

Aus dem Institut für klinische und experimentelle Transfusionsmedizin
der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Northoff

Einfluss auf Koloniebildung und Migrationsverhalten von adulten humanen mesenchymalen Stammzellen nach Markierung mit Ferritpartikeln

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Michaela Nicole Müller
aus
Freiburg im Breisgau

2012

Dekan
1. Berichterstatter
2. Berichterstatter

Professor Dr. I. B. Autenrieth
Professor Dr. H. Northoff
Professor Dr. H. P. Rodemann

Für meine Eltern

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
bzw.	beziehungsweise
CXCR	Gruppe spezieller Chemokinrezeptoren
CD	Cluster of Differentiation
CFU-F assay	Colony-forming unit-fibroblast assay
d.h.	das heißt
Dkk 1	WNT Inhibitor Dickkopf 1
etc.	et cetera
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fe	Eisen
FCS	Fetales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Erdschwerebeschleunigung ($9,81 \text{ m/s}^2$)
°C	Grad Celsius
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HLA	Human Leukocyte Antigen
(h)MSC	(humane) mesenchymale Stammzellen
HSC	hämatopoietische Stammzellen
IE	Internationale Einheit
IGF	Insulin-like Growth Factor/Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
ISCT	International Society for Cellular Therapy
KM	Knochenmark
MDC	Macrophage-derived Chemokine
ml	Milliliter
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
mM	Millimol
MMP	Matrixmetalloprotease
MT1-MMP	Membrane typ 1 MMP
MRT	Magnetresonanztomographie
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

PTCA	Perkutane Transluminale Coronare Angioplastie
PD	Population doublings
PDGF	Plateled-derived Growth Factor
RLW	Reagenzienleerwert
SDF	Stromal-derived Factor
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt
SPIO	Small Particle of Iron-Oxide
s.u.	siehe unten
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
TA	Transfektionsagens
TGF	Transforming Growth Factor
TIL	total iron load
TIMP	Tissue-Inhibitor der Metalloprotease
TNF	Tumornekrosefaktor
TSH	Thyreidea-stimulierendes Hormon
u.a.	unter anderem
USPIO	Ultrasmall Particle of Iron-Oxide
v.a.	vor allem
Wnt	Zusammengesetzter Begriff aus Wingless und Int-1
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Das Stammzellkonzept	2
1.3	Charakterisierung von hMSC	4
1.4	Migration und Homing	6
1.5	Markierung von hMSC	8
1.6	Klinische Anwendung	10
1.7	Fragestellung	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Materialien	13
2.1.1	Zellkultur	13
2.2	Medien und Chemikalien	14
2.2.1	Kulturmedium	14
2.2.2	Differenzierungsmedien	14
2.2.2.1	Adipogene Differenzierung	14
2.2.2.2	Osteogene Differenzierung	14
2.2.2.3	Chondrogene Differenzierung	15
2.2.3	Fetales Kälberserum (FCS)	15
2.2.4	Antibiotika	15
2.2.5	Accutase	15
2.2.6	Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	15
2.2.7	Platelet-derived growth factor (PDGF)	16
2.2.8	Färbereagenzien	16
2.2.8.1	Zitratfixierung	16
2.2.8.2	Alkalische Phosphatase Färbung	16
2.2.8.3	Oil-Red-Lösung	16
2.2.8.4	Coomassie	17
2.2.9	Kontrastmittel und Transfektionsagenzien	17
2.2.9.1	Resovist®	17
2.2.9.2	Dosper	17
2.2.9.3	jetPEI™	17
2.2.9.4	PULSin™	18

2.3	Methoden	19
2.3.1	Isolation der hMSC	19
2.3.2	Charakterisierung der hMSC	19
2.3.2.1	Adipogene Differenzierung	20
2.3.2.2	Osteogene Differenzierung	20
2.3.2.3	Chondrogene Differenzierung	20
2.3.3	Kultivierung der hMSC	21
2.3.4	Subkultivierung	21
2.3.5	Transfektion und Markierung	22
2.3.6	Subkultivierung nach Transfektion	25
2.3.7	Koloniebildungsassay	25
2.3.8	Migrationsassay	26
2.3.9	Eisenbestimmung	26
2.3.9.1	Probenvorbereitung	26
2.3.9.2	Verdünnung der Probe	27
2.3.9.3	Ansatz für Photometrie	27
2.3.10	Statistik	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Viabilitäten	30
3.2	Eisengehalte	32
3.3	Migrationen	35
3.4	Koloniebildungsassays	41
4	Diskussion	45
4.1	Eisenbeladung und Viabilität	45
4.2	Migrationen	47
4.3	Koloniebildung	49
5	Zusammenfassung	51
	Abbildungsverzeichnis	53
	Tabellenverzeichnis	54
	Literaturverzeichnis	55
	Danksagung	65

KAPITEL 1

Einleitung

1.1 Einführung

Stammzellforschung, Gentherapie und Tissue-engineering sind die Schlagworte der modernen Medizin. Vor allem im Bereich der Stammzellforschung liegt die Hoffnung auf neue Therapieoptionen und Behandlungsmöglichkeiten von bisher schlecht oder unbehandelbaren Krankheiten, z.B. Limitationen der pharmakologischen Therapie, bzw. in der Transplantationsmedizin. Embryonale Stammzellen werden hier als besonders erfolgversprechend erachtet. Allerdings ist die Forschung mit ihnen aus rechtlichen und ethischen Gründen stark limitiert.

Eine Alternative dazu bieten adulte Stammzellen, die sich inzwischen aus vielen Organen isolieren und in Kultur bringen lassen. Ein zunehmendes Interesse ergibt sich hier vor allem für die mesenchymalen Stammzellen (MSC) aus dem Knochenmark. Diese Zellen bieten aufgrund ihres Differenzierungspotenzials, der hohen Koloniebildungsrate, ihres immunmodulatorischen Potentials sowie der einfachen Handhabung zahlreiche Einsatzmöglichkeiten.

Um ihren Verbleib im Organismus bzw. ihr Homing im Zielorgan verifizieren zu können, besteht die Möglichkeit, die verwendeten MSC mit verschiedenen Substanzen, z.B. wie in dieser Arbeit mit Ferritpartikeln, zu markieren. Dieser Vorgang wird Markieren genannt. Nach dem Markieren kann mittels Kernspintomographie der Verbleib der hMSC nicht-invasiv nachgewiesen werden.

1.2 Das Stammzellkonzept

Die Definition der Stammzelle beschreibt eine Zelle, die sowohl in der Lage ist, sich selbst zu erneuern, sowie sich in mehr als ein Gewebe zu differenzieren. Sie bringt also Nachkommen hervor, die verschiedene Funktionen erfüllen können. Zum einen unterscheidet man embryonale Stammzellen. Diese können alle Zelltypen eines Organismus hervorbringen und somit z.B. Herz, Lunge, ZNS und Skelettsystem bilden.

Zum anderen gibt es adulte Stammzellen, die sich in einem bestimmten Organ des postnatalen Organismus befinden und dort verschiedene Zelltypen hervorbringen können, die durch degenerative Prozesse oder Krankheit zugrunde gegangen sind. Das bekannteste Beispiel für adulte Stammzellen sind hämatopoietische Stammzellen, die für die ständige Blutbildung sorgen.

Auch mesenchymale Stammzellen (MSC) sind solche adulten Stammzellen. Erstmals beschrieben wurden sie von Friedenstein et al 1976. Hier wurden sie als Zellen des Knochenmarks beschrieben, die sich in osteogenes Gewebe differenzieren können. Vor allem durch die Arbeit von Pittenger et al 1999 wurde die Differenzierungsfähigkeit in Zelltypen wie Osteoblasten, Chondrozyten, Adipocyten [60] detailliert aufgezeigt. Mittlerweile sind weitere Differenzierungsmöglichkeiten beschrieben. Das Differenzierungspotential zeigt die Graphik Abb.1.1.

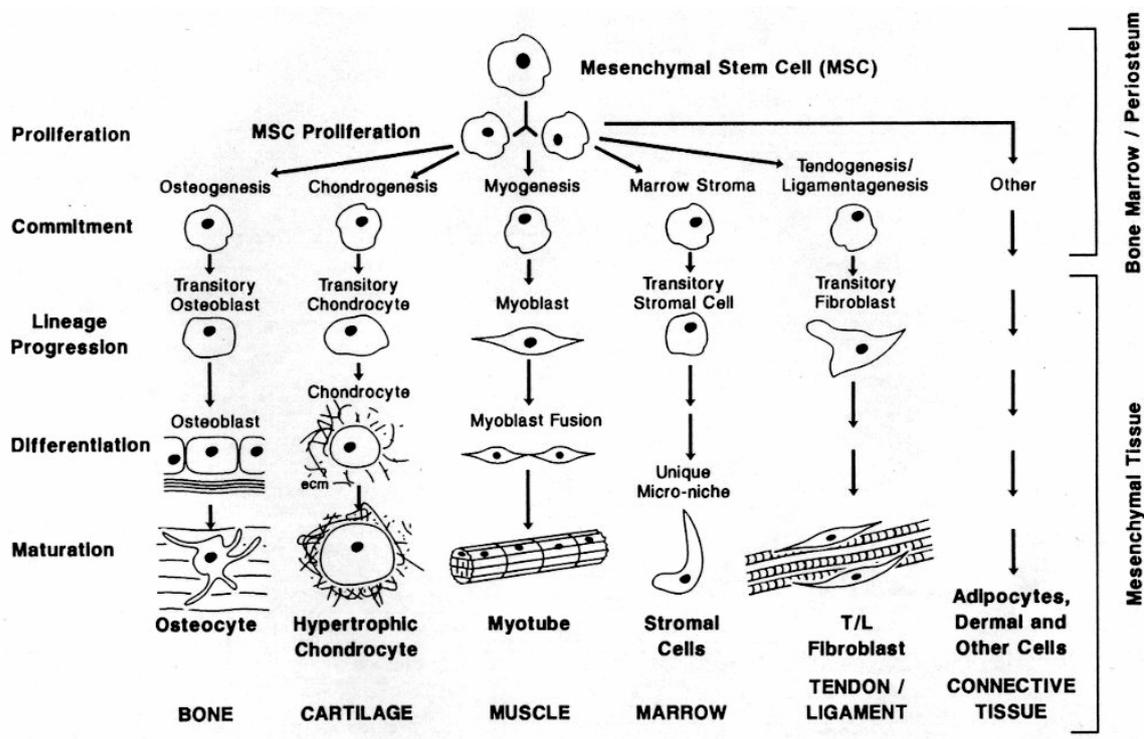


Abbildung 1.1: Differenzierungsmöglichkeiten der hMSC. Aus (Caplan, 1994)

Eine häufig genutzte Quelle für MSC ist das Knochenmark [60]. Allerdings ist diese Möglichkeit der Gewinnung ein sehr invasives Verfahren und nur 0,01 bis 0,001 Prozent der mononuklearen Zellen im Knochenmark sind MSC [60], sodass andere, leichter zugängliche Quellen gute Alternativen darstellen würden. Es gelang der Nachweis, dass auch aus Nabelschnurblut, Plazenta [38], Blut [86], fetaler Leber und sogar aus dem Fettgewebe [43] hMSC gewonnen werden können. Vor allem Nabelschnurblut und peripheres Blut könnten eine gute und leicht zugängliche Quelle für hMSC sein, da diese gewonnenen MSC die gleichen Eigenschaften wie die KM-hMSC haben [79]. Allerdings ist der prozentuale Anteil der hMSC im peripheren Blut sehr gering. Daher müssen die Spender mit GM-CSF stimuliert werden, um diesen Anteil durch Ausschwemmung aus dem Knochenmark zu erhöhen, was allerdings sehr belastend und anstrengend ist.

1.3 Charakterisierung von hMSC

Die erste umfangreichere Charakterisierung der hMSC führte Pittenger et al 1999 durch. Aufgrund der Heterogenität der Präparationen haben hMSC anders als homogene Zelllinien keine für sie alleine typischen Marker. Dies macht die Bestimmung von hMSC aufwändig und schwierig.

Die International Society for Cellular Therapy (ISCT) stellt daher drei Kriterien auf, um Zellen als MSC zu charakterisieren: Zum einen müssen sie an Plastikoberflächen adhaerieren können. Diese Isolierungsmethode mit speziellem Kitsystem nutzte auch Pittenger et al 1999. Des Weiteren sollten sie positiv für Antigene wie CD 105, CD 73 und CD 90 und gleichzeitig negativ bezüglich hämatopoietischer Antigene wie CD 45, CD 34 und Marker für Monozyten, Makropagen und B-Zellen sein. Das Fehlen von CD 34, CD 14, und CD 45 macht die Unterscheidung zu den hämatopoietischen Stammzellen möglich [7]. Des Weiteren müssen die MSC die Fähigkeiten haben, sich unter Standardbedingung zu Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten zu differenzieren [21]. Als Goldstandard gilt damit das so genannte colony-forming unit-fibroblast (CFU-U) assay, welches adhärens, spindelförmige Zellen nachweist [8]. Eine weitere Möglichkeit ist die positive Selektion der MSC durch den Nachweis der Oberflächenmarker CD 49a, Stro-1, CD 133 [78], [18], [19]. Isolation und Assays für MSC wurden schon von Caplan Ende der 80er Jahre beschrieben [14]. Wie in Abbildung 1.2 deutlich wird, kann ein spezifischer Oberflächenmarker nicht zugeordnet werden. So exprimieren hMSC zusätzlich weitere Oberflächenmarker wie CD 44, CD 106, CD 166, CD 29, CD 117, Sca-1 [41].

hMSC exprimieren verschiedene Adhäsionsmoleküle, Extrazellulärproteine, Cytokine und Growth-Faktor-Rezeptoren, die in Assoziation mit der Interaktion im Knochenmark gebracht werden [20].

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

Abbildung 1.2: Oberflächenmarker von hMSC. Aus (Deans and Moseley, 2000)

1.4 Migration und Homing

Die genauen Bedingungen von Migration und Homing, d.h. das Einwandern der MSC in Organe bzw. Gewebe konnten bis heute noch nicht vollständig erklärt werden [67]. Mehrere Studien zeigen, dass die Migration von gesundem Gewebe in geschädigtes Gewebe von Cytokinen und Chemokinen beeinflusst wird [29], [47].

Beispiele von Faktoren, die die Migration beeinflussen, sind SDF1, CXCR4, HGF und Matrixmetalloproteasen. SDF1 und HGF werden bei Organschäden hochreguliert [75]. Dies könnte erklären, dass hMSC vom Knochenmark in verletztes Gewebe migrieren und dort die Wundheilung induzieren können [48]. Des Weiteren unterstützen MSC die Regeneration von geschädigtem Myokard [42], [61]. Hierfür wird Monocyte Chemotactic Faktor als ein myokardialer Homingfaktor angesehen [70].

Ries et al gelang der Nachweis, dass die Migration von Matrixmetalloproteasen beeinflusst wird. Die Expression im geschädigten Gewebe von MMP-2 und MT1-MMP fungieren als Chemoattraktoren von MSC. Diese dadurch induzierte Migration wird durch die Zugabe von MMP-Inhibitoren, Tissue-Inhibitor der Metalloprotease TIMP-1 und TIMP-2 blockiert [67].

Vor allem bei geschädigtem Gewebe kann eine Migration und Homing beobachtet werden. Sezernierte Faktoren wie die Cytokine TGF-beta-1, IL 1 beta und TNF alpha führen über eine Stimulation von MMP-2 und MTP1-MMP zu einer starken Induktion von Migration [67]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass TNF alpha das Homing im mikrovaskulären Myokard nach Schädigung erhöht [72].

Ein weiterer Homingfaktor von hMSC ist CXCR4, ein Chemokinrezeptor [34], [84]. Allerdings exprimieren nicht alle MSC CXCR4 und dieser Rezeptor ist unter normalen Kulturbedingungen an der Oberfläche nur gering exprimiert [84]. Unter Scherkräften wird der CXCR4-Rezeptor jedoch verstärkt auf der Oberfläche von MSC nachgewiesen. CXCR4 erhöht die Migration und das Homing im Gewebe [74].

SDF1 fördert vor allem die Koloniebildung und Migration von MSC [1]. SDF1 wird besonders im Knochenmark exprimiert, allerdings wirkt dieser Faktor eher limitierend auf die Koloniebildung bei gleichzeitiger Stimulation des Homings [62].

Bei Ratten konnte gezeigt werden, dass die Achse SDF1-CXCR4 zu einem Homing von KM-MSK in geschädigtem Gehirngewebe führt [40].

