Aus dem Institut für Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck Direktor: PD Dr. med. Siegfried Görg

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck – aus der Medizinischen Fakultät –

Die Bedeutung der hämatopoetischen Nische im Knochenmark für die Erythropoese

vorgelegt von Gisa Antonia Meyer aus Hannover

Lübeck 2008

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Peter Schlenke

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2008 Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 18.12.2008

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Für Helga und Heinz Anna, Lena und Susanne

Auch auf steinigen Pfaden blühen Blumen

(I. Erath)

Inhaltsverzeichnis

1	Einle	eitung	9
	1.1	Grundlagen der Stammzellphysiologie	10
	1.2	Blutbildende Stammzellen und die Hämatopoese	11
	1.3	Physiologie und Homöostase der Erythropoese	12
	1.4	Die hämatopoetische Nische	13
	1.5	Die extrazelluläre Matrix und Integrine	16
	1.6	Das Matrixprotein Fibronektin	18
	1.7	Das Matrixprotein Laminin	19
	1.8	Das Matrixprotein Kollagen	20
	1.9	Mesenchymale Stammzellen	20
	1.10	Zytokine und Wachstumsfaktoren der Hämatopoese	22
	1.11	Ziel der Arbeit	24
2	Mat	erial und Methoden	25
	2.1	Material	25
		2.1.1 Patienten und Proben	25
		2.1.2 Geräte	26
		2.1.3 Laborbedarf	26
		2.1.4 Zellkulturmedien und Reagenzien	26
		2.1.5 Software	28
	2.2	Methoden	28
		2.2.1 Patienten und Proben	28
		2.2.2 Isolierung und Kultur der hämatopoetischen Stammzellen	28
		2.2.3 Untersuchungen	31
		2.2.4 Erstellen von Matrizes aus Matrixproteinen	33
		2.2.5 Gewinnung und Kultivierung mesenchymaler Stammzellen	33
		2.2.6 Erstellen von Matrizes aus mesenchymalen Stammzellen	34
		2.2.7 Anfertigung des Proteinarrays	35
		2.2.8 Durchführung von Enzyme-linked Immunosorbent Assays $\ .\ .\ .$	35
3	Erge	ebnisse	37
	3.1	Kultur der Erythropoese auf Proteinen der extrazellulären Matrix	37
		3.1.1 Zellvitalität	40
		3.1.2 Zellproliferation	41
		3.1.3 Zelldifferenzierung	42
	3.2	Co-Kultur der Erythropoese auf mesenchymalen Stammzellen	45
		3.2.1 Zellvitalität \ldots	46

		3.2.2	Zellproliferation	47
		3.2.3	Zelldifferenzierung	48
		3.2.4	Produktion von Zytokinen durch mesenchymale Stammzellen $\ . \ .$	55
4	Disk	ussion		57
	4.1	Kultur	r der Erythropoese auf Proteinen der extrazellulären Matrix $\ \ .\ .$.	57
		4.1.1	Kultur der Erythropoese auf Fibronektin	57
		4.1.2	Kultur der Erythropoese auf Laminin	58
		4.1.3	Kultur der Erythropoese auf Kollagen	59
		4.1.4	Kultur der Erythropoese auf ECM-Gel	59
	4.2	Co-Ku	ltur der Erythropoese auf mesenchymalen Stammzellen 	59
		4.2.1	Zellvitalität	60
		4.2.2	Zellproliferation	60
		4.2.3	Zelldifferenzierung	62
		4.2.4	Produktion von Zytokinen durch mesenchymale Stammzellen	63
5	Zusa	ammen	fassung	69
Al	okürz	ungsver	zeichnis	71
Al	obildu	ingsverz	zeichnis	73
Ta	belle	nverzei	chnis	75
Li	teratı	ırverzei	chnis	77
Α	Anh	ang		87
	A.1	Exkur	s: Kontamination der Zellkultur mit säurefesten Stäbchen	87
	A.2	Ethikk	commission	90
	A.3	Arbeit	sanleitungen/Arbeitsprotokolle inklusive Zellfärbungen	95
	A.4	Messp	rotokolle der Durchflusszytometrie	105
	A.5	Protei	narray	107
	A.6	Durch	flusszytometrische Analysen der mesenchymalen Stammzellen	119
	A.7	ELISA		120
	A.8	Bisher	ige Veröffentlichungen	124
Da	anksa	gung		129
Cı	ırricu	lum vit	ae	131

1 Einleitung

Das Knochenmark ist ein für den Menschen überlebenswichtiges Organ. Hier werden beim gesunden Menschen alle Blutzellen produziert und – mit Ausnahme der T-Lymphozyten – erst nach ihrer Ausreifung in den Blutkreislauf entlassen. Das menschliche Blut befindet sich in einem ständigen Erneuerungsprozess, welcher in einem engen homöostatischen Gleichgewicht gehalten werden muss. Eine Dysregulation oder Dysfunktion der Blutbildung im Knochenmark kann zu lebensbedrohlichen Krankheiten führen: Anämien, Granulozytopenien, akuten Störungen der Blutstillung im Falle einer zu geringen Zahl oder bei Funktionsstörungen von Blutzellen, zum Beispiel Thrombozytopenien oder Thrombozytopathien. Ebenso kommt es durch maligne Entartung von Stamm- und Vorläuferzellen zu verschiedenen Formen der Leukämie, die mit einer Überproduktion oder vorzeitigen Entlassung der Vorläuferzellen in den peripheren Blutkreislauf einhergeht. Die genaue Erforschung von physiologischen Einflussfaktoren auf einzelne Aspekte der Blutbildung ist demnach von eminenter Bedeutung, um die Basis für die Erforschung der Pathogenese verschiedener Krankheiten zu schaffen.

1978 äußerte Schofield als Erster den Gedanken, dass blutbildende Stammzellen im Knochenmark in einer hämatopoetischen "Nische" liegen, deren Eigenschaften maßgeblich an der Regulation der Hämatopoese beteiligt sind. Als entscheidend für das Überleben und die Proliferation der Stammzellen vermutete er ihre Bindung an die zellulären und extrazellulären Komponenten dieser "Nische". Seitdem wurden viele Erkenntnisse über die genauere Zusammensetzung der hämatopoetischen "Nische" gewonnen und nach neuesten Erkenntnissen wurde diese Theorie zugunsten eines Zwei-Nischen-Modells erweitert: Demnach liegen die hämatopoetischen Stammzellen und frühen Vorläuferzellen im Knochenmark im Bereich des Endosts vornehmlich umgeben von Osteoblasten (Osteoblastennische) und wandern im Zuge ihrer Ausreifung in die Richtung des sinusoidalen Gefäßnetzes in den zentralen Bereichen des Knochenmarks (vaskuläre Nische). Hier wird ihre weitere Ausreifung gefördert, bis sie schließlich durch das Endothel der Blutgefäße hindurch in den Blutkreislauf geschleust werden. In diversen Studien wurden die verschiedenen möglichen Einflussfaktoren, die auf die hämatopoetischen Zellen im Laufe ihrer Entwicklung einwirken können, untersucht. Trotz neuer Erkenntnisse liegen dennoch noch immer viele Teile der hämatopoetischen Homöostase des Menschen im Dunkeln.

Diese Arbeit soll einen weiteren Beitrag zur Erforschung des Einflusses von Stromazellen und extrazellulärer Matrix auf die menschliche Hämatopoese leisten. Ein etabliertes Zellkulturmodell, in dem humane hämatopoetische Stammzellen durch die Zugabe bestimmter Zytokine zur Differenzierung in reife Erythrozyten angeregt werden, diente als Basis für Versuche zur Co-Kultivierung hämatopoetischer Stammzellen mit Komponenten des menschlichen Knochenmarks. Ziel der Versuche war es, den Einfluss von mesenchymalen Stammzellen – als Beispiel für Stromazellen im Knochenmark – und von Proteinen der extrazellulären Matrix auf die Entwicklung von Blutzellen, speziell Erythrozyten, aus hämatopoetischen Stammzellen zu untersuchen.

Besonderes Augenmerk lag dabei auf den Messgrößen Zellvitalität, Zellproliferation und Differenzierung. Ein von Panzenböck et al. entwickeltes und von der Lübecker Arbeitsgruppe von Dr. Isabel Dorn [1] modifiziertes Modell der Erythropoese aus CD34-positiven humanen Stammzellen diente als Grundlage für Co-Kultivierungsversuche auf mesenchymalen Stammzellen und Matrixproteinen. Verwendet wurden ausschließlich durch Zellapherese aus peripherem Blut gewonnene hämatopoetische Stammzellen und aus Knochenmarkpunktionen isolierte humane mesenchymale Stammzellen. Des weiteren wurden aus Überständen der Co-Kultivierung hämatopoetischer Stammzellen auf mesenchymalen Stammzellen ein umfangreiches Proteinarray sowie verschiedene Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISAs) angefertigt, um die Hämatopoese beeinflussende Zytokine und Chemokine zu detektieren. So konnten neue Hinweise gewonnen werden, auf welche Weise das Knochenmarkstroma die Hämatopoese – allem voran die Erythropoese – beeinflusst. Die Ergebnisse können neue Aufschlüsse über die komplexe Regulation der menschlichen Hämatopoese im Knochenmark liefern und gleichzeitig als Basis für eine weiterführende Erforschung der Physiologie und Pathophysiologe der menschlichen Hämatopoese dienen.

1.1 Grundlagen der Stammzellphysiologie

Die medizinische Forschung an Stammzellen ist ein viel besprochenes und viel versprechendes Thema. Man unterscheidet allgemein zwischen embryonalen, pluripotenten Stammzellen und adulten, multipotenten Stammzellen [2], [3, Kap. 2.1.2]. Da die Forschung an menschlichen embryonalen Stammzellen bis auf wenige Ausnahmen in Deutschland verboten ist, beschränkt sich die Erforschung der menschlichen Stammzellbiologie hierzulande vorwiegend auf die Arbeit mit adulten Stammzellen¹. Alle Stammzellen zeichnen sich definitionsgemäß dadurch aus, dass sie dazu in der Lage sind, identische Kopien von sich herzustellen (Selbsterneuerung) und zu spezialisierten Zellen auszureifen (Differenzierung) [2,4]. Während aus einer embryonalen Stammzelle prinzipiell jede beliebige Zelle des menschlichen Körpers hervorgehen kann (Pluripotenz), sind adulte Stammzellen bereits auf einen bestimmten Gewebetyp festgelegt und können sich nur in diesem Rahmen zu verschiedenen Zelltypen entwickeln (Multipotenz). Im Bereich der multipotenten Stammzellen unterscheidet man zum Beispiel die blutbildenden (hämatopoetischen) Stammzellen von den nicht-blutbildenden (zum Beispiel mesenchymalen oder neuralen) Stammzellen, die bisher in vielen Organen des Menschen nachgewiesen werden konnten [5,6].

¹Vgl. Stammzellgesetz (StZG) des BMBF vom 28. Juni 2002

1.2 Blutbildende Stammzellen und die Hämatopoese

Die Blutbildung findet beim menschlichen Embryo ab der vierten Schwangerschaftswoche zunächst in den Umbilikalgefäßen, der Leber und der Milz statt, wird dann jedoch bis zur Geburt vollständig in das Knochenmark verlagert [7, Kap. 1]. Hier entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen, die den Oberflächenmarker CD34 tragen, die Blutzellen der verschiedenen Reihen mit unterschiedlichen Funktionen: Thrombozyten zur Blutgerinnung, Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten zur Immunabwehr (weiße Reihe) und Erythrozyten (rote Reihe) für den Sauerstofftransport im Blut (siehe Abbildung 1.1).



Abbildung 1.1: Die Ausreifung der hämatopoetischen Stammzellen zu spezialisierten Blutzellen geschieht im Knochenmark über mehrere Zwischenschritte. Die frühen Vorläuferzellen der verschiedenen Blutzellreihen zeichnen sich unter anderem dadurch aus, dass sie unter geeigneten Bedingungen in vitro zunächst in Kolonien oder "Haufen" eng beieinander liegen; diese werden deshalb als Burst Forming Units (BFU) oder Colony Forming Units (CFU) bezeichnet [8, Kap. 24].

Nach ihrer Ausreifung werden die Zellen über die das Knochenmark durchziehenden

Gefäße in den Blutkreislauf entlassen und können hier ihre spezifischen Funktionen wahrnehmen. Für all diese genannten Prozesse der Zellproliferation und -differenzierung werden verschiedene Einflussfaktoren wie Wachstumsfaktoren (Zytokine), Zell-Zell- und Zell-Matrixkontakte diskutiert.

1.3 Physiologie und Homöostase der Erythropoese

Die roten Blutkörperchen (Erythrozyten) entwickeln sich wie alle anderen Blutzellen über Vorläuferzellen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark (siehe Abb. 1.2 auf Seite 14). Die einzelnen Zwischenstadien der Erythropoese exprimieren unterschiedliche Oberflächenstrukturen, die mittels einer Nomenklatur (Cluster of Differentiation= CD) erfasst werden. Diese Oberflächenantigene können mithilfe fluoreszierender Antikörper markiert und am Durchflusszytometer detektiert werden. Dieses Verfahren wird als Immunphänotypisierung bezeichnet. Auf diese Weise lassen sich – alternativ zur Betrachtung von Färbungen unter dem Mikroskop – die verschiedenen Vorläuferzellen erfassen und unterscheiden (siehe Tabelle 1.1).

Oberflächenantigen	exprimierende Zellen	Bedeutung/Funktion
CD34	Hämatopoetische	Stammzellmarker,
	Vorläuferzellen	Adhäsionsmolekül
CD36	Blutplättchen, Monozyten,	ECM-Rezeptor,
	frühe erythroide	Adhäsionsmolekül
	Vorläuferzellen	
CD71	proliferierende Zellen,	Transferrin-Rezeptor
	späte erythroide	
	Vorläuferzellen	
CD235a	Erythrozyten	Glykophorin A, Teil des
		Ss-Blutgruppensystems
CD45	alle hämatopoetischen	Tyrosin-Phosphatase,
	Zellen	Rezeptorantigen von B-
		und T-Zellen

Tabelle 1.1: Oberflächenantigene auf Zellen der Erythropoese und ihre Bedeutung [9]

Rote Blutkörperchen zeichnen sich morphologisch gegenüber allen anderen Zellen durch die Besonderheit aus, dass sie im Zuge der Differenzierung ihren Kern ausstoßen und als kernlose, hämoglobinhaltige Sauerstofftransporter durchschnittlich 120 Tage im Blut zirkulieren können – länger als jede andere kernlose Zelle. Bei einer Gesamterythrozytenzahl des erwachsenen Menschen von 4 bis 5 Millionen pro Mikroliter Blut bedeutet das eine tägliche Neubildung von $3 \cdot 10^9$ Erythrozyten pro Kilogramm Körpergewicht, also circa $2 \cdot 10^{11}$ pro Tag – eine Zahl die im Falle eines erhöhten Bedarfs (zum Beispiel bei starkem Blutverlust) noch erheblich gesteigert werden kann ("Stresshämatopoese") [3, Kap. 2].

Reguliert werden diese Vorgänge durch komplexe Mechanismen, zum großen Teil vermittelt durch lösliche Botenstoffe. Als entscheidend für die Stimulation der Proliferation von Vorläuferzellen ist der von den Stromazellen produzierte "Stem Cell Factor" (SCF) anzusehen [10, 11], während das aus der Niere stammende Erythropoetin (EPO) [12] sowohl die Proliferation als auch die Ausreifung der Zellen entlang der roten Reihe maßgeblich beeinflusst [3]. Doch auch von anderen Faktoren und Hormonen wie Östradiol, Dexamethason, Insulin, Insulin-like-growth-factor und Transferrin weiß man, dass sie eine wichtige Rolle für die Erythropoese spielen [13].

Obwohl noch lange nicht sämtliche Regulationsfaktoren bekannt sind, ist es bereits einigen Arbeitsgruppen gelungen, Zellkulturmodelle der Erythropoese zu entwickeln, bei denen durch Zugabe rekombinanter Botenstoffe die Proliferation hämatopoetischer Stammzellen und ihre Ausreifung entlang der roten Reihe induziert werden [13–15]. Ein solches Modell diente als Basis für die dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuche (siehe Kapitel 2.2.2).

1.4 Die hämatopoetische Nische

Schon seit Längerem wird vermutet, dass die Hämatopoese im Knochenmark an speziellen Orten – sogenannten Stammzellnischen – stattfindet [16]. In diesen Nischen finden die CD34-positiven Stammzellen optimale Bedingungen für Wachstum (Proliferation) und Ausreifung (Differenzierung) vor [17]. Diese Bedingungen werden von den Umgebungskomponenten geschaffen: Den Stromazellen, der von diesen sezernierten extrazellulären Matrix und verschiedenen Zytokine, die entweder von den Stromazellen gebildet und in der extrazellulären Matrix gespeichert werden oder von ihrem Produktionsort fernab des Knochenmarks über die Blutgefäße einwandern (siehe auch Abbildung 1.3 auf Seite 15 und Kapitel 1.3). Mögliche Bedeutungen der Knochenmarknischen für die menschliche Hämatopoese sind:

- 1. Direkte Kommunikation via Zell-Zell-Kontakt
- 2. Bildung von gebundenen und löslichen Wachstumsfaktoren (negative und positive Regulatoren der Hämatopoese)
- 3. Bindung von Wachstumsfaktoren an die extrazelluläre Matrix (ECM)
- 4. Einflussnahme auf Migration und Proliferation der hämatopoetischen Stammzellen durch Bindung an die extrazelluläre Matrix oder Stromazellen

Neuere Studien, die den Aufbau des Knochenmarks untersuchten, haben in den letzten Jahren viele Hinweise erbracht, dass die Zellen verschiedener Reifungsstadien der Erythropoese in vivo auch an verschiedenen Orten des Knochenmarks anzutreffen sind: Die hämatopoetischen Stammzellen und frühen Vorläuferzellen befinden sich im endostalen Bereich in direkter Nachbarschaft zu Osteoblasten. Von hier aus werden sie mobilisiert, zur Proliferation angeregt und wandern im Zuge ihrer Ausreifung in Richtung der Sinusoidalgefäße in zentralere Bereiche des Knochenmarks. Hier finden, in Gegenwart von Endothelzellen, die terminale Ausreifung der Blutzellen sowie ihre Ausschleusung in den

1 Einleitung







(b) Proerythroblast



(c) Polychromatischer Erythroblast



Abbildung 1.2: Die lichtmikroskopisch unterscheidbaren Reifungsstadien der Erythropoese (a-c Pappenheimfärbung, d-e neutrale Benzidinfärbung; Vergrößerung: 1000fach): (a) besitzt ein stark basophiles Zytoplasma und einen Durchmesser von 15-20 μ m sowie einen stark aufgelockerten Zellkern, (b) zeichnet sich durch ein basophiles Plasma mit einem aufgehellten Kernsaum aus, (c) besitzt ein weniger basophiles Zytoplasma als seine beiden Vorgänger, ist auf 10-12 μ m Durchmesser geschrumpft und enthält einen verdichteten Kern, (d) produziert bereits eine beachtliche Menge von Hämoglobin und stellt sich so in der Benzidinfärbung deutlich orange dar; der Kern ist stark verdichtet und randständig, (e) besitzt keinen Kern mehr, dafür eine hohe Konzentration an Hämoglobin und ist circa 8 μ m groß.



Abbildung 1.3: Die hämatopoetische Nische im Knochenmark: Das im Knochenmark befindliche "Stromazellkompartment" setzt sich aus verschiedenen Zellen zusammen, welche die extrazelluläre Matrix produzieren und so eine "Nische" bilden, in welcher die hämatopoetischen Stammzellen liegen und auf mannigfaltige Weise beeinflusst werden können.

Blutkreislauf statt. Basierend auf dieser Hypothese entwickelte sich die Vorstellung von zwei verschiedenen hämatopoetischen Nischen im Knochenmark mit unterschiedlichen Funktionen. Die Literatur hat hierfür die Begriffe einer Osteoblasten- und einer vaskulären Nische geprägt [18–21].

1.5 Die extrazelluläre Matrix und Integrine

Dort wo im menschlichen Körper Gewebeeigenschaften wie Polsterung, Strukturerhaltung, Speicherung von Molekülen und Bindungsvermittlung vonnöten sind, findet sich extrazelluläre Matrix. Je nach Ansprüchen an die Struktur des Gewebes ist diese elastisch (Knorpel, Gefäßwände), fest (Sehnen, Kapseln) oder aufgelockert (Lunge, Drüsen, Fettgewebe) [8, Kap. 2]. Die extrazelluläre Matrix wird von lokalen Stromazellen gebildet und besteht vornehmlich aus verschiedenen Glykoproteinen, die durch ihre Zusammensetzung die Struktur der extrazellulären Matrix bestimmen. Dieser Verbund von Glykoproteinen erfüllt neben den oben genannten Funktionen (Strukturgebung, Bindungsvermittlung) außerdem den Zweck der Speicherung der ebenfalls von Stromazellen produzierten Zytokine und Chemokine.

In den letzten Jahren haben sich die Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung der extrazellulären Matrix für das Verhalten von Zellen, speziell für die Ausreifung unreifer Vorläuferzellen, verdichtet. Knock-out-Mäuse für bestimmte ECM-Bestandteile entwickelten in Versuchen mannigfaltige Krankheitsbilder: Bei einem Synthesedefizit von Laminin kam es zu Muskeldystrophien, Fibronektinmangel führte zu Herzanlagefehlern und die Unfähigkeit, Kollagen zu synthetisieren, endete im Absterben des Mausembryos an Tag 5 [22, 23].

Die somit offenbar lebenswichtige Bedeutung der extrazellulären Matrix wird nach einhelliger Meinung hauptsächlich durch sogenannte Integrine vermittelt: Zelloberflächenrezeptoren, die an die Bindungsstellen der Matrixproteine andocken können. Hierbei handelt es sich um Heterodimere mit einer Alpha- und einer Betauntereinheit, welche jeweils einen großen extrazellulären und einen kurzen zytoplasmatischen Anteil besitzen. Dieser Aufbau der Integrine ermöglicht es, dass eine Bindung des extrazellulären Anteils an ein ECM-Protein oder eine Struktur auf Zelloberflächen über den intrazellulären Anteil einen starken Einfluss auf den Zellmetabolismus ausüben kann. Beispiele für die Wirkung von Integrinen sind Aktivierung von Proteinkinasen bei der Zellproliferation, Reorganisation des Zytoskeletts im Zuge von Formveränderungen bei der Migration und einige mehr [24].

Über zwanzig Isoformen von Integrinen sind bis heute bekannt, jede mit anderen spezifischen Bindungseigenschaften: Die meisten Integrine binden an große Proteinkomplexe wie Kollagen oder Laminin, jedoch gibt es auch Integrine, die an sehr kleine und spezialisierte Untereinheiten binden, wie die RGD-Sequenz des Fibronektin (siehe 1.6 auf Seite 18) [25]. Es besteht die Möglichkeit, dass ein Integrin an verschiedene Seitenketten von Proteinen andockt. Andersherum kann auch der gleiche Seitenarm eines Proteins an verschiedene Integrine binden [23]. So ergeben sich zahlreiche Bindungsmuster, mit deren Hilfe Zellprozesse reguliert werden können. Eine spezialisierte Gruppe der Integrine sind die Very Late Antigens (VLA) (siehe Tab. 1.2). In der Literatur sind gerade im Bereich der Hämatopoese viele Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beschrieben, die durch Integrine – vor allem VLA-4 und VLA-5 – vermittelt werden und eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Hämatopoese spielen [26,27].

Integrin	Untereinheiten	Exprimierende Zellen	Liganden
VLA-1	$\alpha 1 \beta 1$	glatte Muskelzellen, Schwannzellen, Lymphozyten, Endothelzellen	Laminin, Kollagen
VLA-2	$\alpha 2\beta 1$	Fibroblasten, Thrombozyten, Endothelzellen, Epithelzellen, Lymphozyten, hämatopoetische Vorläuferzellen	Laminin, Kollagen
VLA-3	$\alpha 3\beta 1$	Epithelzellen	Laminin, Fibronektin, Entactin, Kollagen
VLA-4	$\alpha 4\beta 1$	Lymphozyten, Monozyten, eosinophile Granulozyten, natürliche Killerzellen, hämatopoetische Vorläuferzellen	Fibronektin, VCAM-1
VLA-5	$\alpha 5\beta 1$	Fibroblasten, Thrombozyten, Monozyten, Lymphyzten, hämatopoetische Vorläuferzellen	Laminin, Fibronektin
VLA-6	$\alpha 6 \beta 1$	Thrombozyten, Lymphozyten, Epithelzellen	Laminin

Tabelle 1.2: Struktur, vorwiegendes Vorkommen und wichtigste Liganden von Very Late Antigen1 bis 6 [28] [8, Kap. 6.2]

1.6 Das Matrixprotein Fibronektin

Bei Fibronektin handelt es sich um ein dimeres Glykoprotein der extrazellulären Matrix. Es kommt an vielen Stellen des menschlichen Körpers in variabler Form vor; zum Beispiel als lösliches Fibronektin im Plasma oder als großer Komplex im Knochenmark. Dieses Protein fungiert nicht nur als Stabilisator der extrazellulären Matrix sondern vor allem auch als Vermittler von Zell-Matrix-Bindungen.

In den letzten Jahren konnte die Rolle von Fibronektin als Wegweiser ("Guide") für migrierende Zellen bewiesen werden [29–31]. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Funktion von Fibronektin im menschlichen Knochenmark als möglicher Einflussfaktor für die Hämatopoese, da deren Zellen ein besonders ausgeprägtes Migrationspotenzial besitzen. Mittlerweile ist bekannt, dass Blutvorläuferzellen aller Reihen über die Transmembranrezeptoren VLA-4 und VLA-5 an verschiedene Bindungsstellen – vor allem die Heparinseitenkette und die zentrale RGD-Sequenz – von Fibronektin anknüpfen können [29, 30, 32–41]. Auch konnte in Adhäsions- und Migrationsassays bewiesen werden, dass diese Bindung das Verhalten der Vorläuferzellen in vielen Aspekten beeinflusst, dazu gehören Zellzyklus, Genexpression und eine Induktion von Migrationsprozessen bei den Vorläuferzellen des Blutes [29, 30]. Weiterhin wurde des Öfteren diskutiert, ob die hämatopoetischen Zellen im Zuge der Ausreifung ihre Bindungsfähigkeit an Fibronektin einbüßen, oder diese zumindest bezüglich der Bindungsspezifität und -intensität mit den verschiedenen Stadien der Zellreifung variiert [8,29,30,32,42]. Auf diese Weise wird erklärt, weshalb Fibronektin ganz unterschiedliche Einflüsse auf Zellen besitzen kann, abhängig von ihrer Lage und ihrem Reifungsstadium. Dies erklärt auch, dass Forschungsergebnisse bezüglich des Einflusses der Bindung von Fibronektin auf die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen (bei leicht veränderten Versuchsbedingungen) häufig widersprüchlich sind. Sowohl eine starke Förderung von Wachstum und Ausreifung von Zellkulturen hämatopoetischer Vorläuferzellen, als auch deren jeweilige Hemmung wurden beschrieben. Tabelle 1.3 stellt vereinfacht einige Forschungsergebnisse dar.

Tabelle 1.3:	Veröffentlichte	Studienergebnissen	zur	Co-Kultivierung	hämatopoetischer	Vorläufer-
	zellen auf hum	anem Fibronektin				

Verfasser	Zelltyp	Zellquelle	Co-Kultur auf humanem Fibronektin
Sugahara et al. [32]	Leukämiezellen	human,	Proliferations-
		peripheres Blut	hemmung
Jiang et al. [43]	$CD34^+$	human,	deutlich weniger
		peripheres Blut	proliferierende
			Zellen
Hurley et al. [40]	$CD34^+$	human,	Proliferations-
		Knochenmark	hemmung
Yokota et al. [44]	$CD34^+$	human,	stärkere
		Nabelschnurblut	Proliferation
			6 1

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Verfasser	Zelltyp	Zellquelle	Co-Kultur auf humanem Fibronektin
Davis et al. [45]	T-Zellen	human, peripheres Blut	Proliferations- förderung von T-Zellen
Shimizu et al. [46]	T-Zellen	human, peripheres Blut	Proliferations- förderung von T-Zellen
Weinstein et al. [47]	Erythroide Vorläuferzellen	human, Knochenmark	stärkere Proliferation von CFU-E und BFU-E
Yanai et al. [48]	Erythroide Vorläuferzellen	murin, fötale Leber	geringere Ausreifung bei Blockade von VLA-4
Tsai et al. [49]	Erythroide Vorläuferzellen	human, Knochenmark	starke Zellbindung an Fibronektin
Patel und Lodish [50]	Erythro- leukämiezellen	murin, fötale Leber	Entkernung nach Vorbehandlung mit DMSO

1.7 Das Matrixprotein Laminin

Laminin ist ein aus drei Ketten bestehendes Glykoprotein (Heterotrimer) und nach Kollagen IV der zweithäufigste Bestandteil der Basallamina [22,51]. Die unterschiedliche Zusammensetzung der drei Ketten aus weiteren Untergruppen führt zu einer großen Vielfalt verschiedener Lamininisoformen. In Säugetieren ist Laminin über Entactin und Perlecan mit Kollagen IV verbunden und besitzt ebenso wie die anderen Glykoproteine der extrazellulären Matrix Integrinbindungsstellen. Aus diesem Grund kann auch Laminin verschiedene Zelltypen zum Beispiel hämatopoetische Vorläuferzellen über Integrine mit der extrazellulären Matrix verbinden. Der Einfluss der Bindung auf die weitere Entwicklung dieser Zellen ist jedoch weitgehend ungeklärt [51]. Bekannt ist, dass vor allem Laminin I eine entscheidende Rolle für die Entwicklung früher Blutgefäße und Epithelien von Säugetierembryonen spielt [52]. Einige Studien belegen zudem, dass adulte hämatopoetische Vorläuferzellen, unter anderem die der Erythropoese, an Laminin binden können [29, 53]. Auch wurde bereits ein die Proliferation und Migration hämatopoetischer Zellen unterstützender Effekt verschiedener Lamininisoformen beobachtet [53, 54]. In anderen Studien konnten jedoch keinerlei Adhäsion hämatopoetischer Vorläufer an das Glykoprotein und ebenso wenig ein Einfluss auf die Kultivierbarkeit festgestellt werden [32, 50, 55].

