Die Rezeptoren bestehen aus einer Zusammensetzung verschiedener Domänen. Die Gene, die für diese Domänen codieren, liegen in verschiedenen Varianten vor. Durch genetische Rekombination entsteht eine Vielzahl von unterschiedlichen DNA-Sequenzen. Auf diesem Weg ist es möglich, bis zu 10^8 T-Zellen mit verschiedenen Rezeptoren in jedem Organismus zu produzieren.

Trifft nun ein Lymphozyt auf ein zu seinem Rezeptor passendes Antigen, fängt er an, klonal zu expandieren und sich zu einer Effektorzelle umzuwandeln. B-Lymphozyten wandeln sich hierbei in Plasmazellen um und beginnen mit der Produktion von spezifischen Antikörpern, die einen wichtigen Teil des adaptiven Immunsystems bilden. Die Variabilität der Antikörper lässt sich durch den gleichen Mechanismus erklären, wie die der Antigenrezeptoren der T-Lymphozyten. Die Lebensdauer der Effektorzellen beläuft sich nur auf wenige Tage. Durch die Bildung von so genannten Gedächtniszellen, die mehrere

Jahre bestehen, aber gelingt es, auf ein erneutes Eindringen eines schon bekannten Erregers schneller zu reagieren und ihn zu eliminieren. Hierfür bleiben langlebige Zellen mit dem jeweiligen Antigenrezeptor nach erstmaliger Infektion erhalten und können bei erneutem Kontakt mit dem Antigen innerhalb kürzester Zeit proliferieren.

Bei den Antikörpern handelt es sich um Y-förmige Moleküle, bei denen der obere Teil die Antigenbindungsstelle (F_{AB} -Teil) und der untere den Konstanten (F_C -Teil), der an Komplement und phagozytosefähige Zellen bindet, darstellt. Man unterscheidet fünf Isotypen von Antikörpern, die sich aus einer unterschiedlichen Anzahl von einzelnen Antikörpermolekülen zu Mono- (IgD, IgE, IgG), Di- (IgA) oder Pentameren (IgM) zusammensetzen. Sie unterscheiden sich in ihrem hauptsächlichlichen Vorkommen und somit ihrer Funktion. Grundsätzlich lassen sich drei Aufgaben von Antikörpern differenzieren: Zum einen sind sie für die Blockade von Krankheitserregern oder Toxinen verantwortlich, was als Neutralisation bezeichnet wird. Des Weiteren sorgen sie für eine Opsonierung von Pathogen, um dieses für Phagozyten kenntlich zu machen. Nicht zuletzt dienen sie der Aktivierung von Komplement und stellen so wiederum eine Verbindung zum angeborenen Immunsystem her (Janeway ed., 2002).

2.4 Knochenmark und Hämatopoese

Während in der Embryonalentwicklung die Leber und die Milz für die Blutbildung zuständig sind, übernimmt das Knochenmark ab dem siebten Monat der Fetalentwicklung den überwiegenden Teil der Hämatopoese. Alle peripheren Blutzellen stammen von wenigen pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ab, deren Identität bis heute noch nicht vollständig geklärt ist. Diese entwickeln sich sowohl in die lymphozytopoetischen als auch die myelopoetischen Stammzellen. Aus den erstgenannten entstehen T- und B-Lymphozyten, die die Aufgaben des adaptiven Immunsystems übernehmen.

Die myeloopoetischen Stammzellen reifen zu Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Thrombozyten heran (Abbildung 1).

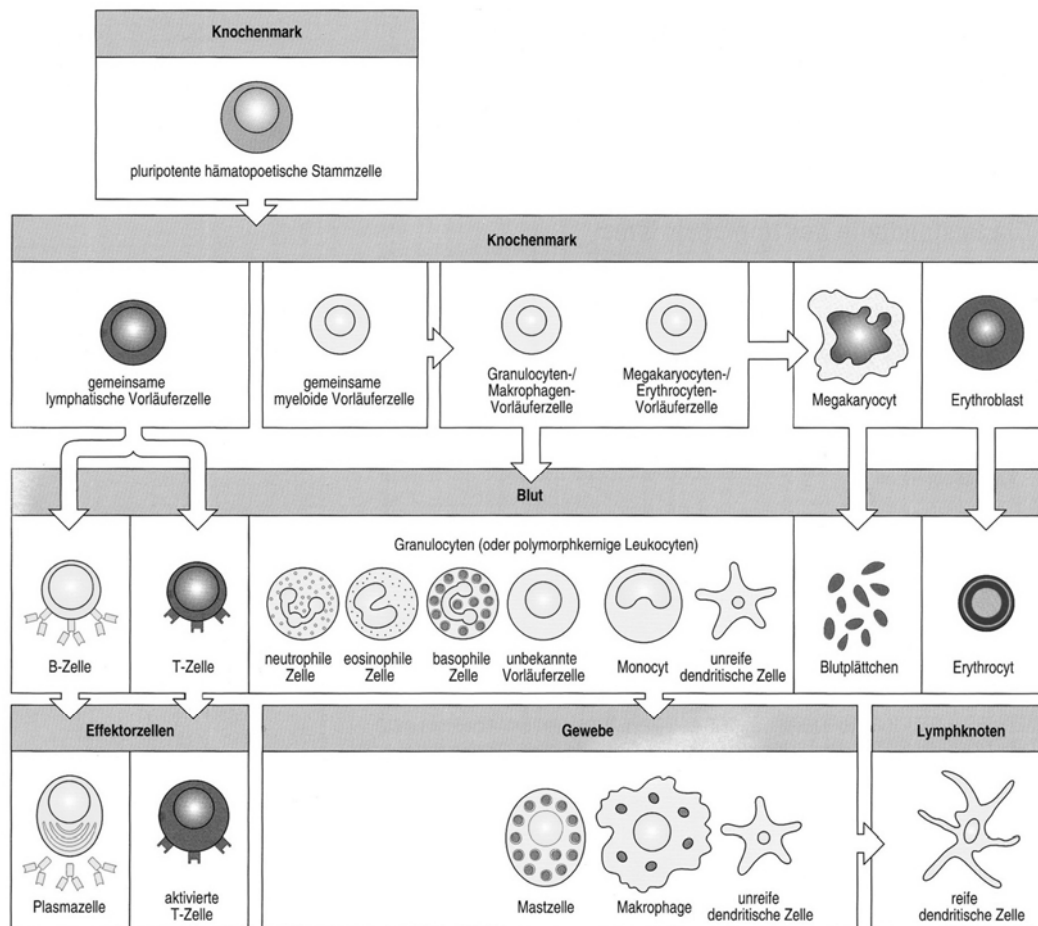


Abbildung 1: Die Entwicklung der peripheren Blutzellen, die alle aus wenigen pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen hervorgehen. Aus: Janeway ed., 2002.

2.5 HLA/MHC Antigene

Während Immunglobuline im Extrazellulärraum mit Krankheitserregern und deren Produkten interagieren, erkennen T-Zellen Antigene nur, wenn ihnen diese auf der Oberfläche anderer Zellen präsentiert werden. Dies geschieht mittels Proteinen, die Peptidfragmente von zum Beispiel Pathogenen an die Zelloberfläche transportieren (Guermontprez et al., 2002). Diese Proteine nennt

man Haupthistokompatibilitätskomplex (*Major Histocompatibility Complex, MHC*). Von den Komplexen existieren zwei Gruppen, die sich in ihrer Struktur, vor allem aber in ihrem Vorkommen und ihrer Funktion unterscheiden.

MHC I Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers exprimiert und nehmen Peptide von Proteinen auf, die im Zytosol synthetisiert werden. So präsentieren sie zum Beispiel virale Proteinfragmente, die von zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen erkannt werden. Dies führt zur Lyse der betroffenen Zelle.

Antigenpräsentierende Zellen, wie B-Lymphozyten, Dendritische Zellen und Makrophagen, besitzen MHC II Moleküle. Über diese werden Peptide von Proteinen in membrangebundenen Vesikeln innerhalb der Zelle dargeboten. So werden Peptide von Krankheitserregern, die in Vesikeln von Makrophagen leben oder von Phagozyten oder B-Zellen aufgenommen wurden, präsentiert. $CD4^+$ T_H1 - und T_H2 -T-Zellen erkennen die ihnen so präsentierten Peptide und aktivieren daraufhin weitere Effektorzellen des Immunsystems (Romagnani, 2000).

2.6 Transplantation

Zellen von verschiedenen Individuen einer Spezies unterscheiden sich in diversen Proteinstrukturen voneinander, die an der Zelloberfläche über MHC I Moleküle präsentiert werden. Diese Strukturen nennt man Alloantigene und sie spielen bei Transplantationen eine wichtige Rolle. Wird ein Organ einem Empfänger transplantiert, dessen Alloantigene sich von denen des Spenders unterscheiden, findet eine Abstoßungsreaktion statt. Die für diese Reaktion verantwortlichen T-Lymphozyten werden auf unterschiedliche Weise aktiviert. Zum einen kann eine indirekte Aktivierung stattfinden, bei der antigenpräsentierende Zellen des Spenders in Lymphknoten des Empfängers gelangen und dort T-Zellen anregen. Ebenfalls indirekt kann die Aktivierung über allogene Proteine des Spenders ausgelöst werden, die von antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers aufgenommen und T-Zellen präsentiert werden.

Darüber hinaus können die T-Zellen des Empfängers auch direkt allogene MHC I und II Moleküle auf dem Transplantat erkennen (Janeway ed., 2002). Um solche Abstoßungsreaktionen zu vermeiden, müssen Empfänger und Spender in ihren MHC Molekülen und den präsentierten Antigenen möglichst identisch sein (Hansen et al., 1999). Doch trotz Übereinstimmung kann es noch zu Abstoßungsreaktionen kommen. Dies geschieht einerseits, weil die Typisierung auf Grund der polymorphen Natur und der Komplexität der menschlichen MHC Moleküle nie ganz genau ist und zum anderen, da noch so genannte Nebenhistokompatibilitätsantigene (*minor histocompatibility antigens*) existieren, die bei der Transplantattoleranz eine Rolle spielen und die hauptsächlich von CD8⁺ Zellen erkannt werden.

Um das Auftreten von Abstoßungsreaktionen zu vermeiden, ist eine immunsuppressive Therapie notwendig.

2.7 Stammzelltransplantation/Knochenmarktransplantation

Für zahlreiche nichtmaligne und maligne Erkrankungen bietet die Knochenmark- oder Stammzelltransplantation einen kurativen Ansatz. Bei den nicht malignen Erkrankungen, wie z. B. Sichelzellanämie oder schwerer aplastischer Anämie, sollen die transplantierten Zellen die gestörte Funktion der Empfängerzellen ersetzen. Bei malignen Erkrankungen, wie zahlreichen Leukämieformen und auch soliden Tumoren, ist oftmals eine Hochdosischemo- und/oder Strahlentherapie die einzig heilende Option. Hierbei wird durch die Therapie das Knochenmark so stark geschädigt, dass keine eigenständige Regeneration mehr möglich ist. Das Knochenmark muss dann durch ein geeignetes Transplantat ersetzt werden.

Die ersten Knochenmarktransplantationen wurden in den späten 1960er Jahren durchgeführt und Anfang der 1970er Jahre wurde die Therapie als Behandlung bei Leukämien akzeptiert.

Spender und Empfänger müssen HLA-identisch sein, damit es nicht zu schweren Abstoßungsreaktionen kommt. Man unterscheidet eine autogene von

einer allogenen Transplantation. Bei der autogenen Transplantation stammen die Stammzellen vom Patienten selber. Die Vorteile sind zum einen, dass die Suche nach einem geeigneten Spender wegfällt und Abstoßungsreaktionen vermieden werden können. Allerdings birgt sie die Gefahr, dass kontaminierende Tumorzellen zu einem Rezidiv führen. Bei einer allogenen Transplantation stammt das Transplantat von einem anderen Individuum derselben Spezies. Zwar muss hierfür erst ein geeigneter Spender gefunden werden und es können heftige Abstoßungsreaktionen auftreten, doch führt der Graft-versus-Leukemia-Effekt, bei dem die transplantierten immunkompetenten Zellen die noch vorhandenen Leukämiezellen zerstören, oftmals zu besseren Therapieergebnissen.

Die Stammzellen können entweder durch Knochenmarkspende aus dem Beckenkamm unter Narkose gewonnen werden oder mittels G-CSF (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*) aus dem Knochenmark mobilisiert und dann durch Leukopherese aus dem Peripherblut gewonnen werden.

2.8 Komplikationen der Stammzelltransplantation

Die hauptsächlichen Komplikationen der Therapie sind Infektionen durch eine herabgesetzte Immunantwort, Rückfall sowie ein Transplantatversagen (Abstoßung/Non-Engraftment). Hierbei gelingt es dem transplantierten Knochenmark nicht, sich im Empfängerkörper anzusiedeln und ausreichend hämatopoetische Zellen zu produzieren. Oftmals sind mehrere Zellreihen betroffen und die Patienten erleiden schwere Infektionen oder werden transfusionspflichtig. Um diesen Komplikation entgegenzuwirken, wird versucht eine Immunrekonstitution zu beschleunigen. Oft kommt es hierbei allerdings zu weiteren Komplikationen, wie zum Beispiel *Graft versus Host Disease (GvHD)*, die vor allem nach dem Einsatz allogener T-Lymphozyten auftritt. Hierbei erkennen die T-Lymphozyten des Spenders Unterschiede der MHC oder auch von sogenannten Nebenhistokompatibilitätsantigenen des Empfängers und reagieren mit einer Immunantwort darauf. Die aktivierten Zellen produzieren

daraufhin Zytokine, wie Interferon (IFN) oder Tumornekrosefaktor (TNF), die zu einer typischen Gewebszerstörung führen. Meistens manifestiert sich diese an der Haut durch starke Rötung und Entzündung oder dem Darm, wobei es zu extremen Durchfällen verbunden mit enormem Gewichtsverlust kommt (Ferrara and Reddy, 2006).

Eine weitere Erschwernis kann durch die Ausschüttung von Zytokinen auftreten. Es werden unter anderem Makrophagen aktiviert, die in einem fehlgeleiteten Prozess Granulozyten und Erythrozyten phagozytieren. Dieser als Hämophagozytose bezeichnete Vorgang äußert sich in Fieber, Splenomegalie und Zytopenien.

2.9 „Mesenchymale Stammzellen“

2.9.1 Allgemeines

Stammzellen sind Zellen, die per Definition die Eigenschaft besitzen, sich selbst erneuern und in mehr als ein Gewebe differenzieren zu können. Man unterscheidet einerseits embryonale Stammzellen, die die Möglichkeit besitzen, sich in komplette Individuen und somit auch in sämtliche Gewebe zu differenzieren. Die Herstellung oder Verarbeitung dieser Zellen und somit auch die Forschung an ihnen steht schon seit langem in scharfer Kritik und ist heute in Deutschland untersagt. Andererseits gibt es adulte Stammzellen, die sich in einem bestimmten Organ finden und deren Differenzierungspotential sich im Wesentlichen auf eine unbestimmte Anzahl von Geweben beschränkt. Hierzu zählen beispielsweise Stammzellen des Darmes oder der Haut, also Gewebe, die einem hohen Zellumsatz unterliegen. Die wohl bekanntesten adulten Stammzellen sind die hämatopoetischen Stammzellen, die ein Leben lang für die Blutbildung zuständig sind. Eine weitere, den adulten Stammzellen angehörende Zellpopulation bilden die mesenchymalen Stammzellen (*Mesenchymal Stem Cells, MSC*), denen sich diese Arbeit widmet.

Diese Stammzellen, die in nicht-hämatopoetisches Gewebe differenzieren können, wurden erstmals vor über 130 Jahren von Cohnheim beschrieben (Cohnheim, 1867; Prockop, 1997). Der Begriff der mesenchymalen Stammzelle tauchte im Jahr 1968 auf, als Friedenstein und Kollegen Zellen des Knochenmarks beschrieben, die in osteogene Gewebe differenzieren können (Friedenstein et al., 1968). In den letzten Jahren kam immer wieder die Diskussion auf, ob MSC überhaupt Stammzellen im engeren Sinne sind. Hierfür müsste die Fähigkeit der Selbsterneuerung z. B. in einem *in vivo* Modell durch Transplantation und Retransplantation der sich daraufhin entwickelten Zellen nachgewiesen werden, wie dies für hämatopoetische Stammzellen geschehen ist. Da ein solches Modell für MSC nicht existiert, hat die ISCT vorgeschlagen, dass die bisher als mesenchymale Stammzellen bekannten Zellen von nun an multipotente mesenchymale Stromazellen heißen sollen, um so das Kürzel MSC beibehalten zu können. Ebenso wurden Definitionskriterien, die die Plastikadhärenz, bestimmte Oberflächenmarker und die Differenzierungsfähigkeit beinhalten, erarbeitet (Dominici et al., 2006; Horwitz et al., 2005).

Im Knochenmark machen MSC einen Anteil von 0,01 - 0,05% aus, lassen sich aber durch geeignete Kultur einfach *in vitro* expandieren (Minguell et al., 2001). Isoliert werden sie hierbei mittels ihrer Eigenschaft, an Plastik zu adhären und können dann unter fortlaufender Passagierung zu spindelförmigen, konfluenten Zellen herangezüchtet werden (Colter et al., 2001; Haynesworth et al., 1992; Jiang et al., 2002; Le Blanc et al., 2003b; Pittenger et al., 1999; Prockop, 1997). Sie verhalten sich *in vitro* anders als hämatopoetische Stammzellen und proliferieren zum Beispiel schneller.

Alterserscheinungen, wie eine Telomerverkürzung, zeigen die Zellen auch nach über 100 Teilungen nicht (Reyes and Verfaillie, 2001).

Das Wachstumsverhalten mesenchymaler Stammzellen variiert je nach Spender, jedoch ist die Kultur der Zellen in den meisten Fällen recht einfach. Trotz allem kann es bei nicht adäquater Behandlung vorkommen, dass die Zellen unter dem Lichtmikroskop wie MSC aussehen, sich jedoch in ihrer Genexpression, Differenzierungskapazität und ihrem Phänotyp unterscheiden (Le Blanc and Pittenger, 2005).

2.9.2 Phänotypisierung

Bis heute ist noch kein einzelner Oberflächenmarker identifiziert worden, der MSC eindeutig als diese ausweist. Durch eine Kombination von Markern, wie zum Beispiel CD105 (Endoglin) und CD73 (ECTO-5' Nucleotidase) lassen sie sich allerdings klar von anderen Zellen des Knochenmarks abgrenzen. Neben diesen Antigenen stellt sich der Phänotyp wie in *Abbildung 2* dar.

In der Praxis werden MSC häufig durch ihre Fähigkeit, an Plastik zu adhären gewonnen. Die bei dieser Methode ebenfalls verbleibenden Monozyten gehen durch die anschließenden Kulturbedingungen verloren. Nach ausreichender Proliferation kann dann die Homogenität der MSC mittels Durchflusszytometrie durch eine Kombinationsfärbung mit CD105 und CD73 nachgewiesen werden.

Common name	CD locus	Detection
Adhesion molecules*		
ALCAM	CD166	Pos
ICAM-1	CD54	Pos
ICAM-2	CD102	Pos
ICAM-3	CD50	Pos
E-selectin	CD62E	Neg
L-selectin	CD62L	Pos
P-selectin	CD62P	Neg
LFA-3	CD58	Pos
Cadherin 5	CD144	Neg
PECAM-1	CD31	Neg
NCAM	CD56	Pos
HCAM	CD44	Pos
VCAM	CD106	Pos
Hyaluronate receptor	CD44	Pos
Growth factors and cytokine receptors*		
IL-1R (α and β)	CD121a,b	Pos
IL-2R	CD25	Neg
IL-3R	CD123	Pos
IL-4R	CD124	Pos
IL-6R	CD126	Pos
IL-7R	CD127	Pos
Inteferon γ R	CDw119	Pos
TNF- α -1R	CD120a	Pos
TNF- α -2R	CD120b	Pos
FGFR		Pos
PDGFR	CD140a	Pos
Transferrin receptor	CD71	Pos
Integrins*		
VLA- α 1	CD49a	Pos
VLA- α 2	CD49b	Pos
VLA- α 3	CD49c	Pos
VLA- α 4	CD49d	Neg
VLA- α 5	CD49e	Pos
VLA- α 6	CD49f	Pos
VLA- β chain	CD29	Pos
β_4 integrin	CD104	Pos
LFA-1 α chain	CD11a	Neg
LFA-1 β chain	CD18	Neg
Vitronectin R α chain	CD51	Neg
Vitronectin R β chain	CD61	Pos
CR4 α chain	CD11c	Neg
Mac1	CD11b	Neg
Additional markers*		
T6	CD1a	Neg
CD3 complex	CD3	Neg
T4, T8	CD4, CD8	Neg
Tetraspan	CD9	Pos
LPS receptor	CD14	Neg
LewisX	CD15	Neg
—	CD34	Neg
Leukocyte common antigen	CD45	Neg
5' terminal nucleotidase	CD73	Pos
B7-1	CD80	Neg
HB-15	CD83	Neg
B7-2	CD86	Neg
Thy-1	CD90	Pos
Endoglin	CD105	Pos
MUC18	CD146	Pos
BST-1	CD157	Pos

Abbildung 2: Phänotyp humaner MSC. Aus: (Deans and Moseley, 2000).

2.9.3 Andere Gewebe aus denen MSC gewonnen werden können

Wie bereits erwähnt, wurden die ersten MSC aus dem Knochenmark gewonnen. Mittlerweile sind aber auch weitere Gewebe beschrieben worden, aus denen MSC isoliert werden können (Hu et al., 2003; in 't Anker et al., 2003b; Wagner et al., 2005). So finden sie sich beispielsweise in Fettgewebe, Synovialflüssigkeit, Zähnen, fetaler Leber, Knochen, Nabelschnur oder der Plazenta (Cao et al., 2005; De Bari et al., 2001; Erices et al., 2003; Fukuchi et al., 2004; Hattori et al., 2004; Morsczeck et al., 2005). Noch ist nicht eindeutig bewiesen, dass diese Zellen dieselben Eigenschaften wie aus dem Knochenmark gewonnene MSC besitzen, doch eine gewisse Ähnlichkeit besteht (Gotherstrom et al., 2005; Im et al., 2005).

Zum besseren Verständnis der Funktion und Wirkungsweise von MSC ist eine nähere Untersuchung dieser Zellen von großer Bedeutung.

2.9.4 Unterstützung des Engraftments von HSC

Über die genaue Funktion von MSC *in vivo* ist bisher nicht viel bekannt, jedoch wird postuliert, dass MSC im Knochenmark das Stroma bilden und die Entwicklung der hämatopoetischen Zellreihen unterstützen. Dieses Phänomen wurde erstmals von in 't Anker und Kollegen beobachtet, die bestrahlte immundefiziente Mäuse (NOD/SCID) mit bzw. ohne MSC, die aus der Lunge gewonnen wurden, und CD34⁺ Zellen transplantierten (in 't Anker et al., 2003a). Hierbei wurde beobachtet, dass die CD34⁺ Zellen in Anwesenheit von MSC ein signifikant höheres Engraftment zeigten als ohne MSC. In anderen Arbeitsgruppen konnten ähnliche Ergebnisse bei fetalen Schafen, die mit menschlichen HSC +/- MSC *in utero* transplantiert wurden, beobachtet werden (Almeida-Porada et al., 1999; Almeida-Porada et al., 2000). Auch eine Transplantation von humanen MSC in NOD/SCID Mäusen führte zu einem entsprechenden Resultat (Maitra et al., 2004).

2.9.5 Differenzierungspotential

Darüber hinaus haben MSC die Möglichkeit, in zahlreiche Gewebe zu differenzieren (Liechty et al., 2000). Hauptsächlich wurde bisher die Differenzierung in Knorpel, Knochen und Fettgewebe untersucht (Deans and Moseley, 2000). Pittenger beschrieb, dass mindestens ein Drittel der anfänglich adhären Zellen die Fähigkeit besitzen, sich osteogen, chondrogen oder adipogen zu differenzieren (Pittenger et al., 1999). Auch konnten Differenzierungen in Skelett- und Herzmuskelzellen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen beobachtet werden (Fukuda and Fujita, 2005; Kopen et al., 1999; Nakano et al., 2001; Toma et al., 2002; Woodbury et al., 2000).

MSC sind in der Lage, in Knochenmark und nichthämatopoetische Gewebe einzuwandern, wie durch mehre Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte (Gao et al., 2001; Pittenger and Martin, 2004; Pochampally et al., 2004). Hierbei wurden humane MSC in teils bestrahlte, teils nicht bestrahlte Mäuse infundiert und nach Wochen bis Monaten in Geweben wie Knochenmark, Leber, Milz, Knochen, Knorpel und Lunge wiedergefunden. Einige Autoren gehen deshalb von der Annahme aus, dass infundierte MSC zuerst ins Knochenmark engraften, um von dort aus in geschädigte bzw. verletzte Gewebe einzuwandern. Sie könnten somit an der Regeneration geschädigter Strukturen beteiligt sein (Bittira et al., 2003; MacKenzie and Flake, 2001; Wu et al., 2003). In Versuchen aus unserer Arbeitsgruppe, in denen mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff (GFP) markierte humane MSC in NOD/SCID Mäuse injiziert wurden, konnte dies allerdings nicht bestätigt werden. Die markierten MSC fanden sich dabei nur in der Lunge wieder. Die physiologische Funktion von MSC bleibt also nach wie vor offen.

2.9.6 Immunologische Eigenschaften

Das Vorhandensein des *Vascular Cell Adhesion Molecules* (VCAM-1, CD106), des *Intercellular Adhesion Molecules* (ICAM-2, CD102) und des *Lymphocyte*

Function Associated antigens (LFA-3, CD58), die bei der Interaktion und Wanderung von T-Lymphozyten eine wichtige Rolle spielen, legen einen immunologischen Einfluss mesenchymaler Stammzellen nahe (Conget and Minguell, 1999; De Ugarte et al., 2003; Deans and Moseley, 2000; Majumdar et al., 1998; Pittenger et al., 1999).