Ein weiterer Rezeptor, der die Migration fördert, ist CD 44 mit dem Liganden Hyaluronsäure. Hyaluronsäure wird vor allem vom Knochenmark produziert und reguliert die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion [30]. Möglicherweise erklärt sich dadurch der positive Effekt von MSC auf HSC. Zusätzlich reguliert CD 44 unter anderem die Koloniebildung, Differenzierung und Migration von MSC im Gewebe [30].

Auch Integrine spielen eine große Rolle bei Zellmigration und Invasion in das Gewebe [37], [80]. Das Homing im Knochen wird unter anderem durch die Expression von Alpha-4-Integrin (CD 49d) vermittelt [46].

Weitere Möglichkeiten, die Migration und Koloniebildung zu stimulieren, sind Wachstumsfaktoren. HGF stimuliert die Zellmigration, aber nicht die Koloniebildung von MSC. Über diesen Faktor ist es möglich die Migration zu erhöhen [57]. Der wirkungsvollste Faktor mit Auswirkung auf Koloniebildung und Migration ist der PDGF-Rezeptor. Dieser ist involviert in Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen [62].

Eine Steigerung der Migration und des Homings um bis zu 40 Prozent ist ebenso über den Wnt3a Pfad möglich. Durch die Erhöhung von beta-Catenin wird dieser Signalweg stimuliert und die Migration verstärkt [56].

1.5 Markierung von hMSC

Damit die Zellen nach der Applikation mittels MRT dargestellt werden können, müssen sie markiert werden. Eine wichtige Anforderung an eine Markierungssubstanz ist, dass diese keinen Einfluss auf die Zellviabilität, Koloniebildung und Differenzierung haben soll. Weiterhin dürfen keine Wechselwirkungen mit der Zellumgebung auftreten und die Substanz muss eine bestimmte Zeit in der Zelle verbleiben. Zudem soll sie gut nachweisbar sein.

Das Markieren kann auf zwei verschiedene Arten erfolgen: Zum einen mit einer paramagnetischen Substanz wie z.B. Gadolinium [52], [16] oder mit einer supraparamagnetischen Substanz wie z.B.:

- Small Particle of Iron Oxide (SPIO) mit einem hydrodynamischen Durchmesser $>50nm$ oder
- Ultra Small Particle of Iron Oxide (USPIO) mit einem hydrodynamischen Durchmesser von $<50nm$.

[64], [85], [71].

SPIO ist ein MRT-negatives Kontrastmittel [83], ein sogenanntes Nanopartikel, bestehend aus einem Eisenoxidkern und einer Hülle entweder aus Dextran oder einem Carboxydextran wie in unserem Fall Resovist® (Ferucarbodextran) [12].

SPIO hat im Vergleich zu anderen Markierungssubstanzen eine größere Signalstärke im MRT [12] und ist zugleich am sensitivsten für MRT [11], d.h. dass auch sehr kleine Mengen entsprechend wenigen markierten MSC noch gut nachgewiesen werden können.

SPIO ist nicht toxisch und hat keinen negativen Effekt auf Koloniebildung und Differenzierungspotential von MSC [3], [6], [23]. Sowohl USPIO und SPIO sind etablierte Substanzen, die sich unter einem Kernspintomografen mit der Stärke von 1,5 Tesla nachweisen lassen [69], wobei sich allerdings SPIO als Mittel der Wahl zum Nachweis der markierten Zellen durchgesetzt hat [12].

Der Nachweis von markierten MSC gelang in ischämischem Schweinemyokard, Rattenhirnen und -nieren [45], [50], [28]. Hierbei hat sich das MRT vor allem zur Verfolgung

und Nachweis von MSC beim Myokard etabliert [2]. Weiterhin konnte das Homing von MSC im MRT bei Gehirn, Skelettmuskel und Myokard [28] nachgewiesen werden. Der MRT-Nachweis gelang hierbei bis zu 5 Wochen nach Applikation von SPIO/USPIO (5 Wochen bei Resovist®, 3-4 Wochen bei Endorem)[39].

Zusätzlich zu SPIO werden noch sogenannte Transfektionsagenzien (TA) verwendet. Diese TAs sind hoch angereicherte Makromoleküle, die über elektrostatische Interaktion beispielsweise DNA in die Zelle transportieren [5], [4]. Sie eignen sich aber ebenso zum Transport von SPIO in die Zellen [23], [33], da sie die Aufnahme von Eisen durch Endozytose oder durch passive Aufnahme durch die Zellmembran ermöglichen [17].

Mehrere Arbeiten zeigten, dass das Markieren mit SPIO und TA keine Auswirkung auf Zellviabilität und Differenzierungspotential hat, sodass SPIO bereits häufig zum Markieren von MSC eingesetzt wird: Arbab et al wiesen nach, dass das Markieren mit Eisen keinen Einfluss auf das Differenzierungspotential oder die Koloniebildung von MSC hat [6]. Eine weitere Arbeit von Hsiao et al. zeigt, dass die alleinige SPIO Markierung weder eine Auswirkung auf die Viabilität noch auf die Koloniebildung oder das Differenzierungspotential von MSC hat[36].

Allerdings gibt es auch andere Arbeiten, die verschiedene Auswirkungen auf das Differenzierungspotential oder auf die Zelle selbst nachweisen konnten: Schäfer et al zeigten hierbei, dass die Eisenbeladung zu einer Hochregulation der Transferrinrezeptoren bei Ratten-MSC führt [69]. Weiterhin beeinflusst SPIO möglicherweise das chondrogene Differenzierungspotential [44], [13]. Möglich sind auch Auswirkungen auf das therapeutische Potential der MSC. Es ist nicht bekannt, inwieweit das Markieren die therapeutische Kapazität beeinflusst. Amsalem et al zeigten, dass nicht markierte Zellen größere Effekte auf die LV-Funktion haben als markierte. Allerdings war hier die Statistik nicht signifikant [2]. Auch Hill et al zeigten in ihrer Arbeit ähnliches: Bei der Injektion von markierten MSC in Schweinemyokard mit ischämischen Arealen gab es bei den markierten MSC keinen Hinweis auf eine myokardiale Differenzierung [31].

1.6 Klinische Anwendung

Aufgrund der hohen Selbsterneuerungs- und Koloniebildungsrate von MSC besteht die Möglichkeit zum Gentransport als Vehikel für Gentherapie und Organregeneration [65]. Ideal wären MSC zum Einsatz gegen Metastasen, Autoimmunkrankheiten sowie in der regenerativen Medizin. Da hMSC keine HLA II-Oberflächenantigene exprimieren, zeigen sie, nachdem sie in verschiedene Gewebe wie Knochenmark, Muskel, Gehirn, Lunge, Leber und Herz gewandert sind, nach der Transplantation keine inflammatorische Reaktion [79].

Zum Einsatz kommen hMSC bereits bei hämatopoietischen Erkrankungen. hMSC geben den hämatopoietischen Stammzellen eine geeignete Umgebung und sorgen so für eine bessere Annahme der Stammzellen [63], [51]. hMSC fördern Homing und Engraftment von hämatopoietischen Stammzellen im Knochenmark [27].

Auch bei der nach Transplantationen auftretenden Graft-versus-Host-Disease könnten MSC von Nutzen sein. Indem hMSC die Proliferation von T-Lymphozyten inaktivieren [49], [58], [10], würde diese Immunreaktion möglicherweise ganz unterdrückt.

Wie zuvor schon geschildert, migrieren und homen MSC vor allem in geschädigten Geweben. So wäre ein weiteres Einsatzgebiet die Regeneration von Strahlenschäden, die bei Tumorbehandlung auftreten [53], da dieses Gewebe gezielt erreicht werden könnte.

Vor allem kardiovaskuläre Erkrankungen könnten ein großes Einsatzgebiet für hMSC werden [61]. Bei Ratten führten intravenös oder kardial injizierte MSC zu einer verbesserten Vaskularisierung und kardialer Funktion nach Herzinfarkt [77], [55]. Hierbei zeigte sich, dass die beste Zeit für eine Injektion der MSC und dem vollen Nutzen ihres Potenzials der Zeitraum bis zu drei Wochen nach Myokardinfarkt ist [82].

Auch bei bisher nicht kurierbaren Nierenerkrankungen, die häufig zur Dialyse und letztendlich zur Transplantation führen, könnten MSC eingesetzt werden. hMSC wandern in das Nierengewebe nach Zellschädigung ein und haben die Möglichkeit sich zu glomerulären mesangialen Zellen zu differenzieren. Sie könnten so zur Heilung verschiedener Nierenerkrankungen beitragen [28].

Aufgrund ihres hohen Differenzierungspotenzials sind hMSC vielversprechend für tissue

engineering [9]. Möglich wäre hierbei der Einsatz vor allem bei orthopädischen Erkrankungen wie Arthrose und Pseudarthrose nach instabilen Frakturen. Auch zur Therapie von Osteogenesis imperfecta könnten MSC eingesetzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von MSC bei Osteogenesis imperfecta zu einem Engraftment von Osteoblasten führt und es damit zu einer Wachstumsbeschleunigung und Zunahme der Knochendichte kommt [68].

1.7 Fragestellung

Bis heute ist die genaue Auswirkung der Eisenbeladung mit und ohne TA auf funktionelle Parameter wie Koloniebildung und Migration und damit auf die therapeutischen Eigenschaften von hMSC nicht geklärt. Es gibt zum Teil sehr widersprüchliche Studien dazu. In dieser Dissertation soll untersucht werden, in wie weit das Markieren der hMSC mit SPIO, bzw. die Kombination von SPIO mit einem TA die Koloniebildung und Migrationsfähigkeit der hMSC im Verhältnis zur Kontrolle beeinflusst. Diese Fähigkeiten der hMSC sind essentiell für den therapeutischen Einsatz. Die Einflüsse auf die Zellen wurden sofort nach Markieren sowie nach zwei Passagen untersucht, um Aussagen über den zeitlichen Verlauf etwaiger Effekte treffen zu können. Weiter wurde die Viabilität und der Gesamteisengehalt der Zellen untersucht.

KAPITEL 2

Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zellkultur

Für die Zellkultur und Versuche wurden die in Tabelle 2.1 und 2.2 aufgeführten Geräte und Materialien verwendet.

Gerät	Hersteller
Inkubator	Heraeus, Hanau, Deutschland
Laminar Flow Sterilbank	BDK, Sonnenbühl, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Mikroskop	Axiovert von Zeiss, Göttingen, Deutschland
CASY TT	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Pipettierhilfe (Pipetboy acu)	INTEGRA, Zizers, Schweiz

Tabelle 2.1: Geräte der Zellkultur

Material	Hersteller
6-Well-Platten	Falcon, BD biosciences, Heidelberg, Deutschland
24-Well-Platten	Falcon, BD biosciences, Heidelberg, Deutschland
Migrationseinsätze Porengröße $8\mu m$	Falcon, BD biosciences, Heidelberg, Deutschland
15ml-Cellstar-Tubes	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße mit 1,5ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
25cm ² Kulturflaschen	Falcon, BD biosciences, Heidelberg, Deutschland
Sterile Pipetten 5/10/15ml	Falcon, BD biosciences, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien

2.2 Medien und Chemikalien

2.2.1 Kulturmedium

Verwendet wurde Alpha-MEM (Art.Nr. BE 02-002F) von Bio Whittaker TM (Cambrex Bio Science, Apen, Deutschland). Dem Medium wurde 10% fetales Kälberserum und 1% der Antibiotika Penicillin und Streptomycin zugesetzt (siehe 2.2.4) . Für die Koloniebildungsassays und die Migrationsversuche wurde dem Medium 20% fetales Kälberserum (FCS) zugegeben.

2.2.2 Differenzierungsmedien

2.2.2.1 Adipogene Differenzierung

Das Medium zur adipogene Differenzierung bestand aus:

- DMEM
- 20% FCS
- Insulin ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma Deisenhofen, Deutschland)
- Dexamethason ($1\mu\text{M}$) (Sigma)
- Indomethazin ($0,2\text{mM}$) (Sigma)
- Isobutylmethylxanthin ($0,5\text{mM}$) (Sigma)

2.2.2.2 Osteogene Differenzierung

Das Medium zur osteogenen Differenzierung bestand aus:

- $0,1\mu\text{M}$ Dexamethason (Sigma Deisenhofen, Deutschland)
- 10mM Glycerophosphat (Sigma)
- $0,2\text{mM}$ Ascorbinsäure (Sigma)
- Kulturmedium

2.2.2.3 Chondrogene Differenzierung

Für die chondrogene Differenzierung wurde ein Fertigkit von R+D Systems verwendet.

2.2.3 Fetales Kälberserum (FCS)

FCS enthält neben wasserlöslichen Substanzen wie T3, T4, TSH und FSH, Insulin, Cortisol, auch Vitamine, Wachstumsfaktoren und essentielle Aminosäuren. FCS wurde in Aliquots bei -20°C eingefroren und für jedes Medium bzw. jeden Arbeitsschritt frisch aufgetaut. Verwendet wurde FCS (Katalog Nr. 102 701 06) von Invitrogen Life Technology, Karlsruhe, Deutschland

2.2.4 Antibiotika

Als Antibiotikazusatz wurde 10.000 μ g Streptomycin und 10.000 IE Penicillin (Art.Nr. A 2213) von Biochrom, Berlin, Deutschland verwendet. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei -20°C und für jedes Medium wurde ein Aliquot frisch aufgetaut.

2.2.5 Accutase

Accutase (Art.Nr. L11-007), PAA-Lab, Kölbe, Deutschland ist ein lytisches Enzym, das die Zellen sowohl von der Kulturflasche als auch voneinander löst. Hier wurde Accutase verwendet, da sie für hMSC schonender ist als Trypsin. Die Accutase wurde ebenfalls in Aliquots bei -20°C eingefroren und für jede Passage frisch aufgetaut.

2.2.6 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Reste des Mediums schwächen die Wirkung der Accutase ab, daher wurden die Zellen vor jeder Passage und nach jeder Eisenbeladung mit PBS gewaschen. Verwendet wurde PBS (Art.Nr. 14190-169) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.2.7 Platelet-derived growth factor (PDGF)

PDGF bezeichnet eine Familie von vier Wachstumsfaktoren (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C und PDGF-D), die alle mitogen auf Zellen wirken, die ihren Ursprung im embryonalen Bindegewebe haben. Sie werden bei Verletzungen von Lymphozyten freigesetzt, um die Heilung des Gewebes zu stimulieren. PDGF spielt eine wichtige Rolle bei der Embryogenese (besonders bei der Entwicklung von Nieren, Blutgefäßen, Lungen und dem ZNS), Zellproliferation, Zellmigration, Wundheilung und bei der Angiogenese. PDGF werden auch mit verschiedenen Krankheiten wie Arteriosklerose, Fibrose und Krebs in Verbindung gebracht. Entdeckt wurde PDGF 1974 von Ross et al. PDGF-BB wurde hier als Migrationsstimulans eingesetzt.

2.2.8 Färbereagenzien

2.2.8.1 Zitratfixierung

- 12,5ml Zitratlösung
- 32,5ml Aceton
- 4ml 37% Formaldehyd

2.2.8.2 Alkalische Phosphatase Färbung

- 0,5ml Natriumnitrit
- 0,5ml FRV-alkalische Lösung
- 22,5ml Aqua dest
- 0,5ml Naphthole AS-BI alkalische Lösung

2.2.8.3 Oil-Red-Lösung

- 300mg Oil-Red-Pulver (Sigma)

- 100ml 99 % Isopropanol (Sigma)
- 2 Teile Aqua dest

2.2.8.4 Coomassie

- 20% Methanol
- 7,5% Eisessig
- Coomassie: Serva R Tablette 0,1g, 0,05%
- 72,5% Aqua dest

2.2.9 Kontrastmittel und Transfektionsagenzien

2.2.9.1 Resovist®

Es wurde als Kontrastmittel Resovist® (0,5mmol Fe/ml; Ch.-B. 31024 R), Schering, Deutschland, verwendet. Resovist® ist eine stabile wässrige Injektionslösung von Carboxydextran-beschichteten SPIO-Nanopartikeln. Die Partikelgröße ist mit der von großen natürlich vorkommenden Proteinen vergleichbar (Referenz Schering Deutschland GmbH (2003) Gebrauchsinformation Resovist® Schering Deutschland GmbH, Berlin).

2.2.9.2 Dosper

Dosper (Cat Nr. 11781 995-001), Roche, Mannheim, Deutschland, ein liposomales Transfektionsagens.

2.2.9.3 jetPEI™

jetPEI™ (Art.Nr. 101-10), biomol, Hamburg, Deutschland, ein lineares Polyethylenimin, d.h. wasserlösliches Transfektionsagens.

2.2.9.4 PULSin™

PULSin™ (Art.Nr. 501-04) biomol, Hamburg, Deutschland, ein kationisch amphiphiles Transfektionsagens.

