

Entwicklung von Expansionsstrategien für  
Misch- und Subpopulationen mesenchymaler Stromazellen  
aus dem Nabelschnurgewebe unter xeno- freien  
Kultivierungsbedingungen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von  
M.Sc. Tim Hatlapatka

geboren am 13.03.1981 in Hildesheim

2011

Referent: Prof Dr. Thomas Scheper  
Institut für Technische Chemie  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferent: PD Dr. Cornelia Kasper  
Institut für Technische Chemie  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 01. August 2011

## Erklärung

Hierdurch erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogenen Institutionen vollständig angegeben wurden. Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, im Mai 2011

~ *meiner Familie* ~

### Danksagungen

Ich danke Prof. Dr. Thomas Scheper für die Bereitstellung dieses hochinteressanten Themas und für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Technische Chemie anfertigen zu dürfen.

Ich danke PD Dr. Cornelia Kasper für die beispielhafte Betreuung während dieser Arbeit, für zahlreiche wertvolle Diskussionen und Hilfestellungen, für die Ermutigung zu Auslandsaufenthalt und Stipendiumsförderung, sowie für die Übernahme des Korreferats.

Prof. Dr. Ralf Hass danke ich für konstruktive Gespräche und Hilfestellungen, für die Durchführung der CCE- Experimente, sowie für die Übernahme der Funktion des Drittprüfers.

Prof. Dr. Roland Jacobs und Prof. Dr. Britta Eiz-Vesper möchte ich für die Bereitstellung der PBMCs und für die Unterstützung bei immunologischen Fragestellungen danken.

Antonina Lavrentieva, Dr. Pierre Moretti und allen weiteren Kollegen aus der Zellkultur möchte ich für die fantastische Zusammenarbeit danken. Es war eine Freude mit so tollen und hilfsbereiten Menschen zusammen zu arbeiten! Außerdem danke ich Martina Weiß und Martin Pähler für ihre stete Hilfsbereitschaft und technische Unterstützung. Ebenso gilt mein Dank all den weiteren lieben Kollegen, die zu dem freundlichen und fröhlichen Arbeitsklima am TCI beigetragen haben.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern und meiner Familie, meiner Freundin und meinen Freunden, die mich alle auf ihre eigene Art und Weise während meiner Arbeit unterstützt und ermutigt haben und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

### Zusammenfassung

Schlüsselwörter: *Mesenchymale Stammzelle, Mesenchymale Stromazelle, MSC, Nabelschnur, xeno- frei*

Die Regeneration von beschädigtem oder erkranktem Gewebe stellt gegenwärtig eine der größten Herausforderungen der Medizin dar. In diesem Kontext sind Stammzellen und vor allem mesenchymale Stamm- oder Stromazellen (MSCs) von großem Interesse, da sie in hohem Maße zur Selbsterneuerung fähig sind und kontrolliert zu unterschiedlichen Zelltypen differenziert werden können. In den letzten Jahren haben sich die menschliche Nabelschnur und andere geburtsassoziierte Gewebe als wertvolle Quellen für MSCs heraus gestellt. Diese Gewebe fallen täglich in großen Mengen an und ihre Verwendung ist frei von ethischen Bedenken.

Für einen klinischen Einsatz von MSCs wird Zellmaterial in großen Mengen und von hoher Qualität benötigt. Hierfür müssen biotechnologische Protokolle etabliert werden, die eine sichere und reproduzierbare Isolierung und Expansion der Zellen erlauben. Auf die Verwendung von Seren nicht human Ursprungs sollte in diesem Zusammenhang verzichtet werden, um ein Infektionsrisiko mit tierischen Pathogenen gering zu halten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Stromazellen aus dem Nabelschnurgewebe erfolgreich mittels einer Explantatkultur isoliert. Durch die Verwendung von allogenen Humanseren (HS) konnten xeno-freie Kulturbedingungen etabliert werden. Dabei wurde in einem Vergleich mit vier kommerziell erhältlichen Kälberseren gezeigt, dass die Zellen in Langzeitkulturexperimenten unter dem Einfluss von HS das höchste Proliferationspotential aufwiesen und der MSC- typische Phänotyp über die gesamte Kulturdauer stabil blieb. Zur weiteren Optimierung der Kulturbedingungen wurde in den folgenden Versuchen die optimale Konzentration des Serums im Medium ermittelt. Als Kriterien hierfür wurden das Proliferationspotential, der Anteil apoptotischer und seneszenten Zellen, sowie die Anzahl kolonienbildender Zellen in einer Kultur herangezogen.

Obwohl die isolierten Zellen innerhalb einer Kultur einen homogenen Immunphänotyp aufwiesen, konnten morphologische Unterschiede bezüglich der Zellgröße beobachtet werden. Um der Frage nachzugehen, ob Zellen unterschiedlicher Größe sich in ihren Charakteristika (wie z.B. Proliferations- und Differenzierungspotential) unterscheiden, wurden die ursprünglichen Zellkulturen mittels „*Counterflow Centrifugal Elutriation*“ (CCE) in Zell- Subpopulationen unterschiedlicher Größe aufgetrennt. Diese wurden anschließend auf ihr Differenzierungspotential hin miteinander verglichen. Es zeigte sich ein multilineares

Differenzierungspotential der untersuchten Subpopulationen, sowie der ursprünglichen Mischpopulation. Um die Protokolle zur *in vitro* Differenzierung der Zellen zu optimieren, wurde auch der Einfluss der Sauerstoffkonzentrationen während der Differenzierung untersucht.

Abschließend konnte in Ko-Kulturversuchen mit allogenen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) gezeigt werden, dass die Zellen *in vitro* ein nur geringes immunogenes Potential, sowie immunmodulatorische Eigenschaften aufwiesen. Diese Ergebnisse sind vor allem mit Blick auf zellbasierte Therapien von großer Bedeutung und zeigen zusammen mit den weiteren Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ein großes Potential von Stromazellen aus dem Nabelschnurgewebe für klinische Anwendungen auf.

## Abstract

Keywords: *Mesenchymal Stem Cell, Mesenchymal Stromal Cell, MSC, Umbilical Cord, xeno-free*

The regeneration of damaged or diseased tissues or organs is one of the most ambitious and challenging fields in modern medicine. In this context, stem cells and especially mesenchymal stem or stromal cells (MSCs) have proven to offer great promise as these cells are capable for extensive self-renewal and display a multilineage differentiation potential. Over the last decade the human umbilical cord and other birth-associated tissues have been found to be a rich and valuable source of MSCs. Since these tissues are discarded after birth, the cells are easily accessible without ethical concerns.

The production of therapeutically significant cell numbers still remains to be one of the major challenges in clinical applications. Therefore biotechnological protocols need to be established to guarantee a reproducible and safe isolation and expansion of the cells. In this context the use of sera of animal origin is inadvisable, since it involves the risk of a transmission of infections from animals to man.

In the context of this work, mesenchymal stromal cells were isolated from whole umbilical cord tissue and xeno-free culture conditions were established. Therefore four different fetal calf sera (FCS) and allogeneic human serum (HS) were compared with regard to cell proliferation and MSC marker stability in long-term expansion experiments and HS was shown to support optimal growth conditions. Additionally, the optimal concentration of HS during cultivation was determined with regard to cell proliferative potential, apoptosis, colony-forming unit fibroblast (CFU-F) frequency and cell senescence.

Although isolated cell populations were homogeneous with regard to MSC marker expression, differences in cell morphology (e.g. cell size and shape) could be observed in primary UC cell cultures. To characterize the morphologically different cells, primary cell cultures were separated into subpopulations according to cell size using “*Counterflow Centrifugal Elutriation*” (CCE) and compared with regard to a multilineage differentiation potential. To further optimize *in vitro* differentiation protocols, the influence of different oxygen concentrations during cell cultivation was investigated.

In co-culture experiments with peripheral blood mononuclear cells (PBMC) it could finally be demonstrated that isolated UC-MSCs also displayed *in vitro* immunoprivileged and immunomodulatory properties. These findings are of great relevance especially for



applications of the cells in the field of cell-based therapies and demonstrate, together with the other results presented in this work, that umbilical cord- derived mesenchymal stromal cells have a great potential for clinical applications.

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
αMEM	<i>α minimum essential medium</i>
μ	Mikro
AE	<i>Amniotic Epithelium</i>
AF	<i>Amniotic Fluid</i>
AM	<i>Amniotic Mesoderm</i>
BM	<i>Bone Marrow</i>
CCE	<i>Counterflow Centrifugal Elutriation</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CFU- F	<i>colony-forming unit fibroblast</i>
cm	Zentimeter
CM	<i>Chorionic Mesoderm</i>
CV	<i>Chorionic Villi</i>
D	Decidua
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dd	doppelt deionisiert
DMEM	<i>Dulbecco`s modified eagle`s medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
E	Elutriationsfraktion
EBRA	<i>European Biomedical Research Association</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>

ES- Zelle	Embryonale Stammzelle
FCS	<i>fetal calve serum</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GvHD	<i>Graft-versus-Host-Disease</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HS	Humanserum
IL	Interleukin
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
ITS	Insulin, Transferrin, Selen
l	Liter
k	Kilo
m	Milli
M	molar
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MP	Mischpopulation
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSC	<i>mesenchymal stem or stromal cell</i>
n	Nano
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PHA	Phytohämagglutinin
PL	Plazenta
PPAR $\gamma$	<i>Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma</i>
RFU	<i>relative fluorescence unit</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>

s	Sekunde
SA- $\beta$ -Gal	Seneszenz-assoziierte $\beta$ -Galactosidase
RUNX2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i>
UC	<i>Umbilical Cord</i>
UCB	<i>Umbilical Cord Blood</i>
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
w/v	<i>weight per volume</i>

## Inhaltsverzeichnis

Danksagungen .....	I
Zusammenfassung.....	IV
Abstract .....	II
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
Inhaltsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung .....	1
2 Theoretische Grundlagen.....	4
2.1 Multipotente mesenchymale Stromazellen (MSCs) aus geburtsassoziierten Geweben.....	4
2.1.1 Charakterisierung von MSCs aus Plazenta und fetalen Membranen .....	8
2.1.2 Charakterisierung von UC-MSCs .....	11
2.1.3 In vitro Differenzierungspotential von MSCs aus Plazenta und fetalen Membranen ....	11
2.1.4 In vitro Differenzierungspotential von UC-MSCs.....	14
2.1.5 In vivo Anwendung von MSCs aus geburtsassoziierten Geweben.....	17
3 Experimenteller Teil .....	20
3.1 Isolierung von mesenchymalen Stromazellen aus dem Nabelschnur-gewebe.....	21
3.2 Charakterisierung von mesenchymalen Stromazellen aus dem Nabelschnurgewebe .....	23
3.3 Formulierung der optimalen Kulturbedingungen für UC-MSCs.....	25
3.3.1 Etablierung von xeno- freien Kultivierungsbedingungen für UC-MSCs .....	26
3.3.2 Optimierung der Serumkonzentration für die Kultivierung von UC-MSCs .....	33
3.4 Identifizierung und Charakterisierung von UC-MSC Subpopulationen .....	45
3.4.1 Counterflow Centrifugal Elutriation (CCE).....	46
3.4.2 Charakterisierung von UC-MSC Subpopulationen.....	47
3.4.3 Untersuchungen zum Differenzierungspotential von UC-MSC Subpopulationen.....	48
3.5 Untersuchungen zum Immunprivileg und zu immunmodulatorischen Eigenschaften von UC-MSCs.....	64

# Inhaltsverzeichnis

---

3.5.1	<i>Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester Assay</i> .....	65
3.5.2	<i>Ko- Kultivierungen von UC-MSCs und allogenen Immunzellen</i> .....	66
3.6	Zusammenfassung und Ausblick.....	77
4	Literaturverzeichnis .....	79
5	Anhang.....	95
5.1	Material .....	95
5.1.1	<i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	95
5.1.2	<i>Primer</i> .....	95
5.1.3	<i>Antikörper</i> .....	96
5.1.4	<i>Kits</i> .....	97
5.1.5	<i>Chemikalien</i> .....	97
5.1.6	<i>Geräte und Laboraustattung</i> .....	99
5.1.7	<i>Primärzellen</i> .....	101
5.1.8	<i>Zellkulturmedien</i> .....	102
5.1.9	<i>Puffer und Lösungen</i> .....	102
5.2	Methoden.....	104
5.2.1	<i>Zellkultur</i> .....	104
5.2.2	<i>Differenzierungen</i> .....	105
5.2.3	<i>Ko- Kulturen</i> .....	106
5.2.4	<i>Analytik</i> .....	106
5.2.5	<i>Histologische Nachweismethoden</i> .....	108
5.2.6	<i>Monoparametrische Analyse des Immunphänotyps von UC-MSCs</i> .....	109
5.2.7	<i>Counterflow Centrifugal Elutriation (CCE)</i> .....	110
5.2.8	<i>Reverse Transkriptase (RT)- PCR</i> .....	111
	Publikationsliste.....	113
	Curriculum Vitae.....	116

### 1 Einleitung

Die Entwicklung von zelltherapeutischen Verfahren für die klinische Anwendung ist eine spannende, herausfordernde und sich rasch entwickelnde Aufgabe der modernen Medizin. Stammzellen und insbesondere embryonale Stamm (ES)-Zellen sind auf Grund ihrer pluripotenten Differenzierungsmöglichkeiten in diesem Zusammenhang von großem Interesse. Allerdings ist die Verwendung von ES-Zellen ethisch problematisch. Zudem birgt die Therapie mit diesen Zellen stets die Gefahr der Tumorbildung. Die Verwendung von adulten Stammzellen stellt daher eine wichtige Alternative dar. Adulte Stammzellen kommen in nahezu jedem Gewebe des menschlichen Körpers vor und bilden ein Reservoir zur kontinuierlichen Regeneration. Sie besitzen die Fähigkeit in einem undifferenzierten und unspezialisierten Zustand im Gewebe zu verweilen und bei Bedarf zu gewebetypischen, spezialisierten Zellen zu differenzieren. Um den Pool an undifferenzierten Zellen im Gewebe aufrecht zu erhalten, besitzen Stammzellen das Potential zur Selbsterneuerung durch symmetrische oder asymmetrische Zellteilung<sup>1</sup>. Dies bedeutet, dass bei der Zellteilung stets eine Tochterzelle entsteht, welche identisch zur Mutterzelle ist. Im Falle der zweiten Tochterzelle kann es sich entweder ebenfalls um eine Stammzelle, oder aber um eine Vorläuferzelle handeln, welche weiter zu einer spezialisierten Zelle differenziert. Die Entscheidung über die jeweilige Teilung erfolgt nach Bedarf und wird durch Signale in der Mikroumgebung der Zelle bestimmt.

Eine der ersten auf adulten Stammzellen beruhenden Therapien war 1968 die Behandlung des Wiskott- Aldrich Syndroms mittels Knochenmarkstransplantation<sup>2</sup>. Heutzutage werden hämatopoetische Stammzelltransplantationen routinemäßig zur Behandlung verschiedener Formen von Leukämie eingesetzt. Pionierarbeiten von Friedenstein und Mitarbeitern Ende der sechziger Jahre des letzten Jahrhunderts zeigten, dass das Knochenmark neben hämatopoetischen Stammzellen auch fibroblastenähnliche plastikadhärent wachsende Zellen beherbergt, welche ein osteogenes Differenzierungspotential aufweisen<sup>3,4</sup>. Caplan *et al.* prägten für diese Zellen den Begriff der Mesenchymalen Stamm- oder Stromazelle (MSC)<sup>5</sup>. Vor allem in den letzten Jahren hat sich das Feld der klinischen Anwendungen von MSCs rasant entwickelt. Waren es im Jahr 2008 noch 36 registrierte Studien, welche den Einsatz von MSCs zur Behandlung einer Vielzahl unterschiedlicher Krankheiten zum Inhalt hatten<sup>6</sup>, so ist die Zahl im Jahr 2011 auf weltweit über 140 geplante, bzw. bereits begonnene Studien gestiegen (<http://clinicaltrials.gov/>). Dabei können die Therapien grundsätzlich in die Behandlung von Immun- und Entzündungserkrankungen und in *Tissue Engineering* Anwendungen unterteilt werden. Diese zelltherapeutischen Strategien basieren dabei

hauptsächlich auf den beiden wichtigsten Charakteristika von MSCs: Ihr hohes Differenzierungspotential (zusammengefasst in <sup>7-10</sup>) und ihre immunprivilegierten und immunmodulatorischen Eigenschaften (zusammengefasst in <sup>11-14</sup>).

In den beschriebenen Studien werden fast ausschließlich MSCs aus dem Knochenmark (BM) verwendet, was zeigt, dass BM-MSCs immer noch als „*gold standard*“ der klinischen Forschung gelten. Allerdings birgt das Knochenmark als Quelle für MSCs einige Nachteile. So ist für die Isolierung der Zellen eine invasive und schmerzhaft gewinnung von Knochenmarksaspiraten nötig. Zudem ist die Anzahl an MSCs im Knochenmark nur sehr gering (etwa 0,001- 0,01 %) und variiert stark mit dem Alter des Spenders <sup>15, 16</sup>. Da für den klinischen Einsatz große Zellzahlen (ca.  $1 \times 10^6$  Zellen/ kg Körpermasse) benötigt werden, beinhaltet die Verwendung von BM-MSCs häufig eine massive *ex vivo* Expansion der Zellen. Hierdurch erhöht sich das Risiko von genetischen Schäden oder epigenetischen Veränderungen des Zellmaterials sowie von bakteriellen und viralen Infektionen. Zudem gestaltet sich die Etablierung von reproduzierbaren biotechnologischen Prozessen auf Grund der spenderabhängigen Qualitätsschwankungen schwierig. Daher sollten für diese Anwendungen auch andere Quellen für autologe MSCs in Betracht gezogen werden.

In diesem Zusammenhang hat sich in den letzten Jahren sog. geburtsassoziiertes Gewebe als interessante Alternative heraus gestellt. Hierzu zählen die Plazenta, das Amnion, das Fruchtwasser, die Nabelschnur und das Nabelschnurblut. Geburtsassoziiertes Gewebe wird in der Regel nach der Geburt verworfen und steht somit jederzeit in großen Mengen zur Verfügung. Zudem ist die Verwendung des Materials ethisch und moralisch unbedenklich. Es hat sich gezeigt, dass aus allen Geweben, sowie aus Nabelschnurblut und Fruchtwasser erfolgreich MSCs und andere stammzellähnliche Zellen isoliert werden können, deren Verträglichkeit bei allogenen Zelltransplantationen aktuell Inhalt erster klinischen Studien ist. Allerdings ist die Anzahl an MSCs in Letzteren so gering, dass diese Quellen ein eher begrenztes technologisches Potential aufweisen.

Auch durch die jeweilige Größe bedingt, ist die Ausbeute an MSCs aus den übrigen Geweben jedoch wesentlich größer und liegt deutlich über der des Knochenmarks. Außerdem konnte gezeigt werden, dass MSCs aus geburtsassoziiertem Gewebe Eigenschaften aufweisen, welche teils denen von ES- Zellen ähneln. Daher wird vermutet, dass neonatale MSCs einen primitiveren Charakter zeigen, als adulte MSCs und in der Stammzellhierarchie zwischen diesen und ES- Zellen anzusiedeln sind <sup>17</sup>.

Daher haben MSCs aus geburtsassoziiertem Gewebe großes Potential für klinische Anwendungen. Eine der größten Herausforderungen stellt dabei die Etablierung von geeigneten biotechnologischen Protokollen dar, um Zellmaterial von höchster Qualität in klinisch relevanten Mengen zu erhalten. Ziel der vorliegenden Arbeiten war es, eine Strategie



zur Isolierung und Expansion von MSCs aus dem Nabelschnurgewebe (UC-MSCs) unter xeno-freien Kulturbedingungen zu entwickeln und Protokolle mit Blick auf Ausbeute und Qualität der Zellen zu optimieren. Um das Potential für klinische Anwendungen der Zellen zu eruieren, wurde das Differenzierungspotential der Zellen untersucht. Zur Optimierung der hierfür angewandten Protokolle wurde auch der Einfluss der Sauerstoffkonzentration während der Differenzierung analysiert.

Bei therapeutischen Ansätzen, welche eine Zelltransplantation beinhalten, sind vor allem die immunprivilegierten und immunmodulatorischen Eigenschaften der MSCs von Bedeutung, welche in dieser Arbeit in Ko-Kulturen mit allogenen Immunzellen nachgewiesen wurden.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Multipotente mesenchymale Stromazellen (MSCs) aus geburts-assozierten Geweben

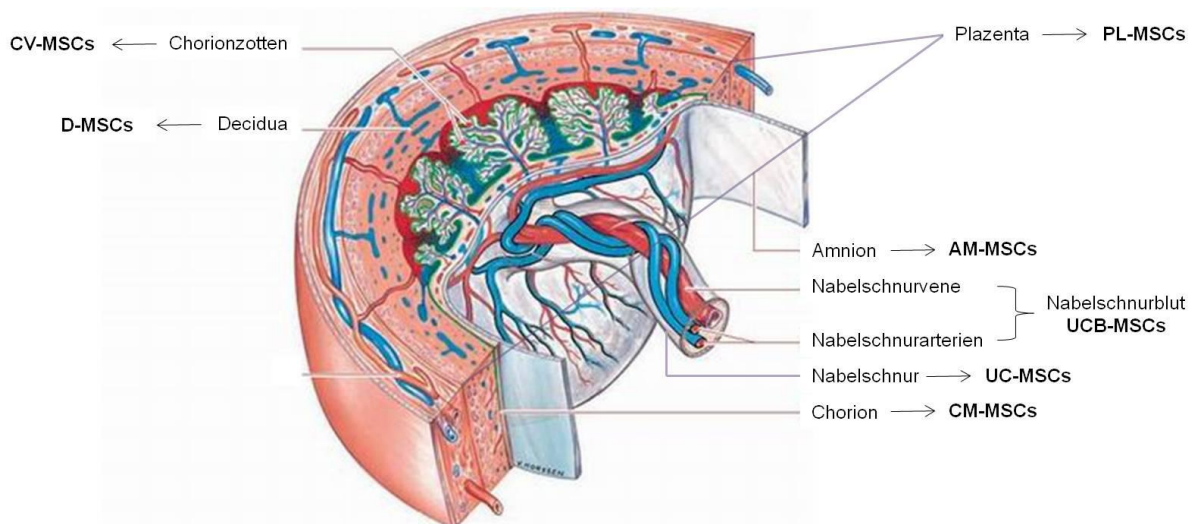
Die Bezeichnung MSC wird allgemein verwendet, um fibroblastenähnliche plastikadhärente Zellpopulationen mit einem hohen Differenzierungspotential zu beschreiben. Dabei wird das Akronym in der Literatur weitläufig sowohl für „*Mesenchymal Stem Cell*“, als auch für „*Mesenchymal Stromal Cell*“ gebraucht. Da es bis dato jedoch noch nicht vollständig geklärt ist, inwieweit alle, oder auch nur einzelne der mittels Plastikadhärenz isolierten Zellen Stammzeleigenschaften im eigentlichen Sinne aufweisen, hat ein Komitee der „*International Society for Cellular Therapy*“ (ISCT) den Terminus „*Multipotent Mesenchymal Stromal Cell*“ postuliert<sup>18</sup>.

Da MSCs ein hohes Potential zur Selbsterneuerung aufweisen und gezielt in Zellen mesodermalem<sup>19, 20</sup>, ectodermalem<sup>21, 22</sup> und endodermalem<sup>23, 24</sup> Ursprungs differenziert werden können, sind diese Zellen von großer Bedeutung für zellbasierte Therapien und Anwendungen im *Tissue Engineering*. Eine Vielzahl von Arbeitsgruppen hat daher eigene Protokolle entwickelt, um MSCs zu isolieren und zu expandieren. Ein Vergleich der Arbeiten ergibt teils stark kontroverse Ergebnisse und wirft die Frage auf, ob die isolierten Zellen ausreichend ähnlich sind, um miteinander verglichen werden zu können. Da bisher noch kein einheitlicher MSC-Marker identifiziert werden konnten, hat die ISCT Minimal Kriterien zur Definition von MSCs vorgeschlagen<sup>25</sup>. Diese beinhalten, dass MSCs plastikadhärent wachsen, eine fibroblastenähnliche Morphologie aufweisen, ein spezifisches Set an Oberflächenmarkern exprimieren (positiv für „*Cluster of Differentiation*“ (CD)105, CD90, CD73; negativ für CD45, CD34, CD19, CD14, „*Human Leukocyte Antigen*“ (HLA)-DR) und gezielt in die osteogene, adipogene und chondrogene Richtung differenziert werden können. Das Knochenmark (*bone marrow* (BM)) stellt heutzutage immer noch die „Quelle Nr. 1“ für MSCs dar. BM-MSCs wurden ausgiebig untersucht und in ersten vielversprechenden klinischen Studien eingesetzt (zusammengefasst in<sup>26</sup>). Dennoch weist das Knochenmark als Quelle für MSCs einige Nachteile auf, da die Isolierung der Zellen aus Aspiraten erfolgt, für deren Gewinnung ein schmerzvoller invasiver Eingriff nötig ist, der zusätzlich das Risiko von Infektionen birgt. Hinzu kommt, dass die Anzahl von MSCs im Knochenmark nur sehr gering ist (ca. 0,001- 0,01%), die Qualität der Zellen stark mit dem Spender variiert und mit zunehmendem Alter des Spenders und bei degenerativen Krankheiten abnimmt<sup>15, 16, 27, 28</sup>.

Daher hat sich der Fokus zahlreicher Forschungsarbeiten auf die Suche nach alternativen Quellen für MSCs konzentriert und es konnte gezeigt werden, dass MSCs in nahezu allen adulten und postnatalen Geweben zu finden sind <sup>29</sup>.

Eine besonders interessante Alternative zu BM stellt geburtsassoziiertes Gewebe dar. Hierzu zählen die Plazenta, die fetalen Membranen (Amnion, Chorion), das Fruchtwasser, sowie die Nabelschnur und das Nabelschnurblut. Da diese Materialien normalerweise nach der Geburt verworfen werden, sind sie leicht zugänglich und ihre Verwendung ist ethisch unbedenklich. Hinzu kommt, dass in ersten Studien gezeigt werden konnte, dass MSCs aus diesen Materialien einige Gemeinsamkeiten mit embryonalen Stamm (ES)-Zellen aufweisen (wie z.B. die Expression spezifischer Marker), was sie von adulten MSCs unterscheidet (siehe Abschnitt 2.1.1). Da die Anzahl an MSCs sowohl im Fruchtwasser, als auch im Nabelschnurblut nur sehr gering ist (0,9- 1,5% (AF) <sup>30</sup>, bzw. 0,001- 0,000001% (UCB) <sup>31</sup>) und die Methoden zur Isolierung der Zellen nur bedingt reproduzierbar sind <sup>32-34</sup>, findet im Rahmen dieser Arbeit keine nähere Beschreibung dieser Quellen statt.

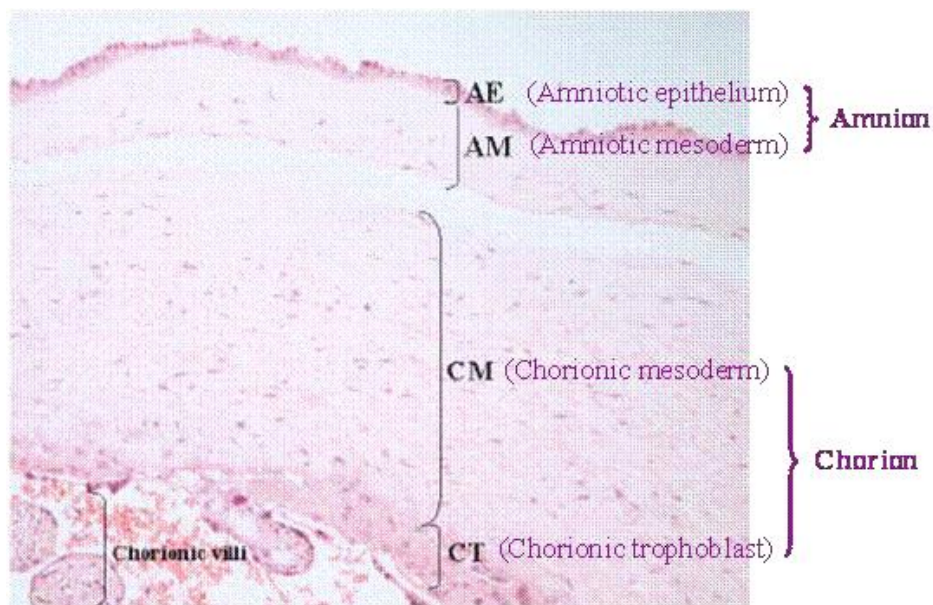
Die Plazenta hat im Durchschnitt eine Dicke von 2,5 cm, einen Durchmesser von 22 cm, und ein Gewicht von 470g <sup>35</sup>. Sie stellt den Nährstoff- und Gasaustausch mit dem Fötus, sowie die Entsorgung von Exkretionsprodukten während der Schwangerschaft sicher. Der allgemeine Aufbau der Plazenta, sowie bisher beschriebene Quellen für MSCs sind in Abb. 2.1 gezeigt.



**Abb. 2.1: Schematische Darstellung geburtsassoziierter Gewebe, welche als Quelle für MSCs beschrieben wurden (adaptiert von <sup>36</sup>). Die Quelle „Fruchtwasser“ ist in dieser Abbildung nicht aufgeführt.**

Da die Plazenta sowohl aus mütterlichem, als auch embryonalem Gewebe besteht, wird sie auch als fetomaternales Organ bezeichnet. Dabei sind die beiden Membranen Amnion und Chorion, sowie die Chorionzotten (*chorionic villi* (CV)) dem fetalen und die Decidua dem maternalen Gewebe zuzuordnen.

Ein Querschnitt durch die fetalen Membranen ist in Abbildung 2.2 gezeigt. Es konnten sowohl aus der Epithelzellschicht des Amnions<sup>37-43</sup> (*amniotic epithelium* (AE)), aus den mesodermalen Schichten von Amnion<sup>34, 37, 43-50</sup> (*amniotic mesoderm* (AM)) und Chorion<sup>46, 47, 51-53</sup> (*chorionic mesoderm* (CM)), sowie aus der Trophoblastenzellschicht<sup>46</sup> (*trophoblastic cell layer* (TC)) Zellpopulationen mit stammzellähnlichen Eigenschaften isoliert werden. Die Gewinnung der Zellen erfolgte dabei in der Regel mittels eines enzymatischen Verdauens des entsprechenden Gewebes.

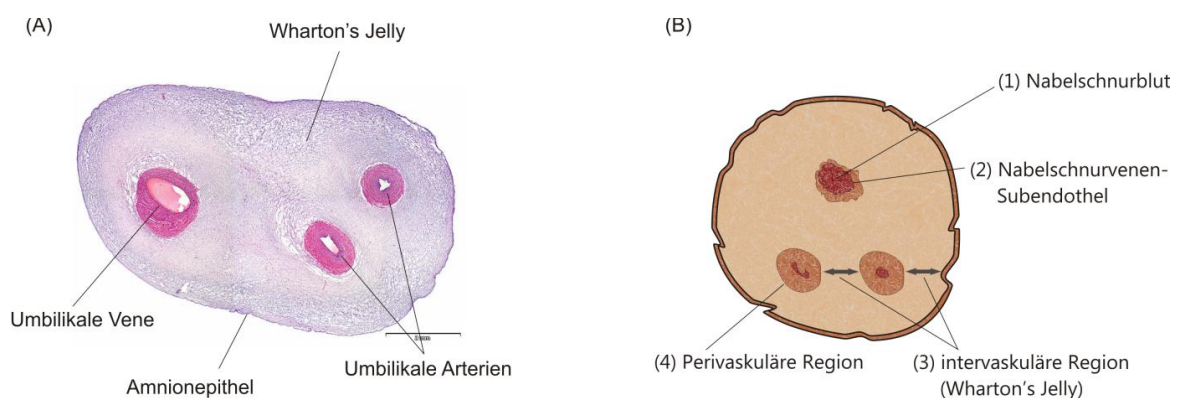


**Abb. 2.2: Querschnitt der fetalen Membranen<sup>54</sup>. Das Amnion besteht aus einer Epithelzellschicht und einer darunter liegenden mesodermalen Schicht. Das Chorion besteht ebenfalls aus einer mesodermalen Schicht und angrenzenden Trophoblastenzellen.**

Die Zellen aus AM und CM weisen MSC-ähnliche Eigenschaften auf und werden daher im Folgenden als AM-MSCs und CM-MSCs bezeichnet. Zellen aus AE und TC zeigen nur begrenzt Ähnlichkeiten zu MSCs und werden im Rahmen dieser Arbeit nicht näher beschrieben (ein Überblick der Arbeiten zur Charakterisierung dieser Zellen ist in<sup>55</sup> gegeben).

Auch aus den Chorionzotten<sup>47, 51, 52, 56-61</sup>, sowie der Decidua<sup>34, 44, 45, 62-66</sup> konnten erfolgreich MSC isoliert werden, welche im Folgenden als CV-MSCs und D-MSCs bezeichnet werden. Einige Arbeitsgruppen isolierten Zellen aus dem gesamten Plazentagewebe<sup>67-73</sup>, welche im Folgenden als PL-MSCs bezeichnet werden.

Ein weiteres geburtsassoziiertes Gewebe und potentielle Quelle für MSCs stellt die Nabelschnur dar, welche Fötus und Plazenta miteinander verbindet. Am Ende einer Schwangerschaft beträgt die Länge einer Nabelschnur ca. 60- 65 cm, das Gewicht ca. 40 g und der Durchmesser ca. 1,5 cm<sup>74, 75</sup>. Die Nabelschnur besteht in der Regel aus zwei Arterien und einer Vene, welche von einem, hauptsächlich aus Proteoglykanen und Hyaluronsäure bestehenden Bindegewebe, dem sogenannten Wharton's Jelly umgeben sind (siehe Abb. 2.3 (A)). Nach außen hin wird die Nabelschnur durch eine amniotische Epithelzellschicht begrenzt. Arbeiten der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass mindestens vier verschiedene Kompartimente der Nabelschnur MSCs enthalten (siehe Abb. 2.3 (B)). Es konnten Zellen erfolgreich aus dem Subendothel der Nabelschnurvene<sup>76-78</sup>, aus dem Wharton's Jelly<sup>79-89</sup>, aus den perivaskulären Regionen der Nabelschnurarterien<sup>90, 91</sup> und dem Nabelschnurblut<sup>32, 92-96</sup> isoliert werden. Andere Arbeitsgruppen isolierten Zellen aus dem gesamten Nabelschnurgewebe<sup>97-100</sup>. Da die Benennung der Zellen durch die jeweiligen Arbeitsgruppen sehr vielfältig ist, werden MSCs im Folgenden unter dem Begriff „*umbilical cord*“ (UC)- MSCs zusammengefasst.



**Abb. 2.3: Querschnitt einer Nabelschnur (adaptiert von<sup>101</sup>).** (A) Die Nabelschnur besteht aus zwei Arterien und einer Vene, welche vom Wharton's Jelly umgeben sind und nach außen hin durch eine amniotische Epithelzellschicht begrenzt werden. (B) Vier unterschiedliche Kompartimente der Schnur stellen Quellen für MSCs dar.

### 2.1.1 Charakterisierung von MSCs aus Plazenta und fetalen Membranen

In Betracht der Größe des Organs und der Tatsache, dass Plazenta und fetale Membranen täglich in großen Mengen anfallen, ist es nicht verwunderlich, dass die Ausbeute an MSCs pro Plazenta deutlich über der eines üblichen Knochenmarkaspirats liegt. So berichteten z.B. Casey *et al.*, dass pro 1 g fetale Membran ca.  $1 \times 10^6$  AM-MSCs gewonnen werden konnten<sup>102</sup> und Soncini *et al.* isolierten durchschnittlich  $24 \pm 10 \times 10^6$  AM-MSCs und  $21 \pm 14 \times 10^6$  CM-MSCs aus den fetalen Membranen<sup>46</sup>. Alviano *et al.* gehen davon aus, dass aus dem Amnion nach der Geburt theoretisch bis zu  $5 \times 10^8$  AM-MSCs isoliert werden könnten<sup>103</sup>.

Sowohl AM-MSCs, CM-MSCs und CV-MSCs, als auch D-MSCs und PL-MSCs wachsen plastikadhärent, zeigen eine fibroblastenähnliche Morphologie und ein multilineares Differenzierungspotential. Außerdem weisen sie eine Reihe MSC-typischer Oberflächenmarker auf. So exprimieren alle Zellen CD73, CD90 und CD105, wohingegen CD45, CD34, CD14 und HLA-DR nicht exprimiert werden. Somit erfüllen die Zellen die Minimalkriterien der ISCT. Außerdem werden Antigene der Klasse HLA-I nur in geringem Maße exprimiert, was auf ein nur geringes immunogenes Potential der Zellen schließen lässt. Tabelle 1 gibt einen Überblick der bisher beschriebenen intra- und extrazellulären Marker.

Sowohl für fetale, als auch maternale MSCs konnten Pluripotenzmarker, wie Oct-4, Rex-1 oder SSEA-4, nachgewiesen werden (siehe Tabelle 1), was darauf schließen lässt, dass diese Zellen einen primitiveren Charakter aufweisen, als adulte MSCs. Vergleiche mit adulten MSCs zeigten, dass sowohl maternale, als auch fetale Zellen ein höheres Proliferationspotential als BM-MSCs aufwiesen<sup>34, 57, 67</sup>. In einem Vergleich von neonatalen MSCs untereinander konnten Macias *et al.* und In'T Anker *et al.* zeigen, dass D-MSCs eine höhere Lebenserwartung und ein gesteigertes Proliferationspotential als AM-MSCs besaßen<sup>34, 62</sup>.

Generell ist eine Expansion der Zellen unter Aufrechterhaltung eines stabilen Karyotyps über mehrere Passagen möglich<sup>53, 57, 62</sup>.