In *mixed lymphocyte cultures* konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart von adulten Nager-, Pavian- oder Menschen-MSK eine T-Zell-Proliferation unterdrückt werden kann (Bartholomew et al., 2002; Di Nicola et al., 2002; Krampera et al., 2003; Le Blanc, 2003; Le Blanc et al., 2004a; Le Blanc et al., 2003b; Potian et al., 2003; Tse et al., 2003). Diese Suppression ist dosisabhängig. Darüber hinaus konnte durch Mitogene stimuliertes Wachstum von T-Lymphozyten unter Co-Kultur mit MSC gehemmt werden. Beim Zusammentreffen von MSC mit verschiedenen Subpopulationen immunologischer Zellen konnte gezeigt werden, dass sich das Zytokinprofil der untersuchten Zellen eher antiinflammatorisch und tolerant ausrichtet (Aggarwal and Pittenger, 2005) (*Abbildung 3*):

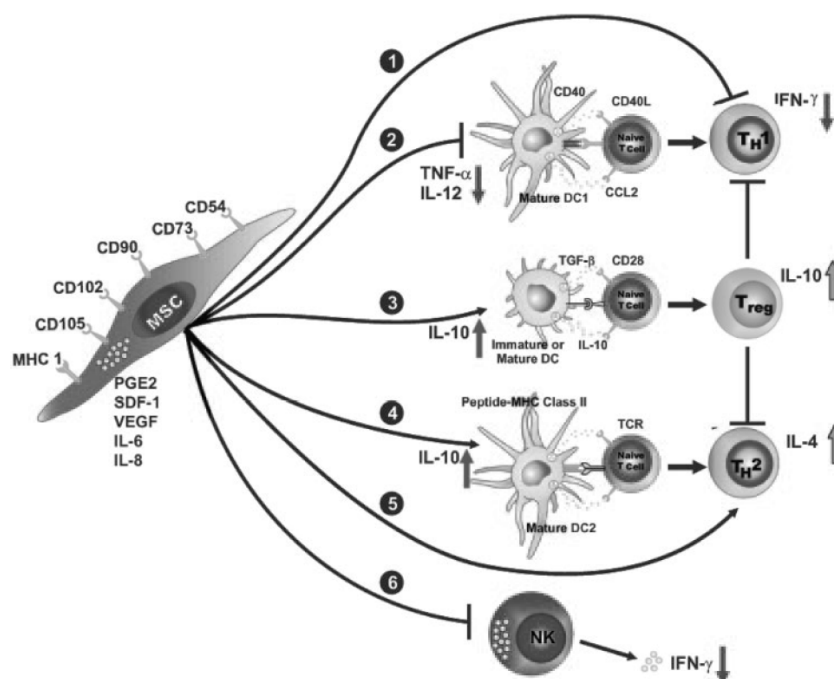


Abbildung 3: Einfluss von MSC auf die Zytokinausschüttung immunologischer Zellen. Aus: (Aggarwal and Pittenger, 2005).

Bei der gemeinsamen Kultur von MSC und T_H1 Zellen fand eine Reduktion der IFN γ Produktion, bei reifen Dendritischen Zellen von TNF α und IL-12 statt. Bei der Kombination von MSC mit T_H2 Zellen wurde eine erhöhte Produktion von IL-4, im Falle von unreifen Dendritischen Zellen oder regulatorischen T-Zellen von IL-10 festgestellt.

Es wurden allerdings Unterschiede gefunden, abhängig davon, ob die MSC in einer MLR oder in Kultur mit mitogen stimulierten Lymphozyten anwesend waren. So fand in MLRs, in denen MSC anwesend waren, eine erhöhte Produktion von IL-2 und des IL-2 Rezeptors statt. Im Gegensatz dazu wurde eine verminderte Produktion der Moleküle festgestellt, wenn MSC auf mit PHA stimulierte PBMC trafen (Rasmusson et al., 2005). Auch gab es verschiedene Ergebnisse, wenn statt humanen murine MSC zur Anwendung kamen (Krampera et al., 2003).

Experimente *in vivo* haben gezeigt, dass allogene transplantierte MSC länger im Körper verbleiben als andere allogene Zelltypen (Le Blanc and Pittenger, 2005). Es wurde beschrieben, dass allogene, nicht-HLA-identische transplantierte MSC in ausgewachsenen Nagern, Hunden, Schweinen und Pavianen engrafteten und humane MSC nach Infusion in fetale Schafe *in utero* nicht abgestoßen werden (Liechty et al., 2000). In Situationen, in denen bereits ein ausgereiftes Immunsystem vorliegt konnte dies jedoch nicht nachvollzogen werden (Eliopoulos et al., 2005). Außerdem ist zu erwähnen, dass es spezies-spezifische Unterschiede gibt, was durch die Abstoßung von humanen MSC nach Infusion in immunkompetente Ratten ersichtlich wurde (Grinnemo et al., 2004). Untersuchungen haben gezeigt, dass MSC im nicht aktivierten Zustand niedrige Level von MHC I, nicht aber MHC II exprimieren (Le Blanc et al., 2003a). Jedoch konnte das Vorhandensein von intrazellulärem MHC II nachgewiesen werden, welches nach Stimulation der MSC für ein bis zwei Tage mit IFN γ an die Zelloberfläche gelangt. Ebenso konnte in einer Arbeit gezeigt werden, dass MSC in einem syngenem Modell als APC fungieren können (Stagg et al., 2006).

Bei der näheren Betrachtung verschiedener Populationen immunologischer Zellen wurde in einer Arbeitsgruppe gezeigt, dass MSC eine durch zytotoxische T-Zellen hervorgerufene Lyse um 70% reduzieren können, jedoch nicht in der Lage sind, bereits aktivierte T-Lymphozyten zu inhibieren. Auch konnte eine NK-Zell-vermittelte Lyse nicht unterdrückt werden (Rasmusson et al., 2003). Andere Autoren berichten jedoch über eine Inhibition der Proliferation, Zytokinsekretion und Zytotoxizität von NK-Zellen durch MSC (Sotiropoulou et al., 2006; Spaggiari et al., 2006).

Hierbei konnte in einigen Versuchen gezeigt werden, dass bereits aktivierte NK-Zellen die Fähigkeit besitzen, MSC zu lysieren. Ebenfalls konnten Unterschiede bezogen auf die verschiedenen NK-Subpopulationen festgestellt werden (Sotiropoulou et al., 2006). Bei Stimulation mit IL-15 zeigten CD56^{dim} Zellen sowohl alleine als auch in Cokultur mit MSC kein Wachstum. CD56^{bright} Zellen, die unter IL-15 Einfluss stark proliferierten, konnten im Beisein von MSC in ihrem Wachstum gehemmt werden.

Der Mechanismus dieser immunologischen Einflüsse ist seit langem umstritten, für die klinische Anwendung aber von großer Bedeutung (Le Blanc, 2003). Während ein Teil der Autoren für einen Zell-Zell-Kontakt abhängigen Vorgang stimmt, plädiert die Mehrheit für den Einfluss löslicher Faktoren (Di Nicola et al., 2002). Hierbei wurden bereits zahlreiche Moleküle näher untersucht. Di Nicola und Kollegen beschreiben einen Einfluss von HGF und TGF- β bei CD2⁺ Zellen, der jedoch nicht bei PBMC allgemein reproduzierbar ist. Die Zugabe neutralisierender Antikörper gegen beide Faktoren konnte den inhibitorischen Effekt von MSC nur auf ein Drittel reduzieren. Die Ursache des restlichen Effekts bleibt offen.

Zusätzlich schließen Tse et al. eine Rolle von IL-10, TGF- β 2, PGE₂ und Indomethacin aus (Tse et al., 2003).

Eine wichtige Funktion scheint die Indolamin-2,3-Dioxygenase zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase, das für den Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan zu Kynurenin verantwortlich und somit inhibitorisch wirksam ist, von MSC exprimiert wird. Der

hemmende Effekt der Zellen auf Lymphozyten kann durch Zugabe von Tryptophan aufgehoben werden (Meisel et al., 2004).

Eine weitere Arbeitsgruppe hält IFN γ , das die Expression von Indolamin-2,3-Dioxygenase induziert, für den entscheidenden Schlüssel der inhibitorischen Aktivität von MSC (Krampera et al., 2006). Versuche unserer Arbeitsgruppe in denen MSC eines Patienten mit IFN γ -Rezeptordefekt verwendet wurden, legen aber einen IFN γ und Indolamin-2,3-Dioxygenase unabhängigen Mechanismus nahe (Gieseke et al., 2007). Neueste Erkenntnisse haben auch Galektin-1 ins Gespräch gebracht, das ebenfalls als ein immunmodulierendes Molekül bekannt ist. Bisher konnte jedoch nur seine Expression auf und Sekretion durch humane MSC nachgewiesen werden (Kadri et al., 2005).

Ebenso konnten, in Abhängigkeit davon, welche Mitogene oder Aktivierungsmöglichkeiten zur Stimulation der T-Zellen verwendet wurden, unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Stärke des inhibitorischen Effekts von MSC auf PBMC gefunden werden (Rasmusson et al., 2005). Für die Klärung dieser vielseitig diskutierten Abläufe bedarf es sicherlich noch einiges an Zeit und Forschungsaktivität.

2.9.7 MSC aus pathologischen Situationen

Bisher sind größtenteils nur MSC von Personen mit intaktem Knochenmark untersucht worden. Jedoch ist auch das Verhalten von MSC aus pathologischen Knochenmarkstromata von Interesse. Bacigalupo et al. haben MSC von Patienten mit schwerer aplastischer Anämie (SAA) näher untersucht. Bei diesen Patienten ist die Hämatopoese gestört, so dass zu wenige Zellen in den einzelnen Zellreihen nachgebildet werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen konnten zeigen, dass MSC von SAA-Patienten eine T-Zellproliferation weniger stark unterdrücken können als MSC von gesunden Spendern (Bacigalupo et al., 2005). Ob diese Entdeckung eine Rolle bei der Pathologie der Erkrankung spielt, bleibt noch zu klären.

2.9.8 Klinische Anwendung

Die oben aufgeführten Eigenschaften eröffnen ein breites Spektrum klinischer Anwendungsmöglichkeiten für MSC, von denen bereits einige mit aus Knochenmark isolierten und *ex vivo* expandierten Zellen durchgeführt wurden. Die Anwendung erscheint hierbei sicher: In bisher mehr als 50 Empfängern humaner MSC wurden keine Nebenwirkungen, wie z. B. Allergien oder ähnliches beobachtet (Horwitz et al., 2002; Koc et al., 2000; Koc et al., 2002; Lazarus et al., 1995; Le Blanc et al., 2004b).

Die ersten Empfänger *in vitro* expandierter MSC erhielten autologe Zellen, die gut vertragen wurden (Lazarus et al., 1995). In weiteren Versuchen waren allerdings MSC von gematchten Geschwistern notwendig, da die Patienten unter hämatologischen Malignomen oder neurometabolischen Erkrankungen litten, so dass keine autologe Transplantation möglich war (Koc et al., 2000; Lazarus et al., 2005). Eine weitere Arbeitsgruppe verwendete MSC zur Behandlung von GvHD. Hierbei fanden entweder MSC von HLA-identischen Geschwistern, von haploidenten Verwandten oder von unverwandten nichtgematchten Spendern Anwendung (Ringden et al., 2006). In diesen Versuchen wurden keine toxischen Schäden durch die MSC-Transplantation beobachtet.

Das gute Engraftment und die Differenzierungseigenschaften von MSC machte man sich bei der Behandlung von Patienten mit Osteogenesis Imperfecta zunutze. Hierbei leiden die Erkrankten unter den Auswirkungen eines Gendefekts, der zur Produktion eines fehlerhaften Kollagen Typ I durch Osteoblasten führt. Dieses Kollagen ist ein wichtiges Strukturprotein des Knochens, dessen Mangel in zahlreichen Knochenbrüchen, fortschreitenden skelettalen Deformitäten und verlangsamtem Knochenwachstum resultiert. Die Gruppe um E. Horwitz transplantierte Kinder, die an Osteogenesis imperfecta litten, mit Knochenmark und konnte bis zu zwei Prozent Spenderosteoblasten in den Patienten identifizieren (Horwitz et al., 1999). Da diese Zellen nur aus MSC, nicht aber aus HSC hervorgehen, konnte gezeigt werden, dass bei

Säuglingen und Kleinkindern eine MSC Übertragung erfolgreich durchzuführen ist.

Nach der Transplantation von HLA-kompatiblen Geschwisterknochenmark konnte bei drei von sechs an Osteogenesis imperfecta leidenden Patienten ein erfolgreiches Engraftment der Osteoblasten und eine damit verbundene Wachstumsbeschleunigung und Zunahme der Knochendichte erzielt werden (Horwitz et al., 2001).

In einer Folgestudie wurden weitere sechs Kinder mit Osteogenesis Imperfecta mit *ex vivo* expandierten MSC nach vorheriger KMT transfundiert. In fünf dieser Patienten gelang die Übertragung von MSC (Horwitz et al., 2002).

Einen Unterschied zu diesen Ergebnissen zeigt sich bei KMT im Erwachsenenalter, wobei fast nie ein Engraftment der MSC oder Osteoblasten gefunden werden konnte, Allerdings fanden hier auch keine vorher expandierten MSC Einsatz (Koc et al., 1999).

Durch die breite Plastizität von MSC eröffnen sich weitere klinische Einsatzgebiete (Liechty et al., 2000).

In ersten Ansätzen im Menschen wurden autologe Myoblasten zur Therapie von kardialen Problemen verwendet (Menasche et al., 2003). Im Tiermodell konnten einzelne Erfolge bei der Verwendung von MSC zur Behandlung von Herzerkrankungen und zur Regeneration ischämischer Herzmuskelgebiete verzeichnet werden. So wurde z. B. nach Knochenmarkinfusion in Mäusen ein Engraftment ins Herz beobachtet (Fukuda, 2001; Orlic et al., 2003). Stamm et al. verwendeten CD133⁺ Zellen zur Behandlung von Herzinfarktpatienten. Sie konnten neben einer guten Verträglichkeit der Infusion auch eine verbesserte lokale Perfusion der mit den Stammzellen behandelten Arealen feststellen (Stamm et al., 2004). Eine weitere Arbeitsgruppe verglich in Patienten nach Myokardinfarkt den Einfluss der Infusion von aus dem Knochenmark oder Peripherblut gewonnenen Vorläuferzellen auf die Auswurfraction des linken Ventrikels. Nach Transplantation der Zellen aus dem Knochenmark konnten sie hierbei eine Verbesserung dieser feststellen (Assmus et al., 2006).

In dystrophen mdx Mäusen konnte nach Infusion von Knochenmark gesunder Mäuse ein Engraftment der Zellen in sowohl Skelett- als auch Herzmuskelgewebe gezeigt werden, was darauf hinweist, dass ein vorhandener Gewebeschaden das Engraftment von zirkulierenden Zellen fördert (Bittner et al., 1999). In einem SCID-Mausmodell mit immundefizienten Mäusen, die einen Mangel an B- und T-Zellen und nur wenige NK-Zellen haben, wurden humane, also xenogene, MSC transplantiert (Toma et al., 2002). Nach 30 Tagen konnten *in situ* differenzierte MSC, die kardiale Proteine exprimierten, gefunden werden. Weitere Versuche in Ratten festigen diese Ergebnisse (Miyahara et al., 2006; Nagaya et al., 2005; Tang, 2005; Yoon et al., 2005).

Aber auch im humanen System konnten erste Erfolge verzeichnet werden. In einer Studie wurden Patienten mit akutem Herzinfarkt, zusätzlich zur Standardtherapie, mit mononukleären Zellen aus dem Knochenmark, die mittels Katheter der Infarktregion zugeführt wurden, behandelt (Strauer et al., 2002). Die so behandelten Patienten zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikant kleineres Infarktareal sowie eine verbesserte Wandbeweglichkeit. Weitere Studien, in denen entweder komplettes Knochenmark oder aus dem Knochenmark gewonnene endotheliale Vorläuferzellen verwendet wurden, konnten ebenfalls die Sicherheit der Transplantation und eine Verbesserung der kardialen Funktion belegen (Perin et al., 2003; Perin et al., 2004; Stamm et al., 2004).

Auch gibt es bereits Ansätze, MSC zur Regeneration anderer Gewebe heranzuziehen. Der Knorpelwiederaufbau bei Osteoarthritis stellt hierbei nur ein Beispiel dar (Barry, 2003; Dudics et al., 2005; Luyten, 2004). Eine weitere Einsatzmöglichkeit bietet sich bei der Behandlung angeborener metabolischer Erkrankungen über die Osteogenesis Imperfecta hinaus. Durch die Produktion und Sekretion von Arylsulfatase A und B, deren Mangel zu den Erkrankungen metachromatische Leukodystrophie bzw. Mukopolysaccharidose VI führt, α -1-iduronidase (mukopolysaccharidose I), Glukozeribrosidase (M.Gaucher) und Adrenoleukodystrophieprotein (Adrenoleukodystrophie) bieten MSC die Möglichkeit, Patienten mit lysosomalen oder peroxisomalen Speicherkrankheiten zu helfen (Koc et al., 2002; Müller et al., 2006b). Ebenfalls

bietet sich durch die oben erwähnten immunmodulierenden Eigenschaften von MSC ein breites Anwendungsspektrum. In einer Pilotstudie wurde der Einsatz von HSC und MSC bei erwachsenen Leukämiepatienten untersucht und mehrere günstige Einflüsse festgestellt: Neben einer schnelleren Rekonstitution fand ein vermindertes Auftreten von akuter und chronischer GvHD statt (Frassoni, 2002). Zusätzliche Ansätze verwendeten eine Transplantation von MSC gezielt zur Behandlung oder Prophylaxe von GvHD nach Stammzelltransplantation (Lazarus et al., 2005; Ringden et al., 2006).

Des Weiteren wurde ein neunjähriger Patient erfolgreich mit MSC behandelt. Bei dem Jungen, der an einer akuten lymphatischen Leukämie litt, trat nach einer allogenen, unverwandten Stammzelltransplantation eine schwere, therapieresistente GvHD auf. Durch Transplantation von MSC des Vaters, der nicht HSC-Spender war, konnte die Komplikation innerhalb von vier Wochen unter Kontrolle gebracht werden. Auch eine GvHD vierten Grades, die durch Spenderlymphozytentransplantation zur Rezidivbehandlung auftrat, konnte durch erneute Gabe von MSC des Vaters komplett zurückgedrängt werden (Le Blanc et al., 2004b).

2.9.9 Isolation und Kulturbedingungen

Die meisten Labore verwenden MSC, die aus dem Knochenmark gewonnen wurden, auch weil noch nicht vollständig geklärt ist, ob die aus anderen Geweben erhaltenen Zellen wirklich in ihrem Phänotyp und ihren Eigenschaften mit den bislang bekannten MSC übereinstimmen. Hierbei wird das Knochenmark, meist nach vorheriger Lyse der Erythrozyten oder nach Dichtegradientenzentrifugation, mit nicht einheitlichem Medium angesetzt. Durch die Eigenschaft, an Plastik zu adhären, bildet sich dann unter konsequenter Passagierung eine homogene Zellpopulation, bestehend aus spindelförmigen Zellen. Darüber hinaus wird auch eine Isolierung der Zellen mittels immunomagnetischen Verfahren angewendet. Hierfür werden die MSC entweder mit einem vorgefertigten Kit (RosetteSep) oder mittels magnetischer Zellsortierung (MACS) separiert (Baddoo et al., 2003; Tondreau et al., 2004).

Zur adäquaten Kultur der Zellen war es bislang nötig, dem Medium FCS hinzuzusetzen, da sie sonst in ihrer Vitalität und Aktivität eingeschränkt waren. Der Nachteil dieser Kulturbedingungen liegt zum einen darin, dass so keine Untersuchung der Zellen unter physiologischen Bedingungen möglich ist. Darüber hinaus gibt es so in der klinischen Anwendung Einschränkungen. Hierbei ist eine möglichst tierproduktfreie Bearbeitung der Zellen erwünscht, um Infektionen mit Bakterien, Pilzen, Viren oder in neuester Zeit Proteinen, wie Prionen, zu vermeiden. In neueren Untersuchungen wurde nun herausgefunden, dass auch eine Kultur mit humanem Serum möglich ist. Ohne weitere Beisetzung anderer Stoffe klappte die Züchtung der Zellen allerdings nur bei einer Arbeitsgruppe (Stute et al., 2004). In anderen Versuchen war die Zugabe diverser Wachstumsfaktoren, Thrombozyten oder Thrombozytenlysaten notwendig (Doucet et al., 2005; Gruber et al., 2004; Lin et al., 2005). Während in den ersten dieser Versuche noch nicht ganz klar war, ob die auf diese Weise kultivierten Zellen dieselben Eigenschaften besitzen wie die in FCS gezüchteten Zellen, konnten wir dies in einer Arbeit unserer Arbeitsgruppe zeigen (Müller et al., 2006a).

2.10 Ziele dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der immunologischen Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen. Hierbei sollte eine genaue Betrachtung von aus dem Knochenmark gewonnenen MSC stattfinden, um diese im Anschluss mit MSC aus anderen Geweben zu vergleichen. Auch sollten MSC aus pathologischen Konstellationen untersucht werden. Insbesondere sollte hier das Augenmerk auf MSC aus Gelenkpunkttaten von JIA-Patienten und auf MSC von SAA-Patienten gelegt werden.

Zunächst sollten die MSC aus unterschiedlichen Geweben auf ihre Morphologie und ihren Immunphänotyp hin verglichen werden. Die Wirkung der Zellen auf aktivierte PBMC sollte in anschließenden Experimenten unter Verwendung eines BrdU-Proliferationsassays oder eines CFSE-Proliferationsassays angesehen werden. Darauf folgend sollten ausgewählte MSC Populationen auf ihren Einfluss auf die einzelnen PBMC-Subpopulationen untersucht werden. Da der Mechanismus, über den MSC ihre immunregulatorischen Effekte ausüben, noch nicht klar ist, sollten durch Experimente in Transwell-Systemen nähere Informationen darüber gewonnen werden, ob ein Zell-Zell-Kontakt notwendig ist oder nicht.

MSC_{SF} sollten zusätzlich auf ihre Differenzierungsfähigkeit in Adipozyten und Osteoblasten untersucht werden.

Die Ergebnisse einer Transplantation von MSC in pädiatrische Patienten wurden bereits ausgewertet und sollen ebenfalls in dieser Arbeit vorgestellt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Produkt	Typ	Bezugsquelle
Begasungsbrutschrank	Heraeus Hera cell	Kendro Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Durchflusszytometer	FACS-Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Auswertecomputer	MAC OS 9.2.2	
FACS-Software	CELLQuest Version 3.3	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryo-Einfriergerät		Qualilab, Bezug über VWR International GmbH, Wien
Microplate Luminometer für BrdU	Victor	Wallac, Freiburg
Mikroskop	IX50	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Zellzählgerät	COBAS MICROS	Roche Diagnostics, Mannheim
Zentrifuge	Rotixa 50 RS	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

3.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Typ	Bezugsquelle
BrdU Klebefolie, schwarz		PerkinElmer, Wellesley, USA
BrdU Zellkulturplatten	View plate-96, black	PerkinElmer, Wellesley, USA
Cryoeinfriereröhrchen	Cryogenic vials 1,2 ml	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Eppendorfröhrchen	Safe-Lock; 0,5; 1,5; 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
PP-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Falcon	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA

Produkt	Typ	Bezugsquelle
Rundbodenröhrchen für FACS 5 ml, Polystyrol		BD Bioscience, Discovery Labware, Bedford, MA
Transwelleinsätze	Falcon 0,4 µm pore size	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Zellkulturflaschen; 162 cm ² ; 75 cm ² ; 25 cm ²		Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Zellkulturplatten 6-well	Falcon	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Zellkulturplatten 24-well	Costar	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Zellkulturplatten 96-well; flat bottom	Costar	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande

3.3 Chemikalien, Reagenzien, Kits

Produkt	Abkürzung	Bezugsquelle
Alizarin Red S		Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Glycerolphosphat		Sigma-Aldrich, Steinheim
Biocoll Separating Solution Dichte 1,077g/ml (Ficoll)		Biochrom, Berlin
Bone Morphogenetic Protein 2	BMP-2	Tebu-Bio, Offenbach
Dexamethason (Fortecortin®)		Universitätsapotheke, Tübingen
Dimethylsulfoxid	DMSO	Merck, Darmstadt
Dulbecco's modified eagle's medium; 1g/l Glukose	DMEM	Cambrex, Verviers, Belgien
Ethanol		Merck, Darmstadt
FACS Flow®		Becton Dickinson, Heidelberg
Fetal Calf Serum	FCS	Biochrom, Berlin
Formaldehyd Fixativ (6,07 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat 23,01 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat 32,18 g Sucrose 150 ml Formaldehyd 37% 850 ml H ₂ O, desti./1 000 ml)		Universitätsapotheke, Tübingen
H ₂ O, destilliert	ddH ₂ O	Millipore GmbH, Schwalbach
HANKS		Biochrom, Berlin
Harris Hematoxilin		Sigma-Aldrich, Steinheim

Produkt	Abkürzung	Bezugsquelle
Heparin, Canusal		CP Pharmaceuticals LTD, England
3-Isobutyl-1-methylxanthin	IBMX	Sigma-Aldrich, Steinheim
Indomethacin		Sigma-Aldrich, Steinheim
Insulin, Actrapid 40 I.E./ml		Novo, Novodisk, Bagsværd, Dänemark
Interleukin 2	IL-2	R&D Systems, Minneapolis, USA
L-Ascorbinsäure-2-phosphat		Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin (200mM)		Biochrom, Berlin oder Cambrex, Verviers, Belgien
Lysepuffer (8,29 g Ammoniumchlorid 1 g Kaliumhydrogencarbonat 0,037 g Na ₂ -EDTA-2H ₂ O pro 1 000 ml)		Universitätsapotheke, Tübingen
Methanol		Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	NaCl	Roth, Karlsruhe
Oil-Red-O		Sigma-Aldrich, Steinheim
OKT3		Orthoclone, Janssen-Cilag GmbH, Neuss
PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	PBS	Gibco BRL, Paisley, Großbritannien oder Biochrom, Berlin
Phytohämagglutinin	PHA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin		Biochrom, Berlin
RPMI 1640 (VLE) mit Phenolrot		Biochrom, Berlin
Tris-HCl		Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau		Roth, Karlsruhe
Trypsin, 2,5%		Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
Cell proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescence)	BrdU	Roche Diagnostics, Mannheim
Vybrant CFDA SE cell tracer kit	CFSE	Molecular probes, (Invitrogen) Karlsruhe

3.4 Antikörper

Produkt	Klon	Bezugsquelle
anti-IgG1-PE	MOPC-31C	BD Bioscience, Heidelberg
anti-CD4-PE	RPA-T4 Isotyp Mouse IgG _{1,κ}	BD Bioscience, Heidelberg
anti-CD8-PE	SK1 Isotyp Mouse IgG _{1,κ}	BD Bioscience, Heidelberg
anti-CD34-PE	563	BD Bioscience, Heidelberg
anti-CD56-PE	B159	BD Bioscience, Heidelberg
anti-CD73-PE	AD2	BD Bioscience, Heidelberg
anti-CD90-PE	F15-42-1	Serotec, Düsseldorf
anti-CD146-PE	P1H12	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-HLA-ABC-PE	G46-2.6	BD Bioscience, Heidelberg
anti-IgG1-FITC	MOPC-31C	BD Bioscience, Heidelberg
anti-CD45-FITC	HI30	BD Bioscience, Heidelberg
anti-CD105-FITC	N1-3A1	Ancell, Bayport, USA
anti-CD106-FITC	1.G11B1	Serotec, Düsseldorf
anti-HLA-DR-FITC	TÜ36	BD Bioscience, Heidelberg

3.5 Medien

Folgende Medien wurden verwendet:

Bezeichnung	Basis	Zusätze
DMEM 10%	DMEM	100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 10% FCS
DMEM _{FFPP}	DMEM	100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 5% FFP Thrombozyten (10 ⁷ /ml)
RPMI 10%	RPMI 1640	100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 10% FCS
RPMI 20% autol.	RPMI 1640	100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 20% autologes Serum (auf PBMC bezogen)

3.6 Zellkultur und zellbiologische Methoden

3.6.1 Verwendete Zellen und deren Kultur

Die Experimente dieser Dissertation wurden mit MSC, gewonnen aus verschiedenen Geweben, durchgeführt. Die Kultur dieser Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen bei 37°C in einem Begasungsbrutschrank unter 10% CO₂. Als Kulturmedium wurde soweit nicht anders erwähnt DMEM, welchem 10% FCS beigegeben wurde (DMEM 10%), verwendet, das alle drei bis sechs Tage gewechselt wurde. Teilweise wurden die Zellen in DMEM mit FFP und Thrombozyten (DMEM_{FFPP}) kultiviert. Die verwendete Menge Medium richtete sich nach der Größe der Flasche, in der die Zellen kultiviert wurden:

162 cm² = 25 - 30 ml Medium

75 cm² = 15 ml Medium

25 cm² = 7 ml Medium

6-Lochplatte = 3 ml Medium pro well

In den Proliferationsassays, in denen PBMC verwendet wurden, wurde größtenteils RPMI mit autologem Serum (RPMI 20% autol.), teilweise RPMI mit 10% FCS (RPMI 10%) verwendet. Die Inkubation erfolgte hierbei bei 37°C im Begasungsbrutschrank unter 5% CO₂.