1.8 Das Matrixprotein Kollagen

Bei Kollagen handelt es sich um das Eiweiß, welches den höchsten Gewichtsanteil (30%) an der extrazellulären Matrix besitzt. Über fünfundzwanzig Isoformen sind derzeit bekannt und sie kommen in etlichen Formen in den unterschiedlichen Gewebetypen von Säugetieren vor. Im Knochenmark herrscht Kollagen Typ I vor, gefolgt von Typ III welches ebenfalls von den lokalen Stromazellen gebildet wird. Das bei der Erstellung dieser Arbeit verwendete Kollagen IV bildet zusammen mit Laminin und einigen Proteoglykanen die Basallaminae der Gefäße aus und ist aus diesem Grund ubiquitär im menschlichen Körper anzutreffen [51]. Wie beim Fibronektin liegen auch in Bezug auf den Einfluss von Kollagen auf Blutvorläuferzellen unterschiedliche Ergebnisse vor: Während die Bindung von Vorläuferzellen an Kollagen I über Integrine als bewiesen gilt [23, 56], widersprechen sich die Untersuchungsergebnisse bezüglich Kollagen IV. Es wurde festgestellt, dass 15%der erythrozytären Vorläuferzellen einer Kultur an Kollagen IV binden können [29]. Diese Beobachtung wurde jedoch von Studien anderer Arbeitsgruppen nicht bestätigt [34,55,56]. In weiteren Studien banden hämatopoetische Stammzellen aus der fetalen Leber an Kollagen IV über VLA-2 und wurden durch diese Bindung in ihrer Proliferation gehemmt. Diese Beobachtung konnte jedoch an hämatopoetischen Stammzellen aus adultem Knochenmark nicht gemacht werden [41]. Entsprechend wenig ist bekannt über den Einfluss einer möglichen Bindung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen an Kollagen. Eine Inhibition der Zellproliferation durch die oben beschriebene Bindung wurde diskutiert jedoch bisher nicht zweifelsfrei nachgewiesen [32].

1.9 Mesenchymale Stammzellen

In den letzten Jahren wurde der Erforschung der mesenchymalen Stammzellen (MSC) des erwachsenen Menschen viel Aufmerksamkeit gewidmet. Verschiedenen Arbeitsgruppen gelang es, diesen Zelltyp aus vielen unterschiedlichen menschlichen Geweben zu isolieren und zahlreiche Studien wurden unternommen, um mehr über die physiologischen Funktionen und Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen in Erfahrung zu bringen. Voneinander unabhängige Studien konnten nachweisen, dass mesenchymale Stammzellen nicht nur Teil der hämatopoetischen Nische im Knochenmark sind, sondern auch der Ursprung der meisten anderen Knochenmarkstromazellen im Bereich der hämatopoetischen Nischen. In vitro und in vivo Experimente erbrachten den Beweis, dass mesenchymale Stammzellen im Knochenmark zu Chondrozyten, Adipozyten, Myofibroblasten, Osteozyten, Osteoblasten und Endothelzellen ausdifferenzieren können [4, 57–59]. Nach der aktuellen Definition für mesenchymale Stammzellen, herausgegeben von der International Society for Cellular Therapy müssen Zellen folgende Mindestkriterien erfüllen um als mesenchymale Stammzellen zu gelten:

- 1. Plastikadhärenz unter Standardkulturbedingungen
- Expression von CD73, CD90 und CD105 nicht jedoch von CD45, CD34, CD14, CD79 (siehe auch Tabelle 1.4 auf der nächsten Seite)

3. Differenzierungsfähigkeit zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten in vitro [60]

Tabelle 1.4:	Oberflächenar	ntigene auf r	nesenchymalen	Stammzellen	und ihre Bedeutung [9]

Oberflachenantigen	exprimierende Zellen	Bedeutung/Funktion
CD73	B- und T-Zell-Subtypen,	Ekto-5'-Nukleotidase,
	Epithelzellen, mesenchymale	Aufnahme von Nukleosiden,
	Stammzellen	T-Zell-Co-Stimulation
CD90	Thymozyten, Nervenzellen,	Stamm- und
	mesenchymale Stammzellen	Nervenzelldifferenzierung
CD105	Endothelzellen, aktivierte	Zellantwort auf TGF- $\beta 1$
	Makrophagen,	
	mesenchymale Stammzellen	

Diese Definition reicht zwar aus, um mesenchymale Stammzellen zu charakterisieren, doch enthält sie nicht alle Aspekte die über mesenchymale Stammzellen bekannt sind. Neben den oben genannten Oberflächenmarkern ist auch von CD13, CD29, CD44, CD54, CD105, CD106, CD140b, CD166 und HLA-A, B und C bekannt, dass sie von mesenchymalen Stammzellen exprimiert werden [61–63]. Des Weiteren sind mesenchymale Stammzellen an der Bildung der extrazellulären Matrix – speziell Fibronektin und Kollagen – beteiligt und produzieren und sezernieren verschiedene Zytokine [64–66](siehe auch Kap.1.10).

Durch ihre zentrale Position im Knochenmark und ihre Funktion als Ursprung vieler verschiedener Zelltypen sind mesenchymale Stammzellen jedoch nicht nur für die Gewebsentstehung und -regeneration von Interesse, sondern stellen auch einen Bestandteil der hämatopoetischen Nischen im Knochenmark dar. Dass die Stromazellen des Knochenmarks die Hämatopoese allgemein beeinflussen, konnte schon 1982 von Dexter et al. [67] bewiesen und seither von zahlreichen Arbeitsgruppen reproduziert werden [14, 64, 68–72]. Welche Zelltypen des Knochenmarkstroma im Einzelnen jedoch welchen Einfluss auf die verschiedenen Zelllinien der Hämatopoese ausüben, ist noch weitgehend unbekannt. Eine Ausnahme bilden die beiden als Hauptbestandteile der hämatopoetischen Nischen bekannten Zelltypen: Osteoblasten und Endothelzellen. Beide gehen in der Regel aus mesenchymalen Stammzellen hervor und sind dafür bekannt, die Hämatopoese maßgeblich beeinflussen zu können. So weiß man, dass es sich bei hämatopoetischen Vorläuferzellen im Bereich des Endosts um besonders frühe Vorläuferzellen handelt und dass Osteoblasten sowohl über Zelladhäsion als auch über die Produktion von die Hämatopoese beeinflussenden Zytokinen dazu in der Lage sind, hämatopoetische Vorläuferzellen in einem Ruhezustand (G_0 im Zellzyklus) zu bewahren und ihr Überleben zu fördern [19,73–76]. Als entscheidend für diese Wirkungen gelten gemeinhin die Bindung von hämatopoetischen Vorläuferzellen an die Osteoblasten sowie die von den Osteoblasten sezernierten Wachstumsfaktoren Angiopoetin 1 [77,78] und Osteopontin [79,80]. Im Bereich der vaskulären Nische dagegen stellen Endothelzellen den vorherrschenden Zelltyp dar, ihnen wird eine Beteiligung an Migrationsprozessen und terminaler Differenzierung von Blutvorläuferzellen zugesprochen [18, 20, 81].

Aus diesen Beobachtungen ergibt sich die Frage, ob die Vorläuferzellen des Knochenmarkstromas – die mesenchymalen Stammzellen – auch Regulationsfunktionen für die Hämatopoese wahrnehmen können. In Studien wurde bereits der allgemein die Hämatopoese fördernde Effekt von mesenchymalen Stammzellen beschrieben und zum Teil in vivo verifiziert [61, 64, 66, 82]. Auch konnten hämatopoetische Wachstumsfaktoren detektiert werden, die von mesenchymalen Stammzellen produziert und sezerniert werden (siehe Tab.1.6). Weiterhin belegen Studien, dass mesenchymale Stammzellen ohne Zugabe rekombinanter Zytokine in vitro die Megakaryopoese begünstigen [83] und diese in vivo zusammen mit der Granulopoese in Bezug auf Proliferation und Differenzierung fördern können [61].

Zudem wurde bereits eine Hemmung der T-Zell-Aktivierung durch mesenchymale Stammzellen beschrieben [84]. Der Einfluss von mesenchymalen Stammzellen auf die Entwicklung der Erythropoese ist jedoch weitgehend unbekannt. Aus diesem Grunde bietet ein selektives in vitro Erythropoesesystem optimale Voraussetzungen für die Erforschung der Bedeutung mesenchymaler Stammzellen und der von ihnen sezernierten Wachstumsfaktoren für die Erythropoese.

1.10 Zytokine und Wachstumsfaktoren der Hämatopoese

Schon seit längerer Zeit werden nicht nur die Auswirkungen von verschiedenen Kulturbedingungen auf die Hämatopoese erforscht, sondern es gilt auch zu ergründen, über welche molekularen Mechanismen diese Einflüsse zustande kommen. Im Zuge dieser Untersuchungen wurden zahlreiche Zytokine beschrieben, die durch Hemmung und Förderung verschiedener hämatopoetischer Zelllinien in Bezug auf Vitalität, Proliferation und Differenzierung Einfluss auf hämatopoetische Stammzellen nehmen können. Dabei handelt es sich sowohl um autokrine als auch parakrine Mechanismen. Das heißt, dass einerseits hämatopoetische Vorläuferzellen sich durch die Sekretion von Zytokinen selbst und gegenseitig beeinflussen, und dass andererseits auch nicht-hämatopoetische Zelltypen dafür bekannt sind, hämatopoetische Wachstumsfaktoren zu produzieren. Die wichtigsten Wachstumsfaktoren sind ebenso wie die sie produzierenden Zellen in den folgenden Tabellen dargestellt.

Botenstoff	CD34+	CFU-GM	CFU-E	CFU-Meg
EPO	-	-	-	-
G-CSF	-	-	-	-
GM-CSF	+	-	-	+
IGF-1	+	-	+	+
IL-1 β	+	-	-	-
IL-6	-	-	-	-
M-CSF	-	+	+	+
SDF-1	-	-	-	-

Tabelle 1.5: Exprimierung von mRNA für hämatopoetische Zytokine durch verschiedene Zellfraktionen der Hämatopoese, ermittelt durch RT-PCR [85,86]

Tabelle 1.6: Exprimierung von mRNA für hämatopoetische Zytokine durch mesenchymale Stammzellen, ermittelt durch RT-PCR, zusammengefasst in [87,88]

Botenstoff	Mesenchymale Stammzellen
G-CSF	$+^{2}$
GM-CSF	$+^{2}$
IL-1 β	$+^{2}$
IL-6	+
M-CSF	+

 $^{^2 \}rm Nur$ nach Induktion durch IL-1 α

1.11 Ziel der Arbeit

Wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, unterliegen die Blutzellen des Menschen einem ständigen Erneuerungsprozess. Die Bildung neuer Blutzellen findet beim erwachsenen Menschen im Knochenmark statt, wo sich die hämatopoetischen Stammzellen – umgeben von Stromazellen und extrazellulärer Matrix – vervielfältigen und zu reifen Blutzellen ausdifferenzieren. Das Milieu, in dem die hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark liegen, wird als hämatopoetische Nische bezeichnet. Wie zuvor beschrieben, haben die Bestandteile dieser Nische wesentliche Einflüsse auf Proliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen.

Ein entscheidender Teil der Hämatopoese ist die Ausreifung von Stammzellen zu roten Blutkörperchen – die sogenannte Erythropoese. Während es schon einige wissenschaftliche Erkenntnisse bezüglich des Einflusses von Knochenmarkstroma auf die Hämatopoese allgemein gibt, ist der Einfluss der "Nischen" speziell auf die Erythropoese noch weitgehend unterforscht. Die beiden zentralen Fragestellungen dieser Arbeit sind demnach:

- 1. Haben die extrazellulären Bestandteile der hämatopoetischen Nische im menschlichen Knochenmark einen Einfluss auf Proliferation, Vitalität und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen entlang der roten Reihe?
- 2. Haben die mesenchymalen Stammzellen als Teil der sich in der hämatopoetischen Nische des menschlichen Knochenmarks befindlichen Stromazellen – einen Einfluss auf Proliferation, Vitalität und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen entlang der roten Reihe?

Die zweite Fragestellung wurde im Zuge der Arbeit erweitert um den Aspekt, durch welche Botenstoffe dieser Einfluss vermittelt sein könnte, beziehungsweise welche Botenstoffe bei einer Co-Kultivierung hämatopoetischer und mesenchymaler Stammzellen von Letzteren produziert werden.

Um diese Fragen zu beantworten, wurde ein 2-Phasen-Zellkulturmodell gewählt, bei welchem in vitro aus humanen hämatopoetischen Stammzellen adulter Stammzellspender reife Erythrozyten gezüchtet werden. Auf der Grundlage dieses Modells wurde ein Co-Kultivierungssystem entwickelt – zum einen mit Proteinen der extrazellulären Matrix, zum anderen mit mesenchymalen Stammzellen – an welchem Proliferation, Vitalität und Differenzierung der hämato- beziehungsweise erythropoetischen Zellen über sechzehn Tage untersucht werden konnten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Sofern nicht anders erwähnt, wurden die in medizinischen Laboratorien üblichen Geräte und Verbrauchsmaterialien verwendet. Die meisten Produktbezeichnungen sowie Firmennamen, die in dieser Arbeit genannt werden, sind in der Regel gleichzeitig eingetragene Warenzeichen und unterliegen als solche den gesetzlichen Bestimmungen. Die Doktorandin versichert, dass alle im folgenden Kapitel beschriebenen Methoden sowie die Statistik und die Auswertung der Ergebnisse von ihr nach Anleitung selbstständig erlernt und durchgeführt wurden.

2.1.1 Patienten und Proben

Tabelle 2.1: Autologe Stammzellspender, die der Verwendung überschüssiger Stammzellen zu Forschungszwecken zugestimmt haben. Die Zellen wurden für die Kultur der Erythropoese auf Proteinen der extrazellulären Matrix (n=5) und auf mesenchymalen Stammzellen (n=3) verwendet.

Alter (Jahre)	Geschlecht	Diagnose
42	weiblich	Non-Hodgkin Lymphom
32	weiblich	Non-Hodgkin Lymphom
43	weiblich	Plasmozytom
55	männlich	Plasmozytom
42	männlich	Burkitt-Lymphom
20	männlich	Seminom
41	weiblich	allogene Spenderin
67	weiblich	Plasmozytom

Das Material der mesenchymalen Stammzellen wurde anonym zur Verfügung gestellt. Die Voten der Ethikkommission sind im Anhang dargestellt.

2.1.2 Geräte

Geräte	Hersteller
Gamma-Bestrahler BioBeam 8000	STS Steuerungstechnik und
	Strahlenschutz, Braunschweig
Canon DS 6031 Kamera	Canon GmbH, Krefeld
Durchflusszytometer Cytomics FC 500	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Lichtmikroskop Diaplan	Leica, Wetzlar
Vollblut Zellzähler Coulter Ac·T 8	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Athos Reader	Biotest, Dreieich

Tabelle 2.2: Geräte

2.1.3 Laborbedarf

Tabelle 2.3: Laborbedarf

Artikelname	Hersteller	Besonderheiten
6-Loch-Platte	Corning, New York	Verwendet für die
		Co-Kultur auf MSC
Transwell-clear	Corning, New York	0,4 μm Porendurchmesser
Membraneinsatz		
6-Loch-Platte für Matrix	Nunc, Wiesbaden	
Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden	

2.1.4 Zellkulturmedien und Reagenzien

Tabelle	2.4:	Zellkulturmedien	und	Reagenzien

Reagenz	Hersteller
3,3-Dimethoxybenzidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aqua ad injectabile	Braun, Heidelberg
Bio Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Biotin Label-based Antibody Array Kit	RayBio, Norcross
Bovines Serum Albumin BSA Frakt.V	Sigma-Aldrich, Steinheim
CD34 PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD34 Progenitor Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD36 FITC	Beckman Coulter, Krefeld
CD45 FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD45 PC7	Beckman Coulter, Krefeld
	Fortsetzung auf der nächsten Seite

Reagenz	Hersteller
CD71 PE	Becton Dickinson, Heidelberg
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diff-Quick Färbeset	Dade Behring, Marburg
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Cambrex BioScience, Vervius
(DMEM)	
Dulbeccos Phosphate Buffered Medium (PBS)	PAA-Laboratories, Pasching
ECM-Gel, murin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Erythropoetin (EPO)	Ortho-Biotech, Neuss
Erythropoetin (EPO)	R&D-Systems, Wiesbaden
Östradiol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA-Laboratories, Pasching
Fibronektin, human	Cell Cystems, St. Katharinen
G-CSF Quantikine ELISA Kit, human	R&DSystems, Wiesbaden
Giemsa-Färbelösung	Merck KGaA, Darmstadt
Glycophorin A PE-Cy5	Becton Dickinson, Heidelberg
IL-6 Quantikine ELISA Kit, human	R&DSystems, Wiesbaden
Insulin, human	Sigma-Aldrich, Steinheim
Insulin-Like-Growth-Factor Long R3	Sigma-Aldrich, München
(IGF)	
Kollagen IV	Sigma-Aldrich, Steinheimn
Laminin, human	Sigma-Aldrich, Steinheim
Laminin I, murin	R&DSystems, Wiesbaden
Lymphozytense parations medium	PAA-Laboratories, Pasching
MEM Alpha Medium	Invitrogen GIBCO, Carlsbad
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg
Microbeads	Beckman Coulter, Krefeld
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin-Streptomycin-Amphotericin-B	Cambrex Bioscience, Vervius
Stem Cell Factor (SCF)	Strathmann Biotec, Hannover
Transferrin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau, 0,4 $\%$	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin	Cambrex Bioscience, Vervius
Wasserstoff peroxyd 30 Gew $\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.5 Software

Programm	Hersteller
Coulter Counter Software	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Durchflusszytometer Software	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
SPSS Version 15.0	SPSS Inc., Chicago
Office Excel 2007	Microsoft Corporation, Redmond
Remote Capture Version 2.7.1.15	Canon GmbH, Krefeld
MiKTeX-pdfTeX 2.6.2693 (1.40.3)	D. E. Knuth, Han The Thanh
(MiKTeX 2.6)	

Tabelle 2.5: Software

2.2 Methoden

2.2.1 Patienten und Proben

Nach Etablierung der Co-Kultivierungen erfolgten fünf Erythropoesemodelle auf extrazellulärer Matrix sowie drei Modelle auf mesenchymalen Stammzellen die in die statistischen Berechnungen eingingen¹. Die Ergebnisse wurden mit dem Wilcoxon-Rangsummen-Test auf ihre statistische Signifikanz hin überprüft. Das Konfidenzintervall betrug 95%. Die beschriebenen Versuche wurden von der Ethikkommission unter den Bearbeitungsnummern 04-088 (hämatopoetische Stammzellen) am 16.08.04 und 04-183 (mesenchymale Stammzellen) am 21.02.05 genehmigt. Die Genehmigungsschreiben sowie wichtige Arbeitsprotokolle finden sich im Anhang.

2.2.2 Isolierung und Kultur der hämatopoetischen Stammzellen

Die hämatopoetischen Stammzellen wurden von Patienten durch Stammzellapherese gewonnen. Die Mobilisierung der Stammzellen erfolgte durch eine vorherige Stimulationstherapie mit G-CSF (Neupogen).

Aus der Zellprobe wurden die mononukleären Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll) separiert. Daraufhin wurden durch magnetische Positivselektion an der MACS-Säule (Gebrauch gemäß Anleitung) die CD34-positiven Zellen von allen anderen Zellen isoliert. Mit Hilfe einer Messung am Durchflusszytometer wurde die Reinheit der Probe bestimmt.

¹Aufgrund einer Kontamination von 5 Erythropoesemodellen mit säurefesten Stäbchen über einen Zeitraum von 12 Monaten konnten die anderen Erythropoesemodelle auf mesenchymalen Stammzellen nicht in die statistische Auswertung einbezogen werden. Bilder und ein Exkurs zur Verunreinigung finden sich zur Anschauung im Anhang (siehe Kapitel A.1 auf Seite 87).

Die CD34-positiven Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und im Brutschrank in feuchter Atmosphäre bei 37 °C und einer Konzentration von 20% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid inkubiert. Je nach Versuchsreihe waren diese 6-Loch-Platten mit einer Matrix aus ECM-Proteinen oder mesenchymalen Stammzellen beschichtet. Bei jedem Kulturmodell wurde parallel eine Kultur auf unbeschichteten Platten als Standardkultur (Negativkontrolle) mitgeführt (siehe 2.1 auf der nächsten Seite).

Die initiale Zellzahl betrug $0, 5 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Pro Vertiefung wurden 2 ml Kulturmedium verwendet. Das Kulturmodell zur humanen Erythropoese bestand aus einer Proliferationsund einer Differenzierungsphase mit einer jeweiligen Dauer von acht Tagen. Die Einzelheiten der Zusammensetzung des Kulturmediums sind Tabelle 2.6 zu entnehmen.

	Zutat	Konzentration
	Medium DMEM	
Basismedium	FCS	15%
	BSA	1%
	Transferrin	0,128 mg/ml
	Aqua-Bidest	15%
	Penicillin-Streptomycin	$100~\mathrm{U/ml}~1\%$
	Natriumbicarbonat	1,9 mmol/l
	Mercaptoethanol	0,1 mmol/l
	Basismedium	
Proliferationsmedium Phase 1: Tag 0-8	SCF	100 ng/ml
	EPO ²	1 U/ml
	Long R3 IGF-1	40 ng/ml
	Dexamethason	10^{-6} mol/l
	Östradiol	10^{-6} mol/l
Differenzierungsmedium	Basismedium	
Phase 2: Tag 9-16	Insulin	$1 \ \mu \mathrm{g/ml}$
	EPO	1 U/ml

Tabelle 2.6: Zusammensetzung der Kulturmedien der Erythropoese

An den Tagen 4, 8, 12 und 16 der Kultur (Untersuchungstage) wurden die Zellen durch vorsichtiges Pipettieren vom Boden der 6-Loch-Platten gelöst, gewaschen (Zentrifuge: 1200 Umdrehungen, 10 Minuten, 20 °C) und gezählt (Neubauer Zählkammer unter Verwendung von Trypanblau und Kulturflüssigkeit in einem Verhältnis von 1:1). An jedem dieser Untersuchungstage wurden Zytospins angefertigt und durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Abschließend wurden die Zellen in frischem Kulturmedium (Zusammensetzung je nach Phase) auf neuen Platten wieder ausgesät. Dabei wurde die Anfangskonzentration von $0, 5 \cdot 10^6$ vitalen Zellen/ml und 2 ml pro Vertiefung wiederhergestellt. An Tag 6 der Kultur wurde in jede Vertiefung 1 ml Proliferationsmedium hinzugegeben, um die Proliferation der Zellen mit Hilfe unverbrauchter Zytokine weiter zu stimulieren.

 $^{^2\}rm Epo$ von der Firma Ortho-Biotech wurde für die Kultur der Erythropoese auf MSC verwendet, Epo der Firma R&D Systems für die Zellkultur auf Proteinen der ECM



Abbildung 2.1: Lichtmikrokopische Fotografie der verschiedenen Erythropoesekulturbedingungen bei einer Saatkonzentration von je $1 \cdot 10^6$ CD34-positiven Zellen pro Vertiefung (Vergrößerung: 400fach): (a)Kultur ohne Matrix (Standardkultur),(b)Co-Kultur auf mesenchymalen Stammzellen, (c) Co-Kultur auf mesenchymalen Stammzellen getrennt durch eine semipermeable Membran (Transwell, Porengröße 0,4 μ m).

2.2.3 Untersuchungen

Bestimmung von Zellproliferation und Vitalität

Mit Hilfe der Neubauer Zählkammer wurde an jedem Untersuchungstag die Zahl der in den Proben vorhandenen Zellen bestimmt. Der Proliferationsfaktor im Vergleich zum vorherigen Untersuchungstag wurde berechnet (Rechnung: Gesamtzahl vitaler Zellen / Gesamtzahl vitaler Zellen am vorherigen Untersuchungstag). Zu diesem Zweck wurden die nach 1:1 Verdünnung des Mediums mit Trypanblau ungefärbten Zellen in den jeweils sechzehn Kästchen der 4 Quadranten der Neubauer-Kammer ausgezählt. Unter Berücksichtigung der Kammerkonstante (0,4) und der Verdünnung der Flüssigkultur durch den Farbstoff konnte die Zellzahl pro Mikroliter ermittelt werden. Die so ermittelten Proliferationsfaktoren der einzelnen Untersuchungstage wurden zur Berechnung der kumulativen Gesamtproliferation multipliziert. Mit Hilfe des Quotienten aus durch Trypanblau gefärbten und nicht gefärbten Zellen wurde der Anteil vitaler Zellen an der Gesamtzellzahl berechnet (Vitalität: vital/nicht vital \cdot 100).

Durchflusszytometrische Analysen

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen, die sich in einer flüssigen Lösung befinden, durch eine Kapillare angesaugt und passieren einzeln einen Laser, der einem Sensormodul gegenüber liegt. Das Licht des Lasers wird an den Zellwänden gebeugt und kann so vom Sensormodul zur Ermittlung der Zellgröße verwendet werden (forward scatter). Durch die Granula und Organellen in der Zelle wird das Licht gebrochen und dient damit als Messparameter für die Dichte der Zelle (sideward scatter). Des Weiteren besteht die Möglichkeit, Zellen, die bestimmte Oberflächenmarker exprimieren, mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper zu kennzeichnen. Diese emittieren, sobald der Laserstrahl auf sie trifft, Fluoreszenzimpulse in einem festgelegten Farbspektrum, welche wiederum vom Sensormodul erfasst und differenziert werden können. Diese verschiedenen Messparameter erlauben eine diagnostische Aufschlüsselung eines Zellgemisches in einzelne Fraktionen. Durch die Zugabe von markierten Mikrobeads in einer bekannten Konzentration kann die Konzentration einzelner Zellsubpopulationen errechnet werden. Für die Reinheitsmessung am Tag der Aufreinigung wurden jeweils 10 μ l der fluoreszenzmarkierten Antikörper CD34 und CD45 (Becton Dickinson, Heidelberg) in dafür vorgesehene Messröhrchen vorgelegt. Nach Zugabe von 100 μ l Zellsuspension wurde die Mischung 15 Minuten bei $4 \,^{\circ}$ C inkubiert. Daraufhin wurden 100 μ l Mikrobeads sowie 0,5 ml FACS-Puffer (PBS + 0.5% BSA) hinzupipettiert. Am Durchflusszytometer wurde mit einem vorgefertigten Protokoll eine Reinheitsmessung durchgeführt.

Zum Nachweis co-exprimierter Antigene, die typisch sind für die humane Erythropoese, wurde ein 4-Farb-Messprotokoll verwendet. Zu diesem Zweck wurden an jedem Kulturtag die in Tabelle 2.7 auf der nächsten Seite dargestellten Antikörper in dafür vorgesehene Messröhrchen vorgelegt.

Antikörper	Farbstoff/Markierung	Konzentration
CD71	PE	10 µl
CD45	PE-Cy7	$10 \ \mu l$
CD36	FITC	$10 \ \mu l$
Glykophorin A	PE-Cy5	$5 \ \mu l$

Tabelle 2.7: Fluoreszenzmarkierte Antikörper für die Durchflusszytometrie

Nach Zugabe von jeweils 100 μ l der entsprechenden Zellsuspension wurde die Mischung 15 Minuten bei 4 °C inkubiert, daraufhin mit FACS-Puffer gewaschen und nach Abnehmen des Überstandes in 0,5 ml FACS-Puffer resuspendiert.

Im Anschluss wurden mit Hilfe eines am Durchflusszytometer vorbereiteten 4-Farb-Protokolls Messungen durchgeführt. Der prozentuale Anteil der Zellen, die ein oder mehrere der gemessenen Antigene exprimierten, konnte den Messprotokollen entnommen und statistisch ausgewertet werden. Exemplarische Messprotokolle finden sich im Anhang (siehe A.4 auf Seite 105).

Anfertigung und Auswertung von Zytospins

Zur Anfertigung von Zytospins wurden in Eppendorfgefäßen an den Untersuchungstagen 8, 12 und 16 je 50000 Zellen in Eppendorfgefäße hineinpipettiert, welche dann mit 50 μ l BSA versetzt und mit PBS auf ein Gesamtvolumen von je 250 μ l aufgefüllt wurden. Diese Suspension wurde in dafür vorgesehene Cytofunnel pipettiert und bei 4000 Umdrehungen/Minute 10 Minuten lang zentrifugiert. Die Objektträger wurden mindestens 16 Stunden lang an der Luft getrocknet. Daraufhin wurde von jeder Zellprobe je ein Objektträger nach Pappenheim und je ein Objektträger mit einer neutralen Benzidinfärbung gefärbt.

Die nach Pappenheim gefärbten Zytospins wurden zur Unterscheidung zwischen Zellen der myeloischen und der erythrozytären Reihe herangezogen (Auszählung von mindestens 200 Zellen unter dem Mikroskop). Mit Hilfe der benzidingefärbten Zytospins – einer Färbemethode, bei der Hämoglobin in Zellen selektiv orange markiert wird – wurden die Fraktionen der Zellen der roten Reihe in verschiedenen Entwicklungsstadien ermittelt (Auszählung von mindestens 200 Zellen der roten Reihe unter dem Mikroskop). Abschließend wurden die prozentualen Anteile der einzelnen Zellfraktionen an den Gesamtzellen berechnet. Die Zytospins wurden von einer zweiten Person unabhängig von den ersten Werten ausgezählt, um die erhobenen Daten zu validieren. Im Falle einer Abweichung von mehr als 10% in einzelnen Fraktionen war eine Wiederholung der Zählungen vorgesehen.

2.2.4 Erstellen von Matrizes aus Matrixproteinen

Das Erstellen von Matrizes aus Matrix
proteinen erfolgte in Anlehnung an die Beschreibungen von Matsubara et al. [89]. Die Matrix
proteine Kollagen und Laminin wurden nach Anleitung in einer Endkonzentration von 30 µg/ml als Suspension in NaHCO3 aufbereitet³. Fibronektin wurde in derselben Konzentration in Aqua bidest gelöst, das ECM-Gel wurde mit DMEM high-glucose auf eine Konzentration von 200 mg/ml eingestellt. Einen Tag vor Beginn der geplanten Co-Kultivierung wurden je 2 ml der genannten Lösungen pro
Vertiefung auf 6-Loch-Platten überführt, welche daraufhin 16 – 24 Stunden bei 4 °C gelagert wurden. Der Überstand wurde abpipettiert. Die Proteine blieben als fest haftende Matrix auf der Oberfläche der Vertiefungen zurück und konnten für die Co-Kultivierung verwendet werden.