**Tab. 1: Beschriebene intra- und extrazelluläre Marker von MSCs aus Plazenta und fetalen Membranen.**

Marker	AM-MSCs	CM-MSCs	CV-MSCs	D-MSCs	PL-MSCs	Referenz
CD3	-					46
CD9				+	+	53, 63, 72
CD13	+	+	+		+	46, 47, 56, 58
CD14	-	-	-		-	46, 47, 58, 72, 103
CD29	+	+	+	+	+	45-47, 58, 59, 63, 72, 103, 104
CD31	-		-	-		34, 45, 46, 53, 56, 59, 104
CD34	-	-	-	-	-	34, 45-47, 53, 56, 58, 59, 63, 69, 70, 72, 103, 104
CD40L				-	-	63, 72
CD44	+	+	+	+	+	45-47, 53, 56, 58, 59, 63, 72, 103, 104
CD45	-	-	-	-	-	34, 45-47, 53, 56, 58, 59, 69, 70, 72, 103, 104
CD49d	+/-			-		34
CD49e	+	+	+	+	+	34, 47
CD54	+					46
CD73	+	+	+	+	+	34, 45-47, 49, 53, 56, 58, 59, 69, 70, 72, 103
CD80					-	72
CD86					-	72
CD90	+	+	+	+	+	34, 45, 47, 49, 53, 56, 58, 59, 69, 70, 72, 104
CD105	+	+	+	+	+	34, 45-47, 49, 56, 58, 59, 63, 69, 70, 72, 103, 104
CD117		-	-	-	-	53, 58, 72
CD123	-			-		34
CD133	-	-	-			34, 59
CD166	+	+	+	+	+	34, 46, 47, 49, 63, 69, 72, 103
CD271	low	low				46
AC133/2					-	72
Cytokeratin 7					-	72
Glycophorin A					-	72
Flk-1					-	72
GATA-4			+			58
HLA-A,B,C	+	+	+	+	+	34, 47, 53, 56, 59, 63, 72, 104
HLA-DR	-	-	-	-	-	45, 47, 53, 56, 59, 63, 72, 104
HLA-G					-	72
Nestin			+			58
Oct-4	+		+	+		49, 58, 63
Rex-1			+			58
SSEA-4	+	+/-*		+	+	49, 63, 72
TRA-1-60				+	+	63, 72
TRA-1-81				+	+	63, 72
Vimentin					+	72

\*Unstimmigkeiten in der Literatur

**Tab. 2: Beschriebene intra- und extrazelluläre Marker von UC-MSCs (adaptiert von <sup>101</sup>)**

Marker	Expression	Referenzen
CD10	+	84, 89
CD13	+	84, 89, 105-112
CD14	-	83, 84, 89, 106, 107, 113, 114
CD29 (integrin β1)	+	88, 89, 107, 110, 111, 113-119
CD31 (PECAM)	-	89, 90, 107, 110, 111, 116, 117
CD33	-	89, 120
CD34	-	80, 83, 84, 88-91, 100, 106-108, 110-114, 116-120
CD38	-	80, 111, 119
CD44	+	83, 84, 88, 89, 91, 100, 107, 108, 110-112, 114, 116, 117, 119, 120
CD45	-	80, 83, 84, 88-91, 100, 107, 108, 110-112, 114, 116, 117, 120
CD49b (integrin α2)	+	89, 108
CD49c (integrin α4)	+	89
CD49d (integrin α3)	+	89
CD49e	+	89, 90
CD51 (integrin α5)	+	81, 88, 89
CD54 (ICAM-1)	-/+ *	80, 108, 117
CD56	-	89
CD71	-/+	114, 119
CD73 (SH3)	+	81, 83, 84, 88, 91, 100, 107, 112-118, 121
CD90 (Thy-1)	+	80, 84, 89-91, 100, 107, 108, 110, 112, 114-116, 118, 120, 121
CD105 (endoglin, SH2)	+	80, 81, 83, 84, 88, 89, 91, 100, 106-108, 111, 113, 116, 117, 120, 121
CD106 (VCAM-1)	-/+ *	91, 107, 108, 110, 122, 123
CD117 (c-kit)	-/+ *	84, 86, 90, 91, 108, 110, 114, 115, 120, 121
CD123 (IL-3 receptor)	-	91
CD133	-	89
CD146	+	90, 122, 124
CD166 (ALCAM)	+	107, 112, 113, 115, 117, 121, 125
CD235a (glycophorin A)	-	91
CD271	n.d.	
Bmi-1	+	119, 126
Esrrb	-	126
GD2	+	127
HLA-1	+	80, 89, 119, 128
HLA-DR (MHC class II)	-	84, 89, 91, 99, 107, 108, 110-112, 115, 116, 118, 119, 123
HLA-DP (MHC class II)	-	84, 91, 111, 114
HLA-DQ (MHC class II)	-	84, 91, 114
HLA-A, B, C (MHC class I)	+	84, 91, 107, 108, 110, 112-115
HLA-G (MHC class I)	-/+*	91, 129, 130
Hoxb-4	-	126
MSCA-1	n.d.	
Nanog	+	89, 121, 126-128, 131
Nucleostemin	+	119, 126, 131
Oct-3/4	-/+*	121, 126-128, 130-132
Rex-1	+	121
Sox-2	+	89, 121, 127, 131
SSEA-3	-/+*	121, 126
SSEA-4	-/+*	91, 116, 121, 126, 127
STRO-1	-/+*	90, 91, 128
Tbx-3	-	126
TCL-1	-	126
Tra-1-60	-/+*	121, 126
Tra-1-81	-/+*	121, 126
ZFX	+	126
Zic-3	-	126

\*Unstimmigkeiten in der Literatur



### 2.1.2 Charakterisierung von UC-MSCs

Ähnlich der Plazenta, enthält auch die Nabelschnur eine große Anzahl an MSCs. Weiss *et al.* berichteten von einer Ausbeute von ca.  $16 \times 10^3$  Zellen pro Zentimeter Schnur<sup>89</sup>. Mittels Isolation per Explantatkultur konnten sogar bis zu  $2,8 \times 10^8$  Zellen aus einer Nabelschnur gewonnen werden<sup>133</sup>.

UC-MSCs erfüllen ebenfalls die Minimal Kriterien der ISCT. Analog zu MSCs aus Plazenta und fetalen Membranen, exprimieren auch UC-MSCs Pluripotenzmarker, wie Oct-3/4, Nanog, Sox-2 oder SSEA-4 (siehe Tab. 2 auf Seite 10). Dies lässt vermuten, dass auch diese Zellen einen primitiveren Charakter aufweisen, als adulte MSCs. Dies zeigte sich auch in direkten Vergleichen mit BM-MSCs bezüglich Proliferations- und Expansionspotential. UC-MSCs hatten kürzere Verdopplungszeiten<sup>115, 123, 134, 135</sup>, zeigten Telomeraseaktivität<sup>83, 86, 121</sup> und konnten unter Aufrechterhaltung eines normalen Karyotyps bis zu 20-80 Populationsverdopplungen durchlaufen<sup>80, 86, 89, 130</sup>.

### 2.1.3 *In vitro* Differenzierungspotential von MSCs aus Plazenta und fetalen Membranen

Die adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierung von adulten MSCs *in vitro* wurde von zahlreichen Gruppen beschrieben und gilt als ein zentrales Merkmal dieser Zellen. Auch MSCs aus Plazenta und fetalen Membranen konnten gezielt in diese drei Richtungen differenziert werden (siehe Abb. 2.4 und Tab. 3). Pilz *et al.* berichteten allerdings, dass PL-MSCs ein geringeres osteogenes Differenzierungspotential als BM-MSCs aufwiesen<sup>70</sup>. Barlow *et al.* berichteten, dass auch das adipogene Differenzierungspotential von PL-MSCs geringer war, als das von BM-MSCs<sup>67</sup>, wohingegen Sung *et al.* in einem Vergleich weder bei adipogen noch osteogen differenzierten PL-MSCs oder BM-MSCs Unterschiede feststellten<sup>104</sup>.

Alviano *et al.* konnten zeigen, dass AM-MSCs in Gegenwart von Dexamethason, Ascorbinsäure-2-Phosphat, „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), „basic fibroblast growth factor“ (bFGF) und „insulin-like growth factor 1“ (IGF-1) in Skelletmuskel-ähnliche Zellen differenzierten<sup>103</sup>. Dabei wurden sowohl die Expression spezifischer Marker, wie MyoD und Myogenin, auf RNA-Ebene (Abb. 2.5 (A)), als auch das muskelzelltypische Protein Vimentin (Abb. 2.5 (B)+(C)) nachgewiesen. AM-MSCs könnten damit ideale Kandidaten zur Therapie von Muskeldystrophien sein.

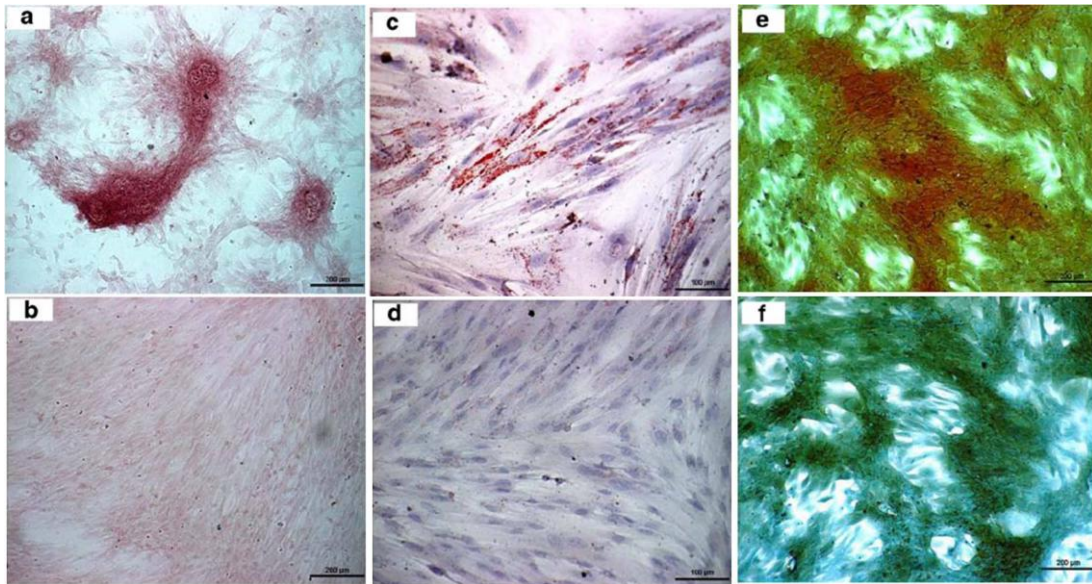


Abb. 2.4: Multilineares Differenzierungspotential von MSCs aus Plazenta und fetalen Membranen am Beispiel von D-MSCs (adaptiert aus<sup>63</sup>). (a) Nachweis osteogener Differenzierung mittels Alizarinrot (Messbalken = 200 µm). (c) Nachweise adipogener Differenzierung mittels Oil Red O (Messbalken = 100µm). (e) Nachweis chondrogener Differenzierung mittels Safranin O/ Fast Green (Messbalken = 200 µm). (b)+(d)+(f) Kontrolle.

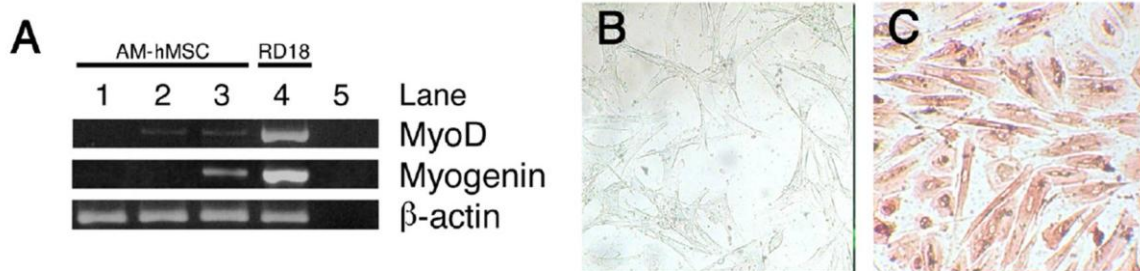
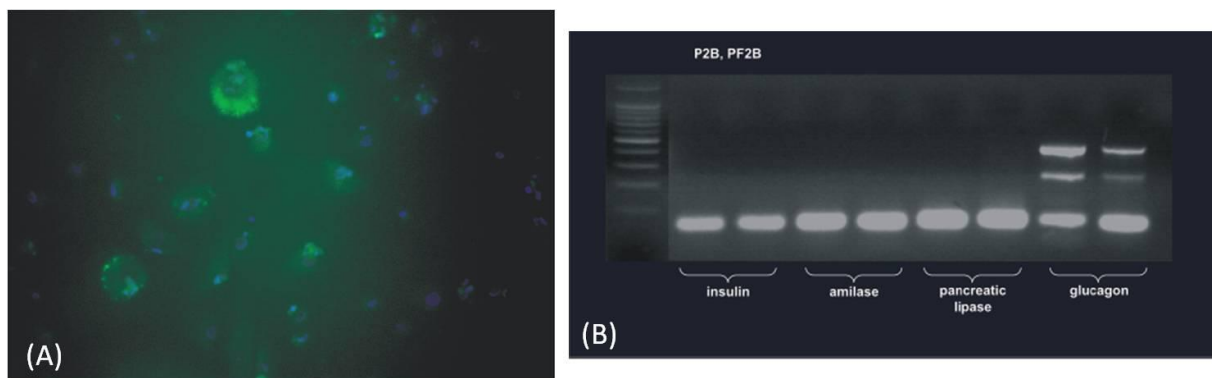


Abb. 2.5: Differenzierung von AM-MSCs in Skelletmuskel- ähnliche Zellen (adaptiert aus<sup>103</sup>). (A) Mittels RT- PCR wurden die muskeltypischen Transkriptionsfaktoren MyoD und Myogenin nachgewiesen. β- Actin diente als *house-keeping* Gen. Spur 1: AM-MSCs in Kontrollmedium; Spur 2+3: AM-MSCs in Differenzierungsmedium 1 bzw. 2 Wochen nach Induktion; Spur 4: Positivkontrolle (Zelllinie RD18); Spur 5: Reagenzkontrolle. (B) Nicht-induzierte und (C) induzierte und Vimentin- positive AM-MSCs.

Ein myogenes Differenzierungspotential konnte auch von anderen Gruppen beobachtet werden<sup>46, 136</sup>. D-MSCs und AM-MSCs konnten in Gegenwart von VEGF ebenfalls erfolgreich

zu Endothelzellen differenziert werden<sup>64, 65, 103</sup>. Darüber hinaus wurde eine Differenzierung von AM-MSCs zu Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen beschrieben. So konnten Zhao *et al.* zeigen, dass AM-MSCs nach Induktion im Differenzierungsmedium kardiospezifische Marker, wie GATA4, „*myosin light chain*“ (MLC)- 2a, MLC- 2v und kardiale Troponine (cTn)- I und T exprimierten<sup>137</sup>. Auch Ventura *et al.* konnten eine gesteigerte Expression spezifischer Marker beobachten<sup>138</sup>.

Andere Arbeiten zeigen ein Potential zur Differenzierung in Zellen der endodermalen Linie auf. So konnten Susman *et al.* PL-MSCs in Pankreas-ähnliche Zellen differenzieren. Unter Verwendung eines vierstufigen Protokolls und dem sequentiellen Einsatz verschiedener Wachstumsfaktoren, wie z.B. „*transforming growth factor*“ (TGF)-  $\beta$ , bFGF und „*epidermal growth factor*“ (EGF) konnten die MSCs zu Langerhans-ähnlichen Zellen differenziert werden. Im Zuge der Kultivierung zeigten die Zellen deutliche morphologische Veränderungen und lagen am Ende als zu Zellsphären akkumulierte Suspensionszellen vor. Mittels Immunhistologie konnte gezeigt werden, dass diese Zellen Glukagon sezernierten (Abb. 2.6 (A)) und mittels RT-PCR wurde gezeigt, dass das Glukagon-Gen exprimiert wurde (Abb. 2.6 (B)). Ein Potential zur Differenzierung in Pankreas-ähnliche Zellen wurde auch von anderen Gruppen beschrieben<sup>61, 68</sup>.



**Abb. 2.6: Differenzierung von PL-MSCs in Glukagon-sezernierende Zellen (adaptiert aus<sup>139</sup>). Unter dem sequentiellen Einsatz verschiedener Wachstumsfaktoren akkumulierten PL-MSCs in Folge der Differenzierung zu Zellsphären, welche Glukagon sezernierten (Immunhistologischer Nachweis (A) und Expression des Glukagon- Gens (B)).**

Schließlich konnte auch ein Potential zur Differenzierung in Neuron-ähnliche Zellen gezeigt werden<sup>47, 50, 51, 56, 71, 72</sup>. Yen *et al.* beobachteten z.B. 6- 14 Tage nach Induktion von PL-MSCs im Differenzierungsmedium eine Neuron-ähnliche Morphologie und konnten mittels

Immunhistologie die neuronalen Marker Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP) 2 und Neuron-spezifische Enolase nachweisen<sup>72</sup>.

Tabelle 3 gibt eine Zusammenfassung des beschriebenen Differenzierungspotentials von MSCs aus Plazenta und fetalen Membranen.

**Tab. 3: Überblick des Differenzierungspotentials von MSCs aus Plazenta und fetalen Membranen.**

Linie	Zellart	AM-MSCs	CM-MSCs	CV-MSCs	P-MSCs	PL-MSCs	Referenz
mesodermal	Adipozyten	+	+	+	+	+	34, 45-47, 53, 56, 58, 60, 64-68, 71, 72, 103, 104
	Chondrozyten	+	+	+	+	+	46, 47, 53, 56, 58-60, 64-67, 103
	Osteoblasten	+	+	+	+	+	34, 37, 45-47, 50, 53, 56, 58, 60, 64-68, 71, 72, 103, 104, 137
	Skelletmuskelnzellen	+	+				46, 103, 136
	Endothelzellen	+			+		64, 65, 103
	Kardiomyozyten	+					137, 138
endodermal	Zellen des Pankreas	+	+	+		+	61, 68, 139
ectodermal	neuronale Zellen	+	+	+		+	47, 50, 51, 56, 68, 71, 72

#### 2.1.4 *In vitro* Differenzierungspotential von UC-MSCs

Auch UC-MSCs zeigen ein breites Differenzierungspotential und können erfolgreich in die adipogene, chondroge und osteogene Richtung differenziert werden (siehe Tab. 4). Darüber hinaus konnten UC-MSCs in Gegenwart von VEGF und bFGF erfolgreich in Endothelzellen differenziert werden<sup>110, 118</sup>. Andere Arbeiten konnten zeigen, dass zumindest Subpopulationen von UC-MSCs auch zu Skelletmuskelnzellen differenzierten<sup>80</sup>. Auch von einer Differenzierung von UC-MSCs zu Kardiomyozyten wurde berichtet, wobei die Aussagen teils widersprüchlich sind. So zeigten Whang *et al.*, dass MSCs aus dem Wharton's Jelly in Gegenwart von 5-Azacytidin oder konditioniertem Kardiomyozytenmedium eine entsprechende Morphologie zeigten und kardiospezifische Marker (*N*-Cadherin und Troponin) exprimierten<sup>88</sup>. Auch Kadivar *et al.* konnten eine Expression kardiospezifischer Gene in UC-MSCs nach Kultivierung im

Differenzierungsmedium nachweisen <sup>117</sup>. Im Gegensatz hierzu konnten Martin Rendon *et al.* keine Expression kardiospezifischer Marker bei MSCs aus dem Wharton's Jelly und den perivaskulären Regionen der Arterien beobachten <sup>122</sup>. Auch gibt es bisher nur sehr wenig Berichte über eine erfolgreiche Differenzierungen von UC-MSCs zu funktionellen schlagenden Kardiomyozyten. Nach derzeitigem Kenntnisstand berichtete einzig eine Gruppe von sporadisch schlagenden Zellen nach 21 Tagen Kultur im Differenzierungsmedium <sup>140</sup>. Quantitative Daten wurden jedoch nicht gezeigt.

Andere Arbeiten zeigten, dass UC-MSCs auch erfolgreich in Zellen der endodermalen Linie differenzieren. So konnten Campard *et al.* zeigen, dass UC-MSCs hepato-spezifische Marker, wie z.B. Albumin,  $\alpha$ -Fetoprotein, Cytokeratin-19, Connexin-32 und Dipeptidylpeptidase 4, konstitutiv exprimierten und nach Induktion im Differenzierungsmedium eine Hepatozyten-ähnliche Morphologie, sowie eine gesteigerte Expression spezifischer Marker aufwiesen und Harnstoff produzierten <sup>141</sup>. Allerdings konnten weitere spezifische Charakteristika von funktionellen Hepatozyten nicht beobachtet werden.

Chao *et al.* konnten mittels eines vierstufigen Protokolls UC-MSCs zu Inselzell-ähnlichen Zellclustern differenzieren, welche Pankreas-spezifische Gene exprimierten und in Abhängigkeit von Glucose Insulin sezernierten <sup>142</sup>. In einem Vergleich mit BM-MSCs konnten Wu *et al.* zeigen, dass UC-MSCs ein höheres Potential zur Differenzierung in Pankreas-ähnliche Zellen besaßen <sup>135</sup>.

Abschließend konnten zahlreiche Gruppen zeigen, dass UC-MSCs nach Induktion in neuronalem Differenzierungsmedium eine entsprechende Morphologie annahmen und neurospezifische Marker, wie z.B.  $\beta$ -III-Tubulin, Neuron-spezifische Enolase, Neurofilament M und Tyrosinhydroxylase exprimierten <sup>81-83, 85, 86, 107, 120, 143, 144</sup>. Beispielhafte Ergebnisse der Arbeitsgruppe Karahuseyinoglu *et al.* sind in Abbildung 2.7 gezeigt.

Eine Zusammenfassung beschriebener Differenzierungen von UC-MSCs ist in Tabelle 4 gegeben.

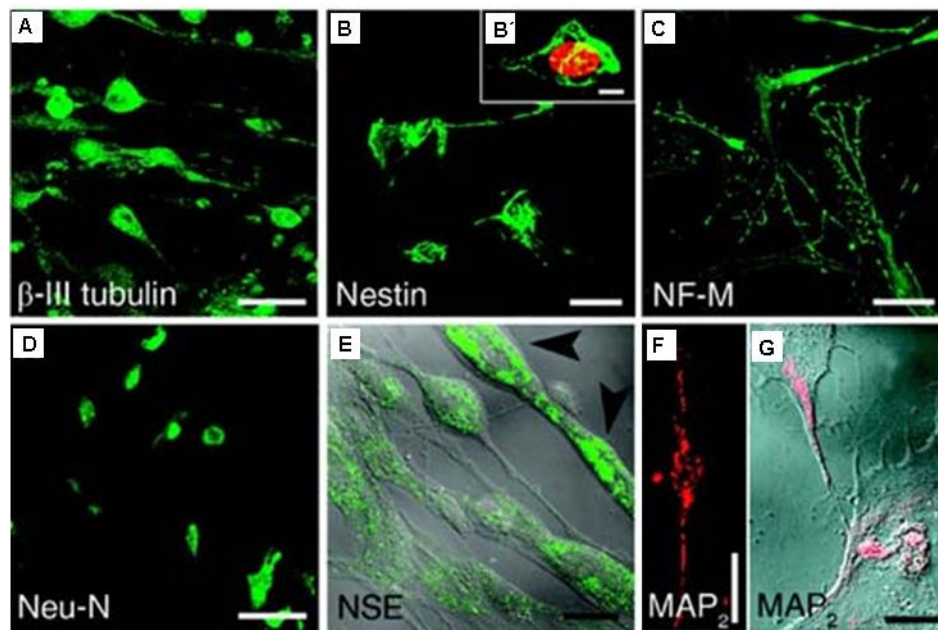


Abb. 2.7: Neuronale Differenzierung von UC-MSCs (adaptiert aus <sup>101</sup>). A: Expression von  $\beta$ -III-Tubulin; B: Expression von Nestin (hauptsächlich im perinukleären Bereich (B')); C: Expression von Neurofilament-160 (NF-M); D: Expression des neurospezifischen nukleären Proteins (Neu-N); E: Expression der Neuron-spezifischen Enolase (NSE); F: Expression des mikrotubuli-assoziierten Proteins 2 (MAP2); G: MAP2-Verteilung bei Zell-Zell-Kontakt. Messbalken: 10  $\mu$ m (B'), 20  $\mu$ m (B, C), 50  $\mu$ m (E), 100  $\mu$ m (A, D).

Tab. 4: Überblick des Differenzierungspotentials von UC-MSCs (adaptiert aus <sup>101</sup>).

Linie	Zellart	Referenzen
mesodermal	Adipozyten	76, 77, 80, 83, 88, 90, 107, 110, 113, 114, 117-124, 128, 130, 134, 145-148
	Chondrozyten	77, 79, 83, 88, 90, 113, 114, 118, 120-122, 124, 128, 134, 145-147
	Osteoblasten *	76-78, 80, 83, 88, 90, 91, 100, 107, 110, 113, 114, 116-124, 128, 130, 134, 145-150
	Kardiomyozyten *	88, 117, 122, 140
	Skelletmuskelzellen	80
	Endothelzellen	110, 118, 134
ectodermal	neuronale Zellen	81-83, 85, 86, 107, 120, 143, 144
endodermal	Zellen des Pankreas	135, 142
	unreife Hepatozyten	141

\*Unstimmigkeiten in der Literatur

Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass es sich bei Zellen aus geburtsassoziierten Geweben um multipotente Stromazellen handelt, die sowohl in die mesodermale, als auch in

nicht-mesodermale Linien differenziert werden können. Da es sich bei MSC-Kulturen höchstwahrscheinlich um Mischpopulationen handelt bleibt zu klären, ob sich Zellen innerhalb dieser Kulturen in ihrem Differenzierungspotential unterscheiden. So konnten in UC-MSC Kulturen Subpopulationen identifiziert werden, welche sich anhand der Expression von Vimentin und Cytokeratin unterschieden. Interessanterweise konnten Zellen, welche Cytokeratin exprimierten *in vitro* nicht zu neuronalen Zellen differenziert werden<sup>151</sup>. Auch in AM-MSC und CM-MSC Kulturen wurden Subpopulationen entdeckt, welche den Oberflächenmarker CD271 exprimierten. Diese Zellen zeigten ein deutlich größeres osteogenes Potential als Zellen, die diesen Marker nicht aufwiesen<sup>46</sup>. Auch in BM-MSCs Kulturen wurden CD271 positive Subpopulationen entdeckt, so dass CD271 als universeller Marker für MSCs mit hohem Proliferations- und Differenzierungspotential diskutiert wird<sup>152, 153</sup>. Nach unserem Kenntnisstand wurde von einer Expression von CD271 in UC-MSCs bisher nicht berichtet.

Weitere Arbeiten sind nötig um zu untersuchen, inwieweit MSCs aus verschiedenen Quellen und MSCs innerhalb einer Kultur sich in ihrem Differenzierungspotential unterscheiden und wie diese Zellen identifiziert werden können. Mit diesen Informationen könnten Protokolle zur klinischen Anwendung der Zellen entscheidend optimiert werden.

### 2.1.5 *In vivo* Anwendung von MSCs aus geburtsassoziierten Geweben

Neben einem multilinearen Differenzierungspotential zeichnen adulte MSCs vor allem auch ein nur geringes immunogenes Potential und immunmodulatorische Eigenschaften aus<sup>11, 13, 14, 154</sup>. Zahlreiche Studien der letzten Jahre konnten zeigen, dass sowohl UC-MSCs<sup>129, 155, 156</sup>, als auch MSCs aus Plazenta<sup>44, 69, 73</sup> und fetalen Membranen<sup>37, 43, 44</sup> *in vitro* ähnliche immunprivilegierte Eigenschaften aufweisen und keine Proliferation von allogenen Immunzellen stimulieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Zellen in Abhängigkeit der Dosis ebenfalls die Proliferation von zuvor stimulierten Immunzellen inhibieren<sup>37, 43, 44, 155</sup>. Roelen *et al.* verglichen die immunmodulatorischen Eigenschaften von AM-MSCs und D-MSCs und beobachteten, dass fetale MSCs einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf die Proliferation von Lymphozyten auswirkten, als maternale MSCs<sup>44</sup>. Vergleiche von neonatalen und adulten MSCs führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. Im Vergleich zu BM-MSCs beobachteten Fazekasova *et al.* eine geringere Immunmodulation durch PL-MSCs<sup>69</sup>, wohingegen Brooke *et al.* keine Unterschiede zwischen BM-MSCs und PL-MSCs beobachten konnten<sup>73</sup>.

Die ungewöhnlichen nicht-immunogenen und immunmodulatorischen Eigenschaften von neonatalen MSCs legen die Vermutung nahe, dass diese Zellen geeignete Kandidaten für Anwendungen in zellbasierten Therapien sind. Erste vielversprechende *in vivo* Studien bekräftigen dies. So injizierten Barlow *et al.* Mäusen PL-MSCs intravenös, welche von den Tieren sehr gut toleriert wurden und keine toxischen Reaktionen auslösten<sup>67</sup>. Auch Bailo *et al.* setzten AM-MSCs und CM-MSCs *in vivo* ein und injizierten diese neonatalen Schweinen und Ratten. Anschließend konnten humane Chimären in Hirn, Lunge, Knochenmark, Thymus, Milz, Leber und Niere der Tiere identifiziert werden, was auf eine Migration und ein *engraftment* der Zellen schließen lässt<sup>157</sup>.

Auch konnte an mehreren Beispielen gezeigt werden, dass MSC zur Heilung von beschädigtem Gewebe beitragen. Dabei scheint der Beitrag der Zellen eher auf parakrinen Effekten, z.B. durch Stimulierung und Modulation von gewebespezifischen Zellen, als auf einer Differenzierung der MSCs zu beruhen. So beobachteten Yang *et al.* eine positive Beeinflussung von Mikroglia und reaktiven Astrozyten durch UC-MSCs nach Durchtrennung des Rückenmarks in Ratten<sup>158</sup>. Hierbei zeigte sich eine gesteigerte Produktion zahlreicher Zytokine in der Nähe der Wunde. Liao *et al.* injizierten UC-MSCs in das Hirn von Nagern nach Schlaganfall und konnten bis zu fünf Wochen danach vitale MSCs nachweisen. Zusätzlich wurde eine Minderung der Symptome nach einem Schlaganfall beobachtet, was die Autoren eine Produktion von Angiogenese-unterstützenden Zytokinen vermuten ließ<sup>159</sup>. Im Gegensatz hierzu zeigten Zhao *et al.*, dass AM-MSCs nach Transplantation in das Herz von Ratten nach Infarkt bis zu zwei Monate überlebten und zu Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen differenzierten<sup>137</sup>. Lund *et al.* wiederum zeigten, dass UC-MSCs nach Transplantation in Nager zur Rettung von Fotorezeptoren beitragen, dabei aber nicht zu Neuronen differenzierten, sondern neurotrophe Faktoren sezernierten<sup>84</sup>. Es bleibt daher in weiteren Studien zu klären, in wieweit der Beitrag von MSCs zur Reparatur von geschädigtem Gewebe auf parakrinen Effekten oder auf einer Differenzierung der Zellen beruht, oder ob beide Effekte synergistisch stattfinden.

Eine der größten Herausforderungen der regenerativen Medizin stellt das *Tissue Engineering* dar. Bisher gibt es nur wenige Berichte über einen Einsatz von neonatalen MSCs auf diesem Gebiet, dennoch sind die bisherigen Ergebnisse vielversprechend. So wird UC-MSCs ein großes Potential für den Bereich des kardiovaskulären *Tissue Engineerings* zugesprochen<sup>160</sup>. Sie wachsen gut auf bio-degradierbaren Polymeren<sup>99</sup> und wurden bereits zur Herstellung von humanen Pulmonalgefäßen<sup>161</sup>, von biologisch aktiven Herzklappen<sup>87</sup> und von lebenden „patches“ im Bereich der pädiatrischen Herzchirurgie verwendet<sup>162</sup>. PL-MSCs wurden in ersten Versuchen auf dem Gebiet des Knorpel-*Tissue Engineerings* eingesetzt und zeigten hier vielversprechende Ergebnisse bei der Herstellung von



funktionellen Knorpelkonstrukten<sup>59</sup>. Schließlich konnten Lindenmair *et al.* zeigen, dass auch das Amnion ein großes Potential für das osteogene *Tissue Engineering* aufwies. In einem innovativen Ansatz wurde gezeigt, dass die Zellen des Amnions ohne vorherige Isolation direkt in der Membran osteogen differenziert werden konnten<sup>163</sup>. Mit Hilfe dieser Methode könnten somit zeitaufwendige Isolations- und Expansionsschritte und die damit verbundenen Risiken von Kontaminationen und genetischen Veränderungen des Zellmaterials vermieden werden.

Die hier gezeigten Ergebnisse veranschaulichen, dass MSCs aus geburtsassoziiertem Gewebe ein großes Potential für zellbasierte Therapien und *Tissue Engineering* Anwendung besitzen. Auf Grund der großen Verfügbarkeit und der ethisch unbedenklichen Herkunft des Materials, stellt geburtsassoziiertes Gewebe eine hochinteressante Alternative zum Knochenmark als Quelle für MSCs dar.

### 3 Experimenteller Teil

Quellen für MSCs sind zahlreich und neben dem Knochenmark (heutzutage immer noch die am häufigsten verwendete Quelle) hat sich während der letzten 10 Jahre vor allem die Nabelschnur als vielversprechende Alternative heraus kristallisiert. Nachdem erste Arbeiten zeigen konnten, dass MSCs aus dem Nabelschnurgewebe (UC-MSCs) bioäquivalent zu MSCs aus dem Knochenmark (BM-MSCs) sind <sup>6</sup>, stellt die Herstellung von Zellmaterial von klinischer Qualität eine neue Herausforderung dar. Hierfür ist jedoch die Etablierung von Protokollen zur standardisierbaren Isolierung, Expansion und Differenzierung der Zellen unabdingbar.

Bisher beschriebene Protokolle beinhalten fast ausschließlich die Verwendung von Serum, welches nicht humanen Ursprungs ist, wodurch Fragen zur allgemeinen biologischen Sicherheit des Zellmaterials aufgeworfen werden. Da eine Übertragung von z.B. Viren, Prionen und anderen Pathogenen vom Tier auf den Menschen nicht restlos ausgeschlossen werden kann, ist die Verwendung von xenogenen Seren für klinische Zwecke nicht zu favorisieren. Eine Alternative hierzu stellt die Verwendung von Humanserum (HS) dar, wodurch sich die Möglichkeit zur Durchführung aller relevanten Schritte der Zellkultur unter allogenen Bedingungen ergibt.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von xeno- freien Kulturbedingungen für UC-MSCs. Im Detail wurde zunächst ein Protokoll entwickelt, um UC-MSCs reproduzierbar aus dem Nabelschnurgewebe mittels einer Explantatkultur zu isolieren und zu expandieren. In einem Vergleich mit vier kommerziell erhältlichen Kälberseren wurde allogenes HS anschließend auf seine wachstumsfördernden Eigenschaften hin analysiert.

Zur weiteren Optimierung der Kulturbedingungen wurde in den folgenden Versuchen die optimale Konzentration des Serums im Medium ermittelt. Als Kriterium hierfür wurden das Proliferationspotential der Zellen, der Anteil apoptotischer und seneszenten Zellen in einer Kultur, sowie das Potential zur Bildung von Kolonien herangezogen.

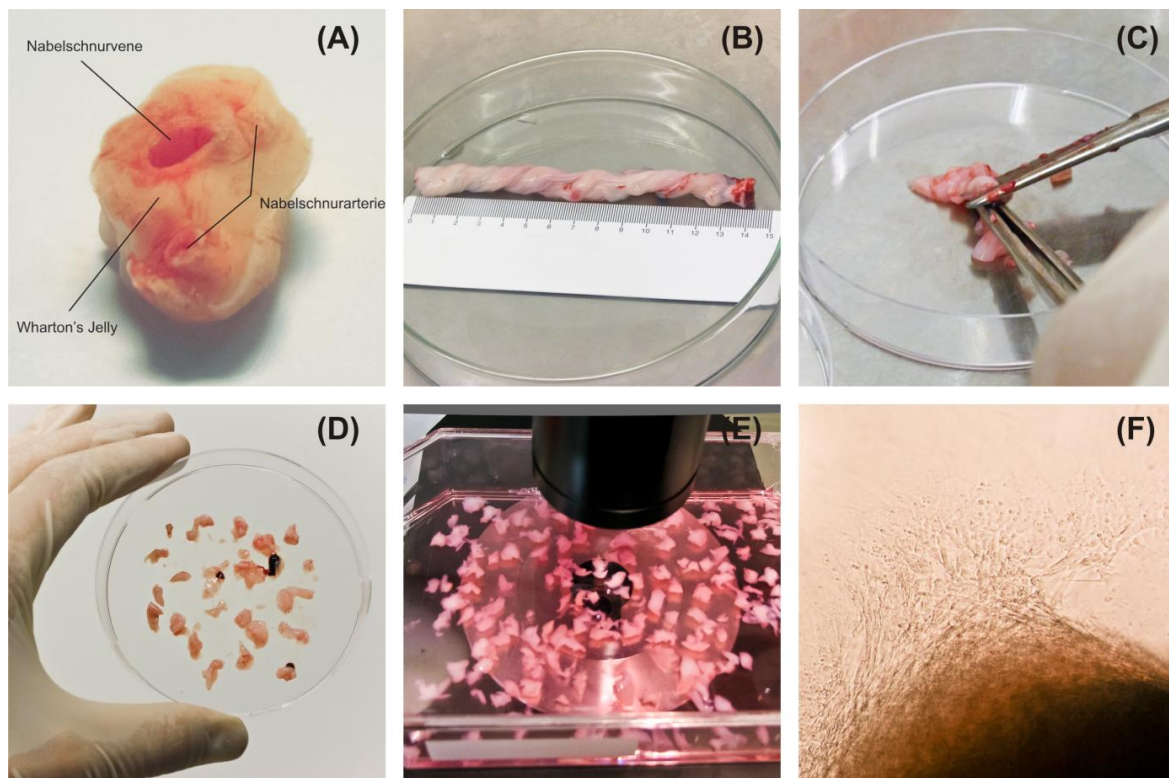
In bereits vorangegangenen Arbeiten von Dr. Ingrida Majore und Dr. Pierre Moretti wurden Subpopulationen innerhalb der UC-MSC Primärkultur isoliert und einer ersten tiefergehenden Charakterisierung unterzogen <sup>100</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurden die Subpopulationen auf ihr osteogenes, adipogenes und chondrogenes Differenzierungspotential hin miteinander verglichen. Dabei wurde ebenfalls der Einfluss der Sauerstoffkonzentrationen auf das Differenzierungspotential untersucht.

Abschließend wurden die UC-MSCs auf immunomodulatorische Eigenschaften hin untersucht. Hierfür wurden Ko-Kulturversuche mit allogenen peripheren mononukleären Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs)) durchgeführt.

### **3.1 Isolierung von mesenchymalen Stromazellen aus dem Nabelschnur- gewebe**

UC-MSCs können aus verschiedenen Regionen der Nabelschnur isoliert werden. Hierfür sind zahlreiche Methoden beschrieben worden, wobei die meisten Protokolle einen enzymatischen Verdau des Gewebes vorsehen. Da eine enzymatische Gewebedissoziation sich negativ auf die Zellvitalität auswirken kann, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Protokoll zur schonenderen Zellisolierung per Explantatkultur etabliert. Mittels der im Folgenden beschriebenen Methode konnten so in jedem Präparationsansatz Zellen erfolgreich isoliert werden. Insgesamt wurden im Zuge dieser Arbeit Zellen aus acht Nabelschnüren isoliert.

Die verwendeten Nabelschnüre stammten aus Kaiserschnittgeburten nach voll ausgetragenen Schwangerschaften (38- 40 Wochen). Sie wurden unmittelbar nach der Geburt zunächst in ca. 10- 15 cm lange Segmente zerteilt (Abb. 3.1 (B)) und anschließend in Puffer (PBS mit 5 g/l Glucose, 50 µg/ml Gentamycin, 2,5 µg/ml Amphotericin B, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) für den Transport aufbewahrt. Alle weiteren Schritte zur Isolierung erfolgten innerhalb der nächsten 48 Stunden unter sterilen Arbeitsbedingungen. Zunächst wurden Arterien und Vene unter Verwendung einer Spritze mit stumpfer Nadel mit PBS gespült, um letzte Blutreste zu entfernen. Anschließend wurden die Nabelschnursegmente in ca. 0,5 cm<sup>3</sup> große Gewebestücke zerteilt (Abb. 3.1 (C)+(D)) und in Zellkulturflaschen überführt (Abb. 3.1 (E)). Durch das Zerteilen wurde einerseits eine möglichst große Oberfläche geschaffen, über die die Zellen herauswachsen konnten, andererseits wurde so gewährleistet, dass Zellen aus allen Kompartimenten der Nabelschnur in Kultur genommen wurden.