Sobald die MSC konfluent waren, wurden sie propagiert und in einer Dichte von ca. 20 000 Zellen/cm² in größere Flaschen umgesetzt. Nach vier bis acht Wochen konnten die Zellen für die Versuche verwendet werden.

3.6.2 Lösen der adhärenen MSC

Zum Lösen der adhärenen MSC wurde das überschüssige Medium abgesaugt und verworfen. Danach wurde zum Abfangen der freien Ca²⁺-Ionen einmal mit 5 - 6 ml PBS gespült. Anschließend wurden 2 - 3 ml Trypsin 1:10 verdünnt in die Kulturflaschen gegeben, so dass die Zellen gerade bedeckt waren und die Flaschen für 7 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden dann durch leichtes Beklopfen der Kulturflaschen vollends gelöst, in PBS (ca. 5 ml) aufgenommen und bei 400 g für ca. 6 Minuten abzentrifugiert.

3.6.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden zum Einfrieren gelöst, bei 400 g für 5 - 10 Minuten abzentrifugiert und zu ca. 100 000 – 1 000 000 Zellen in 1 ml Einfriermedium aufgenommen:

Einfriermedien:

mit FCS kultivierte Zellen: FCS + 10% DMSO

mit FFP und Thrombozyten kultivierte Zellen: FFP + 10% DMSO

Dann wurden die Zellen in Cryoröhrchen gegeben. In einem Kryo-Einfriergerät, das auf Raumtemperatur erwärmt war, wurden die Röhrchen bei – 80°C

eingefroren und dort für 4 Wochen gelagert. Danach wurden sie in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese in den Kryoröhrchen in ein Wasserbad bei 37°C für ca. 2 Minuten gegeben. Sie wurden dann sofort in 5 ml Medium in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 400 g für 5 Minuten abzentrifugiert, anschließend nochmals mit dem Medium der jeweiligen Zellkultur gewaschen und erneut abzentrifugiert. Danach waren sie zur weiteren Verarbeitung bzw. Kultivierung bereit.

3.6.4 Zählen von Zellen

PBMC wurden mittels des COBAS MICROS Zellzählgerät gezählt.

Zum Zählen der MSC wurden diese in geringer Menge PBS aufgenommen und mit derselben Menge Trypanblau angefärbt. Das Auszählen fand mittels einer Neubauer-Zählkammer (Abbildung 4) statt und wurde folgendermaßen ausgewertet:

Zellzahl pro ml

= Mittelwert der Zellzahl in vier Großquadraten • 2 (Verdünnungsfaktor) • 10⁴/ml

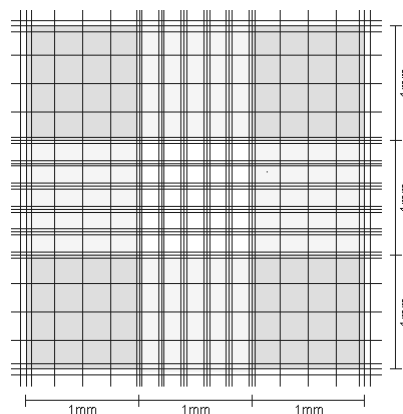


Abbildung 4: Neubauerzählkammer. Ausgezählt werden die vier grau markierten Großquadrate, aus denen der Mittelwert gebildet wird. Aus: www.wikipedia.de.

3.6.5 Gewinnung von MSC aus Knochenmark (MSC_{KM})

Zur Gewinnung von MSC aus Knochenmark (MSC_{KM}) wurden 3 - 5 ml Knochenmark verwendet. Es wurde sich die Eigenschaft der MSC an Plastik zu adhären zunutze gemacht.

Zuerst wurden die Erythrozyten lysiert. Hierzu wurde das Knochenmark in der 10fachen Menge Lysepuffer in einem 50 ml Falcon-Röhrchen suspensiert und für 20 - 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde danach bei 400 g für 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit HANKS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 6 ml Medium, das zur weiteren Kultur verwendet werden sollte, aufgenommen und auf 2 Löcher (I) einer 6-Lochplatte gegeben.

Am darauffolgenden Tag wurde das Medium, samt der noch darin enthaltenen Zellen, in zwei weitere Löcher (II) der 6-Lochplatte gegeben und die vorherigen Löcher (I) wieder mit jeweils 3 ml Medium befüllt.

Zwei weitere Tage später wurde, bei hoher Zellzahl, das Medium der Löcher (II) in die verbleibenden zwei Löcher (III) gegeben und die Löcher (II) wiederum mit Medium gefüllt.

Nach einer Woche wurden die Zellen zur Elimination der Osteoblasten abgelöst und in eine andere 6-Lochplatte gesetzt.

Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie abgelöst und in eine Kulturflasche gesetzt und fortan darin kultiviert. Alle vier bis fünf Tage wurde das Medium gewechselt.

3.6.6 Gewinnung von MSC aus Synovialflüssigkeit (MSC_{SF})

Als Ausgangsmaterial wurden Punktate aus entzündeten Gelenken, meist von Patienten, die an rheumatoider Arthritis litten, verwendet. Die Punktate wurden bei 400 g für ca. 6 - 7 Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das übrig bleibende Pellet wurde in 3 ml Medium aufgenommen und in einer 6-

Lochplatte angesetzt. An den folgenden Tagen wurde wie bei der Gewinnung von MSC aus Knochenmark vorgegangen.

3.6.7 Gewinnung von MSC aus Fettgewebe (MSC_{FAT})

Zur Anzucht von MSC aus Fettgewebe wurde das Fett in geeigneten Medien in 6-Lochplatten ausgesät. Nach einigen Tagen wurde der Überstand verworfen und wie bei der Kultur von MSC aus Knochenmark vorgegangen.

Die aus Fettgewebe gewonnenen MSC erhielten wir freundlicherweise von unserem Kooperationspartner, der Arbeitsgruppe Dominici aus Modena.

3.6.8 Gewinnung von PBMC aus Heparin-Frischblut

PBMC wurden aus Blut von freiwilligen, gesunden Spendern (Ethikkommissionsvotum 241/2005V) gewonnen. Zur Trennung des Blutes in seine verschiedenen Bestandteile wurde eine Dichtegradientenzentrifugation angewendet. Durch die verschiedenen Dichten der einzelnen Blutbestandteile und des Ficolls, erhält man eine Schichtung, die das Abnehmen der PBMC erlaubt. Die oberste Phase wird vom Plasma gebildet. Direkt darunter sammeln sich in einem dünnen Streifen die PBMC an, unter denen sich dann das Ficoll befindet. Im unteren Teil des Röhrchens sammeln sich die Erythrozyten.

Zur Gewinnung von PBMC wurde 20 - 30 ml heparanisieretes Blut verwendet.

Das Blut wurde vorsichtig über 15 ml Ficoll in 50 ml Falcon-Röhrchen geschichtet und bei 960 g ohne Bremse bei Raumtemperatur 20 Minuten zentrifugiert.

Zuerst wurde das Plasma abgenommen und zur eventuell weiteren Verarbeitung beiseite gestellt. Der sich nun direkt oberhalb des Ficolls befindende PBMC-Zellsaum wurde mittels 10 ml Pipette unter ständiger manueller Drehung des Falcon-Röhrchens abgenommen und zum Waschen in ein weiteres 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Anschließend konnten die Zellen ihrer weiteren Verwendung zugeführt werden.

3.7 Proliferationsassays und Durchflusszytometrie

3.7.1 BrdU Proliferationsassay

Prinzip (*Abbildung 5*):

BrdU (Bromdesoxyuridin) ist ein Pyrimidinanalogon, das sich an Stelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen einbaut. Nach Fixation und Denaturierung kann dann ein Antikörper gegen BrdU, an den eine Peroxidase gebunden ist, hinzugegeben werden. Die Peroxidase katalysiert in Anwesenheit von Hydrogenperoxid die Oxidation von Diazyldiaziden. Solch ein Hydrazid ist Luminol, welches in diesem Assay verwendet wird. Das Resultat ist ein angeregtes Produkt, das beim Zurückspringen in seinen Grundzustand Licht emittiert. Diese Emission kann mittels *Microplate Luminometer* gemessen werden.

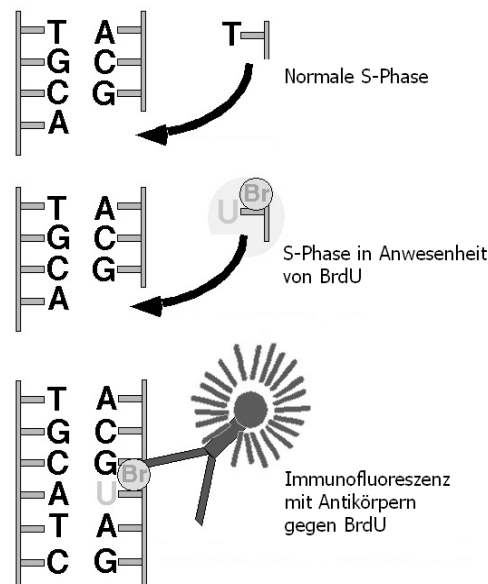


Abbildung 5: Prinzip BrdU Proliferationsassay. Aus: Gerd Kempermann: Aktivitätsabhängige Regulation von Neurogenese im erwachsenen Hippocampus.

Versuchsaufbau:

In den hier durchgeführten Versuchen wurden an Tag -1 die MSC in RPMI 10% in 96-well Platten angesetzt. Die Konzentration der MSC betrug hierbei ca. 30 000/cm². Am nächsten Tag wurde das Medium der Platten abgeschüttet. PBMC wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. In 200 µl RPMI mit 20% autologem Serum wurden ca. 50 000 PBMC unter Zugabe von Mitogenen im Beisein oder in Abwesenheit von MSC in den 96-well Platten kultiviert. Pro Ansatz wurden je drei wells bestückt.

Nach 4 - 6 Tagen Inkubation wurde in jedes Loch jeweils 15 µl *BrdU labeling solution* gegeben und weitere 24 h inkubiert. Dann wurde die Platte bei 300 g und Raumtemperatur für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abgegossen und die Platte vorsichtig auf einem Zellstofftuch abgedrückt. Nun wurde die Platte bei 60°C auf einer Heizplatte für eine Stunde getrocknet. Es wurden 200 µl *Fix Denat* auf die Platte pipettiert und im Anschluss für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Überstand abgegossen und die Platte wiederum auf Zellstoff abgedrückt. Nach Zugabe von 100 µl *Anti-BrdU-POD* Gebrauchslösung wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde erneut abgegossen, die Platte vorsichtig auf Zellstoff abgedrückt und die Zellen dreimal mit Waschlösung für jeweils 5 - 15 Minuten gewaschen. Nach dem Abschütten der letzten Waschlösung wurde auf die Rückseite der Platte eine schwarze Folie aufgeklebt und in jedes Loch 100 µl Substratlösung, die 15 Minuten vor Gebrauch hergestellt worden war hinzugegeben. Innerhalb von zehn Minuten wurde nun am Viktor gemessen.

Für die Inhibitionsversuche wurden folgende Kulturen angesetzt:

- 1) 200 µl Medium
- 2) 50 000 PBMC in 200 µl Medium
- 3) MSC + 1 µg PHA in 200 µl Medium
- 4) MSC + 100 U IL-2 in 200 µl Medium
- 5) 50 000 PBMC + MSC in 200 µl Medium

- 6) 50 000 PBMC + 1 µg PHA in 200 µl Medium
- 7) 50 000 PBMC + 100 U IL-2 in 200 µl Medium
- 8) 50 000 PBMC + 1 µg PHA + MSC in 200 µl Medium
- 9) 50 000 PBMC + 100 U IL-2 + MSC in 200 µl Medium

3.7.2 Durchflusszytometrie und FACS-Analyse

Prinzip:

Die Durchflusszytometrie eignet sich zur Analyse von Zellen mittels Detektion von Streulicht das nach Laserbestrahlung entsteht. Die zu untersuchende Zellsuspension wird durch eine Kapillare so aspiriert, dass die Zellen perlschnurartig aufgereiht werden. Die so aufgetrennten Zellen werden nacheinander von einem Laser erfasst und die verursachte Lichtstreuung aus verschiedenen Winkeln detektiert. Durch die Auftragung dieses Streulichtes als Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) kann man eine Verteilung der Zellen nach ihrer Größe und Granularität erreichen (*Abbildung 6*).

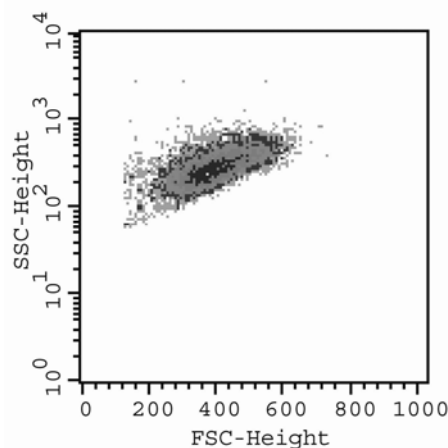


Abbildung 6: Durchflusszytometrische Analyse von MSC. Auftragung der Zellen im Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC).

Des Weiteren können bei dieser Methode die zu analysierenden Zellen mit verschiedenen fluoreszierenden Antikörpern markiert werden. Bei der Markierung gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten. Zum einen können direkt an Farbstoff

gebundene, spezifische Antikörper oder aber markierte Immunglobuline gegen zellgebundene Antikörper verwendet werden.

Die so an die Zellen gebundenen Farbstoffmoleküle werden mittels Laser zur Fluoreszenz angeregt. Photodetektoren messen diese und können Informationen über die Bindung der markierten monoklonalen Antikörper und somit über die Expression der Oberflächenproteine jeder Zelle gewinnen. Die so erhaltenen Daten werden an einen Computer geschickt und können mittels geeigneten Programms ausgewertet werden. Um Aussagen über die Vitalität der Zellen machen zu können, kann eine Färbung mit Propidiumiodid (PI) durchgeführt werden. Dieses dringt nur in Zellen mit durchlässiger Membran, also nekrotische Zellen, ein. In der FACS-Analyse stellen sich diese Zellen dann als PI positiv dar, während die nicht-nekrotischen Zellen hierfür negativ sind.

Werden die Zellen mit einem Antikörper markiert, kann man sie in Form eines Histogramms der Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl auftragen. Wurden allerdings zwei Antikörper verwendet, zeigen sich die Daten als zweidimensionales Streudiagramm.

3.7.3 Immunphänotypisierung von MSC

Zur Charakterisierung der Oberflächenmoleküle der MSC wurden die Zellen mit verschiedenen fluoreszierenden Antikörpern angefärbt und dann der durchflusszytometrischen Analyse zugeführt.

Die MSC wurden hierzu aus den Flaschen abgelöst, zweimal mit PBS gewaschen und zu je ca. $1,5 - 5 \times 10^5$ Zellen in 100 μ l PBS in FACS-Röhrchen überführt. Nun wurden in jedes Röhrchen 5 μ l der entsprechenden Antikörper hinzugegeben und für 20 - 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen bei 400 g für 5 Minuten abzentrifugiert und zwei weitere Male mit PBS gewaschen, bevor sie in der Durchflusszytometrie gemessen wurden.

Anfärbung der Zellen:

Kontrollen:

1. IgG1-FITC IgG1-PE
2. CD105-FITC IgG1-PE
3. IgG1-FITC CD90-PE

Oberflächenfärbungen:

4. CD105-FITC CD90-PE
5. CD106-FITC CD146-PE
6. CD73-PE
7. CD45-FITC CD34-PE
8. Anti-HLA-DR-FITC Anti-HLA-ABC-PE

3.7.4 CFSE-Proliferationsassay

Prinzip:

Die Anwendung des CFSE-Proliferationsassays ermöglicht es, Zellen auf ihr Wachstumsverhalten hin zu untersuchen. CFSE besteht aus einem vorerst nicht-fluoreszierenden Molekül, welches zwei Acetatreste besitzt. Es diffundiert frei in die Zellen hinein. Intrazelluläre Esterasen spalten die Acetatgruppen, so dass sie zu einem fluoreszierenden, membranundurchdringlichen Farbstoff werden. Mit jeder Zellteilung wird der sich im Zytoplasma befindende Farbstoff gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen verteilt, so dass die Dichte von Generation zu Generation um die Hälfte abnimmt. Nach einigen Tagen Inkubation mit z. B. verschiedenen Mitogenen kann dann die Intensität des CFSE der Zellen mittels FACS gemessen und ausgewertet werden. Je weniger Fluoreszenz in einer Zelle gemessen wird, desto öfter hat sie sich geteilt. In einigen Fällen können sogar die einzelnen Zyklen unterschieden werden (*Abbildung 7*).

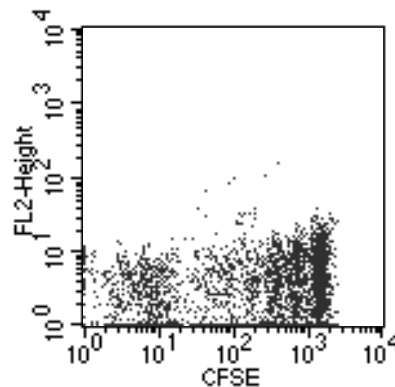


Abbildung 7: Unterscheidung der einzelnen Zellteilungszyklen in einem CFSE-Proliferations-assay.

Anfärbung der PBMC mit CFSE:

Zu färbende PBMC wurden in einer Menge von $1 - 2 \times 10^7$ Zellen in 1 ml PBS in 15 ml Falcon-Röhrchen suspensiert. Dann wurde 1 ml der $1,6 \mu\text{M}$ Färbelösung hinzugegeben und die Zellen bei 37°C im Brutschank für 9 Minuten inkubiert. Nach dem Färbeschritt wurde die Färbung mit 4 ml FCS für 2 Minuten bei Raumtemperatur abgestoppt. Anschließend wurden 6 ml des zur Weiterverarbeitung verwendeten Mediums hinzugegeben und die Zellen bei 400 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit Medium. Zuletzt wurden die Zellen gezählt und für die jeweiligen Versuche verwendet.

Zweite Färbung der PBMC zur Untersuchung der Subpopulationen:

Zur Untersuchung der Subpopulationen der PBMC wurden diese nach der Kultur mit MSC einer zweiten Färbung unterzogen. Hierfür wurden die Zellen am letzten Tag des Proliferationsassays aus den wells genommen. Nach zweimaligem Waschen wurden sie in $200 \mu\text{l}$ PBS aufgenommen und mit dem zweiten Antikörper für 10 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert.

Antikörpermenge:

CD4 – 3 µl für 3×10^5 PBMC

CD8 – 1,5 µl für 3×10^5 PBMC

CD56 – 1,5 µl für 3×10^5 PBMC

Im Anschluss wurden die Zellen bei 400 g für 5 Minuten abzentrifugiert und zwei weitere Male mit PBS gewaschen, bevor sie in der Durchflusszytometrie gemessen wurden.

In den Versuchen wurden am Tag -1 MSC in einer Dichte von ca. 30 000/cm² in 96-well Platten in RPMI 10% angesetzt. Am nächsten Tag wurden PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und mit CFSE wie oben beschrieben angefärbt. Anschließend wurden PBMC unter Stimulation mit 1 - 5 µg/ml PHA bzw. 100 - 500 U/ml IL-2 +/- 1 µg/ml OKT3 in RPMI 20% autol. zu den MSC gegeben, nachdem zuvor das RPMI 10% abgegossen wurde.

Die Ansätze für die CFSE-Proliferationsassays sahen wie folgt aus:

- 1) 50 000 PBMC in 200 µl Medium
- 2) 50 000 PBMC + MSC in 200 µl Medium
- 3) 50 000 PBMC + PHA in 200 µl Medium
- 4) 50 000 PBMC + PHA + MSC in 200 µl Medium
- 5) 50 000 PBMC + IL-2 +/- OKT3 in 200 µl Medium
- 6) 50 000 PBMC + IL-2 +/- OKT3 + MSC in 200 µl Medium

Nach 4 - 6 Tagen Kultur wurden die PBMC abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend am Durchflusszytometer gemessen.

Zur Untersuchung der Subpopulationen wurden die PBMC nach zweimaligem Waschen mit dem entsprechenden Antikörper gefärbt und erst im Anschluss gemessen.

Die Ansätze für die Subpopulationsversuche sahen wie folgt aus:

1) 50 000 PBMC + PHA in 200 µl Medium	→ 2. Färbung: CD4
2) 50 000 PBMC + PHA + MSC in 200 µl Medium	→ 2. Färbung: CD4
3) 50 000 PBMC + PHA in 200 µl Medium	→ 2. Färbung: CD8
4) 50 000 PBMC + PHA + MSC in 200 µl Medium	→ 2. Färbung: CD8
5) 50 000 PBMC + PHA in 200 µl Medium	→ 2. Färbung: CD56
6) 50 000 PBMC + PHA + MSC in 200 µl Medium	→ 2. Färbung: CD56
7) 50 000 PBMC + U IL-2 + OKT3 in 200 µl Medium	→ 2. Färbung: CD4
8) 50 000 PBMC + U IL-2 + OKT3 + MSC in 200 µl Medium	→ 2. Färbung: CD4
9) 50 000 PBMC + U IL-2 + OKT3 in 200 µl Medium	→ 2. Färbung: CD8
10) 50 000 PBMC + U IL-2 + OKT3 + MSC in 200 µl Medium	→ 2. Färbung: CD8
11) 50 000 PBMC + U IL-2 in 200 µl Medium	→ 2. Färbung: CD56
12) 50 000 PBMC + U IL-2 + MSC in 200 µl Medium	→ 2. Färbung: CD56

Transwell /allgemeiner Versuchsaufbau:

Um näher zu untersuchen, ob bei der Inhibition von PBMC durch MSC Zell-Zell-Kontakt notwendig ist oder nicht, wurden die CFSE-Proliferationsassays auch in Transwell-Systemen durchgeführt.

Hierfür wurden am Tag -3 MSC in 24-well Platten in einer Dichte von 30 000/cm² Zellen ausgesät. Die Löcher wurden jeweils mit RPMI 10% Medium befüllt. In die Löcher, in denen PBMC keinen Kontakt zu MSC haben sollten, wurde ein Transwelleinsatz eingesetzt und dieser mit Medium befüllt. An Tag 0 wurden PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und mit CFSE wie oben beschrieben angefärbt. Unter Stimulation mit PHA oder IL-2 / OKT3 wurden die PBMC dann in die Löcher gegeben. In den Löchern, in denen die Zellen allein oder mit möglichem Kontakt zu MSC kultiviert werden sollten, wurden in insgesamt 2 ml Medium ca. 500 000 PBMC kultiviert. In den Löchern,

in denen die PBMC keinen Kontakt zu MSC haben sollten, wurden ca. 500 000 PBMC in möglichst geringem Volumen in die obere Kammer gegeben.

Folgende Ansätze wurden gemacht:

1. PBMC + PHA in Medium
2. PBMC + PHA + MSC ohne Transwell
3. PBMC + PHA + MSC im Transwell-System
4. PBMC + IL-2 + OKT3
5. PBMC + IL-2 + OKT3 + MSC ohne Transwell
6. PBMC + IL-2 + OKT3 + MSC im Transwell-System

Nach 4 - 6 Tagen Kultur wurden die PBMC abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend am Durchflusszytometer gemessen.

Überstand:

In weiteren Versuchen zum Mechanismus der inhibitorischen Wirkung von MSC wurden PBMC nur mit dem Überstand von MSC Kulturen behandelt und im Anschluss die Proliferation in einem CFSE-Proliferationsassay ausgewertet.

Hierzu wurden MSC in einer Dichte von 30 000/cm² in zwei Löcher von 6-Lochplatten in DMEM 10% drei Tage vor Beginn des Versuches angesetzt, um so das Medium zu konditionieren. An Tag -1 wurden MSC desselben Spenders vom selben Ansatz in 96-Lochplatten in RPMI 10% angesetzt. An Tag 0 wurde der Überstand abgeschüttet. PBMC wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und mit CFSE, wie oben beschrieben angefärbt. Dann wurden die Zellen in RPMI 20% autolog zu den MSC gegeben. Bei den Ansätzen, in denen die PBMC mit dem Überstand von MSC behandelt werden sollten, wurde in den darauffolgenden Tagen täglich 100 µl Medium abgenommen und durch Überstand der MSC aus den 6-Lochplatten ersetzt.