2.3 Methoden

Arbeiten an der Zellkultur wurden stets unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar-Flow-Arbeitsbank durchgeführt. Hierzu wurde die Arbeitsbank zuerst ca. 30 Minuten mit UV-Licht bestrahlt und danach die Arbeitsfläche mit 70%igen Alkohol gereinigt. Die Arbeiten an der Zellkultur wurden im zell- und molekularbiologischen Labor der Abteilung für Radiologische Diagnostik im ZMF durchgeführt.

2.3.1 Isolation der hMSC

Die hMSC wurden mittels einer Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dazu wurde 5ml Knochenmarksuspension, von Spendern bei einer Hüft-OP gewonnen, mit 10ml PBS resuspendiert und auf 15ml Lymphoflot (Biotest AG, Dreieich, Deutschland) überschichtet. Nach 20 Minuten Zentrifugieren bei $1000g$ wurden die mononukleären Zellen entnommen, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in einer 75 cm^2 Kulturflasche (Corning Inc., Schiphol-Rijk, Holland) bei 37°C , $5\% \text{CO}_2$ im Inkubator mit Kulturmedium kultiviert. Nach 24 Stunden wurden nicht adhärenente Zellen entfernt und die adhärenente Zellen wurden weiter kultiviert und expandiert. Nach der Aufteilung der Zellen in mehrere 25cm^2 Kulturflaschen erfolgte die Charakterisierung der Zellen.

2.3.2 Charakterisierung der hMSC

Die Charakterisierung der hMSC erfolgte sowohl durch in vitro Differenzierungsassays als auch durch die FACS Analyse. Untersucht wurde das adipo-, chondro- und osteogene Differenzierungspotenzial der hMSC. Die MSC jeder Population wurden für 21 bzw. 14 Tage mit den verschiedenen Differenzierungsmedien inkubiert. Die Differenzierung wurde erfolgreich in der Transfusionsmedizin nach Erhalt der Spenderzellen durchgeführt. Erfolgreich charakterisierte Zellen wurden dann für die eigentlichen Versuche verwendet. Es wurden für die Versuche sieben verschiedene Zelllinien verwendet.

2.3.2.1 Adipogene Differenzierung

Die humanen mesenchymalen Stammzellen wurden in Kulturflaschen ausgesät und die Differenzierung durch Zugabe von adipogenem Medium eingeleitet. Nach 21 Tagen wurde eine Oil-Red-Färbung durchgeführt, um Lipidtröpfchen zu färben. Hierzu wurde das Medium entfernt, die Zellen zwei mal mit PBS gewaschen, 2ml einer 10% Formalinlösung zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Nach Entfernen des Formalins wurden die Zellen mit sterilem Wasser gewaschen und 2ml 60% Isopropanol wurden für zwei Minuten zugegeben. Das Isopropanol wurde entfernt und 2ml Oil-Red-Lösung für fünf Minuten zugegeben. Danach wurden die Zellen mit Wasser gespült und mit 2ml Hämatoxylin (Sigma) für eine Minute gegengefärbt.

2.3.2.2 Osteogene Differenzierung

Die hMSC wurden ebenfalls in Kulturflaschen ausgesät und zur Differenzierung im osteogenen Differenzierungsmedium kultiviert. Nach 21 Tagen wurde die alkalische Phosphatase mit Hilfe eines industriellen Kits der Firma Cambrex Bio Science detektiert. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, 2ml Zitratfixierung wurde für eine Minute zugegeben. Es folgte eine Anfärbung mit 2ml alkaline dye für 30 Minuten. Danach wurden die Zellen zweimal mit Wasser gespült und mit 2ml Hämatoxylin für eine Minute gegengefärbt.

2.3.2.3 Chondrogene Differenzierung

Die chondrogene Differenzierung wurde mit Hilfe eines kommerziellen Differenzierungskits für MSC durchgeführt (Cat. Nr. SC006, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland). Die MSC jeder Population durchliefen folgende Differenzierungsschritte: 25.000 Zellen wurden in ein 15ml Röhrchen überführt und als Pellet kultiviert. Nach dem Zentrifugieren mit $200g$, wurde $1,0\text{ml}$ Standardmedium und $0,5\text{ml}$ chondrogenes Differenzierungsmedium zugegeben und alle zwei bis drei Tage erneuert. Nach 14 Tagen wurde das Chondrozytenpellet entfernt, als Quetschpräparat auf einem Glasträger ausgestrichen und mit 1% Alcian Blue 8GX (Serva, Heidelberg, Deutschland) in 3% Essigsäure (pH 2.5) eingefärbt.

Die FACS Analyse wurde mit einem FACScan Durchflusszytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) und der BD CellQuest Pro Software, durchgeführt. Subkonfluente Kulturen wurden mittels Accutase abgelöst und gewaschen (PBS + AccuMax [PAA Laboratories]). Jeder Ansatz enthielt eine Suspension mit 500.000 Zellen im FACS-Puffer (PBS + 1% Rinderserum Albumin [Sigma] + 0.1% FCS). Der PE konjugierte Antikörper (Anti-human-CD 4, -CD 8, -CD 14, -CD 29, -CD 34, -CD 43, -CD 44,5 -CD 45, -CD 59, -CD 71, -CD 73, -CD 90, -CD 105, -CD 106, -CD 117, -CD 133, -CD 146, -CD 166, HLA class I, HLA class II) wurde zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten und zwei Waschschritten konnten die Proben analysiert werden. Alle Antikörper stammten von BD Biosciences.

2.3.3 Kultivierung der hMSC

Ein Aliquot der zuvor charakterisierten hMSC wurde aus der ursprünglichen Kulturflasche in 25cm^2 - Zellkulturflaschen mit einer Zelldichte von $4.000\text{Zellen}/\text{cm}^2$ überführt und mit 10ml Kulturmedium versetzt. Dies wurde als Passage 1 bezeichnet. Nach einem Medienwechsel nach 24 Stunden wurde das Medium jeden zweiten Tag erneuert, da zum einen viele Inhaltsstoffe des Mediums für die Proliferation verbraucht wurden, zum anderen um Zellgifte, Abbauprodukte und tote Zellen, die nicht mehr adhären waren, zu entfernen. Vor jedem Medienwechsel bzw. jeder Passage erfolgte stets eine mikroskopische Untersuchung auf sichtbare Kontamination bzw. eine Kontrolle der Zelldichte und Zellmorphologie.

Zur Kultivierung wurden die hMSC in einem Inkubator bei einer Temperatur von 37°C und einem CO_2 -Gehalt von 5% gelagert.

2.3.4 Subkultivierung

Bei hoher Zellzahl führt die einsetzende Kontaktinhibition zur Arretierung der Proliferation. Sobald die adhären als Monolayer wachsenden hMSC konfluent waren (beurteilt wurde das mikroskopisch), wurde an diesem Tag eine Subkultur zur weiteren Passage durchgeführt. Dies war nach ca. 7-10 Tagen der Fall. Hierzu wurde das Medium mittels

Glaspipette aus der Kulturflasche abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 10ml PBS gewaschen. Der Monolayer wurde mit 1ml frischer, zuvor im Wasserbad bei 37°C aufgetauter und erwärmter Accutase benetzt. Die Kulturflasche wurde 10-15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Ablösung der hMSC. Nach guter Ablösung der hMSC wurde 5ml Medium zugegeben, was die Wirkung der Accutase neutralisierte. Anschließend erfolgte das mehrmalige Resuspendieren der Zellen, was zur Vereinzelung der Zellen führte. Die anschließende Zellzahlbestimmung erfolgte mittels eines CASY Zellzähl- und Analysesystems. Es wurden 50.000 Zellen in 2ml Medium pro Well in zwei 6-Well-Platten ausgesät und weitergezogen.

2.3.5 Transfektion und Markierung

Am Tag vor der Transfektion, d.h. der Beladung mit Kontrastmittel \pm Transfektionsagens, wurde das Kulturmedium noch einmal gewechselt und auf 1ml/Well reduziert. Das Markieren der Zellen erfolgte in Passage 2. Am Versuchstag wurden dann folgende Transfektionsmedien hergestellt:

In einem 1,5ml Reagenzgefäß wurden pro Bedingung und Well 30,0 μ l PBS mit 22,5 μ l Resovist® (2800 μ g/ml) gemischt. Hieraus ergibt sich eine Endkonzentration von 60 μ gFe/ml. In einem weiteren Reagenzgefäß wurden 42,0 μ l PBS mit 10,5 μ l TA pro Well angesetzt. Die Ansätze wurden für drei Wells gepoolt, d.h. die Ingredienzien für 3 Wells wurden gemeinsam angesetzt. Danach wurde die jeweilige TA-Mischung der Resovist®-Mischung zugegeben, sorgfältig gemischt und für 30 Minuten inkubiert. Es wurden dann jeweils 100 μ l dieser Suspensionen dem Kulturmedium eines Wells zugegeben und im Brutschrank bei Standardbedingungen für vier Stunden inkubiert (37°C, 5% CO₂).

Daraus ergaben sich folgende Ansätze:

1. Kontrolle - keine Zugabe von Eisen oder Transfektionsagens, aber 100 μ l PBS
2. Resovist® 60 μ g - ohne Zugabe eines TA, 60 μ g Fe entsprechen 21,4 μ l Resovist® (2800 μ g/ml)

3. Resovist® 200 μ g - ohne Zugabe eines TA, 200 μ g Fe entsprechen 71,4 μ l Resovist® (2800 μ g/ml)
4. Resovist® 60 μ g + 10 μ l TA Dosper
5. Resovist® 60 μ g + 10 μ l TA jetPEI™
6. Resovist® 60 μ g + 10 μ l TA PULSin™

Nach dem Markieren (Abb.2.1) wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, abgelöst und für die weiteren Arbeitsschritte wie Zellzahlbestimmung, Weiterzucht, Eisenbestimmung, Koloniebildungsassay und Migrationsassay vorbereitet bzw. ausgesät.

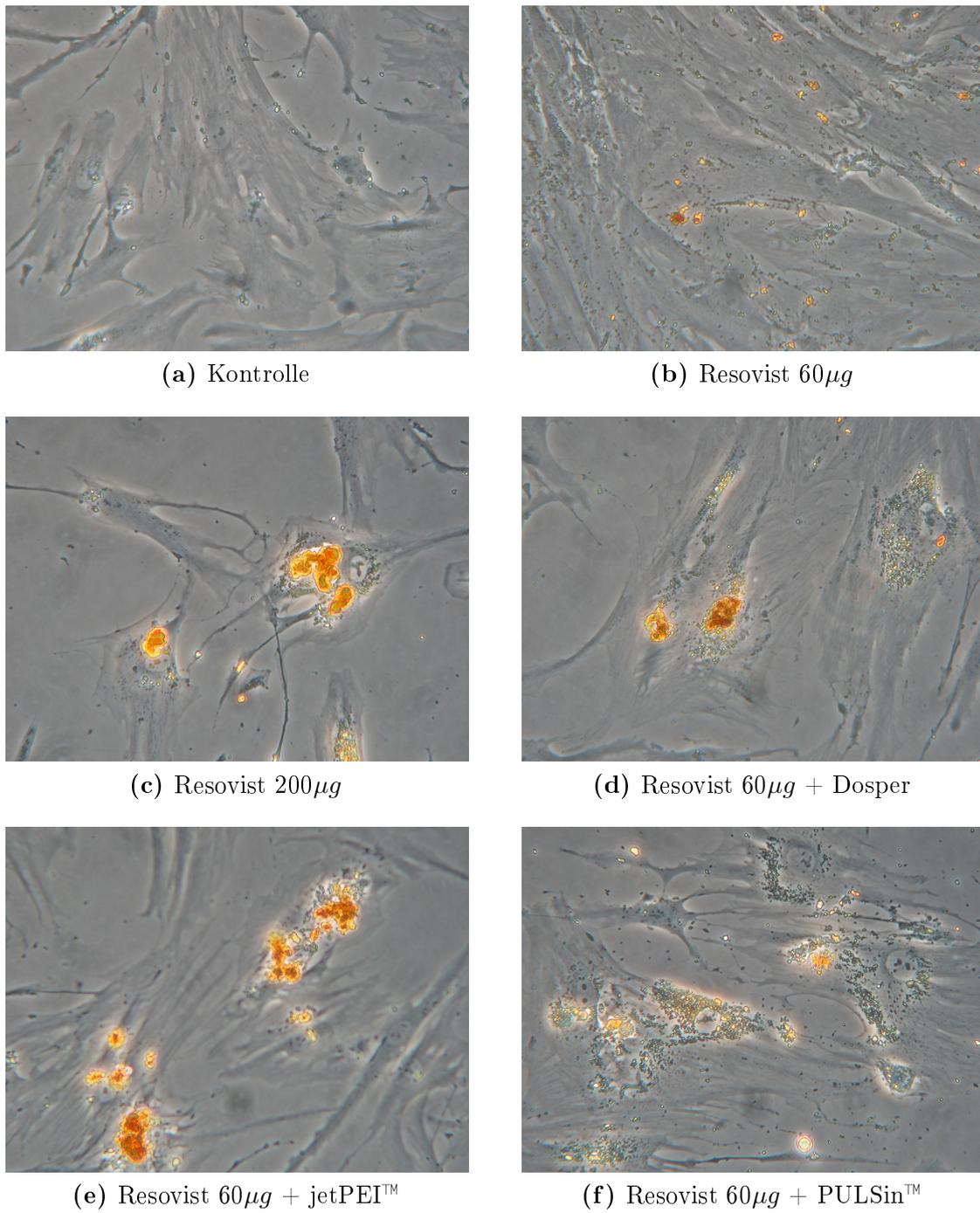


Abbildung 2.1: Markierung von hMSC in Passage 2, fotografiert direkt nach Markierung

2.3.6 Subkultivierung nach Transfektion

Das Prinzip der Subkultivierung (Kapitel 2.3.4) entspricht dem weiter oben beschriebenen. Verändert wurden lediglich die Mengen der verwendeten Reagenzien und jede Subkultivierung erfolgte weiter in 6-Well-Platten. So wurde jedes Well nach Absaugen des Mediums mit 2ml PBS gewaschen und danach $500\mu\text{l}$ Accutase zugeben. Zur Neutralisation der Accutase wurde 1ml Medium verwendet. Anschließend wurden die Zellen mit warmem Kulturmedium (Kapitel 2.2.1) gut vereinzelt und der gesamte Ansatz bzw. die einzelnen Bedingungen getrennt in handelsüblichen 15ml -Cellstar-Tubes gesammelt. Die 6-Well-Platte wurde erneut mit 1ml Medium gespült, um die wenigen verbliebenen Zellen je nach Bedingung ebenfalls in die Cellstar-Tubes zu überführen. Die Zellzahl wurde erneut mittels CASY bestimmt und daraufhin 50.000 Zellen/Well in weitere 6-Well-Platten überführt.

2.3.7 Koloniebildungsassay

Mittels Koloniebildungsassay kann die klonogene Aktivität der Zellen unter optimalen Wachstumsbedingungen bestimmt werden. Die klonogene Aktivität spiegelt eine essentielle Stammzeleigenschaft der hMSC wider. Hierzu wurden nach Transfektion der Passage 2 und Passage 4, nach Ablösen und Bestimmung der Zellzahl, jeweils 500 Zellen in 2ml Medium pro Well in je zwei 6-Well-Platten je Bedingung ausgesät, was 12 Einzelbeobachtungen pro Bedingung und Versuchstag entspricht. Die Zellen wurden 14 Tage im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen. Dazu wurde der Medienüberstand verworfen und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Fixation erfolgte zuerst 10 Minuten mit einer 3,7%igen Formalinlösung, danach 10 Minuten mit 70%igem Alkohol. Anschließend wurden die Substanzen mit Aqua dest gut ausgespült und die Zellen bei Raumtemperatur getrocknet. Zuletzt erfolgte die Färbung mittels Coomassie, welches auf die getrockneten Zellen gegeben wurde. Nach gründlichem Spülen und Waschen erfolgte ein weiterer Trocknungsschritt. Danach wurde der Koloniebildungsassay mikroskopisch ausgewertet. Man zählt die gebildeten Kolonien pro Well, wobei eine Kolonie als eine aus einer Zelle hervorgehende Ansammlung von >50 Zellen definiert ist.

Der Koloniebildungsassay ist ein sehr sensibler Test, um die Auswirkung von Noxen auf das Wachstumsverhalten von Zellen zu untersuchen, weil nur unbeeinträchtigte Zellen in der Lage sind, die nötigen Zellteilungen zu vollziehen.