**Abb. 3.1: Isolierung von plastikadhärenten Zellen aus Nabelschnurgewebe. (A) Querschnitt einer Nabelschnur. (B) Nabelschnursegment. (C+D) Zerkleinerung der Nabelschnursegmente in ca. 0,5 cm<sup>3</sup> große Gewebestücke. (E) Gewebestücke in Kulturmedium. (F) Zellen wachsen aus einem Gewebestück heraus (lichtmikroskopische Aufnahme 40x vergrößert).**

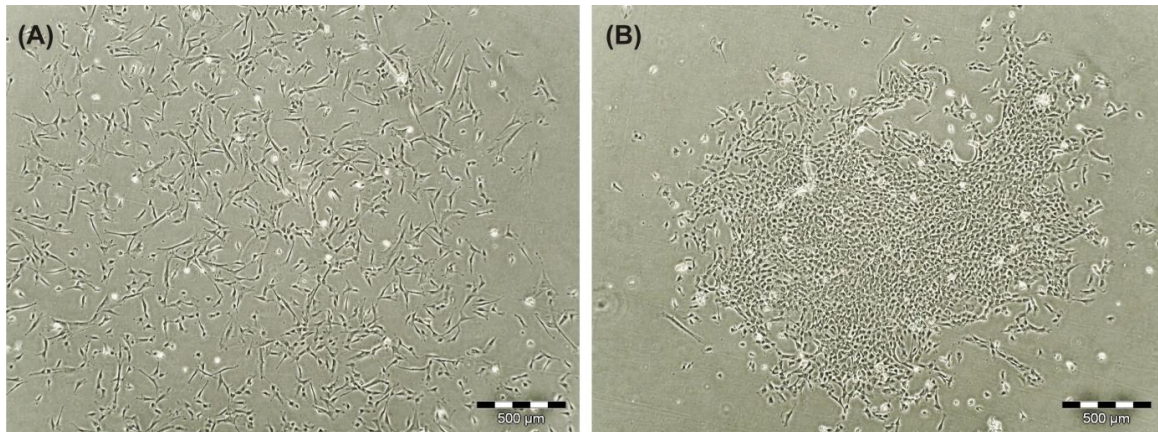
Die Kultivierung der Gewebestückchen erfolgte in  $\alpha$ MEM mit 15% HS und 50  $\mu$ g/ml Gentamycin in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte jeden zweiten Tag. Nach ca. 10 Tagen konnte ein erstes Herauswachsen von Zellen aus den Gewebestücken beobachtet werden (Abb. 3.1 (F)). Nach ca. 14 Tagen wurden die Stücke entfernt und der Zellrasen mehrmals mit PBS gespült. Nach etwa 21 Tagen lag dann eine Zellkultur mit größtenteils fibroblastenähnlicher Morphologie vor, die jedoch vereinzelt auch Kolonien von Zellen mit einem endothelialen Phänotyp enthielt (siehe Abb. 3.1).

Eine Identifizierung von Endothelzellen auf Einzelzellbasis erfolgte mittel Durchflusszytometrie. Hierbei diente das Oberflächenmolekül CD31 als spezifischer Marker. Details zu den Untersuchungen sind der Arbeit von Dr. Pierre Moretti<sup>164</sup> zu entnehmen.

Da die Formulierung des verwendeten Kulturmediums nicht den Ansprüchen von Endothelzellen genügte, starben diese im Laufe der Kultivierung ab, so dass spätestens nach dem ersten Passagieren der Zellen keine Kontamination der Kultur mehr vorlag.

Gleiches zeigte sich nach dem Kryokonservieren und anschließenden Revitalisieren der Primärzellen.

Mit der etablierten Methode konnten pro Nabelschnur ca.  $2 \times 10^7$  Zellen isoliert und für weitere Versuche, sowie das Anlegen von Zellbanken verwendet werden.



**Abb. 3.2:** Zellen mit unterschiedlichem Phänotyp innerhalb einer MSC-Primärkultur. Neben Zellen mit fibroblastenähnlicher Morphologie (A) sind in der Primärkultur vereinzelt auch Kolonien von Zellen mit endothelzellähnlicher Morphologie (B) zu finden (jeweils 40x vergrößert).

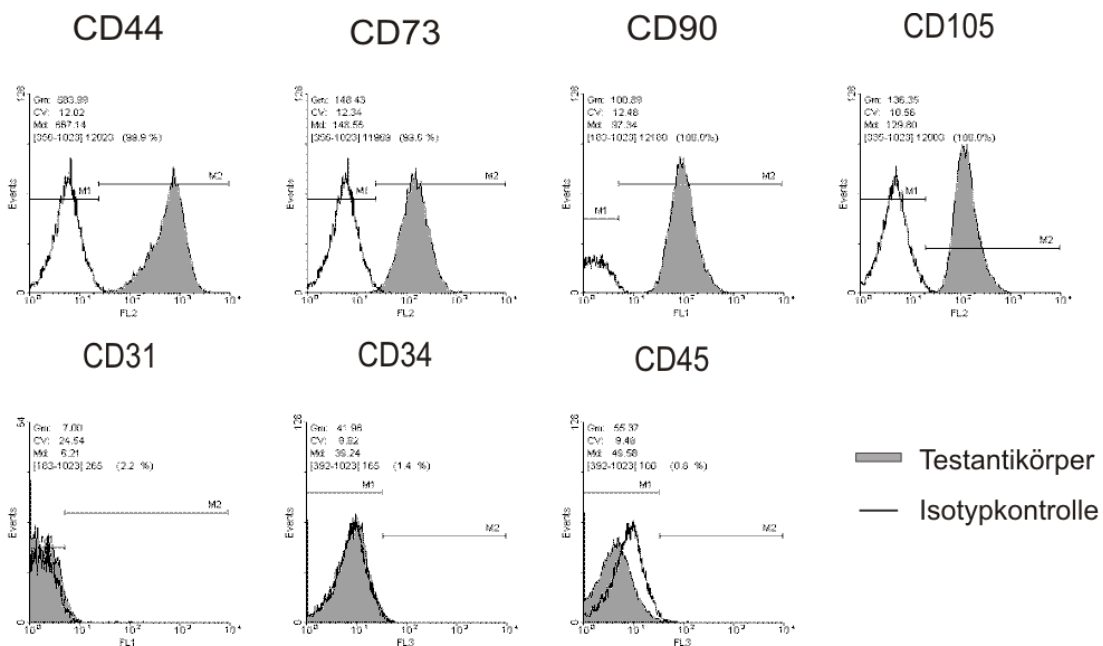
### 3.2 Charakterisierung von mesenchymalen Stromazellen aus dem Nabelschnurgewebe

Da bis dato kein universeller Marker zur Identifizierung von MSCs bekannt ist, hat die „*International Society for Cellular Therapy*“ (ISCT) Minimal Kriterien zur Definition von multipotenten mesenchymalen Stromazellen postuliert<sup>25</sup>. Diese beinhalten, dass MSCs unter Standardkulturbedingungen adhärent auf Plastikoberflächen wachsen und dabei eine fibroblastenähnliche Morphologie aufweisen, ein typisches Set an Oberflächenmarker exprimieren und gezielt sowohl in die osteogene, als auch in die adipo- und chondrogene Richtung differenziert werden können.

Als typische Oberflächenmarker, welche von MSCs exprimiert werden, können CD73 (Ecto-5' Nucleotidase (SH3)), CD90 (Thy- 1) und CD105 (SH2) herangezogen werden. Allerdings werden diese Marker ebenfalls von hämatopoetischen sowie Endothelzellen exprimiert, so

dass eine weitere Eingrenzung des Markerprofils notwendig ist. Daher muss eine Expression von CD31 (ein typisches Antigen auf Endothelzellen), CD34 (ebenfalls ein typisches Antigen auf Endothelzellen, sowie auf hämatopoetischen Vorläuferzellen) und CD45 (ein typisches Antigen auf Leukozyten) ausgeschlossen werden können. Da die extrazelluläre Matrix der Nabelschnur einen großen Anteil an Hyaluronsäure (HA) aufweist<sup>165</sup>, kann die Expression des HA- Rezeptors CD44 als weiterer Marker für UC-MSCs betrachtet werden.

Die in dieser Arbeit isolierten Zellen wachsen plastikadhärent und zeigen eine typische fibroblastenähnliche Morphologie (siehe Abb. 3.2 (A)). Aus Abbildung 3.3 wird ersichtlich, dass die Zellen das oben beschriebene Set an Oberflächenmarkern aufweisen. Eine tiefere Beschreibung der Oberflächenmarkeranalysen sind der Arbeit von Dr. Pierre Moretti<sup>164</sup> zu entnehmen.



**Abb. 3.3: Expression typischer Oberflächenmarker zur Charakterisierung von MSCs. Dargestellt sind die Histogramme durchflusszytometrischer Messungen der aus der Nabelschnur isolierten Stromazellen.**

Außerdem weisen die Zellen ein hohes Differenzierungspotential auf, was in Abschnitt 3.4.3 weiterführend diskutiert wird. Da hiermit die Minimalkriterien der ISCT als erfüllt angesehen werden können, werden die Zellen im Folgenden als umbilikale mesenchymale Stromazellen (UC-MSCs) bezeichnet.

### 3.3 Formulierung der optimalen Kulturbedingungen für UC-MSCs

Damit Zellen für klinische Anwendungen eingesetzt werden können, müssen diese im Allgemeinen zunächst *ex vivo* expandiert werden, um ausreichende Mengen an Zellmaterial zu erhalten. Dabei sollten die Kulturbedingungen so gewählt werden, dass am Ende der Expansion Zellen von höchster Qualität vorliegen. Als Maß hierfür können die Zellviabilität, der Anteil seneszenten und apoptotischer Zellen in den Kulturen, die Stabilität von Geno- und Phänotyp, sowie die Aufrechterhaltung des Differenzierungspotentials und der immunmodulatorischen Eigenschaften herangezogen werden. Um dies zu gewährleisten, ist es unabdingbar, dass die Zellen unter optimalen und reproduzierbaren Bedingungen kultiviert werden. Hierbei hat eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren Einfluss auf die Qualität der Zellen. Vor allem die Zusammensetzung des Kulturmediums und insbesondere die Wahl des Serums spielen eine entscheidende Rolle. Dabei liefern Seren unter anderem Hormone, Bindungsproteine, Anheftungsfaktoren, Aminosäuren, anorganische Salze und Spurenelemente und beeinflussen damit stark das Wachstum der Zellen<sup>166</sup>. Da Seren aber Naturprodukte mit wechselnder und teils unbekannter Zusammensetzung sind, ist eine sorgfältige Auswahl des Serums unabdingbar.

Neben optimalen wachstumsfördernden Eigenschaften ist vor allem auch die Herkunft des Serums wichtig. Routinemäßig angewandte Protokolle beinhalten fast ausschließlich die Verwendung von Seren tierischen Ursprungs, wie z.B. fetales Kälberserum (FCS). Zwar werden diese Seren sehr sorgfältig auf Viruskontaminationen überprüft und ihre Herkunft ist gut zurück verfolgbar, jedoch ist eine Übertragung von Krankheiten auf den Empfänger nicht vollständig ausgeschlossen. So weist z.B. die Firma PAN Biotech GmbH, ein weltweit agierender Anbieter von Seren, ausdrücklich darauf hin, dass durch das Serum Kontaminationen der Zellkulturen mit TSE (*Transmissible Spongiform Encephalopathy*)-Agenzien nicht vollständig ausgeschlossen werden können<sup>167</sup>. Hinzu kommt, dass sich im FCS enthaltene Proteine im Zytoplasma der Zellen ablagern können und bei einer Transplantation zu einer immunologischen Reaktion des Empfängers führen können. So konnten in  $1 \times 10^8$  MSCs 7- 30 mg Proteine nachgewiesen werden, die ursprünglich aus dem FCS stammten<sup>168</sup>. Die Etablierung von xeno-freien Kulturbedingungen ist dementsprechend stark zu favorisieren.

Neben der wissenschaftlichen Fragestellungen zur Verwendung von tierischen Seren bei klinischen Anwendungen, sei hier ebenfalls auf die ethisch fragwürdige Gewinnung von fetalen Kälberseren hingewiesen, bei der laut der *European Biomedical Research Association* (EBRA) jährlich bis zu zwei Millionen Feten getötet werden<sup>169</sup>. Die Gewinnung

des Serums erfolgt aus dem Blut von ungeborenen Kälbern, welche zuvor aus dem Uterus des Muttertiers entfernt wurden. Anschließend wird das Herz der Kälber für gewöhnlich ohne eine vorangegangene Anästhesie punktiert, um das Blut zu gewinnen. Dabei ist davon auszugehen, dass die Tiere bereits am Leben sind und eine normale Hirnfunktion aufweisen<sup>170</sup>. Eine tiefergehende Diskussion dieses Themas soll im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht stattfinden. Der interessierte Leser sei an dieser Stelle auf die Homepage der EBRA und der dort angebotenen Information hingewiesen<sup>169</sup>.

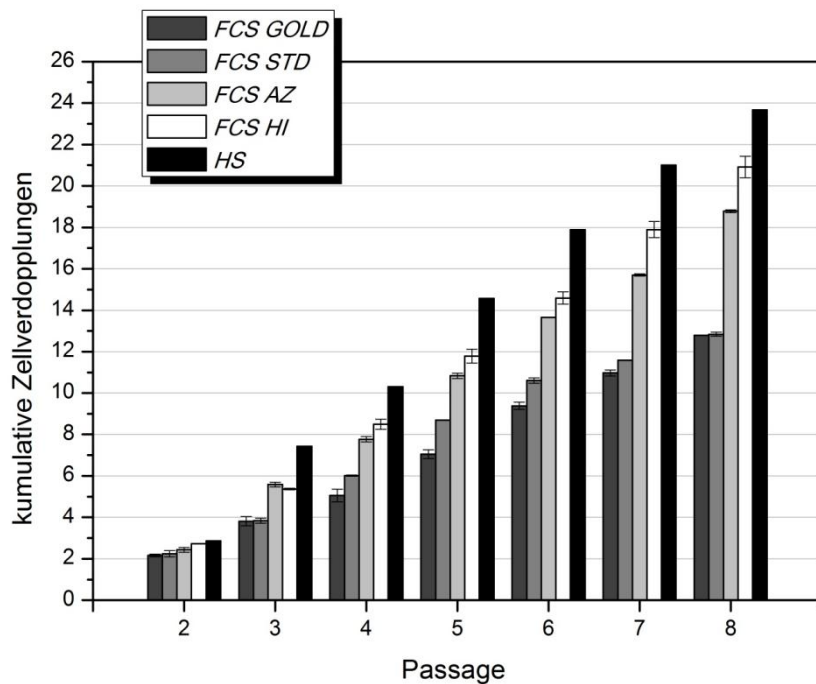
### 3.3.1 Etablierung von xeno- freien Kultivierungsbedingungen für UC-MSCs

Wie bereits erwähnt, ist die Kultivierung von MSCs unter xeno-freien Bedingungen mit Hinblick auf den Einsatz in klinischen Anwendungen zu bevorzugen. Der in diesen Versuchen verfolgte Ansatz beruht dabei auf der Verwendung von allogenen HS. Dieses wurde mit Hinblick auf proliferationsfördernde Eigenschaften, die Homogenität der Zellpopulation sowie die Stabilität der Expression typischer Oberflächenmarker in Langzeitkulturexperimenten (n=3) mit vier verschiedenen FCS verglichen. Hierfür wurden MSCs in einer Dichte von 4000 Zellen/ cm<sup>2</sup> in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausplattiert und in  $\alpha$ MEM mit 50  $\mu$ g/ ml Gentamycin und 10% eines der folgenden Seren kultiviert: Allogenes HS, FCS „Standard Qualität“ (FCS STD), FCS „Gold Standard“ (FCS GOLD), FCS „vorgetestet für Amnionzellen“ (FCS AZ) und FCS „hitzeinaktiviert“ (FCS HI). Die Zellen wurden über einen Zeitraum von sieben Passagen (P2- P8) kultiviert. Wurde in der am schnellsten proliferierenden Kultur eine Konfluenz von ca. 80% erreicht, so wurden die Zellen aller fünf Kulturen enzymatisch abgelöst, mittels Trypanblau Färbung und einer Neubauerkammer gezählt und in der Ausgangszelldichte von 4000 Zellen/ cm<sup>2</sup> erneut ausplattiert. Mit den erhaltenen Zellzahlen und der Dauer der jeweiligen Passage wurden für die Dauer des Experiments kumulative Zellverdopplungen und kumulative Zellzahlen berechnet. In allen Langzeitkulturexperimenten wurden für jedes getestete Serum zwei Versuchsansätze parallel durchgeführt. Auf Grund spenderbedingter Variationen werden im Folgenden die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments gezeigt, welche die Ergebnisse aller Experimente widerspiegeln.

Es konnte gezeigt werden, dass UC-MSCs unter allen getesteten Mediumformulierungen erfolgreich expandiert werden konnten. Allerdings zeigten sich teils deutliche Unterschiede im Bezug auf das Proliferationspotential der Zellen (siehe Abb. 3.4). So durchliefen Zellen bei einer Kultivierungsdauer von 28 Tagen in Gegenwart von HS  $23 \pm 0.31$



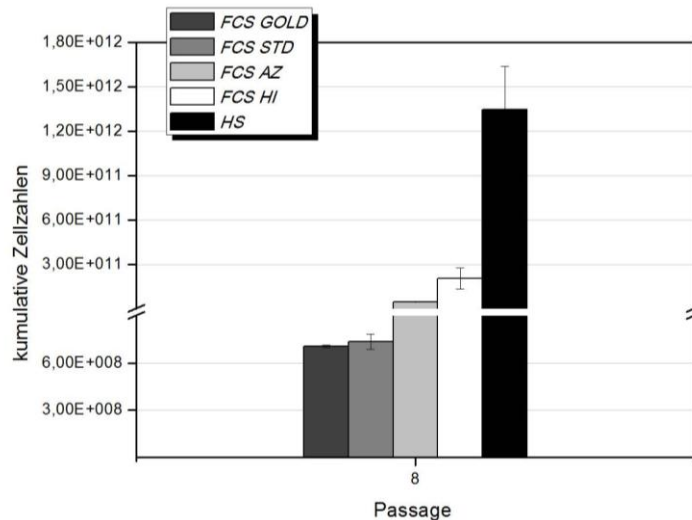
Zellverdopplungen und zeigten somit das höchste Proliferationspotential. Zellen, welche in Medium mit *FCS AZ* bzw. *FCS HI* kultiviert wurden zeigten mit  $21 \pm 0.51$  bzw.  $19 \pm 0.06$  durchlaufenen Zellverdopplungen ein geringeres Proliferationspotential. Deutlich vermindert war die Proliferation von Zellen, welche in Medium mit *FCS STD* ( $13 \pm 0.09$  Verdopplungen) und *FCS GOLD* ( $12 \pm 0.02$  Verdopplungen) kultiviert wurden.



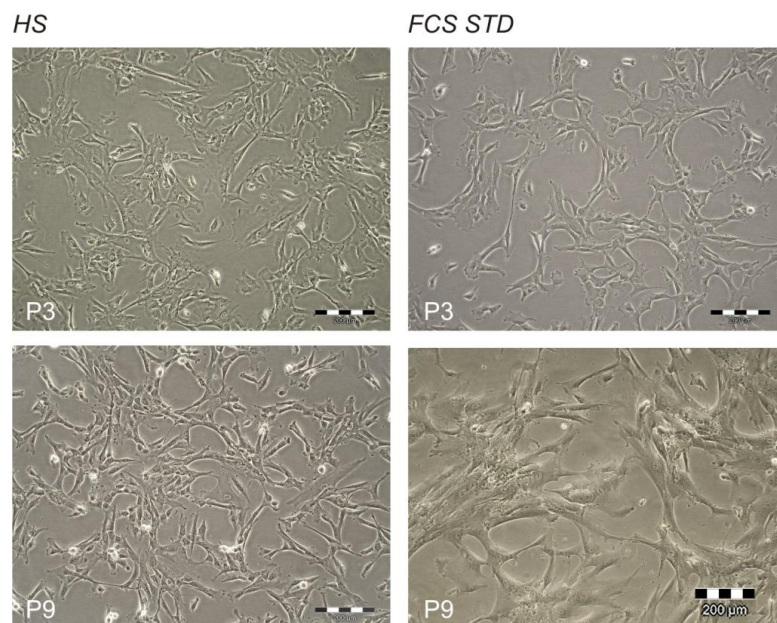
**Abb. 3.4:** Einfluss des Serums auf das proliferative Potential von UC-MSCs. Dargestellt sind die kumulativen Verdopplungen der Zellen über einen Zeitraum von sieben Passagen (P2- P8) in Gegenwart eines der vier getesteten FCS bzw. von HS.

Ein entsprechendes Bild zeigt sich auch, wenn man die am Ende von Passage acht errechneten kumulativen Zellzahlen betrachtet (siehe Abb. 3.5). So konnten durch die Verwendung von HS theoretisch durchschnittlich  $13,5 \times 10^{11}$  UC-MSCs, durch die Verwendung der verschiedenen FCS hingegen nur deutlich weniger Zellen erhalten werden ( $2,05 \times 10^{11}$  Zellen (*FCS HI*);  $0,45 \times 10^{11}$  Zellen (*FCS AZ*);  $0,0074 \times 10^{11}$  Zellen (*FCS STD*);  $0,0071 \times 10^{11}$  Zellen (*FCS GOLD*)). Hinzu kommt, dass es im Laufe der Langzeitkultivierung der Zellen unter der Verwendung von *FCS STD* und *FCS GOLD* zu einer starken Inhomogenität der Größenverteilung innerhalb der Kulturen kam. Abbildung 3.6 veranschaulicht dies am Beispiel von Zellen, welche in Gegenwart von *FCS STD* kultiviert wurden. In HS-haltigem Medium kultivierte Zellen dienten als Vergleich. Es ist

zu erkennen, dass sich die Morphologie der Zellen in dem FCS-haltigen Medium in P9 deutlich von der der Vergleichszellen unterscheidet. Die Zellen erscheinen größer, breiter und langgestreckter. Zellen, welche unter dem Einfluss von *FCS HI* und *FCS AZ* kultiviert wurden, zeigten im Laufe der Langzeitkultivierung nur geringfügige morphologische Veränderungen (Daten nicht gezeigt).

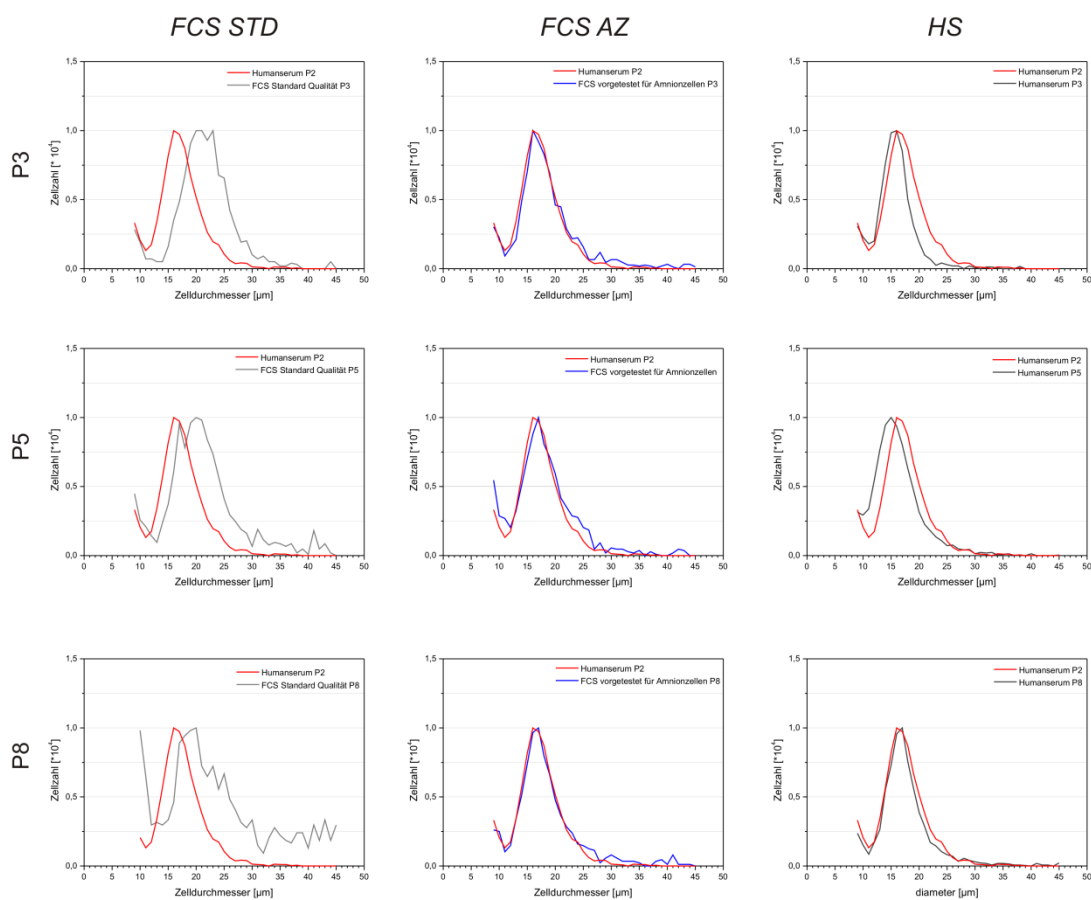


**Abb. 3.5:** Einfluss des Serums im Kulturmedium auf das proliferative Potential von UC-MSCs. Dargestellt sind die kumulativen Zellzahlen, welche theoretisch über einen Zeitraum von sieben Passagen (P2- P8) in Gegenwart eines der vier getesteten FCS bzw. von HS erhalten werden konnten.



**Abb. 3.6:** Einfluss des Serums im Kulturmedium auf die Zellmorphologie am Beispiel von *FCS STD* und *HS*. Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen (100 fach vergrößert) von Zellen während eines Langzeitexperiments in P3 und P9.

Um einen besseren Eindruck der Größenverteilung der Zellen innerhalb der jeweiligen Kultur zu gewinnen, wurden mittels des „CASY<sup>®</sup>1 DT Cell Counter“ die Größenverteilung von Zellen unter dem Einfluss des jeweiligen Serums erstellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.7 dargestellt und zeigen die Verteilungen innerhalb der jeweiligen Kultur am Beispiel von *FCS STD*, *FCS AZ* und *HS* in den Passagen P3, P5 und P8.

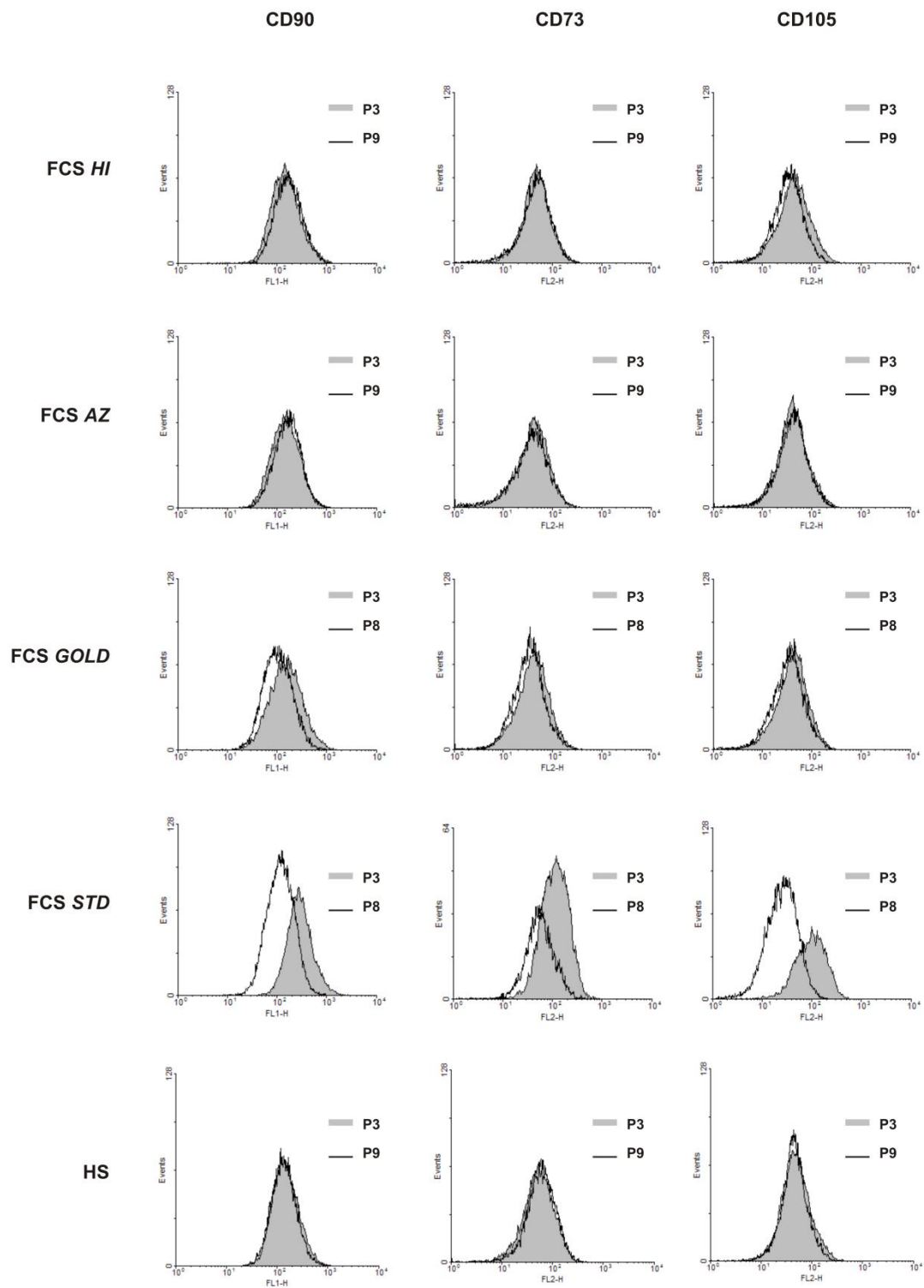


**Abb. 3.7: Überblick der Größenverteilung in UC-MSC Langzeitkulturen unter dem Einfluss von FCS bzw. HS. Dargestellt sind die Größenverteilungen in Kulturen in P3, P5 und P8 in Gegenwart von FCS *STD*, FCS *AZ* und *HS*. Die Aufnahme der Verteilungen erfolgte mittels „CASY<sup>®</sup>1 DT Cell Counter“.**

Es ist zu erkennen, dass die Größenverteilungen der Zellpopulationen, welche in *HS* und *FCS AZ* kultiviert wurden, über den gesamten Zeitraum der Kultivierung weitestgehend stabil geblieben sind. Ausgehend von der ursprünglichen Größenverteilung der Zellen in P2 (rote

Kurve in jedem Graph) mit einem Maximum bei 16  $\mu\text{m}$  Zelldurchmesser, verschob sich das Maximum in beiden Kulturen im Laufe des Experiments nur um ca. 1  $\mu\text{m}$  in Richtung Zellen größeren Durchmessers. Im Falle der Kultur mit HS kam es in P5 zu einer vorübergehenden Verschiebung des Maximums um ca. 1  $\mu\text{m}$  in Richtung kleinerer Zellen. Beide Kulturen zeigten über die gesamte Versuchsdauer eine homogene Zellverteilung, wobei die Kultur in Gegenwart von *FCS AZ* bereits in P3 einen geringen Anteil größerer Zellen enthielt. Bei der Verwendung von *FCS STD* zeigte sich jedoch bereits für Zellen in P3 eine deutliche Verschiebung der Verteilung in Richtung größerer Zellen. Des Weiteren weist die Verteilung auf eine sehr heterogene Zellpopulation mit einem höheren Anteil größerer Zellen hin, was die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 3.6 bestätigt.

Die Größenzunahme und die damit verbundene Heterogenität der Zellpopulation in Gegenwart von *FCS GOLD* und *FCS STD* gingen einher mit einer verminderten Expression stammzelltypischer Oberflächenmarkerproteine. Abbildung 3.8 zeigt die Ergebnisse durchflusszytometrischer Messungen zur Bestimmung des Immunophänotyps der Zellen unter dem Einfluss des jeweiligen Serums in P3 und P8 bzw. P9. Analysiert wurde die Expression der Marker CD73, CD90 und CD105. Es ist zu erkennen, dass die Expression der Marker unter der Verwendung von *FCS HI*, *FCS AZ* und HS über den gesamten Zeitraum des Experiments größtenteils stabil geblieben ist. Einzig Zellen unter dem Einfluss von *FCS HI* zeigten eine geringfügig verminderte Expression von CD105 in P9. Die Verwendung von *FCS GOLD* führte zu einer leichten (CD73, CD105) bis deutlicher verminderten (CD90) Expression der Marker. Die Verwendung von *FCS STD* führte sogar zu einer deutlich verminderten Expression aller drei analysierten Marker.



**Abb. 3.8: Stabilität des Immunphänotyps von UC-MSCs unter dem Einfluss verschiedener Seren. Die Expression der Oberflächenmarker wurde mittels Durchflusszytometrie für Zellen in P3 und P8 bzw. P9 bestimmt.**

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass die Wahl des Serums ein entscheidender Faktor für die Gewinnung von UC-MSCs von hoher Qualität darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass eine effiziente Expansion von UC-MSCs unter xeno-freien Kulturbedingungen nicht nur generell möglich ist, sondern dass die Zellen in Gegenwart von HS unter Aufrechterhaltung ihres ursprünglichen Immunophänotyps das höchste proliferative Potential aufwiesen, was bei Verwendung von zwei der vier getesteten FCS nicht zutraf.

Andere Arbeitsgruppen erzielten auf dem Gebiet der xeno-freien Kultivierung von MSCs teils widersprüchliche Ergebnissen. Shahdadfar *et al.* zeigten ein gesteigertes Proliferationspotential von BM-MSCs unter der Verwendung von autologem HS gegenüber FCS, wohingegen die Verwendung von allogenen HS zu einer Hemmung des Zellwachstums bis hin zum Zelltod führte<sup>171</sup>. Tateishi *et al.* und Le Blanc *et al.* zeigten hingegen ein gesteigertes Proliferationspotential von MSCs aus der Synovia<sup>172</sup> bzw. dem Knochenmark<sup>173</sup> in Gegenwart von autologem HS, wobei letztere zusätzlich jedoch eine vorübergehend gesteigerte Expression von HLA-Klasse-II Molekülen beobachteten. Bieback *et al.* konnten im Gegensatz hierzu keine Unterschiede beim Proliferationspotential von BM-MSCs unter dem Einfluss von allogenen HS und FCS beobachten<sup>174</sup>. Gleiches konnten Pérez-Ilzarbe *et al.* zeigen. Die Verwendung von autologem HS führte im Vergleich zu FCS zu keinen Unterschieden bezüglich Proliferation, sowie Stabilität des Phänotyps und Morphologie von BM-MSCs. Allerdings zeigten die Zellen unter dem Einfluss von HS *in vitro* ein gesteigertes Potential zur Immunmodulation<sup>175</sup>. Einen ähnlichen Effekt konnten auch Hartmann *et al.* beobachten. So zeigten auch UC-MSCs in Medium mit HS eine effizientere Suppression der Proliferation von T-Zellen *in vitro*<sup>176</sup>.

Die hier gezeigten Beispiele lassen sich jedoch nur eingeschränkt miteinander vergleichen, da sich die Quellen für MSCs, sowie die Methoden zur Isolierung und die verwendeten Seren unterscheiden. Dieser Umstand zeigt den Bedarf der Etablierung eines, zumindest für aus den gleichen Quellen stammende Zellen, einheitlichen Protokolls zur Kultivierung von MSCs für klinische Anwendungen.

Das in dieser Arbeit etablierte Protokoll zeigt, dass durch die Verwendung von allogenen HS xeno-freie Kulturbedingungen möglich sind und stellt somit eine interessante Alternative zur konventionellen Kultur mit Seren tierischen Ursprungs dar. Zwar können auch hier spenderspezifische Qualitätsunterschiede des Serums nicht gänzlich ausgeschlossen werden, jedoch können diese größtenteils durch ein „poolen“ der Seren mehrere Spender ausgeglichen werden. Dies gewährleistet ebenfalls, dass stets ausreichend große Mengen an Serum zur Verfügung stehen.

Neben der Wahl des Serums, stellt auch dessen Konzentration im Kulturmedium einen wichtigen Teil der Kultivierungsbedingungen für Zellen dar. Dessen Optimierung war das Ziel folgender Arbeiten.

### 3.3.2 Optimierung der Serumkonzentration für die Kultivierung von UC-MSCs

Wie bereits erwähnt, liefert das Serum neben einer Vielzahl anderer Stoffe auch Faktoren (wie z.B. Hormone), welche großen Einfluss auf die Vitalität und Proliferation der Zellen haben und diese im Idealfall positiv beeinflussen können. Hierbei gilt es jedoch, die optimale Konzentration zu finden, wobei eine möglichst geringe Konzentration in den meisten Fällen erstrebenswert ist. Von besonderer Relevanz ist dieser Umstand, wenn Zellen für klinische Anwendungen in autologem, also mit patienteneigenem Serum expandiert werden sollen, da dieses meist in nur geringen Volumina zur Verfügung steht. Des Weiteren ist zu beachten, dass Seren allgemein, und vor allem Humanserum, zu einem erheblichen Teil der Kosten von Zellkulturexperimenten beitragen. Daher ist es auch aus kommerzieller Sicht erstrebenswert, den Anteil des Serums im Medium möglichst gering zu halten. Für alle Anwendungen gilt jedoch, dass die Konzentration nur so niedrig gewählt werden darf, dass eine optimale Kultur der Zellen immer noch gewährleistet ist.

Um eine optimale Proliferation der Zellen auch bei geringen Serumkonzentrationen zu erreichen, kann das Kulturmedium zusätzlich mit Wachstumsfaktoren angereichert werden. Einer der am häufigsten hierfür verwendeten Faktoren ist der *Fibroblast Growth Factor* (FGF)- 2. FGF- 2 gehört zur FGF Superfamilie, welche aus aktuell 23 Mitgliedern besteht. Diese haben alle eine konservierte zentrale Domäne gemein, welche aus 120 Aminosäuren besteht<sup>177</sup>. Neben der namensgebenden Funktion, hat FGF- 2 auch auf eine Vielzahl anderer Zielzellen unterschiedlichste Auswirkungen. So induziert FGF- 2 unter anderem die Proliferation von Endothelzellen, Melanozyten und Chondrozyten, induziert die Produktion von Interleukin- 6 in Makrophagen und Fibroblasten und verlängert die Überlebensdauer von Neuronen<sup>178, 179</sup>.

Um die optimale Konzentration von HS für die Kultivierung von UC-MSCs zu bestimmen, wurden Zellen in Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen an HS (10%, 5%, 2% HS) kultiviert. Um einen durch die Reduktion des Serums möglicherweise auftretenden Mangel an essentiellen Serumbestandteilen entgegen zu wirken, wurden Medien, welche nur 2% HS enthielten, zusätzlich mit Insulin, Transferrin und Selen (ITS) versetzt.

In einem weiteren Ansatz wurde das Kulturmedium zusätzlich mit FGF-2 (tebu-bio, Offenbach) versetzt, um den Einfluss des Wachstumsfaktors auf die Proliferation der Zellen zu untersuchen. Um zwischen dem Effekt des Faktors und dem des Serums differenzieren zu können, wurde das FGF-2 haltige Medium mit einer nur geringen Konzentration an HS (2%) versetzt. Tabelle 5 gibt einen detaillierten Überblick der verwendeten Medien und Zusätze.

**Tab. 5: Überblick der verwendeten Medien und Zusätze zur Bestimmung der optimalen Serumkonzentration**

Name des Mediums	Zusammensetzung
<i>HS 10</i>	alphaMEM + 10% HS
<i>HS 5</i>	alphaMEM + 5% HS
<i>HS 2</i>	alphaMEM + 2% HS; 0,5% ITS <sup>*</sup> ; 0,5% HSA <sup>**</sup>
<i>HS FGF</i>	alphaMEM + 2% HS; 0,5% ITS <sup>*</sup> ; 0,5% HSA <sup>**</sup> ; 0,5 ng/ ml FGF-2

alle Medien enthielten zusätzlich 50µg/ ml Gentamycin

<sup>\*</sup>Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) Zusatz

<sup>\*\*</sup> Humanes Serumalbumin

Als Kriterien zur Bestimmung der optimalen Serumkonzentration wurden das proliferative Potential der Zellen, die Apoptoserate (anhand der Caspase-3/ 7 Aktivität), die Anzahl der zur Kolonienbildung fähigen Zellen und die Anzahl seneszenten Zellen innerhalb einer Kultur unter Einfluss der jeweiligen Serumkonzentration über einen Zeitraum von drei Passagen (P2- P4) bestimmt. Die im Folgenden gezeigten Daten sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments und spiegeln die Ergebnisse aller Experimente (n=3) wieder.