Folgende Ansätze wurden gemacht:

1. PBMC + PHA in 200 μ l Medium
2. PBMC + PHA + MSC in 200 μ l Medium
3. PBMC + PHA in 200 μ l Medium + täglich 100 μ l Überstand MSC ausgetauscht
4. PBMC + IL-2 + OKT3 in 200 μ l Medium
5. PBMC + IL-2 + OKT3 + MSC in 200 μ l Medium
6. PBMC + IL-2 + OKT3 + täglich 100 μ l Überstand MSC ausgetauscht

Nach 4 - 5 Tagen wurden die PBMC abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend am Durchflusszytometer gemessen.

3.8 Differenzierungen und Färbungen von MSC

3.8.1 Adipogene Differenzierung von MSC_{SF}

Um MSC adipogen zu differenzieren wurden die Zellen am Tag 0 mit DMEM_{FFPP} und den untenstehenden Zusätzen in 6-Lochplatten mit einer Konfluenz von ca. 80 - 90% angesetzt. Ein Loch diente hierbei als Kontrolle und wurde jeweils nur mit DMEM_{FFPP} geführt, in zwei weiteren wurde die Differenzierung vorgenommen. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage fotografiert und das Medium gewechselt.

Verwendete Zusätze für die adipogene Differenzierung:

- 1 μ M Dexamethason
- 60 μ M Indomethacin
- 10 μ M Insulin
- 0,5 mM IBMX

Nach ca. 14 - 25 Tagen, wenn unter dem Lichtmikroskop bereits ca. 50% der Zellen Fettvakuolen zeigten, wurde die Differenzierungsfärbung durchgeführt. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen folgenden Schritten zugeführt:

1. Waschen mit PBS
2. Fixierung der Zellen mit 40%igen Formalindämpfen
3. Spülen mit ddH₂O für zwei Minuten
4. Färbung mit 1% Oil-Red-O (in Lösung mit jeweils zur Hälfte 70% Ethanol und Azeton) für drei Minuten
5. Spülen mit ddH₂O für fünf Minuten
6. Färbung mit Harris Hematoxilin für 30 sec - 1 Minute
7. Spülen mit ddH₂O für fünf Minuten

Anschließend wurde zur Vermeidung von Austrocknung 1 ml PBS auf die Zellen gegeben. Unter dem Lichtmikroskop wurde die Färbung betrachtet und fotografiert.

3.8.2 Osteogene Differenzierung von MSC_{SF}

Zur osteogenen Differenzierung wurden die MSC am Tag 0 ebenfalls mit DMEM_{FFPP} und den entsprechenden Zusätzen in 6-Lochplatten angesetzt. Hier betrug die Konfluenz ca. 60 - 70%. Auch hier diente ein Loch als Kontrolle und wurde nur mit DMEM_{FFPP} geführt, zwei weitere wurden für die Differenzierung verwendet. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage fotografiert und das Medium gewechselt.

Verwendete Zusätze für die osteogene Differenzierung an den Tagen 1 - 6:

10 nM Dexamethason

0,1 mM L-Ascorbinsäure-2-phosphat

ab dem siebten Tag zusätzlich:

10 mM β -Glycerolphosphat

100 ng/ml BMP-2

Nach ca. 14 - 25 Tagen, wenn unter dem Lichtmikroskop bereits kleine Areale von Calciumsalzansammlungen zu sehen waren, wurde die Differenzierungsfärbung durchgeführt.

Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen folgenden Schritten zugeführt:

1. Waschen der Zellen mit 20 mM Tris-HCl und 150 mM NaCl
2. Fixation mit 100% eiskaltem Methanol: Methanol für einige Sekunden auf die Zellen geben, wieder absaugen und dann die Zellen ohne Deckel für 2 Minuten auf Eis trocknen lassen)
3. Spülen mit ddH₂O
4. Färbung mit 0,5% Alizarin Red S pH 4,0 (mit pH-Meter einstellen) für 30 sec - 1 Minute
5. Spülen mit ddH₂O
6. Spülen mit PBS für 15 min
7. Dehydrierung mit eiskaltem Ethanol: Ethanol für einige Sekunden auf die Zellen geben, wieder absaugen und dann die Zellen ohne Deckel für 10 Minuten auf Eis trocknen lassen)

Anschließend wurde zur Vermeidung von Austrocknung 1 ml PBS auf die Zellen gegeben. Unter dem Lichtmikroskop wurde die Färbung betrachtet und fotografiert.

3.9 In Einzelheilversuchen mit MSC behandelte Patienten

In der Kinderklinik Tübingen wurden zwischen 01/2004 und 07/2005 sieben Patienten mit unterschiedlichen Grundkrankheiten in Einzelheilversuchen mit MSC behandelt. Die Patienten litten alle unter malignen Erkrankungen des Knochenmarks und wurden ihrer jeweiligen Grunderkrankung entsprechend behandelt. Sie erhielten nach teils vorheriger Chemotherapie allogene Stammzelltransplantationen. Diese Transplantationen waren in vier Fällen haploid von einem Elternteil, in einem von einem Geschwisterkind und in zwei Fällen von einem nicht-verwandten Spender. Zwei der transplantierten Patienten erhielten eine zweite Stammzelltransplantation. Davon eine wiederum von einem Elternteil und die andere erneut von einem nicht-verwandten Spender. Nach den Transplantationen traten verschiedene Komplikationen, wie Transplantatversagen, akute oder chronisch GvHD auf. Daraufhin wurden MSC vom selben Spender, von dem die hämatopoetischen Stammzellen stammten, transplantiert.

4 Ergebnisse

4.1 Vergleich der Morphologie und des Immunphänotyps von MSC aus verschiedenen Geweben

Zu Beginn wurden MSC aus Knochenmark (MSC_{KM}) mit MSC, die aus Fettgewebe (MSC_{FAT}) oder Synovialflüssigkeit (MSC_{SF}) gewonnen wurden, auf ihre Morphologie und ihre Oberflächenantigene untersucht. Hierzu wurden Zellen, die 6 - 8 Wochen in Kultur waren und sich nun konfluent zeigten, unter dem Lichtmikroskop miteinander verglichen. (Abbildungen 8 a - c)

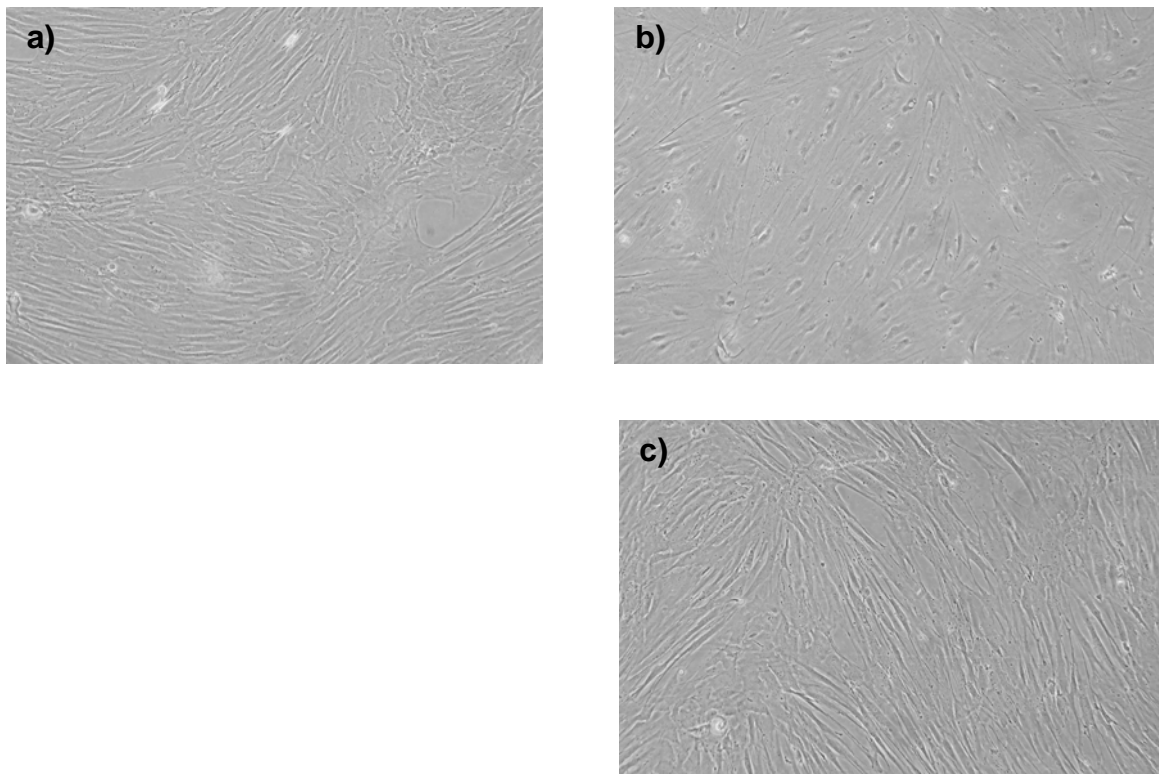


Abbildung 8: Morphologischer Vergleich von a) MSC_{KM} , b) MSC_{FAT} und c) MSC_{SF} unter dem Lichtmikroskop nach ca. sechswöchiger Kultur.

Es zeigten sich in allen Ansätzen spindelförmige Zellen mit homogenem Zytoplasma. Bei den MSC_{FAT} war ein prominenter Zellkern sichtbar.

Mittels Durchflusszytometrie wurde der Immunphänotyp der MSC untersucht.

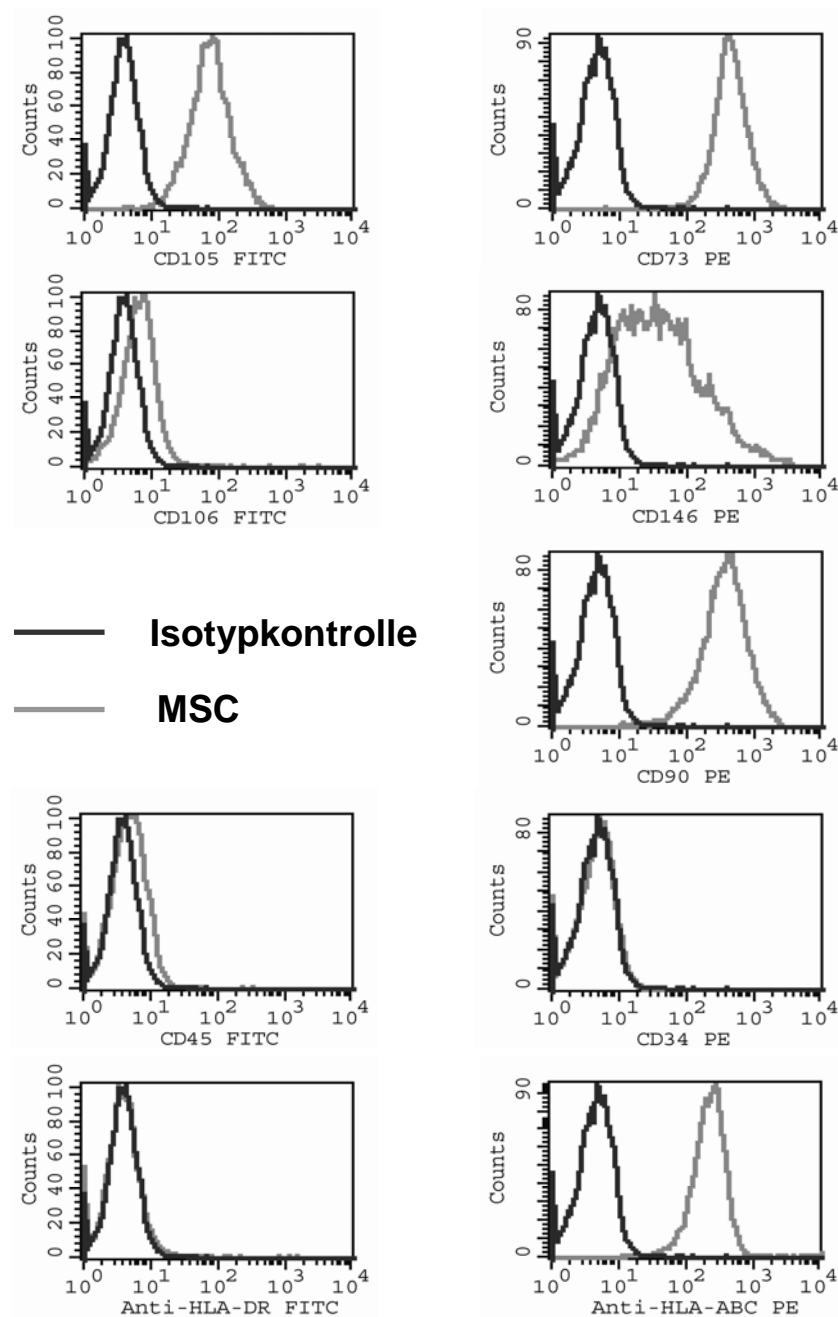


Abbildung 9: Immunphänotyp von MSC_{KM} nach sechswöchiger Kultur.

MSC_{KM} zeigten sich hierbei für sieben der neun getesteten Oberflächenmarker homogen. Sie waren positiv für CD105, CD90, CD73 und HLA-ABC. Negativ waren sie für CD45, CD34 und HLA-DR (Abbildung 9). Spenderspezifische Unterschiede gab es bei den Markern CD106, für den ein Teil der Zellen negativ und ein anderer leicht positiv war und CD146, für den die Zellen entweder negativ oder positiv waren (Abbildung 10 a).

Auch der Immunphänotyp der MSC_{FAT} und MSC_{SF} erschien größtenteils ähnlich. Unterschiede gab es lediglich bei den Markern CD45, CD34 und CD106. Diesbezüglich zeigten sich die MSC_{FAT} für CD45 und CD34 positiv. Die MSC_{SF} zeigten bei CD106 ein positives Bild, ansonsten aber keine Unterschiede (Abbildungen 10 b und c).

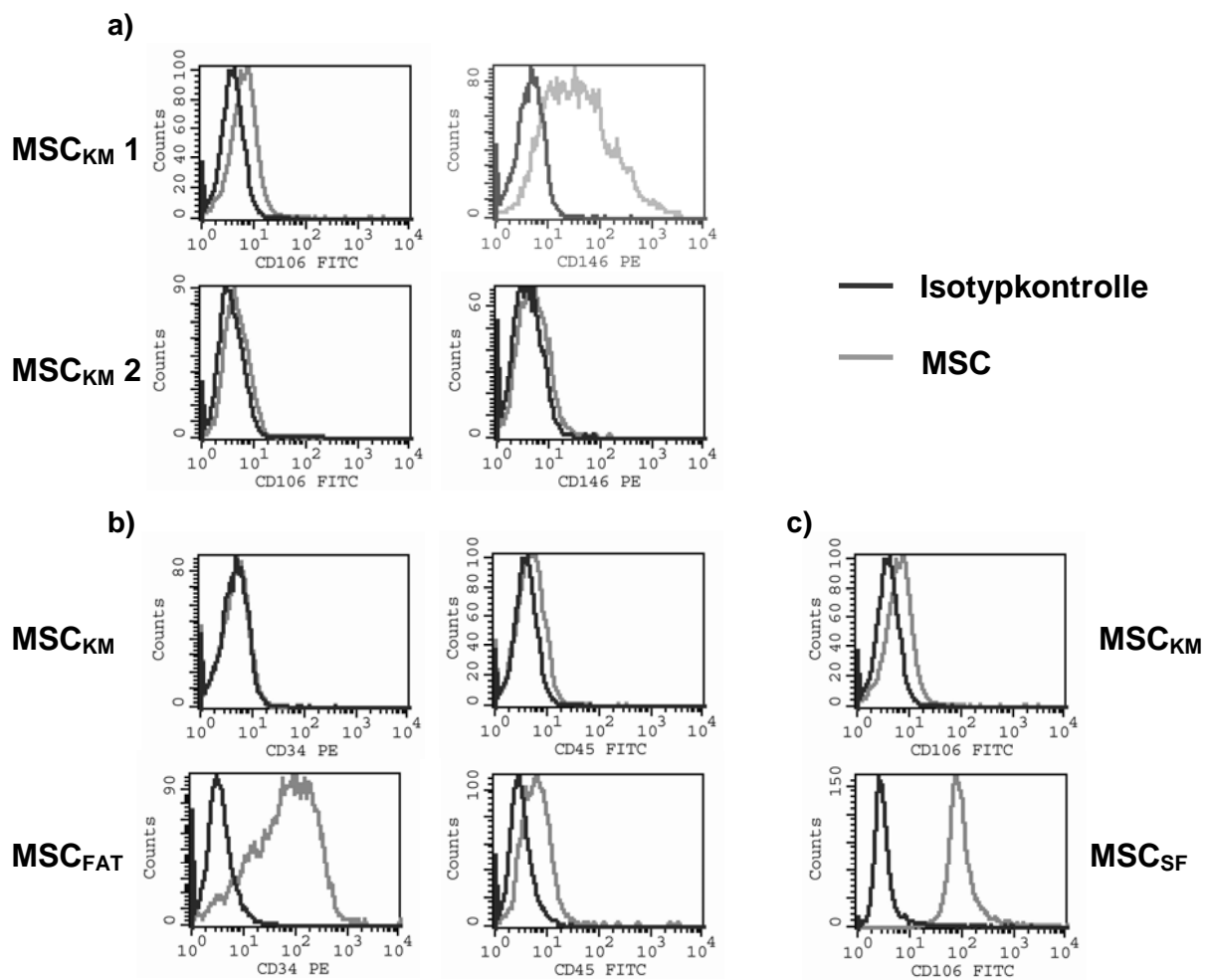


Abbildung 10: Abweichungen im Immunphänotyp von a) MSC_{KM} verschiedener Spender (1 und 2) sowie b) MSC_{FAT} und c) MSC_{SF}.

4.2 Untersuchungen der immunologischen Einflüsse von MSC

4.2.1 BrdU-Proliferationsassay

MSC besitzen immunregulatorische Eigenschaften und können Proliferation und Funktion von Effektorzellen unterdrücken. Um diese Merkmale näher zu untersuchen, sollte in einem BrdU-Proliferationsassay die Wirkung von allogenen MSC auf durch Mitogene stimulierte PBMC betrachtet werden. Hierzu wurden in 96-well Platten PBMC alleine oder unter Stimulation mit 5 µg/ml PHA bzw. 500 U/ml IL-2 mit oder ohne MSC über 7 Tage kultiviert (Abbildung 11).

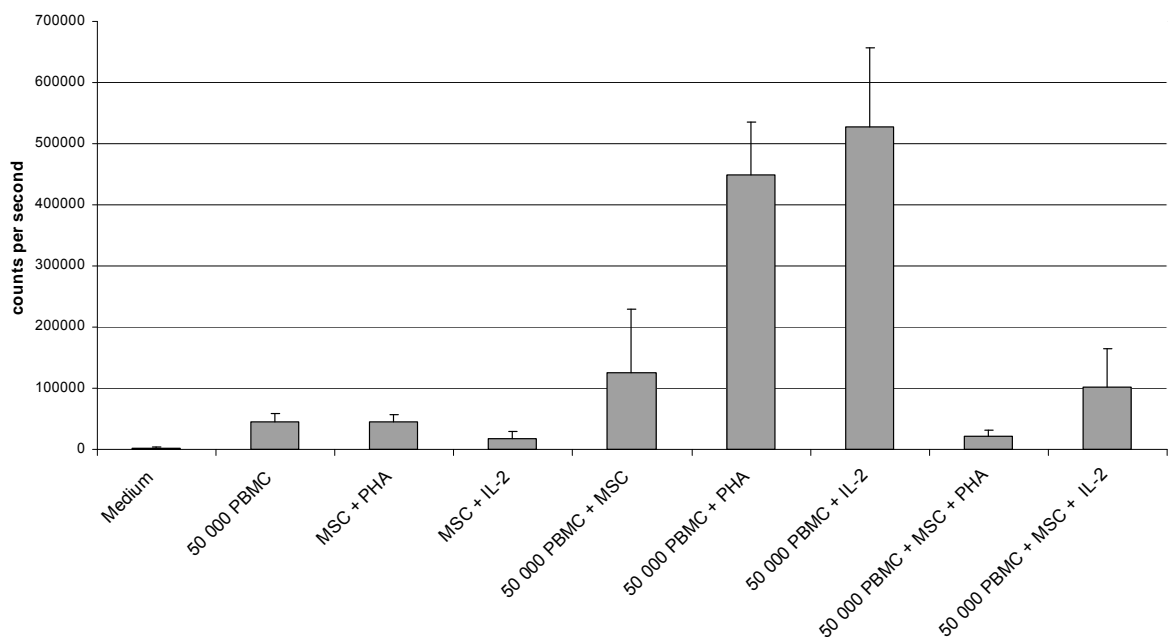


Abbildung 11: Immunregulatorische Eigenschaften von MSC auf PBMC in einem BrdU-Proliferationsassay.

In Gegenwart von allogenen MSC_{KM} zeigten PBMC hierbei keine Alloreaktion. Darüber hinaus konnte eine durch PHA oder IL-2 induzierte Proliferation der PBMC beim Vorhandensein von MSC unterdrückt werden.

4.2.2 CFSE-Proliferationsassay

Da für spätere Versuche die Anwendung des BrdU-Assays nicht ausreichend war, wurde es notwendig, einen anderen Assay einzuführen. Hierbei zeigte sich der CFSE-Proliferationsassay als geeignet, da bei diesem einerseits durch weitere Färbeschritte die Unterscheidung einzelner proliferierender Subpopulationen möglich ist. Ebenso fällt bei dieser Methode der störende Einfluss der MSC weg, deren weiteres Wachstum beim BrdU-Assay mitanalysiert wird.

Zuerst sollte noch einmal die inhibitorische Wirkung von MSC auf PBMC in einem MHC-mismatch Ansatz gezeigt werden.

Auch hier zeigten die PBMC bei sechstägiger Kultur in Gegenwart von MSC keine Alloreaktivität (*Abbildung 12*). Die durch PHA verursachte Proliferation der PBMC konnte durch MSC unterdrückt werden (*Abbildung 13 a*). Ebenfalls konnte eine durch IL-2 und OKT3 induzierte Proliferation gehemmt werden (*Abbildung 13 b*). Die hier noch vorhandene Restproliferation ist vermutlich auf die Proliferation von NK-Zellen zurückzuführen.

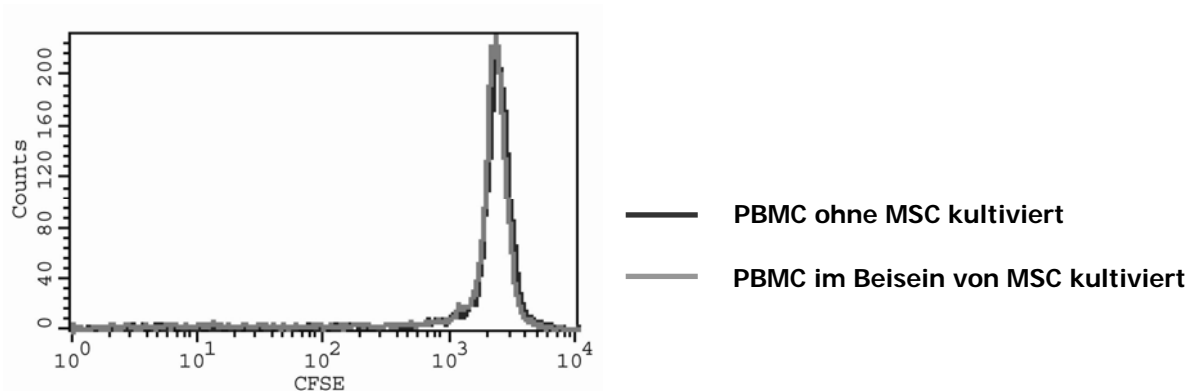


Abbildung 12: Ausbleiben der Alloreaktion von PBMC auf MSC in einem CFSE-Proliferationsassay.

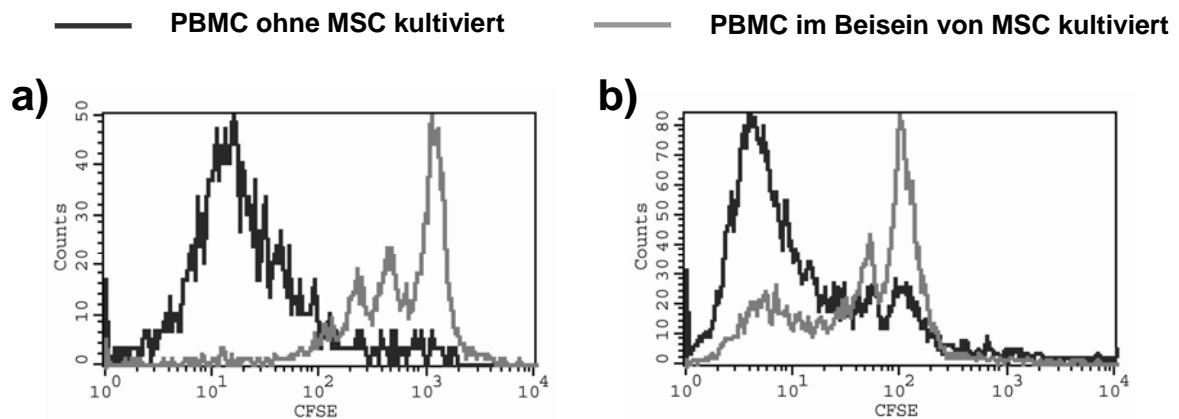


Abbildung 13: Nachweis der Proliferationshemmung von PBMC durch MSC. a) Stimulation der Zellen mit 5 µg/ml PHA über 6 Tage. b) Stimulation der Zellen mit 20 U/ml IL-2 und 1 µg/ml OKT3 über 5 Tage.

In weiteren Versuchen wurden MSC_{FAT} in ähnlicher Weise mit PBMC im MHC-mismatch Ansatz kultiviert. Auch hierbei konnte ein inhibitorischer Effekt der MSC Population auf die PBMC beobachtet werden (*Abbildung 14 a und b*). Ebenso wurden Assays gemacht mit MSC, die in Medium gezüchtet wurden, das *Fresh Frozen Plasma* und Thrombozyten enthielt (MSC_{FFPP}). Diese Zellen waren gleichfalls in der Lage, die Inhibition von stimulierten PBMC zu unterdrücken (*Abbildung 15 a und b*).