2.2.5 Gewinnung und Kultivierung mesenchymaler Stammzellen

Mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll) wurde aus Knochenmarkaspirat⁴ die Fraktion der mononukleären Zellen gewonnen. Nach einer Zellzahlbestimmung am Vollblutzellzähler (Coulter Counter) wurden die Zellen mit Kulturmedium (α -Mem + 20% FCS + 1% L-Glutamin + 1% Penstrep-Streptomycin-Amphotericin B) versetzt und in Zellkulturflaschen mit einer Dichte von ungefähr $1 \cdot 10^7$ mononukleären Zellen pro Flasche in 40 ml Medium bei 37 °C inkubiert. Durch regelmäßigen Mediumwechsel und Passagieren (dreiminütige Inkubation mit Trypsin-EDTA-Gemisch bei 37 °C, Neutralisation mit PBS+20% FCS, "Losklopfen" der Zellen, Waschschritt in der Zentrifuge, neue Aussaat) kam es innerhalb von durchschnittlich 14 Tagen zu einer selektiven Anreicherung und Proliferation von plastikadhärenten mesenchymalen Stamm- und Stromazellen in den Kulturflaschen. Die Zellen der zweiten Passage wurden mit Hilfe durchflusszytometrischer Messungen charakterisiert und für die Erstellung von Matrizes verwendet. Die zur durchflusszytometrischen Phänotypisierung der Zellen verwendeten monoklonalen Antikörpern waren gerichtet gegen CD13, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105, CD106, CD140b, CD166 und HLA-A, B und C. Von allen erwähnten Oberflächenmarkern ist bekannt, dass sie auf mesenchymalen Stammzellen exprimiert werden (siehe 1.9 auf Seite 20). Um eine signifikante Kontamination mit hämatopoetischen Stammzellen auszuschließen, wurden Messungen mit gegen CD34 und CD45 gerichteten monoklonalen Antikörpern mitgeführt.

³Besonderheiten: Kollagen Versuch 1: murin, Versuch 2 bis 5: Wechsel auf human; Laminin: Versuch 1: Sigma-Aldrich, Versuch 2-5: Wechsel auf R&D-Systems

 $^{^4{\}rm Freundlicherweise}$ zur Verfügung gestellt von der Klinik für Orthopädie, UKSH

2.2.6 Erstellen von Matrizes aus mesenchymalen Stammzellen

Die mesenchymalen Stammzellen wurden mit Trypsin-EDTA vom Boden der Kulturflaschen gelöst und in einer Konzentration von $2 \cdot 10^5$ Zellen/Vertiefung in 6-Loch-Platten überführt. Dort wurden sie mit jeweils 2 ml Kulturmedium versetzt, so dass es zu einem den Boden der Vertiefungen bedeckenden Wachstum der Zellen kam. Bei einer mikroskopisch abschätzbaren Konfluenz der mesenchymalen Stammzellen in den 6-Loch-Platten von mindestens 95% wurden die Platten mit 30 Gray bestrahlt um weiteres Wachstum der Zellen zu verhindern (siehe Abb. 2.2). Die so behandelten Matrizes wurden nach einem weiteren Mediumwechsel bis maximal 14 Tage nach der Bestrahlung für Co-Kultivierungsversuche verwendet.



Abbildung 2.2: Konfluente Matrix aus mesenchymalen Stammzellen in einer Plastikschale. Einige Zellen produzieren Bestandteile der extrazellulären Matrix (Färbung: Giemsa, Vergrößerung: 400fach).

2.2.7 Anfertigung des Proteinarrays

Zur semiquantitativen Detektion der von den mesenchymalen Stammzellen und hämatopoetischen Zellen der Kultur möglicherweise sezernierten Wachstumsfaktoren wurde mit Kulturüberständen ein Proteinarray mit über 500 Zielzytokinen durchgeführt. Bei den verwendeten Proben handelte es sich um zellfreie Kulturüberstände, die an Kulturtag 12, also nach 96 Stunden Inkubation (zuletzt umgesetzt an Tag 8), gewonnen wurden. Diese wurden am genannten Kulturtag in sterilen Tubes bei -80 °C tiefgefroren und am Tag der Verarbeitung wieder aufgetaut. Die Proteinarrays wurden mit Hilfe des Biotin Label-based Antibody Array Kit entsprechend Firmenanleitung angefertigt und die mit markiertem Protein beladenen Glaschips wurden zur maschinellen Auswertung an die Firma Ray Bio geschickt. Durch Auswertung der ermittelten Werte abzüglich Hintergrundfluoreszenz und nach einem Abgleich mit der "Internal Control" wurden Kandidatenzytokine identifiziert, die zur weiteren Quantifizierung mittels Elisa geeignet und weiterführend erschienen.

2.2.8 Durchführung von Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)

Zur quantitativen Detektion der "Schlüsselzytokine" G-CSF und IL-6 wurden ELISAs durchgeführt. Als Proben dienten Überstände der Untersuchungstage 8, 12 und 16 aus allen drei Modellen (nur Erythropoese, Erythropoese in direkter Co-Kultur mit mesenchymalen Stammzellen, Erythropoese in indirekter Co-Kultur mit mesenchymalen Stammzellen [Transwell]) von drei unabhängigen Versuchen (27 Proben). Zusätzlich wurde aus mesenchymalen Stammzellen eines Knochenmarkspenders nach oben beschriebenem Prinzip ein "Stromalaver" hergestellt und bestrahlt. Dieser wurde für vier Tage mit Proliferationsmedium und ein weiterer Stromalayer für vier Tage mit Differenzierungsmedium der Erythropoese jedoch ohne Zugabe von hämatopoetischen Zellen inkubiert. Die so als Kontrolle gewonnenen Überstände wurden ebenfalls für ELISAs verwendet. Die Proben wurden nach dem Prinzip von Sandwich-Assays gemäß Firmenanweisung vorbereitet und mit Hilfe des "Athos Readers" ausgelesen: Bei den gemessenen Ergebnissen handelt es sich jeweils um den arithmetischen Mittelwert aus zwei Messungen, korrigiert durch ebenfalls mit Doppelbestimmungen angelegten Standardkurven (siehe A.7 auf Seite 120). Die untere Nachweisgrenze für IL-6 lag bei 0,7 pg/ml, die untere Nachweisgrenze für G-CSF bei 20 pg/ml.
3 Ergebnisse

3.1 Kultur der Erythropoese auf Proteinen der extrazellulären Matrix

Nach einem Etablierungsversuch wurden fünf Erythropoesemodelle auf Proteinen der extrazellulären Matrix durchgeführt. Die Kultur auf 6-Loch-Platten ohne Matrix wurde für die statistischen Berechnungen als Vergleichsgröße herangezogen und stets unter exakt identischen Bedingungen kultiviert wie die zu untersuchenden Proben. Die Reinheit CD34-positiver Zellen nach magnetischer Separation (MACS-Säule) lag im Mittel bei 98% $\pm 2\%$. Das Hauptaugenmerk lag bei den durchgeführten Experimenten auf Messungen der Proliferation, Vitalität und Differenzierung der CD34-positiven Stammzellen.

Die aufgereinigten Stammzellen wurden in fünf verschiedene Ansätze gegeben:

- Erythropoese ohne Matrix (Standardkultur)
- Erythropoese auf ECM-Gel
- Erythropoese auf Kollagen IV
- Erythropoese auf Laminin
- Erythropoese auf Fibronektin

Es gelang, unter allen fünf Kulturbedingungen mit Hilfe des etablierten Erythropoesemodells größere Mengen proliferierender und Hämoglobin produzierender Zellen zu züchten. Die Standardkultur ohne Verwendung von Matrixproteinen diente jeweils als Kontrolle.

Die durchflusszytometrische Analyse wies in allen Modellen einen für die Erythropoese typischen Verlauf ohne signifikante Unterschiede auf. Abbildung 3.1 auf der nächsten Seite stellt die jeweiligen Kinetiken der Antigenexpression für die verschiedenen Phasen des Erythropoesekultursystems dar.

In allen Experimenten bestanden die Kulturen an Tag 16 vornehmlich aus Retikulozyten und Normoblasten, während die Kontamination mit nicht-erythrozytären Blutzellen am Ende der Kultur im Standardkulturmodell bei $4,7\% \pm 3,3\%$ lag. Diese aus der Auswertung der Zytospins gewonnenen morphologischen Erkenntnisse wurden durch die Analyse der durchflusszytometrischen Messungen bestätigt. Der Anteil vitaler Zellen in den Kulturen an Tag 16 betrug in der Standardkultur im Mittel $86,2\% \pm 6,0\%$. Die Messergebnisse der Kulturmodelle über verschiedenen Matrixproteinen wurden jeweils mit den ermittelten Werten der Standardkultur verglichen und werden im Folgenden detailliert besprochen.



Abbildung 3.1



Abbildung 3.1: Kinetik der Antigenexpression auf den hämatopoetischen Zellen während der verschiedenen Kulturtage, ermittelt mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Am ersten Kulturtag sind die aufgereinigten Stammzellen positiv für CD34 (98% \pm 2%). Weiterhin exprimieren die meisten Zellen der Kultur CD45, einen allgemeinen Marker für hämatopoetische Zellen. Unter Kulturbedingungen der Erythropoese verlieren sie diesen jedoch mit der Zeit und exprimieren nacheinander die für die Erythropoese typischen Oberflächenantigene CD36, CD71 und Glykophorin A. Am Ende der Kulturdauer von 16 Tagen sind – unabhängig von der verwendeten Matrix – durchschnittlich 94,2% \pm 1,4% der Zellen positiv für Glykophorin A. Signifikante Unterschiede beim Vergleich der verschiedenen Matrixkulturbedingungen mit der Standardkultur konnten nicht gefunden werden.

3.1.1 Zellvitalität

Verglichen mit der Standardkultur erbrachte eine Kulturvierung der Erythropoese auf den Proteinmatrizes Fibronektin, Laminin und Kollagen keine Unterschiede bezüglich des Anteiles vitaler Zellen an der Kultur. Allen gemein ist die Beobachtung, dass die Vitalität am ersten Untersuchungstag (Tag 4) im Vergleich zur Vitalität bei Aussaat der Zellen (Tag 0) "einknickt" (85% – 92%). Dies ist Ausdruck der Anpassung der hämatopoetischen Stammzellen an die in vitro Kulturbedingungen.

Die Kultivierung des Erythropoesemodells auf ECM-Gel (einem Gemisch verschiedener ECM-Proteine) führte dagegen zu einem stets höheren Anteil vitaler Zellen in der Kultur als in der Standardkultur (siehe Abb. 3.2). Die Zellvitalität erwies sich am letzten Untersuchungstag als signifikant höher als in der Standardkultur (p=0,04; Vitalität an Tag 16: Standardkultur: $86,2\% \pm 6,0\%$; ECM: $91,6\% \pm 8,1\%$). Unter den hier verwendeten Kulturbedingungen konnte demnach auf dem Gemisch extrazellulärer Matrixproteine eine Verbesserung der Kulturbedingungen der humanen Erythropoese in Hinblick auf die Vitalität erreicht werden.



Abbildung 3.2: Vergleich des Anteils vitaler Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen. Bei der Kultivierung der Erythropoese auf ECM-Gel findet sich an Tag 16 ein signifikant höherer Anteil vitaler Zellen als in der Standardkultur.



Abbildung 3.3: Vergleich der kumulativen Proliferation der Erythropoese unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Die erythropoetischen Vorläuferzellen proliferieren auf einer Fibronektinmatrix in signifikant geringerem Ausmaß als in der Standardkultur (p=0,04). Die auf ECM-Gel kultivierten Zellen proliferieren zwar stärker als die Zellen der Standardkultur, jedoch erreichen die erhobenen Daten hier keine Signifikanz (p=0,14).

3.1.2 Zellproliferation

Bei allen durchgeführten Kulturmodellen konnte an sämtlichen Untersuchungstagen eine Proliferation der Zellen und damit ein Anstieg der absoluten Zellzahl nachgewiesen werden. In der ersten Phase des Kulturmodells (Tag 0-8) wurden die CD34-positiven Stammzellen unter Zugabe von Zytokinen kultiviert, wobei nur eine gering erhöhte Zellteilungsrate messbar war. Mit Wechsel auf die Differenzierungsphase der Erythropoese an Tag 12 jedoch konnte regelmäßig eine im Durchschnitt insgesamt 50-fache Expansion der Zellen verzeichnet werden. In allen fünf Versuchen konnte beobachtet werden, dass die auf einer Fibronektinmatrix kultivierten Zellen in deutlich geringerem Ausmaß proliferierten als die Zellen in der Standardkultur (p=0,04; Gesamtproliferation: Standardkultur: 51,3 \pm 76,5; Fibronektin: 31,2 \pm 46,3; siehe Abbildung 3.3).

Lichtmikroskopisch wurde beobachtet, dass bei der Kultur auf Fibronektin an Tag 4 und Tag 8 eine verstärkte Haftung der Zellen am Boden der Vertiefungen vorlag, welche ein intensiveres Nachspülen nötig machte, um alle Zellen abzulösen. An den späteren Kulturtagen wurde diese Adhärenz nicht mehr beobachtet. Gleichzeitig näherten sich die einzelnen Proliferationsfaktoren der Zellen auf Fibronektin an den späteren Kulturtagen zunehmend denen der Standardkultur an (siehe Abb. 3.4 auf der nächsten Seite).



Abbildung 3.4: Darstellung der relativen Zellproliferation auf Fibronektin im Vergleich zur Standardkultur. Die erythropoetischen Zellen proliferieren auf einer Fibronektinmatrix signifikant weniger als ohne Matrix. Jedoch wird der Proliferationsunterschied im Verlauf der Kultur geringer.

Obwohl sich die Proliferationsfaktoren der auf ECM-Gel, Laminin und Kollagen kultivierten Zellen von denen der Standardkultur unterschieden, wie aus der Abbildung 3.3 auf der vorherigen Seite hervorgeht, und die Zellen auf dem ECM-Gel besser wuchsen als in der Standardkultur, erreichten diese Messwerte zu keinem Zeitpunkt eine statistische Signifikanz (Standardkultur verglichen mit ECM-Gel: p=0,14; mit Kollagen: p=0,50; mit Laminin: p=0,89).

3.1.3 Zelldifferenzierung

Aus den morphologischen Zellzählungen der gefärbten Zytospins ist ersichtlich, dass es im Verlauf der ersten 8 Kulturtage stets zu einer beginnenden Ausreifung der Stammzellen entlang der Erythropoese kam. In der zweiten Phase (ab Tag 8) kam es in allen fünf Kulturmodellen zu einer deutlich stärkeren Differenzierung der Zellen bis hin zu einem hohen Anteil an Normoblasten und reifen Erythrozyten an Tag 16 der Kultur. Abbildung 3.5 macht deutlich, dass der Gesamtanteil erythrozytärer Zellen an den Kulturzellen bei $95,3\% \pm 3,3\%$ lag. Wie aus Abbildung 3.6 auf Seite 44 ersichtlich, betrug der Anteil entkernter Zellen am letzten Kulturtag in der Standardkultur im Mittel $40,4\% \pm 11,1\%$.

Verglichen mit der Standardkultur war in der Fibronektinkultur am letzten Kulturtag ein wesentlich höherer Anteil von Zellen, die nicht der roten Reihe angehörten, erkennbar. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurden nicht-erythrozytäre Zellen durch den CD45-Nachweis durchflusszytometrisch erfasst. Auch hier konnte an Tag 16 der Kultur auf Fibronektin im Mittel eine signifikant höhere Zahl CD 45 exprimierender Zellen



Abbildung 3.5: Anteil der nicht-erythrozytären Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen an Tag 16 der Kultur, ermittelt durch morphologische Beurteilung gefärbter Zytospins (n=5).

nachgewiesen werden als in der Standardkultur (p=0,04; Standardkultur: 7,6% \pm 6,5% Fibronektin: 12,4% \pm 10,7%; siehe Abbildung 3.5 und 3.1 auf Seite 38).

In den Zellkulturen auf einer Lamininmatrix war ab Tag 8 im Vergleich zu allen anderen Kulturen ein leichter Entwicklungsvorsprung der Zellen in Richtung der roten Reihe zu beobachten. Dieser Vorsprung baute sich bis Tag 16, verglichen mit der Standardkultur, schließlich zu einer Signifikanz in Bezug auf den Anteil kernloser roter Blutzellen (Retikulozyten) im Verhältnis zu früheren Stadien der Erythropoese aus (p=0,04; Retikulozyten an Tag 16: Standardkultur: $40,4\% \pm 11,1\%$, Laminin: $47,4\% \pm 8,8\%$; siehe Abbildung 3.6 und 3.7 auf der nächsten Seite).

Im Laufe der sechzehntägigen Erythropoesekultur auf Kollagen und ECM-Gel kam es ebenfalls in allen Versuchen zu einer zunehmenden Ausreifung der Stammzellen in Richtung der Erythropoese. Am letzten Untersuchungstag lag der Anteil der kernlosen Retikulozyten im Zellkulturmodell auf Kollagen im Mittel bei 42,6% \pm 5,5%, im Kulturmodell auf ECM-Gel bei 43,8% \pm 6,8%. Die prozentualen Anteile der Zellfraktionen verschiedener Reifungsstadien unterschieden sich jedoch zu keiner Zeit signifikant von den in der Standardkultur gemessenen Werten.



Stammzelle / Proerythroblast Polychromatischer Erythroblast Normoblast Retikulotyt

Abbildung 3.6: Auswertung der Zytospins (neutrale Benzidinfärbung) der verschiedenen Kulturmodelle an den Tagen 8, 12 und 16: Während die Kulturen an Tag 8 in allen Modellen vornehmlich aus erythropoetischen Vorläuferzellen bestehen, entwickeln sie sich bis zu Kulturtag 16 entlang der Erythropoese zu reiferen, Hämoglobin produzierende Blutzellen (Normoblasten/Retikulozyten). Bei der auf einer Lamininmatrix kultivierten Erythropoese findet sich an Tag 16 ein signifikant höherer Anteil entkernter Zellen als in der Standardkultur (n=5).



Abbildung 3.7: Detailausschnitt aus Abb. 3.6 Vergleich des Anteils der Retikulozyten an Kulturtag 16 bei einer Kultur der Erythropoese auf Laminin und ohne Matrix (Standardkultur).

3.2 Co-Kultur der Erythropoese auf mesenchymalen Stammzellen

Zur Etablierung eines möglichen Co-Kultivierungssystems der Erythropoese auf mesenchymalen Stammzellen fanden zwei Vorversuche statt, in denen die optimalen Materialien und Arbeitsmethoden ermittelt wurden. Durch ausdauerndes, jedoch vorsichtiges Spülen der 6-Loch-Platten an den verschiedenen Untersuchungstagen gelang es, die Zellen der Erythropoese von den Vertiefungen zu lösen und die Matrix aus mesenchymalen Stammzellen – auch Stromalayer genannt – bei diesem Vorgang auf den Platten zu belassen. Zum Erfolgsnachweis wurden einige Platten mit Giemsa oder nach der neutralen Benzidinfärbemethode gegengefärbt (siehe Abb.3.8)



Abbildung 3.8: Mikroskopische Fotografien der eingefärbten 6-Loch-Platten an Tag 12 der Erythropoesekultur nach dem Abspülen der hämatopoetischen Zellen: Die Matrix aus mesenchymalen Stammzellen bleibt intakt auf den Platten haften, während nur ein sehr geringer Teil der hämatopoetischen Zellen in den Vertiefungen verbleibt. (a) Neutrale Benzidinfärbung, Vergrößerung: 100fach (b) Neutrale Benzidinfärbung, Vergrößerung: 400fach

Im Anschluss wurden insgesamt drei Modelle nach dem oben beschriebenen Kultursystem durchgeführt und mit Hilfe deskriptiver Parameter ausgewertet. Die Ergebnisse sind nachfolgend zusammengefasst. Weitere fünf Modelle mussten während des Verlaufes der Kultur aufgrund wiederholter Kontamination mit säurefesten Stäbchen verworfen werden. Für eines dieser Modelle liegt der PCR-Nachweis für das Vorhandensein vitaler Mykobakterien (Mykobakterium avium) vor. Für zwei weitere wurden säurefeste Stäbchen in der Ziehl-Neehlsen-Färbung nachgewiesen. Bei allen anderen verworfenen Kulturreihen gab der lichtmikroskopische Befund massenhaft abgestorbener Zellen und auf den Zytospins sichtbarer, mit der Pappenheimfärbung nicht anfärbbarer Stäbchen Anlass, von einer erneuten Kontamination auszugehen und die Probe zu verwerfen; für nähere Details siehe A.1 auf Seite 87).



3.2.1 Zellvitalität

Abbildung 3.9: Vergleich des Anteils vitaler Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen. Bei der Kultivierung der Erythropoese auf mesenchymalen Stammzellen, ob getrennt durch eine semipermeable Membran (Transwell) oder in direktem Zell-Zell-Kontakt, findet sich an allen Kulturtagen ein höherer Anteil vitaler Zellen als in der Standardkultur.

In allen Versuchen zeigte sich, dass die Vitalität der hämatopoetischen Zellen in einer Co-Kultur mit mesenchymalen Stammzellen deutlich verbessert werden konnte (siehe 3.9). Dabei war es nicht erheblich, ob die beiden Zellreihen durch eine semipermeable Membran (Transwell) voneinander getrennt waren oder nicht. Auch kam es unter Co-Kulturbedinungen nicht zu dem aus der Standardkultur bekannten "Einbruch" der Zellvitalität an Tag 4.

3.2.2 Zellproliferation

Während in der ersten Phase des Erythropoesemodells (Tag 1 bis 8) stets ein deutlich stärkeres Zellwachstum der hämatopoetischen Zellen erkennbar war, wenn diese über mesenchymalen Stammzellen kultiviert wurden, war dieser Proliferationsvorteil im Vergleich zur Standardkultur am letzten Kulturtag nicht mehr nachweisbar (siehe 3.10).



Abbildung 3.10: Vergleich einzelner Proliferationsfaktoren der Erythropoese unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Die hämatopoetischen Vorläuferzellen proliferieren in den ersten acht Kulturtagen auf einer Matrix aus mesenchymalen Stammzellen deutlich besser als in der Standardkultur. An den späteren Untersuchungstagen hingegen sinkt die Proliferation der Zellen über einer Matrix unter die Werte der Standardkultur ab.

Dahingegen lag die kumulative Zellproliferation und damit die theoretische Gesamtzellzahl nach sechzehn Kulturtagen jedoch in den Kulturmodellen mit mesenchymalen Stammzellen in allen Experimenten deutlich über der der Standardkultur (Gesamtproliferation: ohne Matrix: $21,0 \pm 14,2$; MSC direkt: $104,5 \pm 44,8$; MSC und Transwell: $62,3 \pm 34,9$; siehe Abb. 3.11 auf der nächsten Seite). Aufgrund der geringen Anzahl auswertbarer Versuche konnten keine Tests zur Ermittlung einer statistischen Signifikanz durchgeführt werden.



Abbildung 3.11: Vergleich der kumulativen Proliferation von Zellen der Erythropoese unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Die hämatopoetischen Vorläuferzellen proliferieren in direktem Kontakt zu mesenchymalen Stammzellen ebenso wie getrennt von diesen durch eine semipermeable Membran (Transwell) deutlich stärker als in der Standardkultur.

3.2.3 Zelldifferenzierung

Während in der Standardkultur die aus vorherigen Versuchen bezüglich der erythropoetischen Zelldifferenzierung bekannten Ergebnisse reproduziert werden konnten (die Kulturen bestanden stets zu mehr als 95% aus hämatopoetischen Stammzellen und Zellen der roten Reihe), zeigten sich in der direkten und indirekten Co-Kultur verschiedene Abweichungen: Es kam zu einer deutlichen Veränderung des Zellbildes auf den Zytospins. Die Zellen entwickelten sich vom Beginn der Kultur an sehr stark in die Richtung der Granulopoese anstelle der Erythropoese, so dass an Kulturtag 16 kaum noch erythrozytäre Zellen auf den Zytospins zu detektieren waren (granulozytäre Vorläufer, Tag 16: ohne Matrix: $1\% \pm 1\%$; MSC direkt: $74\% \pm 23\%$; MSC und Transwell: $61\% \pm 27\%$; siehe 3.12 auf der nächsten Seite).

Zur Veranschaulichung dienen die Abbildungen 3.13 und 3.14. Hier werden mikroskopische Fotografien des Kulturverlaufs der Standardkultur dem Kulturverlauf einer direkten Co-Kultur mit mesenchymalen Stammzellen gegenübergestellt. Während die Zellen der Standardkultur zu Erythrozyten ausreifen, zeigt sich in der Co-Kultivierung ein granulozytendominiertes Bild.



Abbildung 3.12: Auswertung der Zytospins (neutrale Benzidinfärbung und Pappenheimfärbung) der verschiedenen Kulturmodelle an den Tagen 8, 12 und 16: Schon ab Kulturtag 8 findet sich bei den Co-Kultivierungen eine deutliche Tendenz einer Zelldifferenzierung entlang der Myelopoese, welche auch an den späteren Kulturtagen weiter stattfindet. Zudem kommt es zu einer verzögerten Entwicklung der Zellen der roten Reihe, so dass auch an den späten Kulturtagen noch Zellen in frühen Vorläuferstadien vorkommen. Entgegen dieser Beobachtung findet bei der Standardkultur wie in allen vorangegangenen Versuchen eine selektive Ausreifung der Vorläuferzellen entlang der Erythropoese statt.

Abbildung 3.13a: Tag 8, ohne Matrix; Vergrößerung 1000fach, Pappenheimfärbung: Die Kultur besteht größtenteils aus frühen Vorläuferzellen der Hämatopoese sowie aus einigen polychromatischen Erythroblasten.



Abbildung 3.13b: Tag 12, ohne Matrix; Vergrößerung 1000fach, neutrale Benzidinfärbung: Verschiedene Vorläuferstadien der Erythropoese dominieren das Bild, es sind nur sehr wenige andere Zellen auffindbar.



Abbildung 3.13c: Tag 16, ohne Matrix; Vergrößerung 1000fach, neutrale Benzidinfärbung: Die meisten Zellen tragen reichlich Hämoglobin, viele haben ihren Kern bereits ausgestoßen. Nur vereinzelt kommen andere Zellen vor.









Abbildung 3.14a: Tag 8, direkte Co-Kultur; Vergrößerung 1000fach, Pappenheimfärbung: Neben vielen frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen finden sich schon zunehmend Zellen der Myelopoese.



Abbildung 3.14b: Tag 12, direkte Co-Kultur; Vergrößerung 1000fach, neutrale Benzidinfärbung: Der Anteil granulopoetischer Zellen hat weiter zugenommen. Es finden sich weiterhin eher frühe Vorläuferstadien der Erythropoese.



Abbildung 3.14c: Tag 16, direkte Co-Kultur; Vergrößerung 1000fach, neutrale Benzidinfärbung: Zwischen großen Gruppen aus schwer voneinander abgrenzbaren zum Teil segmentkernigen granulozytären Zellen finden sich vereinzelt orange eingefärbte Zellen der roten Reihe.



Abbildung 3.14d: Tag 16, direkte Co-Kultur; Vergrößerung 100fach, neutrale Benzidinfärbung: Übersichtsaufnahme des letzten Kulturtages.

Das in den vorangegangenen Abbildungen veranschaulichte Ergebnis wird in ähnlicher Deutlichkeit durch die durchflusszytometrischen Analysen bestätigt. Auch hier zeigt sich, dass es nach einer anfänglichen Zunahme der Glykophorin A Expression bis Tag 8 auf ungefähr 50% der Gesamtzellen wieder zu einem Abfall dieser zu Gunsten der Exprimierung von CD45 kommt. Auch der Anstieg der Erythropoesemarker CD36 und des Transferrinrezeptors CD71 bleibt in den Co-Kultivierungen stets unter dem der Standardkultur zurück.

Eine weitere Auffälligkeit ergibt sich bei der ausschließlichen Betrachtung von Zellen der roten Reihe auf den Zytospins: In den Co-Kultivierungsmodellen findet zwar Erythropoese statt, doch kommt es zu einer Verzögerung der terminalen Differenzierung, so dass an



Abbildung 3.15



Abbildung 3.15: Kinetik der Antigenexpression auf den Zelloberflächen der hämatopoetischen Zellen. Während es bei der Standardkultur zu einem für die Erythropoese typischen Antigenexpressionsprofil während der 16 Kulturtage kommt, ist bei den Co-Kultivierungen eine deutlich schwächere Expression der für die Erythropoese typischen Antigene (Glykophorin A) zu beobachten. Stattdessen kommt es zu einem weniger starken Abfall des allgemeinen Markers für hämatopoetische Zellen (CD45).

Kulturtag 16 der Anteil entkernter Retikulozyten an allen Zellen der roten Reihe in den Modellen deutlich geringer ausfällt als in der Standardkultur (Retikulozyten an Tag 16 in der Standardkultur: $48,7\% \pm 5,5\%$; direkte Co-Kultur MSC: $32,7\% \pm 10,6\%$; Transwell und MSC: $22,3\% \pm 3,8\%$). Stattdessen bestehen die Zellkulturen, die über mesenchymalen Stammzellen gezüchtet wurden zu einem deutlich größeren Anteil aus frühen Vorläuferzellen der Erythropoese (siehe Abb. 3.16 auf der nächsten Seite).



Abbildung 3.16: Auswertung der Zytospins (neutrale Benzidinfärbung): Obwohl in allen Kulturmodellen Erythropoese stattfindet, wird diese unter Co-Kulturbedingungen deutlich verzögert, so dass an Kulturtag 16 mehr frühe Vorläufer der Erythropoese und weniger Retikulozyten vorhanden sind als in der Standardkultur.