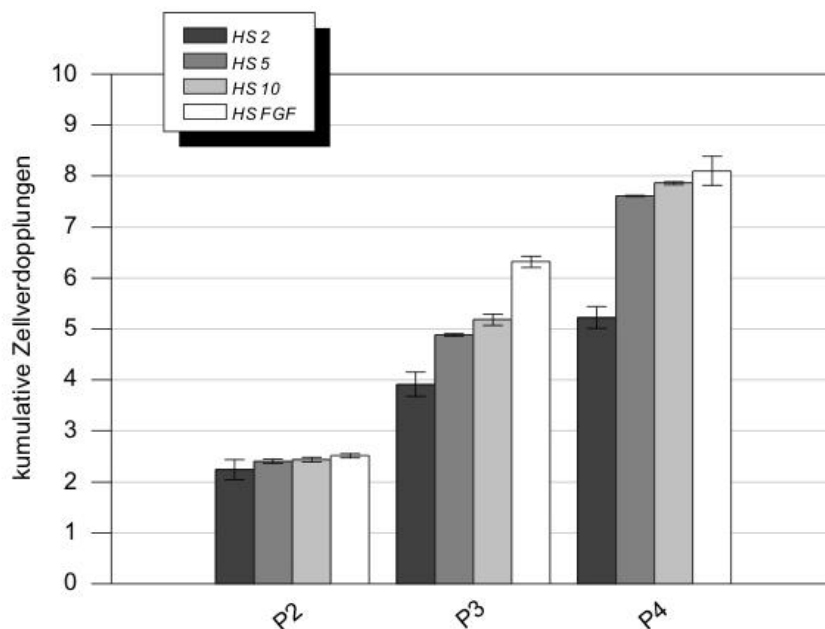
### **3.3.2.1 Bestimmung des Proliferationspotentials und von Apoptose**

Zur Bestimmung des proliferativen Potentials der Zellen und der Caspase-3/ 7 Aktivität wurden UC-MSCs in einer Zelldichte von 4000 Zellen/ cm<sup>2</sup> in acht Wells einer 24-Well Platte in dem entsprechenden Medium ausplattiert. Nachdem in der am schnellsten proliferierenden Kultur eine Konfluenz von ca. 80% erreicht wurde, wurden die Zellen aus jeweils vier Wells aller vier Versuchsansätze mittels Accutase<sup>TM</sup> enzymatisch abgelöst und in



einer Neubauerkammer unter Verwendung von Trypanblau gezählt. Die Zellen aus den verbliebenen vier Wells der jeweiligen Kultur wurden anschließend mittels des Apo-ONE® Homogeneous Caspase3-/7 Assays auf Apoptose hin untersucht.

Die Zellen konnten unter allen getesteten Serumkonzentrationen erfolgreich expandiert werden. Es zeigten sich allerdings deutliche Unterschiede im proliferativen Potential der Zellen, welches durch die Berechnung der kumulativen Zellverdopplungen bestimmt wurde. So zeigten Zellen, welche in *HS FGF* kultiviert wurden, das höchste Proliferationspotential und durchliefen  $8,1 \pm 0,29$  Verdopplungen. Dahingegen durchliefen Zellen in *HS 10* nur  $7,9 \pm 0,02$ , in *HS 5*  $7,6 \pm 0,01$  und in *HS 2* nur  $5,2 \pm 0,21$  Verdopplungen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.9 dargestellt.

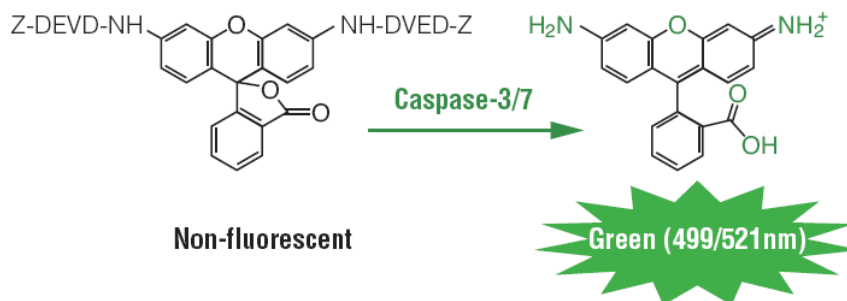


**Abb. 3.9:** Das proliferative Potential von UC-MSCs in Abhängigkeit der HS Konzentration. Dargestellt sind die kumulativen Zellverdopplungen von UC-MSCs unter dem Einfluss der jeweiligen Serumkonzentration für eine Kultivierungsdauer von drei Passagen.

Der Prozess der Apoptose kann durch eine Vielzahl unterschiedlichster Stimuli eingeleitet werden. Hierzu gehören unter anderem Schädigungen durch ein zu hohes Maß an Strahlung, die Aktivierung über den Fas/ Apo-1 Rezeptor (z.B. durch Immunzellen) oder aber auch ein Mangel an Wachstumsfaktoren. Zu den wichtigsten Effektorenzymen der Signaltransduktionskette in apoptotischen Zellen zählen die Mitglieder der Cystein-Asparaginsäure-spezifischen Proteasen (*cysteine aspartic acid-specific protease*

(Caspase)) und hierbei vor allem die Caspasen 3 und 7. Zu den biologischen Substraten dieser Caspasen zählen unter anderem die poly-(ADP Ribose) Polymerase (PARP), die DNA-abhängige Protein Kinase (DNA-PK), Topoisomerasen und die Protein Kinase C (PKC). Dabei spalten die Caspasen spezifisch am C-terminalen Ende eines Asparaginsäurerests der Sequenz DEVD (Asp-Glu-Val-Asp)<sup>180-187</sup>.

Die Bestimmung der Caspase 3-/7 Aktivität kann daher als Maß der Apoptoserate in Zellen dienen. In den hier beschriebenen Versuchen wurde zur Bestimmung der Caspaseaktivität der Apo-ONE<sup>®</sup> Homogeneous Caspase3-/7 Assay verwendet. Das Prinzip des Assays ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Die Zellen werden zunächst permabilisiert und dann mit dem Substrat der Caspasen 3 und 7, dem Rhodamin 110, bis-(N-CBZ-L- aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic acid amide; Z-DEVD-R110) inkubiert. Nach Abspaltung des DEVD- Rests wird Rhodamin 110 freigesetzt, welches stark fluoresziert und entsprechend vermessen werden kann. Die Intensität des gemessenen Signals ist proportional zur Aktivität der Caspasen 3 und 7 in der analysierten Probe.



**Abb. 3.10: Prinzip des Apo-ONE<sup>®</sup> Homogeneous Caspase3-/7 Assays<sup>188</sup>.** Das nicht fluoreszierende Substrat Z-DEVD-R110 wird durch die Caspasen 3 und 7 gespalten. Es wird fluoreszierendes Rhodamin 110 frei, welches detektiert werden kann.

Die Ergebnisse des Assays sind in Abbildung 3.11 als relative Fluoreszenzeinheit (*relative fluorescence unit* (RFU)) und auf die Zellzahl normiert dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Aktivität der Caspasen während der Kultivierung in allen untersuchten Ansätzen anstieg. Allerdings wurden in Kulturen mit reduzierter Serumkonzentration höhere Aktivitäten gemessen. So lagen die Werte bei Zellen in HS 5 bei  $1,7 \pm 0,13$  RFU (P2),  $3,2 \pm 0,35$  RFU (P3) und  $2,7 \pm 0,08$  RFU (P4). Für Zellen in HS 2 lagen die Werte bei  $1,6 \pm 0,3$  RFU (P2),  $4,5 \pm 0,4$  RFU (P3) und  $3,7 \pm 0,35$  RFU (P4).

Verglichen mit Kulturen mit *HS FGF*, war die Aktivität der Caspasen in Kulturen mit *HS 10* geringfügig höher in P3 ( $2,2 \pm 0,32$  RFU (*HS 10*);  $1,7 \pm 0,38$  RFU (*HS FGF*)), blieben jedoch in P4 auf einem ähnlichen Niveau, wohingegen die Aktivität in Gegenwart von *HS FGF* in P4 deutlich anstieg ( $3,3 \pm 0,39$  RFU) und über der in Zellen in *HS 10* lag.

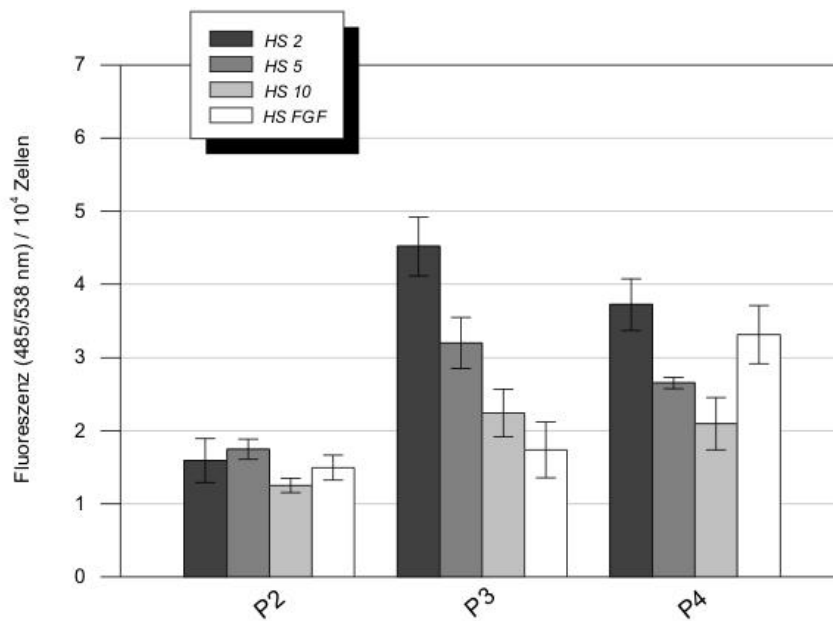


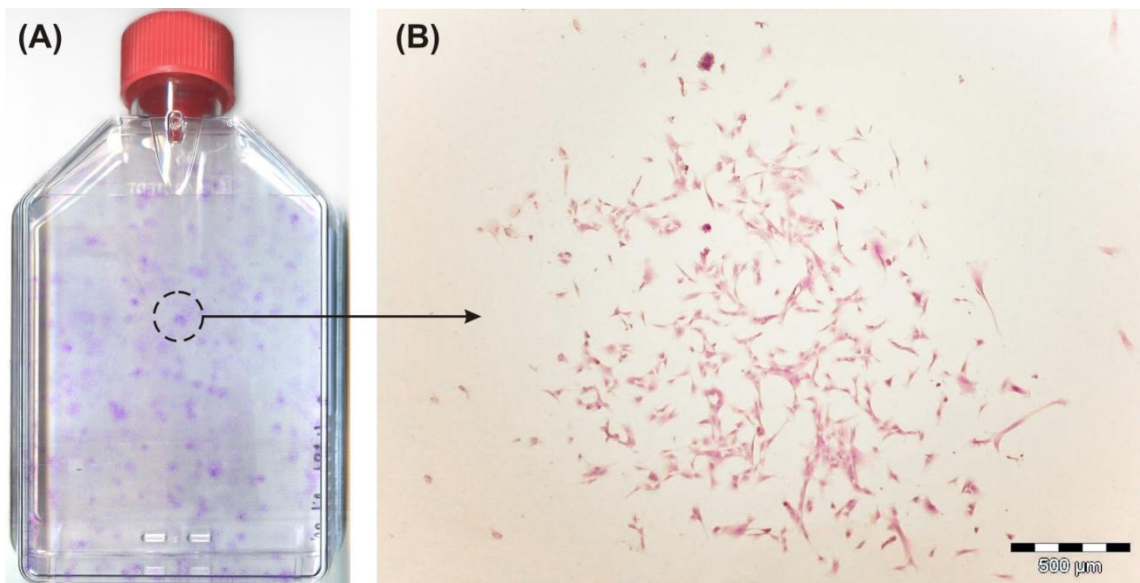
Abb. 3.11: Entwicklung der Apoptose in UC-MSC Kulturen unter Einfluss verschiedener Serumkonzentrationen. Dargestellt ist die Aktivität der Caspasen 3 und 7 als „relative fluorescence units“ (RFU) und normiert auf die Zellzahl.

### 3.3.2.2 Bestimmung der colony forming unit- fibroblast (CFU- F) Frequenz

Die Anzahl der zur Koloniebildung fähigen Zellen innerhalb einer Kultur ist ein Maß für die Anzahl an Stamm- und Progenitorzellen und damit auch ein Maß für die Qualität der Kulturbedingungen. Sie lässt sich mittels des *colony forming unit- fibroblast* (CFU- F) Assays bestimmen und wird im Folgenden als CFU- F Frequenz bezeichnet. Hierfür werden Zellen in einer so geringen Zelldichte ausplattiert, dass davon ausgegangen werden kann, dass wachsende Kolonien ihren Ursprung in einer einzelnen Zelle haben und nicht aus mehreren dicht beieinander liegenden Zellen entstanden sind. Die Methode des CFU- F Assays geht ursprünglich auf die Pionierarbeiten von Friedenstein und Kollegen zurück, die darüber

erstmals mesenchymale Stromazellen aus dem Knochenmark isolierten und ihr osteogenes Differenzierungspotential nachwiesen<sup>3</sup>.

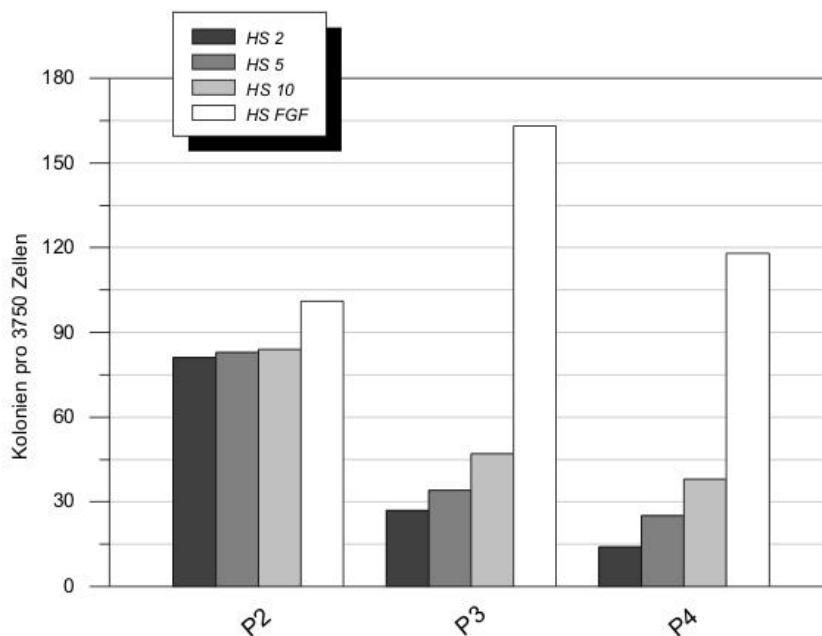
Für die vorliegenden Arbeiten wurden UC-MSCs in einem der vier zu testenden Medien in einer Zelldichte von 50 Zellen/cm<sup>2</sup> in einer T-75 cm<sup>2</sup> Flasche ausplattiert und über einen Zeitraum von acht Tagen ohne Wechsel des Mediums kultiviert. Hierbei wurde auf eine Sichtkontrolle der Zellen während der Inkubation verzichtet, um Erschütterungen und eine Neuverteilung der Zellen zu verhindern. Am Ende der Kultivierung wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 15 Minuten mit einer Lösung aus Kristallviolette in Methanol (0,5 %) fixiert und gefärbt. Die Zellen wurden abschließend erneut mit PBS gewaschen und über Nacht getrocknet. Die Zellkulturflaschen wurden unter dem Mikroskop ausgewertet und Kolonien, welche aus nicht weniger als 30 Zellen bestanden, gezählt. Eine entsprechende Zellkulturflasche nach der Zellfärbung ist in Abbildung 3.12 gezeigt.



**Abb. 3.12: Beispielhaftes Ergebnis eines CFU-F Assays mit UC-MSCs, welche in *HS FGF* kultiviert wurden. (A) Mit Kristallviolette angefärbte Kolonien in T-75 Zellkulturflasche. (B) Lichtmikroskopische Aufnahme einer gefärbten Kolonie (40x Vergrößerung).**

Die Zellen konnten unter allen gegebenen Bedingungen Kolonien bilden, allerdings zeigten sich deutliche Unterschiede in Abhängigkeit der verwendeten Serumkonzentration. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.13 als Anzahl gebildeter Kolonien in 3750 ausplattierten

Zellen dargestellt. Zellen, welche in *HS FGF* kultiviert wurden, zeigten in allen untersuchten Passagen stets das höchste Potential zur Bildung von Kolonien. So wurden in P2 101 Kolonien gebildet, 163 Kolonien in P3 und 118 Kolonien in P4. Damit zeigten die Zellen in Gegenwart von FGF-2, im Gegensatz zu Zellen in den restlichen getesteten Medien, zunächst sogar ein gesteigertes Potential zur Bildung von Kolonien in P3. Unter den anderen Versuchsbedingungen konnte ein konstanter Rückgang der CFU-F Frequenz im Zuge der Subkultivierung beobachtet werden. Kulturen, welche in *HS 2* kultiviert wurden, zeigten die geringste Anzahl an Kolonien (81 P2; 27 P3; 14 P4), gefolgt von Zellen in *HS 5* (83 P2; 34 P3; 25 P4) und Zellen in *HS 10* (84 P2; 47 P3; 38 P4).



**Abb. 3.13:** Einfluss der Serumkonzentration auf das Potential zur Kolonienbildung von UC-MSCs. Dargestellt ist die Anzahl von gebildeten Kolonien bei einer Ausgangszellichte von 3750 Zellen nach einer Kulturdauer von acht Tagen in einem der vier getesteten Medien.

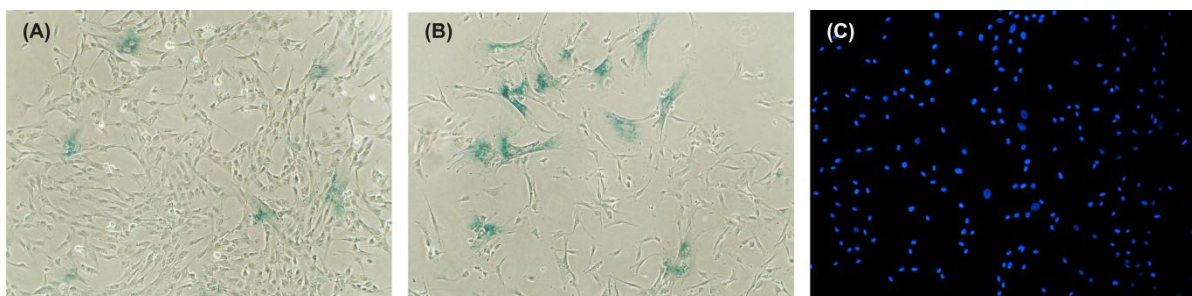
### 3.3.2.3 Bestimmung von Seneszenz-assoziiierter $\beta$ -Galactosidase

Als weiteres Merkmal für die Qualität einer Zellkultur kann der Anteil seneszenten Zellen innerhalb der Kultur herangezogen werden. Eukaryotische, nicht immortalisierte Zellen weisen *in vitro* in der Regel ein limitiertes Potential zur Zellteilung auf. Mit zunehmendem Alter stellen sie die Teilung ein, verbleiben aber als vitale Zellen in der Kultur<sup>189</sup>. Dabei

werden sie auch nicht mehr durch z.B. Wachstumsfaktoren des Serums zur Teilung stimuliert und weisen ein seneszenztypisches Zellzyklusprofil auf, das sich von dem von Zellen, welche wegen Zellschäden oder Kontaktinhibition die Teilung eingestellt haben, unterscheidet. Seneszente Zellen sind meist deutlich größer als noch proliferierende Zellen und zeigen ein verändertes Genexpressionsmuster<sup>190-192</sup>. Des Weiteren exprimieren sie  $\beta$ -Galactosidasen, welche ausschließlich bei einem pH-Wert von 6 Aktivität zeigen (Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galactosidase (SA- $\beta$ -Gal)) und als Nachweis der Seneszenz herangezogen werden können<sup>193</sup>.

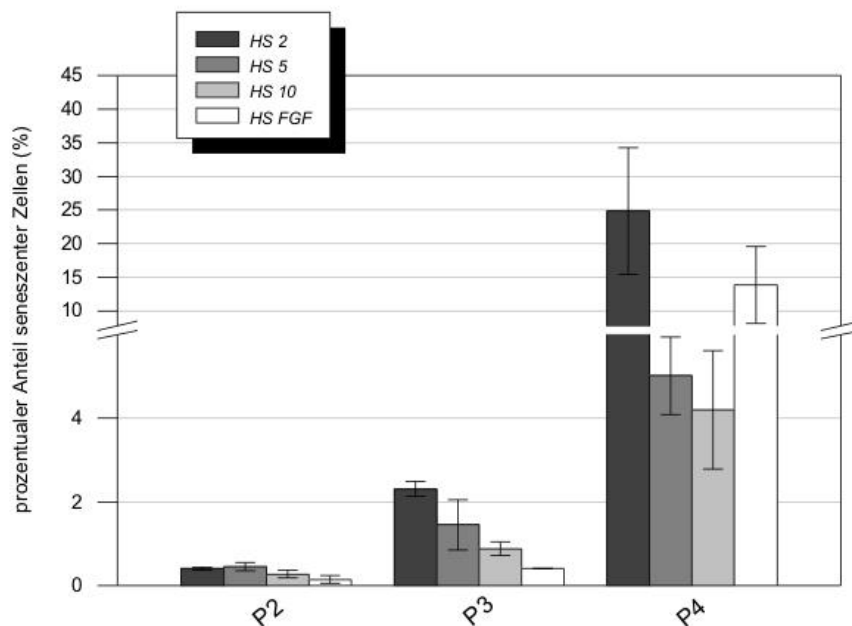
Der Nachweis der SA- $\beta$ -Gal Aktivität erfolgte in den vorliegenden Arbeiten mittels des „*Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kits*“ (Cell Signaling Technology) und basiert auf der Umsetzung von 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal) durch die SA- $\beta$ -Gal, was zu einer grünlich blauen Färbung der seneszenten Zellen führt.

Für die Experimente wurden UC-MSCs in einem der vier zu testenden Medien in einer Zelldichte von 4000 Zellen/ cm<sup>2</sup> in 6-Well Platten ausplattiert und für 48 Stunden kultiviert. Die Zellen wurden anschließend gemäß dem Herstellerprotokoll gefärbt. Zusätzlich wurde eine Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI durchgeführt. Zur Bestimmung des Anteils seneszenten Zellen in der Kultur, wurden pro Versuchsansatz vier repräsentative Bildausschnitte der Kultur gewählt und durch je eine lichtmikroskopische Aufnahme, sowie der zugehörigen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme der mit DAPI gefärbten Zellkerne dokumentiert. Durch Auszählen der gefärbten Zellkerne wurde die Gesamtzellzahl im vorliegenden Bild bestimmt. Die Bestimmung der Anzahl seneszenten Zellen erfolgte durch Auszählung der von einer grünlich blauen Färbung umgebenen Zellkerne. Beispielaufnahmen sind in Abbildung 3.14 gezeigt.



**Abb. 3.14: Bestimmung SA- $\beta$ -Gal positiver Zellen. Mittels *Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kits* gefärbte UC-MSCs, welche zuvor in HS 10 (A) bzw HS 2 (B) kultiviert. (C) Exemplarische Aufnahme von mittels DAPI gefärbter UC-MSC Zellkerne (alle Aufnahmen 100x vergrößert).**

Die Entwicklung des prozentualen Anteils an seneszenten Zellen in Abhängigkeit der Serumkonzentration bzw. unter Einfluss von FGF-2 ist in Abbildung 3.15 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass im Laufe der Kultivierung der Anteil seneszenten Zellen unter jeder getesteten Bedingung zugenommen hat. Dabei kam es in Kulturen in Gegenwart von nur 2 % HS zu der stärksten Zunahme. So lag der Anteil in P2 mit  $0,41 \pm 0,04$  % seneszenten Zellen noch auf einem ähnlichen Niveau, wie in den übrigen drei Kulturen ( $0,45 \pm 0,10$  % (HS 5);  $0,28 \pm 0,10$  % (HS 10);  $0,15 \pm 0,08$  % (HS FGF)), stieg im Laufe der Kultivierung aber deutlich an und lag mit  $2,31 \pm 0,17$  % in P3 und  $24,85 \pm 9,41$  % in P4 jeweils deutlich über den für die restlichen Kulturen bestimmten Werten. So wurden in Kulturen in HS 5 in P3  $1,45 \pm 0,60$  % und in P4  $5,02 \pm 0,92$  % seneszente Zellen bestimmt, Kulturen in HS 10 wiesen  $0,88 \pm 0,16$  % in P3 und  $4,21 \pm 1,41$  % in P4 auf. Der prozentuale Anteil seneszenten Zellen in Kulturen in HS FGF war in P2 und P3 stets geringer als in anderen Kulturen, stieg aber in P4 deutlich an und lag mit  $13,85 \pm 5,72$  % sogar über dem der Kulturen in HS 5 und HS 10.



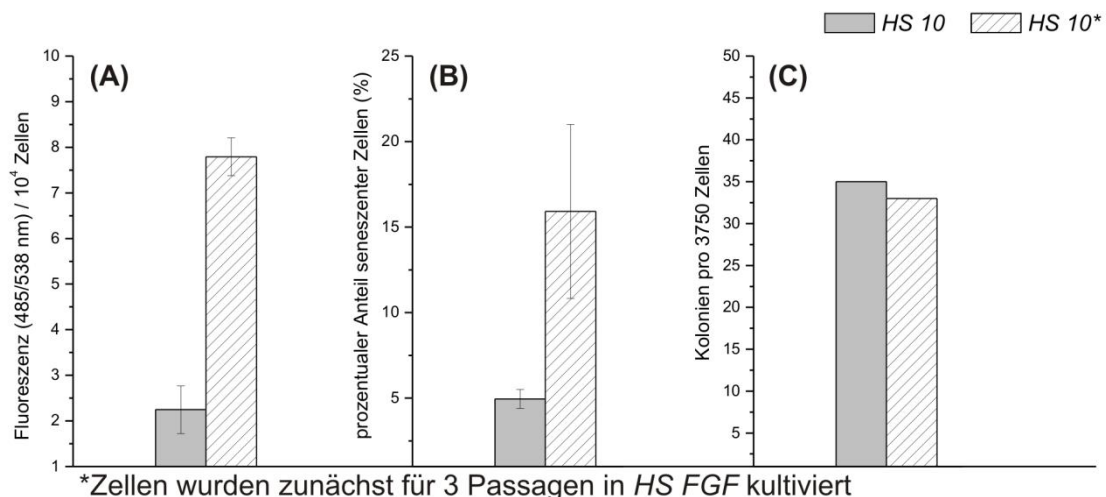
**Abb. 3.15:** Entwicklung des prozentualen Anteils seneszenten Zellen in UC-MSC Kulturen in Abhängigkeit der Serumkonzentration. Dargestellt ist der Anteil der SA-β-Gal positiven Zellen in Gegenwart eines der vier getesteten Medien.

Die vorliegenden Arbeiten zeigen, dass die Konzentration des Serums im Medium einen erheblichen Einfluss auf die Physiologie von UC-MSCs hat. So veranschaulichen die gezeigten Daten, dass ein verminderter Serumgehalt eine Verringerung des Proliferationspotentials zur Folge hat. Hinzu kommt, dass mit sinkendem Serumgehalt die CFU-F Frequenz in den Kulturen deutlich abnimmt, insgesamt also weniger Stamm- und Progenitorzellen in den Kulturen enthalten sind. Begleitet wird dies durch eine Zunahme von apoptotischen und seneszenten Zellen in der Kultur. Zwar war insgesamt ein Anstieg unter jeder gewählten Serumkonzentration zu beobachten, jedoch fiel er bei niedrigeren Konzentrationen deutlich stärker aus. Interessant ist die Beobachtung, dass in allen Kulturen nach einem ersten Anstieg der Apoptoserate von P2 nach P3 ein leichter Rückgang der Caspase-3/7 Aktivität von P3 nach P4 nachgewiesen werden konnte. Dies ist unerwartet, kann aber auf eine Selektion von verschiedenen Subpopulationen innerhalb der ursprünglichen Primärkultur, welche durch die stringenten Kulturbedingungen bedingt ist, hindeuten. Um in einem möglichst kurzen Zeitraum eine Vielzahl von UC-MSCs von höchster Qualität zu erhalten, ist daher eine Reduktion des Serumgehalts nicht zu empfehlen.

Der Einsatz von FGF-2 zur Steigerung der Proliferationsrate und zur Aufrechterhaltung des Differenzierungspotentials von MSCs wurde hinlänglich beschrieben<sup>179, 194-196</sup> und bestätigt die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse. Eine weitergehende Analyse kritischer Parameter, wie Seneszenz und Apoptose, sind dabei nur selten beschrieben. Zwar zeigten UC-MSCs in Gegenwart von FGF-2 ein deutlich gesteigertes Potential zur Proliferation und eine erhöhte CFU-F Frequenz, allerdings wiesen die Kulturen auch deutlich mehr apoptotische und seneszente Zellen auf. Es ist zu vermuten, dass die durch FGF-2 stark erhöhte Proliferation der Zellen zu einem frühzeitigen Altern der Zellen (z.B. durch Schädigung der DNA) und letztendlich zu einem erhöhten Anteil an seneszenten und apoptotischen Zellen geführt haben könnte. So können durch den Einsatz von FGF-2 zwar in kürzerer Zeit mehr Zellen erhalten werden, jedoch sind diese Zellen von minderer Qualität. Auch Panagiota *et al.* konnten eine deutliche Veränderungen der Eigenschaften von MSCs unter dem Einfluss von FGF-2 beobachten<sup>197</sup>. So zeigten Zellen in Gegenwart von FGF eine gesteigerte Expression von HLA-DR und HLA-Klasse-I Molekülen, sowie eine verminderte Expression von CD44. Da CD44 unter anderem bei Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakten eine zentrale Rolle spielt, könnte eine verminderte Expression ein verschlechtertes „*engraftment*“ der Zellen bei Transplantationen zur Folge haben.



Ebenfalls bleibt zu klären, welche Folgen es hat, wenn zuvor *in vitro* unter dem Einfluss von FGF- 2 kultivierte Zellen transplantiert werden und das Milieu *in vivo* keine oder nur deutlich geringere FGF- 2 Konzentrationen aufweist. UC-MSCs, welche zunächst über drei Passagen in FGF- 2 haltigem Medium kultiviert wurden und anschließend für eine weitere Passage in Medium ohne zusätzliches FGF- 2 expandiert wurden, wiesen einen stark erhöhten Anteil an apoptotischen (Abb. 3.16 (A)) und seneszenten (Abb. 3.16 (B)) Zellen auf. Im Vergleich zu Zellen, welche über die gesamte Kulturdauer in Medium ohne FGF- 2 kultiviert wurden, zeigten Kulturen nach der Umstellung von FGF- 2 auf Medium mit 10% HS ca. 3,5-mal mehr apoptotische und 3- mal mehr seneszente Zellen. Auch die CFU- F Frequenz war nach der Umstellung geringer (Abbildung 3.16 (C)).



**Abb. 3.16: Einfluss der Reduktion von FGF-2 im Kulturmedium auf UC-MSC Kulturen.** Dargestellt ist der Anteil apoptotischer (A) seneszenten (B) Zellen, sowie die CFU- F Frequenz (C) in UC-MSC Kulturen, welche für 4 Passagen in HS 10, bzw. für zunächst 3 Passagen in HS FGF und anschließend für eine weitere Passage in HS 10 expandiert wurden.

Aufgrund der vorliegenden Daten ist daher eine Kultivierung der Zellen in  $\alpha$ MEM mit 10% HS zu empfehlen. Neben der Wahl des Serums und dessen Konzentration, spielen jedoch noch weitere Parameter während der Kultivierung von UC-MSCs eine wichtige Rolle, um optimale und standardisierbare Kultivierungsbedingungen zu schaffen. So konnten Majore *et al.* zeigen, dass auch die Aussaatdichte der Zellen einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität des Zellmaterials hat<sup>133</sup>. Um ausreichende Zellmenge für klinische Anwendungen zu erreichen, ist eine starke Expansion der Zellen notwendig. Für die Subkultivierung der Zellen

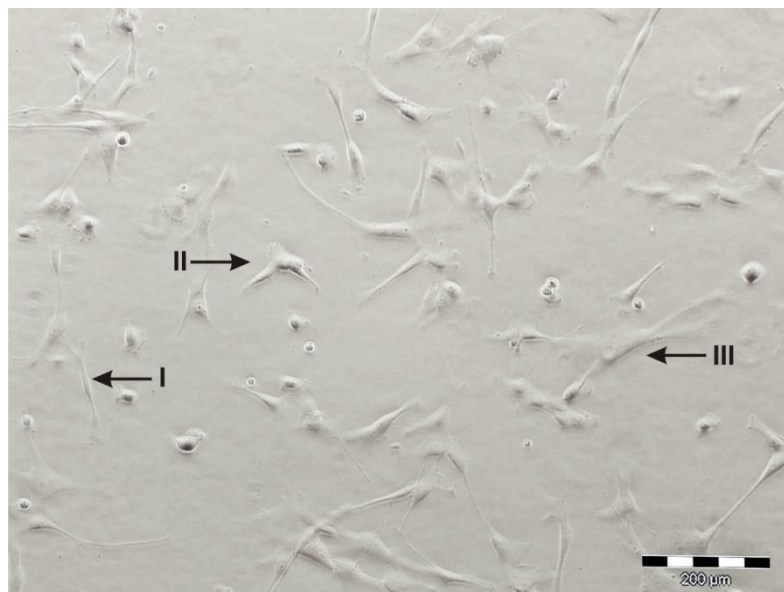
ist dabei ein enzymatisches Ablösen der Zellen von der Kulturgefäßoberfläche und ein Auflösen der Zell- Zell Kontakte notwendig. Um die Anzahl der Passagen möglichst gering zu halten, sollte untersucht werden, ob die Zellen durch das Aussähen in einer Dichte von nur 500 Zellen/ cm<sup>2</sup> ebenfalls effektiv expandiert werden können. Dabei zeigte sich, dass eine Expansion der Zellen mit dieser Ausgangsdichte nicht länger als über zwei Passagen erfolgen sollte, da danach eine starke Abnahme der Zellviabilität beobachtet wurde.

Auch die Sauerstoffkonzentration während der Kultivierung der Zellen ist ein weiterer wichtiger Parameter. Konventionell werden Zellen bei einer atmosphärischen Sauerstoffkonzentration von ca. 21% kultiviert. Diese wird allgemein als normoxisch bezeichnet, wohingegen eine stark verminderte Sauerstoffkonzentration als hypoxisch bezeichnet wird. Tatsächlich entspricht aber nur in den seltensten Fällen die Konzentration, welche in der jeweiligen Nische der Zellen *in vivo* vorliegt, den üblicherweise gewählten 21%. So beträgt der Sauerstoffgehalt z.B. im Knochenmark nur 1%- 7%<sup>198, 199</sup>. Da die Nabelschnur neben den drei Blutgefäßen keine weiteren Kapillaren aufweist ist anzunehmen, dass auch das Nabelschnurgewebe eine hypoxische Mikroumgebung darstellt. Somit stellt die Expansion von Zellen bei reduzierten Sauerstoffkonzentrationen physiologischere Kulturbedingungen dar und eine wachsende Zahl an Arbeitsgruppen hat den Einfluss von Hypoxie auf verschiedene Aspekte der Stammzellkultur untersucht (zusammengefasst in<sup>200</sup>). Auch Lavrentieva *et al.* haben den Einfluss von Hypoxie auf den Metabolismus und das Proliferationspotential der UC-MSCs untersucht und konnten zeigen, dass eine Reduktion der Sauerstoffkonzentration auf Werte zwischen 1,5% und 5% O<sub>2</sub> zu einer gesteigerten Proliferation der Zellen führte, wobei gleichzeitig weniger Zellschäden auftraten. Im Vergleich zu Kulturen unter normoxischen Bedingungen, konnte keine gesteigerte Apoptoserate in den UC-MSC Kulturen festgestellt werden<sup>201</sup>.

So ist abschließend festzuhalten, dass für die Optimierung der Kultivierungsbedingungen von UC-MSCs eine Vielzahl unterschiedlicher Parameter in Betracht gezogen werden müssen und weitere Untersuchungen notwendig sind, um die bereits etablierten Protokolle weiter zu optimieren.

### 3.4 Identifizierung und Charakterisierung von UC-MSK Subpopulationen

Obwohl die isolierten UC-MSKs unter xeno-freien Kulturbedingungen einen stabilen und homogenen Immunphänotyp aufweisen (siehe Abschnitt 3.3), lassen sich innerhalb dieser Kulturen morphologische Unterschiede der Zellen ausmachen. Abbildung 3.17 zeigt eine Aufnahme einer typischen UC-MSK Kultur. Es ist klar zu erkennen, dass die Kultur heterogen erscheint und sowohl kleine gestreckte Zellen (Abb. 3.17 (I)), als auch große und flach ausgebreitete Zellen (Abb. 3.17 (III)) enthält. Dabei scheint es einen fließenden Übergang von klein nach groß zu geben (vergleiche Abb. 3.17 (I)<(II)<(III)). Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass sich die Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befinden. Da Zellen kurz vor der Teilung üblicherweise einen erhöhten Proteingehalt aufweisen, erscheinen diese größer, als Zellen unmittelbar nach der Teilung.



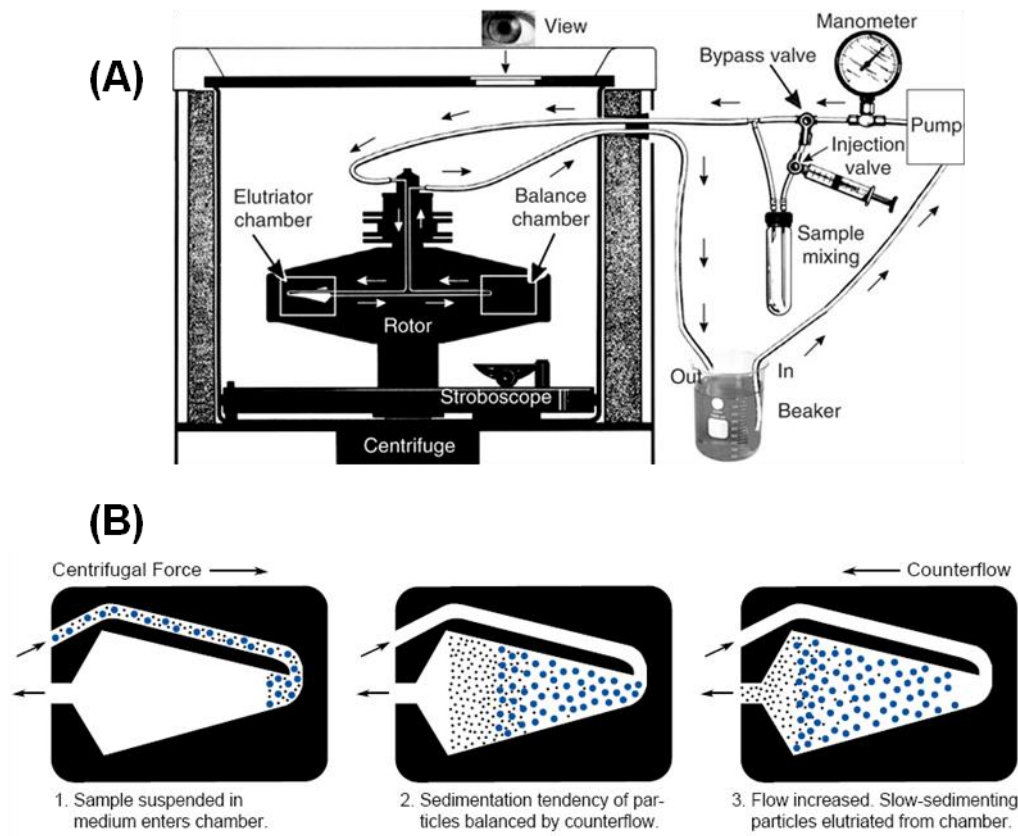
**Abb. 3.17: Morphologische Unterschiede innerhalb einer UC-MSK Kultur. Dargestellt ist eine lichtmikroskopische Aufnahme bei 100x Vergrößerung. Die Pfeile weisen auf Zellen unterschiedlicher Größe und Morphologie hin.**

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die Kultur distinkte Subpopulationen enthält, die sich durch Größe und Morphologie voneinander unterscheiden und evtl. weitere unterschiedliche Charakteristika aufweisen. Dieser Fragestellung sind Majore *et al.* nachgegangen<sup>100</sup>. Mittels „Counterflow Centrifugal Elutriation“ (CCE) wurden UC-MSK

Kulturen in Zellfraktionen unterschiedlicher Größe aufgetrennt und einer ersten tiefergehenden Charakterisierung unterzogen.