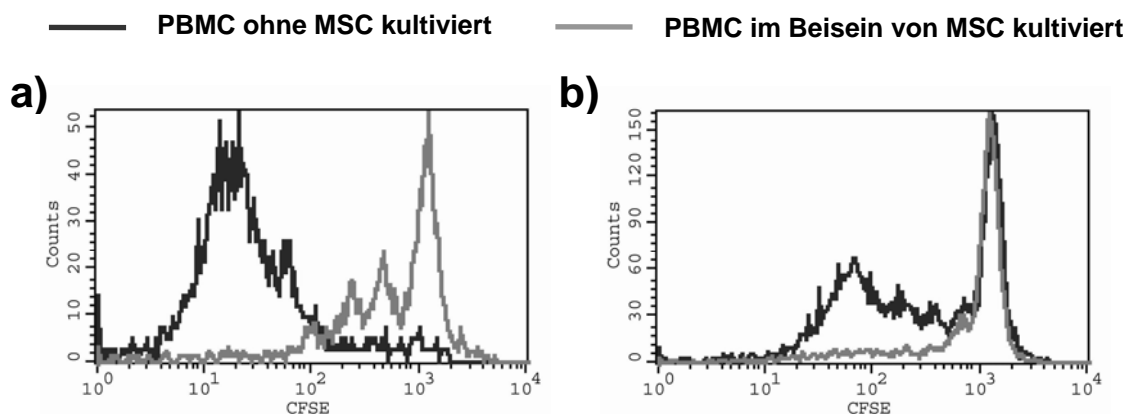


Abbildung 14: Nachweis der Proliferationshemmung von PBMC durch MSC_{FAT}. a) Stimulation der Zellen mit 5 µg/ml PHA über 6 Tage. b) Stimulation der Zellen mit 20 U/ml IL-2 und 1 µg/ml OKT3 über 6 Tage.

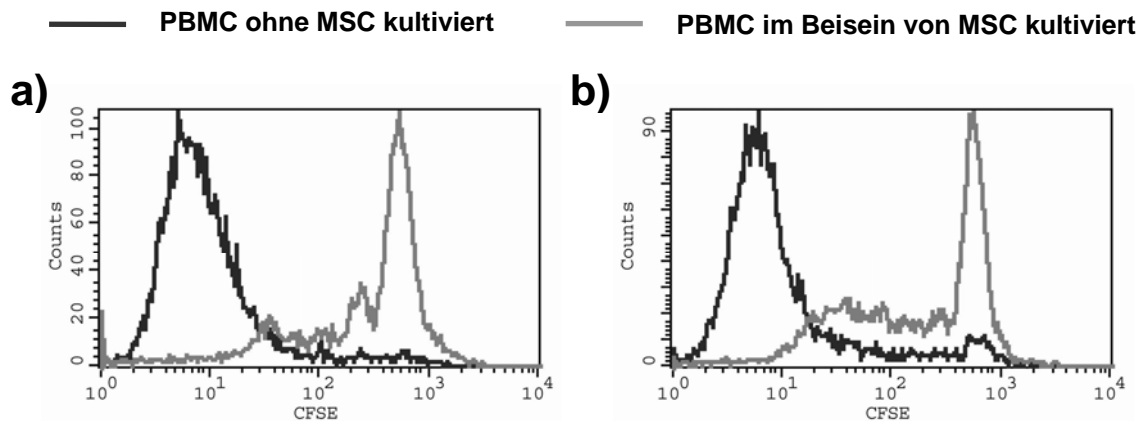


Abbildung 15: Nachweis der Proliferationshemmung von PBMC durch MSC_{FFPP}. a) Stimulation der Zellen mit 5 µg/ml PHA über 5 Tage. b) Stimulation der Zellen mit 100 U/ml IL-2 und 1 µg/ml OKT3 über 5 Tage.

Bei der Untersuchung, ob auch MSC, die aus Synovialflüssigkeit gewonnen wurden (MSC_{SF}), inhibitorisch auf proliferierende PBMC wirken, ergaben sich sehr unterschiedliche Ergebnisse. Zum einen wurden MSC von Patienten verwendet, die an rheumatischen Erkrankungen, wie der juvenilen idiopathischen Arthritis, litten. Hierbei konnten die MSC in 13 von 22 Fällen eine Proliferation von PBMC unterdrücken. Hauptsächlich war dies bei der Verwendung von IL-2 / OKT3 als Mitogene der Fall.

Zum anderen wurden MSC_{SF} von Patienten verwendet, die traumatisch bedingt eine Gelenkentzündung aufzeigten. In sechs von elf Versuchen zeigten MSC hier inhibitorische Eigenschaften gegenüber PBMC (Abbildungen nicht gezeigt).

In einigen Versuchen wurden aus dem Knochenmark gewonnene MSC von Patienten, die an schwerer aplastischer Anämie (SAA) litten, untersucht. Hierbei zeigte sich, dass diese MSC in der Lage waren, stimulierte PBMC in ihrer Proliferation zu hemmen, wenn als Mitogene 100 U/ml IL-2 und 1 µg/ml OKT3 verwendet wurden. Beim Einsatz von 5 µg/ml PHA als Stimulanz konnte dieser Effekt nur in drei von sechs Ansätzen mit drei verschiedenen Spendern beobachtet werden (Abbildungen nicht gezeigt).

4.2.3 Wirkung von MSC auf verschiedene Subpopulationen von PBMC

In weiteren Experimenten wurde das Augenmerk auf einen Teil der verschiedenen Subpopulationen von PBMC gerichtet. Es wurde untersucht, welchen Einfluss MSC auf die Proliferation stimulierter $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD56^+$ Zellen haben. Hierzu wurde der unter 3.7.4 beschriebene CFSE-Proliferationsassay angewendet. An Tag 5 wurden die PBMC nach dem letzten Waschschrift mit einem PE-konjugierten Antikörper gegen das jeweilige Oberflächenmerkmal gefärbt und anschließend am Durchflusszytometer gemessen.

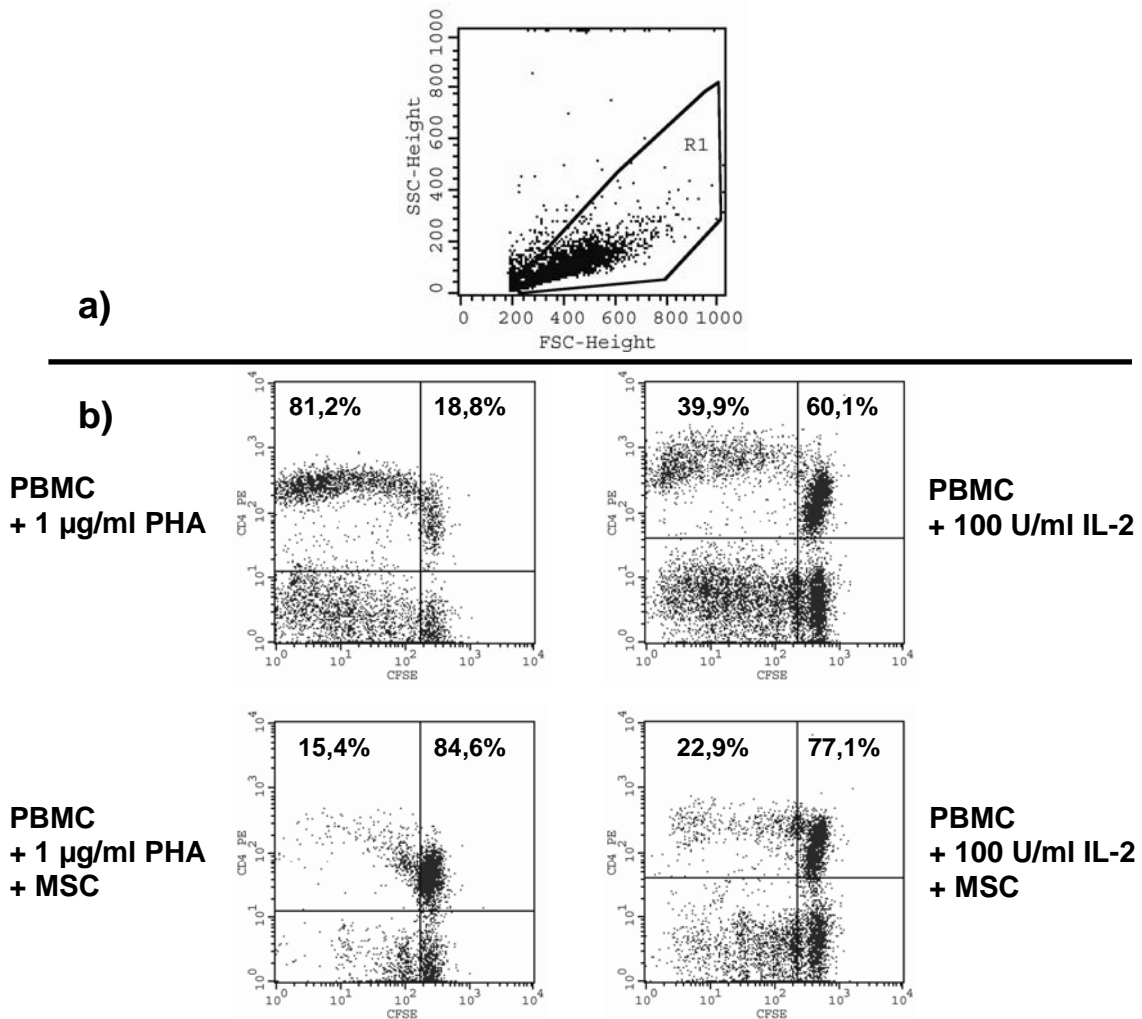
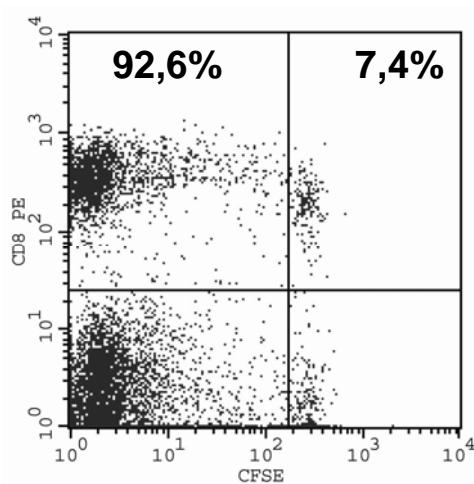
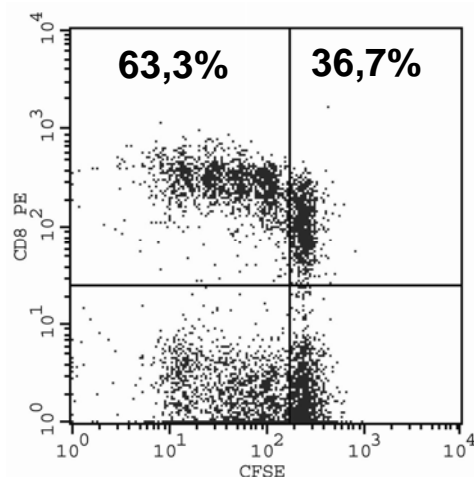


Abbildung 16: CFSE-Assay. Nachweis der inhibitorischen Wirkung von MSC auf $CD4^+$ Zellen.

Abbildung 16 zeigt die Wirkung von MSC auf CD4⁺ Zellen, die mit PHA bzw. IL-2 / OKT3 über 5 Tage stimuliert wurden. In der FACS-Analyse wurden die Zellen hierbei so herausgegriffen, dass keine CD4⁺ Monozyten in die Wertung mit eingingen (Abbildung 16 a). Man sieht sowohl unter Stimulation mit PHA als auch mit IL-2 eine deutliche Inhibition der CD4⁺ Lymphozyten (Abbildung 16 b). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei der Analyse von CD8⁺ Lymphozyten. Auch hier konnte unter Anregung der Zellen mit PHA (Abbildung 17) und IL-2 / OKT3 (Abbildung nicht gezeigt) nach 5 Tagen eine Unterdrückung der Proliferation beobachtet werden, wenn MSC anwesend waren.



**PBMC + 100 U/ml IL-2
+ 5 µg/ml OKT3**



**PBMC + 100 U/ml IL-2
+ 5 µg/ml OKT3
+ MSC**

Abbildung 17: CFSE-Assay. Nachweis der inhibitorischen Wirkung von MSC auf CD8⁺ Zellen.

Bei den CD56⁺ Zellen lassen sich zwei Unterpopulationen unterscheiden: CD56^{dim} und CD56^{bright} Zellen. Es ist zu sehen, dass die CD56^{dim} Zellen, die die zytotoxischen NK-Zellen repräsentieren, in Gegenwart von MSC in ihrer Proliferation gehemmt werden. CD56^{bright} Zellen, also vermehrt zytokinproduzierende NK-Zellen, werden bei Anwesenheit von MSC zur verstärkten Proliferation angeregt (Abbildung 18).

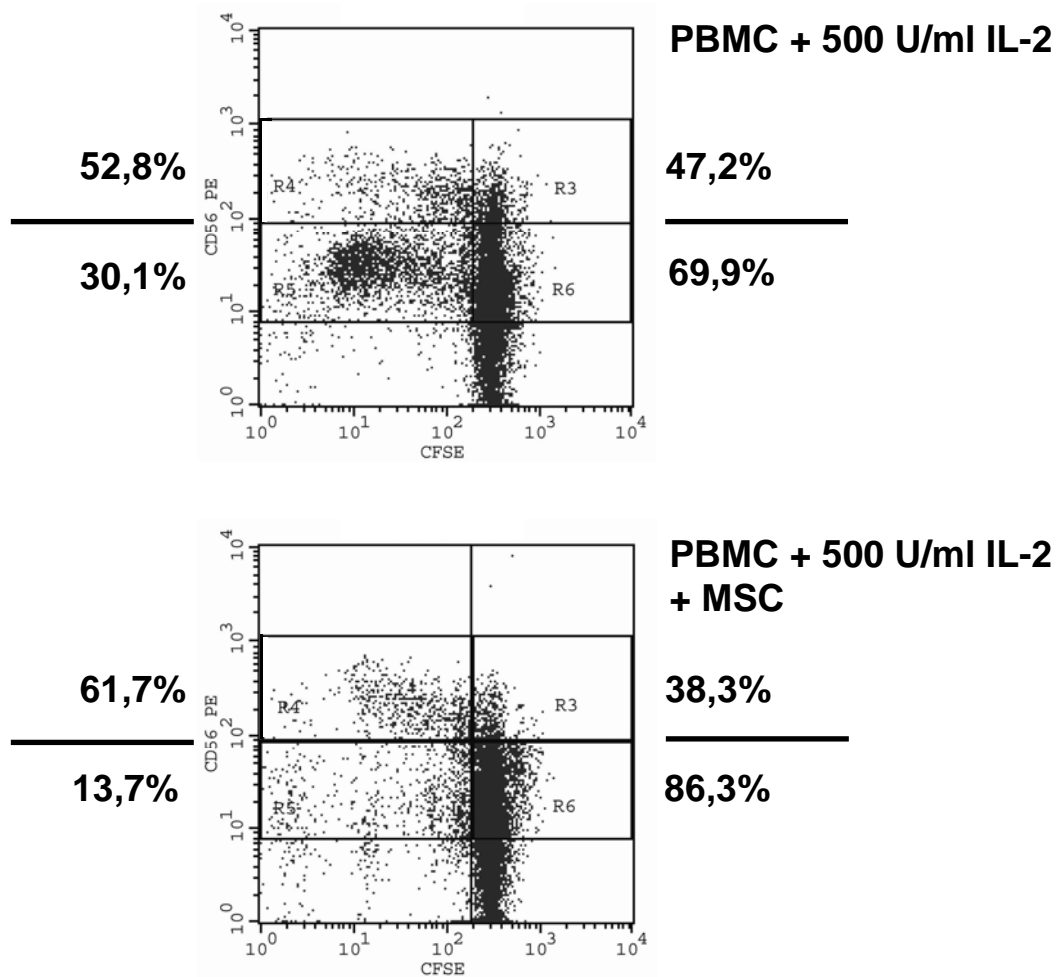


Abbildung 18: Wirkung von MSC auf CD56⁺ Zellen. Die Prozentangaben beziehen sich auf die jeweils proliferierten bzw. nicht-proliferierten CD56^{bright} und CD56^{dim} Zellen.

4.2.4 Untersuchungen zum Mechanismus der Inhibition: Transwell-System

Dass MSC inhibitorisch auf T-Zellen wirken können, ist schon seit längerem bekannt. Der Mechanismus dieser Inhibition ist allerdings noch nicht geklärt. Da neben zahlreichen löslichen Faktoren auch ein Zell-Zell-Kontakt abhängiger Vorgang in Frage kommt, sollte geklärt werden, ob MSC mit PBMC in Kontakt treten müssen, um ihre inhibitorischen Eigenschaften aufzuzeigen. Um diese Frage zu klären, wurden MSC durch eine semipermeable Membran getrennt von stimulierten PBMC kultiviert. Ihre Inhibitionsfähigkeit wurde dann mit Ansätzen verglichen, in denen MSC in direkten Kontakt mit PBMC kommen konnten. Hierbei zeigten sich teils sehr unterschiedliche Ergebnisse. Während in vier von dreizehn Versuchen keine Inhibition der PBMC beobachtet werden konnte, wenn sie durch eine semipermeable Membran von MSC getrennt waren (*Abbildung 19 a*), wurde die Proliferation in den anderen Fällen unterdrückt (*Abbildung 19 b*).

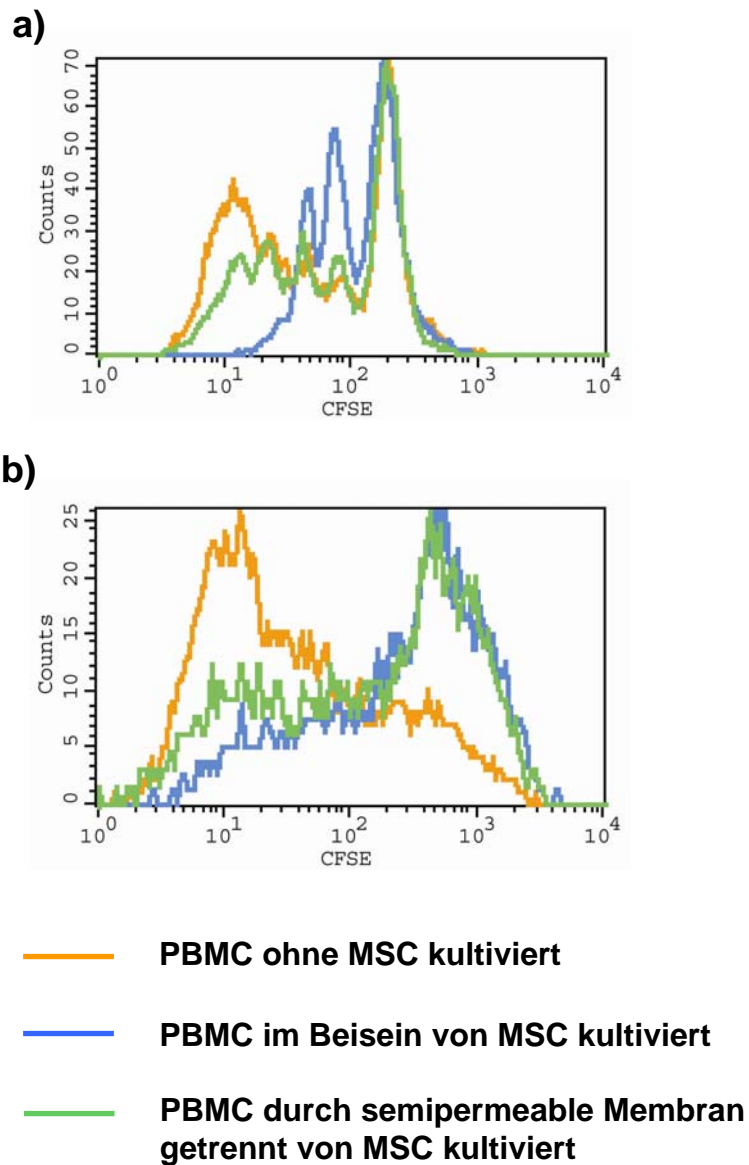


Abbildung 19: CFSE-Assay im Transwell-System. Untersuchung ob für den inhibitorischen Effekt von MSC auf PBMC Zell-Zell-Kontakt notwendig ist oder nicht. Die Zellen wurden über 6 Tage mit 5 µg/ml PHA (a) bzw. 4 Tage mit 1 µg/ml PHA (b) kultiviert.

4.2.5 Untersuchungen zum Mechanismus der Inhibition: Überstand

Zur weiteren Untersuchung des Mechanismus der Immunmodulation wurde geprüft, ob es auch durch den Einsatz von MSC konditioniertem Medium möglich ist, eine Proliferation von PBMC zu unterdrücken. Hierfür wurden PBMC unter Stimulation zum einen im Beisein von MSC und direkter Kontaktmöglichkeit kultiviert. Zum anderen wurden die PBMC nur mit dem Überstand von MSC-Kulturen über 4 - 6 Tage behandelt. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten ebenfalls ein heterogenes Bild. Während in zwei von fünf Versuchen keine Inhibition bei alleiniger Verwendung des konditionierten MSC Überstandes festgestellt werden konnte (Abbildung nicht gezeigt), fand in den anderen drei Fällen eine Hemmung des PBMC-Wachstums statt (Abbildung 20).

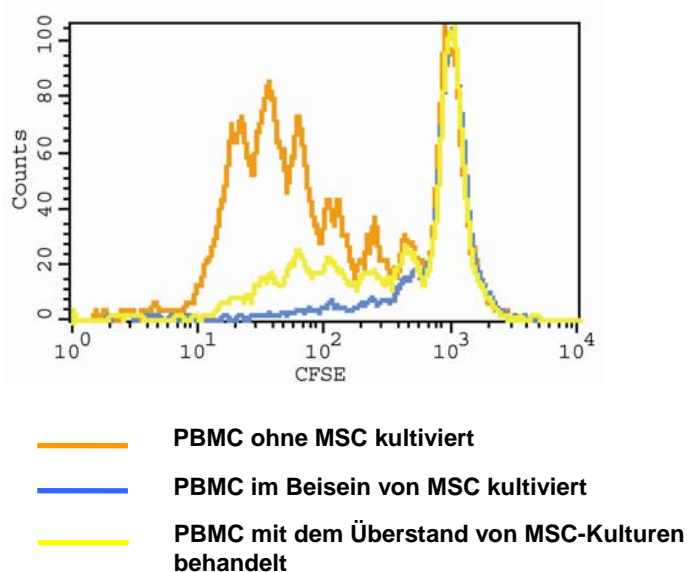


Abbildung 20: CFSE-Assay. Untersuchung ob der Überstand von MSC-Kulturen inhibitorisch auf PBMC wirkt. Die Zellen wurden über 4 Tage mit 100 U/ml IL-2 und 1 µg/ml OKT3 kultiviert.

4.3 Adipogene und osteogene Differenzierung von MSC_{SF}

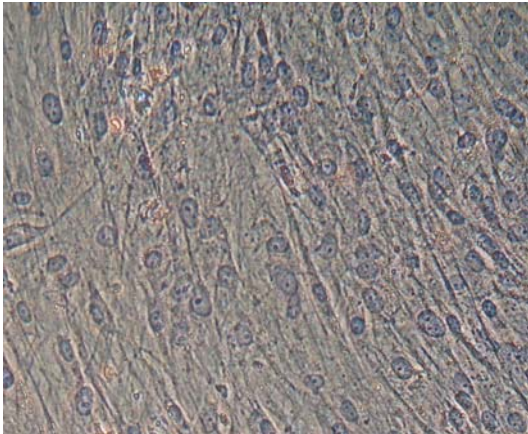
Eine elementare Eigenschaft von Stammzellen ist es, in verschiedene Gewebe differenzieren zu können. Von MSC ist hierbei bereits hauptsächlich die chondro-, osteo- und adipogene Differenzierung in der Literatur beschrieben worden. Damit die Zellen in der Klinik zum Einsatz kommen dürfen, wird vom Paul-Ehrlich-Institut verlangt, dass sie auch nach längerer Kultur ihre Stammzeleigenschaften beibehalten. Um dies nachzuweisen, müssen die Zellen zum Einsatzzeitpunkt differenzierbar sein. In unserem Labor wurden MSC aus dem Knochenmark unter bisher als Standard geltenden Kulturbedingungen mit FCS im Medium differenziert. Neben dem Nachweis, dass MSC_{BM} noch in der Lage sind, in verschiedene Gewebe zu differenzieren, wurden auch MSC_{FFPP} der Differenzierung zugeführt. Um zu zeigen, dass die in dieser Arbeit verwendeten MSC_{SF} ebenfalls MSC im engeren Sinne sind, sollten auch diesen Zellen die Differenzierungsfähigkeit nachgewiesen werden. Hierbei wurden die gleichen Differenzierungs- und Färbemethoden wie bei MSC_{BM} und MSC_{FFPP} verwendet.

Für die Differenzierung in Adipozyten wurden die Zellen wie unter 3.6 beschrieben in DMEM_{FFPP} kultiviert. Nach 15 - 22 Tagen, wenn unter dem Lichtmikroskop Fettvakuolen sichtbar waren, wurden sie der Färbung (siehe Abschnitt 3.8.1) zugeführt.

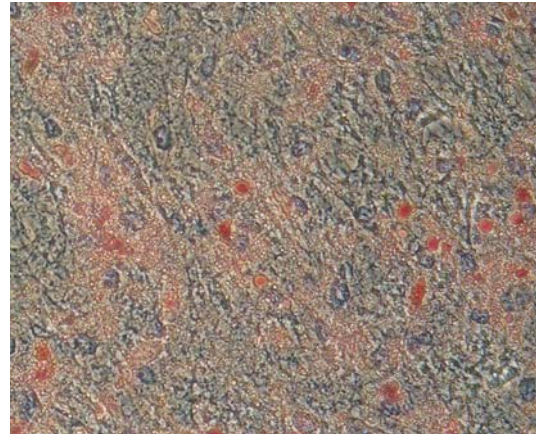
Abbildung 21 zeigt neben der Negativkontrolle, bei der die Zellen ohne Zugabe der Differenzierungsstimuli kultiviert wurden, ein repräsentatives Ergebnis einer adipogenen Differenzierung. Die mit Oil-Red-O rot angefärbten Fettvakuolen verdeutlichen die erfolgreiche Differenzierung der MSC_{SF}.

MSC_{SF} wurden darüber hinaus in Osteoblasten differenziert. Die Induktion der Zellen erfolgte hierbei über 15 Tage in DMEM_{FFPP}. Anschließend wurde die Färbung, wie unter 3.8.2 beschrieben, durchgeführt.