2.3.8 Migrationsassay

Der Migrationsassay untersucht die Eigenschaft von Zellen, sich gerichtet bewegen zu können. Die Migrationsfähigkeit der hMSCs bestimmt, wie schnell die Zellen aus der Umgebung in ihr Zielgewebe einwandern und damit homen können. Hier soll untersucht werden, ob eine höhere Eisenbeladung die Migrationsfähigkeit der Zellen beeinflusst. In diesem Versuch wurde ein Zwei-Kompartimentmodell verwendet, bei dem die Zellen durch eine Membran mit Poren von einer Größe von $8\mu m$ migrieren müssen. Nach dem Ablösen mit Accutase, Überführung in ein Blue-Cup-Röhrchen und Zellzahlbestimmung wurden 110.000 Zellen in $2,75ml$ Medium für fünf Parallelansätze überführt und resuspendiert. In einer 24-Well-Platte wurden die Wells mit je $800\mu l$ Migrationsmedium gefüllt, dem $10\mu l$ PDGF ($20ng/ml$) zugesetzt war. Nun wurden die Membranen eingesetzt und $500\mu l$ Zellsuspension in einer Konzentration von 4.000 Zellen/ $100\mu l$ zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen wie im Schritt 2.3.7 beschrieben, behandelt. Zusätzlich erfolgte ein vorsichtiges Ablösen der nicht migrierten Zellen im Membraneinsatz mittels Wattestäbchen vor der Fixierung.

Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch. Hierzu wurden die Membraneinsätze auf eine Fuchs-Rosenthal Zählkammer gesetzt, wodurch ein Raster zur Zählung zur Verfügung stand. Es wurden 6 repräsentative Großquadrate ausgezählt und die Zahl der migrierten Zellen pro mm^2 berechnet.

2.3.9 Eisenbestimmung

2.3.9.1 Probenvorbereitung

Durch die Zellzahlbestimmung mittels CASY konnte das Volumen ermittelt werden, in dem sich 100.000 Zellen befanden. Diese 100.000 Zellen wurden dann zu $2ml$ PBS in einem $15ml$ Cellstar Tube zugegeben und dieses für fünf Minuten bei $250g$ in der Zentrifuge

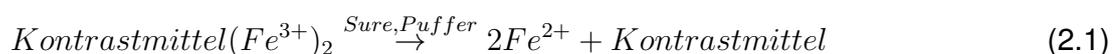
zentrifugiert. Der Überstand wurde sodann abpipettiert, die Zellen erneut mit 2ml PBS gewaschen und das Ganze nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der jetzt entstandene Überstand wurde wiederum abpipettiert und die Cellstar Tubes dann in einem Heißlufttrockenschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) bei $80\text{ }^\circ\text{C}$ für ca. drei Stunden getrocknet. Die Eisenbestimmung erfolgte für jede Bedingung gesondert. Die Ansätze wurden über Nacht mit $100\mu\text{l}$ Perchlorsäure(70%)/ Salpetersäure(100%) im Verhältnis 3:1 bei Raumtemperatur und anschließend zwei Stunden im Heißlufttrockenschrank bei $60\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Probe sollte vor der weiteren Verarbeitung vollkommen homogen sein, d.h. das vorhandene Eisen sollte gelöst sein. Zum Teil musste die Probe deshalb gevortext (Vortex: Reax 2000 von Heidolph, Kehlheim, Deutschland) werden.

2.3.9.2 Verdünnung der Probe

Für den photometrischen Ansatz mussten die Proben mindestens 1:4 mit Aqua dest verdünnt werden, da die Säure in höherer Konzentration die chemische Reaktion stören bzw. unmöglich machen würde. Standardmäßig wurden die Proben zunächst 1:10 verdünnt und gemessen, bei zu hohen Konzentrationen wurde noch höher verdünnt, bis der lineare Messbereich erreicht wurde. Der Messwert sollte unter 1,2 liegen. Für die Messung wurden $100\mu\text{l}$ Probenvolumen und ebenso $100\mu\text{l}$ der Standardlösung und des Reagenzienleerwerts (RLW) benötigt und jeweils in Küvetten vorgelegt.

2.3.9.3 Ansatz für Photometrie

Der Ansatz mit Eisen Ferene S Plus unterliegt folgendem Prinzip: Der Eisenkern des Kontrastmittels liegt als Fe^{3+} vor. Das Eisen wird durch die Säurebehandlung vollständig freigesetzt und zu Fe^{2+} reduziert. Fe^{2+} bildet einen blauen Komplex mit Ferene, dessen Extinktion bei 600 nm direkt proportional zur Eisenkonzentration ist.





Das Photometer wurde auf die Wellenlänge $600nm$, Schichtdicke $1cm$ und Temperatur $20-25^\circ C$ eingestellt und die Proben gegen den Reagenzienleerwert (RLW) gemessen. Der RLW bestand aus $100\mu l$ Aqua dest + $1.000\mu l$ Reagenz 1 des Eisen Ferene S Plus-Kits und die Probe, bzw der Standard bestand aus $100\mu l$ Probe bzw. Standard und $1.000\mu l$ Reagenz 1. Die jeweilige Mischung wurde nach 1-5 Minuten als Extinktion E1 abgelesen. Daraufhin wurden jeder Mischung $250\mu l$ Reagenz 2 zugefügt, gemischt und nach 10 Minuten als Extinktion E2 abgelesen. ΔE errechnete sich wie folgt:

$$\Delta E = [(E2 - E1)Probe \text{ oder } Standard] - [(E2 - E1)RLW] \quad (2.3)$$

Um den Eisengehalt in $\mu g/dl$ zu erhalten, wurde folgendermaßen gerechnet:

$$Eisen[\mu g/dl] = \frac{\Delta E_{Probe}}{\Delta E_{Standard}} * Konz.Standard(100\mu g/dl) \quad (2.4)$$

Des weiteren konnte aufgrund der festen Bezugsgröße von 100.000 eingesetzten Zellen die Konzentration in pg Eisen pro Zelle berechnet werden. Um die genaue Eisenkonzentration zum Ende des Versuchs (nach zwei, bzw. vier Passagen) zu ermitteln, musste dieser Wert noch durch die Populationdoublings (PD) korrigiert werden. Hierzu wurden die Eisenwerte nach folgender Formel korrigiert:

$$Eisen[\mu g/dl] = \frac{\Delta E_{Probe}}{\Delta E_{Standard}} * Konz.Standard(100\mu g/dl) * PD \quad (2.5)$$

2.3.10 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Herrn Professor Dr. Klaus Dietz, Institut für Medizinische Biometrie, Universität Tübingen, mit dem Statistikprogramm Jmp (SAS institute inc., Cary, NC, USA). Die statistische Signifikanz zwischen den einzelnen Bedingungen wurde mithilfe eines multifaktoriellen Varianzanalysemodells berechnet, wobei die Bedingung als fester Faktor, der Spender als zufälliger Faktor in das Modell einging. Als Testverfahren wurde für die Viabilität der Tukey-Kramer-Test, für die Migration der Dunnett's-Test verwendet. Die Parameter wurden durch die restricted maximum likelihood (REML) geschätzt. Für die Analyse der Viabilität und Migration wurde ebenfalls der Faktor Zellpassage eingeschlossen. Zur Stabilisierung der Varianzen wurde falls nötig eine logarithmische Transformation durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als geometrische Mittel mit ihrem 95% Konfidenzintervall dargestellt. Für die Koloniebildungsassays wurden die erhaltenen Werte der einzelnen Bedingung im Verhältnis zu den jeweiligen Kontrollen gesetzt. Hierzu wurde eine logarithmische Transformation zur Stabilisierung der Faktoren durchgeführt. Die Varianzanalyse der Koloniebildungsassays enthielt als feste Faktoren die Bedingung sowie die Zellpassage und als zufälliger Faktor den Spender.

KAPITEL 3

Ergebnisse

3.1 Viabilitäten

Nach jedem Versuchsschritt oder Passage wurde die Viabilität der Zellen gemessen. Hierdurch sollte kontrolliert werden, ob die verschiedenen Bedingungen Auswirkungen auf die Viabilität hatten. Dazu war es notwendig, identische Zellzahlen von vitalen Zellen in die weiteren Versuche einzusetzen. Hierbei ergab sich eine konstant gute und von der Bedingung unabhängige Viabilität von mindestens 88% für die Passagen 4 und bis 95,2% für die Passagen 2. Für die Passagen 5-7 konnten Viabilitäten von ebenfalls 88% bis 94% gemessen werden. Bei der durchgeführten Kovarianzanalyse (nicht dargestellt) gab es einen signifikanten Einfluss von $p < 0,005$ des zeitlichen Verlaufs auf die Viabilitäten. Zielgröße war hier Viabilität, die nominalen Einflussgrößen hMSC, Agens und Eisen und die kontinuierliche Einflussgröße Zeit, sowie eine einfache Kombination jeder nominalen Einflussgröße mit der Zeit.

Dargestellt sind in Abb. 3.1 die Mittelwerte mit jeweiligen Standardabweichungen von allen Zellreihen in der jeweiligen Passage und jeweiligen Bedingung. Für jede Bedingung sind die Werte von links nach rechts in zunehmendem Zellalter (Passage) geordnet. Dasselbe gilt für Abb. 3.2.

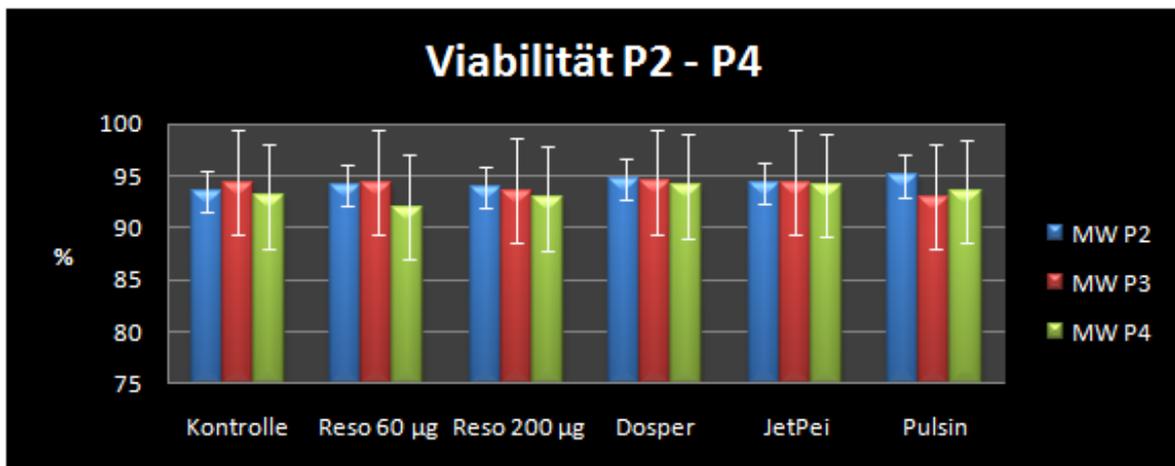


Abbildung 3.1: Viabilitäten Passage 2-4

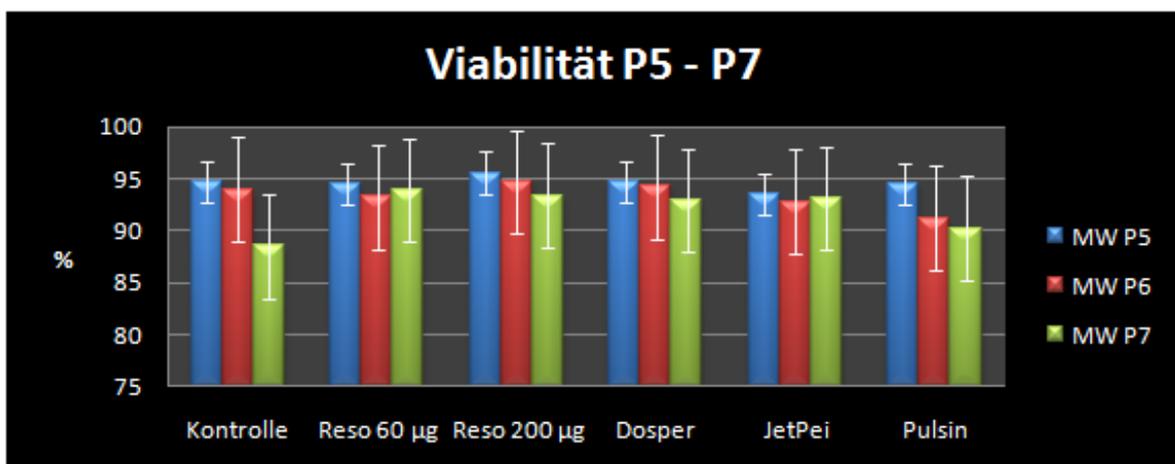


Abbildung 3.2: Viabilitäten Passage 5-7

3.2 Eisengehalte

Für die Passagen 2-4 sowie 5 und 7 wurden die Eisenwerte gemessen, um die Eisenbeladung der Zellen im Verlauf des weiteren Wachstums beurteilen zu können. Ebenso sollte die jeweilige Eisenbeladung durch die verschiedenen Bedingungen untersucht werden. Die totale Eisenaufnahme (total iron load, TIL) war abhängig von der Bedingung, nicht aber vom Zellalter. Hierbei konnten Werte von durchschnittlich $0,1 \text{ pg/Zelle}$ bei der Kontrolle bis $145,9 \text{ pg/Zelle}$ bei Resovist® 200 bestimmt werden. Der höchste mittlere TIL konnte bei der Bedingung Resovist® 200 mit $145,9 \text{ pg/Zelle}$ gemessen werden, gefolgt von Resovist®/jetPEI™ mit $91,6 \text{ pg/Zelle}$. Bei Resovist® 60 konnte $34,7 \text{ pg/Zelle}$ bei Resovist® 60/Dosper $41,2 \text{ pg/Zelle}$ gemessen werden. Es ergab sich eine statistisch signifikante Erhöhung des TIL bei den Bedingungen Resovist® 60/jetPEI™ und Resovist® 200 ohne TA im Vergleich zu Resovist® 60 ohne TA bei der Passage 2 (Abb. 3.3). Bei den Transfektionsagenzien zeigt sich, dass TIL bei jetPEI™ am höchsten und bei Dosper am niedrigsten ist.

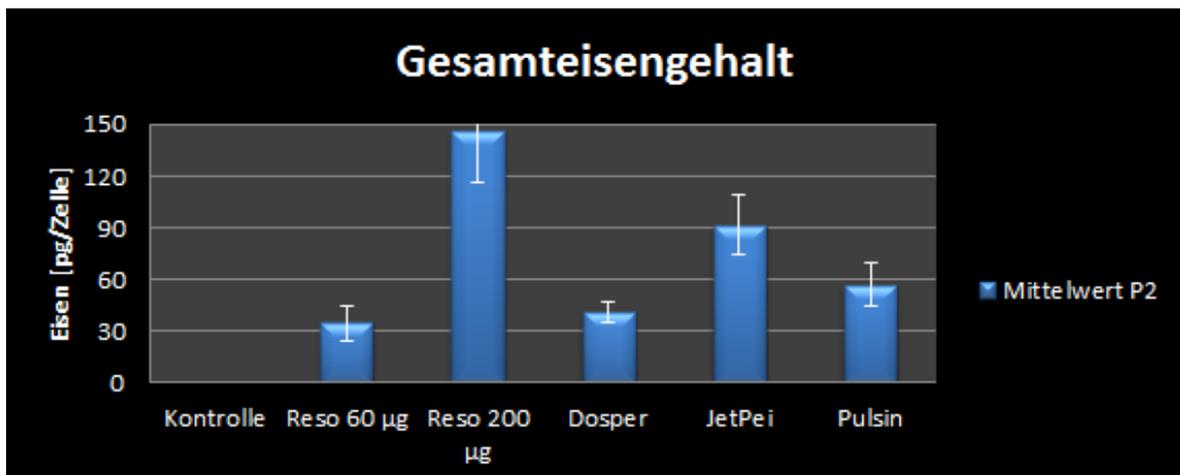


Abbildung 3.3: Eisenbeladung P2

Dargestellt sind in Abb. 3.4 und Abb. 3.5 der Abfall der Eisenkonzentration nach Zellteilung, bzw. die Eisenaufnahme und deren Abfall bei höherem Zellalter.