### 3.4.1 Counterflow Centrifugal Elutriation (CCE)

Bei der CCE handelt es sich um ein physikalisches Trennprinzip, bei dem Zellen unterschiedlicher Größe entsprechend ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit voneinander getrennt werden. Der allgemeine Aufbau der Apparatur ist in Abbildung 3.18 (A) dargestellt.



**Abb. 3.18: Prinzip der CCE. (A) Schematischer Aufbau der Elutriationsapparatur<sup>202</sup>. (B) Unterschiedliche Stadien während des Elutriationsprozesses<sup>203</sup>.**

Während der CCE befinden sich die Zellen in einem Medium (z.B. PBS) und werden mit einer definierten Fließgeschwindigkeit in eine Rotationskammer in Richtung der Rotationsachse gepumpt (Abb. 3.18 (B1)). Die Sedimentation der Zellen in die radiale Richtung wird dabei durch die entgegengerichtete Fließgeschwindigkeit des Mediums

ausbalanciert. Da Zellen als nahezu runde Partikel angesehen werden können und die Sedimentationsgeschwindigkeit von Partikeln (bei ähnlicher Dichte) in einem Medium größtenteils vom Durchmesser abhängt, weisen verschieden große Zellen unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeiten auf. Stehen Zentrifugalkraft und Fließgeschwindigkeit im Gleichgewicht, ordnen sich die Zellen entsprechend ihrer Sedimentationsgeschwindigkeiten in distinkten Zonen der Rotationskammer an (Abb. 3.18 (B2)). Durch Erhöhung der Fließgeschwindigkeit können dann die Zellen aus der Kammer eluiert werden und in einzelnen Fraktionen aufsteigender Größe gesammelt werden (Abb. 3.18 (B3))<sup>202-204</sup>. Bei der Elutriation handelt es sich um ein zellschonendes Verfahren, bei dem die Zellen sich in einem physiologischen Medium befinden, so dass die ursprüngliche Zellviabilität und Funktion erhalten bleiben.

### 3.4.2 Charakterisierung von UC-MSK Subpopulationen

Die Elutriation der Ausgangspopulation (Mischpopulation (MP)) ergab sechs Zellfraktionen mit kontinuierlich ansteigender Zellgröße. Hiervon wurden die erste Zellfraktion (kleine Zellen) und die letzte Zellfraktion (große Zellen) weitergehend charakterisiert und mit der MP verglichen.

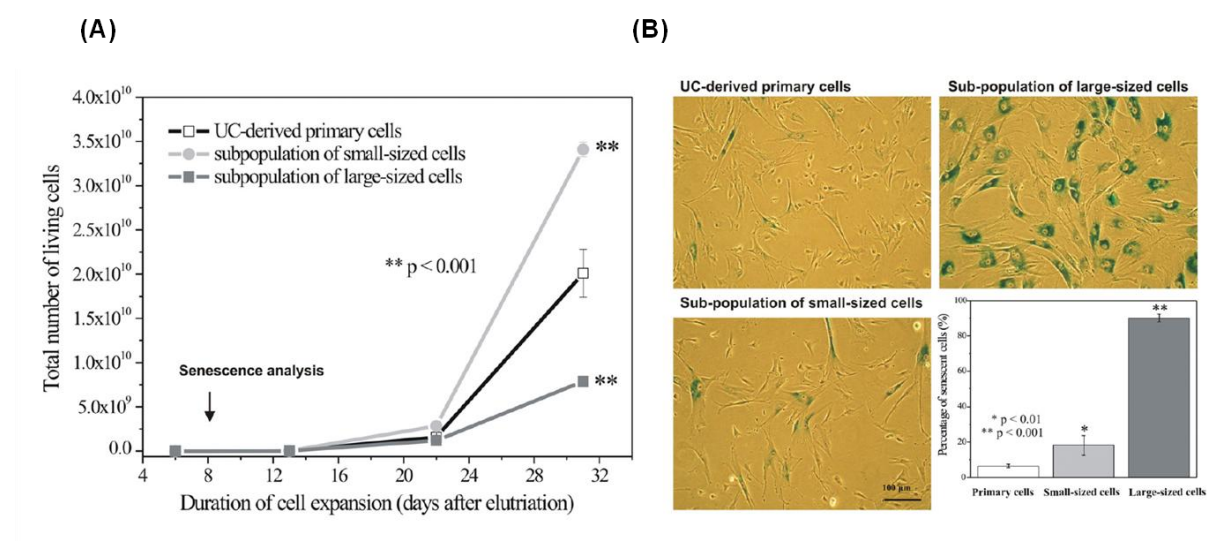


Abb. 3.19: Charakterisierung von UC-MSK Subpopulationen (aus<sup>164</sup>). (A) Proliferatives Potential der Subpopulationen bzw. der Primärkultur. (B) Übersicht des Anteils seneszenten Zellen in den untersuchten Zellfraktionen.

Es zeigte sich, dass die Zellen der ersten Fraktion ein deutlich gesteigertes Proliferationspotential aufwiesen, wohingegen Zellen der letzten Fraktion deutlich weniger proliferierten (siehe Abb. 3.19 (A)). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Kulturen der letzten Fraktion, verglichen mit der MP, einen stark erhöhten Anteil an seneszenten Zellen enthielten, wohingegen Kulturen von Zellen der ersten Fraktion deutlich weniger seneszente Zellen aufwiesen (Abb. 3.19 (B)). Abschließend wurde gezeigt, dass Zellen der letzten Fraktion eine verminderte Expression typischer Oberflächenmarker aufwiesen <sup>100</sup>.

### 3.4.3 Untersuchungen zum Differenzierungspotential von UC-MSC Subpopulationen

Die von Majore *et al.* gezeigten Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass es sich bei den aufgetrennten Zellfraktionen um Subpopulation handelt. Die CCE stellt somit eine Methode dar, mit der hochproliferative UC-MSC Subpopulationen aus Primärkulturen erhalten werden können. Eine tiefere Charakterisierung der Subpopulationen ist jedoch notwendig.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher die UC-MSC Subpopulationen und die primäre Mischpopulation auf ihr Differenzierungspotential hin miteinander verglichen werden.

Da für Aspekte der regenerativen Medizin eine ständige Verfügbarkeit von Zellmaterial von großer Bedeutung ist und dies durch das Anlegen von (Stamm)-Zellbanken erreicht werden kann, wurde untersucht, ob eine Differenzierung von zuvor kryokonservierten Zellen möglich ist. Daher wurden für die Experimente UC-MSCs zunächst isoliert und expandiert, elutriert und anschließend kryokonserviert. Die Experimente zum Differenzierungspotential erfolgten dann mit revitalisierten Zellen. Ein Vergleich des Differenzierungspotentials von „frischen“ nicht kryokonservierten Subpopulationen war Thema der Diplomarbeit von Ramona Winkler <sup>205</sup>.

Wie bereits erwähnt, konnte ein großer Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf den Metabolismus und die Proliferation der UC-MSCs gezeigt werden (siehe Diskussion Abschnitt 3.3.2). Daher sollte im Zuge dieser Arbeit ebenfalls untersucht werden, ob eine reduzierte Sauerstoffkonzentration während der Kultur einen Einfluss auf das Differenzierungspotential der Zellen hat. Neben einer Kultivierung bei konventionellen 21% O<sub>2</sub> (im Inkubator bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>) wurden deshalb alle Experimente auch bei 5% O<sub>2</sub> (bei sonst gleichen Kulturbedingungen) durchgeführt.

Die UC-MSCs wurden mittels des unter 3.1 beschriebenen Protokolls isoliert. Die so erhaltene adhärente Zellkultur wurde anschließend für eine weitere Passage in Vorbereitung auf die CCE in einer „*cellfactory*“ expandiert. Die CCE erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof.

Hass (Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Medizinischen Hochschule Hannover). Es wurden ca.  $4 \times 10^8$  Zellen eingesetzt, woraus sechs Fraktionen ansteigender Zelldurchmesser erhalten wurden. Für die weitergehenden Experimente wurden Zellen der Elutriationsfraktion 1 (E1) sowie Elutriationsfraktion 6 (E6) verwendet. Sowohl die Zellen der Fraktionen E1 und E6, als auch Zellen der ursprünglichen Mischpopulation (MP) wurden anschließend für eine weitere Passage expandiert und abschließend kryokonserviert. Nach dem Revitalisieren der Zellen erfolgte die Kultivierung in 12-Well Platten. Da es in vorangegangenen Differenzierungsversuchen stets zu einem Ablösen des Zellrasens von der Kulturgefäßoberfläche kam, wurden die Wells vor dem Ausplattieren der Zellen mit Fibronectin beschichtet. Die UC-MSCs wurden in einer Dichte von 2000 Zellen/  $\text{cm}^2$  in einem Volumen von 600  $\mu\text{l}$  Kontrollmedium ausplattiert und im Inkubator bei 37°C und 21% bzw. 5%  $\text{O}_2$  bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Anschließend folgte die Umstellung auf das jeweilige Differenzierungsmedium. Es wurden ausschließlich kommerziell erhältliche Medien verwendet. Da diese auf DMEM basieren, wurde als Kontrollmedium ebenfalls DMEM verwendet. Tabelle 6 gibt eine Zusammenfassung der verwendeten Kulturmedien. Ein Mediumwechsel von 600  $\mu\text{l}$ / Well erfolgte alle drei bis vier Tage. Die Kulturüberstände wurden gesammelt und bis zur späteren Analyse bei -20°C gelagert. Die Kultivierung im jeweiligen Differenzierungsmedium erfolgte über einen Zeitraum von 21 Tagen. Für histologische Nachweise einer Differenzierung wurden die Zellen im Anschluss mit Paraformaldehyd fixiert. Da bei biologischem Material spenderbedingte Unterschiede im Differenzierungspotential generell nicht zu vermeiden sind, lassen sich die Ergebnisse mehrerer Experimente nur bedingt miteinander vergleichen. Im Folgenden werden die Ergebnisse eines Experiments vorgestellt.

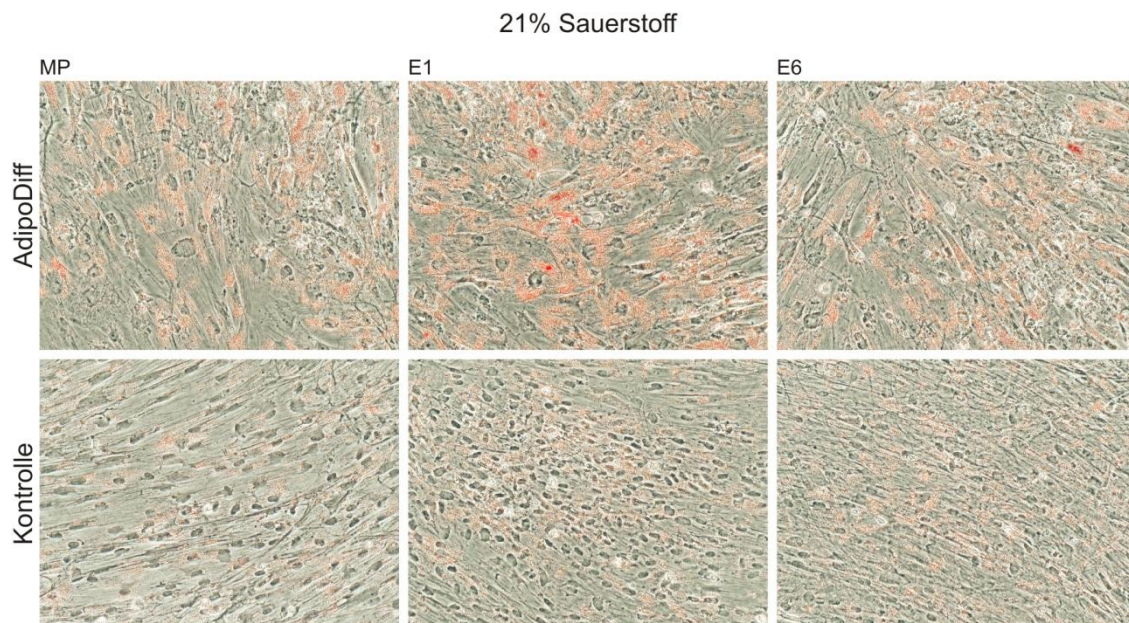
**Tab. 6: Überblick der verwendeten Kultivierungsmedien**

Name des Mediums	Art des Mediums
Expansionsmedium	alphaMEM (+10% HS, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin)
Kontrollmedium	DMEM <i>high glucose</i> (+5% HS, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin)
OsteoDiff	osteogenes Differenzierungsmedium (+50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin)
AdipoDiff	adipogenes Differenzierungsmedium (+50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin)
ChondroDiff	chondrogenes Differenzierungsmedium (+50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin)

### 3.4.3.1 Adipogenes Differenzierungspotential von UC-MSCs

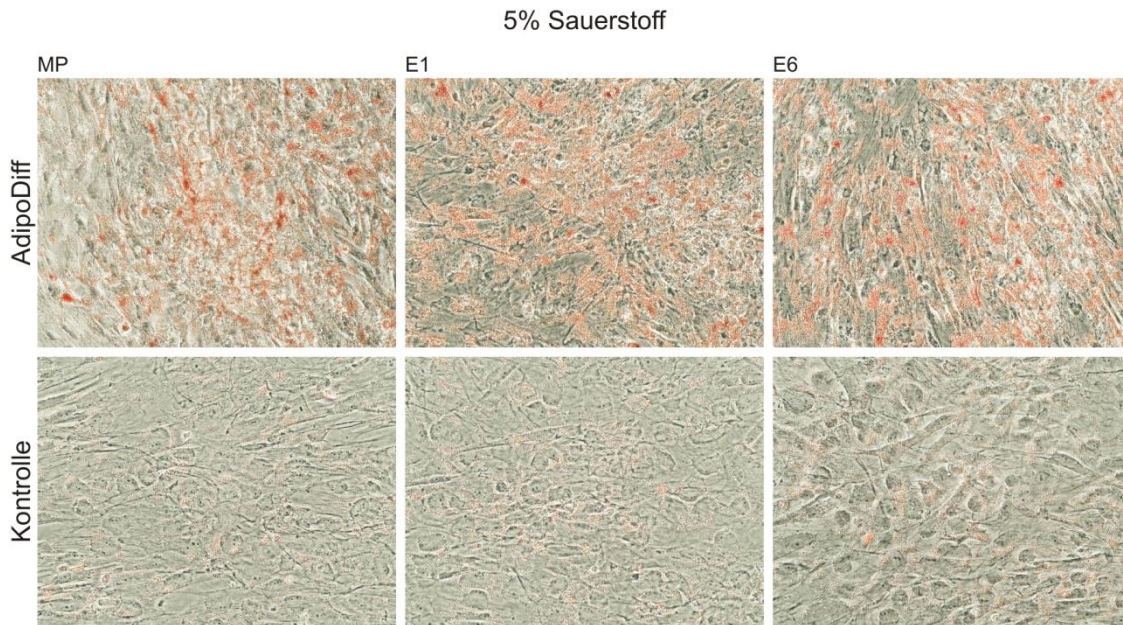
In Laufe der Differenzierung konnte in allen adipogen induzierten Zellkulturen eine Veränderung der Morphologie der Zellen von einer flachen spindelartigen Form hin zu einer ovalen Form beobachtet werden. Begleitet wurde dies durch eine kontinuierliche Anhäufung von kleinen Lipidvesikeln. Diese sind charakteristisch für eine beginnende adipogene Differenzierung der Zellen und können mit dem Farbstoff Oil Red O spezifisch angefärbt werden.

Die Ergebnisse der Differenzierungsexperimente unter dem Einfluss von 21% Sauerstoff nach 21 Tagen Kulturdauer sind in Abbildung 3.20 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass alle untersuchten Zellpopulationen ein adipogenes Differenzierungspotential aufweisen, welches sich anhand der rot gefärbten Lipidvesikel erkennen lässt. Zellen, welche im Kontrollmedium kultiviert wurden, zeigen hingegen nur sehr wenige gefärbte Vesikel. Auch die bei 5% Sauerstoff kultiviert Zellen konnten erfolgreich differenziert werden (siehe Abb. 3.21). Ein erhöhtes Differenzierungspotential von Zellen einer Subpopulation gegenüber Zellen der Mischpopulation lässt sich bei keiner der gegebenen Sauerstoffkonzentration erkennen.

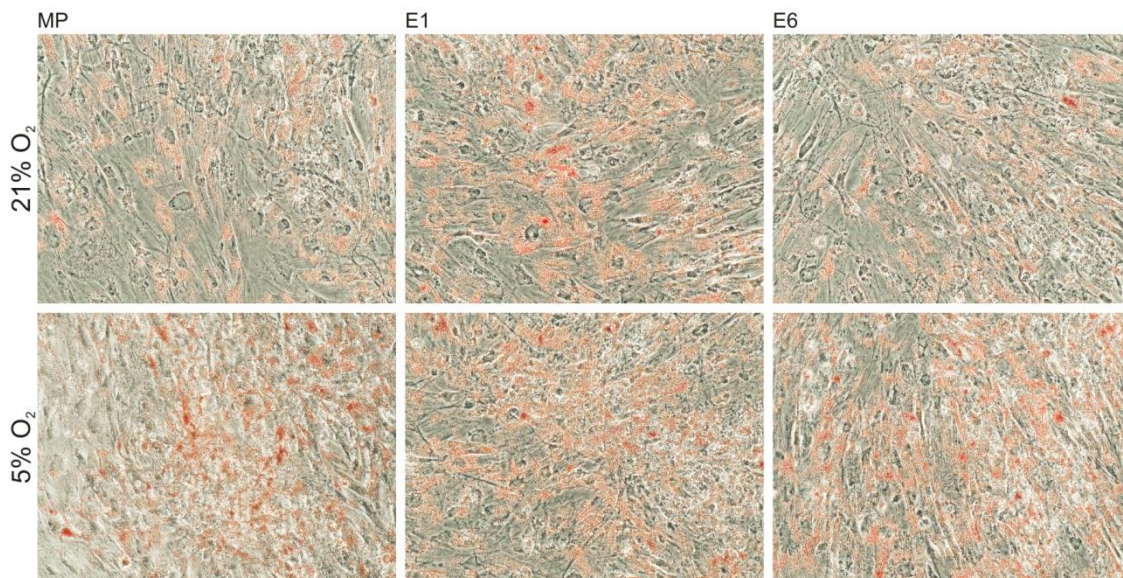


**Abb. 3.20:** Nachweis des adipogenen Differenzierungspotentials der UC-MSC Subpopulationen (E1, E6) und der Mischpopulation (MP) unter dem Einfluss von 21% Sauerstoff. Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen (200x vergrößert) der mit Oil Red O gefärbten UC-MSCs nach 21 Tagen Kultur im Differenzierungsmedium (AdipoDiff) bzw. im Kontrollmedium (Kontrolle). Gezeigt ist jeweils eine repräsentative von vier Aufnahmen jedes Versuchsansatzes.





**Abb. 3.21:** Nachweis des adipogenen Differenzierungspotentials der UC-MSC Subpopulationen (E1, E6) und der Mischpopulation (MP) unter dem Einfluss von 5% Sauerstoff. Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen (200x vergrößert) der mit Oil Red O gefärbten UC-MSCs nach 21 Tagen Kultur im Differenzierungsmedium (AdipoDiff) bzw. im Kontrollmedium (Kontrolle). Gezeigt ist jeweils eine repräsentative von vier Aufnahmen jedes Versuchsansatzes.

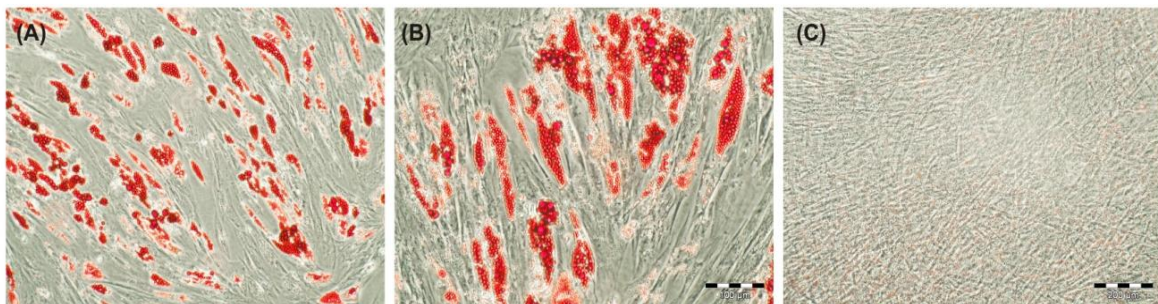


**Abb. 3.22:** Gegenüberstellung des adipogenen Differenzierungspotentials der UC-MSC Subpopulationen, bzw der Mischpopulation unter dem Einfluss von 21% und 5% Sauerstoff. Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen (200x vergrößert) der mittels Oil Red O gefärbten UC-MSCs nach 21 Tagen Kultur im Differenzierungsmedium (AdipoDiff). Gezeigt ist jeweils eine repräsentative von vier Aufnahmen jedes Versuchsansatzes.

In Abbildung 3.22 sind die Ergebnisse der Differenzierungsexperimente bei 21% und 5% gegenüber gestellt. Im direkten Vergleich lassen sich bei UC-MSCs, welche bei 5% Sauerstoff kultiviert wurden, mehr gefärbte Lipidvesikel erkennen. Quantitative Aussagen sind anhand der Aufnahmen jedoch nicht möglich.

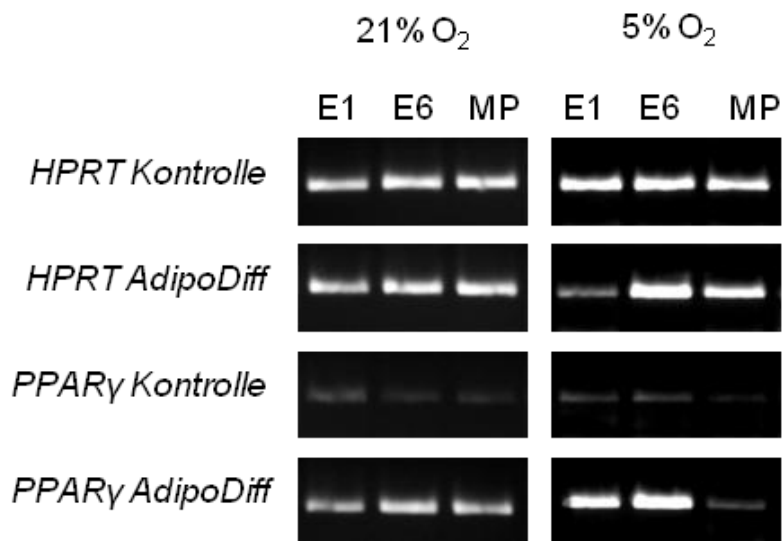
Unter dem Einfluss beider Sauerstoffkonzentrationen lassen sich jedoch nur kleine Vesikel erkennen, die noch nicht zu größeren Lipidvakuolen verschmolzen sind. Dies veranschaulicht auch Abbildung 3.23, welche Aufnahmen von adipogen differenzierten humanen MSCs aus Fettgewebe zeigt, welche ebenfalls für einen Zeitraum von 21 Tagen bei 21% Sauerstoff im AdipoDiff- Medium kultiviert wurden. Hier sind deutlich mehr und größere Lipidvesikel zu erkennen.

Der direkte Vergleich lässt vermuten, dass die UC-MSCs entweder ein generell vermindertes adipogenes Differenzierungspotential aufweisen, oder aber der Differenzierungsprozess zum Zeitpunkt der Analyse noch nicht weit vorangeschritten war.



**Abb. 3.23: Adipogenes Differenzierungspotential von humanen MSCs aus Fettgewebe. Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen ((A)+(B) 200x vergrößert; (C) 100x vergrößert) der mittels Oil Red O gefärbten MSCs nach 21 Tagen Kultur im Differenzierungsmedium (AdipoDiff) (A)+(B), bzw. im Kontrollmedium (C) bei 21% Sauerstoff.**

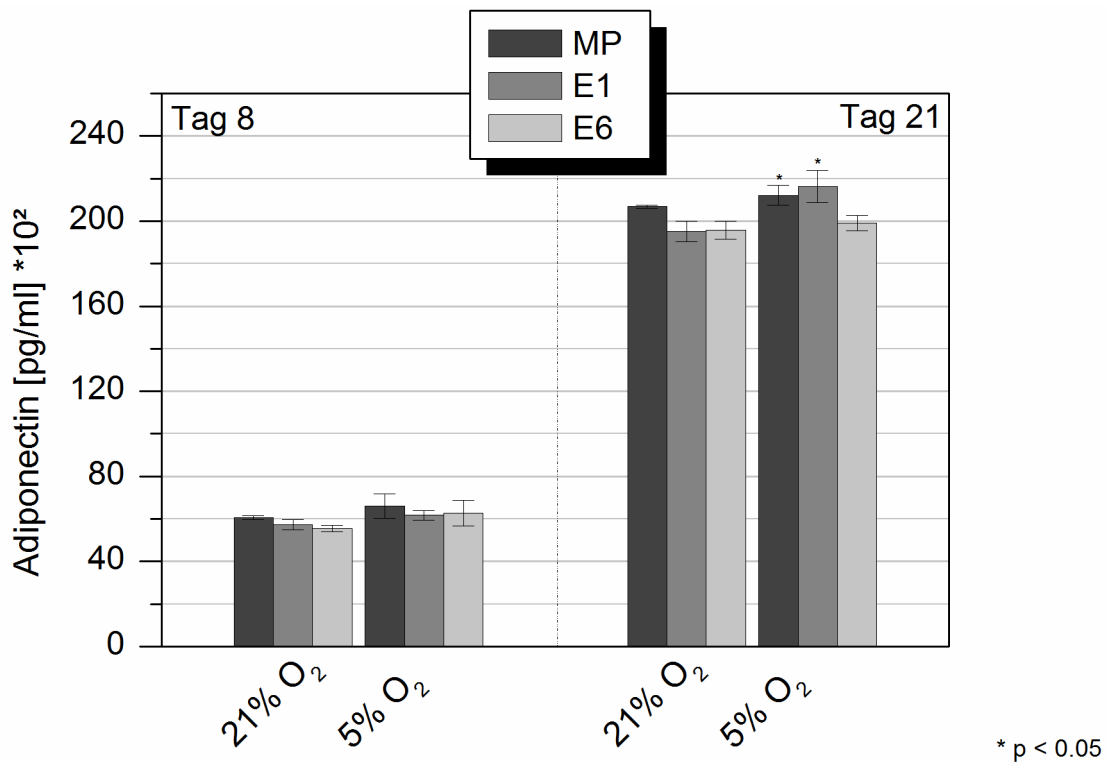
Als weiterer Nachweis der adipogenen Differenzierung wurde die Expression des „*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*“ (PPAR $\gamma$ )- Gens analysiert. PPAR $\gamma$  wird hauptsächlich im Fettgewebe gebildet und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Reifung von Adipozyten sowie im Glucose- und Fettsäuremetabolismus<sup>206, 207</sup>. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.24 dargestellt.



**Abb. 3.24:** Ergebnisse der Expressionsanalyse des PPAR $\gamma$ - Gens mittels RT- PCR in Zellen der Subpopulationen E1 und E6, sowie Zellen der Mischpopulation. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 21 Tagen Kultur im Differenzierungsmedium (AdipoDiff) bzw. im Kontrollmedium (Kontrolle) bei 21% und 5% Sauerstoff. Als *house-keeping* Gen diente das Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) Gen.

Es ist zu erkennen, dass das Gen bei Zellen, welche im Differenzierungsmedium kultiviert wurden, stärker exprimiert wurde, als bei Zellen der Kontrolle. Bei 21% Sauerstoff lassen sich keine Unterschiede erkennen, wohingegen bei 5% die Banden bei den Fraktionen E1 und E6 eine stärkere Intensität aufweisen, als die Bande der Mischpopulation.

Als letzter Nachweis der adipogenen Differenzierung wurde die Expression von Adiponectin, einem Hormon, das von reifen Adipozyten sezerniert wird<sup>208, 209</sup>, mittels „*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*“ (ELISA) im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Analysiert wurden Proben an Tag 8 und Tag 21 der Differenzierung. Der Abstand zwischen dem zuletzt erfolgten Mediumwechsel und der Probennahme betrug jeweils 4 Tage. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.25. dargestellt.



**Abb. 3.25: Quantitativer Nachweis von Adiponectin im Zellkulturüberstand der Fraktionen E1, E6 und MP nach 8 bzw. 21 Tagen Kultur im Differenzierungsmedium unter dem Einfluss von 21% und 5% Sauerstoff.**

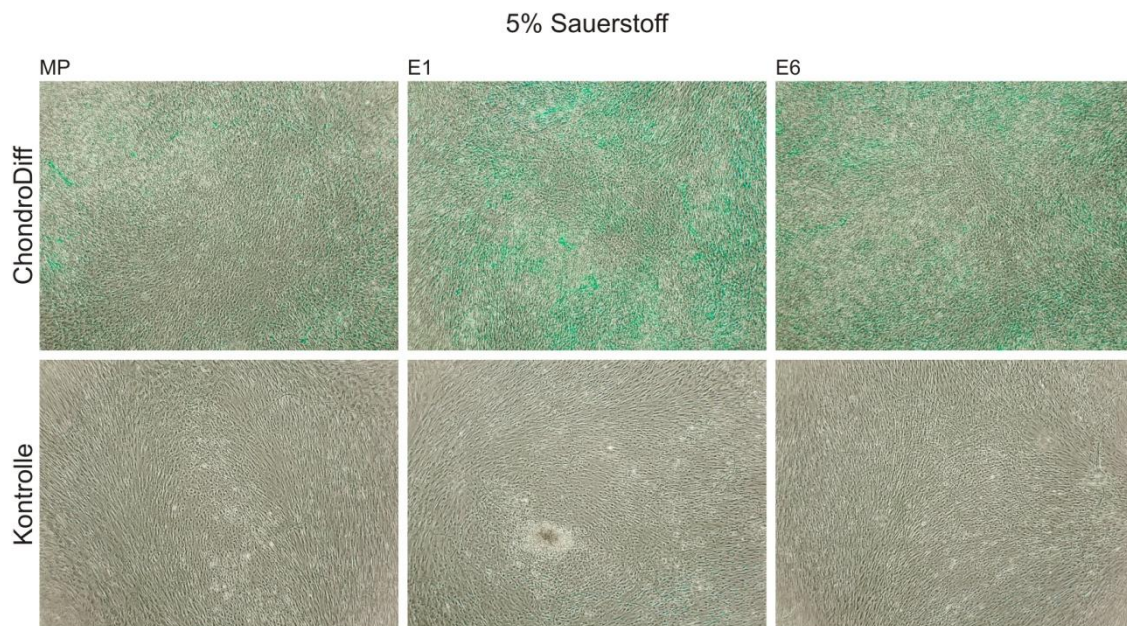
Es ist zu erkennen, dass es im Laufe der Differenzierung zu einem Anstieg der Adiponectin-Konzentration in allen untersuchten Ansätzen kam, was auf eine eingeleitete Differenzierung der UC-MSCs schließen lässt. Auch ist zu erkennen, dass nach 21 Tagen die Adiponectin-Konzentration im Falle der Mischpopulation und der Subpopulation E1 bei einer Kultivierung bei 5% Sauerstoff signifikant höher war, als bei 21% Sauerstoff. Die gezeigten Ergebnisse konnten jedoch nicht auf die jeweilige Zellzahl normiert werden, da es durch ein enzymatisches Ablösen der fragilen differenzierten Zellen zur Lyse kam. Daher kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlich hohen Konzentrationen an Adiponectin nicht nur auf einem fortgeschrittenen Differenzierungsgrad der Zellen beruhen, sondern Folge unterschiedlicher Zellzahlen sein könnten. Andere Arbeiten zeigen aber, dass eine beginnende adipogene Differenzierung von UC-MSCs mit einem Proliferationsstopp der Zellen einhergeht<sup>151, 210</sup>. Daher ist anzunehmen, dass es auch in den vorliegenden Arbeiten zu einer deutlich verminderten Proliferation der Zellen nach Einleitung der Differenzierung gekommen ist. Die Aufnahmen der Abbildung 3.22 unterstützen diese Vermutung, da die gezeigten Fotos keine unterschiedlich dicht gewachsenen Zellrasen zeigen. So ist zu vermuten, dass der starke Anstieg der an Tag 21 gemessenen Adiponectin-

Konzentration in einer fortgeschrittenen adipogenen Differenzierung begründet ist. Die gezeigten Daten korrelieren ebenfalls mit den Beobachtungen von Karahuseyinoglu *et al.*, welche eine stark gesteigerte Expression des Adiponektin- Gens ab Tag 21 der Differenzierung von UC-MSCs auf mRNA- Ebene zeigen konnten<sup>151</sup>. Ein adipogenes Differenzierungspotential für Zellen aus anderen Kompartimenten der Nabelschnur wurde auch von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen<sup>77, 88, 90, 211</sup>. Untersuchungen zum Einfluss von Hypoxie auf das Differenzierungspotential von MSCs sind hingegen selten und teils widersprüchlich<sup>212, 213</sup>.

### **3.4.3.2 Chondrogenes Differenzierungspotential von UC-MSCs**

Der Nachweis der chondrogenen Differenzierung erfolgte mittels Färbung mit Alcianblau, einem Kupferfarbstoff, welcher mit knorpeltypischen Proteoglycanen (z.B. Aggrecan) interagiert und diese türkisfarben anfärbt. Ein häufig auftretendes Problem während der chondrogenen Differenzierung der UC-MSCs bei 21% Sauerstoff war das Ablösen und Zusammenziehen des Zellerasens vom Kulturgefäßboden, was dazu führte, dass eine Analyse der Zellen nicht mehr möglich war. Die Gründe hierfür sind nicht geklärt. Auch eine Beschichtung der Wells mit Kollagen I oder Fibronectin, um eine möglichst Extrazellulärmatrix-ähnliche Oberfläche zu schaffen, zeigte nur bedingt Verbesserungen. Daher konnte nur bei 5% Sauerstoff ein Vergleich des chondrogenen Differenzierungspotentials der Fraktionen durchgeführt werden. Die Ergebnisse nach 21 Tagen Kulturdauer sind in Abbildung 3.26 dargestellt.

Die Fotografien zeigen bei allen untersuchten Zellpopulationen türkisfarbenen Einfärbungen der knorpeltypischen Proteoglycane, was auf ein chondrogenes Differenzierungspotential der UC-MSCs schließen lässt. Zellen, welche im Kontrollmedium kultiviert wurden, zeigen hingegen keine angefärbten Einlagerungen. Die leicht intensivere Färbung im Falle der Subpopulation E1 legt die Vermutung nahe, dass bei Zellen dieser Fraktion ein leicht erhöhtes Differenzierungspotential bei 5% Sauerstoff vorhanden ist. Quantitative Aussagen anhand der Fotografien sind jedoch nicht möglich.



**Abb. 3.26: Vergleich des chondrogenen Differenzierungspotentials der untersuchten Fraktionen unter dem Einfluss von 5% Sauerstoff. Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen (40x vergrößert) der mit Alcianblau gefärbten UC-MSCs nach 21 Tagen Kultur im Differenzierungsmedium (ChondroDiff) bzw. im Kontrollmedium (Kontrolle) bei 5% Sauerstoff.**

Ein chondrogenes Differenzierungspotential der UC-MSCs, auch bei einer Sauerstoffkonzentration von 21%, wurde ebenfalls im Rahmen der Bachelorarbeit von Caroline Jerrentrup<sup>214</sup> und der Diplomarbeit von Anne Neumann<sup>215</sup>, sowie von Majore *et al.*<sup>133</sup> nachgewiesen. Mittels RT-PCR wurde hier zusätzlich die Expression der knorpelspezifischen Gene SOX9, COMP und Kollagen X in chondrogen induzierten UC-MSCs gezeigt. Ein ähnliches Potential wurde ebenfalls für Zellen aus anderen Kompartimenten der Nabelschnur nachgewiesen<sup>77, 83, 90, 211</sup>.

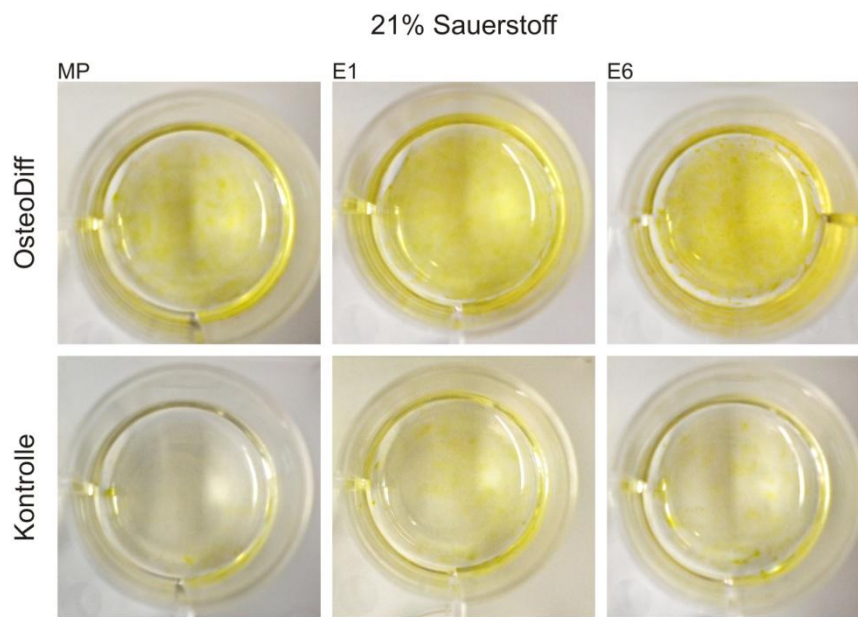
Die hier vorliegenden Ergebnisse lassen keine Aussagen zum Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf das chondrogene Differenzierungspotential der Zellen zu. Andere Arbeitsgruppen konnten in ersten vergleichenden Analysen mit BM-MSCs und MSCs aus dem Fettgewebe zeigen, dass eine Differenzierung der Zellen unter hypoxischen Bedingungen zu einer gesteigerten Chondrogenese führte<sup>216-218</sup>.