In *Abbildung 22* sind die Ergebnisse einer repräsentativen osteogenen Differenzierung dargestellt, in der die ausgefallenen Calciumsalze durch Alizarin Red S angefärbt wurden.

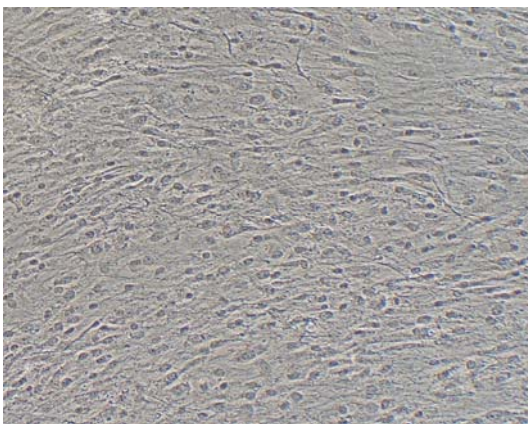


Negativkontrolle

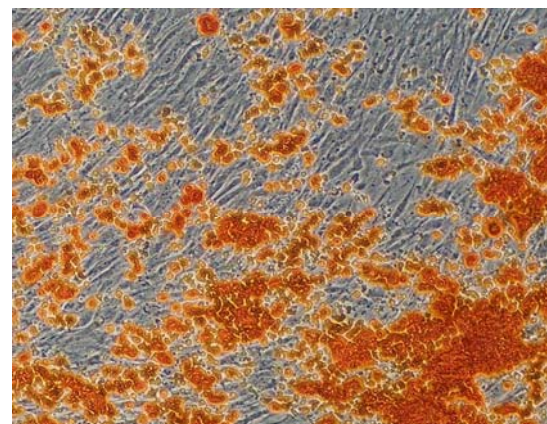


Differenzierung

Abbildung 21: Differenzierung von MSC_{SF} in Adipozyten. Differenzierungszeit: 15 Tage.



Negativkontrolle



Differenzierung

Abbildung 22: Differenzierung von MSC_{SF} in Osteoblasten. Differenzierungszeit: 15 Tage.

4.4 Einzelheilversuche

Durch ihre immunregulatorischen Eigenschaften bieten MSC ein herausragendes klinisches Potenzial. Die Behandlung von Hämophagozytose und GvHD nach allogener Stammzelltransplantation wurde in Einzelheilversuchen an sieben pädiatrischen Patienten im Zeitraum von 2004 bis 2005 in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsklinik Tübingen durchgeführt. Die Patienten litten hierbei unter verschiedenen malignen Knochenmarkserkrankungen, die eine allogene Stammzelltransplantation notwendig machten. Im Anschluss traten in den hier angeführten Patienten in zwei Fällen eine akute GvHD, eine chronische GvHD in 3 Fällen und eine Hämophagozytose bzw. ein Transplantatversagen in jeweils einem Fall auf. Nach Ausschöpfung der Standardtherpieverfahren wurden den Patienten teils mehrmals mit MSC transplantiert. *Tabelle 1* gibt einen Überblick über die Erkrankungen und Therapien der Patienten. Zusätzlich werden Informationen über die Komplikationen und Transplantationen gezeigt. In *Tabelle 2* werden Einzelheiten der MSC-Transplantate angeführt.

Tabelle 1: Grunderkrankungen, Therapien und Komplikationen der mit MSC behandelten Patienten

ID	Alter	Diag-nose	Konditionierung	Spender	Stammzellen, Quelle und Transplantatmanipulationsmethode 10 ⁶ pro kg KG	T-Zellen 10 ⁶ pro kg KG	Immunsup- pression	GvHD	Organ
1	14 J.	T-ALL	TBI Flu iATG VP16 12 Gy 160 mg/m ² 60 mg/kg 60 mg/kg 60 mg/kg	MIMFD (Vater)	5,14 CD133* PBSC (positiv Selektion) 4,44 CD133* PBSC (positiv Selektion) 0,90 CD133* PBSC (positiv Selektion) 3,07 CD34* PBSC (CD3/CD19 Depletion)	8,0 3,5 0,4 6,4	Etanercept, mehrere Durch- gänge Dexa- methason, 2 x VP16 150 mg/m ²	-	-
2	17 J.	c-ALL	TBI Flu iATG VP16 12 Gy 160 mg/m ² 60 mg/kg 60 mg/kg	MIMFD (Vater)	5,28 CD34* PBSC (CD3/CD19 Depletion) 2,72 CD34* PBSC (positiv Selektion) 0,45 CD34* PBSC (positiv Selektion) 0,45 CD34* PBSC (positiv Selektion) 3,41 CD34* PBSC (positiv Selektion)	7,6 9,8 1,6 1,6 1,4	Prednison, Etanercept, Ciclosporin, Mycophe- nolatmolefyll	akute I°-II°, extensive chronische	Leber, Haut, Durchfall
3	9 J.	MDS	Busulfex OKT3 Cyclo Melphalan Rekonditionierung Flu iATG OKT3 2 Tx TLI Thiotepa Flu Thymoglobulin 12,8 mg/kg 0,7 mg/kg 120 mg/kg 140 mg/kg 120 mg/m ² 60 mg/kg 1 mg/kg 7 Gy 5 mg/kg 120 mg/m ² 3 mg/kg	1. MIMFD (Vater) 2. MIMFD (Mutter)	23,88 CD133* PBSC (CD3/CD19 Depletion ergänzt mit CD133 nach positiv Selektion) 4,56 CD34* PBSC (positiv Selektion) 5,20 CD133* PBSC (positiv Selektion), boost 32,98 CD34* PBSC (CD3/CD19 + CD 133') 8,04 CD133* PBSC (CD3/CD19 + CD 133')	27,0 40,3 3,10 162,4	OKT3, Ciclosporin, Basiliximab, Mycophe- nolatmolefyll	-	-
4	14 J	CML	Busulfex iATG Cyclo TLI Flu Thymoglobulin 12,6 mg/kg 60 mg/kg 120 mg/kg 7 Gy 200 mg/m ² 6 mg/kg	1. MUD 2. MMUD	7,55 CD34* PBSC (nicht manipuliert) 21,38 CD34* PBSC (nicht manipuliert) 2,0 CD34* PBSC (CD 133 positiv Selektion) 2,0 CD34* PBSC (CD 133 positiv Selektion)	10008,9 50000,0 10018,9 0,8 0,8	Prednison, Methylpredni-son, Mycophe- nolatmolefyll, OKT3, rATG, Tacrolimus	akute III°	Haut, Leber, Darm
5	15 J.	SAA	iATG Cyclo Flu 45 mg/kg 120 mg/kg 120 mg/kg	MUD	5,0 CD34* PBSC (positiv Selektion)	4,9 500,0	Prednison, Ciclosporin, Mycophe- nolatmolefyll, Etanercept	akute III° chronische II°	Haut, Leber, Darm, Lunge
6	15 J.	CML	Busulfan Cyclo 12,6 mg/kg 120 mg/kg	MSD	5,49 CD34* PBSC (nicht manipuliert)	14800,0	Ciclosporin, Mycophe- nolatmolefyll, Prednison	akute II°	Haut, Leber, Darm
7	4 J.	AML	Gemtuzumab Flu Thiotepa Melphalan 9 mg/m ² 160 mg/m ² 10 mg/kg 140 mg/m ²	MIMFD (Vater)	34,70 CD34* PBSC (CD3/CD19 Depletion ergänzt mit CD34* nach positiv Selektion)	168,8	Prednison, Methylpredni-son, Mycophe- nolatmolefyll, OKT3	akute II°	Haut, Darm

Abkürzungen: Cyclo = Cyclophosphamid, Flu = Fludarabin, Gy = Gray, rATG = rabbit antithymocyte globulin,
TBI = total body irradiation, TLI = total lymphnode irradiation, Tx = Transplantation, VP16 = Etopophos

Tabelle 2: Einzelheiten und Verlauf der MSC-Transplantationen

ID	Diagnose	HSC-Spender	Tag 0	MSC-Indikation	MSC-Transfusion	MSC in 10 ⁶	MSC pro kg KG in 10 ⁶	Vitalität in %	Reinheit in %	Verlauf
1	T-ALL	MMFD (Vater)	25.10.2003	Hämophagozytose	16.07.2004 (d+265) 23.08.2004 (d+303) 15.11.2004 (d+387)	39	0,4	43	n.d.	Lebend und wohl auf
2	c-ALL	MMFD (Vater)	27.12.2003	cGvHD	02.09.2004 (d+250)	83	1,4	73	n.d.	Verstorben an EBV-LPD 27 Monate nach HSCT und 18 Monate nach MSC.T
3	MDS	1. MMFD (Vater) 2. MMFD (Mutter)	16.07.2004 10.09.2004	Transplantatsubstanzungsprophylaxe	26.10.2004 (d+46) (Mutter)	78	2,0	93	99	Lebend und wohl auf
4	CML	1. MUD 2. MMUD	07.09.2004 19.10.2004	aGvHD	07.01.2005 (d+80) (Vater)	15	0,4	95	n.d.	Lebend und wohl auf
5	SAA	MUD	13.11.2002	cGvHD	15.09.2004 (d+672) 07.10.2004 (d+694) (Mutter)	80	2,0	78	83	An cGvHD verstorben
6	CML	MSD	04.06.2003	cGvHD	12.01.2004 (d+222) 11.07.2005 (d+768)	127	3,0	95	99	Leichte Besserung
7	AML	MMFD (Vater)	05.04.2005	aGvHD	12.07.2005 (d+98)	45	3,0	98	99	An Rezidiv verstorben

Die insgesamt elf Transplantationen wurden von allen Patienten bis über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 20 Monaten gut vertragen. Es zeigten sich weder eine Toxizität noch Nebenwirkungen. Im Einzelnen führten die Transplantationen der MSC in den behandelten Patienten zu folgenden Verläufen ihrer Erkrankungen:

Ein Patient (5) zeigte nach MSC-Transplantation keine Besserung seiner cGvHD und verstarb ein Jahr später.

Ein Patient (2) zeigte keine Verbesserung seines Zustandes und starb an EBV assoziiertem lymphoproliferativem Syndrom, das unter Immunsuppression entstand, 18 Monate nach MSC-Transplantation.

Ein Patient (3) zeigte einen ereignislosen Verlauf, nachdem er MSC zur Transplantatstabilisierung nach zweiter haploident hämatopoetischer Stammzelltransplantation von seiner Mutter erhalten hatte.

Ein Patient (6) mit cGvHD zeigte nach MSC-Transplantation eine Besserung seines Zustandes und gewann 15% seines Körpergewichts.

Bei einem Patienten (4), der MSC zusammen mit immunsuppressiver Therapie zur Behandlung einer aGvHD erhielt, kam es nicht zu einem Fortschreiten der Komplikation in eine cGvHD.

Ein Patient (7) mit schwerer aGvHD, der MSC mit immunsuppressiver Therapie erhielt, starb auf Grund eines Rezidivs.

Den Verlauf mit der deutlichsten Besserung zeigte eine 14-jährige Patientin (1), der hier beispielhaft näher erläutert werden soll. Die Patientin litt an einer hochrisikohaften T-ALL mit myeloischer Koexpression (Erstdiagnose: 28.04.2003). Die Behandlung erfolgte primär nach dem Studienprotokoll ALL BFM 2000. Als Prednison poor responder zeigten sich am Tag 15 noch 87% KM-Blasten. Am Tag 33 war noch keine Remission erreicht (31% KM-Blasten), so dass die Patientin in den Hochrisikoarm des Protokolls wechselte. Ab dem 31.07.2003 zeigte sich vor dem HR1-Block eine zytologische Vollremission. Angesichts dieser Konstellation wurde die Indikation zur allogenen Knochenmarktransplantation gestellt. Auf Grund des Zeitdrucks wurde der Vater als haploidenter Stammzellspender herangezogen. Nach der protokollgemäßen Konditionierung nach ALL-SZT BFM 2003 wurde die

Patientin am 28.10.2003 transplantiert. Allerdings war die Knochenmarkfunktion so eingeschränkt, dass zur Behandlung zunächst drei Stammzellboosts durchgeführt wurden. Transplantiert wurden CD133⁺ Zellen von Leukapheresen nach G-CSF-Stimulation und anschließender immunomagnetischer Positivselektion der Zellen. Beim letzten Zeitpunkt wurde allerdings CD/CD19-depletiertes Knochenmark verwendet:

28.10.2003:	4,44 • 10 ⁶	CD133 ⁺ Progenitorzellen/kg KG
	0,37 • 10 ⁴	CD3 ⁺ Zellen/kg KG
17.11.2003	0,90 • 10 ⁶	CD133 ⁺ Progenitorzellen/kg KG
	0,04 • 10 ⁴	CD3 ⁺ Zellen/kg KG
03.12.2003	0,90 • 10 ⁶	CD133 ⁺ Progenitorzellen/kg KG
	0,04 • 10 ⁴	CD3 ⁺ Zellen/kg KG
09.12.2003	1,98 • 10 ¹⁰	Zellen MNC (CD3/19 depletierte Zellen)
	3,07 • 10 ⁶	CD34 ⁺ Progenitorzellen/kg KG
	0,64 • 10 ⁴	CD3 ⁺ Zellen/kg KG

Auch nach der letzten Stammzelltransplantation konnte kein ausreichendes Wachstum der Zellen festgestellt werden. Als Ursache dieses *trilineage failures* des Knochenmarkes konnte eine Hämophagozytose nachgewiesen werden (*Abbildung 23*).

Als ferner mehrere Zyklen einer Steroidpulstherapie sowie eine Behandlung mit Cyclophosphamid ohne dauerhaften Effekt blieben, erhielt die Patientin dreimalig *ex vivo* expandierte MSC vom Spender der hämatopoetischen Stammzellen, ihrem Vater.

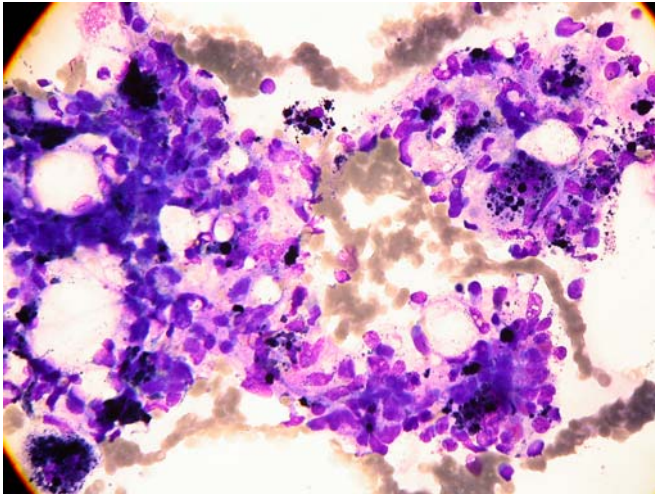


Abbildung 23: Mikroskopisches Bild der Hämophagozytose der 14-jährigen Patientin.

Abbildungen 24 a – d zeigen den Verlauf verschiedener wichtiger Parameter während der Behandlung der Patientin.

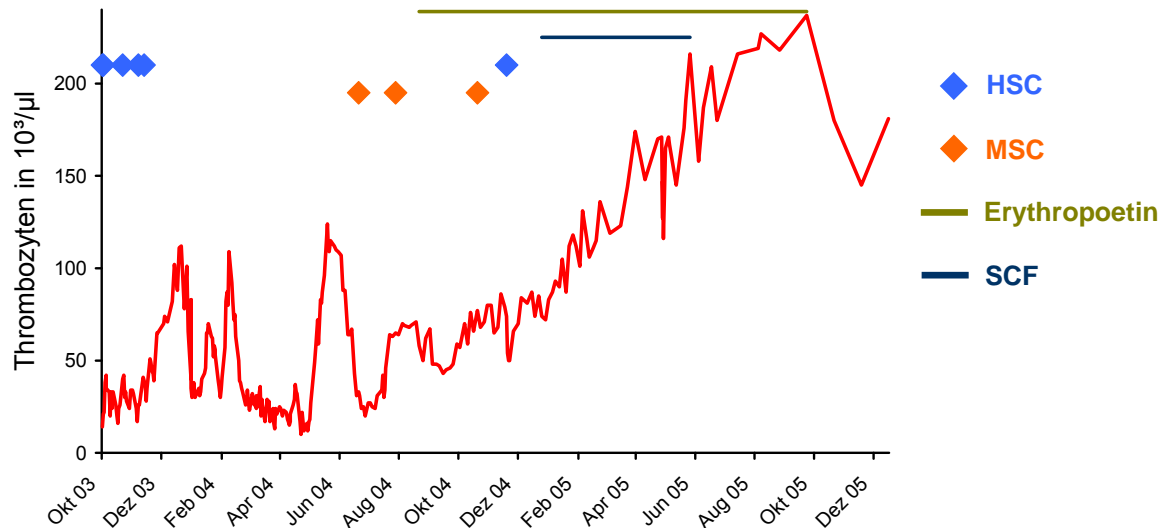


Abbildung 24 a: Verlauf der Thrombozytenzahl der Patientin K. V. während der Behandlung.

In *Abbildung 24 a* ist die Entwicklung der Thrombozytenzahl zu sehen, die ein sensibler Parameter für das Ausmaß einer Hämophagozytose darstellt. Während sich die Zahl bis zur ersten MSC-Transplantation größtenteils unter

50 000/ μl und somit unter dem Normwert von $150 - 400 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ bewegte, stieg sie mit Beginn der ersten MSC-Gabe kontinuierlich auf über 300 000/ μl an. Beim Verlauf der Leukozyten erkennt man, dass selbst nach fünfmaliger hämatopoetischer Stammzelltransplantation noch kein Anstieg der Leukozytenzahl zu verzeichnen war. Der Wert lag mit unter 1 000/ μl weit unter dem Normwert ($4 - 11 \cdot 10^3/\mu\text{l}$). Auch nach dreimaliger MSC-Transplantation stieg er nicht wesentlich an. Allerdings schafften es die MSC-Transplantationen, die Hämophagozytose zu stoppen und eine Verbesserung des *mikroenvironments* des Knochenmarks zu erreichen. Auf dieser Basis konnte nach erneuter hämatopoetischer Stammzelltransplantation ein erfolgreiches Engraftment der Zellen erzielt werden (Abbildung 24 b).

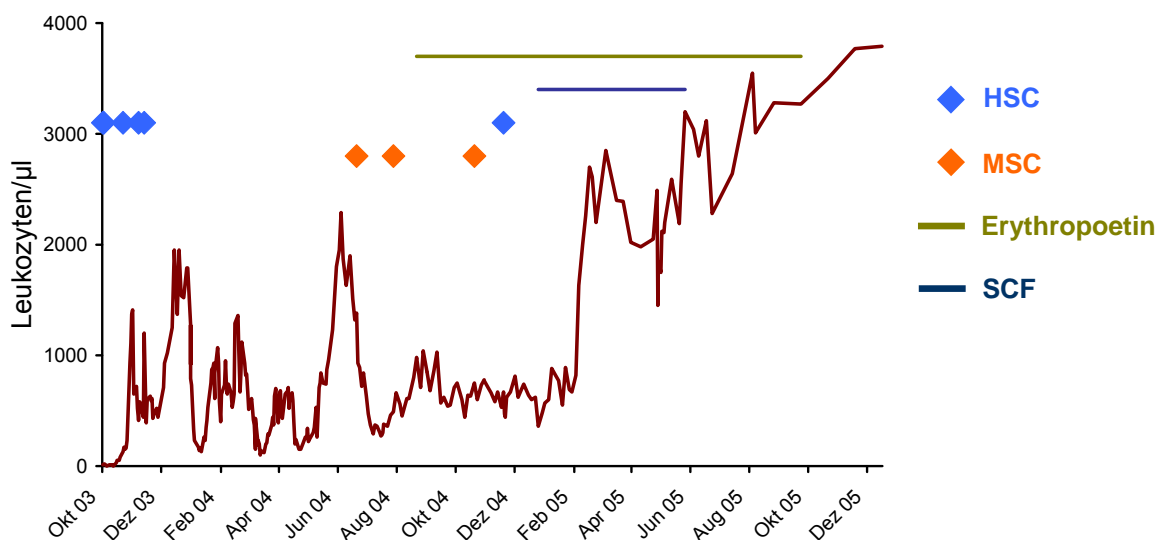


Abbildung 24 b: Verlauf der Leukozytenzahl der Patientin K. V. während der Behandlung.

Die Retikulozytenzahl war in der Anfangsphase der Behandlung oftmals so niedrig, dass sie nicht messbar war. Anschließend befand sie sich weit unter dem Normwert. Erst nach fünfmaliger hämatopoetischer, dreimaliger mesenchymaler Stammzelltransplantation und dem Einsatz von Stammzellularfaktor stieg ihr Wert über die Normwertgrenze und bis zum letzten Messzeitpunkt kontinuierlich an (Abbildung 24 c).

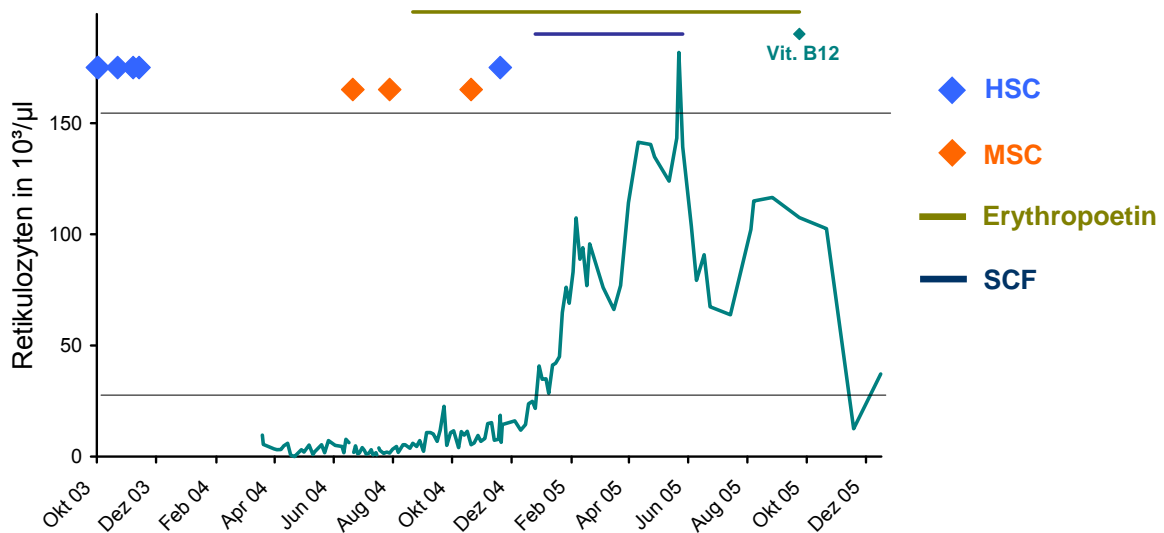


Abbildung 24 c: Verlauf der Retikulozytenzahl der Patientin K. V. während der Behandlung.

Der Hämoglobinwert unterlag von Beginn der Therapie an großen Schwankungen (Abbildung 24 d).

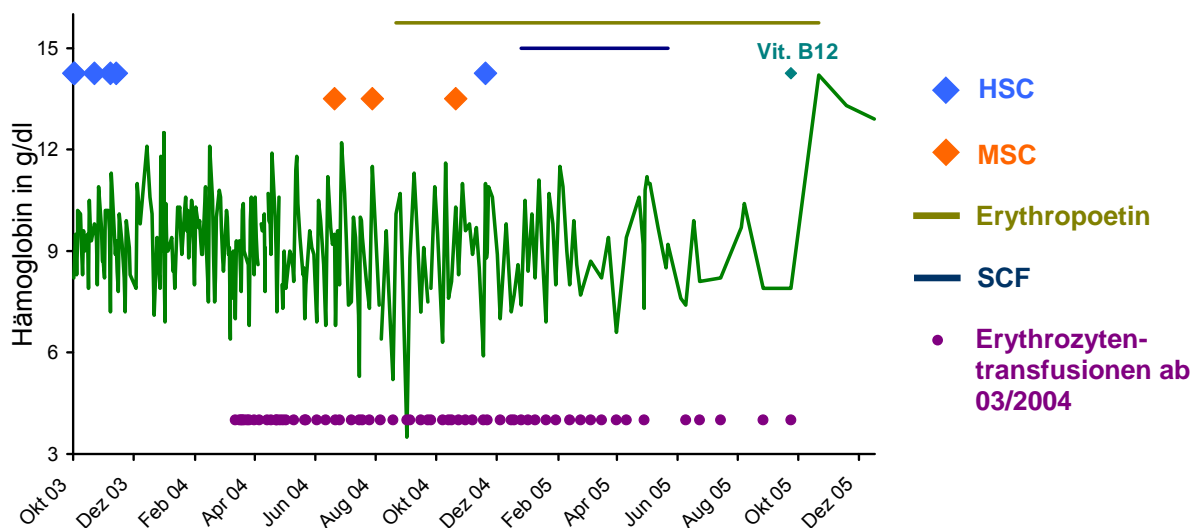


Abbildung 24 d: Verlauf des Hämoglobinwertes der Patientin K. V. während der Behandlung.

Zahlreiche Steroidgaben zur Behandlung der Hämophagozytose brachten ihn immer wieder von sehr niedrigen Werten (oftmals unter 7 g/dl) in einen

tolerablen Bereich. Trotz allem war die Patientin in der Regel ein bis zwei Mal wöchentlich transfusionspflichtig. Der Einsatz von Vitamin B12 zeigte letztlich den erwünschten Erfolg und brachte den Hämoglobinwert auf über 12 g/dl.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Transplantation von MSC bei Kindern nach Stammzelltransplantation möglich und sicher ist. Der hier näher beschriebene Fall der erfolgreichen Behandlung einer Hämophagozytose nach MSC-Transplantation ist der erste dieser Art. Er demonstriert, dass die Anwendung von MSC in Patienten mit dysregulierter Immunantwort oder Autoimmunerkrankungen in der Zukunft eine mögliche Therapieoption sein kann.