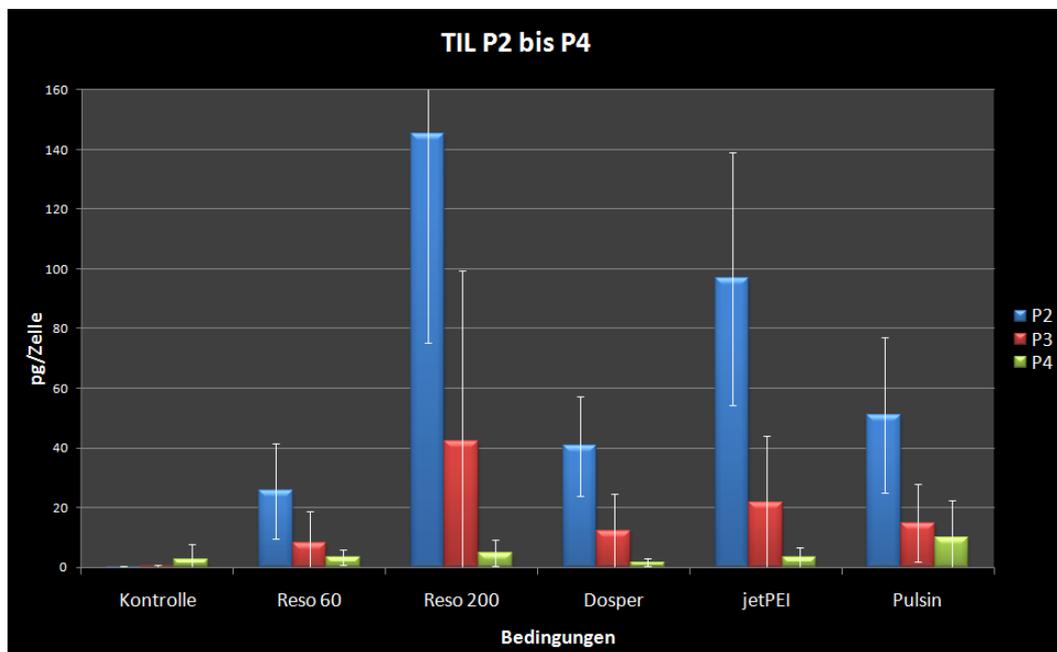


Abbildung 3.4: Eisenbeladung P2 bis P4

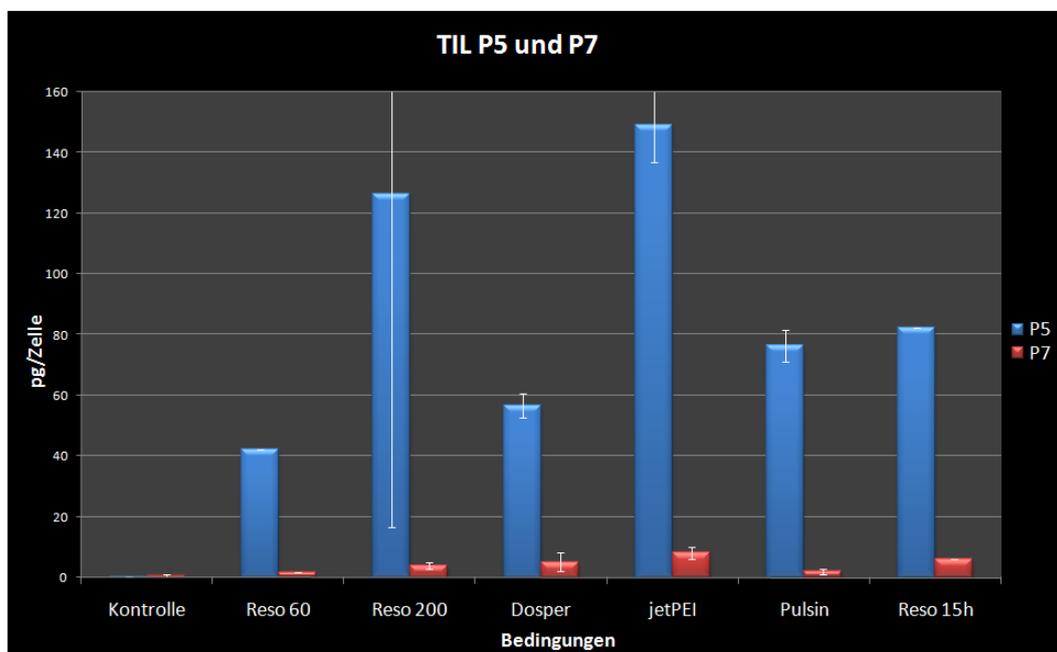


Abbildung 3.5: Eisenbeladung P5 und P7

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit jeweiligen Standardabweichungen von allen Zellreihen in der jeweiligen Passage und jeweiligen Bedingung. Für jede Bedingung sind die Werte von links nach rechts in zunehmendem Zellalter (Passage) geordnet.

3.3 Migrationen

Das Migrationsvermögen der hMSC stellt einen wichtigen Schritt dar, um das Homing zu ermöglichen. In diesen Versuchen wurde der Einfluss der Eisenbeladung auf die Migrationsfähigkeit der Zellen untersucht. Alle Zellen wurden mit PDGF als Chemoattraktor zur Migration stimuliert. Pro Bedingung und Stichprobe wurden fünf Migrationseinsätze verwendet. In der Kovarianzanalyse konnte eine signifikante Reduktion der Migrationsfähigkeit in Passage 2 von Resovist®/PULSin™ im Verhältnis zur Kontrolle und auch zu den anderen Bedingungen Resovist® 60 und Resovist®/jetPEI™ gezeigt werden. Dieser Effekt konnte in Passage 4 nicht mehr signifikant nachgewiesen werden. Allerdings war immer noch ein deutlicher Abfall der Migrationsfähigkeit im Vergleich zu den anderen Bedingungen zu beobachten. Signifikant zeigte sich hier der Abfall der Migrationsfähigkeit von Resovist®/PULSin™ in Bezug zu Resovist®/jetPEI™ (Abb. 3.6).

Jeder Bedingung sind hierbei zwei Symbole zugeordnet: x für Passage 2 und • für Passage 4.

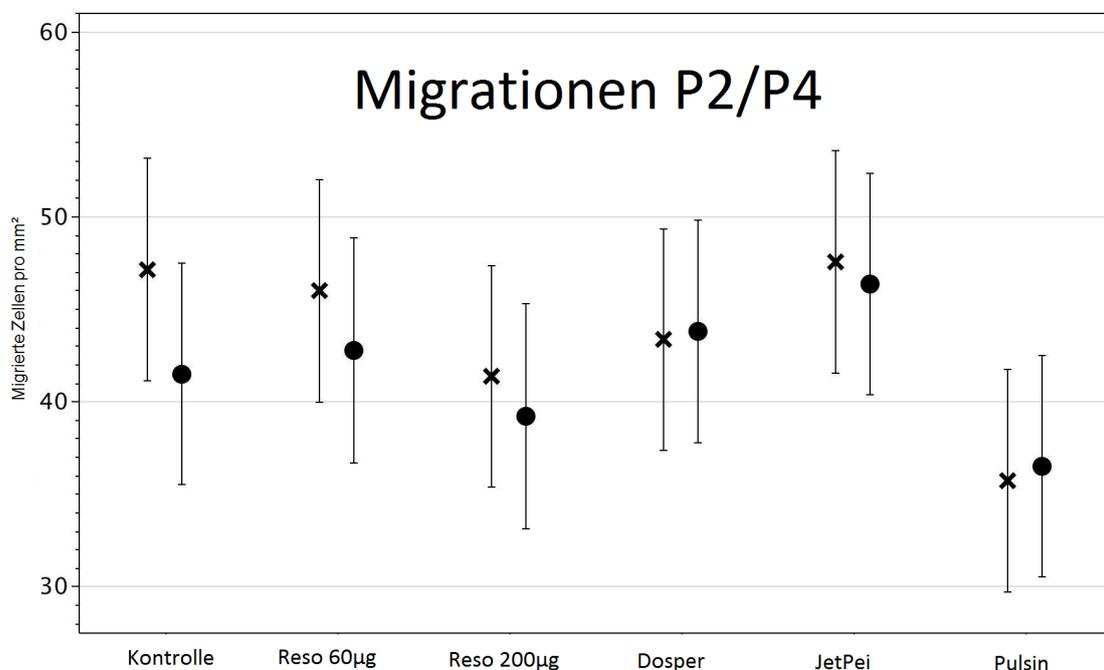


Abbildung 3.6: Migrationsfähigkeit

Dargestellt sind in Abb. 3.7 die Mittelwerte der jeweiligen Bedingung mit Standardabweichung und 95% Konfidenzintervall für die Passage 2. Diese Werte wurden dann mittels Dunnetts-Test statistisch ausgewertet (Abb. 3.8).

Für die nachfolgenden Abbildungen 3.7 bis 3.12 gelten folgende Zuordnungen:

- Bedingung 1: Kontrolle
- Bedingung 2: Resovist® 60 μ g
- Bedingung 3: Resovist® 200 μ g
- Bedingung 4: Resovist® 60 μ g + TA Dosper
- Bedingung 5: Resovist® 60 μ g + TA jetPEI™
- Bedingung 6: Resovist® 60 μ g + TA PULSin™

Bedingung	Mittelwert	Standard- abweichung	Unteres 95% KI	Oberes 95% KI
1	46,8583	2,0768	42,7620	50,9540
2	46,1461	2,0768	42,0500	50,2420
3	41,4311	2,0461	37,3960	45,4660
4	43,4261	2,0461	39,3910	47,4610
5	47,6126	2,0461	43,5770	51,6480
6	35,7840	2,0461	31,7490	39,8190

Abbildung 3.7: Mittelwerte der Anzahl migrierter Zellen bei Passage 2

Diese Grafik veranschaulicht signifikante Unterschiede. Die dargestellten Kreise zeigen die Mittelwerte mit Standardabweichungen der Bedingungen an. Kreise, die sich hierbei nicht berühren, gelten als statistisch signifikant unterschiedlich, in unserem Fall also die Kontrolle und Bedingung 6, entsprechend einer Beladung mit Resovist® in Kombination mit PULSin™.

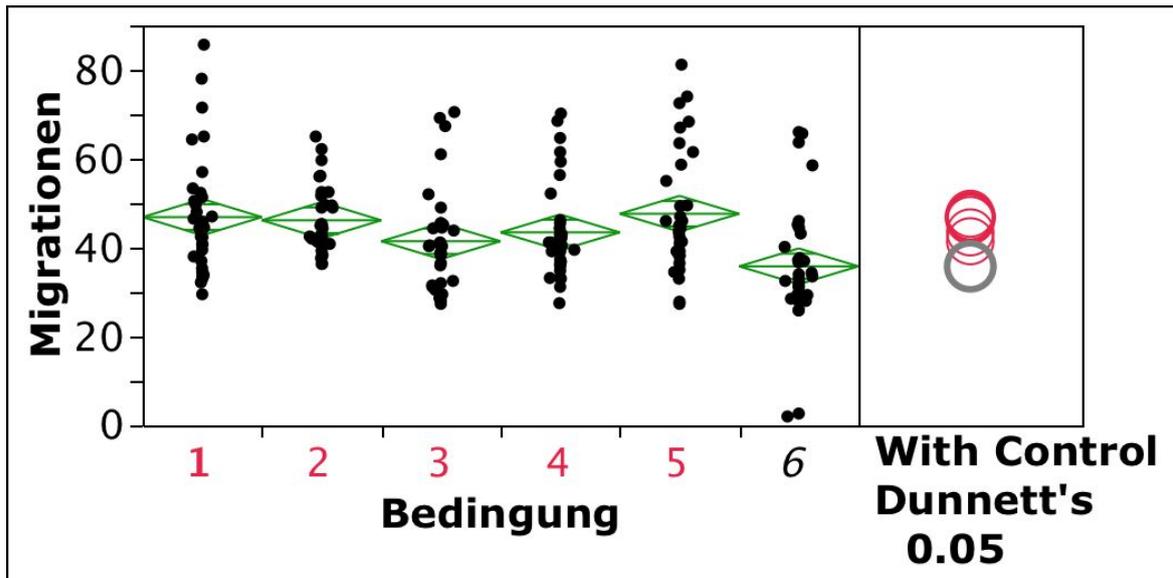


Abbildung 3.8: Einfluss der Beladung auf das Migrationsverhalten bei Passage 2

Mittels Dunnett's-Test erhielten wir also folgende Ergebnisse (Abb. 3.9). Abs(Dif)-LSD bezeichnet hier "least significant difference", und zeigt einen p-Wert kleiner 0,05 an. Bedingungen mit einem positiven Abs(Dif)-LSD und einem positiven p-Wert gelten als statistisch signifikant. Dies zeigt sich hier also nur für Bedingung 6 im Vergleich zu den anderen Bedingungen.

Bedingung	Abs(Dif)-LSD	p-Value
5	-6,630	0,9992
1	-7,430	1,0000
2	-6,720	0,9994
4	-3,950	0,6472
3	-1,950	0,2253
6	3,695	0,0009

Abbildung 3.9: Dunnett's-Test für die Passage 2

Entsprechend der Auswertung von Passage 2 wurde auch bei Passage 4 vorgegangen. Hier konnte keine Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle mehr gezeigt werden. So überschneiden sich im Dunnett's Test alle Mittelwerte samt Standardabweichung im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.11) und es zeigt sich bei keiner Bedingung ein positives Datenpaar (Abb. 3.12).

Bedingung	Mittelwert	Standard- abweichung	Unteres 95% KI	Oberes 95% KI
1	41,4570	1,7775	37,9510	44,9630
2	43,1997	1,9199	39,4130	46,9860
3	39,6442	1,9199	35,8580	43,4310
4	43,4556	1,8034	39,8990	47,0130
5	46,3330	1,7775	42,8270	49,8390
6	36,4805	1,7775	32,9750	39,9860

Abbildung 3.10: Mittelwerte der Migration bei Passage 4

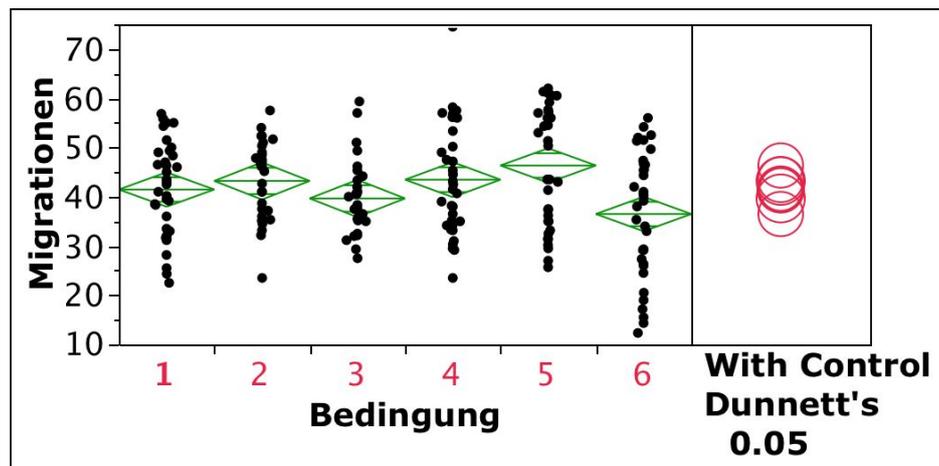


Abbildung 3.11: Einfluss der Bedingungen auf die Migration bei Passage 4

Bedingung	Abs(Dif)-LSD	p-Value
5	-1,500	0,197
4	-4,430	0,899
2	-4,900	0,947
1	-6,380	1,000
3	-4,830	0,938
6	-1,400	0,182

Abbildung 3.12: Dunnett's-Test für die Passage 4

Der zuvor beschriebene Effekt konnte in den Passagen 5 und 7 nicht so deutlich beobachtet werden. Zwar gab es ebenso einen Abfall der Migrationsfähigkeit der Bedingung Resovist®/PULSin™ im Vergleich zur Kontrolle, die anderen Bedingungen verhielten sich aber ähnlich wie die Kontrolle. Bei Resovist®60 μ g und Resovist®/jetPEI™ konnte eine bessere Migrationsfähigkeit als bei der Kontrolle beobachtet werden. Diese Effekte waren bei der Passage 7 rückläufig. Aufgrund der geringen Stichprobenanzahl(n=2) konnte hier keine statistische Analyse durchgeführt werden.