3.2.4 Produktion von Zytokinen durch mesenchymale Stammzellen

Mit Hilfe eines Proteinarrays fand eine semiquantitative "ScreeningAnalyse von insgesamt 507 Zytokinen aus Zellkulturüberständen von Untersuchungstag 12 des dritten Co-Kultur-Experimentes auf mesenchymalen Stammzellen mit den drei unterschiedlichen Untersuchungsbedingungen statt (ohne Matrix, direkte Co-Kultur, Transwell). Nach eingehender Analyse der Ergebnisse in Zusammenschau mit den in der Kultur gemessenen Parametern und der Literatur wurden zwei "Schlüsselproteine" für eine quantitative Detektion mit Hilfe von ELISAs ausgewählt.

Nachweis von IL-6 mittels ELISA

In den aus der Standardkultur (Erythropoese ohne Matrix) gewonnenen Überständen konnte zu keinem Zeitpunkt Interleukin-6 in einer sicher als positiv zu deutenden Konzentration nachgewiesen werden (untere Nachweisgrenze des Assays: 0,7 pg/ml. Im Gegensatz dazu fanden sich in allen Kulturüberständen, die mit mesenchymalen Stammzellen inkubiert worden waren, Interleukin-6 Konzentrationen, die über dem maximal messbaren Wert von 3120 pg/ml lagen (=Overflow, siehe Tabelle 3.1). Aus diesem Grund wurden die Messungen der Proben aus Versuch 2 und 3 in mit einer Verdünnung von 1:1000 wiederholt.

Tabelle 3.1: Quantitativer Nachweis von IL-6 (pg/ml) aus Kulturüberständen, maximale Standardkonzentration (obere Nachweisgrenze): 3120 pg/ml, untere Nachweisgrenze: 0,7 pg/ml. Für die Versuche 2, 3 und die ausschließlich über mesenchymalen Stammzellen kultivierten Mediumproben wurden Verdünnungsreihen angesetzt und gemessen, da die Zytokinkonzentrationen bei den unverdünnten Proben in den Modellen der direkten und indirekten Co-Kultur mit mesenchymalen Stammzellen außerhalb des für den ELISA messbaren Bereiches lagen.

		Tag 8	Tag 12	Tag 16
Versuch 1	Standardkultur	0 pg/ml	61 pg/ml	$2 \mathrm{~pg/ml}$
	EP + MSC	overflow	overflow	overflow
	EP + Transwell	overflow	overflow	overflow
Versuch 2	Standardkultur	24 pg/ml	1 pg/ml	5 pg/ml
	EP + MSC	$167200 \mathrm{~pg/ml}$	168200 pg/ml	$135300 \mathrm{~pg/ml}$
	EP + Transwell	405220 pg/ml	15550 pg/ml	$47620~\mathrm{pg/ml}$
Versuch 3	Standardkultur	11 pg/ml	8 pg/ml	0 pg/ml
	EP + MSC	142000 pg/ml	$112400~\rm pg/ml$	$8029 \mathrm{~pg/ml}$
	EP + Transwell	42950 pg/ml	10160 pg/ml	4390 pg/ml
MSC + ProlMedium			$91970 \mathrm{~pg/ml}$	
MSC + DiffMedium			55130 pg/ml	

Nachweis von G-CSF mittels ELISA

Die gemessenen Konzentrationen von G-CSF in den Kulturüberständen sind in Tabelle 3.2 aufgetragen. Die höchsten Konzentrationen finden sich mit einer Ausnahme stets im Modell der direkten Co-Kultur. Im Längsschnitt der Versuche gesehen ist zudem stets die G-CSF Konzentration an Tag 8 der Kultur deutlich höher als an den anderen Untersuchungstagen. Diese Beobachtung legt eine Veränderung des von den mesenchymalen Stammzellen sezernierten Zytokinprofils nach Beginn der Differenzierungsphase des Kulturmodells nahe. Des weiteren zeigen sich auch bei den Kontrollwerten (Erythropoesemedium über mesenchymalen Stammzellen ohne co-kultivierte Zellen) hohe G-CSF Konzentrationen in den Überständen.

Tabelle 3.2: Quantitativer Nachweis von G-CSF (pg/ml) aus Kulturüberständen, maximale Standardkonzentration (obere Nachweisgrenze): 2500 pg/ml, untere Nachweisgrenze 20 pg/ml

		Tag 8	Tag 12	Tag 16
Versuch 1	Standardkultur	14 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml
	EP + MSC	2024 pg/ml	1001 pg/ml	562 pg/ml
	EP + Transwell	$1073 \mathrm{~pg/ml}$	546 pg/ml	135 pg/ml
Versuch 2	Standardkultur	0 pg/ml	0 pg/ml	0 pg/ml
	EP + MSC	overflow	696 pg/ml	861 pg/ml
	EP + Transwell	1748 pg/ml	407 pg/ml	496 pg/ml
Versuch 3	Standardkultur	0 pg/ml	26 pg/ml	0 pg/ml
	EP + MSC	3192 pg/ml	217 pg/ml	202 pg/ml
	EP + Transwell	1394 pg/ml	345 pg/ml	106 pg/ml
MSC + ProlMedium			601 pg/ml	
MSC + DiffMedium		$267 \mathrm{~pg/ml}$		

4 Diskussion

4.1 Kultur der Erythropoese auf Proteinen der extrazellulären Matrix

Im adulten Organismus findet die menschliche Hämatopoese – und die Erythropoese als ein Teil von ihr – im Knochenmark in sogenannten hämatopoetischen Nischen statt, welche von verschiedenen Stromazellen und extrazellulärer Matrix gebildet werden. Die im vorangegangenen Ergebnisteil dieser Arbeit dargestellten Messresultate weisen nach, dass verschiedene Matrixproteine deutliche Einflüsse auf die Erythropoese in vitro ausüben können. Im Folgenden sollen diese Resultate in Diskussion mit bisher erschienenen Veröffentlichungen genauer analysiert werden.

4.1.1 Kultur der Erythropoese auf Fibronektin

In der Literatur ist bereits hinlänglich beschrieben, dass hämatopoetische Stammzellen sowie frühe Zellen der Erythropoese an die verschiedenen Seitenketten von Fibronektin binden können [29, 30, 32–40]. Ob diese Bindungen jedoch Einflüsse auf die Ausreifung und Proliferation erythropoetischer Vorläuferzellen ausüben, ist noch nicht abschließend geklärt (siehe Tabelle 1.3 auf Seite 18). Unsere vorliegenden Ergebnisse weisen eindeutig darauf hin, dass die Bindung von Stammzellen an Fibronektin ihre Proliferation in vitro mindern kann – ein Ergebnis, welches bereits in Experimenten anderer Arbeitsgruppen beobachtet werden konnte [32, 43]. Aus vorangegangenen Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen ist zudem bekannt, dass die Bindung hämatopoetischer Vorläuferzellen an die RGD-Sequenz des Matrix-Glykoproteins Osteopontin ihre Proliferation hemmen kann [2]. Die in unseren Versuchen gewonnenen Messresultate zeigen bei einer Co-Kultivierung hämatopoetischer Stammzellen mit dem Matrixprotein Fibronektin ebenfalls eine Hemmung der Proliferation. Bekanntermaßen besitzt auch dieses Protein eine RGD-Sequenz, an welche Zellen der Hämatopoese binden können (siehe Kapitel 1.6 auf Seite 18). Demnach ist es gut denkbar, dass die beobachtete Proliferationshemmung über eine Bindung der Stamm- und Vorläuferzellen an die RGD-Sequenz des Fibronektin vermittelt wird. Um diese Theorie zu belegen, wären jedoch ergänzende Untersuchungen zur funktionellen Adhäsivität zwischen Zellen und Matrixprotein notwendig.

Bei genauer Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse fällt auf, dass die Inhibition der Zellproliferation im Laufe der sechzehn Kulturtage nachlässt. Der inhibierende Einfluss, den Fibronektin auf die Zellen ausübt, wird demnach im Zuge ihrer fortschreitenden Ausreifung deutlich geringer. Dies legt den Schluss nahe, dass die Bindungsfähigkeit der erythropoetischen Vorläuferzellen an Fibronektin im Zuge ihrer Differenzierung nachlässt. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen einiger zurückliegender Studien anderer Arbeitsgruppen [30, 40, 42, 90].

Während die Zellen der roten Reihe offenbar im Zuge ihrer Ausreifung ihre Bindungsfähigkeit an Fibronektin einbüßen, ist dieses Phänomen nicht für die Zellen der weißen Reihe beschrieben. Vielmehr wurde schon mehrfach berichtet, dass es zu einer Förderung der T-Zell-Proliferation durch ihre Bindung an Fibronektin kommt [45,46]. Auch in unseren Experimenten wurde die Proliferation von Zellen der weißen Reihe – im Gegensatz zu den erythropoetischen Vorläuferzellen – durch Co-Kultivierung mit Fibronektin nicht gehemmt. Stattdessen kam es zu einem prozentualen Anstieg des Anteils weißer Blutzellen an den Gesamtzellen in der Kultur, so dass die Kontamination der Erythropoesekultur mit Vorläuferzellen der weißen Reihe am letzten Kulturtag einen signifikant höheren Wert erreichte als in der Standardkultur.

4.1.2 Kultur der Erythropoese auf Laminin

Wie im Ergebnisteil der Arbeit beschrieben, zeigte die Erythropoesekultur auf einer Lamininmatrix an Tag sechzehn einen signifikanten Reifungsvorsprung gegenüber der Erythropoesekultur ohne Matrix. Des Weiteren lag der Anteil von Retikulozyten an den Gesamtzellen der Kultur am letzten Untersuchungstag höher als in den auf anderen Matrizes durchgeführten Kulturversuchen. Obwohl die Bindung von Stammzellen an Laminin bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde [29,53], liegen bisher keine vergleichbaren Studienergebnisse bezüglich eines Einflusses von Laminin auf die terminale Ausreifung erythropoetischer Zellen vor. Aus diesem Grund können unsere Ergebnisse nicht weiterführend mit vorausgegangenen Studien verglichen werden. Bei eingehender Betrachtung der Ergebnisse und der Bedeutung, welche Laminin im menschlichen Körper zukommt (Kapitel 1.7), erscheint jedoch die Unterstützung der Zellreifung durch Laminin physiologisch sinnvoll: Da Laminin ein wichtiger Bestandteil der Basallamina von Gefäßen ist, kommt es im Knochenmark vor allem im Bereich der vaskulären Nische vor – dem Ort, an dem in vivo die reiferen Stadien der Blutvorläuferzellen lokalisiert sind (siehe 1.4). Eine Bindung dieser Zellen an Laminin und ein Einfluss des Proteins auf ihre terminale Differenzierung einschließlich Entkernung und ihre Ausschleusung aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf sind demnach gut vorstellbar.

4.1.3 Kultur der Erythropoese auf Kollagen

Obwohl Kollagen ein ubiquitär vorkommender Bestandteil des menschlichen Körpers ist, existieren nur wenige Hinweise auf biologische Funktionen dieses Proteins neben seiner Rolle als formgebender Bestandteil vieler Gewebe. Unsere Studienergebnisse konnten ebenfalls keine Bedeutung von Kollagen für die menschliche Erythropoese aufzeigen. Kollagen ist demnach als formgebendes Element vieler Gewebe ein essenzieller Bestandteil des menschlichen Körpers, nimmt jedoch nach aktuellem Wissensstand keinen Einfluss auf die Proliferation und Ausreifung hämatopoetischer Stammzellen.

4.1.4 Kultur der Erythropoese auf ECM-Gel

Während die Untersuchung der Funktionen einzelner bereits identifizierter Komponenten der extrazellulären Matrix laufend fortschreitet, bleibt es schwierig, die Bedeutung der extrazellulären Matrix als Ganzes detailliert zu erfassen und zu deuten. Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Zellen wie Endothel- und Epithelzellen ihren eigenen programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten, wenn sie von ihrem Untergrund gelöst werden [91–93]. Unsere Versuche zeigen, dass die Erythropoesekultur auf ECM-Gel über einen signifikant höheren Anteil vitaler Zellen verfügt als die Standardkultur. Diese Beobachtung liefert einen weiteren Hinweis für den essenziellen Wert der extrazellulären Matrix für das optimale Überleben von Stammzellen und Vorläuferzellen im Knochenmark. Welche Bestandteile der extrazellulären Matrix jedoch für den hier gemessenen Effekt verantwortlich sind, sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

Bei eingehender Analyse unserer Ergebnisse fällt weiterhin auf, dass die bei der Erythropoese auf Laminin und Fibronektin gewonnenen Beobachtungen einer beschleunigten terminalen Differenzierung beziehungsweise einer Proliferationshemmung der hämatopoetischen Vorläuferzellen bei dem Kulturmodell auf ECM-Gel nicht reproduziert werden konnten, obwohl Laminin und Fibronektin mutmaßlich als Bestandteile im Gel vorhanden sind. Dieser Umstand ist möglicherweise auf die geringe Konzentration dieser Glykoproteine im Gel, verglichen mit Kollagen als Hauptbestandteil extrazellulärer Matrix, zurückzuführen.

4.2 Co-Kultur der Erythropoese auf mesenchymalen Stammzellen

Die im Ergebnisteil dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse der Co-Kultivierung der Erythropoese über einem Stroma aus mesenchymalen Stammzellen – unter Kontaktbedingungen oder getrennt durch eine semipermeable Membran – liefern Hinweise auf eine starke Einflussnahme mesenchymaler Stammzellen auf die Entwicklung hämatopoetischer Vorläuferzellen. Die Tatsache, dass alle Effekte sowohl in der direkten als auch in der indirekten Co-Kultur beobachtet werden konnten, diese jedoch in Bezug auf Proliferation und Differenzierung in der direkten Co-Kultur noch prägnanter waren, lässt darauf schließen, dass sowohl Zell-Zell-Kontakte als auch die Sekretion löslicher Faktoren durch mesenchymale Stammzellen bei den beobachteten Vorgängen eine Rolle spielen.

4.2.1 Zellvitalität

Die von Beginn an zu beobachtende deutlich höhere Zellvitalität der Kulturen auf Stroma als in der Standardkultur deutet darauf hin, dass mesenchymale Stammzellen über die Sekretion löslicher Faktoren die hämatopoetischen Stammzellen an der Apoptose hindern und protektive Einflüsse auf alle Entwicklungsstadien hämatopoetischer Vorläuferzellen ausüben. Gerade die Tatsache, dass der in der Standardkultur zu beobachtende Abfall der Vitalität an Tag 4 in keinem der Co-Kulturversuche auftrat, ist ein Indiz dafür, dass mesenchymale Stammzellen einen wichtigen Beitrag zum Überleben der hämatopoetischer Vorläuferzellen leisten können. In der Literatur finden sich nur wenige Angaben über den Einfluss mesenchymaler Stammzellen auf den Anteil vitaler Zellen in Zellkulturen. Jedoch wurde häufig der allgemein fördernde Effekt mesenchymaler Stammzellen auf hämatopoetische Stammzellen beschrieben. Dieser könnte – nach den vorliegenden Ergebnissen – offensichtlich auch dadurch gekennzeichnet sein, dass bei einer Co-Kultivierung der verschiedenen Zellreihen von Beginn an mehr Zellen in der Kultur überleben können. Möglicherweise imitiert demnach die Matrix aus mesenchymalen Stammzellen die hämatopoetischen Nischen im Knochenmark (siehe Kapitel 3.2) [64, 82, 84, 94, 95].

4.2.2 Zellproliferation

Wie bereits in Kapitel 1.9 erwähnt, konnte der in unseren Versuchen beobachtete proliferationsfördernde Effekt mesenchymaler Stammzellen auf hämatopoetische Vorläuferzellen schon von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden [61,64,66,82,94]. Auch in unseren Versuchen war die Proliferation der hämatopoetischen Stammzellen in Co-Kultivierung mit mesenchymalen Stammzellen besser als unter Standardkulturbedingungen. Dies gilt sowohl für direkte als auch für indirekte (durch ein Transwell getrennte) Co-Kultivierungen (Gesamtproliferation: ohne Matrix: $21,0 \pm 14,2$; MSC: $104,5 \pm 44,8$; Transwell: $62,3 \pm 34,9$; siehe 3.11 auf Seite 48). Diese unterschiedlichen Proliferationsraten lassen auf ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren schließen: Die kumulative Zellproliferation in der indirekten Co-Kultur überschreitet die der Standardkultur um ein Vielfaches. In der direkten Co-Kultur ist diese Tatsache an den ersten 8 Kulturtagen noch einmal stärker ausgeprägt. Dies führt zu der Annahme, dass im Wesentlichen von den mesenchymalen Stammzellen sezernierte Zytokine die Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen fördern, dass jedoch auch direkte Zell-Zell-Kontakte zwischen Stroma und hämatopoetischen Vorläuferzellen in Synergie mit den Zytokinen das Wachstumsverhalten der hämatopoetischen Vorläuferzellen stimulieren.

Zusätzlich fällt auf, dass sich ab Tag 12 der Kultur die errechneten Proliferationsfaktoren in den einzelnen Modellen weniger stark unterscheiden. Es kommt sogar – im Gegensatz zu den vorausgegangenen Untersuchungstagen – zu niedrigeren Zellproliferationen in beiden Co-Kulturmodellen als in der Standardkultur. Diese Beobachtung eröffnet Raum für Spekulationen. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass die große Mehrheit der Zellen durch die Zugabe anderer rekombinanter Zytokine ab Tag 8 (Einleitung der Differenzierungsphase) tatsächlich in die erythrozytäre Zelldifferenzierung eintritt und dass diese erythroiden Vorläuferzellen weniger sensibel gegenüber den vom Stroma produzierten Faktoren reagieren. Durch Zugabe des Differenzierungsmediums zu den Kulturen wird jedoch keine schlagartige sondern eine langsame, über Tage andauernde, Ausreifung der Zellen eingeleitet. Diese könnte – entsprechend oben genannter Hypothese – dazu führen, dass die Förderung der Zellproliferation durch mesenchymale Stammzellen nur langsam und kontinuierlich parallel zum Ausreifungsgrad absinkt. Keinesfalls jedoch liefert eine langsame Ausreifung der hämatopoetischen Zellen eine hinreichende Erklärung für ein Absinken der Zellproliferation in den Co-Kulturen unter die Werte der Standardkultur.

Eine weitere mögliche Erklärung für den beobachteten Effekt ist, dass es durch die Zugabe anderer rekombinanter Zytokine zu den Kulturen ab Kulturtag 8 zu einer Art negativen Rückkopplung zwischen hämatopoetischen Vorläuferzellen und mesenchymalen Stammzellen kommt. Diese könnte entweder durch die hinzugegebenen Zytokine selbst verursacht sein, oder dadurch, dass die hämatopoetischen Zellen im Zuge ihrer Ausreifung ihr Sekretionsprofil an Zytokinen verändern. Die differenzielle Zytokinexpression der erythroiden Vorläuferzellen könnte wiederum mit der Zytokinsekretion der mesenchymalen Stammzellen interagieren und hier eine Veränderung hervorrufen. Zahlreiche Studien belegen, dass im Sinne dieser Hypothese hämatopoetische Stammzellen während ihrer Ausreifung unterschiedliche Wachstumsfaktoren produzieren und sich ihr Transkriptionsprofil für Zytokine grundlegend verändert [85,86]. Tabelle 1.5 auf Seite 23 bietet einen Überblick über die von den verschiedenen Zellreihen sezernierten hämatopoetischen Zytokine. Weiterhin konnte in Studien nachgewiesen werden, dass Stromazellen unter unterschiedlichen Kulturbedingungen, zum Beispiel durch Hinzugabe verschiedener Zytokine zum Kulturmedium, ihr Expressionsprofil für Wachstumsfaktoren und damit ihre Einflussnahme auf andere Zellen verändern [71]. Doch auch die Hinweise für ein Rückkopplungssystem zwischen mesenchymalen und hämatopoetischen Stammzellen haben sich in den letzten Jahren verdichtet. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass auf Knochenmarkstroma oder mesenchymalen Stammzellen kultivierte hämatopoetische Zellen über bislang unbekannte Mechanismen die Produktion einiger Wachstumsfaktoren durch mesenchymale Stammzellen hochregulieren. Bekannt ist bislang eine deutliche Erhöhung der Produktion von IL-6, LIF und G-CSF [75, 96, 97]. Unsere Messungen einer besonders hohen G-CSF-Konzentration in der ersten Kulturphase, welche dann in der Differenzierungsphase absinkt, untermauern diese Hypothese zusätzlich.

In Übereinkunft mit diesen aus der Literatur bekannten experimentellen Resultaten erscheint es wahrscheinlich, dass es auch in unseren Experimenten zu einer gegenseitigen Beeinflussung der verschiedenen Zellpopulationen kam. Möglicherweise war diese jeweils unterschiedlich, in Abhängigkeit vom Reifungsgrad der hämatopoetischen Zellpopulationen und vom Untersuchungsgrad. Demnach ist es denkbar, dass frühe hämatopoetische Vorläuferzellen die Produktion von für die frühe Hämatopoese wirksamen Zytokinen durch mesenchymale Stammzellen fördern, während reifere Zellen der Hämatopoese dies nicht mehr oder nur in geringerem Umfang vermögen. Um diese Hypothesen jedoch zu untermauern, ist es notwendig, das Vorkommen der in Frage kommenden Wachstumsfaktoren im Längsschnitt des Kultursystems quantitativ zu analysieren (siehe Kapitel 4.2.4).

4.2.3 Zelldifferenzierung

Die in Kapitel 3.2 dargestellten Einflüsse der mesenchymalen Stammzellen auf die Differenzierung und Ausreifung hämatopoetischer Vorläuferzellen wiesen in allen drei Versuchen ähnliche Tendenzen auf: In den Co-Kultivierungsversuchen kam es stets bereits an den ersten Untersuchungstagen zur beginnenden Differenzierung einiger Zellen in Richtung der Granulopoese. Diese verstärkte sich im Zuge der Kultur, so dass sich an Tag 16 zum größten Teil myelopoetische Vorläuferzellen detektieren ließen. Dieser selektiv die Granulopoese fördernde Effekt mesenchymaler Stammzellen wurde bereits zuvor beschrieben, jedoch stets unter anderen als den vorliegenden Kulturbedingungen [61,64]. Auf den ersten Blick wirkt dieser Effekt vordergründig wie eine Verdrängung der Erythropoese durch die Granulopoese; berechnet man jedoch in den drei Kulturmodellen aus den theoretischen Gesamtzellzahlen die Anzahl an Zellen, die der roten Reihe angehören, so zeigt sich, dass sich die absolute Zahl von Zellen der roten Reihe in den Modellen kaum unterscheidet (siehe Abbildung 4.1). Es kommt also nicht, wie man annehmen könnte, zu einer Unterdrückung der Erythropoese, sondern vielmehr zu einem zusätzlichen starken Wachstum myelopoetischer Zellen in den Zellkulturen.



Abbildung 4.1: Absolute Zellzahl von Zellen der roten Reihe unter verschiedenen Kulturbedingungen.

Dennoch wird die Erythropoese durch die Co-Kultivierung zumindest in ihrer terminalen Differenzierung gehemmt. Auch wenn die Gesamtzahl der Zellen der roten Reihe in der Co-Kultur nicht sinkt, so verringert sich doch der Anteil entkernter Zellen an Zellen der roten Reihe (Retikulozyten an Tag 16 in der Standardkultur: $48.7\% \pm 5.5\%$; direkte Co-Kultur MSC: $32,7\% \pm 10,6\%$; Transwell und MSC: $22,3\% \pm 3,8\%$). Dies spricht für eine hemmende Wirkung mesenchymaler Stammzellen auf die terminale Ausreifung erythropoetischer Zellen in vitro. Da dieser Effekt in der indirekten Co-Kultur noch stärker ausgeprägt ist als in der direkten Co-Kultur, wird der Grund dieser Entwicklung bei von den mesenchymalen Stammzellen sezernierten Wachstumsfaktoren zu finden sein. Die Enukleation und damit die Entwicklung einer erythrozytären Zelle vom Normoblasten zum Retikulozyten scheint somit nicht unmittelbar von Zell-Zell-Kontakten abzuhängen. Anders verhält es sich bei den frühen Vorläuferzellen der roten Reihe: Hier werden in der direkten Co-Kultur mehr Zellen im Stadium des Proerythroblasten zurückgehalten als bei der Trennung der Zellfraktionen durch eine semipermeable Membran. Dies weist darauf hin, dass Zell-Stroma-Kontakte entscheidend dazu beitragen, hämatopoetische Zellen in den sehr frühen Vorläuferstadien zurückzuhalten [95].

4.2.4 Produktion von Zytokinen durch mesenchymale Stammzellen

Die beiden vorangegangenen Abschnitte legen dar, dass verschiedene Einflüsse mesenchymaler Stammzellen auf die Hämatopoese wahrscheinlich zum größten Teil auf die Sekretion von Zytokine durch mesenchymale Stammzellen zurückzuführen sind:

- Die Förderung der Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen während der ersten Woche der Kultur und
- die Förderung der Myelopoese bei zusätzlich zur Erythropoese stattfindender Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen zu Granulozyten.

Aus diesen Gründen erscheinen für eine Detailanalyse vor allem Zytokine interessant, welche bekanntermaßen Einflüsse auf die frühe Hämatopoese ausüben können, nach den aus unseren Proteinarrayexperimenten vorliegenden Ergebnissen in den Kulturüberständen vorhanden sind, jedoch nicht — wie SCF oder EPO – manuell hinzugegeben wurden. Als sogenannte "early acting cytokines" der Hämatopoese sind in der Literatur vor allem IL-6, als ungerichteter proliferationsfördernder Effektor [98] und G-CSF als gerichteter Förderer der Proliferation myelopoetischer Vorläuferzellen bekannt. Weiterhin ist G-CSF dafür bekannt, hämatopoetische Stammzellen zu einer Ausdifferenzierung entlang der Granulopoese bis hin zu reifen Granulozyten bewegen zu können [76, 99–103] (zusammengefasst in [104]). Der Nachweis dieser Zytokine im Quer- und Längsschnitt der Experimente sollte aus diesem Grund neue Hinweise für die Klärung der in der vorangegangenen Diskussion aufgestellten Hypothesen liefern:

• Der ab Tag 12 nicht weiter zu beobachtende Effekt der Proliferationsförderung durch ein Stroma aus mesenchymalen Stammzellen legt die Vermutung einer Veränderung des Zytokinprofils im Kulturmedium nahe.

• Die besonders starke Förderung der Ausreifung hämatopoetischer Stammzellen im Sinne der Granulopoese, welche ausschließlich bei beiden Co-Kultivierungen, nicht jedoch in der Standardkultur beobachtet werden konnte, lässt auf die Produktion eines "selektiv" die Granulopoese fördernden Zytokinprofils in den Co-Kultivierungen, nicht jedoch in der Standardkultur schließen.

Zu diesem Zweck wurden Kulturüberstände der Untersuchungstage 8, 12 und 16 der drei Experimente zur Anfertigung von ELISAs verwendet. Diese ELISAs dienten zu selektiven, quantitativen Detektion der Zytokine IL-6 und G-CSF (siehe auch Kapitel 4.2.2). Des weiteren wurden mesenchymale Stammzellen ohne CD34-positive Zellen für 96 Stunden allein in Proliferations- beziehungsweise Differenzierungsmedium der Erythropoese kultiviert. Die aus diesen Kultivierungen gewonnen Überstände wurden ebenfalls für oben genannte ELISAs verwendet, um auszuschließen, dass mögliche Unterschiede der Zytokinexpression der mesenchymalen Stammzellen von der Hinzugabe rekombinanter Zytokine und nicht von der Co-Kultivierung der verschiedenen Stammzellen herrührten.

Wie in Kapitel 1.10 beschrieben, werden weder G-CSF noch IL-6 in relevantem Ausmaß von hämatopoetischen Stammzellen oder den verschiedenen Blutvorläuferzellen produziert. Zahlreiche Veröffentlichungen sind sich in Hinblick auf diesen Punkt einig. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass beide Zytokine in den hier beschriebenen Co-Kultivierungsmodellen nahezu ausschließlich von den mesenchymalen Stammzellen produziert werden.

Hierbei war IL-6 in allen untersuchten Proben in ausgesprochen hoher Konzentration vorhanden (siehe Tab. 3.1 auf Seite 55). Diese Beobachtung weist eindeutig darauf hin, dass IL-6 bei der proliferationsfördernden Wirkung der mesenchymalen Stammzellen auf die hämatopoetischen Stammzellen eine größere Rolle spielen kann. Um diese Hypothese zu erhärten, bedarf es in der Zukunft jedoch weiterer Versuche wie der Hinzugabe von IL-6 zum verwendeten Erythropoesemodell ohne die Co-Kultivierung über mesenchymalen Stammzellen oder die Blockierung von IL-6 durch Antikörper im Co-Kulturmodell.

Bezüglich der G-CSF-Konzentration in den vorhandenen Proben ist festzustellen, dass

- in den Standardkulturen wenig oder kein G-CSF vorhanden ist,
- in der direkten Co-Kultur (mit nur einer einzigen Ausnahme) deutlich mehr G-CSF vorhanden ist als im Transwellversuch,
- die höchste Konzentration an G-CSF stets an Tag 8 zu messen ist, also parallel zum beobachteten Expansions-"Peak",
- die Konzentration des Zytokins in der Kultur mesenchymaler Stammzellen mit Proliferationsmedium vier mal so hoch ist, wie in denen mit Differenzierungsmedium.

In vielen bisher an mesenchymalen Stammzellen durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass diese erst nach Stimulation durch einen exogenen Faktor in messbaren Konzentrationen G-CSF produzieren. Nach Literaturmeinung kommt als Einflussfaktor am ehesten Interleukin-1 α in Frage [87,88]. Dieses wird bekanntermaßen von Fibroblasten, aktivierten Makrophagen, aber auch von erythroiden Zellen produziert [105].

Geht man davon aus, dass die zu den Kontrollproben hinzugegebenen Kulturmedien (Proliferationsmedium, Differenzierungsmedium) frei von IL-1 α sind, weist der der Nachweis von G-CSF in diesen Proben darauf hin, dass hier höchstwahrscheinlich ein autokriner Mechanismus eine Rolle spielt. Das bedeutet, dass es sich bei einem Teil der für den Stromalayer verwendeten Zellen um IL-1 α produzierende Zellen handelt. Das in einer niedrigen Konzentration vorhandene IL-1 α ist wiederum dazu in der Lage, die IL-1 α Produktion mesenchymaler Stammzellen zu induzieren. Dies führt zu einer deutlich nachweisbaren Konzentration von IL-1 α in allen untersuchten Kulturen an denen mesenchymale Stammzellen beteiligt waren. Bei eingehender Analyse des durchgeführten Proteinarrays wird diese Hypothese untermauert: In allen untersuchten Proben findet sich eine messbare Konzentration von IL-1 α . Da es sich hier jedoch um eine einzige, stichprobenartige Messung handelt, wäre für eine endgültige Validierung oben genannter Hypothese die Durchführung weiterer Proteinarrays oder eines IL-1 α ELISAs notwendig.