5 Diskussion

Durch einen enormen Fortschritt in der Behandlung maligner Erkrankungen in den letzten Jahrzehnten ist es heutzutage möglich, einen großen Teil an Leukämie erkrankter Kinder mittels Chemotherapie zu heilen. Trotz allem ist es aber in einer Vielzahl der Fälle notwendig, eine myeloablative Therapie anzuwenden, die im Anschluss eine Knochenmarktransplantation verlangt. Diese ist mit nicht immer leicht überwindbaren Hindernissen verbunden. Zum einen gilt es, einen passenden Spender zu finden, da man sich in den meisten Fällen durch eine allogene Transplantation einen größeren Erfolg erhofft als durch eine autologe. Aber selbst bei Transplantation eines passenden (gematchten) Transplantats treten unerwünschte Komplikationen auf. Neben einer Abstoßung durch den Empfänger und damit verbundenem Transplantatversagen führen auch akute oder chronische *Graft versus Host Diseases* (GvHD) zu oft gravierenden Krankheitsverläufen. Durch ihre immunmodulierenden und das Engraftment unterstützenden Eigenschaften bieten MSC eine gute Basis, um diesen Komplikationen entgegenzutreten. Im Tiermodell konnten hierbei erste Erfolge verzeichnet werden, als MSC zusätzlich zu hämatopoetischen Stammzellen transplantiert wurden (in 't Anker et al., 2003b; Maitra et al., 2004). Die CD34⁺ Zellen zeigten in den angeführten Versuchen ein besseres Engraftment. Aber auch der Einsatz beim erwachsenen Menschen führte bereits in zahlreichen Fällen zu einem Erfolg (Horwitz et al., 2002; Koc et al., 2000; Koc et al., 2002; Lazarus et al., 1995; Le Blanc et al., 2004b). Es konnte nicht nur gezeigt werden, dass die Transplantation von MSC sicher ist, auch im humanen System konnte ein besseres Engraftment von hämatopoetischen Stammzellen beobachtet werden. Der Einsatz von MSC bei pädiatrischen Patienten wurde erst in wenigen Versuchen untersucht (Horwitz et al., 1999; Horwitz et al., 2002; Horwitz et al., 2001). Aber auch hier können MSC eine gute Option sein, maligne Erkrankungen zu therapieren oder als Unterstützung nach

Knochenmarktransplantation Anwendung finden. Wenn MSC, wie es das Ziel ist, als therapeutische Zellen zum Einsatz kommen sollen, ist es wichtig, ihre Eigenschaften und ihre Funktion besser kennen zu lernen. Diese Arbeit befasst sich mit dieser Aufgabe und betrachtet auch den Einsatz von MSC in pädiatrischen Patienten.

5.1 Vergleich mesenchymaler Stammzellen aus verschiedenen Geweben

In der vorliegenden Arbeit sollten mesenchymale Stammzellen aus verschiedenen Geweben miteinander verglichen werden. Bezüglich ihrer Morphologie und des Immunphänotyps wurden MSC_{BM} , MSC_{SF} und MSC_{FAT} gegenübergestellt. Die Zellen wurden hierfür auf gleiche Art und Weise kultiviert und zuerst unter dem Lichtmikroskop analysiert. Bereits in Kultur verhielten sich die verschiedenen Populationen ähnlich und auch bei der mikroskopischen Betrachtung fanden sich keine markanten Unterschiede (*Abbildung 8 a - c*).

Mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen auf ihre Oberflächenmarker hin untersucht. Hierbei zeigten sie sich positiv für CD105 und CD73, was sie als MSC auswies (*Abbildung 9*). Bei einigen Oberflächenmolekülen gab es jedoch eindeutige Unterschiede. Während MSC_{FAT} auf ihrer Außenseite auch Marker von hämatopoetischen Stammzellen tragen, zeigten MSC_{SF} und verschiedene Populationen von MSC_{BM} unterschiedlich starke Ausprägungen von CD106 und CD146 (*Abbildung 10 a - c*). Diese Moleküle sind Marker für den Aktivierungsgrad von Endothel- oder T-Zellen. Die Abweichungen in der Ausprägung der einzelnen Oberflächenmarker zeigen zwar, dass die Zellen nicht zu 100% identisch sind, lassen jedoch noch keine Schlüsse auf ihre Funktion oder weitere Eigenschaften zu. Unterschiedliche Messzeitpunkte und damit verbundene Abweichungen in der Aktivität der Zellen könnten die verschiedenen Ergebnisse bei der Untersuchung der Oberflächenmarker erklären. Auch muss man bedenken, dass es sich bei allen Zellen um Material verschiedener Personen, mit teils grundlegend unterschiedlichen Erkrankungen

handelt, so dass auch deswegen ein breites Spektrum an Markerausprägungen zustande kommen kann.

5.2 Nachweis der immunmodulatorischen Eigenschaften von MSC

Um die immunologischen Eigenschaften von MSC näher zu untersuchen, wurde ihre Wirkung auf PBMC betrachtet. Dabei wurde zuerst der Einfluss von MSC auf allogene PBMC in einem BrdU-Proliferationsassay analysiert (*Abbildung 11*). Hierbei zeigte sich, dass bei den PBMC keine wesentlich verstärkte Proliferation stattfand, wenn sie ohne Stimulation aber mit MSC kultiviert wurden. Eine durch PHA oder IL-2 verursachte Wachstumssteigerung von PBMC, die ohne MSC kultiviert wurden, konnte im Beisein von MSC deutlich inhibiert werden. Da im BrdU-Proliferationsassay alle sich im *well* befindenden Zellen in die Auswertung einfließen, war es wichtig, den Anteil der MSC an der detektierten Lichtemission gering zu halten. Als Negativkontrolle dienten hierfür stimulierte MSC, die ohne PBMC kultiviert über den Versuchszeitraum mitgeführt wurden. Da sich zeigte, dass die Messwerte in diesen Kontrollen deutlich geringer waren, kann man davon ausgehen, dass das Vorhandensein von MSC in den versuchsrelevanten *wells* das Ergebnis nicht signifikant beeinflusst hat.

MSC scheinen also keinen proliferationssteigernden Einfluss auf allogene PBMC zu haben und können darüber hinaus eine vorhandene Proliferation sogar unterdrücken. Allerdings waren diese Phänomene in den durchgeführten Versuchen von der Konzentration der MSC abhängig. War das Verhältnis von MSC zu PBMC zu gering, zeigten die PBMC eine Proliferationssteigerung und ließen sich nicht inhibieren.

Diese Ergebnisse ließen sich auch im CFSE-Proliferationsassay bestätigen. Hierbei wird nur die Proliferation der zuvor angefärbten PBMC mittels Durchflusszytometrie gemessen. In den durchgeführten Versuchen zeigten nicht stimulierte PBMC keine Proliferation. Auch im Beisein von allopathen MSC

konnte kein Wachstum beobachtet werden (*Abbildung 12*). Hierbei war das Verhältnis von MSC zu PBMC identisch dem im BrdU-Proliferationsassay eingesetzten.

Unter Stimulation mit PHA oder IL-2 / OKT3 zeigten die PBMC meist eine starke Proliferation. Diese konnte inhibiert werden, wenn MSC anwesend waren (*Abbildung 13 a und b*). Auch hierbei war das Maß der Inhibition von der Menge verwendeter MSC abhängig.

MSC konnten bereits aus einer Vielzahl verschiedener Gewebe gewonnen werden (Hu et al., 2003; in 't Anker et al., 2003a; Wagner et al., 2005). Um die Zellen in ihrer Gesamtheit besser zu verstehen, ist es von Interesse, auch die Eigenschaften und Funktionen von MSC aus anderen Geweben besser kennen zu lernen. Diese Arbeit widmet sich hierbei neben MSC, die aus dem Knochenmark gewonnen wurden (MSC_{BM}) auch MSC aus Fettgewebe (MSC_{FAT}), der Synovialflüssigkeit (MSC_{SF}) und MSC unter anderen Kulturbedingungen (MSC_{FFPP}). Der Vergleich der Zellen auf ihre Morphologie und ihren Immunphänotyp ist bereits in Abschnitt 5.1 erwähnt worden. Auf die immunmodulierenden Eigenschaften soll in diesem Abschnitt näher eingegangen werden. In weiteren Versuchen wurde auch die Funktion von MSC aus pathologischen Situationen untersucht.

5.2.1 MSC_{FAT}

Die Gewinnung von MSC aus Knochenmark stellt für den Patienten immer noch eine oft schmerzhaft und aufwändige Prozedur, die normalerweise einer Allgemeinnarkose bedarf, dar. Des Weiteren lassen sich durch Knochenmarkpunktion teils nur geringe Mengen an Zellen gewinnen. Mit der Entdeckung von MSC in Fettgewebe, stellte sich die Frage, ob diese Zellen eine geeignete Alternative zu MSC_{BM} stellen können. Hier bietet sich die Möglichkeit, die Zellen in großer Menge unter lokaler Anästhesie zu erhalten. Doch besitzen MSC_{FAT} auch dieselben Eigenschaften wie MSC_{BM} ? In ihrer Morphologie und ihrem Immunphänotyp unterscheiden sie sich nach den

Ergebnissen dieser Arbeit zusammengefasst nur unwesentlich (*siehe Abschnitt 5.1*). Auch die immunologischen Eigenschaften, genauer die Möglichkeit der Inhibition von stimulierten PBMC, zeigen keine Differenzen zu denen von MSC_{BM}. Auch MSC_{FAT} waren in der Lage, eine Wachstumssteigerung von stimulierten PBMC zu hemmen. Dies war sowohl bei der Verwendung von PHA als Mitogen, als auch von IL-2 / OKT3 der Fall (*Abbildung 14 a und b*).

Die Differenzierungsfähigkeit dieser Zellen wurde bereits durch mehrere Arbeitsgruppen belegt (Lin et al., 2006; Sakaguchi et al., 2005).

MSC_{FAT} scheinen also MSC_{BM} sehr ähnlich zu sein und könnten so in Zukunft eine mögliche alternative Quelle für die Gewinnung von MSC für zelluläre Therapie Zwecke sein.

5.2.2 MSC_{FFPP}

Da es für die klinische Anwendung von Interesse ist, auf tierische Inhaltsstoffe bei der Kultur humaner Zellen zu verzichten, wurde in unserer Arbeitsgruppe an einem Verfahren gearbeitet, das dies berücksichtigt. Die Kultivierung von MSC in Medium, das statt FCS *fresh frozen plasma* (FFP) und Thrombozyten enthält, hat sich hierbei als geeignete Alternative bewährt (Müller et al., 2006a). Wichtig ist dabei, dass die auf diese Weise kultivierten MSC (MSC_{FFPP}) ihre Eigenschaften beibehalten. In Vorarbeiten wurde dies für ihren Immunphänotyp und ihre Differenzierungsfähigkeit in unserem Labor bestätigt. Auch ihre Wachstumsgeschwindigkeit sollte sich im Vergleich zu bisherigen Kulturen nicht verlangsamen. Dies konnte ebenfalls für eine Konzentration von 5% FFP und 10⁷/ml Thrombozyten im Medium nachgewiesen werden. In dieser Arbeit sollte nun die Frage geklärt werden, ob die Zellen auch unter den neuen Kulturbedingungen ihre immunologischen Eigenschaften beibehalten. Im CFSE-Proliferationsassay konnte dies ebenfalls verifiziert werden (*Abbildung 15 a und b*).

5.2.3 MSC_{SF}

Autoimmunerkrankungen stellen die Medizin immer noch vor große Rätsel. Neben der Tatsache, dass die Ursachen solcher Erkrankungen größtenteils nach wie vor unklar sind, weiß man bisher auch noch wenig über die Funktion einzelner Zellpopulationen und die Faktoren, die den Krankheitsverlauf beeinflussen. Als Ursache gelten neben einer genetischen Komponente auch Umwelteinflüsse. Trotz der Negativselektion von T-Zellen mit Rezeptoren, die körpereigene Strukturen erkennen, finden sich immer noch Zellen im Körper, die mit geringer Affinität an eigene Strukturen binden und diese bekämpfen. Diese autoreaktiven T-Zellen sind aber nicht in der Lage, das Autoantigen aus dem Körper zu entfernen. So kommt es zu einer anhaltenden Entzündungsreaktion. Diese kann sich auf eine gewisse Anzahl von Organen beschränken oder aber systemisch den gesamten Körper betreffen. Man nimmt an, dass auch bei einer Autoimmunerkrankung antigenspezifische T-Zellen eine adaptive Immunantwort einleiten. Zytotoxische T-Zellen und eine fehlgeleitete Makrophagenaktivierung durch T_H1-Zellen können zu enormen Gewebsschäden führen. Die Stimulation von selbstreaktiven B-Zellen durch T-Lymphozyten führt zu schädlichen Antikörperreaktionen (Janeway ed., 2002). Bisher ist es noch nicht gelungen, eine adäquate Therapie zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen zu entwickeln. Eine starke medikamentöse Immunsuppression mit ihren teils schwerwiegenden Nebenwirkungen ist oftmals die einzige Möglichkeit, den Patienten ein Leben mit akzeptabler Lebensqualität zu ermöglichen.

In dieser Arbeit wurden auch MSC aus Gelenkpunktaten näher untersucht. Einerseits waren dies Zellen von Patienten, die an rheumatischen Erkrankungen, wie z. B. der juvenilen idiopathischen Arthritis, litten. Hierbei spielt sich ein autoimmuner Prozess ab, der hauptsächlich auf die Gelenke zielt. Teils sind nur ein bis wenige, teils aber auch eine große Anzahl an Gelenken betroffen.

Bezogen auf die immunologischen Eigenschaften von MSC_{SF} zeigte sich in den durchgeführten Versuchen ein sehr heterogenes Bild. Während unter

Stimulation der PBMC mit IL-2 / OKT3 meist eine Inhibition des Wachstums durch MSC möglich war, konnte nur in einem Teil der Versuche eine Proliferationshemmung durch MSC erreicht werden, wenn PHA als Mitogen eingesetzt wurde (Abbildungen nicht gezeigt).

Andererseits fanden aber auch Zellen von Patienten Einsatz, die auf Grund eines Traumas eine Gelenkentzündung erlitten hatten. Bei diesen Zellen war in ca. 50% der Versuche eine Inhibition der stimulierten PBMC möglich (Abbildungen nicht gezeigt).

Die unterschiedlichen Hemmungsgrade von PBMC durch MSC bei Verwendung verschiedener Mitogene beruhen möglicherweise auch auf den unterschiedlichen Ansatzpunkten der Stimulanzen. Während PHA Lymphozyten im Allgemeinen stimuliert, greifen IL-2 und OKT3 am T-Zellrezeptor an und stimulieren nur T-Lymphozyten und NK-Zellen.

Bei der Frage nach der Rolle von MSC_{SF} in Gelenken sollte man auch die Herkunft der Zellen hinterfragen. Jones et al., die ebenfalls das Vorhandensein von MSC in Synovialflüssigkeit nachgewiesen haben, widmen sich in ihrer Veröffentlichung dieser Frage (Jones et al., 2004). Als mögliche Quelle der MSC werden der geschädigte Knorpel, der Knochen, die Synovia, das Periost oder das Knochenmark selbst angeführt. Andererseits können MSC auch direkt unter physiologischen Bedingungen in der Synovialflüssigkeit vorhanden sein. In diesem Falle könnte ihre physiologische Funktion darin bestehen, kleine oberflächliche Knorpelschäden zu reparieren. Unter diesen Umständen stellt sich natürlich die Frage, wieso die Zellen in rheumatischen Erkrankungen nicht in der Lage sind, diese Schäden zu regenerieren. Da die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine variable Inhibierung der PBMC durch MSC_{SF} hindeuten, lässt sich dieses Phänomen eventuell auf eine verminderte immunologische Funktion von MSC_{SF} in den Patienten zurückführen. Es bleibt jedoch auch noch zu klären, welche Rolle die Synovialflüssigkeit mit ihren zellulären und löslichen Bestandteilen bei der Pathogenese der Erkrankungen spielt.

5.2.4 MSC_{SAA}

Die schwere aplastische Anämie (SAA) stellt eine Form der Knochenmarkinsuffizienz dar. Das bedeutet, dass eine Anämie, eine Granulozytopenie und/oder Thrombozytopenie in unterschiedlicher Kombination vorliegt. Die Ursache ist hierbei primär, das heißt es liegt keine bekannte Grunderkrankung oder regelhaft zur Knochenmarkinsuffizienz führende Schädigung, wie eine Hochdosischemotherapie oder Bestrahlung, vor. Die Diagnose der Erkrankung erfolgt mittels Knochenmarkpunktion, bei der eine Hypoplasie des Markes festzustellen ist. Der Pathomechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. Neben einem direkten Einfluss einer Virusinfektion oder chemischen Noxen wird die Ursache auch in einer pathologischen T-Zellreaktion gesucht. Welchen Beitrag das Knochenmarkstroma leistet, ist ebenfalls offen. Bacigalupo und Kollegen haben MSC von SAA Patienten auf ihre immunologischen Eigenschaften hin untersucht und festgestellt, dass sie eine verminderte suppressive Wirkung auf T-Zellen haben (Bacigalupo et al., 2005). Man könnte daraus also ableiten, dass es durch eine fehlgeleitete T-Zellreaktion, die zu einer Unterdrückung der Hämatopoese führt, und eine verminderte immunsuppressive Funktion von MSC bei SAA-Patienten zur Knochenmarkinsuffizienz bei den Erkrankten kommt.

In der hier vorliegenden Arbeit sollte die Funktion von MSC_{SAA} pädiatrischer Patienten näher untersucht werden. Es zeigte sich im CFSE-Proliferationsassay, dass bei Verwendung von IL-2 / OKT3 als Mitogen die Proliferation von PBMC durch MSC_{SAA} gehemmt werden konnte. Wenn als Stimulans PHA verwendet wurde, konnte dieser Effekt in nur wenigen Fällen beobachtet werden (Abbildungen nicht gezeigt). Die große Spannweite an Erscheinungsformen der aplastischen Anämie spielt sicherlich eine Rolle bei der Heterogenität der Ergebnisse.

5.2.5 Subpopulationen

In den bisher angeführten Versuchen wurden PBMC immer nur in ihrer Gesamtheit betrachtet. Da die einzelnen Subpopulationen von PBMC sich verschieden verhalten und in einzelnen Erkrankungen unterschiedliche Rollen spielen, ist es wichtig zu wissen, wie MSC auf die verschiedenen Populationen wirken. Um dies zu untersuchen, wurden PBMC in einem CFSE-Proliferationsassay unter Stimulation mit bzw. ohne MSC kultiviert. In einem zweiten Färbeschritt wurden einzeln CD4⁺, CD8⁺ und CD56⁺ Zellen aus den PBMC herausgegriffen und mittels Durchflusszytometrie näher betrachtet.

Sowohl stimulierte CD4⁺ als auch CD8⁺ Zellen konnten im Beisein von MSC gehemmt werden (*Abbildungen 16 und 17*). Dies deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen (Di Nicola et al., 2002; Krampera et al., 2003).

Die Wirkung von MSC auf NK-Zellen scheint hingegen vielseitiger und komplexer. Während MSC in Überzahl noch in der Lage sind, NK-Zellen *in vitro* zu inhibieren, können dieselben NK-Zellen MSC angreifen, wenn diese in Relation in der Minderheit sind (Spaggiari et al., 2006).

Sotiropoulou und Kollegen untersuchten die verschiedenen NK-Zell-Subpopulationen und konnten feststellen, dass CD56^{dim} NK-Zellen von MSC inhibiert werden konnten, während CD56^{bright} Zellen nicht von diesem Phänomen betroffen waren (Sotiropoulou et al., 2006).

Diese Ergebnisse konnten in den Versuchen, die mit NK-Zellen in dieser Arbeit durchgeführt wurden, bestätigt werden. CD56^{dim} Zellen, die die zytotoxischen NK-Zellen repräsentieren, wurden im Beisein von MSC in ihrer Proliferation gehemmt, während CD56^{bright} Zellen, also vermehrt zytokinproduzierende NK-Zellen, sogar noch in ihrem Wachstum verstärkt wurden (*Abbildung 18*).

Diese Ergebnisse würden den Erfolg eines Einsatzes von MSC zur Behandlung von GvHD bekräftigen können. Bei den den Körper angreifenden Zellen bei GvHD handelt es sich um T-Lymphozyten, die durch MSC gehemmt werden könnten. NK-Zellen hingegen, die für den gewünschten *Graft versus Leukaemia Effect* nach Stammzelltransplantation zur Behandlung einer Leukämie

verantwortlich sind, würden in ihrem Wachstum nicht inhibiert werden (Glass et al., 1996). So könnte der *Graft versus Leukaemia Effect* weiterhin ausgenutzt und eine GvHD vermieden werden.

5.2.6 Untersuchungen zum Mechanismus der Inhibition

Obgleich die immunologischen Eigenschaften durch zahlreiche Berichte belegt sind, ist noch kein Konsens über den genauen Ablauf dieser gefunden. Noch immer ist offen, ob für die Interaktion zwischen den einzelnen Zelltypen ein Zell-Zell-Kontakt notwendig ist oder nicht. Neben HGF und TGF β , die als lösliche Faktoren genannt werden, halten einige Autoren die Indolamin-2,3-Dioxygenase für das Schlüsselmolekül bei diesem Mechanismus (Di Nicola et al., 2002; Meisel et al., 2004). Dieses Enzym wird von MSC exprimiert und ist für den Abbau von Tryptophan zu Kynurenin verantwortlich. Ebenso sind in jüngster Zeit IFN γ , als Induktor der Indolamin-2,3-Dioxygenase, oder Galektin-1 als mögliche involvierte Moleküle näher in Betracht gezogen worden (Kadri et al., 2005; Krampera et al., 2006). Ein Mechanismus der sowohl lösliche als auch oberflächengebundene Moleküle einschließt wird in letzter Zeit häufiger als Erklärung angenommen (Rasmusson et al., 2005; Sotiropoulou et al., 2006).

Die Ergebnisse dieser Arbeit würden ein solches Modell bekräftigen. In den Versuchen, die im Transwell-System durchgeführt wurden, reichten die Resultate von einer eindeutig sichtbaren Unterdrückung des Wachstums der PBMC durch MSC über eine deutlich schwächere Inhibition bis hin zu keinem Effekt der MSC (*Abbildung 19 a und b*). Auch die Ergebnisse der Ansätze, in denen PBMC nur mit dem Überstand von MSC-Kulturen behandelt und dann mit Ansätzen, in denen die Zellen in direkten Kontakt zu MSC treten konnten, verglichen wurden, zeigten sich uneinheitlich (*Abbildung 20*). Allerdings stellte es sich in diesen Versuchen als schwierig heraus, zu entscheiden, in welchem Verhältnis PBMC zu MSC verwendet werden sollten, um eine angemessene Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Bei der Kultur der PBMC im Zweikammersystem der Transwellplatten befanden sich die Zellen auf einem

engeren Raum und könnten sich schon so gegenseitig im Wachstum beeinflusst haben. Bei den Versuchen, in denen der Überstand täglich ausgetauscht wurde, war es darüber hinaus nur schwer möglich, einen Verlust von PBMC durch Abnahme des alten Überstandes auszuschließen. Auch so wurde das Verhältnis von PBMC zu MSC beeinflusst, was bei der Betrachtung der Ergebnisse dieser Versuche beachtet werden muss.

5.3 Differenzierung der MSC_{SF}

Eine besondere Eigenschaft von Stammzellen ist es, sich in mehr als ein Gewebe entwickeln zu können. Auch MSC besitzen die Möglichkeit, in verschiedene Zelltypen zu differenzieren. *In vitro* wurde hierbei bisher unter anderem die Differenzierung in Knorpel, Knochen, Fett, Skelett- und Herzmuskelzellen und Neuronen untersucht. In erster Linie fanden bei diesen Untersuchungen MSC_{BM} Anwendung. Des Weiteren konnten aber auch MSC_{FAT} erfolgreich in verschiedene Gewebe differenziert werden (Dicker et al., 2005). In der klinischen Anwendung müssen gemäß den Richtlinien des Paul-Ehrlich-Instituts die Stammzeleigenschaften der Zellen erhalten bleiben. Als Beweis hierfür muss vor Einsatz der MSC in der Klinik die erhaltene Differenzierungsfähigkeit nachgewiesen werden. In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen, MSC_{SF} in Adipozyten und Osteoblasten zu differenzieren, sollten zum einen deren Stammzeleigenschaften bestätigt werden. Zum anderen sollten sie auch MSC aus anderen Geweben gegenübergestellt werden. So gelang es in allen Versuchen, MSC_{SF} in Adipozyten zu differenzieren (*Abbildung 21*). Die Entwicklung in Osteoblasten gestaltete sich schwieriger. Zwar konnten in einem Teil der Ansätze deutlich Calciumsalze, die beweisend für die erfolgreiche Differenzierung sind, gefunden werden (*Abbildung 22*). Bei einigen MSC-Populationen blieb dieser Effekt aus. Ob es sich hierbei um eine Regelmäßigkeit handelt, dass MSC_{SF} also durch einen Defekt nicht konsequent osteogen zu differenzieren sind, lässt sich vom jetzigen Standpunkt aus nicht sagen. Ebenso könnten diese unterschiedlichen

Ergebnisse auf verschiedene Erscheinungsformen bzw. Ursachen der Gelenkentzündungen zurückzuführen sein. Um dies heraus zu finden, bedarf es näherer Untersuchungen. Dabei liegt ein besonderes Augenmerk auf der chondrogenen Differenzierung, da es sich bei Knorpel um eines der am meisten betroffenen Gewebe bei der juvenilen idiopathischen Arthritis handelt.

5.4 Klinischer Einsatz mesenchymaler Stammzellen in der Pädiatrie

In Einzelheilversuchen wurden in der Kinderklinik Tübingen zwischen 01/2004 und 07/2005 sieben pädiatrische Patienten, die an verschiedenen malignen Erkrankungen litten, mit MSC transplantiert (Müller et al., 2007). Verschiedene, durch konventionelle Verfahren nicht kontrollierbare, Komplikationen nach der Knochenmarktransplantation führten zu dem Schluss, dass der Einsatz von MSC in diesen Patienten zu einer Besserung des Zustandes führen könnte. Die insgesamt elf Transplantationen wurden hierbei von allen sieben Patienten bis über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 20 Monaten gut vertragen. Für die Bewertung der langfristigen Entwicklung aller Patienten ist es bisher aber noch zu früh.

Der in dieser Arbeit näher beschriebene Verlauf der Erkrankung einer 14-jährigen Patientin (1) zeigte nach MSC-Transplantation die deutlichste Besserung. Die Patientin, die an einer hoch risikohaften T-ALL mit myeloischer Koexpression litt, wurde primär nach dem ALL BFM 2000 behandelt. Auf Grund schlechten Ansprechens auf die Therapie (*prednison poor responder*) erhielt die Patientin allogene Stammzellen ihres Vaters. Nach fünfmaliger hämatopoetischer Stammzelltransplantation hatte sie insgesamt $5,14 \cdot 10^6$ CD133⁺ Zellen erhalten. Trotz allem litt die Patientin weiterhin an einem alle drei Zellreihen betreffenden Transplantatversagen und einer Hämophagozytose, die nur auf Steroidstoßgaben ansprach (*Abbildung 23*). Es gelang jedoch nicht, alle drei Zellreihen in gleichem Maße positiv zu beeinflussen. Daraufhin wurden neun Monate nach der ersten Stammzelltransplantation in drei Fraktionen MSC

vom Vater transplantiert. Insgesamt erhielt die Patientin $0,4 \cdot 10^6$ MSC pro kg Körpergewicht.