### 3.4.3.3 Osteogenes Differenzierungspotential von UC-MSCs

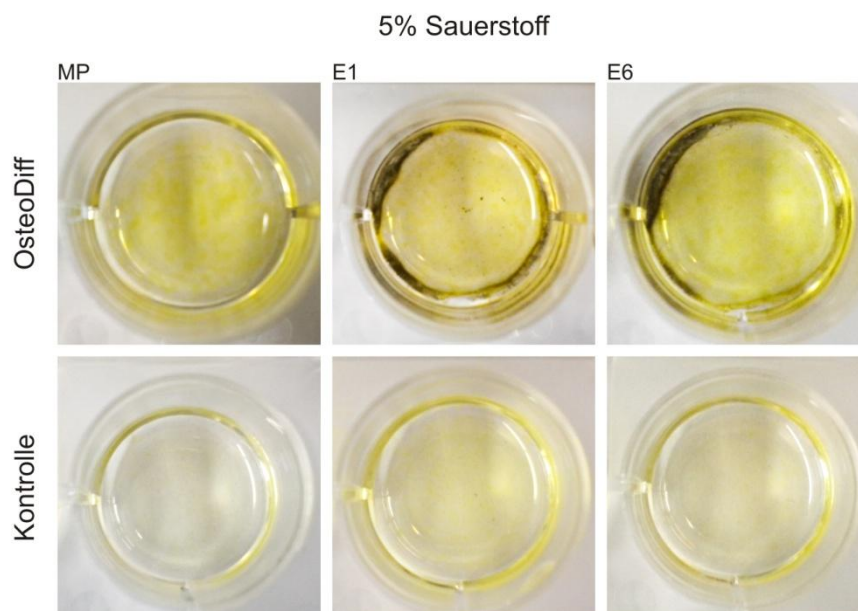
In den vorangegangenen Arbeiten von Dr. Pierre Moretti und Dr. Ingrida Majore konnte kein eindeutiges Potential der UC-MSCs zur osteogenen Differenzierung nachgewiesen werden<sup>133, 164</sup>. Zwar konnten osteospezifische Marker, wie die Expression des „*Runt-related Transcription Factor 2*“ (RUNX2)- Gens mittels RT-PCR nachgewiesen werden, jedoch wurde eine voranschreitende Mineralisierung der extrazellulären Matrix, welches als verlässlicher Nachweis einer beginnenden Bildung von Knochengewebe gilt, unter den gewählten Kulturbedingungen nicht beobachtet. Selbst die Zugabe von BMP- 2/ 7 und 1,25-Dihydroxyvitamin D3 zum Medium, beides potente osteoinduktive Substanzen, konnte keine vollständige osteogene Differenzierung der Zellen induzieren. Um die Differenzierungsbedingungen daher weiter zu variieren und zu optimieren, sollte durch eine Verringerung der Sauerstoffkonzentration während der Kultivierung der Zellen eine Umgebung geschaffen werden, welche der *in vivo* Umgebung im Knochen ähnelt und einer osteogenen Differenzierung der Zellen förderlich sein könnte.

Eine mit der Differenzierung von MSCs einhergehende Einlagerung von Calcium in die extrazelluläre Matrix lässt sich unter anderem mittels der von Kossa (Silber) und der Alizarinrot Färbung nachweisen. Die Ergebnisse der nach 21 Tagen Kulturdauer bei 21% Sauerstoff mittels von Kossa gefärbten Zellen sind in Abbildung 3.27 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass alle untersuchten Zellpopulationen eine nur schwache Mineralisierung aufweisen. Dennoch lässt die, im Vergleich zur Kontrolle, intensivere gelbe Färbung auf eine begonnene Mineralisierung schließen. Für die untersuchten Zellfraktionen lassen sich jedoch keine Unterschiede erkennen.

Bei 5% O<sub>2</sub> weisen die Subpopulationen E1 und E6 etwas mehr Calciumeinlagerungen auf, was sich anhand der schwarzen Verfärbung in den Randbereichen erkennen lässt (siehe Abb. 3.28). Dies könnte auf ein erhöhtes Differenzierungspotential der Subpopulation im Vergleich zur Mischpopulation hindeuten, aber auch im Vergleich zu Zellen derselben Fraktionen, welche bei 21% Sauerstoff kultiviert wurden. Abbildung 3.29 veranschaulicht dies in einem direkten Vergleich.

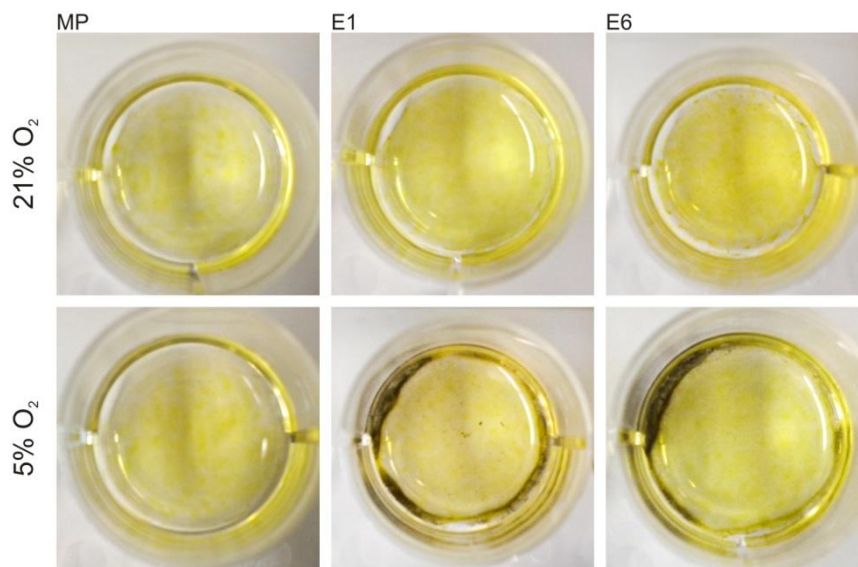


**Abb. 3.27:** Nachweis des osteogenen Differenzierungspotentials der UC-MSC Subpopulationen (E1, E6) und der Mischpopulation (MP) unter dem Einfluss von 21% Sauerstoff. Dargestellt sind Aufnahmen der mittels von Kossa gefärbten UC-MSCs nach 21 Tagen Kultur im Differenzierungsmedium (OsteoDiff) bzw. im Kontrollmedium (Kontrolle).



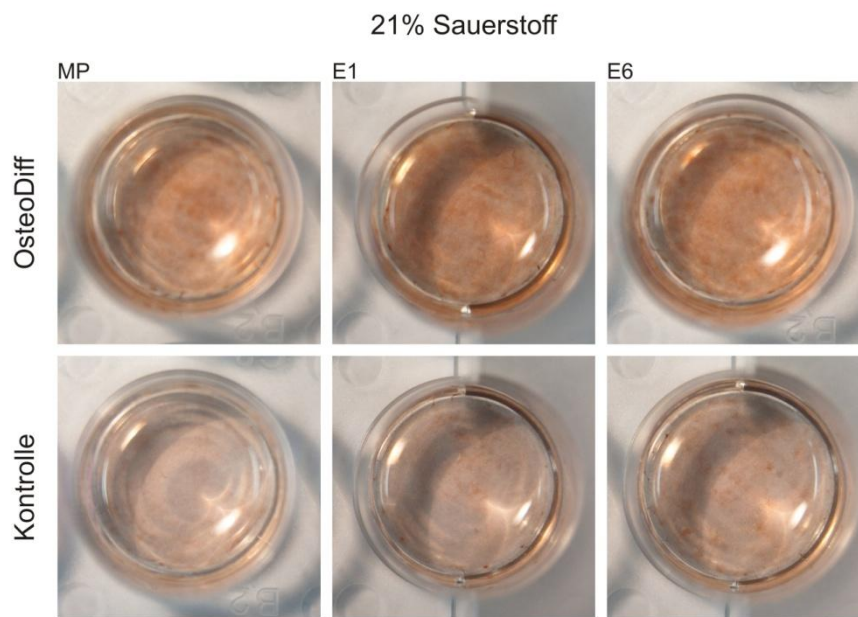
**Abb. 3.28:** Nachweis des osteogenen Differenzierungspotentials der UC-MSC Subpopulationen (E1, E6) und der Mischpopulation (MP) unter dem Einfluss von 5% Sauerstoff. Dargestellt sind Aufnahmen der mittels von Kossa gefärbten UC-MSCs nach 21 Tagen Kultur im Differenzierungsmedium (OsteoDiff) bzw. im Kontrollmedium (Kontrolle).



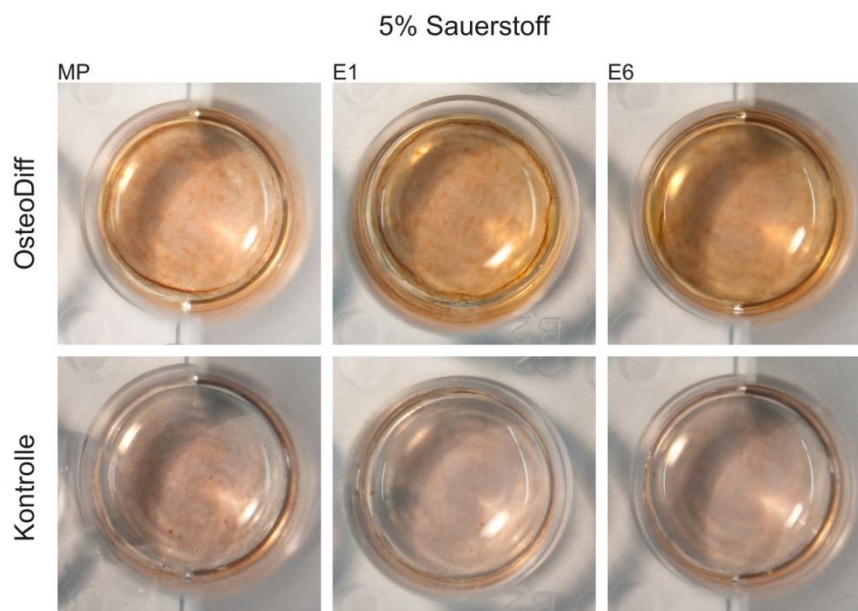


**Abb. 3.29: Gegenüberstellung des osteogenen Differenzierungspotentials der UC-MSC Subpopulationen, bzw der Mischpopulation unter dem Einfluss von 21% und 5% Sauerstoff. Dargestellt sind Aufnahmen der mittels von Kossa gefärbten UC-MSCs nach 21 Tagen Kultur im Differenzierungsmedium (OsteoDiff).**

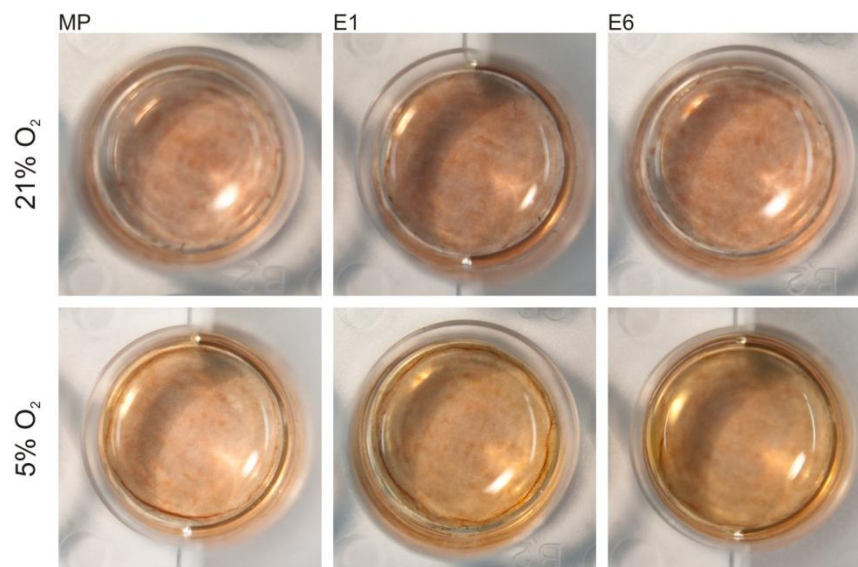
Die Ergebnisse der mittels Alizarinrot gefärbten Zellen sind in Abbildung 3.20 und 3.31 dargestellt. Auch hier zeigt sich anhand der roten Färbung, dass alle untersuchten Zellpopulationen eine beginnende Einlagerung von Calcium aufweisen, jedoch ist die Intensität der Färbung auch hier nur schwach. Zellen der Kontrollansätze sind dennoch deutlich schwächer gefärbt. Zellen, die bei 5% Sauerstoff differenziert wurden, zeigen eine minimal intensivere Färbung, was tendenziell den Ergebnissen der von Kossa Färbung entspricht. Allerdings sind hier die Unterschiede vor allem im Falle der Fraktionen E1 und E6 deutlich geringer. Abbildung 3.32 verdeutlicht dies.



**Abb. 3.30:** Nachweis des osteogenen Differenzierungspotentials der UC-MSC Subpopulationen (E1, E6) und der Mischpopulation (MP) unter dem Einfluss von 21% Sauerstoff. Dargestellt sind Aufnahmen der mittels Alizarinrot gefärbten UC-MSCs nach 21 Tagen Kultur im Differenzierungsmedium (OsteoDiff) bzw. im Kontrollmedium (Kontrolle).



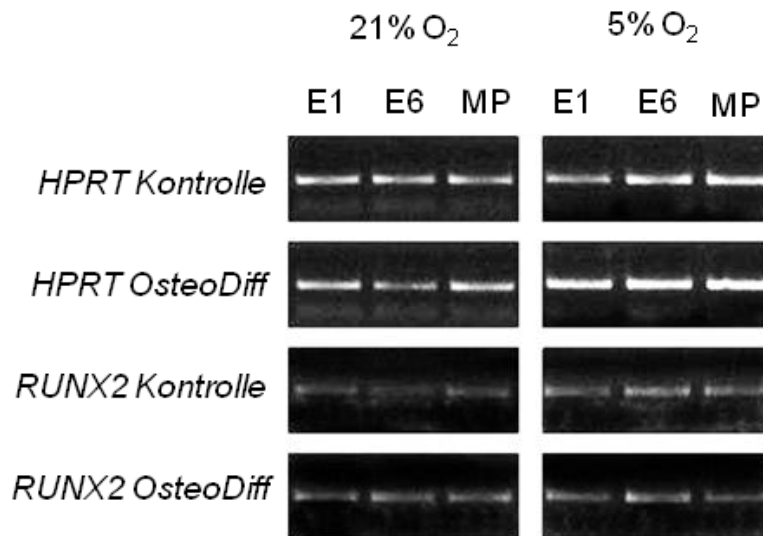
**Abb. 3.31:** Nachweis des osteogenen Differenzierungspotentials der UC-MSC Subpopulationen (E1, E6) und der Mischpopulation (MP) unter dem Einfluss von 5% Sauerstoff. Dargestellt sind Aufnahmen der mittels Alizarinrot gefärbten UC-MSCs nach 21 Tagen Kultur im Differenzierungsmedium (OsteoDiff) bzw. im Kontrollmedium (Kontrolle).



**Abb. 3.32: Gegenüberstellung des osteogenen Differenzierungspotentials der UC-MSC Subpopulationen, bzw der Mischpopulation unter dem Einfluss von 21% und 5% Sauerstoff. Dargestellt sind Aufnahmen der mittels Alizarinrot gefärbten UC-MSCs nach 21 Tagen Kultur im Differenzierungsmedium (OsteoDiff).**

Als weiterer Nachweis der osteogenen Differenzierung erfolgte die Expressionsanalyse des RUNX2- Gens mittels RT-PCR. RUNX2 (auch CBFA1 genannt) ist ein zentraler Transkriptionsfaktor während der osteogenen Differenzierung und kann als Marker einer Differenzierung der Zellen herangezogen werden<sup>219-221</sup>.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.33 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei beiden untersuchten O<sub>2</sub>-Konzentrationen bei Zellen, welche im Differenzierungsmedium kultiviert wurden, eine nur schwache Expression von RUNX2 auftrat. Die Intensität der Banden lässt sich nicht von der der Zellen im Kontrollmedium unterscheiden, so dass anhand der Expressionsdaten des Gens nicht auf eine osteogene Differenzierung geschlossen werden kann.



**Abb. 3.33:** Ergebnisse der Expressionsanalyse des RUNX2-Gens mittels RT-PCR in Zellen der Subpopulationen E1 und E6, sowie Zellen der Mischpopulation. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 21 Tagen Kultur im Differenzierungsmedium (OsteoDiff) bzw. im Kontrollmedium (Kontrolle) bei 21% und 5% Sauerstoff. Als *house-keeping* Gen diente das Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) Gen.

Die hier gezeigten Ergebnisse lassen keine eindeutigen Aussagen zum osteogenen Differenzierungspotential der UC-MSCs zu. Auch Aussagen zu möglichen Unterschieden zwischen den Subpopulationen sind nur bedingt möglich. Zwar könnte die Kulturdauer im Differenzierungsmedium zu kurz und die Differenzierung der Zellen zum Zeitpunkt der Analytik noch nicht abgeschlossen gewesen sein, jedoch kann ein generell nur geringes Potential zur osteogenen Differenzierung der UC-MSCs, wie bereits zuvor vermutet, unter den gewählten Kulturbedingungen weiterhin nicht ausgeschlossen werden.

Die Aussagen anderer Gruppen zum osteogenen Differenzierungspotential von MSCs aus Nabelschnur sind teils kontrovers. So berichten viele Arbeitsgruppen von einem Potential, welches dem von BM-MSCs gleich ist<sup>77, 83, 114, 145, 222</sup>. Andere Gruppen konnten hingegen nur ein stark vermindertes osteogenes Potential erkennen<sup>122, 147, 223</sup>. Mögliche Ursache der Diskrepanzen könnte in den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen der jeweiligen Labore und die hiermit verbundenen epigenetischen Veränderungen der Zellen liegen. Kulturbedingte Veränderungen von Zellen wurden schon für BM-MSCs und MSCs aus dem Fettgewebe beschrieben<sup>20, 224-226</sup>. Möglich ist aber auch, dass das Differenzierungspotential der Zellen von ihrer jeweiligen Position innerhalb der Nabelschnur abhängt. So konnten Baksh *et al.* zeigen, dass Zellen aus der perivaskulären Region der Nabelschnur ein sehr hohes Differenzierungspotential ausweisen, welches sogar das von BM-MSCs übersteigt<sup>90</sup>,

wohingegen Suzdal'tseva *et al.*, Girdlstone *et al.*, sowie Ishige *et al.* nur ein sehr geringes osteogenes Potential für Zellen aus dem vaskulären Gewebe und dem Wharton's Jelly nachweisen konnten<sup>147, 223, 227</sup>. Hinzu kommt, dass die Zellen je nach Position innerhalb der Schnur einen unterschiedlichen Alterungsgrad aufzuweisen scheinen, wobei noch primitive und hochproliferative Zellen im intervaskulären Raum und Zellen, welche in der Differenzierung bereits fortgeschrittene bzw. festgelegt sind, in unmittelbarer Nähe der Blutgefäße zu finden sind<sup>151, 228</sup>.

Durch die hier gewählte Methodik zur Isolation werden nicht gezielt Zellen einer bestimmten Region isoliert, so dass es als möglich erscheint, dass Kulturen zum Zeitpunkt der osteogenen Induktion nur wenige reifere Zellen enthalten und der eingesetzte Stimulus unter konventionellen Kulturbedingungen nicht ausreicht, um eine osteogene Differenzierung der primitiven Zellen zu induzieren.

Auch eine Reduktion der Sauerstoffkonzentration während der Differenzierung als weiterer Stimulus reicht nicht aus. Arbeiten anderer Gruppen zeigen sogar, dass Hypoxie das Potential zur osteogenen Differenzierung vermindert. So beschreiben D'Ippolito *et al.*, dass humane adulte und multipotente Zellen aus dem Knochenmark unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen (3% O<sub>2</sub>) zu einer deutlich verringerten bzw. fehlenden Expression typischer osteogener Marker, wie Osteocalcin, Bone Sialoprotein und RUNX2, sowie eine deutlich verringerte Aktivität der alkalischen Phosphatase neigten. Eine Mineralisierung in Langzeitkulturen konnte ebenfalls nicht beobachtet werden<sup>229</sup>. Gleiches konnten Malladi *et al.* für MSCs aus dem Fettgewebe zeigen<sup>230</sup>. Hinzu kommt, dass für BM-MSCs unter hypoxischen Bedingungen eine gesteigerte Expression embryonaler Stammzellmarker, wie OCT 4, beobachtet wurde, was auf einen Erhalt der primitiven Eigenschaften der Zellen schließen lässt<sup>231-233</sup>. Dennoch zeigten Lennon *et al.* im Gegensatz hierzu für hypoxisch kultivierte (5% O<sub>2</sub>) primäre MSCs aus dem Knochenmark der Ratte, dass diese bei einer gezielten Differenzierung erhöhte typische osteogene Marker, wie alkalische Phosphatase Aktivität und Calciumgehalt in der extrazellulären Matrix, aufwiesen<sup>234</sup>.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass UC-MSCs auch nach dem Kryokonservieren ein adipogenes und chondrogenes Differenzierungspotential aufweisen. Dabei scheint eine Reduktion der Sauerstoffkonzentration eine gesteigerte Differenzierung der Zellen zu bewirken, wobei die hier gezeigten Unterschiede nur gering sind. Die teils widersprüchlichen Ergebnisse anderer Gruppen lassen darauf schließen, dass der Grat zwischen dem Finden der optimalen Sauerstoffkonzentration zur Stimulation der Differenzierung und dem Erhalt der primitiven Eigenschaften der Zellen sehr schmal ist und für jede Zellart und Differenzierungsrichtung individuell angepasst werden muss.

Mit Blick auf Unterschiede im Differenzierungspotential der mittels CCE erhaltenen Subpopulationen konnten keine eindeutigen Unterschiede gefunden werden. Auch ein erster Vergleich von frischen, nicht kryokonservierten Subpopulationen zeigte keine eindeutigen Unterschiede, bestätigte aber nochmals das allgemeine Differenzierungspotential der UC-MSCs.

Unter den gewählten Kultivierungsbedingungen konnte eine fortgeschrittene osteogene Differenzierung der Zellen nicht erreicht werden. Vielversprechende Ergebnisse von Versuchen zur dreidimensionalen Kultivierung von UC-MSCs auf Trägermaterialien zeigen aber, dass sowohl in einer statischen als auch in einer dynamischen Kultur im Bioreaktor ein deutlich gesteigertes osteogenes Differenzierungspotential der Zellen nachweisbar ist. Die Arbeiten hierzu sind Thema der laufenden Dissertation von Sonja Kress<sup>235</sup>. Daher scheint es sinnvoll, auch mit Blick auf *Tissue Engineering* Anwendungen, auf eine konventionelle 2D-Kultivierung zu verzichten und diese durch eine Expansion und Differenzierung der Zellen in Bioreaktoren zu ersetzen.

### **3.5 Untersuchungen zum Immunprivileg und zu immunmodulatorischen Eigenschaften von UC-MSCs**

Neben einem multilinearen Differenzierungspotential weisen MSCs auch ein nur geringes immunogenes Potential und immunmodulatorische Eigenschaften auf. So konnte für BM-MSCs gezeigt werden, dass diese weder *in vitro* die Proliferation von allogenen Lymphozyten stimulieren, noch *in vivo* eine Immunantwort auslösen, wenn sie in allogenen Tiermodellen eingesetzt werden<sup>236-238</sup>. Des Weiteren wurde für BM-MSCs gezeigt, dass diese auch auf eine Vielzahl anderer Zellen des Immunsystems einen immunmodulatorischen Einfluss ausüben. Dazu gehören unter anderem T- und B-Zellen, Dendritische Zellen (DZ) und Natürliche Killer (NK)-Zellen<sup>13, 14, 239-243</sup>. BM-MSCs können zudem zu einem verlängerten Überleben von Hauttransplantaten beitragen<sup>244</sup> und wurden in ersten klinischen Studien zur Abschwächung von Transplantat-Wirt-Reaktion (*Graft-versus-Host-Disease* (GvHD)) eingesetzt<sup>245, 246</sup>. GvHD-Reaktionen treten häufig bei Knochenmarktransplantationen auf und sind bedingt durch im Transplantat enthaltene spendereigene Immunzellen (vornehmlich T-Lymphozyten), welche gegen den Empfängerorganismus agieren.

Aktuell werden mit steigendem Interesse auch MSCs aus der Nabelschnur auf immunmodulatorische Eigenschaften hin untersucht. Dabei konnte in unterschiedlichen Ansätzen gezeigt werden, dass auch die Nabelschnur als Quelle für Zellen mit immunmodulatorischen Eigenschaften dienen kann<sup>129, 155, 156, 158, 247</sup>.

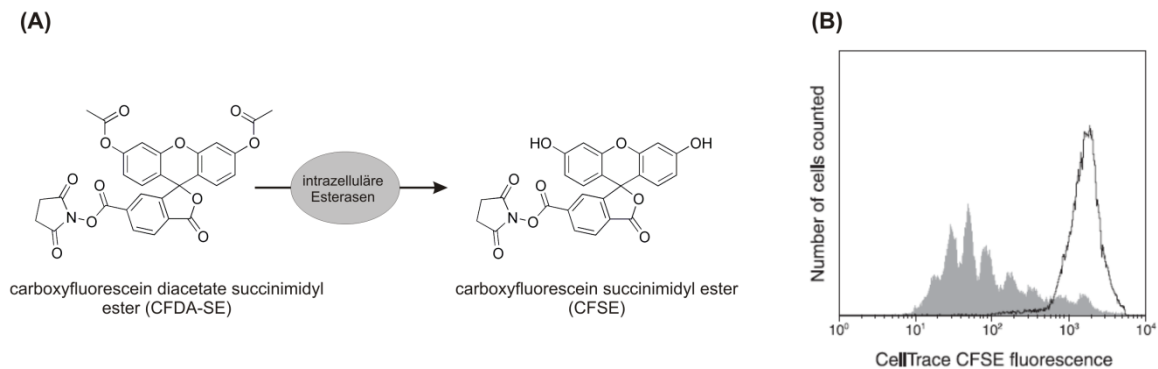
In der vorliegenden Arbeit sollten die isolierten UC-MSC Mischpopulationen unter dem Aspekt der xeno-freien Kultur auf diese Eigenschaften hin weitergehend charakterisiert werden. Hierfür wurde in Ko-Kulturversuchen untersucht, ob einerseits eine Stimulation der Proliferation von allogenen ruhenden peripheren mononukleären Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cell* (PBMC)) durch UC-MSCs ausbleibt und andererseits die Proliferation von zuvor stimulierten PBMCs inhibiert wird.

Der Begriff PBMC umfasst einkernige Blutzellen, die einen runden Nucleus enthalten. Hierzu zählen Lymphozyten (T- Zellen (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>), B- Zellen und NK- Zellen), Monozyten und Makrophagen<sup>248</sup>. Auf Grund der Vielzahl von unterschiedlichen Immunzellen, stellen PBMCs eine ideale Zellpopulation zur Modellierung von immunologischen Vorgängen dar.

Eine Proliferation der PBMCs in den Ko- Kulturversuchen wurde mittels des Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)- Assays analysiert.

### 3.5.1 Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester Assay

Die Proliferation von Zellen lässt sich mittels des CFSE- Assays nachverfolgen. Dabei diffundiert Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFDA-SE) passiv in das Zytoplasma der Zellen. Intrazelluläre Esterasen spalten dort die Acetatgruppen ab und es entsteht der fluoreszierende Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) (siehe Abbildung 3.34 (A)). Über die Succinimidyl- Gruppe bindet CFSE kovalent an intrazelluläre Moleküle, verbleibt somit stabil im Zytoplasma der Zelle und wird nicht auf benachbarte Zellen übertragen<sup>249</sup>. Bei der Zellteilung wird der Farbstoff zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen vererbt. Da dabei die Intensität des Farbstoffs pro Zelle abnimmt und die Zellzahl insgesamt zunimmt, ergibt sich bei durchflusszytometrischen Analysen der Zellpopulation ein für die Proliferation charakteristisches Histogramm (Abbildung 3.34 (B)). Die Proliferation von Zellen lässt sich so für bis zu acht sukzessive Zellteilungen nachverfolgen, bevor die Konzentration des Farbstoffes im Zytoplasma nicht mehr von der Autofluoreszenz der Zellen zu unterscheiden ist. In nicht-proliferierenden Zellen bleibt der Farbstoff auch für mehrere Wochen stabil<sup>250</sup>.

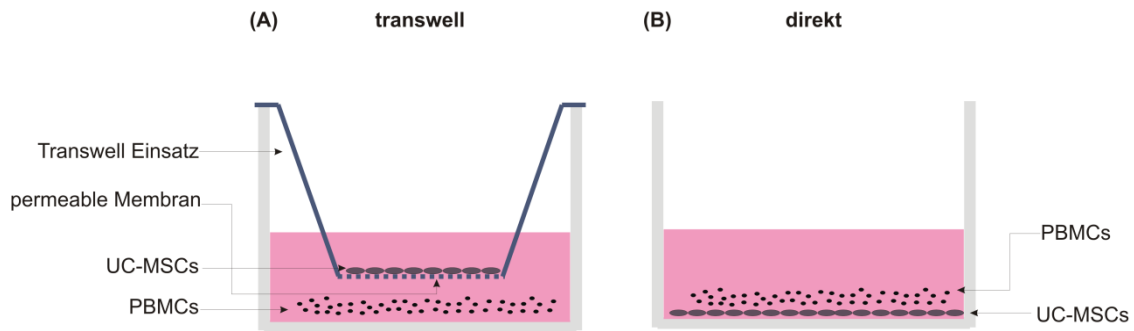


**Abb. 3.34: Prinzip des CFSE-Assays. (A) Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFDA-SE) diffundiert passiv in das Zytoplasma der Zellen. Dort werden die Acetatgruppen von intrazellulären Esterasen abgespalten und es entsteht der fluoreszierende Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE). (B) Nachweis der Proliferation von CFSE gefärbten PBMCs mittels Durchflusszytometrie<sup>250</sup>. Die Zellen wurden mit Phytohämagglutinin (PHA) zur Proliferation stimuliert (grau), ein Teil der Zellen wurde mittels Mitomycin C arretiert (schwarz).**

### 3.5.2 Ko- Kultivierungen von UC-MSCs und allogenen Immunzellen

Werden allogene Zellen transplantiert, so werden sie in der Regel vom Immunsystem des Empfängers als fremd erkannt und attackiert. Die Immunreaktion geht dabei mit einer starken Proliferation von T- Zellen einher. Das Aufeinandertreffen von Immunzellen und allogenen Zellen lässt sich *in vitro* in Ko-Kulturexperimenten simulieren. In den vorliegenden Arbeiten sollte so untersucht werden, ob die UC-MSCs immunologisch privilegiert sind und eine Stimulation der Proliferation von PBMCs ausbleibt. Durch eine Ko- Kultur mit zuvor zur Proliferation stimulierten PBMCs sollte untersucht werden, ob die UC-MSCs immunmodulatorische Eigenschaften aufweisen und die Proliferation der PBMCs inhibieren. Der allgemeine Versuchsaufbau ist in Abbildung 3.35 dargestellt. In allen Versuchen wurden zuvor frisch isolierte und mit CFSE-markierte PBMCs eingesetzt. Da die Stimulation der Proliferation sowie deren Modulation prinzipiell über lösliche Mediatoren, als auch durch einen direkten Zell- Zell Kontakt vermittelt werden können, wurden beide Möglichkeiten simuliert. Um eine mediatorvermittelte Reaktion zu überprüfen, wurden Transwell Einsätze für die Kultur verwendet (siehe Abb. 3.35 (A)). Über eine permeable Membran wurden die Zellen räumlich voneinander getrennt, wobei ein Stoffaustausch gewährleistet blieb.





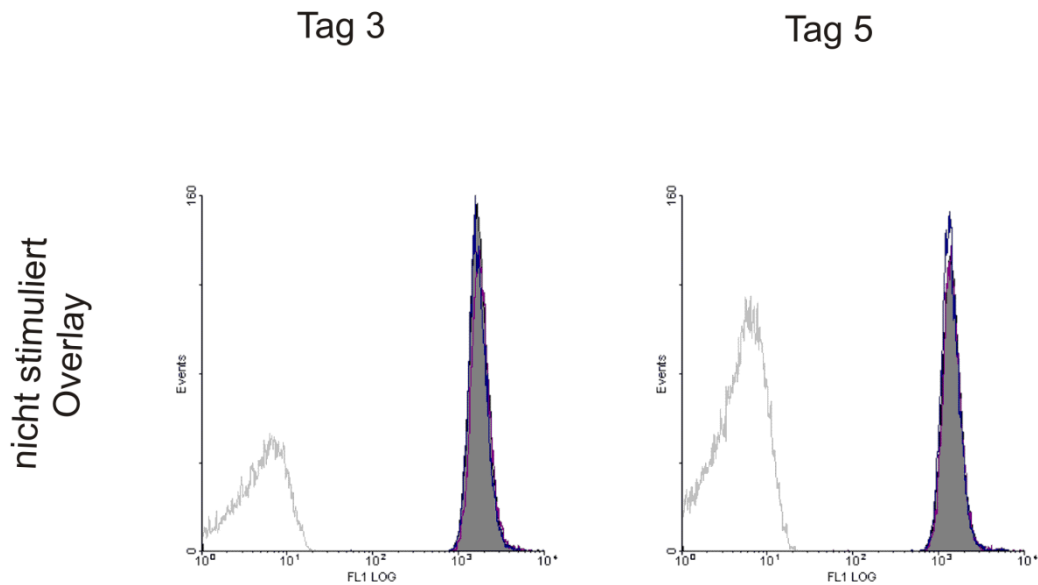
**Abb. 3.35: Schematische Darstellung der Ko-Kultursysteme. Die Zellpopulationen werden entweder mittels eines Transwell Einsatzes durch eine permeable Membran voneinander getrennt (A) oder mit direktem Zell-Zell Kontakt kultiviert (B).**

Für eine Kultur mit direktem Zell- Zell Kontakt wurden zunächst die UC-MSCs ausplattiert. Nachdem diese an die Kulturgefäßoberfläche adhärirt waren, wurden die PBMCs hinzugegeben (Abb. 3.35 (B)). In allen Versuchen wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:10 (UC-MSCs : PBMCs) kultiviert.

Für die Untersuchung des Einfluss der UC-MSCs auf die Proliferation der PBMCs, wurden diese einen Tag vor Start der Ko- Kultur mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert. In allen Versuchsansätzen wurden an Tag drei und fünf der Ko- Kultur die PBMCs geerntet und am Durchflusszytometer analysiert. Die im Folgenden gezeigten Daten sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments und spiegeln die Ergebnisse aller Experimente (n=3) wieder.

### 3.5.2.1 Untersuchungen zum Immunprivileg von UC-MSCs

Die Ergebnisse zur Untersuchung eines möglichen immunogenen Potentials von UC-MSCs *in vitro* sind in Abbildung 3.36 gezeigt. Dargestellt ist ein overlay der aufgenommenen Histogramme an Tag 3 und Tag 5 der Ko- Kulturen. Ruhende und mit CFSE gefärbte PBMCs, die nicht aus einer Ko-Kultur stammten, dienten jeweils als Kontrolle (dunkelgrau gefüllt). Es ist zu erkennen, dass weder ein direkter Zell-Zell Kontakt mit UC-MSCs (blaue Linie), noch eine räumliche Trennung der Zellpopulationen durch Transwell Einsätze (lilafarbene Linie) eine Proliferation von ruhenden allogenen PBMCs auslöste.



**Abb. 3.36:** Ergebnisse der Ko- Kulturrexperimente von UC-MSCs mit nicht-stimulierten PBMCs. Dargestellt sind die Histogramme der Proliferationsanalysen CFSE- gefärbter PBMCs aus Ko-Kulturen mit UC-MSCs mit direktem Zell-Zell Kontakt (blau) und durch Transwell Einsätze getrennt (lila) an Tag 3 und 5 der Kultur. Ruhende mit CFSE gefärbte PBMCs, die nicht aus einer Ko- Kultur stammten, dienten als Kontrolle (dunkelgrau gefüllt). Ungefärbte PBMCs dienten zur Überprüfung der CFSE- Färbung (hellgrau).

Ähnliche Ergebnisse wurden von anderen Arbeitsgruppen sowohl für MSCs aus der Nabelschnur<sup>129, 155</sup>, als auch aus dem Knochenmark<sup>240, 251, 252</sup> und anderen Geweben (wie z.B. Fettgewebe<sup>253</sup>, Zahnpulpa<sup>254</sup> und dem Amnion<sup>37</sup>) gezeigt. Dabei sind die genauen Mechanismen, durch welche das Immunprivileg der MSCs bedingt ist, noch nicht vollständig aufgedeckt, es wird aber davon ausgegangen, dass der Status auf dem Zusammenspiel einer Vielzahl von Faktoren beruht.

Transplantierte Zellen werden in der Regel auf Grund ihrer spezifischen Oberflächenmoleküle, dem Haupthistokompatibilitätskomplex (*Major Histocompatibility Complex* (MHC)), durch alloreaktive T-Zellen erkannt, was eine Immunreaktion zur Folge hat. MHC- Moleküle sind polymorphe Glycoproteine und werden grundsätzlich in zwei Klassen, die MHC- Klasse- I und MHC- Klasse- II Komplexe unterteilt. Im Falle des Menschen werden diese entsprechend der Produkte des Humanen Leukozyten Antigens (HLA) weiter unterteilt. So gehören die Antigene HLA- A, - B und - C zu Molekülen der MHC- Klasse- I und die Antigene HLA- DL, - DQ und - DR zu den Molekülen der MHC- Klasse- 2<sup>255</sup>. MHC- I Moleküle werden von nahezu allen Zellen (mit Ausnahme von Trophoblasten und Erythrozyten) exprimiert und hauptsächlich von zytotoxischen T- Zellen erkannt, wohingegen MHC- II Moleküle vornehmlich von antigenpräsentierenden Zellen

(hauptsächlich Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen) exprimiert werden und von T- Helfer Zellen erkannt werden.

MSCs exprimieren üblicherweise keine MHC- II und in nur sehr geringem Maße MHC- I Moleküle auf der Zelloberfläche, so dass es möglich ist, dass sie auf diesem Wege der Erkennung durch alloreaktive T-Zellen entgehen. Hinzu kommt, dass sie keine kostimulatorischen Moleküle, wie CD40, CD80 und CD86 exprimieren, welche zu einer Verstärkung des Aktivierungssignals in T- Zellen beitragen<sup>11, 252</sup>.

Der Arbeit von Dr. Pierre Moretti ist zu entnehmen, dass die isolierten UC-MSCs keine HLA- A,- B und - C (MHC- I) Moleküle exprimieren<sup>164</sup>. Jacobs *et al.* haben die Zellen auf die Expression von HLA- DR (MHC- II) untersucht, welche nicht festgestellt wurde (Daten bisher unveröffentlicht). Der vorliegende Immunphänotyp der UC-MSCs unterstützt daher die Theorie des geringen immunogenen Potentials der Zellen auf Grund nicht exprimierter spezifischer Oberflächenmarker. Dennoch stellt eine fehlende Expression von MHC- Molekülen keinen generellen Schutz vor der Erkennung durch Immunzellen dar. So erhöht z.B. das Fehlen von MHC- I Molekülen auf der Zelloberfläche die Wahrscheinlichkeit, dass Zellen durch NK-Zellen lysiert werden. Die Aktivität von NK-Zellen wird durch ein Zusammenspiel von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren reguliert. So binden z.B. die „*killer cell immunoglobulin-like receptors*“ (KIRs) an MHC- I Moleküle auf der Zielzelle, wodurch eine Aktivierung der NK- Zelle inhibiert wird. Fehlen die MHC- I Moleküle, so verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung Aktivierung der NK- Zelle und es kommt zur Lyse der Zielzelle<sup>255</sup>.