Während bezüglich der Herkunft des Zytokins IL-1 α und seines Effektes auf die Zellen der hier durchgeführten Zellkulturmodelle nur spekuliert werden kann, können beim Nachweis von G-CSF auch weitere eindeutigere Beobachtungen gemacht werden: Der Umstand, dass die G-CSF Konzentration in acht der neun untersuchten Überstände aus direkten Co-Kultur-Experimenten deutlich höher ist, als in den aus dem Transwellmodell gewonnenen Überständen weist darauf hin, dass Zell-Zell-Kontakte zwischen hämatopoetischen und mesenchymalen Vorläuferzellen die G-CSF-Produktion durch Letztere über einen unbekannten Mechanismus triggern und damit erhöhen können. Auch die im Proteinarray semiquantitativ ermittelte IL-1 α Konzentration ist im Überstand der direkten Co-Kultur über dreimal so hoch wie in den beiden anderen Proben. Diese Messdaten gehen konform mit den zytologischen Beobachtungen einer verstärkten Ausreifung granulopoetischer Zellen vor allem in den Versuchen der direkten Co-Kultur.

Folgendes Modell ist demnach vorstellbar: Durch direkte Zell-Zell-Kontakte zwischen den beiden untersuchten Zelltypen kommt es zu einer vermehrten IL-1 α Produktion durch beide Zellarten. Dies induziert einen starken Anstieg der G-CSF-Produktion durch mesenchymale Stammzellen, welche wiederum in großem Ausmaß die Proliferation und Differenzierung granulozytärer Vorläuferzellen aus hämatopoetischen Stammzellen bewirkt, trotz der Hinzugabe erythropoesefördernder Zytokine zum Kulturmedium (siehe Abb. 4.2 auf Seite 67). Somit wird deutlich, dass direkte Zell-Zell-Kontakte einen wichtigen Stellenwert bei den Wechselwirkungen zwischen hämatopoetischen Stammzellen und ihrer Nische im Knochenmark einnehmen.

Ein weiteres bedeutendes Ergebnis ist, dass die höchsten G-CSF Konzentration stets an Tag 8 der Kultur gemessen werden konnten. Da die Zahl der mesenchymalen Stammzellen im Stromalayer jedoch an allen Kulturtagen in etwa gleich hoch ist und es sich bei allen Versuchen um Zellmaterial desselben Knochenmarksspenders handelte, ist die Ursache für diesen Umstand am ehesten in den hämatopoetischen Vorläuferzellen zu sehen. Diese produzieren jedoch bekanntermaßen selbst kein G-CSF. Daraus lässt sich schließen, dass entweder die hohe Zahl hämatopoetischer Zellen an Tag 8 der Kultur oder aber ihre hohe proliferative Aktivität eine Amplifizierung der G-CSF Produktion in den mesenchymalen Stammzellen verursacht. Als möglicher Botenstoff kommt auch hier erneut IL-1 α in Betracht.

Zusammenfassend konnten die zu Beginn der Arbeit gestellten Fragen zu großen Teilen beantwortet werden: Sowohl die extrazelluläre Matrix als auch die mesenchymalen Stammzellen im Knochenmark beeinflussen die hämatopoetischen Stammzellen in Bezug auf Proliferation, Vitalität und Differenzierung während ihrer Ausreifung entlang der roten Reihe. Bei den durchgeführten in vitro Experimenten konnten wichtige Erkenntnisse zur humanen Erythropoese gewonnen werden:

- 1. ECM-Gel fördert die Vitalität und das Überleben der kultivierten hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen.
- 2. Fibronektin hemmt die Proliferation der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen.
- 3. Laminin fördert die Differenzierung und die Entkernung erythrozytärer Vorläuferzellen zu reifen Retikulozyten.
- 4. Mesenchymale Stammzellen führen sowohl über die Sekretion löslicher Zytokine als auch vermittelt durch direkte Zell-Zell-Kontakte – zu einem starken Proliferationszuwachs.
- 5. Mesenchymale Stammzellen führen zu einer Förderung der Myelopoese, nicht jedoch der Erythropoese.

Demnach liefern unsere Experimente wichtige und aufschlussreiche Indizien für ein komplexes Zusammenspiel verschiedenster Faktoren in den hämatopoetischen Nischen des menschlichen Knochenmarks, die für die humane Erythropoese mitverantwortlich sind. Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit dem eingangs erläuterten Zwei-Nischen-Konzept der Erythropoese (Osteoblasten- und vaskuläre Nische).

Um die in diesem Kapitel aufgestellten Hypothesen weiter zu untermauern, wären weitere Zellkulturversuche mit der Hinzugabe von rekombinantem IL-6 und G-CSF oder deren Blockade durch Antikörper notwendig. Ebenso sollten zu diesem Zweck weitere Proteinarrays oder ELISAs (zum Beispiel zum Nachweis von IL-1 α und Verdünnungsreihen für den Nachweis von IL-6) im Quer- und Längsschnitt der Experimente durchgeführt werden. Durch eine Erweiterung und Fortführung der für diese Arbeit etablierten Versuchsreihen könnten auf diese Art viele weitere Hinweise auf die Regulationsmechanismen der Hämatopoese im menschlichen Knochenmark gewonnen werden.



Abbildung 4.2: Während die hämatopoetischen Stammzellen im Verlauf der Standardkultur vornehmlich zu roten Blutzellen (Erythropoese) heranreifen, kommt es bei der Co-Kultivierung hämatopoetischer Stammzellen mit mesenchymalen Stammzellen zu einem Ausreifen entlang der weißen Reihe (Myelopoese). Diese wird unter anderem durch die von den mesenchymalen Stammzellen produzierten Zytokine IL-6 und G-CSF vermittelt.

5 Zusammenfassung

Nach vorherrschender Lehrmeinung findet die Hämatopoese des erwachsenen Menschen im Knochenmark in sogenannten "hämatopoetischen Nischen" statt in denen extrazelluläre Matrix und die verschiedenen Stromazellen entscheidenden Einfluss auf die Proliferation und Ausreifung hämatopoetischer Vorläuferzellen ausüben. Bei den vorliegenden Experimenten handelt es sich um Co-Kultivierungsversuche CD34-positiver hämatopoetischer Stammzellen auf mesenchymalen Stammzellen – in direktem Kontakt zum Stroma oder getrennt durch eine semipermeable Membran – sowie auf Proteinen der extrazellulären Matrix (Fibronektin, Laminin I, Kollagen IV und ECM-Gel). Das Kulturmedium wurde standardmäßig mit rekombinanten Zytokinen versetzt, die – ohne das Vorhandensein einer Matrix – zu einer vielfachen Expansion und einer selektiven Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen entlang der roten Reihe (Erythropoese) führen. Die Reinheit der Stammzellen zum Zeitpunkt des Kulturbeginns lag bei circa 95%, die Enukleationsrate am Ende der Erythropoesekultur bei fast 50%.

Der erste Teil der Dissertation beschäftigt sich mit der Frage, ob die Kultivierung hämatopoetischer Stammzellen über Proteinen der extrazellulären Matrix einen Einfluss auf ihre Entwicklung hat. Hierbei erbrachten die Experimente zur Ermittlung von Zellvitalität, Proliferation und Differenzierung in den Kulturen mit Hilfe von Neubauer-Zählkammer, Zytospins und durchflusszytometrischen Analysen die Ergebnisse, dass

- Fibronektin die Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen verringert,
- Laminin die Differenzierung der Vorläuferzellen zu reifen Retikulozyten unterstützt und
- ECM-Gel zu einer höheren Zellvitalität in den Kulturen führt.

Die zweite zentrale Frage der Arbeit lautete, ob eine Co-Kultivierung hämatopoetischer Stammzellen mit mesenchymalen Stammzellen die Entwicklung der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen zu Zellen der Erythropoese beeinflusst. In diesem Zusammenhang konnte festgestellt werden, dass ein Stromalayer aus mesenchymalen Stammzellen sowohl in direkter als auch in indirekter Co-Kultur die Proliferation der hämatopoetischen Vorläuferzellen exponentiell verbessert, jedoch trotz der Zugabe erythropoetischer rekombinanter Zytokine ihre Entwicklung entlang der Myelopoese induziert.

Unabhängig vom Proliferationsverhalten scheinen mesenchymale Stammzellen auch die Ausreifung von Zellen der Erythropoese zu verzögern und diese vor allem durch direkten Zell-Zell-Kontakt in ihren frühen Reifungsstadien zu arretieren. Die von den mesenchymalen Stammzellen sezernierten Wachstumsfaktoren IL-6 und G-CSF wurden in einem Proteinarray als möglicherweise ursächlich für diese Entwicklung identifiziert – Zytokine, die bekannt sind für ihre Einflussnahme auf die frühen Stadien der Hämatopoese. Die Konzentrationen dieser beiden Zytokine im Kulturmedium wurde daraufhin photometrisch im Längsschnitt der Experimente bestimmt (Untersuchungstag 8, 12 und 16). Diese Bestimmungen ergaben, dass IL-6 in hoher Konzentration von den mesenchymalen Stammzellen produziert wird und damit wahrscheinlich für die hohe Proliferationsrate in den Co-Kultivierungen verantwortlich ist. Weiterhin konnten Hinweise gewonnen werden, dass direkte Zell-Zellkontakte zwischen mesenchymalen Stammzellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen die G-CSF-Produktion der mesenchymalen Stammzellen in großem Ausmaß triggern. Dieser Umstand liefert eine plausible Erklärung für die Ausreifung der in Co-Kultur geführten hämatopoetischen Vorläuferzellen in Richtung der Granulopoese.

Aus diesen Ergebnissen folgt, dass die Bestandteile der hämatopoetischen Nischen im Knochenmark sowohl einzeln als auch in Synergie die Hämatopoese sowohl fördernd als auch hemmend beeinflussen können. Es ist davon auszugehen, dass diese Einflüsse sowohl durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte als auch durch lösliche Wachstumsfaktoren vermittelt werden. Mesenchymale Stammzellen spielen eine bedeutende Rolle für die Granulopoese im Knochenmark, beeinflussen die Erythropoese jedoch nur in geringem Ausmaß.

Insgesamt liefert diese Arbeit weitere Hinweise für die essenzielle Bedeutung der hämatopoetischen Nischen im Knochenmark für die Regulation der Hämatopoese und bietet damit neue Anhaltspunkte für Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Physiologie und Pathologie des Knochenmarks und der Hämatopoese.

Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovine Serum Albumine
CFU-E	Erythroid Colony Forming Units
CFU-GM	Granulocyte/Macrophage Colony Forming Units
CFU-Meg	Megakaryocyte Colony Forming Units
ECM	Extracelluar Matrix
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
\mathbf{EP}	Erythropoese
EPO	Erythropoetin
FCS	Fetal Calf Serum
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor
HSC	Hematopoietic Stem Cell
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IL-1 α	Interleukon 1 Alpha
IL-1 β	Interleukin 1 Beta
IL-6	Interleukin 6
M-CSF	Makrophage Colony Stimulating Factor
MSC	Mesenchymal Stem Cell
\mathbf{SCF}	Stem Cell Factor
SDF-1	Stromal Cell Derived Factor 1
TGF - $\beta 1$	Transforming Growth Factor- $\beta 1$
Abbildungsverzeichnis

1.1	Die Ausdifferenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu reifen Blutzellen im Knochenmark	11
$\begin{array}{c} 1.2 \\ 1.3 \end{array}$	Die lichtmikroskopisch untescheidbaren Reifungsstadien der Erythropoese Die hämatopoetische Nische im Knochenmark	$11 \\ 14 \\ 15$
2.1	Lichtmikroskopische Fotografie der verschiedenen Erythropoesekulturbedin- gungen.	30
2.2	Konfluente Matrix aus mesenchymalen Stammzellen in einer Plastikschale. Einige Zellen produzieren Bestandteile der extrazellulären Matrix (Färbung: Giemsa, Vergrößerung: 400fach).	34
3.1	Kinetik der Antigenexpression auf den hämatopoetischen Zellen während der verschiedenen Kulturtage, ermittelt mit Hilfe der Durchflusszytometrie	38
3.2	Vergleich des Anteils vitaler Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen	40
3.3	Vergleich der kumulativen Gesamtproliferation der Erythropoese unter ver- schiedenen Versuchsbedingungen.	41
3.4	Darstellung der relativen Zellproliferation auf Fibronektin im Vergleich zur	
	Standardkultur.	42
3.5	Anteil der Zellfraktionen unter verschiedenen Kulturbedingungen an Tag 16	
	der Kultur.	43
3.6	Auswertung der Zytospins (neutrale Benzidinfärbung) der verschiedenen	
	Kulturmodelle an den Tagen 8, 12 und 16	44
3.7	Vergleich des Anteils der Retikulozyten an Kulturtag 16 bei einer Kultur der	
	Erythropoese auf Laminin oder ohne Matrix (Standardkultur).	44
3.8	Mikroskopische Fotografien der eingefarbten 6-Loch-Platten an Tag 12 der	45
2.0	Erythropoesekultur nach dem Abspulen der hamatopoetischen Zellen.	45
3.9	Vergleich des Anteils vitaler Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen.	40
3.10	vergielen einzelner Fromerationslaktoren der Erythropoese unter verschiede-	47
2 11	Vergleich der kumulativen Preliferation der Frythropoese unter verschiedenen	47
0.11	Versuchsbedingungen	18
3 1 2	Auswertung der Zytospins (Neutrale Benzidin-Färhung und Pappenheimfär-	40
0.12	hung) der verschiedenen Kulturmodelle an den Tagen 8–12 und 16	49
3.13a	Mikroskopische Fotografie von Tag 8. Standardkultur Vergrößerung 1000fach	10
5.100	Pappenheimfärbung.	50
3.13b	Mikroskopische Fotografie von Tag 12, Standardkultur, Vergrößerung 1000fach.	
	neutrale Benzidinfärbung.	50

3.13c	Mikroskopische Fotografie von Tag 16, Standardkultur, Vergrößerung 1000fach, neutrale Benzidinfärbung.	50
3.13d	Mikroskopische Fotografie von Tag 16, Standardkultur, Vergrößerung 100fach, neutrale Benzidinfärbung.	50
3.14a	Mikroskopische Fotografie von Tag 8, direkte Co-Kultur, Vergrößerung 1000fach, Papponheimförbung	51
3.14b	Mikroskopische Fotografie von Tag 12, direkte Co-Kultur, Vergrößerung 1000fach neutrale Benzidinfärbung	51
3.14c	Mikroskopische Fotografie von Tag 16, direkte Co-Kultur, Vergrößerung 1000fach neutrale Benzidinfärbung	51
3.14d	Mikroskopische Fotografie von Tag 16, direkte Co-Kultur, Vergrößerung	51
3.15	Kinetik der Antigenexpression auf den Zelloberflächen der hämatopoetischen	51
3.16	Zellen	52 54
41	Absolute Zellzahl von Zellen der roten Beihe unter verschiedenen Kulturbe-	04
1.1	dingungen	62
7.2	eine Co-Kultivierung hämatopoetischer Stammzellen mit mesenchymalen Stammzellen.	67
A.1	Lichtmikrokopische Fotografie der a) nach Pappenheim und b-c) nach Ziehl- Neehlsen gefärbten Objektträger.	89
A.2 A.3	Durchflusszytometrische Analyse der Zellkultur im Standardkulturmodell Durchflusszytometrische Analyse der Zellkultur in Co-Kultur mit mesenchy-	105
A.4	malen Stammzellen	106 119

Tabellenverzeichnis

1.1	Oberflächenantigene auf Zellen der Erythropoese und ihre Bedeutung	12
1.2	Struktur, vorwiegendes Vorkommen und wichtigste Liganden von Very Late	
	Antigen 1 bis 6	17
1.3	Veröffentlichte Studienergebnissen zur Co-Kultivierung hämatopoetischer Vor-	
	läuferzellen auf humanem Fibronektin	18
1.4	Oberflächenantigene auf mesenchymalen Stammzellen und ihre Bedeutung	21
1.5	Exprimierung von mRNA für hämatopoetische Zytokine durch verschiedene	
	Zellfraktionen der Hämatopoese	23
1.6	Exprimierung von mRNA für hämatopoetische Zytokine durch mesenchymale	
	Stammzellen	23
0.1		
2.1	Autologe Stammzellspender, die der Verwendung überschüssiger Stammzellen	
	zu Forschungszwecken zugestimmt haben	25
2.2	Geräte	26
2.3	Laborbedarf	26
2.4	Zellkulturmedien und Reagenzien	26
2.5	Software	28
2.6	Zusammensetzung der Kulturmedien der Erythropoese	29
2.7	Fluoreszenzmarkierte Antikörper für die Durchflusszytometrie	32
31	Quantitativer Nachweis von IL-6 (ng/ml) aus Kulturüberständen	55
0.1	Quantitative Nachweis von 11-0 (pg/m) aus Rutur uberstählten	55
3.2	Quantitativer machinels von G-OSF (pg/mi) aus Kulturuberstanden	00

Literaturverzeichnis

- [1] Isabel Dorn, Pamela Lazar-Karsten, Stefanie Boie, Julika Ribbat, Dirk Hartwig, Birgit Driller, Holger Kirchner, and Peter Schlenke. In vitro proliferation and differentiation of human cd34+ cells from peripheral blood into mature red blood cells with two different cell culture systems. *Transfusion*, Feb 2008.
- [2] Austin Smith. A glossary fo stem-cell biology. Nature, 441:1060, 2006.
- [3] Christian Mueller-Eckhardt. Transfusionsmedizin. Springer, 3. auflage edition, 2003.
- [4] Elisabeth H Javazon, Kirstin J Beggs, and Alan W Flake. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol*, 32(5):414–425, May 2004.
- [5] Robert Passier and Christine Mummery. Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovasc Res*, 58(2):324–335, May 2003.
- [6] G. Bianchi, A. Muraglia, A. Daga, G. Corte, R. Cancedda, and R. Quarto. Microenvironment and stem properties of bone marrow-derived mesenchymal cells. Wound Repair Regen, 9(6):460–466, 2001.
- [7] Pettit J.E. Hoffbrand A.V., Moss P.A.H. *Essential Haematology*, volume Fifth Edition. Blackwell Publishers, 2006.
- [8] Harvey Lodish, Arnold Berk, Paul Matsudaira, Lawrence Zipursky, and James Darnell. *Molekulare Zellbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, 4 edition, 8 2001.
- [9] Human cd & other cellular antigens. www.ebioscience.com, 11 2007.
- [10] Weijia Wang, Daniel N Horner, Wen Li Kelly Chen, Peter W Zandstra, and Julie Audet. Synergy between erythropoietin and stem cell factor during erythropoiesis can be quantitatively described without co-signaling effects. *Biotechnol Bioeng*, 99(5):1261–1272, Apr 2008.
- [11] H. Sakatoku and S. Inoue. In vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors of cord blood. *Stem Cells*, 15(4):268–274, 1997.
- [12] E. Goldwasser, N. Beru, and D. Smith. Erythropoietin. Immunol Ser, 49:257–276, 1990.
- [13] B. Panzenböck, P. Bartunek, M. Y. Mapara, and M. Zenke. Growth and differentiation of human stem cell factor/erythropoietin-dependent erythroid progenitor cells in vitro. *Blood*, 92(10):3658–3668, Nov 1998.

- [14] Marie-Catherine Giarratana, Ladan Kobari, Hélène Lapillonne, David Chalmers, Laurent Kiger, Thérèse Cynober, Michael C Marden, Henri Wajcman, and Luc Douay. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. Nat Biotechnol, 23(1):69–74, Jan 2005.
- [15] Cornelia Leberbauer, Florence Boulmé, Gertrud Unfried, Johannes Huber, Hartmut Beug, and Ernst W Müllner. Different steroids co-regulate long-term expansion versus terminal differentiation in primary human erythroid progenitors. *Blood*, 105(1):85–94, Jan 2005.
- [16] R. Schofield. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. Blood Cells, 4(1-2):7–25, 1978.
- [17] JCE Underwood. *General and systematic Pathology*. Churchill Livingstone, third edition edition, 2000.
- [18] Tong Yin and Linheng Li. The stem cell niches in bone. J Clin Invest, 116(5):1195– 1201, May 2006.
- [19] Russell S Taichman. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*, 105(7):2631–2639, Apr 2005.
- [20] Beate Heissig, Yuichi Ohki, Yayoi Sato, Shahin Rafii, Zena Werb, and Koichi Hattori. A role for niches in hematopoietic cell development. *Hematology*, 10(3):247–253, Jun 2005.
- [21] Francesco Dazzi, Rajesh Ramasamy, Sarah Glennie, Simon P Jones, and Irene Roberts. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev*, 20(3):161– 171, May 2006.
- [22] Hynda K Kleinman, Deborah Philp, and Matthew P Hoffman. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Curr Opin Biotechnol*, 14(5):526–532, Oct 2003.
- [23] R. L. Juliano and S. Haskill. Signal transduction from the extracellular matrix. J Cell Biol, 120(3):577–585, Feb 1993.
- [24] C. C. Kumar. Signaling by integrin receptors. Oncogene, 17(11 Reviews):1365–1373, Sep 1998.
- [25] A. E. Aplin, A. Howe, S. K. Alahari, and R. L. Juliano. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev*, 50(2):197– 263, Jun 1998.
- [26] M. Hanspal. Importance of cell-cell interactions in regulation of erythropoiesis. Curr Opin Hematol, 4(2):142–147, Mar 1997.

- [27] M. W. Wang, U. Consoli, C. M. Lane, A. Durett, M. J. Lauppe, R. Champlin, M. Andreeff, and A. B. Deisseroth. Rescue from apoptosis in early (cd34-selected) versus late (non-cd34-selected) human hematopoietic cells by very late antigen 4and vascular cell adhesion molecule (vcam) 1-dependent adhesion to bone marrow stromal cells. *Cell Growth Differ*, 9(2):105–112, Feb 1998.
- [28] Anne Mey, Olivier Gandrillon, Kelly M McNagny, Dennis O Clegg, and Jacques Samarut. The v-erba oncogene blocks expression of alpha2/beta1 integrin a normal inhibitor of erythroid progenitor proliferation. Oncogene, 21(18):2864–2872, Apr 2002.
- [29] K. L. Goltry and V. P. Patel. Specific domains of fibronectin mediate adhesion and migration of early murine erythroid progenitors. *Blood*, 90(1):138–147, Jul 1997.
- [30] M. H. Vuillet-Gaugler, J. Breton-Gorius, W. Vainchenker, J. Guichard, C. Leroy, G. Tchernia, and L. Coulombel. Loss of attachment to fibronectin with terminal human erythroid differentiation. *Blood*, 75(4):865–873, Feb 1990.
- [31] A. G. Arroyo, J. T. Yang, H. Rayburn, and R. O. Hynes. Alpha4 integrins regulate the proliferation/differentiation balance of multilineage hematopoietic progenitors in vivo. *Immunity*, 11(5):555–566, Nov 1999.
- [32] H. Sugahara, Y. Kanakura, T. Furitsu, K. Ishihara, K. Oritani, H. Ikeda, H. Kitayama, J. Ishikawa, K. Hashimoto, and Y. Kanayama. Induction of programmed cell death in human hematopoietic cell lines by fibronectin via its interaction with very late antigen 5. J Exp Med, 179(6):1757–1766, Jun 1994.
- [33] M. W. Long, R. Briddell, A. W. Walter, E. Bruno, and R. Hoffman. Human hematopoietic stem cell adherence to cytokines and matrix molecules. *J Clin Invest*, 90(1):251–255, Jul 1992.
- [34] M. Rosemblatt, M. H. Vuillet-Gaugler, C. Leroy, and L. Coulombel. Coexpression of two fibronectin receptors, vla-4 and vla-5, by immature human erythroblastic precursor cells. J Clin Invest, 87(1):6–11, Jan 1991.
- [35] K. Hamamura, H. Matsuda, Y. Takeuchi, S. Habu, H. Yagita, and K. Okumura. A critical role of vla-4 in erythropoiesis in vivo. *Blood*, 87(6):2513–2517, Mar 1996.
- [36] A. Sharma, J. A. Askari, M. J. Humphries, E. Y. Jones, and D. I. Stuart. Crystal structure of a heparin- and integrin-binding segment of human fibronectin. *EMBO* J, 18(6):1468–1479, Mar 1999.
- [37] J. C. van der Loo, X. Xiao, D. McMillin, K. Hashino, I. Kato, and D. A. Williams. Vla-5 is expressed by mouse and human long-term repopulating hematopoietic cells and mediates adhesion to extracellular matrix protein fibronectin. J Clin Invest, 102(5):1051–1061, Sep 1998.
- [38] C. M. Verfaillie, J. B. McCarthy, and P. B. McGlave. Mechanisms underlying abnormal trafficking of malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia. decreased adhesion to stroma and fibronectin but increased adhesion to the basement

membrane components laminin and collagen type iv. J Clin Invest, 90(4):1232–1241, Oct 1992.

- [39] E. S. Strobel, D. Möbest, S. von Kleist, M. Dangel, S. Ries, R. Mertelsmann, and R. Henschler. Adhesion and migration are differentially regulated in hematopoietic progenitor cells by cytokines and extracellular matrix. *Blood*, 90(9):3524–3532, Nov 1997.
- [40] R. W. Hurley, J. B. McCarthy, and C. M. Verfaillie. Direct adhesion to bone marrow stroma via fibronectin receptors inhibits hematopoietic progenitor proliferation. J *Clin Invest*, 96(1):511–519, Jul 1995.
- [41] V. Roy and C. M. Verfaillie. Expression and function of cell adhesion molecules on fetal liver, cord blood and bone marrow hematopoietic progenitors: implications for anatomical localization and developmental stage specific regulation of hematopoiesis. *Exp Hematol*, 27(2):302–312, Feb 1999.
- [42] C. M. Verfaillie, J. B. McCarthy, and P. B. McGlave. Differentiation of primitive human multipotent hematopoietic progenitors into single lineage clonogenic progenitors is accompanied by alterations in their interaction with fibronectin. J Exp Med, 174(3):693–703, Sep 1991.
- [43] Y. Jiang, F. Prosper, and C. M. Verfaillie. Opposing effects of engagement of integrins and stimulation of cytokine receptors on cell cycle progression of normal human hematopoietic progenitors. *Blood*, 95(3):846–854, Feb 2000.
- [44] T. Yokota, K. Oritani, H. Mitsui, K. Aoyama, J. Ishikawa, H. Sugahara, I. Matsumura, S. Tsai, Y. Tomiyama, Y. Kanakura, and Y. Matsuzawa. Growth-supporting activities of fibronectin on hematopoietic stem/progenitor cells in vitro and in vivo: structural requirement for fibronectin activities of cs1 and cell-binding domains. *Blood*, 91(9):3263–3272, May 1998.
- [45] L. S. Davis, N. Oppenheimer-Marks, J. L. Bednarczyk, B. W. McIntyre, and P. E. Lipsky. Fibronectin promotes proliferation of naive and memory t cells by signaling through both the vla-4 and vla-5 integrin molecules. *J Immunol*, 145(3):785–793, Aug 1990.
- [46] Y. Shimizu, G. A. van Seventer, K. J. Horgan, and S. Shaw. Costimulation of proliferative responses of resting cd4+ t cells by the interaction of vla-4 and vla-5 with fibronectin or vla-6 with laminin. J Immunol, 145(1):59–67, Jul 1990.
- [47] R. Weinstein, M. A. Riordan, K. Wenc, S. Kreczko, M. Zhou, and N. Dainiak. Dual role of fibronectin in hematopoietic differentiation. *Blood*, 73(1):111–116, Jan 1989.
- [48] N. Yanai, T. Satoh, and M. Obinata. Endothelial cells create a hematopoietic inductive microenvironment preferential to erythropoiesis in the mouse spleen. *Cell Struct Funct*, 16(1):87–93, Feb 1991.

- [49] S. Tsai, V. Patel, E. Beaumont, H. F. Lodish, D. G. Nathan, and C. A. Sieff. Differential binding of erythroid and myeloid progenitors to fibroblasts and fibronectin. *Blood*, 69(6):1587–1594, Jun 1987.
- [50] V. P. Patel and H. F. Lodish. A fibronectin matrix is required for differentiation of murine erythroleukemia cells into reticulocytes. J Cell Biol, 105(6 Pt 2):3105–3118, Dec 1987.
- [51] H. Colognato and P. D. Yurchenco. Form and function: the laminin family of heterotrimers. Dev Dyn, 218(2):213-234, Jun 2000.
- [52] Peter Ekblom, Peter Lonai, and Jan F Talts. Expression and biological role of laminin-1. *Matrix Biol*, 22(1):35–47, Mar 2003.
- [53] Yu-Chen Gu, Jarkko Kortesmaa, Karl Tryggvason, Jenny Persson, Peter Ekblom, Sten-Eirik Jacobsen, and Marja Ekblom. Laminin isoform-specific promotion of adhesion and migration of human bone marrow progenitor cells. *Blood*, 101(3):877– 885, Feb 2003.
- [54] U. Siler, M. Seiffert, S. Puch, A. Richards, B. Torok-Storb, C. A. Müller, L. Sorokin, and G. Klein. Characterization and functional analysis of laminin isoforms in human bone marrow. *Blood*, 96(13):4194–4203, Dec 2000.
- [55] F. G. Giancotti, P. M. Comoglio, and G. Tarone. Fibronectin-plasma membrane interaction in the adhesion of hemopoietic cells. J Cell Biol, 103(2):429–437, Aug 1986.
- [56] M. Koenigsmann, J. D. Griffin, J. DiCarlo, and S. A. Cannistra. Myeloid and erythroid progenitor cells from normal bone marrow adhere to collagen type i. *Blood*, 79(3):657–665, Feb 1992.
- [57] Yukari Muguruma, Takashi Yahata, Hiroko Miyatake, Tadayuki Sato, Tomoko Uno, Jobu Itoh, Shunichi Kato, Mamoru Ito, Tomomitsu Hotta, and Kiyoshi Ando. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*, 107(5):1878–1887, Mar 2006.
- [58] Brenton Short, Nathalie Brouard, Teresa Occhiodoro-Scott, Anand Ramakrishnan, and Paul J Simmons. Mesenchymal stem cells. Arch Med Res, 34(6):565–571, 2003.
- [59] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshak. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411):143–147, Apr 1999.
- [60] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, Fc Marini, Ds Krause, Rj Deans, A. Keating, Dj Prockop, and Em Horwitz. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4):315–317, 2006.