In den anschließend durchgeführten Knochenmarkuntersuchungen zeigte sich ein Rückgang der Hämophagozytose. Dies kann als eine Erholung des Knochenmarkstromas durch die MSC-Transplantation interpretiert werden. Die Thrombozytenzahl stieg bereits bald nach der ersten MSC-Transfusion an und hielt sich über den Untersuchungszeitraum stabil (*Abbildung 24 a*).

Da sich die Leukozyten- und Retikulozytenzahl jedoch nicht gleich besserte, wurden ein weiteres Mal hämatopoetische Stammzellen transplantiert. Unter unterstützender Therapie mit Stammzellfaktor und Erythropoetin konnten sich die beiden Zellreihen erholen (*Abbildung 24 b und c*), so dass letztlich alle drei Zellreihen bis über den Zeitraum von über einem Jahr stabil wieder hergestellt waren.

Auf Grund des oft sehr niedrigen Hämoglobinwertes war die Patientin lange Zeit wiederholt transfusionspflichtig. Die Steroidgaben zur Behandlung der Hämophagozytose brachten die Werte zwar oft in einen tolerablen Bereich, konnten diese aber nicht stabil hoch halten. Letzten Endes zeigte sich, dass ein Vitamin B12 Mangel Ursache für das niedrige Hämoglobinlevel war und eine ausreichende Substitution das Defizit begleichen konnte (*Abbildung 24 d*).

Die hier angeführten Behandlungen lassen darauf schließen, dass die Transplantation von *ex vivo* expandierten MSC möglich und sicher ist. In keinem der Fälle konnte eine cGvHD geheilt werden. Dies kann an der limitierten Zahl von MSC liegen und/oder zusätzlich an der in diesen Fällen schon sehr lange bestehenden autoimmunen Dysregulation. Die Patienten, die zur Behandlung einer aGvHD MSC erhielten, konnten sich aber teilweise von einem Stadium III° erholen. Gleichzeitig konnte das Fortschreiten zu einer cGvHD verhindert werden. Man muss jedoch bedenken, dass parallel zur MSC-Gabe eine immunsuppressive Therapie mit u. a. Cyclosporin A und Steroiden durchgeführt wurde, die wohl *per se* auch einen Einfluss auf die Transplantation hatte.

Die Behandlung einer Hämophagozytose mit MSC war bisher noch nicht beschrieben worden. Der positive Krankheitsverlauf zeigt anschaulich die

Möglichkeiten einer zellulären Therapie mit MSC bei dysregulierten Immunreaktionen und lässt auf einen erfolgreichen Einsatz in der Therapie von Autoimmunerkrankungen hoffen.

5.5 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit konnte beim Vergleich von MSC aus verschiedenen Geweben große Parallelen aufzeigen. Neben Ähnlichkeiten in der Morphologie und dem Immunphänotyp zeigten sie auch weitreichend vergleichbare immunologische Eigenschaften. Die untersuchten MSC aus den verschiedenen Geweben sind allesamt nicht immunogen. So lösten MSC aus dem Knochenmark, dem Fettgewebe oder der Synovialflüssigkeit größtenteils keine Alloreaktionen gegenüber PBMC aus. Auch sind sie in der Lage, ablaufende Immunreaktionen, die durch verschiedene Mitogene hervorgerufen wurden, zu unterdrücken. Es bestehen jedoch Unterschiede gegenüber den einzelnen Subpopulationen von PBMC. Während $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen durch MSC inhibiert werden können, ist dies bei NK-Zellen nur für die $CD56^{dim}$ Zellen, die die zytotoxischen NK-Zellen repräsentieren, der Fall. $CD56^{bright}$ Zellen zeigen sogar noch eine verstärkte Proliferation, wenn sie mit MSC in Kontakt treten. Für die inhibitorischen Vorgänge, die MSC auslösen, scheinen sowohl lösliche als auch zellständige Faktoren eine Rolle zu spielen. Darauf deuten die Ergebnisse der Versuche in den Transwell-Systemen und mit dem Überstand von MSC-Kulturen.

Durch die Differenzierung von MSC_{SF} in Adipozyten und Osteoblasten konnte zum einen ihre Ähnlichkeit zu MSC aus anderen Geweben, zum anderen ihre Stammzeleigenschaften nachgewiesen werden.

In den angeführten Einzelheilversuchen konnten MSC in sieben pädiatrischen Patienten sicher und ohne nachweisbare Nebenwirkungen transplantiert werden. In einer Patientin konnte eine Hämophagozytose als Komplikation einer Stammzelltransplantation erfolgreich mit MSC behandelt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass der klinische Einsatz von MSC zukunftssträchtig ist. Dies kann einerseits als Behandlung von Transplantationskomplikationen, wie

in dieser Arbeit gezeigt stattfinden, andererseits wäre aber auch die Verwendung bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen denkbar.

6 Zusammenfassung

Mit dem Einsatz mesenchymaler Stammzellen als zelluläre Therapie eröffnet sich ein breites Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten. Ihr Differenzierungspotenzial macht sie zu einem potenziellen Schwerpunkt der regenerativen Medizin. In der Hämatologie können sie ihren Platz in der Behandlung von Komplikationen nach Stammzelltransplantation finden. Neben ihrer Eigenschaft, das Engraftment von hämatopoetischen Stammzellen zu unterstützen, tragen sie auch herausragende immunmodulatorische Fähigkeiten.

Während in vorherigen Arbeiten vornehmlich erwachsene Patienten mit MSC behandelt wurden und nur wenige einzelne Fälle über Transplantationen bei Kindern berichteten, wurden hier nun insgesamt sieben Kinder durch die Kinderklinik Tübingen mit MSC transplantiert. Hierbei wurden keine Nebenwirkungen, wie z. B. allergische Reaktionen festgestellt. Chronische GvHDs zeigten im Verlauf keine Besserung durch eine MSC-Transplantation und bei einem Patienten führte eine solche Komplikation sogar zum Tode. Bei den Patienten mit aGvHD konnte ein Fortschreiten der Erkrankung in eine cGvHD verhindert werden. Des Weiteren beschreibt die vorliegende Arbeit die erste Behandlung eines Patienten mit MSC, der an Hämophagozytose litt. Hierbei konnte das erfolgversprechendste Ergebnis erzielt werden. Die mehrmalige Transplantation von MSC führte zu einem verbesserten Umfeld mit besseren Wachstumsbedingungen für die anschließend nochmals transplantierten hämatopoetischen Stammzellen, so dass die Hämophagozytose gestoppt und die Hämatopoese angeregt werden konnte.

Die Ergebnisse, die aus den Untersuchungen von MSC_{SF} und MSC_{SAA} resultieren, zeigen, dass auch ein Einsatz von MSC bei diesen und anderen Autoimmunerkrankungen denkbar ist. Hierfür sind allerdings noch weitere Untersuchungen notwendig.

Zusammenfassend konnte die Arbeit große Gemeinsamkeiten von MSC_{BM}, MSC_{SF} und MSC_{FAT} feststellen. Neben ihrer ähnlichen Morphologie zeigten sich auch im Immunphänotyp große Übereinstimmungen. Die immunmodulierenden Eigenschaften von MSC_{BM} und vor allem der inhibitorische Effekt auf Lymphozyten konnte klar aufgezeigt werden. Auch MSC_{FAT} und MSC_{FFPP} waren in der Lage, stimulierte PBMC zu inhibieren. Bei der Untersuchung von MSC_{SF} und MSC_{SAA} zeigten sich teils kontroverse Ergebnisse. Die Vorgänge in autoimmunen Prozessen scheinen hier komplexer und bedürfen noch weiterer Erforschung.

Zwar ließ sich noch kein eindeutiges Ergebnis über den Mechanismus der Interaktion zwischen MSC und PBMC festmachen, die Ergebnisse deuten jedoch auf einen Einfluss von sowohl löslichen als auch zelloberflächengebundenen Faktoren hin.

Im Ganzen befürworten und bestärken diese Ergebnisse einen Einsatz mesenchymaler Stammzellen zur Behandlung hämatologischer Erkrankungen und lassen an eine vielseitige Verwendung der Zellen in Zukunft denken. Trotzdem werden noch nähere Untersuchungen notwendig sein, um die Vorgänge besser verstehen und die Anwendung optimieren zu können.

7 Literaturverzeichnis

Aderem A, Ulevitch RJ (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406:782-787.

Aggarwal S, Pittenger MF (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105:1815-1822.

Almeida-Porada G, Flake AW, Glimp HA, Zanjani ED (1999). Cotransplantation of stroma results in enhancement of engraftment and early expression of donor hematopoietic stem cells in utero. *Exp. Hematol.* 27:1569-1575.

Almeida-Porada G, Porada CD, Tran N, Zanjani ED (2000). Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. *Blood* 95:3620-3627.

Assmus B, Honold J, Schachinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Teupe C, Pistorius K, Martin H, Abolmaali ND, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM (2006). Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 355:1222-1232.

Bacigalupo A, Valle M, Podesta M, Pitto A, Zocchi E, De Flora A, Pozzi S, Luchetti S, Frassoni F, Van Lint MT, Piaggio G (2005). T-cell suppression mediated by mesenchymal stem cells is deficient in patients with severe aplastic anemia. *Exp. Hematol.* 33:819-827.

Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC, Phinney DG (2003). Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J. Cell Biochem.* 89:1235-1249.

Barry FP (2003). Mesenchymal stem cell therapy in joint disease. *Novartis Found. Symp.* 249:86-96.

Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp. Hematol.* 30:42-48.

Bittira B, Shum-Tim D, Al-Khaldi A, Chiu RC (2003). Mobilization and homing of bone marrow stromal cells in myocardial infarction. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 24:393-398.

Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K, Ivanova S, Streubel B, Hauser E, Freillinger M, Hoger H, Elbe-Burger A, Wachtler F (1999). Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat. Embryol. (Berl)* 199:391-396.

Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC (2005). Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332:370-379.

Carroll MC (2004). The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat. Immunol.* 5:981-986.

Cohnheim J (1867).

Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ (2001). Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:7841-7845.

Conget PA, Minguell JJ (1999). Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell Physiol* 181:67-73.

De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP (2001). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 44:1928-1942.

De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, Benhaim P, Hedrick MH, Fraser JK (2003). Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol. Lett.* 89:267-270.

Deans RJ, Moseley AB (2000). Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp. Hematol.* 28:875-884.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99:3838-3843.

Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, van H, V, Gotherstrom C, Blomqvist L, Arner P, Ryden M (2005). Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp. Cell Res.* 308:283-290.

Dominici M, Le Blanc K., Müller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315-317.

Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, Lataillade JJ (2005). Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J. Cell Physiol* 205:228-236.

Dudics V, Kunstar A, Geher P, Gomor B, Hangody L, Uher F (2005). Mesenchymal stem cells as potential source cartilage repair. *Orv. Hetil.* 146:1201-1208.

Eliopoulos N, Stagg J, Lejeune L, Pommey S, Galipeau J (2005). Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood* 106:4057-4065.

Erices AA, Allers CI, Conget PA, Rojas CV, Minguell JJ (2003). Human cord blood-derived mesenchymal stem cells home and survive in the marrow of immunodeficient mice after systemic infusion. *Cell Transplant.* 12:555-561.

Ferrara JL, Reddy P (2006). Pathophysiology of graft-versus-host disease. *Semin. Hematol.* 43:3-10.

Frassoni F (2002). Expanded mesenchymal stem cells (MSC), co-infused with HLA identical hemopoietic stem cell transplants, reduce acute and chronic graft versus host disease: a matched pair analysis. *Bone Marrow Transplant.* 29 (Suppl. 2):2.

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6:230-247.

Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K (2004). Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells* 22:649-658.

Fukuda K (2001). Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif. Organs* 25:187-193.

Fukuda K, Fujita J (2005). Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice. *Kidney Int.* 68:1940-1943.

Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI (2001). The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues. Organs* 169:12-20.

Gieseke F, Schutt B, Viebahn S, Koscielniak E, Friedrich W, Handgretinger R, Muller I (2007). Human multipotent mesenchymal stromal cells inhibit proliferation of PBMC independently of IFN γ R1-signaling and IDO expression. *Blood In Press.*

Glass B, Uharek L, Zeis M, Loeffler H, Mueller-Ruchholtz W, Gassmann W (1996). Graft-versus-leukaemia activity can be predicted by natural cytotoxicity against leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* 93:412-420.

Gotherstrom C, West A, Liden J, Uzunel M, Lahesmaa R, Le Blanc K (2005). Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Haematologica* 90:1017-1026.

Grinnemo KH, Mansson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, Tammik C, Holgersson J, Ringden O, Sylven C, Le Blanc K (2004). Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 127:1293-1300.

Gruber R, Karreth F, Kandler B, Fuerst G, Rot A, Fischer MB, Watzek G (2004). Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions. *Platelets* 15:29-35.

Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 20:621-667.

Hansen JA, Yamamoto K, Petersdorf E, Sasazuki T (1999). The role of HLA matching in hematopoietic cell transplantation. *Rev. Immunogenet.* 1:359-373.

Hattori H, Sato M, Masuoka K, Ishihara M, Kikuchi T, Matsui T, Takase B, Ishizuka T, Kikuchi M, Fujikawa K, Ishihara M (2004). Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissues Organs* 178:2-12.

Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI (1992). Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13:81-88.

Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T (2002). 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.* 99:8932-8937.

Horwitz EM, Le Blanc K., Dominici M, Müller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7:393-395.

Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK (1999). Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat. Med.* 5:309-313.

Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD, McCarville ME, Orchard PJ, Pyeritz RE, Brenner MK (2001). Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood* 97:1227-1231.

Hu Y, Liao L, Wang Q, Ma L, Ma G, Jiang X, Zhao RC (2003). Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. *J. Lab Clin. Med.* 141:342-349.

Im GI, Shin YW, Lee KB (2005). Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis. Cartilage* 13:845-853.

in 't Anker PS, Noort WA, Kruisselbrink AB, Scherjon SA, Beekhuizen W, Willemze R, Kanhai HH, Fibbe WE (2003a). 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.* 31:881-889.

in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, Beekhuizen W, Willemze R, Kanhai HH, Fibbe WE (2003b). Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* 88:845-852.

Janeway CA, Jr., Medzhitov R (2002). Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20:197-216.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-49.

Jones EA, English A, Henshaw K, Kinsey SE, Markham AF, Emery P, McGonagle D (2004). Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum.* 50:817-827.

Kadri T, Lataillade JJ, Doucet C, Marie A, Ernou I, Bourin P, Joubert-Caron R, Caron M, Lutomski D (2005). Proteomic study of Galectin-1 expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 14:204-212.

Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W (2002). Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant.* 30:215-222.

Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM (2000). Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 18:307-316.

Koc ON, Peters C, Aubourg P, Raghavan S, Dyhouse S, DeGasperi R, Kolodny EH, Yoseph YB, Gerson SL, Lazarus HM, Caplan AI, Watkins PA, Krivit W (1999). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Exp. Hematol.* 27:1675-1681.

Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:10711-10716.

Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F (2006). Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24:386-398.

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

Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI (1995). Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant.* 16:557-564.

Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK, Shpall EJ, McCarthy P, Atkinson K, Cooper BW, Gerson SL, Laughlin MJ, Loberiza FR, Jr., Moseley AB, Bacigalupo A (2005). Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 11:389-398.

Le Blanc K (2003). Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 5:485-489.

Le Blanc K, Pittenger M (2005). Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy* 7:36-45.

Le Blanc K, Rasmusson I, Gotherstrom C, Seidel C, Sundberg B, Sundin M, Rosendahl K, Tammik C, Ringden O (2004a). Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 60:307-315.

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

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

Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O (2003b). Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand. J. Immunol.* 57:11-20.

Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW (2000). Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat. Med.* 6:1282-1286.

Lin HT, Tarng YW, Chen YC, Kao CL, Hsu CJ, Shyr YM, Ku HH, Chiou SH (2005). Using human plasma supplemented medium to cultivate human bone marrow-derived mesenchymal stem cell and evaluation of its multiple-lineage potential. *Transplant. Proc.* 37:4504-4505.

Lin Y, Chen X, Yan Z, Liu L, Tang W, Zheng X, Li Z, Qiao J, Li S, Tian W (2006). Multilineage differentiation of adipose-derived stromal cells from GFP transgenic mice. *Mol. Cell Biochem.* 285:69-78.

Luyten FP (2004). Mesenchymal stem cells in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 16:599-603.

MacKenzie TC, Flake AW (2001). Human mesenchymal stem cells persist, demonstrate site-specific multipotential differentiation, and are present in sites of wound healing and tissue regeneration after transplantation into fetal sheep. *Blood Cells Mol. Dis.* 27:601-604.

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

Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL (1998). Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J. Cell Physiol* 176:57-66.

Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 103:4619-4621.

- Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D (2003). Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41:1078-1083.
- Minguell JJ, Erices A, Conget P (2001). Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 226:507-520.
- Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H (2006). Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat. Med.* 12:459-465.
- Morsczeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kuhn U, Mohl C, Sippel C, Hoffmann KH (2005). Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 24:155-165.
- Müller I, Kordowich S, Holzwarth C, Isensee G, Lang P, Neunhoeffler F, Dominici M, Greil J, and Handgretinger R (2007). Application of multipotent mesenchymal stromal cells in pediatric patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol. Dis* 40:25-32.
- Müller I, Kordowich S, Holzwarth C, Spano C, Isensee G, Staiber A, Viebahn S, Gieseke F, Langer H, Gawaz MP, Horwitz EM, Conte P, Handgretinger R, Dominici M (2006a). Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy* 8:437-444.
- Müller I, Kustermann-Kuhn B, Holzwarth C, Isensee G, Vaegler M, Harzer K, Krageloh-Mann I, Handgretinger R, Bruchelt G (2006b). In vitro analysis of multipotent mesenchymal stromal cells as potential cellular therapeutics in neurometabolic diseases in pediatric patients. *Exp. Hematol.* 34:1413-1419.
- Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H, Miyatake K, Kitamura S (2005). Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 112:1128-1135.
- Nakano K, Migita M, Mochizuki H, Shimada T (2001). Differentiation of transplanted bone marrow cells in the adult mouse brain. *Transplantation* 71:1735-1740.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2003). Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr. Transplant.* 7 Suppl 3:86-88.

Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, Rossi MI, Carvalho AC, Dutra HS, Dohmann HJ, Silva GV, Belem L, Vivacqua R, Rangel FO, Esporcatta R, Geng YJ, Vaughn WK, Assad JA, Mesquita ET, Willerson JT (2003). Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 107:2294-2302.

Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Silva GV, Mesquita CT, Belem L, Vaughn WK, Rangel FO, Assad JA, Carvalho AC, Branco RV, Rossi MI, Dohmann HJ, Willerson JT (2004). Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 110:II213-II218.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.

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

Pochampally RR, Neville BT, Schwarz EJ, Li MM, Prockop DJ (2004). Rat adult stem cells (marrow stromal cells) engraft and differentiate in chick embryos without evidence of cell fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:9282-9285.

Potian JA, Aviv H, Ponzio NM, Harrison JS, Rameshwar P (2003). Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. *J. Immunol.* 171:3426-3434.

Prockop DJ (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276:71-74.

Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K (2003). Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 76:1208-1213.

Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K (2005). Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp. Cell Res.* 305:33-41.

Reyes M, Verfaillie CM (2001). Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N. Y. Acad Sci* 938:231-233.

Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnie H, Marschall HU, Dlugosz A, Szakos A, Hassan Z, Omazic B, Aschan J, Barkholt L, Le Blanc K (2006). Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 81:1390-1397.

Romagnani S (2000). T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 85:9-18.

Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T (2005). Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* 52:2521-2529.

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

Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L (2006). Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 107:1484-1490.

Stagg J, Pommey S, Eliopoulos N, Galipeau J (2006). Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood* 107:2570-2577.

Stamm C, Kleine HD, Westphal B, Petzsch M, Kittner C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G (2004). CABG and bone marrow stem cell transplantation after myocardial infarction. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 52:152-158.

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P (2002). Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 106:1913-1918.

Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR (2004). Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp. Hematol.* 32:1212-1225.

Tang YL (2005). Autologous mesenchymal stem cells for post-ischemic myocardial repair. *Methods Mol. Med.* 112:183-192.

Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD (2002). Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105:93-98.

Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Delforge A, Massy M, Mortier C, Bron D (2004). Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. *Cytotherapy* 6:372-379.

Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC (2003). Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 75:389-397.

Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD (2005). Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp. Hematol.* 33:1402-1416.

Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 61:364-370.

Wu GD, Nolte JA, Jin YS, Barr ML, Yu H, Starnes VA, Cramer DV (2003). Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection. *Transplantation* 75:679-685.

Yoon J, Min BG, Kim YH, Shim WJ, Ro YM, Lim DS (2005). Differentiation, engraftment and functional effects of pre-treated mesenchymal stem cells in a rat myocardial infarct model. *Acta Cardiol.* 60:277-284.

8 Publikationen

Müller I, Kordowich S, Holzwarth C, Isensee G, Lang P, Neunhoeffler F, Dominici M, Greil J and Handgretinger R (2008). Application of multipotent mesenchymal stromal cells in pediatric patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol. Dis* 40:25-32.

Müller I, Kordowich S, Holzwarth C, Spano C, Isensee G, Staiber A, Viebahn S, Gieseke F, Langer H, Gawaz MP, Horwitz EM, Conte P, Handgretinger R, Dominici M (2006a). Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy* 8:437-444.

9 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Dr. Ingo Müller für die freundliche Überlassung des Themas, die hervorragende, engagierte Betreuung und das entgegengebrachte Vertrauen. Vieles wäre ohne ihn nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Gernot Bruchelt danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit und die konstruktive, offene Atmosphäre in den Labors der Kinderklinik.

Bei Herrn Prof. Dr. Rupert Handgretinger bedanke ich mich für den interessanten Forschungsschwerpunkt und das angenehme Klima in der Kinderklinik Tübingen.

Ein besonderer Dank geht an meine Arbeitsgruppe:

Jutta Jenner für die freundliche Einführung in die Laborarbeit, insbesondere bei der Erlernung der FACS-Analyse. Alexandra Staiber für die Hilfe bei meinen „ersten Schritten“ im Labor. Susanne Viebahn für die universelle Unterstützung und die Tipps bei der Überarbeitung dieser Arbeit. Friederike Gieseke für ihre vielseitigen Ratschläge bei Labortätigkeiten und die konstruktiven Kommentare bezüglich meiner Dissertation. Martin Vaegler für seine Empfehlungen - besonders bei computerbezogenen Fragen - und die aufbauende Durchsicht meiner Arbeit. Gesa Isensee für die weit reichende Beratung bei der Differenzierung und Färbung der MSC. Christina Holzwarth für die gute Zusammenarbeit. Luciana Dannecker für die Unterstützung bei der MSC-Zucht und den Überblick im Labor.

Der gesamten AG Holzer danke ich für die immer nette Kooperation in den Labors und Büroräumen und zahlreiche Aktivitäten darüber hinaus. Hervorheben möchte ich hier jedoch:

Carsten Schepp, der mir immer freundlich, rasch und sehr engagiert vor Allem bei Angelegenheiten rund ums FACS, geholfen hat und Markus Haug, der mir bei allen labortechnischen Problemen oder Fragen zum Reference Manager sofort mit Rat und Tat zur Stelle gewesen ist.

Nicht zu vergessen wäre auch Nikolay Tzaribachev, dem ich für die Gelenkpunktate, die Anregungen zu den Versuchen mit den „Synovial-MS“, Paris, Madonna und PRADA danken möchte.

Beim „Hämalabor“ bedanke ich mich für die freundliche Erlaubnis zur Benutzung des Zellzählgerätes und das Weiterleiten von Knochenmark zur MSC-Gewinnung. Vielen Dank auch den Mitarbeitern der Tagesklinik, dass sie uns nie vergessen haben, wenn mal ein wenig Knochenmark übrig war.

Ein Dank geht auch an alle hier nicht angeführten Mitarbeiter der Labors der Kinderklinik für die freundliche Zusammenarbeit auf C02.

Der AG Dominici möchte ich für die freundliche Überlassung der MSC_{FAT} und die Anleitung zur Färbung der Zellen, sowie ein nettes Seminar bei Regen und Sonnenschein in Italien danken.

Dem Graduiertenkolleg „Zellbiologische Mechanismen Immunassoziierter Prozesse“ danke ich für die finanzielle Unterstützung und die Erfahrungen, die ich in zahlreichen Seminaren und auf Kongressen sammeln durfte.

All meinen Freunden möchte ich danken, dass sie mir in verschiedenster Weise Rückhalt gegeben und mir einen tollen Freizeitausgleich neben der Laborarbeit beschert haben.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Geschwistern, die mich in all meinem Tun immer unterstützt haben und für mich da sind.

10 Lebenslauf

Name: Sandra Kordowich

Geboren: 01. Juli 1980 in Stuttgart

Schulbildung: 1987 - 1991: **Grundschule** Stuttgart-Sillenbuch
1991 - 2000: Ev. Heidehof-**Gymnasium** Stuttgart;
Abschluss: Abitur

Studium: 2000 - 2001: Studium der **internationalen BWL** an der
Eberhard Karls Universität Tübingen
seit Oktober 2001: Studium der **Humanmedizin** an der
Eberhard Karls Universität Tübingen
September 2003: **ärztliche Vorprüfung** (Physikum)
20. Mai 2008: **Ärztliche Prüfung**

seit Juli 2004: **Promotion** zum Thema „Immunologische Eigenschaften
Mesenchymaler Stammzellen und klinische Anwendung bei
sieben Kindern bei Prof. Dr. Gernot Bruchelt

August 2004 –
August 2006: Mitglied des **Graduiertenkollegs** „Zellbiologische
Mechanismen Immunassoziierter Prozesse“

Famulaturen: März – April 2004: **Gynäkologie** im Marienhospital Stuttgart
September – Oktober 2004: **Klinik für Kinderheilkunde
und Jugendmedizin** Tübingen
März – April 2005: **endokrinologische Ambulanz** der
Universitätsklinik Tübingen
März – April 2006: **Inneren Medizin** im Queen Elisabeth
Hospital, Bridgetown, Barbados

Praktisches Jahr: 1. Terial: **Neurologie** im Universitätsspital Basel, Schweiz
2. Terial: **Chirurgie** im Klinikum Stuttgart
3. Terial: **Innere Medizin** im Universitätsspital Zürich,
Schweiz