Erste Untersuchungen, die sich mit dieser Fragestellung befassen, brachten bisher keine eindeutigen Erkenntnisse. So wurde in einigen Arbeiten gezeigt, dass MSCs von NK- Zellen erkannt und lysiert werden<sup>256, 257</sup>, allerdings konnten Jacobs *et al.* zeigen, dass es in Ko-Kulturen aus UC-MSCs und isolierten NK- Zellen zu keiner gezielten Lyse der MSCs kam. Vielmehr konnte eine gezielte Immunmodulation durch die UC-MSCs beobachtet werden (Daten bisher unveröffentlicht). Dies lässt darauf schließen, dass noch weitere Mechanismen zum nicht-immunogenen Status der Zellen beitragen.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte im umbilikalen Ursprung der Zellen liegen. Der Fetus kann während der Schwangerschaft als semi-allogenes Gewebe angesehen werden und muss vor Abstoßungsreaktionen des mütterlichen Immunsystems geschützt werden. Teil dieses Schutzes bildet die Zellbarriere des Trophoblasten. Dessen Zellen weisen MHC- I Moleküle nur in sehr geringem Maße auf ihrer Oberfläche auf (kein HLA- A und- B, geringfügig HLA- C) und entgehen so der Erkennung durch alloreaktive zytotoxische T- Zellen. Hinzu kommt, dass diese Zellen das Oberflächenantigen HLA- G, ein nicht-

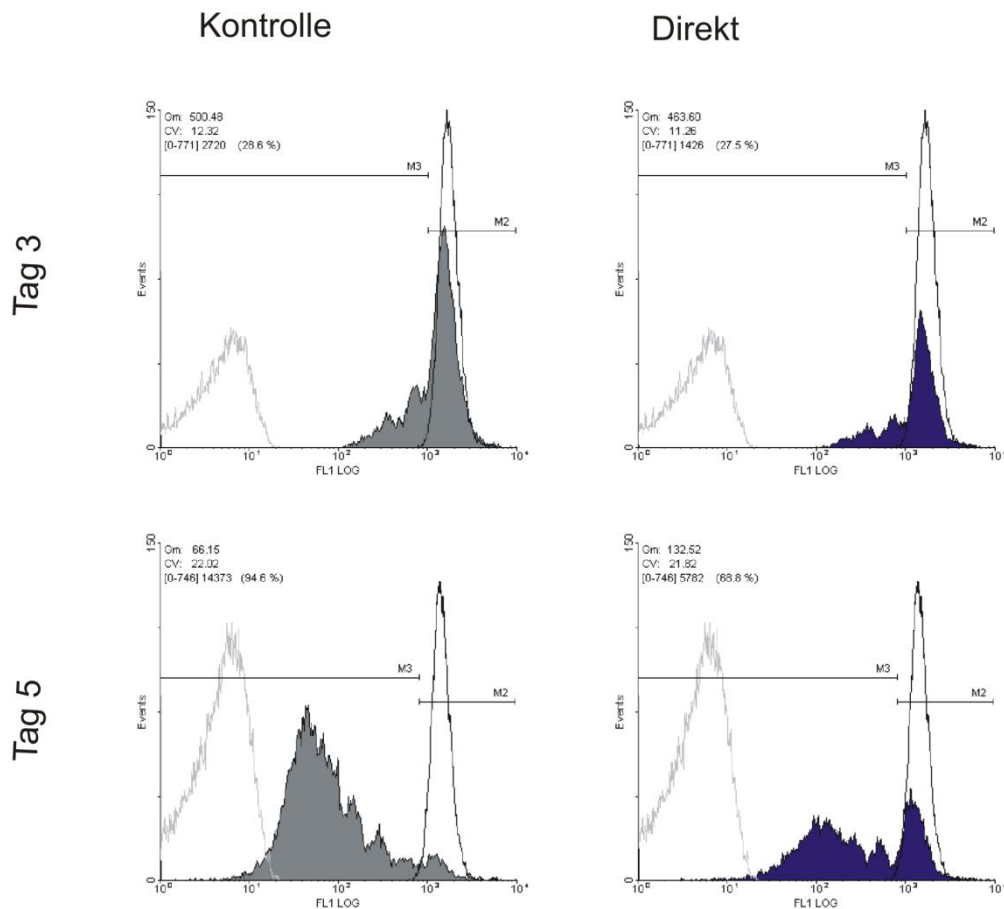
klassische Moleküle der HLA- I Klasse, exprimieren und höchstwahrscheinlich somit der Lyse durch maternale NK- Zellen entgehen<sup>258, 259</sup>.

Da die Nabelschnur die Verbindung zwischen fetalem und maternalem Gewebe darstellt, ist es möglich, dass zumindest Teile der Nabelschnur ebenfalls immunologische Eigenschaften aufweisen, die denen der Zellen aus dem Trophoblasten ähneln. In der Tat konnte für umbilikale MSCs bereits gezeigt werden, dass diese Zellen sowohl auf mRNA- Ebene<sup>129</sup>, als auch auf Protein- Ebene HLA- G<sup>130</sup> exprimieren. Somit könnte auch die Expression von HLA- G zum Immunprivileg von UC-MSCs beitragen. Ebenfalls wird vermutet, dass MSCs vom Immunsystem gut toleriert werden, weil sie die Funktionen verschiedener Immunzellen durch Zell- Zell Kontakte und durch die Produktion von Mediatoren inhibieren. Untersuchungen zum Einfluss der UC-MSCs auf die Proliferation von PBMCs war Teil der folgenden Arbeiten.

### **3.5.2.2 Untersuchungen zu den immunmodulatorischen Eigenschaften von UC-MSCs**

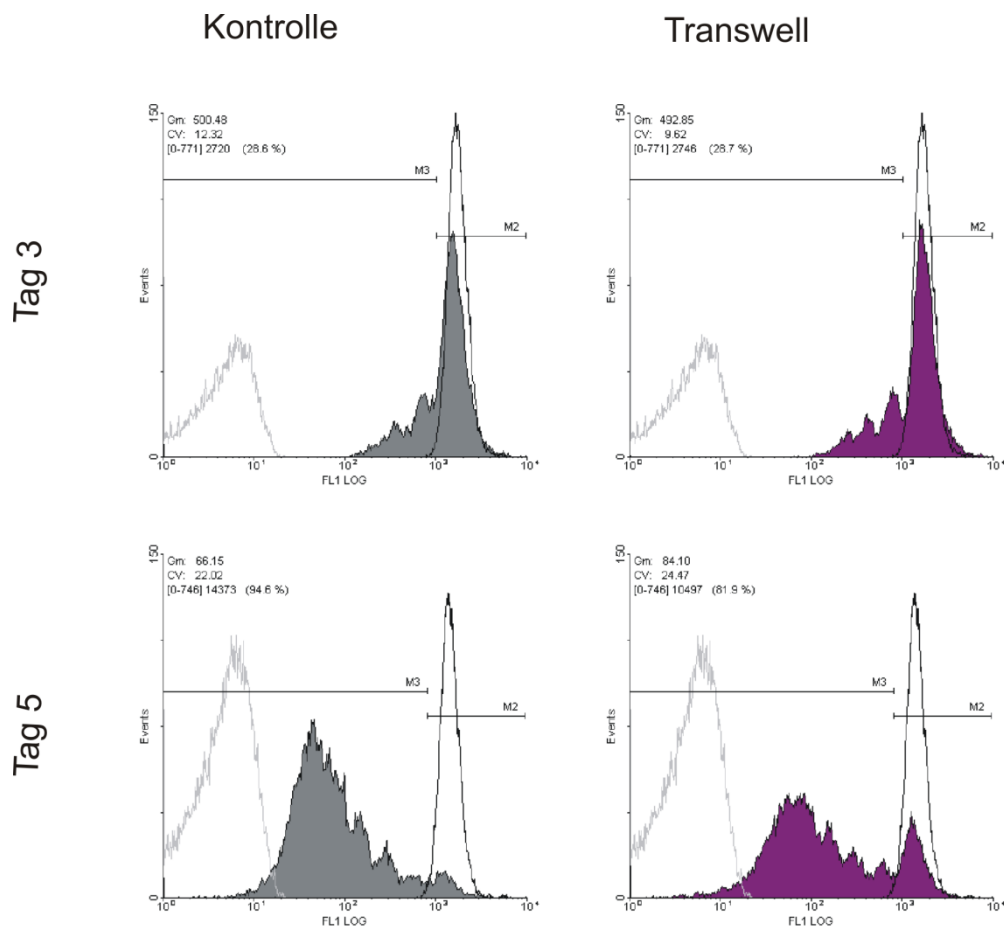
In Ko- Kulturversuchen mit zuvor zur Proliferation stimulierten PBMCs sollte untersucht werden, ob die isolierten UC-MSCs *in vitro* ein Potential zur Immunmodulation aufweisen und die Proliferation der PBMCs inhibieren. Da als Wirkmechanismen hierfür prinzipiell sezernierte Faktoren, als auch ein direkter Zell- Zell Kontakt in Frage kommen, wurden die Ko- Kulturen mit und ohne räumlicher Trennung der Zellpopulationen durchgeführt (siehe Abb. 3.35).

Die beispielhaften Ergebnisse einer Ko- Kultivierung von UC-MSCs und mit PHA stimulierten PBMCs mit direktem Zell- Zell Kontakt sind in Abbildung 3.37 gezeigt. Dargestellt sind die Histogramme der durchflusszytometrischen Messungen der Proliferation der CFSE- gefärbten PBMCs an Tag 3 und Tag 5 der Ko- Kultur. Gefärbte und stimulierte PBMCs, welche nicht unter dem Einfluss von UC-MSCs standen, dienten als Kontrolle. Die Messungen mit diesen Zellen ergaben ein typisches Histogramm für proliferierende PBMCs (vergleiche mit Abb. 3.34 (B)). An Tag 3 konnten 28,6 % der gemessenen Ereignisse proliferierenden Zellen zugeordnet werden, an Tag 5 proliferierten 94,6 % der analysierten Zellen. Verglichen hiermit, proliferierten in den Ko- Kulturen an Tag 3 27,5 % der Zellen und an Tag 5 lediglich 68,8 % der analysierten PBMCs.



**Abb. 3.37:** Ergebnisse der Ko- Kulturexperimente von UC-MSCs mit zuvor stimulierten PBMCs. Dargestellt sind die Histogramme der Proliferationsanalysen CFSE- gefärbter PBMCs aus Ko- Kulturen mit UC-MSCs mit direktem Zell-Zell Kontakt an Tag 3 und 5 der Kultur (blau gefüllt). Stimulierte (dunkelgrau gefüllt), sowie ruhende (schwarz) und mit CFSE gefärbte PBMCs, die nicht aus einer Ko- Kultur stammten, dienen als Kontrolle. Ungefärbte PBMCs dienen zur Überprüfung der CFSE- Färbung (hellgrau). Marker „M3“ gibt den prozentualen Anteil proliferierender PBMCs im Vergleich zu nicht stimulierten ruhenden PBMCs an.

Die Ergebnisse eines Ko- Kulturexperiments mit räumlicher Trennung der Zellpopulationen durch Transwellmembranen sind in Abbildung 3.38 gezeigt. Auch hier ist ein Einfluss der UC-MSCs auf die Proliferation der PBMCs zu erkennen. So wurden an Tag 3 28,7 % und an Tag 5 81,9 % proliferierende Zellen nachgewiesen. Der Einfluss von löslichen Faktoren auf die Proliferation von PBMCs scheint jedoch geringer zu sein, als ein direkter Zell- Zell Kontakt mit UC-MSCs.



**Abb. 3.38:** Ergebnisse der Ko-Kulturexperimente von UC-MSCs mit zuvor stimulierten PBMCs. Dargestellt sind die Histogramme der Proliferationsanalysen CFSE- gefärbter PBMCs aus Ko-Kulturen mit UC-MSCs ohne direktem Zell-Zell Kontakt an Tag 3 und 5 der Kultur (lila gefüllt). Stimulierte (dunkelgrau gefüllt), sowie ruhende (schwarz) und mit CFSE gefärbte PBMCs, die nicht aus einer Ko-Kultur stammten, dienen als Kontrolle. Ungefärbte PBMCs dienen zur Überprüfung der CFSE-Färbung (hellgrau). Marker „M3“ gibt den prozentualen Anteil proliferierender PBMCs im Vergleich zu nicht stimulierten ruhenden PBMCs an.

Dies wird in Abbildung 3.39 noch einmal verdeutlicht. Die Graphik zeigt ein overlay der Histogramme aus den jeweiligen Ko-Kulturversuchen und der Kontrolle. Es ist zunächst zu erkennen, dass sich an Tag 3 die Anzahl der proliferierenden PBMCs in den Ko-Kulturen nicht wesentlich von der in den Kontrollkulturen unterscheidet. An Tag 5 proliferierten in Ko-Kulturen mit direktem Zell-Zell Kontakt nur 68,8 % der PBMCs, wohingegen in Transwellkulturen noch 81,9 % der Zellen proliferierten. Tabelle 7 fasst die gewonnenen Daten noch einmal zusammen.

Tab. 7: Übersicht des Anteils proliferierender PBMCs in den Ko- Kulturen und in der Kontrolle

Tag	Direkt	Transwell	Kontrolle
3	27,5 %	28,7 %	28,6 %
5	68,8 %	81,9 %	94,6 %

Die Ergebnisse sind teils kontrovers zu den in der Literatur gefundenen Beobachtungen. Sowohl für Zellen aus dem Nabelschnurgewebe, als auch aus anderen Quellen wurden von anderen Arbeitsgruppen keine Unterschiede in der Stärke der Modulation durch MSCs in direkten oder indirekten Ko- Kulturen beobachtet. Der Einfluss der Zellen war lediglich dosisabhängig <sup>129, 155, 260-262</sup>.

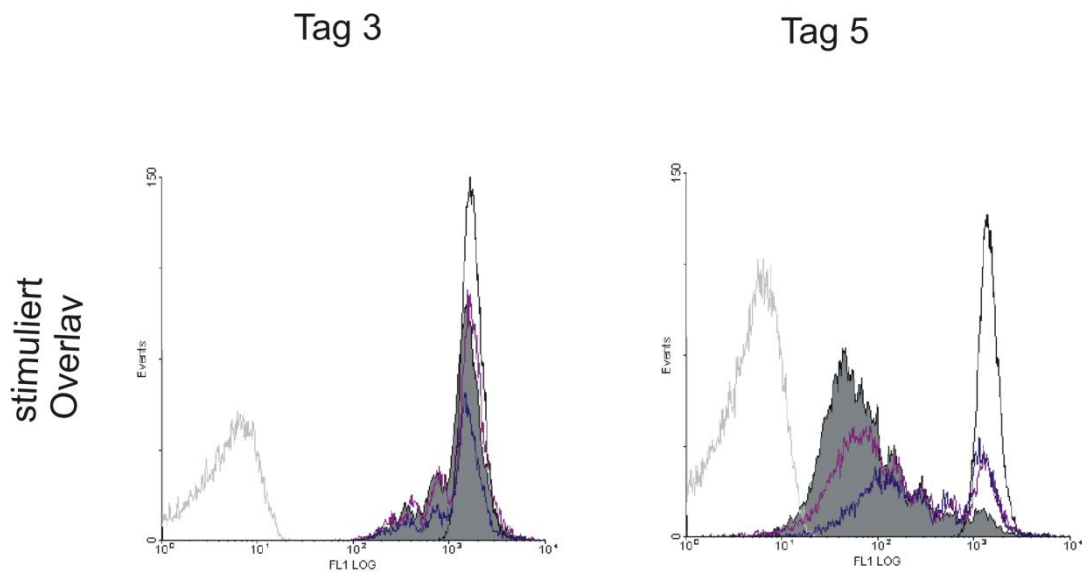


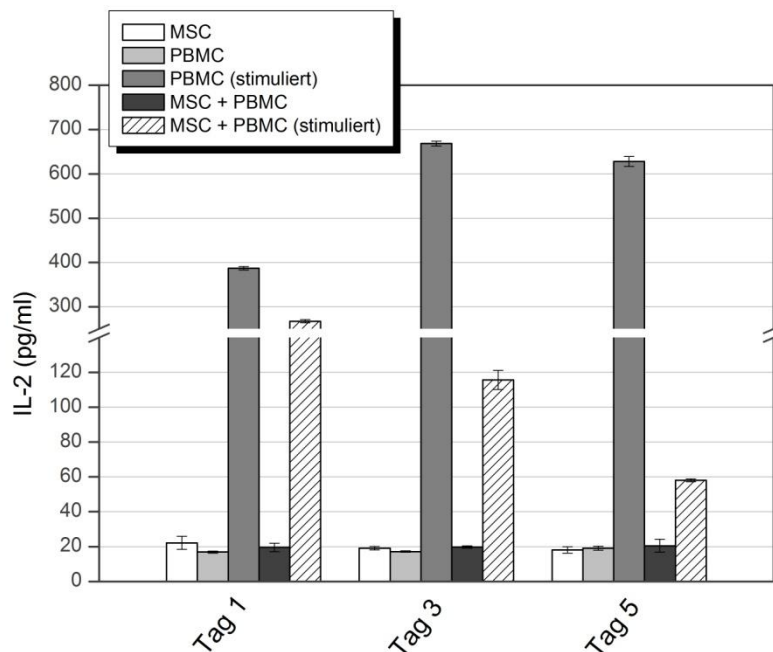
Abb. 3.39: Zusammenfassung der Ko- Kulturexperimente mit UC-MSCs und stimulierten PBMCs. Dargestellt ist ein overlay der Histogramme der Proliferationsanalysen CFSE-gefärbter PBMCs aus Ko-Kulturen mit UC-MSCs mit (blau) und ohne (lila) direktem Zell-Zell Kontakt an Tag 3 und 5 der Kultur. Stimulierte (dunkelgrau gefüllt), sowie ruhende (schwarz) und mit CFSE gefärbte PBMCs, die nicht aus einer Ko- Kultur stammten, dienten als Kontrolle. Ungefärbte PBMCs dienten zur Überprüfung der CFSE- Färbung (hellgrau).

Als weiterer Indikator einer Immunmodulation durch UC-MSCs diene der Nachweis von Interleukin (IL)- 2 im Zellkulturüberstand der Ko- Kulturen. IL- 2 stellt eines der wichtigsten Schlüsselmoleküle einer beginnenden Immunreaktion dar. Es wird hauptsächlich von

aktivierten T- Zellen produziert und stimuliert unter anderem die Proliferation von weiteren T- und anderen Immunzellen und trägt somit stark zur Ausweitung der Immunreaktion bei.

Der Nachweis von IL- 2 erfolgte mittels ELISA in Zellkulturüberständen aus Ko- Kulturen von UC-MSCs mit stimulierten und nicht stimulierten PBMCs mit direktem Zell- Zell Kontakt an Tag 1, 3 und 5 der Kultivierung. Des Weiteren erfolgten Messungen mit Überständen aus Kulturen von UC-MSCs, sowie stimulierten und nicht stimulierten PBMCs. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 3.40 gezeigt.

UC-MSC Kulturen und Kulturen mit nicht stimulierten PBMCs zeigten über den gesamten Zeitraum der Kultivierung eine geringe, aber konstante Expression von IL- 2 (ca. 20 pg/ ml), wohingegen PHA- stimulierte PBMCs signifikant mehr IL- 2 produzierten ( $387 \pm 3,9$  pg/ ml an Tag 1,  $669 \pm 5,5$  pg/ ml an Tag 3 und  $628 \pm 11,2$  pg/ ml an Tag 5). Im Gegensatz hierzu wurden in Ko- Kulturen mit stimulierten PBMCs und UC-MSCs deutlich weniger IL- 2 nachgewiesen ( $267 \pm 3,6$  pg/ ml an Tag 1,  $116 \pm 5,4$  pg/ ml an Tag 3 und  $58 \pm 0,8$  pg/ ml an Tag 5). In Ko- Kulturen aus UC-MSCs und nicht stimulierten PBMCs wurden IL- 2 Konzentrationen auf dem Niveau von ruhenden PBMCs gemessen, was den privilegierten Status der UC-MSCs unterstreicht.



**Abb. 3.40:** Einfluss der UC-MSCs auf die Sekretion von IL- 2. Dargestellt sind die gemessenen IL- 2 Konzentrationen in den Zellkulturüberständen von UC-MSCs, ruhenden bzw. stimulierten PBMCs, sowie von Ko- Kulturen aus UC-MSCs und ruhenden bzw. stimulierten PBMCs mit direktem Zell- Zell Kontakt an Tag 1, 3 und 5.



Die Abnahme der IL-2 Konzentration in Ko-Kulturen mit stimulierten PBMCs korreliert mit den Ergebnissen der Proliferationsanalysen und lässt einen Einfluss der UC-MSCs auf die IL-2 vermittelte Aktivierungskaskade von Immunzellen vermuten. Wie bereits erwähnt, trägt IL-2 maßgeblich zur Ausbreitung einer Immunreaktion bei, da es die Proliferation von T-Zellen nach Bindung an den IL-2 Rezeptor stimuliert. Dieser setzt sich aus drei Untereinheiten zusammen, wobei die  $\alpha$ -Untereinheit (CD25) erst nach Aktivierung der Zelle exprimiert wird. Erst wenn alle drei Untereinheiten vorhanden sind, ist eine ausreichend hohe Affinität für IL-2 vorhanden<sup>263, 264</sup> und es kommt zur Aktivierung der T-Zelle. Diese produziert wiederum ebenfalls IL-2 und stimuliert hierdurch weitere T-Zellen. Eine Inhibierung der Expression von CD25 könnte somit maßgeblich zur Eindämmung der Proliferation von T-Zellen beitragen und Teil der Immunmodulation von MSCs sein. Arbeiten in denen die Expression von CD25/IL-2R auf der Oberfläche von T-Zellen während der Ko-Kultivierung mit BM-MSCs analysiert wurde zeigten in der Tat, dass in Anwesenheit von MSCs die Expression von CD25 und CD38 (ein weiterer Aktivierungsmarker auf T-Zellen) signifikant vermindert war<sup>261, 265</sup>.

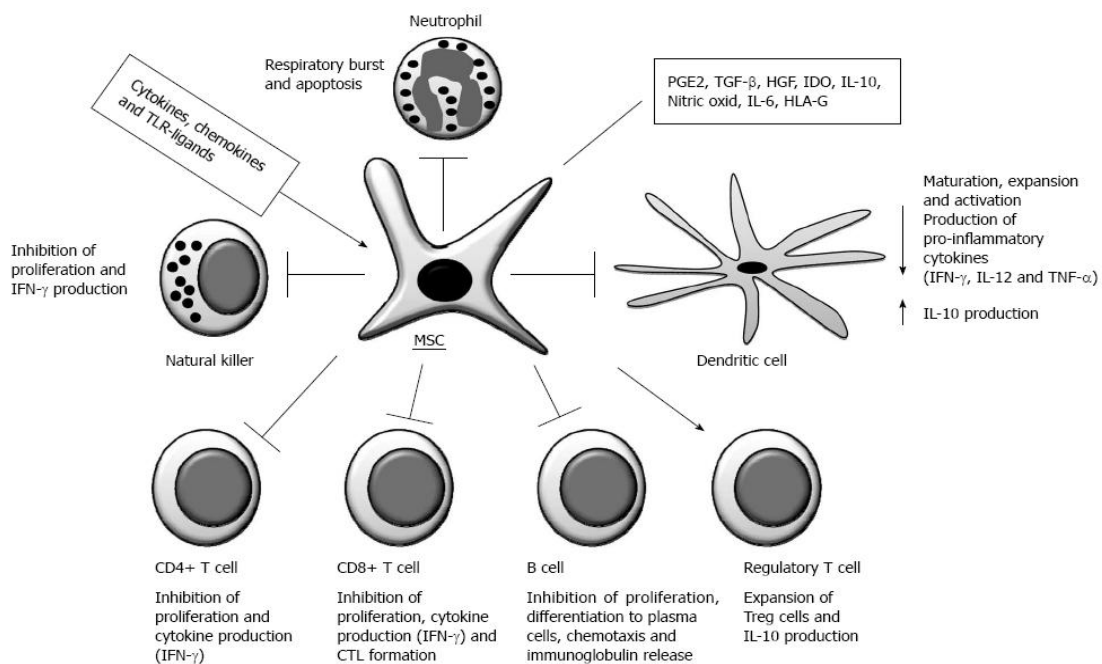
Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen weisen auf noch weitere mögliche Mechanismen zur Regulation der Proliferation von T-Zellen hin. So wurde gezeigt, dass MSCs unter inflammatorischen Bedingungen Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) exprimieren, ein Enzym, das die Umsetzung von Tryptophan zu N-Formylkynurenin katalysiert. Die fortschreitende Depletion von Tryptophan hat letztendlich einen Arrest der T-Zell Proliferation zur Folge<sup>266</sup>. IDO wird ebenfalls von Zellen des Trophoblasten exprimiert und wird als weiterer Teil der immunsuppressiven Wirkmechanismen zum Schutz des Fetus angesehen<sup>267</sup>. Ein weiteres Indiz für die funktionelle Ähnlichkeit von MSCs und Zellen des Trophoblasten.

Als weiterer Regulator von T-Zellen konnte Prostaglandin 2 (PGE<sub>2</sub>) nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass PEG<sub>2</sub> ebenfalls von MSCs exprimiert wird und eine T<sub>H</sub>1-T-Zell vermittelte pro-inflammatorische Reaktion in eine T<sub>H</sub>2-T-Zell vermittelte anti-inflammatorische Reaktion umkehren kann<sup>268</sup>.

Die Immunmodulation durch MSCs beschränkt sich jedoch nicht ausschließlich auf T-Zellen, sondern umfasst eine Vielzahl weiterer Immunzellen und Wirkmechanismen<sup>11, 12, 269</sup>. So wurde gezeigt, dass auch die Proliferation von B-Zellen, sowie deren Differenzierung zu antikörperproduzierenden Zellen durch die Anwesenheit von MSCs inhibiert wird<sup>270</sup>. Wie bereits zuvor erwähnt, unterliegen auch NK-Zellen der Immunmodulation durch MSCs. In Ko-Kulturversuchen wurde gezeigt, dass die Proliferation von zuvor mit IL-2 oder IL-15 stimulierten NK-Zellen inhibiert wurde<sup>256</sup>. Dies wurde von Jakobs *et al.* für die in dieser Arbeit isolierten UC-MSCs bestätigt. Interessanterweise konnte hier eine Inhibierung der

Proliferation nur im Falle eines direkten Zell- Zell Kontakts nachgewiesen werden (Daten bisher unveröffentlicht).

Eine Zusammenfassung der Zellen des Immunsystems, die *in vitro* einer Immunmodulation durch MSCs unterliegen, sowie die bisher vermuteten Wirkmechanismen sind in Abbildung 3.41 gezeigt<sup>269</sup>. Auch wenn bisher erst wenig über die genauen Mechanismen der Immunmodulation durch MSCs bekannt ist, so lassen die aktuellen Ergebnisse doch auf ein hohes Potential der Zellen für den Einsatz in zellbasierten Therapien schließen.



**Abb. 3.41: Zusammenfassung der der Immunmodulation durch MSCs unterliegenden Immunzellen sowie die vermuteten Wirkmechanismen<sup>269</sup>.**

In den vorliegenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die unter xeno-freien Bedingungen isolierten und expandierten UC-MSCs *in vitro* keine Proliferation von ruhenden PBMCs stimulieren. Vielmehr konnte eine Inhibierung der Proliferation von stimulierten PBMCs gezeigt werden, wobei ein direkter Zell- Zell Kontakt zu einem stärkeren Effekt führte. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Zellen ebenfalls ein nur geringes immunogenes Potential und immunmodulatorische Eigenschaften aufweisen, wie es auch schon von anderen Arbeitsgruppen für Zellen aus dem Nabelschnurgewebe und anderen Quellen gezeigt wurde. Eine weiterführende Charakterisierung dieser interessanten

Eigenschaften von UC-MSCs ist mit Blick auf klinische Anwendungen jedoch zu empfehlen. Dabei könnte der Einfluss der Zellen auf weitere Immunzellen, sowie eine Analyse der Expression von HLA- G und ko- stimulatorischen Faktoren (z.B. CD40, CD80 und CD86) von großem Interesse sein. Außerdem sollten auch die mittels CCE erhaltenen UC-MSC Subpopulationen (siehe Abschnitt 3.4) auf ihre immunmodulatorischen Eigenschaften hin miteinander verglichen werden.

### 3.6 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde erfolgreich ein Protokoll etabliert, um humane MSCs aus dem Nabelschnurgewebe unter xeno- freien Kulturbedingungen effektiv und reproduzierbar zu isolieren und zu expandieren. Mittels einer Explantatkultur konnten so pro Nabelschnur durchschnittlich  $2 \times 10^7$  Primärzellen mit einem einheitlichen MSC- typischen Immunphänotyp erhalten werden. Dabei zeigten die Zellen ein plastikadhärentes Wachstum mit einer fibroblasten- ähnlichen Morphologie. Durch den Verzicht auf einen enzymatischen Verdau des Nabelschnurgewebes, ist diese Methode zellschonend und einfach durchzuführen. Dabei sind alle Arbeitsschritte der Isolierung sehr gut kontrollier- und standardisierbar, so dass eine Durchführung auch unter GMP- konformen Bedingungen denkbar ist. Die Dauer, welche zur Gewinnung der Zellen benötigt wird, beträgt durchschnittlich 21 Tage. Um die Zeitspanne zu verkürzen, wäre der Einsatz von Chemokinen denkbar, um die Migration der Zellen aus den Gewebestückchen heraus zu beschleunigen. So konnte für BM-MSCs und MSCs aus dem Nabelschnurblut gezeigt werden, dass deren Migration durch die Chemokine „*hepatocyte growth factor*“ (HGF) und „*stromal-derived factor*“ (SDF)- 1 stimuliert wurde<sup>271, 272</sup>. Die gewonnenen Zellen können anschließend ohne hohe Verluste kryokonserviert werden, so dass das Anlegen von Zellbanken möglich ist.

Unter den durch die Verwendung von allogenen HS gegebenen xeno- freien Kulturbedingungen zeigten die Zellen ein hohes Proliferationspotential, welches im Vergleich zu konventionellen Kulturbedingungen mit tierischen Seren deutlich erhöht war. Hinzu kommt, dass Zellkulturen in Gegenwart von FCS teils stark heterogen waren und eine verminderte Expression typischer MSC- Oberflächenmarker zeigten. Somit ist eine xeno- freie Kultur von UC-MSCs nicht nur prinzipiell möglich, sondern zu empfehlen. Hierdurch wird nicht nur die potentielle Gefahr einer Übertragung von Pathogenen minimiert, sondern können deutlich schneller Zellzahlen von klinischer Relevanz erreicht werden. Durch eine verkürzte Expansion der Zellen *in vitro* wird so auch die Gefahr einer Entartung der Zellen

durch chromosomale Anomalien reduziert. Außerdem ist anzunehmen, dass eine Kultur der Zellen in autologen Serum ebenfalls möglich ist. Dies könnte erheblich zum Erfolg von zellbasierten Therapien beitragen.

Obwohl die isolierten UC-MSCs einen homogenen Immunphänotyp aufweisen, lassen sich mittels CCE distinkte Subpopulationen erhalten. Diese unterscheiden sich deutlich bezüglich ihres Proliferationspotentials und des Anteils seneszenten Zellen. Eindeutige Unterschiede im Differenzierungspotential der Subpopulationen ließen sich in einer ersten näheren Charakterisierung jedoch nicht zeigen. Der Nachweis von Subpopulationen wirft ebenfalls die Frage auf, inwiefern die postulierten Minimalkriterien der ISCT noch ausreichend sind, um MSCs zu definieren. Ebenso erfüllen alle Zellen, welche aus unterschiedlichen Kompartimenten der Nabelschnur isoliert wurden, die Kriterien, unterscheiden sich aber teils erheblich, z.B. bezüglich ihres Differenzierungspotentials, von einander. Allgemein sind Vergleiche von Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen jedoch schwierig, da allein durch unterschiedliche Kultivierungsmethoden schon epigenetische Veränderungen der Zellen auftreten können. Dabei hat eine Vielzahl unterschiedlichster Faktoren Einfluss auf die Eigenschaften der Zellen. Dies konnte in den hier vorgestellten Arbeiten am Beispiel der Herkunft und Konzentration des Serums und darüber hinaus am Beispiel der gewählten Aussaatdichte der Zellen, sowie der gewählten Sauerstoffkonzentration belegt werden. Eine Anpassung dieser Parameter stellt aber auch eine Möglichkeit zur weiteren Optimierung der Kultivierungsbedingungen dar.

Erste Anzeichen deuten darauf hin, dass eine Reduktion der Sauerstoffkonzentration zu einem gesteigerten adipogenen und chondrogenen Differenzierungspotential von UC-MSCs führt. Dabei ist es jedoch notwendig, die jeweils optimale Konzentration zu finden. Ein generelles osteogenes Differenzierungspotential konnte in einer konventionellen zweidimensionalen Kultur auch unter hypoxischen Bedingungen nicht eindeutig nachgewiesen werden. Allerdings zeigten erste vielversprechende Arbeiten, dass sich UC-MSCs in dynamischen 3D Kulturen zu einer osteogenen Differenzierung stimulieren lassen. Durch die Verwendung von geeigneten Trägermaterialien und Bioreaktoren lassen sich Bedingungen schaffen, welche ein Wachstum der Zellen unter physiologischeren Bedingungen im dreidimensionalen Zellverbund ermöglichen und vor allem mit Blick auf *Tissue Engineering* Anwendungen von größtem Interesse sind. Auch das Immunprivileg der Zellen und ihre immunmodulatorischen Eigenschaften können für den Erfolg solcher Therapien förderlich sein. Es bleibt jedoch zu überprüfen, inwiefern diese Eigenschaften auch nach einer gezielten Differenzierung der Zellen noch vorhanden sind.

## 4 Literaturverzeichnis

1. Morrison, S. J.; Kimble, J., Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **2006**, 441, (7097), 1068-74.
2. Bach, F. H.; Albertini, R. J.; Joo, P.; Anderson, J. L.; Bortin, M. M., Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet* **1968**, 2, (7583), 1364-6.
3. Friedenstein, A. J.; Chailakhjan, R. K.; Lalykina, K. S., The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* **1970**, 3, (4), 393-403.
4. Friedenstein, A. J.; Piatetzky, S., II; Petrakova, K. V., Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* **1966**, 16, (3), 381-90.
5. Caplan, A. I., Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* **1991**, 9, (5), 641-50.
6. Ennis, J.; Sarugaser, R.; Gomez, A.; Baksh, D.; Davies, J. E., Isolation, characterization, and differentiation of human umbilical cord perivascular cells (HUCPVCs). *Methods Cell Biol* **2008**, 86, 121-36.
7. Grove, J. E.; Bruscia, E.; Krause, D. S., Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* **2004**, 22, (4), 487-500.
8. Jackson, L.; Jones, D. R.; Scotting, P.; Sottile, V., Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med* **2007**, 53, (2), 121-7.
9. Phinney, D. G.; Prockop, D. J., Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* **2007**, 25, (11), 2896-902.
10. Poulosom, R.; Alison, M. R.; Forbes, S. J.; Wright, N. A., Adult stem cell plasticity. *J Pathol* **2002**, 197, (4), 441-56.
11. Siegel, G.; Schafer, R.; Dazzi, F., The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Transplantation* **2009**, 87, (9 Suppl), S45-9.
12. Hoogduijn, M. J.; Popp, F.; Verbeek, R.; Masoodi, M.; Nicolaou, A.; Baan, C.; Dahlke, M. H., The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. *Int Immunopharmacol* **2010**.
13. Le Blanc, K., Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* **2003**, 5, (6), 485-9.
14. Le Blanc, K.; Ringden, O., Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **2005**, 11, (5), 321-34.
15. Mueller, S. M.; Glowacki, J., Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem* **2001**, 82, (4), 583-90.
16. Stenderup, K.; Justesen, J.; Clausen, C.; Kassem, M., Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* **2003**, 33, (6), 919-26.
17. Pappa, K. I.; Anagnou, N. P., Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regen Med* **2009**, 4, (3), 423-33.
18. Horwitz, E. M.; Le Blanc, K.; Dominici, M.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F. C.; Deans, R. J.; Krause, D. S.; Keating, A., Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2005**, 7, (5), 393-5.
19. Dennis, J. E.; Merriam, A.; Awadallah, A.; Yoo, J. U.; Johnstone, B.; Caplan, A. I., A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res* **1999**, 14, (5), 700-9.

20. Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D.; Moorman, M. A.; Simonetti, D. W.; Craig, S.; Marshak, D. R., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **1999**, 284, (5411), 143-7.
21. Choong, P. F.; Mok, P. L.; Cheong, S. K.; Leong, C. F.; Then, K. Y., Generating neuron-like cells from BM-derived mesenchymal stromal cells in vitro. *Cytotherapy* **2007**, 9, (2), 170-83.
22. Xu, R.; Jiang, X.; Guo, Z.; Chen, J.; Zou, Y.; Ke, Y.; Zhang, S.; Li, Z.; Cai, Y.; Du, M.; Qin, L.; Tang, Y.; Zeng, Y., Functional analysis of neuron-like cells differentiated from neural stem cells derived from bone marrow stroma cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol* **2008**, 28, (4), 545-58.
23. Saulnier, N.; Lattanzi, W.; Puglisi, M. A.; Pani, G.; Barba, M.; Piscaglia, A. C.; Giachelia, M.; Alfieri, S.; Neri, G.; Gasbarrini, G.; Gasbarrini, A., Mesenchymal stromal cells multipotency and plasticity: induction toward the hepatic lineage. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **2009**, 13 Suppl 1, 71-8.
24. Sun, Y.; Chen, L.; Hou, X. G.; Hou, W. K.; Dong, J. J.; Sun, L.; Tang, K. X.; Wang, B.; Song, J.; Li, H.; Wang, K. X., Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients into insulin-producing cells in vitro. *Chin Med J (Engl)* **2007**, 120, (9), 771-6.
25. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.; Horwitz, E., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2006**, 8, (4), 315-7.
26. Bajada, S.; Mazakova, I.; Richardson, J. B.; Ashammakhi, N., Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* **2008**, 2, (4), 169-83.
27. Nishida, S.; Endo, N.; Yamagiwa, H.; Tanizawa, T.; Takahashi, H. E., Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J Bone Miner Metab* **1999**, 17, (3), 171-7.
28. Kuo, C. K.; Li, W. J.; Mauck, R. L.; Tuan, R. S., Cartilage tissue engineering: its potential and uses. *Curr Opin Rheumatol* **2006**, 18, (1), 64-73.
29. da Silva Meirelles, L.; Chagastelles, P. C.; Nardi, N. B., Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* **2006**, 119, (Pt 11), 2204-13.
30. Roubelakis, M. G.; Pappa, K. I.; Bitsika, V.; Zagoura, D.; Vlahou, A.; Papadaki, H. A.; Antsaklis, A.; Anagnou, N. P., Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* **2007**, 16, (6), 931-52.
31. Sensebe, L., Clinical grade production of mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng* **2008**, 18, (1 Suppl), S3-10.
32. Bieback, K.; Kern, S.; Kluter, H.; Eichler, H., Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* **2004**, 22, (4), 625-34.
33. Wexler, S. A.; Donaldson, C.; Denning-Kendall, P.; Rice, C.; Bradley, B.; Hows, J. M., Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* **2003**, 121, (2), 368-74.
34. In 't Anker, P. S.; Scherjon, S. A.; Kleijburg-van der Keur, C.; de Groot-Swings, G. M.; Claas, F. H.; Fibbe, W. E.; Kanhai, H. H., Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* **2004**, 22, (7), 1338-45.
35. Benirschke, K.; et al, *Pathology of the Human Placenta*. 5 ed.; Springer New York: 2006.
36. [www.10voorbiologie.nl](http://www.10voorbiologie.nl), Citing web resources: Theorie: Placenta en navelstreng. <http://www.10voorbiologie.nl/afbczw/placenta.jpg> **2011. Letzter Zugriff am 01.04.2011.**
37. Wolbank, S.; Peterbauer, A.; Fahrner, M.; Hennerbichler, S.; van Griensven, M.; Stadler, G.; Redl, H.; Gabriel, C., Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem

- cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Eng* **2007**, 13, (6), 1173-83.
38. Akle, C. A.; Adinolfi, M.; Welsh, K. I.; Leibowitz, S.; McColl, I., Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet* **1981**, 2, (8254), 1003-5.
39. Miki, T.; Lehmann, T.; Cai, H.; Stolz, D. B.; Strom, S. C., Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells* **2005**, 23, (10), 1549-59.
40. Miki, T.; Marongiu, F.; Ellis, E.; S, C. S., Isolation of amniotic epithelial stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* **2007**, Chapter 1, Unit 1E 3.
41. Ochsenbein-Kolble, N.; Bilic, G.; Hall, H.; Huch, R.; Zimmermann, R., Inducing proliferation of human amnion epithelial and mesenchymal cells for prospective engineering of membrane repair. *J Perinat Med* **2003**, 31, (4), 287-94.
42. Sakuragawa, N.; Misawa, H.; Ohsugi, K.; Kakishita, K.; Ishii, T.; Thangavel, R.; Tohyama, J.; Elwan, M.; Yokoyama, Y.; Okuda, O.; Arai, H.; Ogino, I.; Sato, K., Evidence for active acetylcholine metabolism in human amniotic epithelial cells: applicable to intracerebral allografting for neurologic disease. *Neurosci Lett* **1997**, 232, (1), 53-6.
43. Wolbank, S.; van Griensven, M.; Grillari-Voglauer, R.; Peterbauer-Scherb, A., Alternative sources of adult stem cells: human amniotic membrane. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **2010**, 123, 1-27.
44. Roelen, D. L.; van der Mast, B. J.; in't Anker, P. S.; Kleijburg, C.; Eikmans, M.; van Beelen, E.; de Groot-Swings, G. M.; Fibbe, W. E.; Kanhai, H. H.; Scherjon, S. A.; Claas, F. H., Differential immunomodulatory effects of fetal versus maternal multipotent stromal cells. *Hum Immunol* **2009**, 70, (1), 16-23.
45. Hwang, J. H.; Shim, S. S.; Seok, O. S.; Lee, H. Y.; Woo, S. K.; Kim, B. H.; Song, H. R.; Lee, J. K.; Park, Y. K., Comparison of cytokine expression in mesenchymal stem cells from human placenta, cord blood, and bone marrow. *J Korean Med Sci* **2009**, 24, (4), 547-54.
46. Soncini, M.; Vertua, E.; Gibelli, L.; Zorzi, F.; Denegri, M.; Albertini, A.; Wengler, G. S.; Parolini, O., Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med* **2007**, 1, (4), 296-305.
47. Portmann-Lanz, C. B.; Schoeberlein, A.; Huber, A.; Sager, R.; Malek, A.; Holzgreve, W.; Surbek, D. V., Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol* **2006**, 194, (3), 664-73.
48. Bilic, G.; Ochsenbein-Kolble, N.; Hall, H.; Huch, R.; Zimmermann, R., In vitro lesion repair by human amnion epithelial and mesenchymal cells. *Am J Obstet Gynecol* **2004**, 190, (1), 87-92.
49. Bilic, G.; Zeisberger, S. M.; Mallik, A. S.; Zimmermann, R.; Zisch, A. H., Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial and mesenchymal stromal cells for application in cell therapy. *Cell Transplant* **2008**, 17, (8), 955-68.
50. Sakuragawa, N.; Kakinuma, K.; Kikuchi, A.; Okano, H.; Uchida, S.; Kamo, I.; Kobayashi, M.; Yokoyama, Y., Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells. *J Neurosci Res* **2004**, 78, (2), 208-14.
51. Portmann-Lanz, C. B.; Schoeberlein, A.; Portmann, R.; Mohr, S.; Rollini, P.; Sager, R.; Surbek, D. V., Turning placenta into brain: placental mesenchymal stem cells differentiate into neurons and oligodendrocytes. *Am J Obstet Gynecol* **2010**, 202, (3), 294 e1-294 e11.
52. Mohr, S.; Portmann-Lanz, C. B.; Schoeberlein, A.; Sager, R.; Surbek, D. V., Generation of an osteogenic graft from human placenta and placenta-derived mesenchymal stem cells. *Reprod Sci* **2010**, 17, (11), 1006-15.
53. Nur Fariha, M. M.; Chua, K. H.; Tan, G. C.; Tan, A. E.; Hayati, A. R., Human chorion-derived stem cells: changes in stem cell properties during serial passage. *Cytotherapy* **2011**.
54. New Jersey Medical School, *Citing web resources: Stem Cell and Regenerative Medicine*.