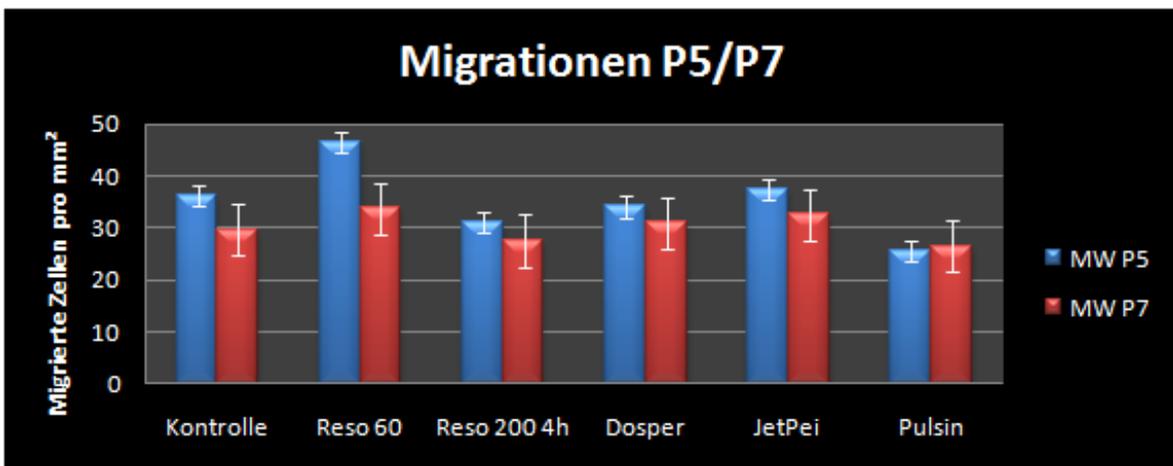


Abbildung 3.13: Migrationsfähigkeit P5 und P7

3.4 Koloniebildungsassays

Die klonogene Aktivität ist ein empfindlicher Marker für die Fähigkeit der Einzelzellen, Klone unter Kulturbedingungen zu bilden. Als Kolonie wird ein Zellkonglomerat definiert, das aus mehr als 50 Zellen besteht. Jeder Ansatz der jeweiligen Bedingung bestand aus zwei 6-Well-Platten, entsprechend also 12 Einzelwerten pro Stichprobe.

In Passage 2 konnte eine signifikante Reduktion der Koloniebildungsfähigkeit bei allen Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Besonders bei Resovist®/PULSin™ war die Fähigkeit zur Koloniebildung extrem verringert. Nach zwei weiteren Passagen konnte ein Anstieg der Koloniebildungsfähigkeit festgestellt werden, wobei die Werte der Kontrolle nur von Resovist®/jetPEI™ erreicht werden konnten.

Statistisch signifikant blieb dieser Effekt in Passage 4 bei allen weiteren Bedingungen (Abb. 3.14).

Aufgrund der großen individuellen Streuung der Werte der einzelnen Spender wurden alle Ergebnisse in Bezug zu der jeweiligen Kontrolle gestellt und danach die Kovarianzanalyse durchgeführt. Hierbei wurde eine Transformation in einem 10er Logarithmus zur Stabilisierung der Varianz durchgeführt.

Dargestellt sind in Abb. 3.14 die logarithmierten Mittelwerte mit jeweiliger Standardabweichung.

Bedingungen, deren Standardabweichung die Referenzlinie der Kontrolle nicht schneidet, unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle.

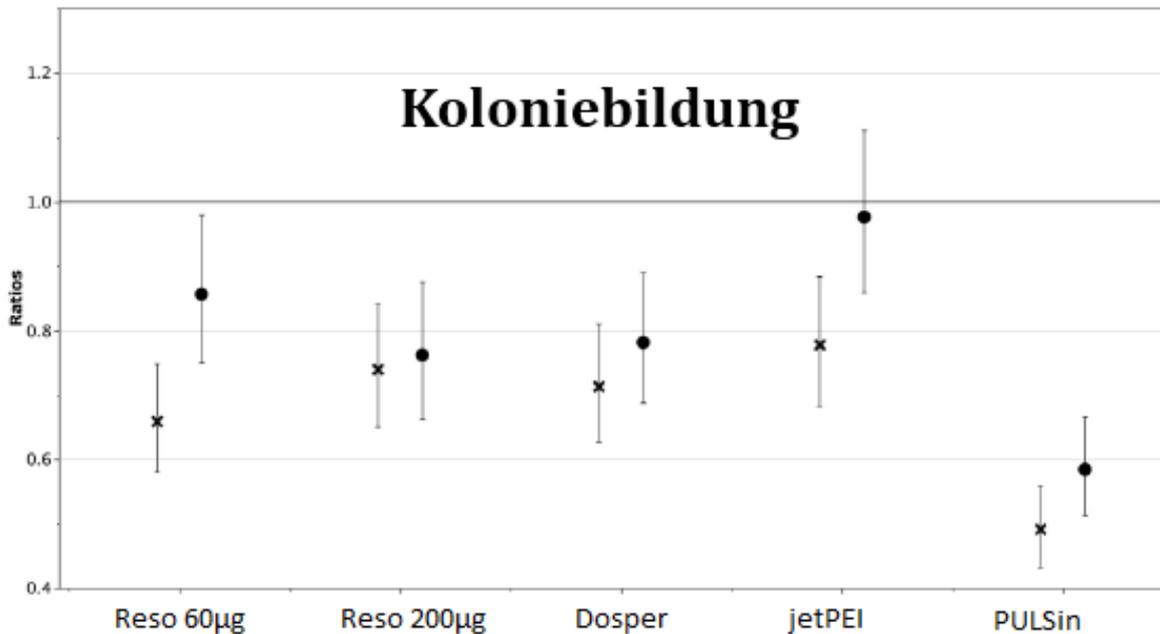


Abbildung 3.14: Koloniebildungsfähigkeit P2 und P4

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich sowohl die Bedingungen (Abb. 3.15) als auch das Zellalter signifikant auf die Koloniebildung auswirken (Abb. 3.16). Mittels Kleinstquadratmethode wurde für den Einfluss der Bedingung (Abb. 3.15) und für Einfluss des Zellalters (Abb. 3.15) jeweils ein p-Wert von kleiner 0,001 ermittelt. Dies gilt nur für die Passagen 2-4. Die klonogene Aktivität sinkt mit dem Alter und der Differenzierung der Zellen.

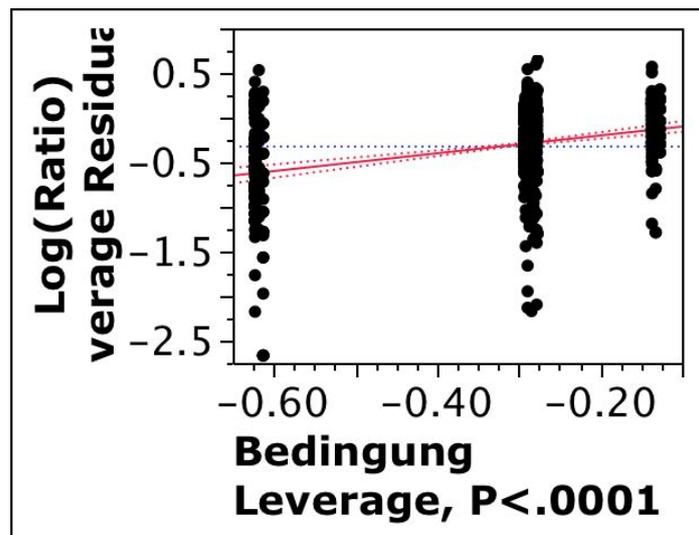


Abbildung 3.15: Signifikanter Einfluss der Bedingungen auf die Koloniebildung

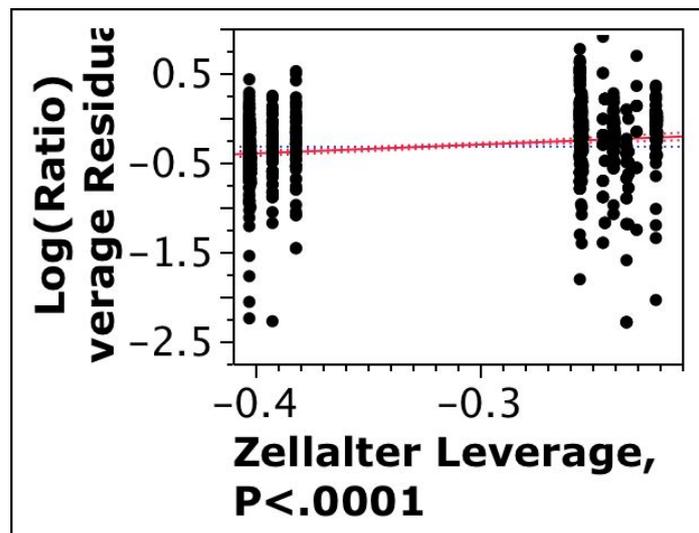


Abbildung 3.16: Signifikanter Einfluss des Zellalters auf die Koloniebildung

Auch bei Passage 5 konnte ein Abfall der Koloniebildungsfähigkeit bei allen Bedingungen außer bei Resovist® 60 μ g beobachtet werden. Nach zwei weiteren Passagen war die Koloniebildungsfähigkeit bei allen Bedingungen allerdings größer als die der unbehandelten Kontrolle (Abb. 3.17). Aufgrund der geringen Fall war eine statistische Auswertung der Passagen 5 und 7 nicht möglich.

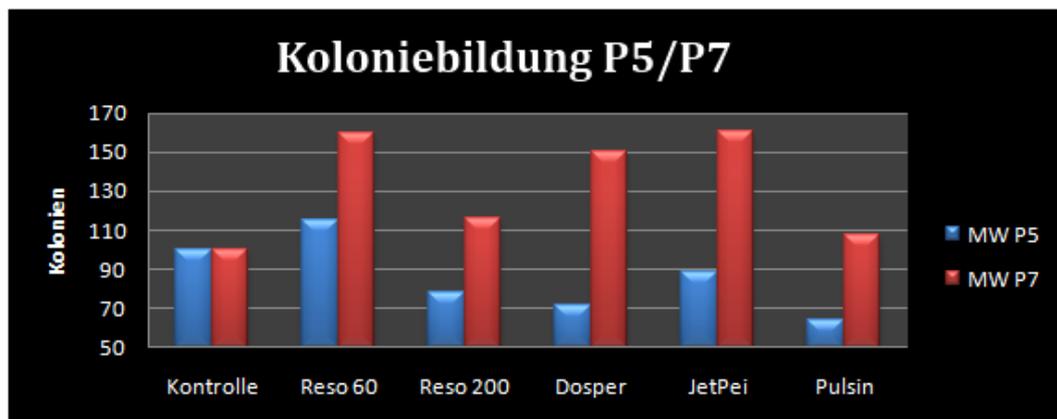


Abbildung 3.17: Koloniebildungsfähigkeit P5 und P7

KAPITEL 4

Diskussion

4.1 Eisenbeladung und Viabilität

Übereinstimmend mit der aktuellen Literatur wurde keine Auswirkung verschiedener Beladungsmodi auf die Vitalität der Zellen gefunden.

Die Eisenbeladung der hMSC nach Markieren mit SPIO und TAs wurde mittels Photometrie bestimmt. Hierbei erhielten wir bei Passage 2 einen TIL von $0,01pg$ bei der Kontrolle bis zu $145,9pg/Zelle$ bei Markieren mit $200\mu g$ Resovist®. Bei Passage 4 waren die Eisenwerte aufgrund der Zellteilung und des Zellstoffwechsels rückläufig. Grundsätzlich war der TIL bei allen Bedingungen mit Transfektionsagens höher als bei der alleinigen Beladung mit $60\mu g$ Resovist®, so dass man davon ausgehen kann, dass alle TAs zu einer verstärkten Eisenaufnahme in die Zellen führen. Bei dem TA jetPEI™ war der TIL durchgehend von allen drei TAs am höchsten, bei Dosper durchgehend am niedrigsten.

Diese Unterschiede in der Eisenkonzentration sind möglicherweise auf die unterschiedlichen Wirkungsweisen der TAs zurückzuführen. jetPEI™ ist ein wasserlösliches TA, während Dosper hingegen ein liposomales TA ist. Eventuell kann dadurch die Eisenaufnahme in die Zelle leichter oder vermehrt erfolgen.

Doch führt dieser teilweise sehr hohe TIL zu einer Beeinträchtigung der Zelle? Schäfer et al konnten eine eindeutige Veränderung des Zellstoffwechsel nachweisen. Hierbei wurden Ratten-MSC entsprechend unserer Versuche markiert. Bei der Auswertung der Versuche ergab sich eine Hochregulation des Transferrinrezeptors, d.h. die Eisenbeladung

führte zu einem veränderten Rezeptorstatus. Unklar war auch, ob die Rezeptoren nach Markieren noch voll funktionsfähig waren, da die Oberfläche der MSC mit Komplexen von SPIO mit TA überzogen war [69]. Dass hohe Konzentrationen von SPIO keinen Einfluss auf die Viabilität, die Koloniebildung oder das Differenzierungspotential der MSC haben, wiesen Hsiao et al nach. Dazu wurden hMSC mit einem SPIO markiert. Hierbei wurden TIL bis zu $23,4\text{pg}/\text{Zelle}$ erreicht ohne irgendeine Auswirkung auf die Zellen. Diese konnten auch mittels $1,5\text{ T MRT}$ nachgewiesen werden [36].

In der hier vorliegenden Arbeit war der TIL der Passage 2 bis zu fünf mal so hoch wie bei Hsiao, und sogar bei Passage 4 wurden Werte erzielt, die bei Beladung mit TA jetPEI™ genau so hoch und sogar noch höher bei Beladung mit Resovist® $200\mu\text{g}$ waren als bei der eben beschriebenen Arbeit. Trotzdem konnten wir nicht statistisch signifikant nachweisen, dass der erfolgte Abfall der Migrationsfähigkeit oder die bei Passage 2 als auch 4 bestehende Verminderung der Koloniebildungsrate mit dem TIL der einzelnen Zelle bzw. der einzelnen Bedingung zusammenhängt.

4.2 Migrationen

Die Migrationsfähigkeit der hMSC ist die Voraussetzung für das Homing der Zellen und damit das Erreichen der geschädigten Gewebe bzw. das Ausschöpfen ihres therapeutischen Potentials. In dieser Arbeit wurde die Migrationsfähigkeit der hMSC mittels 2-Kammer-System untersucht. Hierbei müssen die hMSC durch eine Membran migrieren, die die Situation in vivo imitiert. Hier zeigte sich eine Reduktion des Migrationsvermögens bei allen Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle bei Passage 2. Diese war allerdings nur bei dem TA PULSin™ signifikant. Im weiteren Versuchsverlauf waren diese Reduktionen rückläufig, sodass auch kein signifikanter Unterschied mehr bei PULSin™ in Passage 4 zu beobachten war.

Die verschiedenen Migrations- und Homingmechanismen der MSC wurden schon in Abschnitt 1.4 dargestellt. Als wichtigster und potentester Migrationsstimulator beschrieben ist PDGF. So konnten Ponte et al nachweisen, dass im Versuch mit hMSC, die wie bei uns bei orthopädischen Operationen aus dem Knochenmark gewonnen wurden, sich bei der Stimulation mit PDGF die stärkste Migration ergab [62]. Es kann also davon ausgegangen werden, dass der signifikante Abfall der Migrationsfähigkeit beim Markieren mit SPIO und dem TA PULSin™ nicht auf unzureichende oder nur geringe Stimulation mit einem ungeeigneten oder niederpotenten Stimulans zurückzuführen ist.

Vielmehr stellt sich die Frage, in wieweit dieses Markieren zu einer Veränderung evtl. sogar Schädigung der hMSC führt, wenn nicht mit dem etablierten Stimulans eine normale Migrationsfähigkeit gezeigt werden kann.

Diese Beeinträchtigung der hMSC muss aber reversibel sein, da sich die Migrationsfähigkeit der hMSC bei Passage 4 als nicht signifikant verringert darstellt, weder zur Kontrolle noch zu den anderen Bedingungen.

Dass das Markieren von MSC keine Auswirkung im Hinblick auf die Migrationsfähigkeit zeigt, wurde vor allem aufgrund der Arbeiten von Arbab et al angenommen. Die hMSC wurden allerdings mit Feridex, einem Ferumoxid-Protaminsulfat-Komplex, markiert. In der Versuchsanordnung wurde auch die Migrationsfähigkeit der hMSC bestimmt. Verwendet wurde hierbei allerdings SDF1 als Stimulans. Es ergab sich dabei kein Unterschied der

Migrationsfähigkeit von markierten und nichtmarkierten Zellen. Des weiteren ergab sich kein Unterschied im Differenzierungspotential der Zellen [6].

In der vorliegenden Arbeit konnte aber zumindest für das Markieren mit SPIO und dem TA PULSin™ eine signifikant eingeschränkte und für Passage 2 eine generelle, aber nicht signifikante Einschränkung der Migrationsfähigkeit der anderen Bedingungen gezeigt werden. Es ist also davon auszugehen, dass das Markieren mit SPIO und/oder TA zumindest zu einer reversiblen Einschränkung der Migrationsfähigkeit mit daraus eventuell folgendem fehlendem oder verringerten Homing der hMSC führen kann.