- [61] Maria Angelopoulou, Enrico Novelli, Joanna E Grove, Henry M Rinder, Curt Civin, Linzhao Cheng, and Diane S Krause. Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in nod/scid mice. *Exp Hematol*, 31(5):413–420, May 2003.
- [62] Yuehua Jiang, Balkrishna N Jahagirdar, R. Lee Reinhardt, Robert E Schwartz, C. Dirk Keene, Xilma R Ortiz-Gonzalez, Morayma Reyes, Todd Lenvik, Troy Lund, Mark Blackstad, Jingbo Du, Sara Aldrich, Aaron Lisberg, Walter C Low, David A Largaespada, and Catherine M Verfaillie. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418(6893):41–49, Jul 2002.
- [63] S. E. Haynesworth, M. A. Baber, and A. I. Caplan. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*, 13(1):69–80, 1992.
- [64] J. L. Liesveld, C. N. Abboud, R. E. Duerst, D. H. Ryan, J. K. Brennan, and M. A. Lichtman. Characterization of human marrow stromal cells: role in progenitor cell binding and granulopoiesis. *Blood*, 73(7):1794–1800, May 1989.
- [65] S. E. Haynesworth, M. A. Baber, and A. I. Caplan. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and il-1 alpha. J Cell Physiol, 166(3):585–592, Mar 1996.
- [66] M. K. Majumdar, M. A. Thiede, S. E. Haynesworth, S. P. Bruder, and S. L. Gerson. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (mscs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. J Hematother Stem Cell Res, 9(6):841–848, Dec 2000.
- [67] T. M. Dexter. Stromal cell associated haemopoiesis. J Cell Physiol Suppl, 1:87–94, 1982.
- [68] Wolfgang Wagner, Rainer Saffrich, Ute Wirkner, Volker Eckstein, Jonathon Blake, Alexandra Ansorge, Christian Schwager, Frederik Wein, Katrin Miesala, Wilhelm Ansorge, and Anthony D Ho. Hematopoietic progenitor cells and cellular microenvironment: behavioral and molecular changes upon interaction. *Stem Cells*, 23(8):1180–1191, Sep 2005.
- [69] K. A. Moore, H. Ema, and I. R. Lemischka. In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells. *Blood*, 89(12):4337–4347, Jun 1997.
- [70] Jason A Hackney, Pierre Charbord, Brian P Brunk, Christian J Stoeckert, Ihor R Lemischka, and Kateri A Moore. A molecular profile of a hematopoietic stem cell niche. Proc Natl Acad Sci U S A, 99(20):13061–13066, Oct 2002.
- [71] A. Johnson and K. Dorshkind. Stromal cells in myeloid and lymphoid long-term bone marrow cultures can support multiple hemopoietic lineages and modulate their production of hemopoietic growth factors. *Blood*, 68(6):1348–1354, Dec 1986.
- [72] Armand Keating. Mesenchymal stromal cells. Curr Opin Hematol, 13(6):419–425, Nov 2006.

- [73] R. S. Taichman and S. G. Emerson. The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment. *Stem Cells*, 16(1):7–15, 1998.
- [74] R. S. Taichman, M. J. Reilly, and S. G. Emerson. Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. *Blood*, 87(2):518–524, Jan 1996.
- [75] R. S. Taichman, M. J. Reilly, R. S. Verma, and S. G. Emerson. Augmented production of interleukin-6 by normal human osteoblasts in response to cd34+ hematopoietic bone marrow cells in vitro. *Blood*, 89(4):1165–1172, Feb 1997.
- [76] J. Caldwell and S. G. Emerson. Il-1 alpha and tnf alpha act synergistically to stimulate production of myeloid colony-stimulating factors by cultured human bone marrow stromal cells and cloned stromal cell strains. J Cell Physiol, 159(2):221–228, May 1994.
- [77] Fumio Arai, Atsushi Hirao, and Toshio Suda. Regulation of hematopoietic stem cells by the niche. Trends Cardiovasc Med, 15(2):75–79, Feb 2005.
- [78] Toshio Suda, Fumio Arai, and Shigeto Shimmura. Regulation of stem cells in the niche. Cornea, 24(8 Suppl):S12–S17, Nov 2005.
- [79] David N Haylock and Susan K Nilsson. Stem cell regulation by the hematopoietic stem cell niche. *Cell Cycle*, 4(10):1353–1355, Oct 2005.
- [80] L. M. Calvi, G. B. Adams, K. W. Weibrecht, J. M. Weber, D. P. Olson, M. C. Knight, R. P. Martin, E. Schipani, P. Divieti, F. R. Bringhurst, L. A. Milner, H. M. Kronenberg, and D. T. Scadden. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425(6960):841–846, Oct 2003.
- [81] Hans-Georg Kopp, Scott T Avecilla, Andrea T Hooper, and Shahin Rafii. The bone marrow vascular niche: home of hsc differentiation and mobilization. *Physiology* (Bethesda), 20:349–356, Oct 2005.
- [82] Yue Zhang, Chou Chai, Xue-Song Jiang, Swee-Hin Teoh, and Kam W Leong. Coculture of umbilical cord blood cd34+ cells with human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*, 12(8):2161–2170, Aug 2006.
- [83] L. Cheng, P. Qasba, P. Vanguri, and M. A. Thiede. Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from cd34(+) hematopoietic progenitor cells. J Cell Physiol, 184(1):58–69, Jul 2000.
- [84] Katarina Le Blanc and Olle Ringdén. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 11(5):321–334, May 2005.
- [85] M. Majka, A. Janowska-Wieczorek, J. Ratajczak, K. Ehrenman, Z. Pietrzkowski, M. A. Kowalska, A. M. Gewirtz, S. G. Emerson, and M. Z. Ratajczak. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human cd34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood*, 97(10):3075–3085, May 2001.

- [86] Martina Komor, Saskia Güller, Claudia D Baldus, Sven de Vos, Dieter Hoelzer, Oliver G Ottmann, and Wolf-K. Hofmann. Transcriptional profiling of human hematopoiesis during in vitro lineage-specific differentiation. *Stem Cells*, 23(8):1154– 1169, Sep 2005.
- [87] R. J. Deans and A. B. Moseley. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*, 28(8):875–884, Aug 2000.
- [88] M. K. Majumdar, M. A. Thiede, J. D. Mosca, M. Moorman, and S. L. Gerson. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (mscs) and stromal cells. J Cell Physiol, 176(1):57–66, Jul 1998.
- [89] Takehiro Matsubara, Shinichi Tsutsumi, Haiou Pan, Hisatada Hiraoka, Ryo Oda, Masahiro Nishimura, Hiroshi Kawaguchi, Kouzou Nakamura, and Yukio Kato. A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun*, 313(3):503–508, Jan 2004.
- [90] V. P. Patel and H. F. Lodish. The fibronectin receptor on mammalian erythroid precursor cells: characterization and developmental regulation. J Cell Biol, 102(2):449–456, Feb 1986.
- [91] S. M. Frisch and H. Francis. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. J Cell Biol, 124(4):619–626, Feb 1994.
- [92] S. M. Frisch and E. Ruoslahti. Integrins and anoikis. Curr Opin Cell Biol, 9(5):701– 706, Oct 1997.
- [93] J. E. Meredith and M. A. Schwartz. Integrins, adhesion and apoptosis. Trends Cell Biol, 7(4):146–150, Apr 1997.
- [94] C. M. Verfaillie. Direct contact between human primitive hematopoietic progenitors and bone marrow stroma is not required for long-term in vitro hematopoiesis. *Blood*, 79(11):2821–2826, Jun 1992.
- [95] Yun Kyung Jang, Dai Hyun Jung, Mee Hyun Jung, Dong Hyun Kim, Keon Hee Yoo, Ki Woong Sung, Hong Hoe Koo, Wonil Oh, Yoon Sun Yang, and Sung-Eun Yang. Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. Ann Hematol, 85(4):212–225, Apr 2006.
- [96] G. Mbalaviele, N. Jaiswal, A. Meng, L. Cheng, C. Van Den Bos, and M. Thiede. Human mesenchymal stem cells promote human osteoclast differentiation from cd34+ bone marrow hematopoietic progenitors. *Endocrinology*, 140(8):3736–3743, Aug 1999.
- [97] P. Gupta, B. R. Blazar, K. Gupta, and C. M. Verfaillie. Human cd34(+) bone marrow cells regulate stromal production of interleukin-6 and granulocyte colonystimulating factor and increase the colony-stimulating activity of stroma. *Blood*, 91(10):3724–3733, May 1998.

- [98] M. O. Muench, J. G. Schneider, and M. A. Moore. Interactions among colonystimulating factors, il-1 beta, il-6, and kit-ligand in the regulation of primitive murine hematopoietic cells. *Exp Hematol*, 20(3):339–349, Mar 1992.
- [99] W. Brugger, W. Möcklin, S. Heimfeld, R. J. Berenson, R. Mertelsmann, and L. Kanz. Ex vivo expansion of enriched peripheral blood cd34+ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 beta (il-1 beta), il-6, il-3, interferon-gamma, and erythropoietin. *Blood*, 81(10):2579–2584, May 1993.
- [100] C. Caux, I. Moreau, S. Saeland, and J. Banchereau. Interferon-gamma enhances factor-dependent myeloid proliferation of human cd34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 79(10):2628–2635, May 1992.
- [101] C. M. Verfaillie. Soluble factor(s) produced by human bone marrow stroma increase cytokine-induced proliferation and maturation of primitive hematopoietic progenitors while preventing their terminal differentiation. *Blood*, 82(7):2045–2053, Oct 1993.
- [102] Na Li, Pierre Feugier, Brigitte Serrurrier, Veronique Latger-Cannard, Jean-François Lesesve, Jean-François Stoltz, and Assia Eljaafari. Human mesenchymal stem cells improve ex vivo expansion of adult human cd34+ peripheral blood progenitor cells and decrease their allostimulatory capacity. *Exp Hematol*, 35(3):507–515, Mar 2007.
- [103] Angela C Cooper, Ashraf Mikhail, Mark W Lethbridge, D. Michael Kemeny, and Iain C Macdougall. Increased expression of erythropoiesis inhibiting cytokines (ifngamma, tnf-alpha, il-10, and il-13) by t cells in patients exhibiting a poor response to erythropoietin therapy. J Am Soc Nephrol, 14(7):1776–1784, Jul 2003.
- [104] M. Ogawa. Hemopoietic stem cells: stochastic differentiation and humoral control of proliferation. *Environ Health Perspect*, 80:199–207, Mar 1989.
- [105] S. V. Sennikov, L. V. Eremina, D. M. Samarin, I. V. Avdeev, and V. A. Kozlov. Cytokine gene expression in erythroid cells. *Eur Cytokine Netw*, 7(4):771–774, Dec 1996.

A Anhang

A.1 Exkurs: Kontamination der Zellkultur mit säurefesten Stäbchen

Nachdem einige Vorversuche und drei vollständige Versuche der Erythropoese auf mesenchymalen Stammzellen stattgefunden hatten, kam es in den folgenden Versuchen stets zu einem plötzlichen rapiden Verlust der Zellvitalität auf zum Teil unter 20% von einem Untersuchungstag zum nächsten, während die Kultur zum Zeitpunkt der Aussaat vital und steril erschienen war. Diese Beobachtung gab Anlass zu gründlichen mikrobiologischen Untersuchungen auf Bakterien und Pilze jeder Art. Die Untersuchungen fielen jedoch stets negativ aus und ergaben keine Hinweise auf pathogene Keime in den eingesandten Proben. Auf den gefärbten Zytospins der auf diese Weise missglückten Versuche ließen sich manchmal in geringem Maße, manchmal sehr deutlich stäbchenartige Strukturen erkennen, die sich jedoch nicht mit den verwendeten Methoden anfärben ließen.

Diese Beobachtung gab Anlass, im Institut für Mikrobiologie (Direktor: Prof. Dr. W. Solbach) gezielt um eine Ziehl-Neehlsen-Färbung bereits angefertigter Zytospins zu bitten. Diese erbrachte schließlich den Befund, dass es sich bei den beobachteten Strukturen um säurefeste Stäbchen handelte. Aus einem nachfolgenden Experiment, in dem sich erneut das massenhafte Absterben der Zellen zeigte, konnte von der dem Institut für Mikrobiologie eine Kultur auf speziellen Nährmedien für Mykobakterien angelegt werden. Diese fiel nach acht Wochen positiv aus und die aus dem angelegten Material durchgeführte PCR bewies letztlich das Vorhandensein vitaler säurefester Stäbchen vom Typ "Mykobakterium avium", einem opportunistischen Krankheitserreger, der hauptsächlich im Wasser vorkommt.

Nach eingehender Beratung sowohl durch das Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität zu Lübeck als auch das Referenzzentrum für Mykobakterien in Borstel wurden eingehende Reinigungsmaßnahmen der Labore sowie der Labormaterialien durchgeführt. Sämtliche Reagenzien wurden verworfen und ersetzt. Die Wasserquellen der Labore wurden auf eine Kontamination mit Mykobakterien überprüft, die Kulturen blieben jedoch negativ. Um eine möglicherweise von vornherein vorhandene Kontamination der Zellquellen aufzudecken, wurden die folgenden Zellkulturexperimente in einem anderen Labor mit neuen Materialien durchgeführt. Nachdem durch spezielle PCR-Versuche und mykobakterielle Kulturen (freundlicherweise durchgeführt durch das Referenzzentrum für Mykobakterien in Borstel) eine Kontamination der neu angelegten Kulturen ausgeschlossen wurde, konnten aus einer neuen "sauberen" Knochenmarkquelle die für die ELISA-Untersuchungen dringend benötigten Überstände gewonnen werden. Auf weitere Co-Kultivierungsversuche wurde jedoch verzichtet. Trotz aller diagnostischer Maßnahmen blieb die ursprüngliche Kontaminationsquelle unbekannt. Aus diesen Gründen kann eine Kontamination der ausgewerteten Co-Kultivierungsversuche mit Mykobakterium avium nicht letztendlich ausgeschlossen werden. Jedoch ergaben sich bei der Auswertung und Durchführung der drei Experimente keinerlei Hinweise auf eine Kontamination: Es kam weder zu einem Absinken der Zellvitalität noch zu Einbußen der Proliferationsfähigkeit der Zellen. Auch konnten auf den Zytospins der ausgewerteten Versuche zu keiner Zeit nicht-anfärbbare Stäbchen detektiert werden, wie es auf allen Zytospins der kontaminierten Kulturen der Fall gewesen war.

UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Hol Campus Lübeck Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene Medizinaluntersuchungsamt Direktor: Professor Dr. med. Werner Solbach	stein	Hatzeburger Alle 160 23538 Libeck Tel.: 0451 500-2824 Fax: 0451 500-2808 www.hygiene-luebeck.uk-sh.de Akkreditiert nach DIN EN ISO 15189 und DIN EN ISO/IEC 17025 DAR-RegNr.: DAC-ML-0157-02-10
UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswip-Hotstein - Campus Lübeck Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene - Ratzeburger Allee 160 - 23538 Lübeck Med., Mikrobiologie und Hygiene	Labor-Nr. Pat-Nr. Abnahme: Eingang: Ausgang:	T000340 (00535011) Seite 1 0000060195 5 10.05.2007 10.05.2007 11:35 29.06.2007 11:35 29.06.2007 11:35 10.05.2007 10.05.2007 11:35 10.05.2007
Ratzeburger Allee 160 23538 Lübeck	Flüssigke Untersuch TBC	r (ki., Chemie) sit Zellmedium nungsauftrag:
Mikrobiologische Beg	utachtung	ENDBEFUND
Ziehl-Neelsen Farbung: Saurefeste Stabchen nachgewiesen. KULTUR:		
1) Mycobacterium avium		
Säurefeste Stäbchen in der Flüssig- kultur und auf den festen Nährmedien nachgewiesen.		
		0
Prof. Dr. med. W. Solbach	PD Dr. m	ed. J. Rupp (Tel. 4409)
e Veröffentlichung der Daten aus diesem Gutachten zu wissenschaftlichen Zwecken bedarf der schriftl	lichen Genehmigung de	as Institutsdirektors.

88



(a)



Abbildung A.1: Lichtmikrokopische Fotografie der a) nach Pappenheim und b-c) nach Ziehl-Neehlsen gefärbten Objektträger. Bei den in der Pappenheimfärbung nicht anfärbbaren und in der Ziehl-Neehlsen-Färbung deutlich rot gefärbten Strukturen handelt es sich um säurefeste Stäbchen. Vergrößerung: 400fach

A.2 Ethikkommission



Medizinische Fakultät - Der Vorsitzende der Ethikkommission

Dekanat der Medizinischen Universität zu Lübeck Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Herrn Dr. med. Schlenke Institut für Immunologie und Transfusionswesen

im Hause

Datum: 16.08.2004 Aktenzeichen: (immer angeben !) 04-088

Bearbeiter:

Telefon:

Fax:

email

Frau Erdmann

4639

3026

erdmann@zuv.uni-luebeck.de

(0451) 500-

(0451) 500-

nachrichtlich: Herr Prof. Kirchner Direktor des Institutes für Immunologie und Transfusionswesen

Sitzung der Ethik-Kommission am 10. August 2004 Antragsteller: Herr Dr. Schlenke / Herr Prof. Kirchner Titel: In vitro Erythropoese induziert aus CD34+ humanen Stammzellen

Sehr geehrter Herr Dr. Schlenke,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission hat nach folgender Ergänzung keine Bedenken: Die Kommission bittet um die Erläuterung des Ausdruckes "pseudo-anonymisiert" im dritten Absatz der Aufklärung.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und den besten Wünschen für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich Ihr

. .

lerve Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe Mitglied der Ethik-Kommission und Sitzungsleiter

anwesende Kommissionsmitglieder: E B.Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe (Sozialmedizin) Prof. Dr. F. Hohagen (Psychiatrie) B.Prof. Dr. Dominiak (Pharmakologie)

E Frau H. Müller (Pflege) Prof. Wessel (Kinderchinurgie) Herr Schneider (Vors. Richter am Landgericht Lübeck) Prof. Schwinoer Herr Prof. Dr. H. L. Fehm (Medizinische Klinik I) B Frau Prof. Dr. M. Schrader (Plastische Chirurgie) B Herr D. Schultz (Pädiatrie) R Herr D. Stoian UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein

Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin Direktor: Prof. Dr. med. Holger Kirchner

UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holsteir Ratzeburger Allee 160 · D-23538 Lübeck

Aufklärungsbogen zur Forschungsstudie "Erythropoese"

Betrifft: Entnahme von überschüssigen Stammzelle

Liebe Patientin, Lieber Patient,

bei Ihnen sollen Blut-Stammzellen gesammelt werden. Diese Zellen besitzen die Fähigkeit, sich zu allen Zellen ihres Blutes zu differenzieren (rote und weiße Blutkörperchen und Blutplättchen). Nachdem Sie in den nächsten Monaten zur Behandlung Ihrer Grunderkrankung eine Hochdosis-Chemotherapie erhalten haben, sollen Ihnen die gesammelten Stammzellen zurück gegeben werden. Sie sollen dazu beitragen, dass sich Ihr Blutbild möglichst schnell erholt. Die optimale Dosis an Stammzellen, die zu Ihrer Genesung benötigt wird, wurde in der Knochenmarktransplantationssitzung des UK-SH aufgrund aktueller Studienergebnisse festgelegt. Allerdings kann erst nach Beendigung der Zellsammlung festgestellt werden, wie viele Stammzellen tatsächlich gesammelt wurden. Häufig aind mehr Zellen vorhanden, als für die Transplantation benötigt werden. Von diesen Zellen ist kein zusätzlicher Therapieerfolg zu erwarten.

Dr. I. Dorn, Dr. D. Hartwig Dipl. Biol. S. Boie

PD Dr. P. Schlenke

Wir möchten Sie hiermit bitten, die überschüssigen Stammzellen für die Forschung benutzen zu dürfen. Es handelt sich um ein Projekt im Rahmen der Grundlagenforschung. Ihre Zellen sollen dazu verwendet werden, die Entwicklung der roten Blutkörperchen beim Menschen näher zu untersuchen. Hierzu werden die Stammzellen im Brutschrank über 14-21 Tage zu reifen roten Blutkörperchen kultiviert. Um die Regulation dieser Zellreifung besser zu verstehen, sollen die Zellen zunächst unter verschiedenen Kulturbedingungen gehalten werden (z.B. unterschiedliche Wachstumsfaktoren, Sauerstoffgehalt). Außerdem sollen Gene untersucht werden, die möglicherweise an der Entwicklung der roten Blutkörperchen beteiligt sind.

Selbstverständlich erhalten Sie in jedem Falle Ihre optimale Transplantatdosis. Somit ist die Nutzung überschüssiger Stammzellen zu Forschungszwecken nicht mit einem erhöhten Risiko für Sie verbunden. Weiterhin möchten wir Sie darauf hinweisen, dass die Studie pseudo-anonymisiert durchgeführt wird. Dies bedeutet, dass die Herkunft Ihrer Zellen für Dritte nicht ersichtlich ist und auch die Ergebnisse anonymisiert dokumentiert werden. Die entnommenen Zellen werden ausschließlich für die dargestellten Versuche verwendet und verbleiben im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Luebeck. Eine Weitergabe an Dritte außerhalb des UK-SH ist nicht vorgesehen. Sämtliches Material wird nach Beendigung der Studie verworfen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt ebenfalls an unserem Institut. Spätere Kontakte zu Ihnen aufgrund der Ergebnisse bzw. für weitere Untersuchungen sind ebenfalls nicht vorgesehen.

Falls Sie weitere Fragen zu unserer Studie haben, stehen wir Ihnen natürlich jederzeit gern zur Verfügung.

Mit freundlichen Grüßen Dr. med. Isabel Dorn



Medizinische Fakultät - Der Vorsitzende der Ethikkommission

Dekanat der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Herrm	Bearbeiter:	Frau Erdmann	
PD Dr. med. Schlenke	Telefon:	(0451) 500-	4639
Institut für Immunologie und Transfusionswesen	Fax:	(0451) 500-	3026
	email:	erdmann@zuv.un	i-luebeck.de
im Hause			
	Datum:	21.02.2005	
	Aktenzeichen:		
	(immer angeben	!) 04-183	

nachrichtlich: Herr Prof. Kirchner Direktor des Institutes für Immunologie und Transfusionswesen

Umlaufverfahren vom 09. Februar 2005 Antragsteller: Herr Dr. Schlenke / Herr Prof. Kirchner Titel: Proliferation und Differenzierung humaner mese

Proliferation und Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen

Sehr geehrter Herr Dr. Schlenke,

der Antrag wurde im o.g. Umlaufverfahren durch den Vorsitzenden und die Kommissionsmitglieder Herrn Stojan und Herrn Schneider geprüft.

Gegen die Studie bestehen keine Bedenken.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und den besten Wünschen für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich Ihr



anwesende Kommissionsmitglieder: 🗷 (Sozialmedizin, Vorsitzender der EK) Prof. Dr. F. Hohagen (Psychiatrie) Prof. Dr. Dominiak (Pharmakologie)

Frau H. Müller Frau H. Müller (Přlege) Prof. Wessel (Kinderchirurgie, Stellv. Vorsitzender der EK) El Herr Schneider (Vors. Richter am Landgericht Lübeck) Prof. Schwinger (Humangenetik)

Herr Prof. Dr. H. L. Fehm (Medizinische Klinik I) Frau Prof. Dr. M. Schrader Frau Frot. Dr. M. Schrader (Plastische Chirurgie) Herr Dr. Schultz (Pädiatrie) 🗵 Herr D. Stojan (Präsident des Amtsgerichtes Lübeck)

UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein

Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin Direktor: Prof. Dr. med. Holger Kirchner

UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein Ratzeburger Allee 160 · D-23538 Lübeck

Campus Lübeck PD Dr. med. P. Schlenke Tel.: 0451/ 500 - 2841 0451/500 - 2844 Funk: 06-1596

Aufklärungsbogen zur Forschungsstudie "mesenchymale Stammzelle" (PD Dr. med. P. Schlenke, cand. med. Ulrich Lindner)

Liebe Patientin, Lieber Patient,

bei Ihnen ist eine Operation an der Hüfte vorgesehen. Im Rahmen dieser Operation wird der sog. Hüftkopf durch eine Prothese ersetzt. Damit die Prothese auch "richtig sitzt", muss aus dem Knochen Material, das "Knochenmark", entfernt werden. Dieses Material wird normalerweise verworfen. Wir bitten Sie uns das Knochenmark zu Forschungszwecken zur Verfügung zu stellen.

Es handelt sich um ein Projekt im Rahmen der Grundlagenforschung. Die wissenschaftliche Fragestellung beschäftigt sich mit der Charakterisierung sogenannter mesenchymaler Stammzellen. Von diesen Zellen hofft man, dass sie in Zukunft dazu verwendet werden können, geschädigte Organe, Knochen oder Knorpel zu reparieren (Gewebeersatz). Wir werden ihre mesenchymalen Stammzellen in zell- und molekularbiologischen Experimenten anzüchten und ihr Wachstums- und Differenzierungsverhalten untersuchen.

Die Nutzung überschüssigen Knochenmarks zu Forschungszwecken ist nicht mit einem erhöhten Risiko für Sie verbunden, insbesondere da das Material ansonsten im OP verworfen wird. Weiterhin möchten wir Sie darauf hinweisen, dass die Studie anonymisiert durchgeführt wird. Dies bedeutet, dass die Herkunft Ihres Knochenmarks für Dritte nicht ersichtlich ist und auch die Ergebnisse anonymisiert dokumentiert werden. Die entnommenen Zellen werden ausschließlich für die dargestellten Versuche verwendet und verbleiben im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck. Eine Weitergabe an Dritte außerhalb des UK-SH ist nicht vorgesehen. Sämtliches Material wird nach Beendigung der Studie verworfen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt ebenfalls nunsterem Institut. Spätere Kontakte zu Ihnen aufgrund der Ergebnisse bzw. für weitere Untersuchungen sind ebenfalls nicht vorgesehen.

Falls Sie weitere Fragen zu unserer Studie haben, stehen wir Ihnen natürlich jederzeit gern zur Verfügung. Zudem möchten wir Sie darauf hinweisen, dass Sie jederzeit ohne Angabe von Gründen von der Studie zurücktreten können.

Mit freundlichen Grüßen

PD Dr. med. Peter Schlenke, cand. med. Ulrich Lindner

Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Anstalt des Öffentlichen Rechts Bankverbindungen: Dresdner Bank Lübeck Nr.: 3 000 412 00 (BLZ 230 800 40) Postbank Hamburg Nr.: 38 56 51 - 207 (BLZ 200 100 20) UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein

Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin Direktor: Prof. Dr. med. Holger Kirchner

UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein Ratzeburger Allee 160 · D-23538 Lübeck

Campus Lübeck PD Dr. med. P. Schlenke Tel.: 0451/500 – 2844 0451/500 – 2841 Funk: 06-1596

Einverständniserklärung zur Forschungsstudie "mesenchymale Stammzelle"

(PD Dr. med. P. Schlenke, cand.med.Ulrich Lindner)

Name: _____

Geburtsdatum:

Ich bin damit einverstanden, dass von mir entnommenes, überschüssiges Knochenmark zu Forschungszwecken verwendet wird. Mit Hilfe des Knochenmarks sollen Untersuchungen zur Erforschung der "mesenchymalen Stammzelle" vorgenommen werden. Über die Zielsetzung und Risiken bin ich am ______ von _____ aufgeklärt worden.

Unterschrift aufklärender Arzt

Unterschrift Patient

Ort, Datum

A.3 Arbeitsanleitungen/Arbeitsprotokolle inklusive Zellfärbungen

Giemsa-Färbung

- Luftgetrockneten Objektträger mit Methanol bedecken
- 5 Minuten einwirken lassen
- Objektträger mit Aqua dest. vorsichtig abspülen
- Objektträger mit Giemsa-Färbelösung überschichten
- 5 Minuten einwirken lassen
- Objektträger mindestens dreimal gut mit Aqua dest. abspülen
- Objektträger schrägstehend an der Luft trocknen lassen
- Eventuelle Farbreste an der Unterseite des Objektträgers mit Ethanol entfernen

Neutrale Benzidinfärbung

Ansetzen der Färbelösungen: 1% 3,3-Dimethoxybenzi
dinlösung: 0,5 g 3,3-Dimethoxybenzidin in 50 ml Methanol lösen 1% Wasserstoff
peroxidlösung: 1 ml Wasserstoffperoxid mit 25 ml Ethanol und 25 ml Aqua dest. verm
engen

- Luftgetrockneten Objektträger mit Methanol bedecken
- 5 Minuten einwirken lassen
- Methanol abziehen
- Objektträger 1,5 Minuten in der 1%igen 3,3-Dimethoxybenzidinlösung inkubieren
- Objektträger 1,5 Minuten in der 1%igen Wasserstoffperoxidlösung inkubieren
- 30 Sekunden mit Aqua dest. spülen
- Objektträger 5 mal 1 Sekunde in Diff-Quick-Fixierlösung eintauchen und zwischendurch kurz abtropfen lassen
- Objektträger 5 mal 1 Sekunde in Diff-Quick Färbelösung 1 eintauchen und zwischendurch kurz abtropfen lassen
- Objektträger 5 mal 1 Sekunde in Diff-Quick Färbelösung 2 eintauchen und zwischendurch kurz abtropfen lassen
- Objektträger gut mit Aqua dest. abspülen
- Objektträger schrägstehend an der Luft trocknen lassen

• Eventuelle Farbreste an der Unterseite des Objektträgers mit Ethanol entfernen

Färbung nach Pappenheim

Die Pappenheim-Färbungen wurden vom Institut für Hämatologie nach folgendem Protokoll angefertigt:

- Luftgetrockneten Objektträger mit May-Grünwald-Lösung bedecken
- 3 min einwirken lassen
- Objektträger mit Aqua dest. abspülen und anschließend mit Aqua dest. bedecken
- 3 min einwirken lassen
- Ausstrich erneut mit Aqua dest. spülen
- Aqua dest. abkippen
- $\bullet~15$ min mit Giemsa-Gebrauchslösung färben
- Gut mit Aqua dest. abspülen
- Objektträger schrägstehend an der Luft trocknen lassen
- Eventuelle Farbreste an der Unterseite des Objektträgers mit Ethanol entfernen

A.3 Arbeitsanleitungen/Arbeitsprotokolle inklusive Zellfärbungen

Arbeitsanweisungen

Ficoll und Aufreinigung:	Minimum: Optimal:	$10 * 10^{6}$ Zellen 15 * 10 ⁶ Zellen
Untersuchungstage: 0,4,8,12 Coaten der Dishes: Tag -1,3,	,16 7,11	

Dishes:

- ungecoatet (3 ml, Konzentration: 30 $\mu l/ml)$
 - ECM (3 ml, Konzentration: $30 \mu l/ml$)
 - Laminin (3 ml, Konzentration: 30 µl/ml)
 - Fibronektin(3 ml, Konzentration: 20 µl/ml)
 - Kollagen (3 ml, Konzentration: 30 $\mu l/ml)$

Ernte: Abpipettieren der Zellsuspension und gründliches Nachspülen

Zellzählung Trypanblau (Neubauer-Zählkammer)

FACS-Messung:

4-Farbmessung: Petra → Accqusition → SC 3671GlyA45.PRO

GPA -	Cy5	5 µl				
CD36 -	FITC	10 µl				
CD 71 -	PE	10 µl				
CD 45 -	PC7	10 µl				
100 µl Zelle	n					
Inkubation bei 4°, 15 Minuten						
Waschen mit FACS-Puffer						
Messung						

Ab d8 zusätzlich

Zytospins (je 2): 50000 Zellen mit PBS auf 200 μl + 50 μl BSA Benzidinfärbung (Stammzelle, polychromatischer Erythroblast, Normoblast, Retikulozyt) Pappenheimfärbung

Saat: d0: je 2 oder 3 Dishes mit 1 * 10^6 Zellen in 3 ml Medium (d0 bis d8 Proliferationsmedium, ab d9 Differenzierungsmedium)

Untersuchungstag Gisa Meyer Datum

Kultivierung der Erythropoese auf extrazellulären Matrixproteinen

Neubauer Zählkammer

	Ungecoatet	ECM	Laminin	Kollagen	Fibronektin
Ausgesäte Zellzahl Vortag					
Aktuelle Zellzahl / µl					
Aktuelle Zellzahl / ml					
Suspension in Tubes (ml)					
Zellen Gesamt (*10 ⁶)					
Proliferations- faktor					
Vitalität (%)					

FACS

Zytospin (ab Tag 9): 50 000 Zellen pro Zytospin, je 2:

oo ooo zelien pio zytoopin, je z.								
Un	100 000 ÷		Zellen / µl =					
ECM	100 000 ÷		Zellen / µl =					
La	100 000 ÷		Zellen / µl =					
Koll	100 000 ÷		Zellen / µl =					
Fn	100 000 ÷		Zellen / µl =					

Saat: Je 1 · 10⁶ Zellen in 2 ml Medium/Well

Zahl der Wells \cdot 10⁶ ÷ Zellen / ml = ml Suspension für Aussaat

	Ungecoatet	ECM	Laminin	Kollagen	Fibronektin
Zahl der Wells					
Zellen/ml					
Suspension für					
Aussaat (ml)					

Besonderheiten

Ungecoatet		EC	M	Lam	ninin	Kolla	agen	Fibro	nektin
W	В	W	В	W	В	W	В	W	В
Σ		Σ		Σ		Σ		Σ	

Duchflusszytometrische Stammzellmessung mit/ohne Beads

Material:

CD34 PE BD Biosciences CD45 FITC BD Biosciences Durchflusszytometer Facs-Puffer: PBS + 0,5% BSA Protokoll: sccount.pro

Vorlegen von 10 µl CD34 PE 10 µl CD45 FITC 100 µl Zellsuspension

Inkubation 15 Minuten bei 6°C

Entweder: 1

Hinzufuegen von 100 µl Beads 0,5 ml Facs-Puffer (= PBS + 0,5 % BSA) Hinzufügen von FacsPuffer Waschen + 0,5 ml FacsPuffer

Messung: sccount.pro Achtung: Eingabe des aktuellen CAL-Faktors!

sccount.pro Kein CAL-Faktor

Messung:

Anleitung für die FACS-4-farbmessung (Durchflusszytometrie)

Oder:

Material:

Durchflusszytometer CD71 PE BD Pharmingen CD45 PC7 Beckmann Coulter Glycophorin A PE-Cy5 BD Pharmingen CD36 FITC Immunotech Facs-Puffer: PBS + 0,5% BSA

 $\begin{array}{l} Arbeits an we is ung: \\ Vor legen von \\ 5\,\mu l \, CD71 \, PE \\ 5\,\mu l \, CD45 \, PC7 \\ 5\,\mu l \, CD36 \, FITC \\ 2,5\,\mu l \, Gly cophorin \, A \, PE-Cy5 \end{array}$

Hinzufügen von 100 µl Zellsuspension plus 0,5 ml Facs-Puffer

$A.3\ Arbeits anleitung en/Arbeits protokolle\ inklusive\ Zellf{\"arbungen}$

Modell:								
Untersuch	ungstag	Gisa	a Meyer	Datum				
Co-Kultivierung der Erythropoese auf mesenchymalen Stammzellen								
	uer Zanikar	Ungecoatet	MSC-Layer	MSC+Transwell				
		- 3						
Ausgesäte Zellzahl Vo	rtag							
Aktuelle Zellzahl / µ	I							
Aktuelle Ze / ml	ellzahl *10 ⁶							
Suspensio in Tubes (n	n nl)							
Zellen Gesamt (*1	0 ⁶)							
Proliferatio	onsfaktor							
Vitalität (%)							
FACS								
Zytosp 50 000 Zelle	oin (ab Tag	9): 1. ie 2:						
Un	100 000 ÷	,,,-	Zellen / ul =					
MSC	100 000 ÷		Zellen / µl =					
Trans	100 000 ÷		Zellen / µl =					
Saat: Je 1 · 10 ⁶ Zellen in 2 ml Medium/Well (Ausnahme Transwell)								

Zahl der Wells 10⁶ ÷ Zellen / ml = ml Suspension für Aussaat

	Ungecoatet	MSC	Transwell
Zahl der Wells			
Zellen * 10 ⁶ /ml			
Suspension für Aussaat (ml)			

Besonderheiten



Ansetzen der Erythropoesekultur nach dem Lübecker Modell

Ausgesät werden:

3 Wells Cokultur Erythropoese auf mesenchymlaen Stammzellen

(Konzentration 1*10⁶ HSC in 2 ml Proliferationsmedium)

3 Wells Cokultur Erythropoese auf mesenchymalen Stammzellen getrennt durch ein Transwell:

- 2,5 ml Proliferationsmedium in das Well pipettieren
- Die semipermeable Membran in das Well einsetzen
- 0,75 * 10⁶ HSC in 1,5 ml Proliferationsmedium auf die Membran pipettieren
- Gesamtvolumen im Well: 4 ml Medium

3 Wells Kultur der Erythropoese ohne Matrix

(Konzentration 1*10⁶ HSC in 2 ml Proliferationsmedium)

Hinweis: Die 6-Well-Plate der Negativkontrolle kann für die gesamte Erythropoese wiederverwendet werden ebenso wie die Transwells. Jedoch muss an jedem Kulturtag eine neue Matrix verwendet werden.

Die 3 Proben werden wie nach dem bekannten Modell 16 Tage kultiviert und an Tag 4,8,12 und 16 wie folgt behandelt:

- Vorsichtiges abpipettieren der Zellen, gründliches nachspülen nur mit dem eigenen Medium und nur am Rand. Wichtig ist, dass nicht der Flüssigkeitsstrahl aus der Pipette direkt über die Matrix fährt, da diese sonst abgelöst wird.
- Bei den Transwells wird ausschlie
 ßlich die Suspension oberhalb der Membran abgenommen und der Rest zun
 ächst im Well belassen.
- Überführen der Zellproben in 3 Eppendorfgefäße. In diesen befinden sich somit in der Regel zweimal 6 ml (Negativkontrolle und direkte Cokultur) und einmal 4,5 ml (Transwell) Diese können zum Waschen auf 6 ml aufgefüllt werden.
- Waschen der Proben.
- Zum wegfrieren des Überstandes wird aus dem Transwellmodell die Flüssigkeit unterhalb der Membran verwendet, für die anderen Proben der Überstand nach dem Waschen. Es sollten 2-3 ml weggefroren werden.

Alle weiteren Schritte entsprechen den bereits bekannten Arbeitsanweisungen:

- > Zählen der Proben mit der Neubauer Zählkammer
- Anfertigen von je 4 Zytopsins pro Probe
- Durchführen einer FACS 4-Farb-Messung (die Gates werden generell nicht während der Messungen verändert sondern erst nach Abschluss des gesamten Modells)
- > Aussaat in frischem Medium in der oben erwähnten Konzentration.
- Färben oder einfrieren der Zytospins.

Arbeitsanweisung

CoKultur der Erythropoese auf mesenchymalen Stammzellen

Erstellen der Matrix:

Insgesamt werden vier 6-Well-Plates mit einer Matrix aus mesenchymalen Stammzellen pro Erythropoese benötigt. Die ersten 2 Platten sollten mindestens 7 Tage vor der geplanten Erythropoese angesetzt werden, die beiden anderen innerhalb der ersten 3 Tage der Erythropoese.

Vorgehen:

Aus der Flasche mit mesenchymalen Stammzellen:

- Überstand abnehmen
- Die Flasche einmal vorsichtig mit PBS nachspülen
- Trypsin in die Flasche pipettieren, so dass der Boden bedeckt ist
- Die Flasche für 3 Minuten verschlossen im Brutschrank inkubieren
- PBS + 20% FCS hinzupipettieren, mindestens doppelt soviel wie Trypsin
- Flasche verschließen und gegen die Handfläche schlagen um die Zellen zu lösen
- Überführen der Zellsuspension in ein steriles Eppendorfgefäß
- Überprüfen ob die Flasche frei von Zellen ist, ansonsten Vorgang wiederholen
- falls immer noch Zellen zurückbleiben diese mit einem sterilen Scraper vom Flaschenboden lösen
- Zellen im Eppendorfgefäß waschen, resuspendieren, mit dem Coulter zählen
- Aussaat von möglichst einer neuen Flasche und 2 6-Well-Plates (Konzentration: 2*10⁵)
- Hinzugabe von je 2 ml Kultumedium (α-Mem + 20% FCS + 1% L-Glutamin + 1% PSA)
- Inkubieren der 6-Well-Plates bis zu 90% Konfluenz der Zellen (4 bis 7 Tage)
- Bei langsamem Wachstum an Tag 4 einen Mediumwechsel durchführen
- Bei ausreichender Konfluenz die 6-Well-Plates doppelt einschweißen und bei 30 Gray (= ein Bestrahlungsvorgang im großen Behälter) bestrahlen
- Die 6-Well-Plates vorsichtig aus der Folie entnehmen, einen Mediumwechsel durchführen und die Platten im Brutschrank aufbewahren.
- Die so vorbereiteten Zellen können bis zu 10 Tage nach Bestrahlung für die Cokultur der Erythropoese verwendet werden

Anmerkung: Falls die Platten mit der Matrix früher benötigt werden (weil zum Beispiel kurzfristig eine Erythropoese in 2 Tagen angekündigt wird), kann die Saatkonzentration auf bis zu 1*10⁶ erhöht werden. Es ist jedoch darauf zu achten, dass genügend mesenchymale Stammzellen vorhanden bleiben um eine weitere Flasche zu befüllen damit die Kulturreihe weitergeführt werden kann.





Abbildung A.2: Durchflusszytometrische Analyse der Zellkultur im Standardkulturmodell.



Abbildung A.3: Durchflusszytometrische Analyse der Zellkultur in Co-Kultur mit mesenchymalen Stammzellen.

A.5 Proteinarray

RayBio® Cytokine Antibody Arrays -- Biotin Label Based Antibody Array I G Series Internal Control Normalization without Background

	-	ohne Matrix	MSC	Transwell
		13569324-1	13569324-2	13569325-1
1	Positive Control	1.604,56	796,37	1.151,71
2	Neg	1,00	0,68	0,28
3	6Ckine	1,00	0,68	0,28
4	Activin A	1,00	1.126,59	162,46
5	Activin B	1,00	0,68	0,28
6	Activin C	38,33	3.312,76	1.400,29
7	Activin RIA / ALK-2	1,00	0,68	0,28
8	Activin RIB / ALK-4	1,00	0,68	0,28
9	Activin RII A/B	1,00	0,68	0,28
10	Activin RIIA	1,00	0,68	0,28
11	Adiponectin / Acrp30	264,00	138,08	0,28
12	AgRP	3,00	0,68	0,28
13	ALCAM	1,00	0,68	0,28
14	Angiogenin	8,00	0,68	5,88
15	Angiopoietin-1	1,00	0,68	0,28
16	Angiopoietin-2	30,67	9,05	0,28
17	Angiopoietin-4	20,67	0,68	0,28
18	Angiopoietin-like 1	111,67	19,92	0,28
19	Angiopoietin-like 2	26,33	1.595,60	807,42
20	Angiopoietin-like Factor	1,00	0,68	0,28
21	Angiostatin	1,00	20,82	0,28
22	APJ	1,00	0,68	0,28
23	AR (Amphiregulin)	1,00	0,68	0,28
24	APRIL	1,00	73,34	0,28
25	Artemin	1,00	0,68	0,28
26	AxI	1,00	15,85	0,28
27	B7-1 /CD80	533,00	458,83	360,48
28	BAFF R / TNFRSF13C	1,00	0,68	0,28
29	BCMA / TNFRSF17	1,00	0,68	0,28
30	BD-1	1,00	0,68	0,28
31	BDNF	18,00	13,58	0,28
32	beta-Catenin	1,00	0,68	1,40
33	beta-Defensin 2	1,00	0,68	0,28
34	beta-NGF	1,00	0,68	0,28
35	BIK	1,00	0,68	54,81
36	BLC / BCA-1 / CXCL13	1,00	0,68	54,53

37	BMP-2	1,00	0,68	0,28
38	BMP-3	154,00	251,94	77,49
39	BMP-3b / GDF-10	1,00	0,68	0,28
40	BMP-4	47,33	85,79	0,28
41	BMP-5	1,00	0,68	0,28
42	BMP-6	14,67	65,64	0,28
43	BMP-7	59,33	0,68	0,28
44	BMP-8	55,67	77,19	0,28
45	BMP-15	1,00	0,68	0,28
46	BMPR-IA / ALK-3	1,00	0,68	0,28
47	BMPR-IB / ALK-6	1,00	0,68	0,28
48	BMPR-II	68,33	0,68	0,28
49	BTC	5,67	0,68	0,28
50	Cardiotrophin-1 / CT-1	985,67	624,98	305,68
51	CCL14 / HCC-1 / HCC-3	1,00	0,68	0,28
52	CCL28 / VIC	695,00	1.114,59	1.258,66
53	CCR1	1,00	22,41	0,28
54	CCR2	33,67	42,56	11,39
55	CCR3	268,33	130,84	398,30
56	CCR4	22,00	57,50	83,47
57	CCR5	13,33	0,68	29,60
58	CCR6	46,67	0,68	67,97
59	CCR7	45,67	0,68	49,76
60	CCR8	1,00	0,68	2,99
61	CCR9	11,00	13,58	7,94
62	CD14	1,00	0,68	5,32
63	CD27 / TNFRSF7	1,00	0,68	0,28
64	CD30 / TNFRSF8	152,67	5,66	297,65
65	CD30 Ligand / TNFSF8	1,00	0,68	0,28
66	CD40 / TNFRSF5	1,00	1.415,65	783,80
67	CD40 Ligand / TNFSF5 /CD154	1,00	0,68	0,28
68	CD 163	403,67	619,77	562,53
69	Cerberus 1	1,00	0,68	0,28
70	Chem R23	1,00	0,68	7,94
71	Chordin-Like 1	1,00	0,68	56,11
72	Chordin-Like 2	43,67	32,82	95,89
73	Csk	1,00	0,68	0,28
74	CLC	1,00	0,68	0,28
75	CNTF	1,00	420,12	77,77
76	CNTF R alpha	8,67	68,59	69,84
77	Coagulation Factor III / Tissue Factor	1,00	0,68	0,28
78	CRIM 1	1,00	40,52	23,62
79	Cripto-1	9,00	0,68	0,28
80	CRTH-2	24,00	0,68	251,53
-----	------------------------	-----------	----------	----------
81	Cryptic	1,00	313,73	17,18
82	CTACK / CCL27	1,00	67,00	55,37
83	CTGF / CCN2	12,67	0,68	245,74
84	CTLA-4 /CD152	12,00	108,65	65,73
85	CV-2 / Crossveinless-2	1,00	221,60	114,84
86	CXCL14 / BRAK	8,33	50,25	2.524,04
87	CXCL16	1,00	0,68	201,95
88	CXCR1 / IL-8 RA	5,00	70,40	203,44
89	CXCR2 / IL-8 RB	32,33	74,25	10,83
90	CXCR3	5,33	20,15	0,28
91	CXCR4 (fusin)	84,67	239,03	27,64
92	CXCR5 /BLR-1	705,33	118,61	134,63
93	CXCR6	34,00	0,68	0,28
94	D6	41,00	159,36	23,25
95	DAN	1,00	0,68	0,28
96	DANCE	1,00	0,68	0,28
97	DcR3 / TNFRSF6B	1,00	0,68	0,28
98	Decorin	1,00	278,65	230,61
99	Dkk-1	1,00	1.288,66	319,68
100	Dkk-3	1,00	0,68	0,28
101	Dkk-4	37,00	0,68	0,28
102	DR3 / TNFRSF25	1,00	0,68	0,28
103	DR6 / TNFRSF21	10.126,67	4.712,33	785,95
104	Dtk	7,67	0,68	0,28
105	EDA-A2	6,00	376,21	325,00
106	EDAR	1,00	0,68	0,28
107	EDG-1	1,00	216,17	19,70
108	EGF	1,00	0,68	0,28
109	EGF R / ErbB1	1,00	0,68	0,28
110	EG-VEGF / PK1	26,67	137,63	16,81
111	EMAP-II	33,00	10,41	0,28
112	ENA-78	12,00	202,82	180,94
113	Endocan	1,00	247,64	346,11
114	Endoglin / CD105	1,00	0,68	0,28
115	Endostatin	1,00	0,68	0,28
116	EN-RAGE	1,00	0,68	35,39
117	Eotaxin / CCL11	34,00	41,42	19,51
118	Eotaxin-2 / MPIF-2	40,67	13,13	0,28
119	Eotaxin-3 / CCL26	96,33	0,68	0,28
120	Epiregulin	66,67	0,68	86,55
121	ErbB2	360,33	453,62	161,15
122	ErbB3	1,00	0,68	0,28

123	ErbB4	1,00	0,68	0,28
124	Erythropoietin	810,67	1.321,93	301,48
125	E-Selectin	22,67	0,68	34,64
126	Endothelin	270,00	316,22	108,12
127	FADD	64,67	35,99	15,69
128	FAM3B	6,67	0,68	0,28
129	Fas / TNFRSF6	151,00	23,77	6,63
130	Fas Ligand	12,33	0,68	15,13
131	FGF Basic	3,67	85,56	0,28
132	FGF-BP	6,67	0,68	0,28
133	FGF R3	1,00	0,68	0,28
134	FGF R4	78,67	233,83	26,05
135	FGF R5	1,00	40,74	0,28
136	FGF-4	1,00	0,68	0,28
137	FGF-5	1,00	0,68	0,28
138	FGF-6	1,00	0,68	0,28
139	FGF-7 / KGF	11,67	372,13	28,29
140	FGF-8	1,00	0,68	2,24
141	FGF-9	1,00	0,68	0,28
142	FGF-10 / KGF-2	94,67	206,44	0,28
143	FGF-11	1,00	86,70	0,28
144	FGF-12	1,00	0,68	0,28
145	FGF-13 1B	5.389,33	4.511,10	2.141,15
146	FGF-16	1,00	0,68	2,71
147	FGF-17	1,00	0,68	0,28
148	FGF-18	1,00	0,68	4,11
149	FGF-19	1,00	0,68	0,28
150	FGF-20	1,00	0,68	0,28
151	FGF-21	1,00	0,68	0,28
152	FGF-23	1,00	0,68	4,29
153	FLRG	1,00	0,68	0,28
154	Flt-3 Ligand	1,00	0,68	0,28
155	Follistatin	1,00	0,68	0,28
156	Follistatin-like 1	1,00	0,68	0,28
157	Fractalkine	1,00	0,68	0,28
158	Frizzled-1	1,00	0,68	0,28
159	Frizzled-3	1,00	0,68	11,11
160	Frizzled-4	1,00	0,68	7,28
161	Frizzled-5	1,00	0,68	0,28
162	Frizzled-6	1.00	0,68	0,28
	11122160-0	-,		
163	Frizzled-7	1,00	0,68	0,28
163 164	Frizzled-7 Galectin-3	1,00 51,67	0,68 24,45	0,28 22,03

166	GASP-2 / WFIKKN	1,00	0,68	0,28
167	GCP-2 / CXCL6	3,00	96,20	57,14
168	GCSF	139,33	387,98	544,32
169	G-CSF R / CD 114	15,33	16,75	13,54
170	GDF1	373,00	3.244,62	1.974,30
171	GDF3	248,00	3.433,18	2.507,98
172	GDF5	327,33	3.305,74	2.246,09
173	GDF8	252,33	2.470,93	1.691,31
174	GDF9	327,00	3.532,78	2.229,47
175	GDF11	577,67	4.025,33	2.892,55
176	GDF-15	1,00	0,68	14,85
177	GDNF	709,00	521,08	317,35
178	GFR alpha-1	1,00	0,68	73,29
179	GFR alpha-2	63,33	0,68	156,48
180	GFR alpha-3	329,00	557,52	1.399,55
181	GFR alpha-4	1,00	0,68	0,28
182	GITR / TNFRF18	14,33	0,68	40,99
183	GITR Ligand / TNFSF18	1,00	0,68	0,28
184	Glucagon	104,67	79,68	2.212,67
185	Glut1	32,00	0,68	0,28
186	Glut2	2,00	0,68	70,58
187	Glut3	22,00	0,68	0,28
188	Glut5	37,00	0,68	0,28
189	Glypican 3	220,00	131,29	133,05
190	Glypican 5	5,33	0,68	78,43
191	GM-CSF	424,33	1.569,57	847,85
192	GM-CSF R alpha	103,00	75,38	0,28
193	Granzyme A	76,33	256,69	134,91
194	GREMLIN	178,33	921,73	246,30
195	GRO	1,00	0,68	359,18
196	GRO-a	135,67	1.014,31	600,34
197	Growth Hormone (GH)	78,67	132,42	12,14
198	Growth Hormone R (GHR)	1,00	0,68	0,28
199	HB-EGF	1,00	0,68	234,72
200	HCC-4 / CCL16	1,00	0,68	0,28
201	HCR / CRAM-A/B	16,00	91,00	14,47
202	Hepassocin	144,67	193,76	338,17
203	Heregulin / NDF / GGF / Neuregulin	112,33	306,26	44,72
204	HGF	1,00	0,68	0,28
205	HGFR	88,67	757,85	185,98
206	HRG-alpha	1,00	0,68	0,28
207	HRG-beta 1	1,00	0,68	0,28
208	HVEM / TNFRSF14	1,00	0,68	0,28

209	I-309	1,00	0,68	0,28
210	ICAM-1	1,00	0,68	108,58
211	ICAM-2	1,00	0,68	15,41
212	ICAM-3 (CD50)	1,00	0,68	0,28
213	ICAM-5	1,00	0,68	46,68
214	IFN-alpha / beta R1	1,00	0,68	0,28
215	IFN-alpha / beta R2	1,00	0,68	0,28
216	IFN-beta	1,00	0,68	80,01
217	IFN-gamma	82,33	194,67	623,21
218	IFN-gamma R1	188,00	65,87	17,93
219	IGFBP-1	1,00	0,68	123,99
220	IGFBP-2	39,00	137,17	72,73
221	IGFBP-3	20,67	2.324,47	1.370,79
222	IGFBP-4	13,33	220,25	249,94
223	IGFBP-6	249,33	456,56	241,44
224	IGFBP-rp1 / IGFBP-7	516,33	5.151,92	4.750,89
225	IGF-I	137,33	294,27	144,90
226	IGF-I SR	54,33	87,83	72,73
227	IGF-II	1,00	4,75	813,96
228	IGF-II R	579,33	991,90	234,91
229	IL-1 alpha	640,67	2.230,08	651,88
230	IL-1 beta	39,67	25,80	0,28
231	IL-1 F5 / FIL1delta	69,67	201,91	214,09
232	IL-1 F6 / FIL1 epsilon	734,33	1.397,08	566,45
233	IL-1 F7 / FIL1 zeta	1,00	0,68	39,77
234	IL-1 F8 / FIL1 eta	1,00	17,20	0,28
235	IL-1 F9 / IL-1 H1	243,33	273,44	50,42
236	IL-1 F10 / IL-1HY2	4,67	0,68	0,28
237	IL-1 R3 / IL-1 R AcP	1,00	0,68	0,28
238	IL-1 R4 /ST2	172,00	4,53	17,83
239	IL-1 R6 / IL-1 Rrp2	1,00	0,68	0,28
240	IL-1 R8	1,00	0,68	0,28
241	IL-1 R9	1,00	0,68	0,28
242	IL-1 ra	59,67	60,21	5,32
243	IL-1 sRI	1,00	0,68	0,28
244	IL-1 sRII	1,00	0,68	0,28
245	IL-2	69,33	623,16	107,74
246	IL-2 R alpha	1,00	0,68	0,28
247	IL-2 R beta /CD122	1,00	0,68	0,28
248	IL-2 R gamma	1,00	0,68	0,28
249	IL-3	116,67	591,93	307,73
250	IL-3 R alpha	1,00	0,68	0,28
251	IL-4	4,33	0,68	52,94

252	IL-4 R	57,33	214,36	114,28
253	IL-5	101,67	3.589,82	437,04
254	IL-5 R alpha	1,00	0,68	0,28
255	IL-6	76,33	2.609,46	1.495,90
256	IL-6 R	1,00	1,36	0,28
257	IL-7	86,67	1.368,34	272,63
258	IL-7 R alpha	1,00	15,17	0,28
259	IL-8	117,67	1.677,32	1.137,94
260	IL-9	1,00	0,68	0,28
261	IL-10	16,67	84,66	15,97
262	IL-10 R alpha	15,00	0,68	0,28
263	IL-10 R beta	1,00	0,68	0,28
264	IL-11	1,00	0,68	0,28
265	IL-12 p40	1,00	0,68	0,28
266	IL-12 p70	309,33	136,04	193,27
267	IL-12 R beta 1	1,00	0,68	9,43
268	IL-12 R beta 2	14,00	0,68	95,89
269	IL-13	255,33	697,18	698,37
270	IL-13 R alpha 1	74,33	982,62	520,98
271	IL-13 R alpha 2	1,00	0,68	0,28
272	IL-15	203,00	1.254,93	562,53
273	IL-15 R alpha	562,67	518,36	194,95
274	IL-16	10,33	0,68	0,28
275	IL-17	1,00	0,68	0,28
276	IL-17B	6,00	0,68	15,59
277	IL-17B R	2,67	25,80	56,58
278	IL-17C	1,00	0,68	6,35
279	IL-17D	9,00	24,22	67,69
280	IL-17E	39,67	18,11	21,47
281	IL-17F	47,33	253,75	43,98
282	IL-17R	1,00	3,17	33,80
283	IL-17RC	6,00	0,68	44,72
284	IL-17RD	1,00	0,68	0,28
285	IL-18 BPa	36,33	153,47	18,39
286	IL-18 R alpha /IL-1 R5	1,00	0,68	0,28
287	IL-18 R beta /AcPL	1,00	0,68	0,28
288	IL-19	89,67	280,68	242,00
289	IL-20	17,67	21,50	2,61
290	IL-20 R alpha	42,33	308,53	961,20
291	IL-20 R beta	1,00	0,68	0,28
292	IL-21	1,00	0,68	2,71
293	IL-21 R	1,00	0,68	0,28
294	IL-22	91.00	94.84	153.87

295	IL-22 BP	1,00	0,68	15,87
296	IL-22 R	1,00	160,71	582,97
297	IL-23	41,67	221,60	35,20
298	IL-23 R	1,00	0,68	17,93
299	IL-24	56,33	88,96	47,99
300	IL-26	3,33	0,68	0,28
301	IL-27	15,33	0,68	112,60
302	IL-28A	74,67	119,97	112,79
303	IL-29	1,00	0,68	69,93
304	IL-31	1,00	0,68	39,21
305	IL-31 RA	1,00	0,68	20,54
306	Inhibin A	1,00	0,68	0,28
307	Inhibin B	1,00	190,37	67,88
308	Insulin	1,00	0,68	23,43
309	Insulin R	41,33	484,86	607,06
310	Insulysin / IDE	1,00	0,68	0,28
311	IP-10	1,00	14,26	52,66
312	I-TAC / CXCL11	6,00	115,22	137,81
313	Kininostatin / kininogen	1,00	0,68	0,28
314	Kremen-1	1,00	0,68	26,14
315	Kremen-2	1,00	0,68	0,28
316	Lck	1,00	52,74	61,43
317	Latent TGF-beta bp1	49,33	153,70	153,21
318	LBP	2.260,33	2.498,09	659,72
319	LECT2	1,00	0,68	0,28
320	Lefty - A	1,00	0,68	0,28
321	Leptin R	1,00	0,68	0,28
322	Leptin (OB)	1,00	3,40	0,28
323	LFA-1 alpha	618,67	1.894,85	1.295,44
324	LIF	168,33	108,65	285,70
325	LIF R alpha	179,00	64,74	128,28
326	LIGHT / TNFSF14	69,33	111,14	98,50
327	Lipocalin-1	15,33	23,54	127,07
328	LRP-1	1,00	0,68	0,28
329	LRP-6	1,00	0,68	7,94
330	L-Selectin (CD62L)	1,00	0,68	76,93
331	Luciferase	52,67	87,37	79,36
332	Lymphotactin / XCL1	1,00	236,77	1.896,62
333	Lymphotoxin beta / TNFSF3	1,00	25,35	470,84
334	Lymphotoxin beta R / TNFRSF3	1,00	0,68	0,28
335	MAC-1	1,00	0,68	0,28
336	MCP-1	511,67	2.443,31	1.183,78
337	MCP-2	1.00	5.89	51.91