4.3 Koloniebildung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fähigkeit zur Koloniebildung mittels Koloniebildungsassay objektiviert. Wir konnten hier zeigen, dass das Markieren mit SPIO alleine und mit allen TAs zu einem signifikanten Abfall der Koloniebildungsfähigkeit führte. Dieser Effekt erholte sich bei Passage 4 bei allen Bedingungen. Besonders die Kombination mit dem TA jetPEI™ zeigte eine im Vergleich zur Kontrolle ähnliche Koloniebildung. Der stärkste und deutlichste Abfall der Koloniebildung zeigte sich bei der Kombination mit TA PULSin™, welches schon bei der Migration zu einer starken Reduktion führte. Möglicherweise stellt dieses TA für den Zellstoffwechsel die größte Herausforderung dar, während jetPEI™ als das verträglichste TA erscheint. Bekannt ist bisher, dass es signifikante Unterschiede bei den MSC Eigenschaften gibt. Diese sind abhängig vom Spender, Gewebe und Experiment. Es konnte gezeigt werden, dass KM-hMSC das geringste Potential zur Koloniebildung haben, dann allerdings die höchsten Zellzahlen in den Kolonien zeigen [68].

Bisher zeigen viele Arbeiten keinen Hinweis auf einen Einfluß auf die Koloniebildung, Migration und Differenzierungsfähigkeit von MSC nach Markieren mit SPIO und TA. Die im Abschnitt 4.1 vorgestellte Arbeit von Hsiao konnte keine Einschränkung der Koloniebildung der mit SPIO markierte Zellen zeigen [36], doch in dieser Arbeit zeigt sich dieser Effekt deutlich bei allen Bedingungen.

Es stellt sich nun die Frage, inwieweit sich diese Verminderung der klonogenen Aktivität auf das therapeutische Potential der MSC auswirkt. Und ist diese Verminderung transient oder perpetuierend? Bisher gibt es mehrere Arbeiten, die keinen Hinweis auf eine Einschränkung der Differenzierungsfähigkeit oder der Koloniebildung zeigen. So ergab sich bei Frank et al. keine Einschränkung der Koloniebildung bei Markieren mit drei verschiedenen TAs. Allerdings wurde in diesen Arbeiten ein Apoptosenachweis geführt und andere TAs verwendet [6], [23]. Die im Abschnitt 4.2 beschriebene Arbeit von Arbab et al zeigte zwar, dass das Markieren nicht zu einer Einschränkung der Differenzierung und Migrationsfähigkeit führt, allerdings wurde dabei die Koloniebildung nicht untersucht.

Andere Arbeiten hingegen konnten zeigen, dass das Markieren mit SPIO die chondro-

gene Differenzierung beeinflusst, bzw. verhindert [44],[13].

Bekannt ist zudem, dass SPIO, die größer als $1\mu m$ sind, die Koloniebildung inhibieren [32]. Möglicherweise bilden also die TAs mit SPIO solch große Komplexe. Eventuell ist der besonders starke Abfall der Koloniebildung bei PULSin™ darauf zurückzuführen. Möglicherweise führt die eingeschränkte Koloniebildung, die ein Zeichen für eingeschränkten Stoffwechsel, bzw. Zellstreß ist, auch zu einer Einschränkung der Differenzierung. Hierdurch würden sich die Ergebnisse von Hill et al und Ansalet al erklären lassen. Bei beiden ergab sich eine Einschränkung der therapeutischen Kapazität. Bei Hill et al führte das Markieren der MSC dazu, dass bei diesen Zellen kein Hinweis mehr auf eine myokardiale Differenzierung gefunden werden konnte [31]. Ansalet al konnten sowohl bei markierten als auch bei nichtmarkierten Zellen eine Verbesserung der LV-Funktion nach Injektion in geschädigtes Myocard sehen. Dieser Effekt gestaltete sich bei markierten MSC schwächer, war allerdings nicht statistisch signifikant [2].

Schließlich konnte hier deutlich gezeigt, dass sowohl das Markieren alleine mit SPIO als auch die Kombination mit einem TA zu einer Reduktion der Koloniebildung führt. Als eher protektiv scheint die Verwendung des TA jetPEI™ zu sein, während die Kombination mit dem TA PULSin™ zu einer massiv verminderten Koloniebildung führt, die sogar bei höheren Passagen noch zu beobachten ist.

KAPITEL 5

Zusammenfassung

hMSC zeichnen sich durch ihr großes Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotential aus. Aufgrund dessen gelangen sie immer mehr in das Interesse der aktuellen Forschung. Mögliche Einsatzgebiete der hMSC stellen kardiovaskuläre und hämatopoietische Erkrankungen dar, sowie degenerative Prozesse oder Erkrankungen wie Osteogenesis imperfecta. Als gängiges Mittel zur Verfolgung der MSC nach Injektion und zur Standortbestimmung im Zielorgan hat sich die Markierung von MSC mit SPIO alleine oder in Kombination mit TA etabliert. Die so markierten MSC können mittels MRT nachgewiesen werden. Bisher galt das Markieren mit SPIO und TA als nebenwirkungsarm bezüglich des möglichen Einsatzes zur Stammzellenmarkierung. Lediglich ein Einfluss auf die chondrogene Differenzierung konnte gezeigt werden.

Diese Arbeit vergleicht erstmals verschiedene Markierungsmethoden untereinander. Untersucht wurden dazu die Migrations- und Koloniebildungsfähigkeiten der hMSC direkt nach Markierung in Passage 2 und später nach Passage 4. Es konnte hier ein deutlicher Einfluss des Markierens mit SPIO und TA auf die hMSC gezeigt werden. So ergab sich eine Einschränkung der Migrationsfähigkeit bei Passage 2, die sich bei Passage 4 nicht mehr zeigte. Viel deutlicher fiel der Einfluss des Markierens bei der Koloniebildung ins Gewicht. Alle Bedingungen zeigten hier einen Abfall der Koloniebildungsfähigkeit, teilweise hielt dieser Effekt auch bei Passage 4 noch an. Als besonders ungünstig erwies sich das Markieren mit SPIO in Kombination mit dem TA PULSin™. Diese Bedingung führte zu der einzigen signifikanten Migrationsreduktion bei Passage 2 und zu der deutlichsten Kolonie-

bildungseinschränkung sowohl bei Passage 2 als auch 4. Dieses TA scheint aufgrund dieser Auswirkung als ungeeignet für das Markieren von hMSC für einen therapeutischen Einsatz. Das TA mit dem geringsten Einfluß auf Migration und Koloniebildungsrate war jetPEI™, welches bei der Koloniebildung nach Passage 4 fast ähnliche Werte wie die Kontrollgruppe aufwies. Insgesamt ergab sich keine Korrelation zwischen der Eisenbeladung der einzelnen Zellen, dem TIL und den geschilderten Effekten. Daher sind weitere Untersuchungen zu den intrazellulären Mechanismen nach Markieren mit SPIO und TA notwendig. Möglicherweise geben diese dann auch Aufschluss auf das therapeutische Potential nach dem Markieren, welches in dieser Arbeit nicht untersucht wurde und sich damit als limitierender Faktor dieser Arbeit ergibt. Es bleibt also zu sagen, dass das Markieren der hMSC sich auf die Migration und Koloniebildungsrate der Zellen auswirken kann. Daher sollte das Markieren von MSC nicht ohne kritische Beobachtung eingesetzt werden. Zudem ist die weitere Erforschung der Auswirkungen des Markierens auf die hMSC notwendig, um genaue Aussagen zum therapeutischen Potential der markierten hMSC machen zu können.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Differenzierungsmöglichkeiten der hMSC. Aus (Caplan, 1994)	3
1.2	Oberflächenmarker von hMSC. Aus (Deans and Moseley, 2000)	5
2.1	Markierung von hMSC in Passage 2, fotografiert direkt nach Markierung	24
3.1	Viabilitäten Passage 2-4	31
3.2	Viabilitäten Passage 5-7	31
3.3	Eisenbeladung P2	32
3.4	Eisenbeladung P2 bis P4	33
3.5	Eisenbeladung P5 und P7	33
3.6	Migrationsfähigkeit	35
3.7	Mittelwerte der Anzahl migrierter Zellen bei Passage 2	36
3.8	Einfluss der Beladung auf das Migrationsverhalten bei Passage 2	37
3.9	Dunnett's-Test für die Passage 2	38
3.10	Mittelwerte der Migration bei Passage 4	38
3.11	Einfluss der Bedingungen auf die Migration bei Passage 4	39
3.12	Dunnett's-Test für die Passage 4	39
3.13	Migrationsfähigkeit P5 und P7	40
3.14	Koloniebildungsfähigkeit P2 und P4	42
3.15	Signifikanter Einfluss der Bedingungen auf die Koloniebildung	43
3.16	Signifikanter Einfluss des Zellalters auf die Koloniebildung	43
3.17	Koloniebildungsfähigkeit P5 und P7	44

Tabellenverzeichnis

2.1	Geräte der Zellkultur	13
2.2	Verbrauchsmaterialien	13

Literaturverzeichnis

- [1] ABBOTT, JD ; HUANG, Y ; LIU, D ; HICKEY, R ; KRAUSE, DS ; GIORDANO, FJ:
Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury.
In: *Circulation* 110(21) (2004 Nov 23), S. 3300–5
- [2] AMSALEM, Y ; MARDOR, Y ; FEINBERG, MS ; LANDA, N ; MILLER, L ; DANIELS, D ; OCHERASHVILLI, A ; HOLBOVA, R ; YOSEF, O ; BARBASH, IM ; LEOR, J:
Iron-oxide labeling and outcome of transplanted mesenchymal stem cells in the infarcted myocardium.
In: *Circulation* 116(11 Suppl) (2007 Sep 11), S. I38–45
- [3] ARBAB, AS ; BASHAW, LA ; MILLER, BR ; JORDAN, EK ; LEWIS, BK ; KALISH, H ; FRANK, JA:
Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging.
In: *Radiology* 229(3) (2003 Dec), S. 838–46
- [4] ARBAB, AS ; PANDIT, SD ; ANDERSON, SA ; YOCUM, GT ; BUR, M ; FRENKEL, V ; KHUU, HM ; READ, EJ ; FRANK, JA:
Magnetic resonance imaging and confocal microscopy studies of magnetically labeled endothelial progenitor cells trafficking to sites of tumor angiogenesis.
In: *Stem Cells* 24(3) (2006 Mar), S. 671–8
- [5] ARBAB, AS ; YOCUM, GT ; KALISH, H ; JORDAN, EK ; ANDERSON, SA ; KHAKOO, AY ; READ, EJ ; FRANK, JA:
Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI.
In: *Blood* 104(4) (2004 Aug 15), S. 1217–23
- [6] ARBAB, AS ; YOCUM, GT ; RAD, AM ; KHAKOO, AY ; FELLOWES, V ; READ, EJ ; FRANK, JA:
Labeling of cells with ferumoxides-protamine sulfate complexes does not inhibit function or differentiation capacity of hematopoietic or mesenchymal stem cells.
In: *NMR Biomed* 18(8) (2005 Dec), S. 553–9
- [7] BADDOO, M ; HILL, K ; WILKINSON, R ; GAUPP, D ; HUGHES, C ; KOPEN, GC ; PHINNEY, DG:

- Charakterisation of mesenchymal stem cells isolated from murine marrow by negativ selektion.
In: *J Cell Biochem* 89 (2003), S. 1235–1249
- [8] BAKSH, D ; SONG, L ; TUAN, RS:
Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy.
In: *J. Cell. Mol. Med* 8 (3) (2004), S. 301–316
- [9] BIANCO, P ; ROBEY, PG:
Stem cells in tissue engineering.
In: *Nature* 414 (2001), S. 118–121
- [10] BLANC, K L. ; TAMMIK, C ; ROSENDAHL, K ; ZETTERBERG, E ; RINGDEN, O:
HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells.
In: *Exp Hematol* 31(10) (2003 Oct), S. 890–6
- [11] BULTE, JW ; KRAITCHMAN, DL:
Monitoring cell therapy using iron oxide MR contrast agents.
In: *Curr Pharm Biotechnol* 5(6) (2004 Dec), S. 567–84
- [12] BULTE, JW ; KRAITCHMAN, DL:
Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging.
In: *NMR Biomed* 17(7) (2004 Nov), S. 484–99
- [13] BULTE, JW ; KRAITCHMAN, DL ; MACKAY, AM ; PITTENGER, MF:
Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells is inhibited after magnetic labeling with ferumoxides.
In: *Blood* 104(10) (2004 Nov 15), S. 3410–2
- [14] CAPLAN, AI:
Mesenchymal stem cells.
In: *J Orthop Res* 9(5) (1991 Sep), S. 641–50
- [15] CONGET, PA ; MINGUELL, JJ:
Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells.
In: *J Cell Physiol* 181(1) (1999 Oct), S. 67–73.
- [16] DALDRUP-LINK, HE ; RUDELIUS, M ; METZ, S ; PIONTEK, G ; PICHLER, B ; SETTLES, M ; HEINZMANN, U ; SCHLEGEL, J ; OOSTENDORP, RA ; RUMMENY, EJ:
Cell tracking with gadophrin-2: a bifunctional contrast agent for MR imaging, optical imaging, and fluorescence microscopy.
In: *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31(9) (2004 Sep), S. 1312–21
- [17] DALDRUP-LINK, HE ; RUDELIUS, M ; PIONTEK, G ; METZ, S ; BRÄUER, R ; DEBUS, G ; COROT, C ; SCHLEGEL, J ; LINK, TM ; PESCHEL, C ; RUMMENY, EJ ; OOSTENDORP, RA:
Migration of iron oxide-labeled human hematopoietic progenitor cells in a mouse model: in vivo monitoring with 1.5-T MR imaging equipment.

- In: *Radiology* 234(1) (2005 Jan), S. 197–205
- [18] DENNIS, JE ; CARBILLET, JP ; CAPLAN, AI ; CHARBORD, P:
The STRO-1+ marrow cell population is multipotential.
In: *Cells Tissues Organs* 170(2-3) (2002), S. 73–82
- [19] DESCHASEAUX, F ; GINDRAUX, F ; SAADI, R ; OBERT, L ; CHALMERS, D ; HERVE, P:
Direct selection of human bone marrow mesenchymal stem cells using an anti-
CD49a antibody reveals their CD45^{med,low} phenotype.
In: *Br J Haematol* 122(3) (2003 Aug), S. 506–17
- [20] DEVINE, Sm ; HOFFMANN, R:
Role of mesenchymal stem cell in hematopoietic stem cell transplantation.
In: *Curr Opin Hematol* 99 (2000), S. 3838–3843
- [21] DOMINICI, M ; LEBLANC, K ; MUELLER, I ; SLAPER-CORTENBACH, I ; MARINI, F ;
KRAUSE, D ; DEANS, R ; KEATING, A ; PROCKOP, DJ ; HORWITZ, E:
Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International
Society for Cellular Therapy position statement.
In: *Cytotherapy* 8(4) (2006), S. 315–317
- [22] FORTE, G ; MINIERI, M ; COSSA, P ; ANTENUCCI, D ; SALA, M ; GNOCCHI, V ;
FIACCAVENTO, R ; CAROTENUTO, F ; VITO, P D. ; BALDINI, PM ; PRAT, M ;
NARDO, P D.:
Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration,
and differentiation.
In: *Stem Cells* 24(1) (2006 Jan), S. 23–33
- [23] FRANK, JA ; MILLER, BR ; ARBAB, AS ; ZYWICKE, HA ; JORDAN, EK ; LEWIS, BK ;
JR, LH B. ; BULTE, JW:
Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superpara-
magnetic iron oxides and transfection agents.
In: *Radiology* 228(2) (2003 Aug), S. 480–7
- [24] FRIEDENSTEIN, AJ ; GORSKAJA, JF ; KULAGINA, NN:
Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs.
In: *Exp Hematol* 4 (1976), S. 267–274
- [25] GREGORY, CA ; SINGH, H ; PERRY, AS ; PROCKOP, DJ:
The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of
human adult stem cells from bone marrow.
In: *J Biol Chem* 278(30) (2003 Jul 25), S. 28067–78
- [26] GRONTHOS, S ; FRANKLIN, DM ; LEDDY, HA ; ROBEY, PG ; STORMS, RW ; GIMBLE,
JM:
Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells.
In: *J Cell Physiol* 189 (2001), S. 54–63
- [27] HAN, JY ; GOH, RY ; SEO, SY ; HWANG, TH ; KWON, HC ; KIM, SH ; KIM, JS ; KIM,
HJ ; LEE, YH:

- Cotransplantation of cord blood hematopoietic stem cells and culture-expanded and GM-CSF-/SCF-transfected mesenchymal stem cells in SCID mice.
In: *J Korean Med Sci* 22(2) (2007 Apr), S. 242–7
- [28] HAUGER, O ; FROST, EE ; HEESWIJK, R van ; DEMINIÉRE, C ; XUE, R ; DELMAS, Y ; COMBE, C ; MOONEN, CT ; GRENIER, N ; BULTE, JW:
MR evaluation of the glomerular homing of magnetically labeled mesenchymal stem cells in a rat model of nephropathy.
In: *Radiology* 238(1) (2006 Jan), S. 200–10
- [29] HEISSING, B ; HATTORI, K ; DIAS, S ; AL. et:
Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kitligand.
In: *Cell* 109 (2002), S. 625–637
- [30] HERRERA, MB ; BUSSOLATI, B ; BRUNO, S ; MORANDO, L ; MAURIELLO-ROMANAZZI, G ; SANAVIO, F ; STAMENKOVIC, I ; BIANCONE, L ; CAMUSSI, G:
Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury.
In: *Kidney Int* 72(4) (2007 Aug), S. 430–41
- [31] HILL, JM ; DICK, AJ ; RAMAN, VK ; THOMPSON, RB ; YU, ZX ; HINDS, KA ; PESSANHA, BS ; GUTTMAN, MA ; VARNEY, TR ; MARTIN, BJ ; DUNBAR, CE ; McVEIGH, ER ; LEDERMAN, RJ:
Serial cardiac magnetic resonance imaging of injected mesenchymal stem cells.
In: *Circulation* 108(8) (2003 Aug 26), S. 1009–14
- [32] HINDS, KA ; HILL, JM ; SHAPIRO, EM ; LAUKKANEN, MO ; SILVA, AC ; COMBS, CA ; VARNEY, TR ; BALABAN, RS ; KORETSKY, AP ; DUNBAR, CE:
Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells.
In: *Blood* 102(3) (2003 Aug 1), S. 867–72
- [33] HOEHN, M ; KÜSTERMANN, E ; BLUNK, J ; WIEDERMANN, D ; TRAPP, T ; WECKER, S ; FÖCKING, M ; ARNOLD, H ; HESCHELER, J ; FLEISCHMANN, BK ; SCHWINDT, W ; BÜHRLE, C:
Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat.
In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(25) (2002 Dec 10), S. 16267–72
- [34] HONCZARENKO, M ; LE, Y ; SWIERKOWSKI, M ; GHIRAN, I ; GLODEK, AM ; SILBERSTEIN, LE:
Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors.
In: *Stem Cells* 24(4) (2006 Apr), S. 1030–41
- [35] HORWITZ, EM ; PROCKOP, DJ ; FITZPATRICK, LA ; KOO, WW ; GORDON, PL ; NEEL, M ; SUSSMAN, M ; ORCHARD, P ; MARX, JC ; PYERITZ, RE ; BRENNER, MK:
Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta.

- In: *Nat Med* 5(3) (1999 Mar), S. 309–13
- [36] HSIAO, JK ; TAI, MF ; CHU, HH ; CHEN, ST ; LI, H ; LAI, DM ; HSIEH, ST ; WANG, JL ; LIU, HM:
Magnetic nanoparticle labeling of mesenchymal stem cells without transfection agent: cellular behavior and capability of detection with clinical 1.5 T magnetic resonance at the single cell level.
In: *Magn Reson Med* 58(4) (2007 Oct), S. 717–24
- [37] HYNES, RO:
Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.
In: *Cell* 110(6) (2002 Sep 20), S. 673–87
- [38] IGURA, K ; ZHANG, X ; TAKAHASHI, K ; MITSURU, A ; YAMAGUCHI, S ; TAKASHI, TA:
Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta.
In: *Cytotherapy* 6 (2004), S. 543–553
- [39] ITTRICH, H ; LANGE, C ; DAHNKE, H ; ZANDER, AR ; ADAM, G ; NOLTE-ERNSTING, C:
Labeling of mesenchymal stem cells with different superparamagnetic particles of iron oxide and detectability with MRI at 3T.
In: *Rofo* 177(8) (2005 Aug), S. 1151–63
- [40] JI, JF ; HE, BP ; DHEEN, ST ; TAY, SS:
Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury.
In: *Stem Cells* 22(3) (2004), S. 415–27
- [41] KATZ, Aj ; THOLPADY, A ; THOLPADY, SS ; SHNAG, H ; OGLE, RC:
Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells.
In: *Stem Cells* 23 (2005), S. 412–423
- [42] KAWADA, H ; FUJITA, J ; KINJO, K ; AL et:
Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction.
In: *Blood* 104 (2004), S. 3581–3587
- [43] KERN, S ; EICHLER, H ; STOEVE, J ; KLÜTER, H ; BIEBACK, K:
Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue.
In: *Stem Cells* 24(5) (2006 May), S. 1294–301
- [44] KOSTURA, L ; KRAITCHMAN, DL ; MACKAY, AM ; PITTENGER, MF ; BULTE, JW:
Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis.
In: *NMR Biomed* 17(7) (2004 Nov), S. 513–7
- [45] KRAITCHMAN, DL ; HELDMAN, AW ; ATALAR, E ; AMADO, LC ; MARTIN, BJ ; PITTENGER, MF ; HARE, JM ; BULTE, JW:

- In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction.
In: *Circulation* 107(18) (2003 May 13), S. 2290–3
- [46] KUMAR, S ; PONNAZHAGAN, S:
Bone homing of mesenchymal stem cells by ectopic alpha 4 integrin expression.
In: *FASEB J* 21(14) (2007 Dec), S. 3917–27
- [47] LAPIDOT, T ; PETIT, I:
Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells.
In: *Exp Hematol* 30 (2002), S. 973–981
- [48] MACKENZIE, TC ; FLAKE, AW:
human mesenchymal stem cells persist, demonstrate site-specific multipotential differentiation, and are present in sites of wound healing and tissue regeneration after transplantation into fetal sheep.
In: *Blood Cells Mol Dis* 27 (2001), S. 601–604
- [49] MACKENZIE, TC ; FLAKE, AW:
Multilineage differentiation of human MSC after in utero transplantation.
In: *Cytotherapy* 3(5) (2001), S. 403–5
- [50] MAGNITSKY, S ; WATSON, DJ ; WALTON, RM ; PICKUP, S ; BULTE, JW ; WOLFE, JH ; POPTANI, H:
In vivo and ex vivo MRI detection of localized and disseminated neural stem cell grafts in the mouse brain.
In: *Neuroimage* 26(3) (2005 Jul 1), S. 744–54
- [51] MAJUMDAR, MK ; THIEDE, MA ; HAYNESWORTH, SE ; BRUDER, SP ; GERSON, SL:
Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages.
In: *J Hematother Stem Cell Res* 9(6) (2000 Dec), S. 841–8
- [52] MODO, M ; CASH, D ; MELLODEW, K ; WILLIAMS, SC ; FRASER, SE ; MEADE, TJ ; PRICE, J ; HODGES, H:
Tracking transplanted stem cell migration using bifunctional, contrast agent-enhanced, magnetic resonance imaging.
In: *Neuroimage* 17(2) (2002 Oct), S. 803–11.
- [53] MOUISEDDINE, M ; FRANCOIS, S ; SEMONT, A ; SACHE, A ; ALLENET, B ; MATHIEU, N ; FRICK, J ; THIERRY, D ; CHAPEL, A:
Human mesenchymal stem cells home specifically to radiation-injured tissues in a non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency mouse model.
In: *Br J Radiol* 80 Spec No 1 (2007 Sep), S. S49–55
- [54] MUELLER, SM ; GLOWACKI, J:
Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges.
In: *J Cell Biochem* 82(4) (2001), S. 583–90

- [55] NAGAYA, N ; FUJII, T ; IWASE, T ; OHGUSHI, H ; ITOH, T ; UEMATSU, M ; YAMAGISHI, M ; MORI, H ; KANGAWA, K ; KITAMURA, S:
Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis.
In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287(6) (2004 Dec), S. H2670–6
- [56] NETH, P ; CICCARELLA, M ; EGEEA, V ; HOELTERS, J ; JOCHUM, M ; RIES, C:
Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells.
In: *Stem Cells* 24(8) (2006 Aug), S. 1892–903
- [57] NEUSS, S ; BECHER, E ; WÖLTJE, M ; TIETZE, L ; JAHNEN-DECHENT, W:
Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing.
In: *Stem Cells* 22(3) (2004), S. 405–14
- [58] NICOLA, M D. ; CARLO-STELLA, C ; MAGNI, M ; MILANESI, M ; LONGONI, PD ; MATTEUCCI, P ; GRISANTI, S ; GIANNI, AM:
Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli.
In: *Blood* 99(10) (2002 May 15), S. 3838–43
- [59] NISHIDA, S ; ENDO, N ; YAMAGIWA, H ; TANIZAWA, T ; TAKAHASHI, HE:
Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation.
In: *J Bone Miner Metab* 17(3) (1999), S. 171–7
- [60] PITTENGER, MF ; MACKAY, AM ; BECK, SC ; AL. et:
Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.
In: *Science* 284 (1999), S. 143–147
- [61] PITTENGER, MF ; MARTIN, BJ:
Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics.
In: *Circ Res* 95(1) (2004 Jul 9), S. 9–20
- [62] PONTE, AL ; MARAIS, E ; GALLAY, N ; LANGONNÉ, A ; DELORME, B ; HÉRAULT, O ; CHARBORD, P ; DOMENECH, J:
The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities.
In: *Stem Cells* 25(7) (2007 Jul), S. 1737–45
- [63] PROCKOP, DJ:
Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues.
In: *Science* 276(5309) (1997 Apr 4), S. 71–4.
- [64] REIMER, P ; WEISSLEDER, R ; LEE, AS ; WITTENBERG, J ; BRADY, TJ:
Receptor imaging: application to MR imaging of liver cancer.
In: *Radiology* 177(3) (1990 Dec), S. 729–34
- [65] REISER, J ; ZHANG, XY ; HEMENWAY, CS ; MONDAL, D ; PRADHAN, L ; RUSSA, VF L.:
Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases.

- In: *Expert Opin Biol Ther* 5(12) (2005 Dec), S. 1571–84
- [66] REYES, M ; VERFAILLIE, CM:
Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells.
In: *Ann N Y Acad Sci* 938 (2001 Jun), S. 231–3
- [67] RIES, C ; EGEA, V ; KAROW, M ; KOLB, H ; JOCHUM, M ; NETH, P:
MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines.
In: *Blood* 109(9) (2007 May 1), S. 4055–63
- [68] SAKAGUCHI, Y ; SEKIYA, I ; YAGISHITA, K ; MUNETA, T:
Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source.
In: *Arthritis Rheum* 52(8) (2005 Aug), S. 2521–9
- [69] SCHÄFER, R ; KEHLBACH, R ; WISKIRCHEN, J ; BANTLEON, R ; PINTASKE, J ; BREHM, BR ; GERBER, A ; WOLBURG, H ; CLAUSSEN, CD ; NORTHOFF, H:
Transferrin receptor upregulation: in vitro labeling of rat mesenchymal stem cells with superparamagnetic iron oxide.
In: *Radiology* 244(2) (2007 Aug), S. 514–23
- [70] SCHENK, S ; MAL, N ; FINAN, A ; ZHANG, M ; KIEDROWSKI, M ; POPOVIC, Z ; MCCARTHY, PM ; PENN, MS:
Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor.
In: *Stem Cells* 25(1) (2007 Jan), S. 245–51
- [71] SCHOEPPF, U ; MARECOS, EM ; MELDER, RJ ; JAIN, RK ; WEISSLEDER, R:
Intracellular magnetic labeling of lymphocytes for in vivo trafficking studies.
In: *Biotechniques* 24(4) (1998 Apr), S. 642–6, 648–51
- [72] SEGERS, VF ; RIET, I V. ; ANDRIES, LJ ; LEMMENS, K ; DEMOLDER, MJ ; BECKER, AJ D. ; KOCKX, MM ; KEULENAER, GW D.:
Mesenchymal stem cell adhesion to cardiac microvascular endothelium: activators and mechanisms.
In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(4) (2006 Apr), S. H1370–7
- [73] SEKIYA, I ; LARSON, BL ; VUORISTO, JT ; CUI, JG ; PROCKOP, DJ:
Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs).
In: *J Bone Miner Res* 19(2) (2004 Feb), S. 256–64
- [74] SHI, M ; LI, J ; LIAO, L ; CHEN, B ; LI, B ; CHEN, L ; JIA, H ; ZHAO, RC:
Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice.
In: *Haematologica* 92(7) (2007 Jul), S. 897–904
- [75] SON, BR ; MARQUEZ-CURTIS, LA ; KUCIA, M ; WYSOCZYNSKI, M ; TURNER, AR ; RATAJCZAK, J ; RATAJCZAK, MZ ; JANOWSKA-WIECZOREK, A:

- Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases.
In: *Stem Cells* 24(5) (2006 May), S. 1254–64
- [76] STENDERUP, K ; JUSTESEN, J ; CLAUSEN, C ; KASSEM, M:
Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells.
In: *Bone* 33(6) (2003 Dec), S. 919–26
- [77] TANG, YL ; ZHAO, Q ; ZHANG, YC ; CHENG, L ; LIU, M ; SHI, J ; YANG, YZ ; PAN, C ; GE, J ; PHILLIPS, MI:
Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium.
In: *Regul Pept* 117(1) (2004 Jan 15), S. 3–10
- [78] TONDREAU, T ; LAGNEAUX, L ; DEJENEFFE, M ; DELFORGE, A ; MASSY, M ; MORTIER, C ; BRON, D:
Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential.
In: *Cytotherapy* 6(4) (2004), S. 372–9
- [79] TONDREAU, T ; MEULEMAN, N ; DELFORGE, A ; DEJENEFFE, M ; LEROY, R ; MASSY, M ; MORTIER, C ; BRON, D ; LAGNEAUX, L:
Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity.
In: *Stem Cells* 23(8) (2005 Sep), S. 1105–12
- [80] UGARTE, DA D. ; ALFONSO, Z ; ZUK, PA ; ELBARBARY, A ; ZHU, M ; ASHJIAN, P ; BENHAIM, P ; HEDRICK, MH ; FRASER, JK:
Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow.
In: *Immunol Lett* 89(2-3) (2003 Oct 31), S. 267–70
- [81] WAKITANI, S ; IMOTO, K ; YAMAMOTO, T ; SAITO, M ; MURATA, N ; YONEDA, M:
Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees.
In: *Osteoarthritis Cartilage* 10(3) (2002 Mar), S. 199–206
- [82] WANG, Y ; JOHNSEN, HE ; MORTENSEN, S ; BINDSLEV, L ; RIPA, RS ; HAACK-SORENSEN, M ; JORGENSEN, E ; FANG, W ; KASTRUP, J:
Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention.
In: *Heart* 92(6) (2006 Jun), S. 768–74
- [83] WEISSLEDER, R ; STARK, DD ; ENGELSTAD, BL ; BACON, BR ; COMPTON, CC ; WHITE, DL ; JACOBS, P ; LEWIS, J:
Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity.
In: *AJR Am J Roentgenol* 152(1) (1989 Jan), S. 167–73

- [84] WYNN, RF ; HART, CA ; CORRADI-PERINI, C ; O'NEILL, L ; EVANS, CA ; WRAITH, JE ; FAIRBAIRN, LJ ; BELLANTUONO, I:
A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow.
In: *Blood* 104(9) (2004 Nov 1), S. 2643–5
- [85] YEH, TC ; ZHANG, W ; ILDSTAD, ST ; HO, C:
In vivo dynamic MRI tracking of rat T-cells labeled with superparamagnetic iron-oxide particles.
In: *Magn Reson Med* 33(2) (1995 Feb), S. 200–8
- [86] ZVAIFLER, NJ ; MARINOVA-MUTAFCHIEVA, L ; ADAMS, G ; EDWARDS, CJ ; MOSS, J ; BURGER, JA:
Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta.
In: *Arthritis Res* 2 (2000), S. 477–488

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hinnak Northoff für das Überlassen dieses interessanten Themas.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Klaus Dietz die statistische Auswertung.

Besonderer Dank geht an Herrn Dr. med. Richard Schäfer und Herrn Dr. Rainer Kehlbach für die hervorragende Betreuung während dieser Arbeit.

Ebenso danke ich Eva für die vielen Stunden mit guter Laune und guter Zusammenarbeit im Labor.

Nicht zuletzt möchte ich Daniel für Betreuung sämtlicher Computerprobleme und meinen Eltern, die mir meinen Weg und das Studium ermöglicht haben, danken.