338	MCP-3	81,33	28,07	122,68
339	MCP-4 / CCL13	1,00	0,68	60,22
340	M-CSF	1,00	0,68	16,53
341	M-CSF R	1,00	37,12	10,18
342	MDC	1,00	0,68	0,28
343	MFG-E8	1,00	9,05	0,28
344	MFRP	1,00	0,68	0,28
345	MIF	1,00	0,68	226,50
346	MIG	1,00	133,78	722,37
347	MIP-1a	47,00	160,26	111,48
348	MIP-1b	1.178,33	1.974,52	1.406,27
349	MIP-1d	201,67	197,84	18,30
350	MIP 2	47,00	90,77	228,65
351	MIP-3 alpha	1,00	0,68	0,28
352	MIP-3 beta	1,00	0,68	0,28
353	MMP-1	150,67	5.567,06	529,38
354	MMP-2	1,00	0,68	93,37
355	MMP-3	1,00	41,42	1.454,63
356	MMP-7	9,33	0,68	122,59
357	MMP-8	20,00	181,54	252,37
358	MMP-9	5.337,67	284,99	117,73
359	MMP-10	1,00	74,02	958,96
360	MMP-11 /Stromelysin-3	221,00	604,60	150,22
361	MMP-12	1,00	0,68	34,64
362	MMP-13	1,00	0,68	47,52
363	MMP-14	1,00	0,68	92,62
364	MMP-15	1,00	0,68	32,30
365	MMP-16 / MT3-MMP	1,00	0,68	0,28
366	MMP-19	1,00	0,68	0,28
367	MMP-20	1,00	0,68	0,28
368	MMP-24 / MT5-MMP	1,00	0,68	44,72
369	MMP-25 / MT6-MMP	1,00	0,68	0,28
370	Musk	69,33	731,14	77,96
371	MSP alpha Chain	203,67	261,44	187,01
372	MSP beta-chain	179,00	282,04	679,05
373	NAP-2	82,00	127,21	86,08
374	NCAM-1 / CD56	1,00	148,26	209,14
375	Neuritin	1.240,67	1.854,10	517,52
376	NeuroD1	425,33	781,84	73,67
377	Neuropilin-2	13,67	107,75	10,64
378	Neurturin	302,33	276,16	153,96
379	NGF R	1,00	0,68	2,99
380	NOV / CCN3	1,00	0,68	0,28

381	NRG1 Isoform GGF2	1,00	0,68	0,28
382	NRG1-alpha / HRG1-alpha	1,00	0,68	26,98
383	NRG1-beta1 / HRG1-beta1	1,33	0,68	16,25
384	NRG2	386,67	1.261,95	886,04
385	NRG3	66,00	878,04	191,12
386	NT-3	16,33	154,83	63,40
387	NT-4	292,67	354,48	122,03
388	Orexin A	301,33	2,49	81,97
389	Orexin B	1,00	0,68	0,28
390	OSM	860,67	880,99	139,77
391	Osteoactivin / GPNMB	380,67	210,51	4.849,21
392	Osteocrin	1,00	0,68	0,84
393	Osteoprotegerin / TNFRSF11B	16,67	4.040,27	1.386,76
394	OX40 Ligand / TNFSF4	1,00	0,68	3,92
395	PARC / CCL18	1,00	5,66	3,83
396	PD-ECGF	1,00	0,68	0,28
397	PDGF R alpha	1,00	16,07	13,54
398	PDGF R beta	1,00	4,98	6,16
399	PDGF-AA	1,00	0,68	6,91
400	PDGF-AB	20,00	151,66	7,47
401	PDGF-BB	1,00	19,47	0,28
402	PDGF-C	62,00	46,18	7,84
403	PDGF-D	6,33	1,36	0,28
404	PECAM-1 /CD31	1,00	0,68	0,28
405	Pentraxin3 / TSG-14	1,00	717,78	268,24
406	Persephin	1,00	0,68	0,28
407	PF4 / CXCL4	429,00	373,04	176,74
408	PIGF	1,00	0,68	195,13
409	PLUNC	1,00	0,68	0,28
410	Pref-1	1,00	0,68	97,10
411	Progranulin	1.580,33	4.019,90	1.505,98
412	Prolactin	59,00	324,60	386,07
413	P-selectin	1,00	0,68	52,56
414	RAGE	21,00	0,68	37,25
415	RANK / TNFRSF11A	68,33	20,60	0,28
416	RANTES	1,00	0,68	255,17
417	RELM beta	71,00	35,54	204,56
418	RELT / TNFRSF19L	18,00	42,10	81,51
419	ROBO4	1,00	6,56	0,28
420	S100 A8/A9	763,67	1.266,48	268,80
421	S100A10	1,00	0,68	0,28
422	SAA	1,00	0,68	0,28
423	SCF	5.00	29.88	47.34

424	SCF R /CD117	1,00	0,68	11,67
425	SDF-1 / CXCL12	1,00	416,27	0,28
426	sFRP-1	1,00	72,89	127,91
427	sFRP-3	37,67	173,39	20,54
428	sFRP-4	102,33	296,30	141,36
429	sgp130	135,00	27,16	59,47
430	SIGIRR	67,67	88,96	632,55
431	Siglec-5/CD170	17,00	15,85	1,87
432	Siglec-9	5,33	28,29	62,65
433	SLPI	1,00	1,81	0,28
434	Smad 1	1,00	0,68	0,28
435	Smad 4	1.202,00	2.225,10	917,31
436	Smad 5	1,00	0,68	0,28
437	Smad 7	1,00	0,68	0,28
438	Smad 8	1,00	0,68	0,28
439	SMDF / NRG1Isoform	1,00	0,68	8,12
440	Soggy-1	1,00	0,68	0,28
441	Sonic Hedgehog (Shh N-terminal)	1,00	0,68	0,28
442	SPARC	1,00	0,68	38,47
443	Spinesin	1,00	0,68	0,28
444	TACI / TNFRSF13B	1,00	0,68	3,55
445	Tarc	1,00	0,68	0,28
446	TCCR / WSX-1	1,00	0,68	0,28
447	TECK / CCL25	1,00	0,68	0,28
448	TFPI	1,00	0,68	0,28
449	TGF-alpha	1,00	0,68	0,28
450	TGF-beta 1	1,00	6,34	300,45
451	TGF-beta 2	1,00	0,68	2,99
452	TGF-beta 3	1,00	0,68	2,15
453	TGF-beta 5	1,00	3,40	1,31
454	TGF-beta RI / ALK-5	1,00	0,68	0,28
455	TGF-beta RII	1,00	0,68	0,28
456	TGF-beta RIIb	1,00	0,68	0,28
457	TGF-beta RIII	1,00	0,68	7,56
458	Thrombopoietin (TPO)	1,00	9,96	0,28
459	Thrombospondin (TSP)	2.729,33	3.805,09	6.258,28
460	Thrombospondin-1	6.132,33	6.618,49	6.514,66
461	Thrombospondin-2	24,67	131,74	24,84
462	Thrombospondin-4	42,67	0,68	0,28
463	Thymopoietin	1,00	0,68	4,39
464	Tie-1	1,00	0,68	0,28
465	Tie-2	1,00	0,68	0,28
466	TIMP-1	3.878.67	5.152.37	2.262.71

467	TIMP-2	1,00	440,72	217,07
468	TIMP-3	1,00	0,68	0,28
469	TIMP-4	1,00	0,68	0,28
470	TL1A / TNFSF15	1,00	0,68	0,28
471	TLR1	1,00	0,68	0,28
472	TLR2	17,67	0,68	91,59
473	TLR3	1,00	0,68	0,28
474	TLR4	1,00	0,68	0,28
475	TMEFF1 / Tomoregulin-1	13,00	20,15	12,42
476	TMEFF2	1,00	102,99	240,60
477	TNF-alpha	426,00	2.734,86	241,26
478	TNF-beta	226,33	1.487,40	547,96
479	TNF RI / TNFRSF1A	1,00	0,68	29,60
480	TNF RII / TNFRSF1B	1,00	0,68	8,22
481	TRADD	1,00	1,58	0,28
482	TRAIL / TNFSF10	1,00	0,68	0,28
483	TRAIL R1 / DR4 / TNFRSF10A	10,33	146,23	25,77
484	TRAIL R2 / DR5 / TNFRSF10B	1,00	0,68	0,28
485	TRAIL R3 / TNFRSF10C	1,00	0,68	24,46
486	TRAIL R4 / TNFRSF10D	299,00	357,19	88,23
487	TRANCE	164,33	255,11	184,49
488	TREM-1	132,67	119,29	79,17
489	TROY / TNFRSF19	1,00	0,68	0,28
490	TSG-6	72,33	156,41	14,85
491	TSLP	24,00	43,01	0,28
492	TWEAK / TNFSF12	1,00	2,72	0,28
493	TWEAK R / TNFRSF12	1,00	0,68	0,28
494	Ubiquitin+1	4.826,33	7.574,86	4.968,53
495	uPA	1,00	0,68	0,28
496	uPAR	6,67	0,68	42,85
497	Vasorin	1,00	0,68	39,31
498	VCAM-1 (CD106)	1,00	0,68	0,28
499	VE-Cadherin	1,00	0,68	0,28
500	VEGF	63,67	869,67	712,38
501	VEGF R2 (KDR)	1,00	0,68	0,28
502	VEGF R3	1,00	0,68	19,05
503	VEGF-B	1,00	14,94	145,09
504	VEGF-C	1,00	372,36	1.903,91
505	VEGF-D	1,00	0,68	0,28
506	VEGI / TNFSF15	29,67	142,83	62,74
507	WIF-1	1,00	0,68	167,31
508	WISP-1 / CCN4	16,67	110,46	21,29
509	XEDAR	1.00	0.68	0.28

A.6 Durchflusszytometrische Analysen der mesenchymalen Stammzellen



Abbildung A.4: Durchflusszytometrische Analyse der mesenchymalen Stammzellen (in allen drei Versuchen verwendet).

A.7 ELISA

SAY THOI ASUI FERI TO I	N D R F	R. 2	.1		' I	T - (
THO ASUI FERI TO	D R F						3									
АТЕ	FN LA T	MENT CE F YOUT AYOU	FTI ILTF T	TEF R	>		Q1 1 5 N	uantit 50 pm 40 nm 5 sper	tativ	e -> auto	Sta Iay	nda out	rd Cu tunc	rve, tion	Concer used.	ntratio
1		Ţ	2		1		L	ţ	ų.	ų		6	10	11	12	
51	1	54			1	13	Ð	10	18	18	1	2.6	26	34	1 34	1
81	1	S 1	1 2	2 1	2	1 1	1	11	19	1 1 9	1 1	27	27	3.5	35	-+ B
S 2	1	S 2	1 1	3	3	()	2	12	20	20		28	28	36	36	-+ C
S 3	;	S 3	4	L į	4	1	3	13	21	21	1	29	29	37	37	10
S 4	4	84	1	>	5	1 3	4	14	22	22		3.0	3.0	3.8	3.8	-+ ! R
85	1	85	1 6	+- >	6	1	5	15	23	23		31	31	39	1 30	-+ ! P
86	1	S 6		/ !	.,	• 1	6	16	24	24	1	32	32	4.0	+ 4.0	16
8	,	8	1 9) (9	1 1	.7	17	1 25	1 25	1	33	33	41	1 4 1	-+
2	-+	2	-+		!	+	ŀ.	5	÷ .,	R		q	+ יח	-+	13	
'RIP 'AND 'AND 'AND 'AND 'AND IITS JRVE) SH	S AF AF AF AF AF AF	ND S1 ND S2 ND S3 ND S4 ND S5 ND S6 DF CC FIT M KING	DNCEN 10DE	JTR/	ATION	ſ	: 1 = = = : P : L	2-wc1 3.120 6.250 12.50 25.00 50.00 100.0 G/ML INE 1	1 (hd	orizo Og	ntal)				
	I I I I I I I I I I I I I I I I I I I	TRIPS S1 S1 S1 S1 S2 S5 S5 S5 S5 S5 S5 S5 S5 S5 S5	I I 1 1 51 51 51 51 51 51 S1 51 S2 52 S3 53 S4 54 S5 55 S6 56 8 8 2 2 RIPS 3NDARD S1 ANDARD S2 3NDARD S2 ANDARD S2 3NDARD S2 SNDARD S6 ITS OF CC IVE FIT NO SHAKING	I I	I 1 7 ATE LAYOUT I 1 ATE LAYOUT I 1 S1 I 51 1 S1 I S1 2 S2 I S2 3 S3 I S2 3 S4 S4 S4 5 S5 I S5 6 S4 S5 I 6 S5 I S5 6 S4 S5 I 6 S5 I S5 6 S4 S5 I 7 8 8 9 1 1 2 3 3 RIPS Image: Similar Simila	1 7 4 ATE LAYOUT 1 1 51 51 1 1 51 51 1 1 81 51 2 2 82 52 3 3 53 53 4 4 54 54 5 5 55 55 6 6 86 8 9 9 1 2 3 1 8 8 9 9 1 2 3 1 8 8 9 9 1 2 3 1 8 8 9 9 1 2 3 1 8 8 9 9 1 2 3 1 8 8 9 9 1 2 3 1 8 8 9 9 1 2 3 1 8 8	I 1 1 1 1 1 ATE LAYOUT I 1 1 1 1 1 51 51 1 1 1 1 1 1 1 51 51 1 1 1 1 1 1 1 S1 S1 S1 2 2 2 1 1 S2 S2 S2 3 3 1 1 1 1 1 S2 S2 S2 3 3 1	I 1 2 I I NATE LAYOUT I NATE LAYOUT ATE LAYOUT I 1 I 1 1 I 10 S1 I S1 I I I I 10 S1 I S1 I I I 10 S1 I S1 I I I 10 S1 I S1 I I I 10 S2 I S2 I I I 10 S2 I S2 I I I 10 S4 S4 S4 S I I I S5 I S5 I I I I S6 I S5 I I I I I RIPS I I I I I I I I I I I I I I I I I S6 I	I 1 1 1 1 10 10 ATE LAYOUT : No spec 1 1 1 1 10 10 S1 1 1 1 10 10 S2 1 1 1 10 10 S3 53 4 4 13 13 S4 54 5 5 14 14 S5 55 6 6 15 15 S6 55 6 6 15 15 S6 55 6 6 17 17 1 7 1 5 16 16 8 8 9 9 17 17 1 7 1 5	I 1 1 1 1 10 130 131 ATE LAYOUT : No special 1 1 1 10 10 18 51 51 1 1 10 10 18 S1 S1 S1 2 2 11 11 10 18 S1 S1 S1 2 2 11 11 11 19 S2 S2 3 3 12 12 20 S3 S3 S3 4 4 13 13 21 S4 S4 5 5 14 14 22 S5 S5 6 6 15 15 23 S6 S6 7 7 16 16 24 8 8 9 9 17 17 25 1 3 1 2 5 7 24 8 8 9 9 17 17 25 <tr< td=""><td>I I</td><td>I 1</td><td>I 1</td><td>I 1</td><td>Image: Control of the second secon</td><td>FREENCE FILLION 1</td></tr<>	I I	I 1	I 1	I 1	Image: Control of the second secon	FREENCE FILLION 1

120

ANTHO Plate	S 2001 :	1	Assay Assay	Result 27: IL-	Printout -6	22-JA	N-2008	14:35:57 Page 1
Measu Reter Blank Metho	rement l enco Fi mode d	¶ilter Iter	: 4 : 54 : Ax : Qi	0 nm 0 nm verage of antitat:	t individu ive Evalua	al blank tion	positions	
OPTD	FNS.	Moor. In a station is				nn sann sann sann sann an sa		ui.
								area anna Arman
							, R	
						, cì, , t		1900 - 1900 - 1900 - 1900 - 1900 - 1900 - 1900 - 1900 - 1900 - 1900 - 1900 - 1900 - 1900 - 1900 - 1900 - 1900 -
n n National a						₹ ¥		an and and and and and and and and and a
	der lauf of definition							
								Contract of the second s
ng Sing In Second								
. 19 I								
	an a	n ha dan magana an Tanan Ing Tanan Ing Ka			i di	.5 <u>1</u> 2	in define er nige reneres 199	
				CONCEN	TRATION ->			
Units Curve Corre Slope Ottse	of Cond -fit Mod Lation ((m) t (y-coe	centra le Coetti ettici	tion cient ent)	: PG/ML : LINE 1 : .998 : .964 : -2.080	log/log)			
STD.	CONC. C	DDs of	indiv	idual we	2115	OD	-MEAN CV [%] CALC.C
S 1	3.120 1	301:	.025	B02: .(21		.023 12.	30 2 869

81	3.120	B01:	.075	B02:	.021	.023	12.30	2.869
S2	6.250	C01:	.062	C02:	.038	.050	33.94	6.418
S3	12.50	D01:	.120	D02:	.091	.105	19.44	13.92
S4	25.00	E01:	.183	E02:	.189	.186	2.28	25.06
\$5	50.00	F01:	.352	F02:	. 362	.357	1.98	49.27
86	100.0	G01:	.673	G02:	.689	.681	1.66	96.26

Delete standards (y/n) ?





H02: 2.085

3.62

2.033

Delete standards (y/n) ?

S'/

ANTHOS 2001 Assay Parameter Listing 18-JAN-2008 15:04:59

A	SSAY	NR	2. 28	8	'G	-CSF'								
M R A P	METHOD: Quantitative -> Standard Curve, ConcentrationMEASUREMENT FILTER: 450 nmREFERENCE FILTER: 540 nmAUTO LAYOUT: No special auto layout function used.PLATE LAYOUT:													
	1		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A .	ЬΙ	1	ЬI	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33	τ λ
B	S 1		S 1	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34	F B
C.	S 2		S 2	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35	, ; c
D	S 3	1	S 3	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36	D
R.	S 4	1	S 4	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37	: В
F	\$ \$ 5		S 5	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38	, ; P +
G	\$6	 -+	S 6	7	1 7	15	15	23	23	31	31	39	39	; G +
H	S7		S 7	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40	! H
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12														
S S S S S S S S S S S S S S S S S S S	TRIP TAND TAND TAND TAND TAND TAND NITS URVE O SH	ARI ARI ARI ARI ARI ARI ARI ARI ARI ARI) S1) S2) S3) S4) S5) S6) S7 F C0 F C0 F C0 F MO ENG	NCENTF DDE	ATION	: 8 = = = = : P : L	-well 39.00 78.00 156.0 312.0 625.0 1250 2500 G/ML INE 10	(vert	ical)					

A.8 Bisherige Veröffentlichungen

- 1. Abstract der Posterveröffentlichung, erschienen im Programm des "2nd Congress of the German Society for Stem Cell Research; Würzburg, October 4-6,2007"
- 2. Poster ausgestellt auf dem "2nd Congress of the German Society for Stem Cell Research; Würzburg, October 4-6,2007"
- 3. Abstract der Posterveröffentlichung, erschienen im Programm des "36th Annual Scientific Meeting of the ISEH Society for Hematology and Stem Cells"
- 4. Poster ausgestellt auf dem "36th Annual Scientific Meeting of the ISEH Society for Hematology and Stem Cells"

Co-culturing of in vitro erythropoiesis with extra cellular matrix proteins

G. Meyer, P. Lazar-Karsten, U. Lindner, B. Driller, I. Dorn, P. Schlenke.

Objective: Erythropoiesis proceeds in so called hematopoietic microenvironments or niches, in which stroma cells produce extra cellular matrix molecules. To investigate the influence of these molecules on proliferation and differentiation we used an established in vitro Erythropoiesis system in co-culture with different matrix proteins.

Material and Methods: Human CD34+ cells were isolated and cultured over 16 days in a two-phase liquid assay (d1-d8 SCF, EPO, IGF-1, steroids; d9-d16 EPO, insulin) in 6 well plates coated with Laminin, Collagen, Fibronectin or Extra Cellular Matrix (ECM). An uncoated plate was used as a negative control. Cell viability was determined by trypan blue staining and microscopic examination. To measure cell proliferation, vital cells were enumerated using a Neubaucr counting chamber. Cell growth and differentiation was evaluated by flow cytometry and cytospin preparations on each day of analysis.

Results: A total of 5 experiments were performed. At the end of the culture more than 95% of the cells of the control culture were glycophorin A positive and therefore clearly of erythroid nature. According to cytospins, cells showed morphological characteristics of normoblasts (50%) and reticulocytes (45%). The cells cultured with ECM showed the best vitality (91%) compared with the other cultures. The proliferation rate assessed in different culture conditions showed no significant difference. On the last day of culturing the control culture showed the highest amount of erythroid cells compared to cells cultured on proteins.

Conclusion: The hematopoietic niche or microenvironment provides *in vivo* the optimum condition for proliferation and differentiation of erythroid precursers. Our aim was to optimize the *in vitro* Erythropoiesis by co-cultivating the erythroid precursor with extra cellular matrix proteins. However our experiments showed that the *in vitro* Erythropoiesis could not be optimized by adding matrix proteins to the culture.

A Anhang



126

Influences of age, hypoxia and extracellular matrix proteins on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells

U. Lindner, B. Driller, F. Boehrnsen, G. Meyer, J. Kramer, J. Rohwedel, J. Behrends, N. Wendler, P. Schlenke

Purpose: In the past decade, there has been much interrest in the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells (hMSCs), giving rise to several mesodermal lineages. Up to now, there is still a lack of knowledge about parameters, affecting the in-vitro and in-vivo behaviour of hMSCs. In this study, we examined the effects of age of donors, oxygen deprivation, and basementmembrane extracellular-matrix (ECM) proteins on the in-vitro expansion and differentiation of hMSCs.

Methods: hMSCs, obtained from bone marrow of 22 donors (age 21-84), were analyzed by determination of proliferation rate, morphological features and viability, and phenotypically characterized by fluorescence activated cell sorting. The differentiation capacity was examined by histochemical and immunhistochemical staining procedures, photometric and fluorometric quantification protocols, as well as RT-PCRs. Telomerase activity was defined by PCR and ELISA.

Results: The capacity of hMSCs to proliferate and differentiate decreased with increasing age, except the adipogenic potential. Hypoxia enhanced expansion of hMSCs, resulting in 20-fold (5% O₂) oder 30-fold (1% O₂)higher growth rates after 60 days, when compared to normoxia. In addition, more Oct-3/4 and STRO-1 positive stained cells appeared. Under oxygen deprivation, only temporal varieties were found for the differentiation into osteoblasts, however chondrogenesis was promoted. In general, bmECM-proteins (for example: Laminin S, Laminin 5, Collagen IV) also improved proliferation and differentiation, while adding of specific bmECM antibodies inhibited these processes. Combining hypoxia and bmECM proteins led to once more advanced growth rates and differentiation capability for all lineages. Rapidly proliferating RS cells subpopulations were more pronounced in hypoxic and bmECM-treated cell cultures, as well as in early passages and samples from young donors.

Conclusions: In-vitro proliferation and differentiation capability of hMSCs is highly age-dependent. Hypoxia and bmECM proteins are valuable tools for an effective in-vitro expansion and differentiation of hMSCs, suited for clinical applications.



Influences of Age, Hypoxia, and Extracellular Matrix on Proliferation and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Lindner U¹ Driller B¹ Böhrnsen F² Kramer ³⁷ Rolwedel ³⁷ Behrends ³ Wendler N³ Meyer G³ Schlenke P¹ ⁴ Institute of Immology and Transfusion Medicine, University of Luebeck ⁴ Institute of Molecular Medicine, University of Luebeck ⁴ Clinic for Orthopadic Surgery, University of Luebeck

C



Human bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) can differentiate into bone, carillage, tendon, muscles or adipose tissue. So they might be an important tool for tissue regeneration such as cariliage repair or bone replacement in the near future. While embryonic stem cells have an unlimited proliferative life span, in-vitre expanded MSCs show a short proliferative longevity, combined with low replication capacity, and an increased loss of differentiation potenetial during the culture period. We investigate the influences of basement membrane extracellular matrix (bmECM) proteins, hypoxia, and age on the meinode parameters to setablish an effective in-vitro model for the expansion and re-injection of autologous human MSCs.



Fig. 1: Bone morror derived MeCC were obtained from fenoral shaft of patients undergoing total hip replacement. Cells were co-cultured with bmECM protons luminin 1 Januini 5, collagon IP, fibronectin, ECM/gd, which constant all bmECM components and additionally growth federes. Material and Methods

Cells were cultured under normoxic and hypoxic conditions (2% and 5% O₂) for five passages. At the end of every passage, cells were counted to proof replicative capacity. Phenotyping of cells and analysis of STRO-1/Alkaline Phosphatase antigen expression were performed every second and fifth passage via flow cytometry. At the same time, the differnitation into the three classical lineages (osteoblasts, adipo-, and chondrocytes) were induced for 28 days. To quantify differnitation potential, stained cultures of adipocytes were photographed to determine size and number by CellExplorer2003*Software. Glycosaminglycan content of cartilage micromass bodies was measured photometrical. Alkaline phosphatase activity of osteoblasts was quantified fluorometrical.



r ag ... services of the projection for projection of quantity, and approximation experity in addicated (Math Mathematicated and the service of the dense mathematicate of the service of the dense mathematicate of the service of the dense mathematicate of the service of the









Fig. 4 : Co-culture samples differed significantly from cell numbers of MSCs seeded on plastic surfaces (gr-80.1)8). Ago-related decline in ECM-gel long-run cultures differed significantly from cell numbers on plastic disko, to uno in ided? EVM gel cultures to younger plastic angles, compass (D. Inhibiton with culture surface antibodies lead to to significant decrease (gr-801) in proliferation capacity in colgen IV, hannin, and ECM-get reated disko. Ko proliferation (was zet as 1), initially 10° cells was observed on iaminin and ECM-get cultures inhibited with laminin5 (and additionally collagen IV) antibodies.

Further Results and Conclusions

ntact : ulilind:

Culturing MSCs under hypoxic conditions and on bmECM proteins leads to higher growth rates, a prolonged maintainence of differentiation potential, and higher expression of stem cell markers like STRO-1 and Oct-34, but the main factor for better in-vitro expansion and differentiation of human mesenchymal stem cell is still the age of the donor. Under the mentioned culture conditions a highly effective in-vitro expansion of MSCs is possible, but these factors are not able to break the border of age...

128

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Holger Kirchner danke ich sehr herzlich für die Möglichkeit, an dem von ihm geleiteten Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, die dieser Dissertationsschrift zu Grunde liegenden Experimente durchzuführen.

Herrn PD Dr. Peter Schlenke danke ich für die anspruchsvolle und interessante Promotionsthematik, seine stete Hilfsbereitschaft und die kameradschaftliche Atmosphäre in seiner Arbeitsgruppe.

Ich bedanke mich bei Frau Birgit Driller für ihre unendliche Geduld und ihr Engagement dabei, mir alle Arbeitstechniken beizubringen und für ihre tatkräftige Unterstützung bei allen Versuchen, bei Tag und Nacht, an jedem beliebigen Tag der Woche.

Frau Pamela Lazar-Karsten, Herrn Dr. Ulrich Lindner und Frau Dr. med. Isabel Dorn möchte ich Dank sagen für die außerordentliche Unterstützung zu allen Zeiten der Dissertation und für die stete Versorgung mit Informations- und Arbeitsmaterialien.

Ich danke allen Forschungsmitarbeitern des ehemaligen Institutes für Immunologie und Transfusionsmedizin für zahlreiche aufmunternde, anregende, kreative, weiterbringende und ratgebende Gespräche wann immer es notwendig war – und das war oft.

Dankbar bin ich den vielen Mitarbeiten verschiedener Einrichtungen die unbürokratisch und kulant zu der Aufklärung und Beseitigung der Kontamination der Zellkulturen mit Mykobakterium avium beigetragen haben; im speziellen Frau Salmon und Herrn Prof. Dr. med. Werner Solbach aus dem Insitut für Mikrobiologie und Hygiene, Frau Dr. Rüsch-Gerdes aus dem Nationalen Referenzzentrum für Mykobakterien in Borstel, allen beratenden Stimmen vieler verschiedener Institutionen und nicht zuletzt Frau Hitz und ihrem Team von der Hauswirtschaft des UK-SH.

Meiner lieben Freundin Karen Fröhlich gilt ebenfalls großer Dank für private Unterstützung zu allen Zeiten, ein stets offenes Ohr für Probleme aller Art und für viel, viel Kaffee.

Für das Ertragen der vielen schwierigen Phasen und seine stete uneingeschränkte Unterstützung danke ich aus tiefstem Herzen meinem Freund Bernhard Klefer.

Nicht zu vergessen schulde ich auch meinen Eltern und meinen Schwestern Dank. Danke, dass trotz aller Neugierde manchmal einfach keine Fragen gestellt wurden.

Curriculum vitae

Gisa Antonia Meyer

Adresse	Hundestr. 2 23552 Lübeck
Geboren am	22. Dezember 1982
Geboren in	Hannover
Nationalität	Deutsch
Familienstand	Ledig



Schule & Studium

1989 - 1993	Grundschule, Rulle
1993 - 1995	Orientierungsstufe, Rulle
1995 - 2002	Kath. Gymnasium St. Angela, Osnabrück
Juni 2002	Abschluss Abitur
ab 2002	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
August 2004	Bestehen des Physikums, Universität zu Lübeck
Juli 2005	Beginn der Promotionsarbeit
August 2007	Eintritt ins Praktische Jahr Chirurgie, Sana Kliniken Innere Medizin, Medizinische Klinik Borstel Psychiatrie, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie UK-SH, Cam- pus Lübeck
Januar 2008	Ende des experimentellen Teils der Promotionsarbeit

24. November 2008