[http://njms.umdni.edu/gsbs/stemcell/scofthemonth/2008/PlacSCsci\\_clip\\_image004.gif](http://njms.umdni.edu/gsbs/stemcell/scofthemonth/2008/PlacSCsci_clip_image004.gif) **2011.**

**Letzter Zugriff am 01.04.2011.**

55. Parolini, O.; Alviano, F.; Bagnara, G. P.; Bilic, G.; Buhring, H. J.; Evangelista, M.; Hennerbichler, S.; Liu, B.; Magatti, M.; Mao, N.; Miki, T.; Marongiu, F.; Nakajima, H.; Nikaido, T.; Portmann-Lanz, C. B.; Sankar, V.; Soncini, M.; Stadler, G.; Surbek, D.; Takahashi, T. A.; Redl, H.; Sakuragawa, N.; Wolbank, S.; Zeisberger, S.; Zisch, A.; Strom, S. C., Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells* **2008**, 26, (2), 300-11.
56. Igura, K.; Zhang, X.; Takahashi, K.; Mitsuru, A.; Yamaguchi, S.; Takashi, T. A., Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* **2004**, 6, (6), 543-53.
57. Poloni, A.; Maurizi, G.; Babini, L.; Serrani, F.; Berardinelli, E.; Mancini, S.; Costantini, B.; Discepoli, G.; Leoni, P., Human Mesenchymal Stem Cells from chorionic villi and amniotic fluid are not susceptible to transformation after extensive in vitro expansion. *Cell Transplant* **2010**.
58. Poloni, A.; Rosini, V.; Mondini, E.; Maurizi, G.; Mancini, S.; Discepoli, G.; Biasio, S.; Battaglini, G.; Berardinelli, E.; Serrani, F.; Leoni, P., Characterization and expansion of mesenchymal progenitor cells from first-trimester chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* **2008**, 10, (7), 690-7.
59. Zhang, X.; Mitsuru, A.; Igura, K.; Takahashi, K.; Ichinose, S.; Yamaguchi, S.; Takahashi, T. A., Mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun* **2006**, 340, (3), 944-52.
60. Zhang, X.; Soda, Y.; Takahashi, K.; Bai, Y.; Mitsuru, A.; Igura, K.; Satoh, H.; Yamaguchi, S.; Tani, K.; Tojo, A.; Takahashi, T. A., Successful immortalization of mesenchymal progenitor cells derived from human placenta and the differentiation abilities of immortalized cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2006**, 351, (4), 853-9.
61. Kadam, S.; Muthyala, S.; Nair, P.; Bhonde, R., Human placenta-derived mesenchymal stem cells and islet-like cell clusters generated from these cells as a novel source for stem cell therapy in diabetes. *Rev Diabet Stud* **2010**, 7, (2), 168-82.
62. Macias, M. I.; Grande, J.; Moreno, A.; Dominguez, I.; Bornstein, R.; Flores, A. I., Isolation and characterization of true mesenchymal stem cells derived from human term decidua capable of multilineage differentiation into all 3 embryonic layers. *Am J Obstet Gynecol* **2010**, 203, (5), 495 e9-495 e23.
63. Huang, Y. C.; Yang, Z. M.; Chen, X. H.; Tan, M. Y.; Wang, J.; Li, X. Q.; Xie, H. Q.; Deng, L., Isolation of mesenchymal stem cells from human placental decidua basalis and resistance to hypoxia and serum deprivation. *Stem Cell Rev* **2009**, 5, (3), 247-55.
64. Kyurkchiev, S.; Shterev, A.; Dimitrov, R., Assessment of presence and characteristics of multipotent stromal cells in human endometrium and decidua. *Reprod Biomed Online* **2010**, 20, (3), 305-13.
65. Dimitrov, R.; Kyurkchiev, D.; Timeva, T.; Yunakova, M.; Stamenova, M.; Shterev, A.; Kyurkchiev, S., First-trimester human decidua contains a population of mesenchymal stem cells. *Fertil Steril* **2010**, 93, (1), 210-9.
66. Lu, G. H.; Zhang, S. Z.; Chen, Q.; Wang, X. F.; Lu, F. F.; Liu, J.; Li, M.; Li, Z. Y., [Isolation and multipotent differentiation of human decidua basalis-derived mesenchymal stem cells.]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **2011**, 31, (2), 262-265.
67. Barlow, S.; Brooke, G.; Chatterjee, K.; Price, G.; Pelekanos, R.; Rossetti, T.; Doody, M.; Venter, D.; Pain, S.; Gilshenan, K.; Atkinson, K., Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* **2008**, 17, (6), 1095-107.
68. Battula, V. L.; Bareiss, P. M.; Treml, S.; Conrad, S.; Albert, I.; Hojak, S.; Abele, H.; Schewe, B.; Just, L.; Skutella, T.; Buhring, H. J., Human placenta and bone marrow derived



- MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation* **2007**, *75*, (4), 279-91.
69. Fazekasova, H.; Lechler, R.; Langford, K.; Lombardi, G., Placenta-derived MSCs are partially immunogenic and less immunomodulatory than bone marrow-derived MSCs. *J Tissue Eng Regen Med* **2010**.
70. Pilz, G. A.; Ulrich, C.; Ruh, M.; Abele, H.; Schafer, R.; Kluba, T.; Buhning, H. J.; Rolaufts, B.; Aicher, W. K., Human Term Placenta-Derived Mesenchymal Stromal Cells Are Less Prone to Osteogenic Differentiation Than Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Dev* **2011**.
71. Yen, B. L.; Chien, C. C.; Chen, Y. C.; Chen, J. T.; Huang, J. S.; Lee, F. K.; Huang, H. I., Placenta-derived multipotent cells differentiate into neuronal and glial cells in vitro. *Tissue Eng Part A* **2008**, *14*, (1), 9-17.
72. Yen, B. L.; Huang, H. I.; Chien, C. C.; Jui, H. Y.; Ko, B. S.; Yao, M.; Shun, C. T.; Yen, M. L.; Lee, M. C.; Chen, Y. C., Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells* **2005**, *23*, (1), 3-9.
73. Brooke, G.; Rossetti, T.; Pelekanos, R.; Ilic, N.; Murray, P.; Hancock, S.; Antonenas, V.; Huang, G.; Gottlieb, D.; Bradstock, K.; Atkinson, K., Manufacturing of human placenta-derived mesenchymal stem cells for clinical trials. *Br J Haematol* **2009**, *144*, (4), 571-9.
74. Di Naro, E.; Ghezzi, F.; Raio, L.; Franchi, M.; D'Addario, V., Umbilical cord morphology and pregnancy outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **2001**, *96*, (2), 150-7.
75. Raio, L.; Ghezzi, F.; Di Naro, E.; Gomez, R.; Franchi, M.; Mazor, M.; Bruhwiler, H., Sonographic measurement of the umbilical cord and fetal anthropometric parameters. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **1999**, *83*, (2), 131-5.
76. Covas, D. T.; Siufi, J. L.; Silva, A. R.; Orellana, M. D., Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res* **2003**, *36*, (9), 1179-83.
77. Panepucci, R. A.; Siufi, J. L.; Silva, W. A., Jr.; Proto-Siquiera, R.; Neder, L.; Orellana, M.; Rocha, V.; Covas, D. T.; Zago, M. A., Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **2004**, *22*, (7), 1263-78.
78. Romanov, Y. A.; Svintsitskaya, V. A.; Smirnov, V. N., Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* **2003**, *21*, (1), 105-10.
79. Bailey, M. M.; Wang, L.; Bode, C. J.; Mitchell, K. E.; Detamore, M. S., A comparison of human umbilical cord matrix stem cells and temporomandibular joint condylar chondrocytes for tissue engineering temporomandibular joint condylar cartilage. *Tissue Eng* **2007**, *13*, (8), 2003-10.
80. Conconi, M. T.; Burra, P.; Di Liddo, R.; Calore, C.; Turetta, M.; Bellini, S.; Bo, P.; Nussdorfer, G. G.; Parnigotto, P. P., CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. *Int J Mol Med* **2006**, *18*, (6), 1089-96.
81. Fu, Y. S.; Cheng, Y. C.; Lin, M. Y.; Cheng, H.; Chu, P. M.; Chou, S. C.; Shih, Y. H.; Ko, M. H.; Sung, M. S., Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem Cells* **2006**, *24*, (1), 115-24.
82. Fu, Y. S.; Shih, Y. T.; Cheng, Y. C.; Min, M. Y., Transformation of human umbilical mesenchymal cells into neurons in vitro. *J Biomed Sci* **2004**, *11*, (5), 652-60.
83. Karahuseyinoglu, S.; Cinar, O.; Kilic, E.; Kara, F.; Akay, G. G.; Demiralp, D. O.; Tukun, A.; Uckan, D.; Can, A., Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells* **2007**, *25*, (2), 319-31.
84. Lund, R. D.; Wang, S.; Lu, B.; Girman, S.; Holmes, T.; Sauve, Y.; Messina, D. J.; Harris, I. R.; Kihm, A. J.; Harmon, A. M.; Chin, F. Y.; Gosiewska, A.; Mistry, S. K., Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease. *Stem Cells* **2007**, *25*, (3), 602-11.

85. Ma, L.; Feng, X. Y.; Cui, B. L.; Law, F.; Jiang, X. W.; Yang, L. Y.; Xie, Q. D.; Huang, T. H., Human umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells. *Chin Med J (Engl)* **2005**, 118, (23), 1987-93.
86. Mitchell, K. E.; Weiss, M. L.; Mitchell, B. M.; Martin, P.; Davis, D.; Morales, L.; Helwig, B.; Beerenstrauch, M.; Abou-Easa, K.; Hildreth, T.; Troyer, D.; Medicetty, S., Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells* **2003**, 21, (1), 50-60.
87. Schmidt, D.; Mol, A.; Odermatt, B.; Neuenschwander, S.; Breymann, C.; Gossi, M.; Genoni, M.; Zund, G.; Hoerstrup, S. P., Engineering of biologically active living heart valve leaflets using human umbilical cord-derived progenitor cells. *Tissue Eng* **2006**, 12, (11), 3223-32.
88. Wang, H. S.; Hung, S. C.; Peng, S. T.; Huang, C. C.; Wei, H. M.; Guo, Y. J.; Fu, Y. S.; Lai, M. C.; Chen, C. C., Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* **2004**, 22, (7), 1330-7.
89. Weiss, M. L.; Medicetty, S.; Bledsoe, A. R.; Rachakatla, R. S.; Choi, M.; Merchav, S.; Luo, Y.; Rao, M. S.; Velagaleti, G.; Troyer, D., Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells* **2006**, 24, (3), 781-92.
90. Baksh, D.; Yao, R.; Tuan, R. S., Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* **2007**, 25, (6), 1384-92.
91. Sarugaser, R.; Lickorish, D.; Baksh, D.; Hosseini, M. M.; Davies, J. E., Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* **2005**, 23, (2), 220-9.
92. Bieback, K.; Kluter, H., Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood. *Curr Stem Cell Res Ther* **2007**, 2, (4), 310-23.
93. Gang, E. J.; Jeong, J. A.; Han, S.; Yan, Q.; Jeon, C. J.; Kim, H., In vitro endothelial potential of human UC blood-derived mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* **2006**, 8, (3), 215-27.
94. Gang, E. J.; Jeong, J. A.; Hong, S. H.; Hwang, S. H.; Kim, S. W.; Yang, I. H.; Ahn, C.; Han, H.; Kim, H., Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells* **2004**, 22, (4), 617-24.
95. Hou, L.; Cao, H.; Wang, D.; Wei, G.; Bai, C.; Zhang, Y.; Pei, X., Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. *Int J Hematol* **2003**, 78, (3), 256-61.
96. Lee, O. K.; Kuo, T. K.; Chen, W. M.; Lee, K. D.; Hsieh, S. L.; Chen, T. H., Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* **2004**, 103, (5), 1669-75.
97. Hatlapatka, T.; Moretti, P.; Lavrentieva, A.; Hass, R.; Marquardt, N.; Jacobs, R.; Kasper, C., Optimization of culture conditions for the expansion of umbilical cord-derived mesenchymal stem or stromal cell-like cells using xeno-free culture conditions. *Tissue Eng Part C Methods* **2007**, 17, (4), 485-93.
98. Kadner, A.; Hoerstrup, S. P.; Tracy, J.; Breymann, C.; Maurus, C. F.; Melnitchouk, S.; Kadner, G.; Zund, G.; Turina, M., Human umbilical cord cells: a new cell source for cardiovascular tissue engineering. *Ann Thorac Surg* **2002**, 74, (4), S1422-8.
99. Kadner, A.; Zund, G.; Maurus, C.; Breymann, C.; Yakarisik, S.; Kadner, G.; Turina, M.; Hoerstrup, S. P., Human umbilical cord cells for cardiovascular tissue engineering: a comparative study. *Eur J Cardiothorac Surg* **2004**, 25, (4), 635-41.
100. Majore, I.; Moretti, P.; Hass, R.; Kasper, C., Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord. *Cell Commun Signal* **2009**, 7, 6.
101. Moretti, P.; Hatlapatka, T.; Marten, D.; Lavrentieva, A.; Majore, I.; Hass, R.; Kasper, C., Mesenchymal stromal cells derived from human umbilical cord tissues: primitive cells with

- potential for clinical and tissue engineering applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **2010**, 123, 29-54.
102. Casey, M. L.; MacDonald, P. C., Interstitial collagen synthesis and processing in human amnion: a property of the mesenchymal cells. *Biol Reprod* **1996**, 55, (6), 1253-60.
103. Alviano, F.; Fossati, V.; Marchionni, C.; Arpinati, M.; Bonsi, L.; Franchina, M.; Lanzoni, G.; Cantoni, S.; Cavallini, C.; Bianchi, F.; Tazzari, P. L.; Pasquinelli, G.; Foroni, L.; Ventura, C.; Grossi, A.; Bagnara, G. P., Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol* **2007**, 7, 11.
104. Sung, H. J.; Hong, S. C.; Yoo, J. H.; Oh, J. H.; Shin, H. J.; Choi, I. Y.; Ahn, K. H.; Kim, S. H.; Park, Y.; Kim, B. S., Stemness evaluation of mesenchymal stem cells from placentas according to developmental stage: comparison to those from adult bone marrow. *J Korean Med Sci* 25, (10), 1418-26.
105. Fan, X.; Liu, T.; Liu, Y.; Ma, X.; Cui, Z., Optimization of primary culture condition for mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood with factorial design. *Biotechnol Prog* **2009**, 25, (2), 499-507.
106. Lechner, V.; Hocht, B.; Ulrichs, K.; Thiede, A.; Meyer, T., [Obtaining of mesenchymal progenitor cells from the human umbilical cord]. *Zentralbl Chir* **2007**, 132, (4), 358-64.
107. Lu, L. L.; Liu, Y. J.; Yang, S. G.; Zhao, Q. J.; Wang, X.; Gong, W.; Han, Z. B.; Xu, Z. S.; Lu, Y. X.; Liu, D.; Chen, Z. Z.; Han, Z. C., Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* **2006**, 91, (8), 1017-26.
108. Lupatov, A. Y.; Karalkin, P. A.; Suzdal'tseva, Y. G.; Burunova, V. V.; Yarygin, V. N.; Yarygin, K. N., Cytofluorometric analysis of phenotypes of human bone marrow and umbilical fibroblast-like cells. *Bull Exp Biol Med* **2006**, 142, (4), 521-6.
109. Walenda, T.; Bork, S.; Horn, P.; Wein, F.; Saffrich, R.; Diehlmann, A.; Eckstein, V.; Ho, A. D.; Wagner, W., Co-Culture with Mesenchymal Stromal Cells Increases Proliferation and Maintenance of Hematopoietic Progenitor Cells. *J Cell Mol Med* **2009**.
110. Wu, K. H.; Zhou, B.; Lu, S. H.; Feng, B.; Yang, S. G.; Du, W. T.; Gu, D. S.; Han, Z. C.; Liu, Y. L., In vitro and in vivo differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells. *J Cell Biochem* **2007**, 100, (3), 608-16.
111. Yan, Y.; Xu, W.; Qian, H.; Si, Y.; Zhu, W.; Cao, H.; Zhou, H.; Mao, F., Mesenchymal stem cells from human umbilical cords ameliorate mouse hepatic injury in vivo. *Liver Int* **2009**, 29, (3), 356-65.
112. Yu, Y.; Ren, H.; Yun, W.; Jin, Y.; Li, K.; Du, L., [Differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into chondroblast and osteoblasts]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* **2008**, 25, (6), 1385-9.
113. Liu, X. D.; Liu, B.; Li, X. S.; Mao, N., [Isolation and identification of mesenchymal stem cells from perfusion of human umbilical cord vein]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **2007**, 15, (5), 1019-22.
114. Diao, Y.; Ma, Q.; Cui, F.; Zhong, Y., Human umbilical cord mesenchymal stem cells: Osteogenesis in vivo as seed cells for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* **2008**.
115. Bakhshi, T.; Zabriskie, R. C.; Bodie, S.; Kidd, S.; Ramin, S.; Paganessi, L. A.; Gregory, S. A.; Fung, H. C.; Christopherson, K. W., 2nd, Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of umbilical cord segments provide stromal support for the maintenance of cord blood hematopoietic stem cells during long-term ex vivo culture. *Transfusion* **2008**, 48, (12), 2638-44.
116. Hou, T.; Xu, J.; Wu, X.; Xie, Z.; Luo, F.; Zhang, Z.; Zeng, L., Umbilical Cord Wharton's Jelly: A New Potential Cell Source of Mesenchymal Stromal Cells for Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A* **2009**.
117. Kadivar, M.; Khatami, S.; Mortazavi, Y.; Shokrgozar, M. A.; Taghikhani, M.; Soleimani, M., In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2006**, 340, (2), 639-47.

118. Kestendjieva, S.; Kyurkchiev, D.; Tsvetkova, G.; Mehandjiev, T.; Dimitrov, A.; Nikolov, A.; Kyurkchiev, S., Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. *Cell Biol Int* **2008**, *32*, (7), 724-32.
119. Qiao, C.; Xu, W.; Zhu, W.; Hu, J.; Qian, H.; Yin, Q.; Jiang, R.; Yan, Y.; Mao, F.; Yang, H.; Wang, X.; Chen, Y., Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. *Cell Biol Int* **2008**, *32*, (1), 8-15.
120. Kadam, S. S.; Tiwari, S.; Bhonde, R. R., Simultaneous isolation of vascular endothelial cells and mesenchymal stem cells from the human umbilical cord. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **2009**, *45*, (1-2), 23-7.
121. Jo, C. H.; Kim, O. S.; Park, E. Y.; Kim, B. J.; Lee, J. H.; Kang, S. B.; Lee, J. H.; Han, H. S.; Rhee, S. H.; Yoon, K. S., Fetal mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord sustain primitive characteristics during extensive expansion. *Cell Tissue Res* **2008**, *334*, (3), 423-33.
122. Martin-Rendon, E.; Sweeney, D.; Lu, F.; Girdlestone, J.; Navarrete, C.; Watt, S. M., 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies. *Vox Sang* **2008**, *95*, (2), 137-48.
123. Lu, L. L.; Song, Y. P.; Wei, X. D.; Fang, B. J.; Zhang, Y. L.; Li, Y. F., [Comparative characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord tissue and bone marrow]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **2008**, *16*, (1), 140-6.
124. Covas, D. T.; Panepucci, R. A.; Fontes, A. M.; Silva, W. A., Jr.; Orellana, M. D.; Freitas, M. C.; Neder, L.; Santos, A. R.; Peres, L. C.; Jamur, M. C.; Zago, M. A., Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol* **2008**, *36*, (5), 642-54.
125. Magin, A. S.; Koerfer, N. R.; Partenheimer, H.; Lange, C.; Zander, A.; Noll, T., Primary Cells As Feeder Cells For Coculture Expansion Of Human Hematopoietic Stem Cells From Umbilical Cord Blood A Comparative Study. *Stem Cells Dev* **2008**.
126. Kermani, A. J.; Fathi, F.; Mowla, S. J., Characterization and genetic manipulation of human umbilical cord vein mesenchymal stem cells: potential application in cell-based gene therapy. *Rejuvenation Res* **2008**, *11*, (2), 379-86.
127. Xu, J.; Liao, W.; Gu, D.; Liang, L.; Liu, M.; Du, W.; Liu, P.; Zhang, L.; Lu, S.; Dong, C.; Zhou, B.; Han, Z., Neural ganglioside GD2 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells in umbilical cord. *Cell Physiol Biochem* **2009**, *23*, (4-6), 415-24.
128. Zhang, Z. Y.; Teoh, S. H.; Chong, M. S.; Schantz, J. T.; Fisk, N. M.; Choolani, M. A.; Chan, J., Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared with perinatal and adult mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **2009**, *27*, (1), 126-37.
129. Weiss, M. L.; Anderson, C.; Medicetty, S.; Seshareddy, K. B.; Weiss, R. J.; VanderWerff, I.; Troyer, D.; McIntosh, K. R., Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells* **2008**, *26*, (11), 2865-74.
130. La Rocca, G.; Anzalone, R.; Corrao, S.; Magno, F.; Loria, T.; Lo Iacono, M.; Di Stefano, A.; Giannuzzi, P.; Marasa, L.; Cappello, F.; Zummo, G.; Farina, F., Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem Cell Biol* **2009**, *131*, (2), 267-82.
131. Carlin, R.; Davis, D.; Weiss, M.; Schultz, B.; Troyer, D., Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod Biol Endocrinol* **2006**, *4*, 8.
132. Hiroyama, T.; Sudo, K.; Aoki, N.; Miharada, K.; Danjo, I.; Fujioka, T.; Nagasawa, T.; Nakamura, Y., Human umbilical cord-derived cells can often serve as feeder cells to maintain primate embryonic stem cells in a state capable of producing hematopoietic cells. *Cell Biol Int* **2008**, *32*, (1), 1-7.

133. Majore, I.; Moretti, P.; Stahl, F.; Hass, R.; Kasper, C., Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord. *Stem Cell Rev* **2010**, *7*, (1), 17-31.
134. Chen, M. Y.; Lie, P. C.; Li, Z. L.; Wei, X., Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* **2009**, *37*, (5), 629-40.
135. Wu, L. F.; Wang, N. N.; Liu, Y. S.; Wei, X., Differentiation of Wharton's Jelly Primitive Stromal Cells into Insulin-Producing Cells in Comparison with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Part A* **2009**.
136. Ilancheran, S.; Moodley, Y.; Manuelpillai, U., Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta* **2009**, *30*, (1), 2-10.
137. Zhao, P.; Ise, H.; Hongo, M.; Ota, M.; Konishi, I.; Nikaido, T., Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation* **2005**, *79*, (5), 528-35.
138. Ventura, C.; Cantoni, S.; Bianchi, F.; Lionetti, V.; Cavallini, C.; Scarlata, I.; Foroni, L.; Maioli, M.; Bonsi, L.; Alviano, F.; Fossati, V.; Bagnara, G. P.; Pasquinelli, G.; Recchia, F. A.; Perbellini, A., Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. *J Biol Chem* **2007**, *282*, (19), 14243-52.
139. Susman, S.; Soritau, O.; Rus-Ciuca, D.; Tomuleasa, C.; Pop, V. I.; Miha, C. M., Placental stem cell differentiation into islets of Langerhans-like glucagon-secreting cells. *Rom J Morphol Embryol* **2010**, *51*, (4), 733-8.
140. Pereira, W. C.; Khushnooma, I.; Madkaikar, M.; Ghosh, K., Reproducible methodology for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord and its potential for cardiomyocyte generation. *J Tissue Eng Regen Med* **2008**, *2*, (7), 394-9.
141. Campard, D.; Lysy, P. A.; Najimi, M.; Sokal, E. M., Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. *Gastroenterology* **2008**, *134*, (3), 833-48.
142. Chao, K. C.; Chao, K. F.; Fu, Y. S.; Liu, S. H., Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. *PLoS ONE* **2008**, *3*, (1), e1451.
143. Chou, S. C.; Ko, T. L.; Fu, Y. Y.; Wang, H. W.; Fu, Y. S., Identification of genetic networks during mesenchymal stem cell transformation into neurons. *Chin J Physiol* **2008**, *51*, (4), 230-46.
144. Ma, L.; Cui, B. L.; Feng, X. Y.; Law, F. D.; Jiang, X. W.; Yang, L. Y.; Xie, Q. D.; Huang, T. H., [Biological characteristics of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells and their differentiation into neurocyte-like cells]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* **2006**, *44*, (7), 513-7.
145. Ciavarella, S.; Dammacco, F.; De Matteo, M.; Loverro, G.; Silvestris, F., Umbilical cord mesenchymal stem cells: role of regulatory genes in their differentiation to osteoblasts. *Stem Cells Dev* **2009**.
146. Sudo, K.; Kanno, M.; Miharada, K.; Ogawa, S.; Hiroshima, T.; Saijo, K.; Nakamura, Y., Mesenchymal progenitors able to differentiate into osteogenic, chondrogenic, and/or adipogenic cells in vitro are present in most primary fibroblast-like cell populations. *Stem Cells* **2007**, *25*, (7), 1610-7.
147. Suzdal'tseva, Y. G.; Burunova, V. V.; Vakhrushev, I. V.; Yarygin, V. N.; Yarygin, K. N., Capability of human mesenchymal cells isolated from different sources to differentiation into tissues of mesodermal origin. *Bull Exp Biol Med* **2007**, *143*, (1), 114-21.
148. Tian, X.; Fu, R. Y.; Chen, Y.; Yuan, L. X., [Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from the tissue of umbilical cord for osteoblasts and adipocytes differentiation]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **2008**, *39*, (1), 26-9.
149. Passeri, S.; Nocchi, F.; Lamanna, R.; Lapi, S.; Miragliotta, V.; Giannessi, E.; Abramo, F.; Stornelli, M. R.; Matarazzo, M.; Planteda, D.; Urciuoli, P.; Scatena, F.; Coli, A., Isolation

- and expansion of equine umbilical cord-derived matrix cells (EUCMCs). *Cell Biol Int* **2009**, 33, (1), 100-5.
150. Honsawek, S.; Dhitiseith, D.; Phupong, V., Effects of demineralized bone matrix on proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord. *J Med Assoc Thai* **2006**, 89 Suppl 3, S189-95.
151. Karahuseyinoglu, S.; Kocafele, C.; Balci, D.; Erdemli, E.; Can, A., Functional structure of adipocytes differentiated from human umbilical cord stroma-derived stem cells. *Stem Cells* **2008**, 26, (3), 682-91.
152. Battula, V. L.; Treml, S.; Bareiss, P. M.; Gieseke, F.; Roelofs, H.; de Zwart, P.; Muller, I.; Schewe, B.; Skutella, T.; Fibbe, W. E.; Kanz, L.; Buhning, H. J., Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica* **2009**, 94, (2), 173-84.
153. Buhning, H. J.; Battula, V. L.; Treml, S.; Schewe, B.; Kanz, L.; Vogel, W., Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann N Y Acad Sci* **2007**, 1106, 262-71.
154. Kode, J. A.; Mukherjee, S.; Joglekar, M. V.; Hardikar, A. A., Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy* **2009**, 11, (4), 377-91.
155. Ennis, J.; Gotherstrom, C.; Le Blanc, K.; Davies, J. E., In vitro immunologic properties of human umbilical cord perivascular cells. *Cytotherapy* **2008**, 10, (2), 174-81.
156. Yoo, K. H.; Jang, I. K.; Lee, M. W.; Kim, H. E.; Yang, M. S.; Eom, Y.; Lee, J. E.; Kim, Y. J.; Yang, S. K.; Jung, H. L.; Sung, K. W.; Kim, C. W.; Koo, H. H., Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunol* **2009**.
157. Bailo, M.; Soncini, M.; Vertua, E.; Signoroni, P. B.; Sanzone, S.; Lombardi, G.; Arienti, D.; Calamanti, F.; Zatti, D.; Paul, P.; Albertini, A.; Zorzi, F.; Cavagnini, A.; Candotti, F.; Wengler, G. S.; Parolini, O., Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. *Transplantation* **2004**, 78, (10), 1439-48.
158. Yang, C. C.; Shih, Y. H.; Ko, M. H.; Hsu, S. Y.; Cheng, H.; Fu, Y. S., Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord. *PLoS ONE* **2008**, 3, (10), e3336.
159. Liao, W.; Xie, J.; Zhong, J.; Liu, Y.; Du, L.; Zhou, B.; Xu, J.; Liu, P.; Yang, S.; Wang, J.; Han, Z.; Han, Z. C., Therapeutic effect of human umbilical cord multipotent mesenchymal stromal cells in a rat model of stroke. *Transplantation* **2009**, 87, (3), 350-9.
160. Breyman, C.; Schmidt, D.; Hoerstrup, S. P., Umbilical cord cells as a source of cardiovascular tissue engineering. *Stem Cell Rev* **2006**, 2, (2), 87-92.
161. Hoerstrup, S. P.; Kadner, A.; Breyman, C.; Maurus, C. F.; Guenter, C. I.; Sodian, R.; Visjager, J. F.; Zund, G.; Turina, M. I., Living, autologous pulmonary artery conduits tissue engineered from human umbilical cord cells. *Ann Thorac Surg* **2002**, 74, (1), 46-52; discussion 52.
162. Schmidt, D.; Mol, A.; Neuenschwander, S.; Breyman, C.; Gossi, M.; Zund, G.; Turina, M.; Hoerstrup, S. P., Living patches engineered from human umbilical cord derived fibroblasts and endothelial progenitor cells. *Eur J Cardiothorac Surg* **2005**, 27, (5), 795-800.
163. Lindenmair, A.; Wolbank, S.; Stadler, G.; Meinel, A.; Peterbauer-Scherb, A.; Eibl, J.; Polin, H.; Gabriel, C.; van Griensven, M.; Redl, H., Osteogenic differentiation of intact human amniotic membrane. *Biomaterials* 31, (33), 8659-65.
164. Moretti, P. Establishment of recombinant cell lines and characterization of primary cells for stem cell technology applications. Leibniz Universität Hannover, Hannover, 2010.
165. Raio, L.; Cromi, A.; Ghezzi, F.; Passi, A.; Karousou, E.; Viola, M.; Vigetti, D.; De Luca, G.; Bolis, P., Hyaluronan content of Wharton's jelly in healthy and Down syndrome fetuses. *Matrix Biol* **2005**, 24, (2), 166-74.
166. Lindl, T., *Zell- und Gewebekultur*. 6 ed.; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 2008; p 406.

167. PAN Biotech GmbH, *Citing web resources: Vorteile der Serumfreien Zellkultur*. [http://www.pan-biotech.com/content/index.php?option=com\\_content&view=article&id=145&Itemid=141&lang=de](http://www.pan-biotech.com/content/index.php?option=com_content&view=article&id=145&Itemid=141&lang=de) **2011. Letzter Zugriff am 02.02.2011.**
168. Spees, J. L.; Gregory, C. A.; Singh, H.; Tucker, H. A.; Peister, A.; Lynch, P. J.; Hsu, S. C.; Smith, J.; Prockop, D. J., Internalized antigens must be removed to prepare hypoinmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol Ther* **2004**, 9, (5), 747-56.
169. European Biomedical Research Association (EBRA), *Citing web resource: UK alternatives group questions use of fetal calf serum*. [http://www.ebra.org/ebrabulletin-uk/alternatives-group-questions-use-of-fetal-calf-serum\\_131.htm](http://www.ebra.org/ebrabulletin-uk/alternatives-group-questions-use-of-fetal-calf-serum_131.htm) **2004. Letzter Zugriff am 02.02.2011.**
170. Mellor, D. J.; Gregory, N. G., Responsiveness, behavioural arousal and awareness in fetal and newborn lambs: experimental, practical and therapeutic implications. *N Z Vet J* **2003**, 51, (1), 2-13.
171. Shahdadfar, A.; Fronsodal, K.; Haug, T.; Reinholt, F. P.; Brinchmann, J. E., In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells* **2005**, 23, (9), 1357-66.
172. Tateishi, K.; Ando, W.; Higuchi, C.; Hart, D. A.; Hashimoto, J.; Nakata, K.; Yoshikawa, H.; Nakamura, N., Comparison of human serum with fetal bovine serum for expansion and differentiation of human synovial MSC: potential feasibility for clinical applications. *Cell Transplant* **2008**, 17, (5), 549-57.
173. Le Blanc, K.; Samuelsson, H.; Lonnie, L.; Sundin, M.; Ringden, O., Generation of immunosuppressive mesenchymal stem cells in allogeneic human serum. *Transplantation* **2007**, 84, (8), 1055-9.
174. Bieback, K.; Hecker, A.; Kocaomer, A.; Lannert, H.; Schallmoser, K.; Strunk, D.; Kluter, H., Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells* **2009**, 27, (9), 2331-41.
175. Perez-Illarbe, M.; Diez-Campelo, M.; Aranda, P.; Tabera, S.; Lopez, T.; del Canizo, C.; Merino, J.; Moreno, C.; Andreu, E. J.; Prosper, F.; Perez-Simon, J. A., Comparison of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy. *Transfusion* **2009**, 49, (9), 1901-10.
176. Hartmann, I.; Hollweck, T.; Haffner, S.; Krebs, M.; Meiser, B.; Reichart, B.; Eissner, G., Umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells grow best under GMP-compliant culture conditions and maintain their phenotypic and functional properties. *J Immunol Methods* **2009**, 363, (1), 80-9.
177. Ornitz, D. M.; Xu, J.; Colvin, J. S.; McEwen, D. G.; MacArthur, C. A.; Coulier, F.; Gao, G.; Goldfarb, M., Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* **1996**, 271, (25), 15292-7.
178. Burgess, W. H.; Maciag, T., The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* **1989**, 58, 575-606.
179. van den Bos, C.; Mosca, J. D.; Winkles, J.; Kerrigan, L.; Burgess, W. H.; Marshak, D. R., Human mesenchymal stem cells respond to fibroblast growth factors. *Hum Cell* **1997**, 10, (1), 45-50.
180. Fernandes-Alnemri, T.; Armstrong, R. C.; Krebs, J.; Srinivasula, S. M.; Wang, L.; Bullrich, F.; Fritz, L. C.; Trapani, J. A.; Tomaselli, K. J.; Litwack, G.; Alnemri, E. S., In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, 93, (15), 7464-9.
181. Kumar, S.; Lavin, M. F., The ICE family of cysteine proteases as effectors of cell death. *Cell Death Differ* **1996**, 3, (3), 255-67.
182. Nicholson, D. W.; Ali, A.; Thornberry, N. A.; Vaillancourt, J. P.; Ding, C. K.; Gallant, M.; Gareau, Y.; Griffin, P. R.; Labelle, M.; Lazebnik, Y. A.; et al., Identification and inhibition

- of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **1995**, 376, (6535), 37-43.
183. Nicholson, D. W.; Thornberry, N. A., Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* **1997**, 22, (8), 299-306.
184. Rosen, A., Huntingtin: new marker along the road to death? *Nat Genet* **1996**, 13, (4), 380-2.
185. Tewari, M.; Quan, L. T.; O'Rourke, K.; Desnoyers, S.; Zeng, Z.; Beidler, D. R.; Poirier, G. G.; Salvesen, G. S.; Dixit, V. M., Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* **1995**, 81, (5), 801-9.
186. Thornberry, N. A.; Bull, H. G.; Calaycay, J. R.; Chapman, K. T.; Howard, A. D.; Kostura, M. J.; Miller, D. K.; Molineaux, S. M.; Weidner, J. R.; Aunins, J.; et al., A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **1992**, 356, (6372), 768-74.
187. Vaux, D. L.; Strasser, A., The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, 93, (6), 2239-44.
188. Promega Corporation, *Citing web resources: Technical Bulletin: Apo-ONE<sup>®</sup> Homogeneous Caspase-3/7 Assay*. <http://www.promega.com/tbs/tb295/tb295.pdf>, **2009**.  
**Letzter Zugriff am 02.02.2011.**
189. Goldstein, S., Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science* **1990**, 249, (4973), 1129-33.
190. Cristofalo, V. J.; Volker, C.; Francis, M. K.; Tresini, M., Age-dependent modifications of gene expression in human fibroblasts. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **1998**, 8, (1), 43-80.
191. Linskens, M. H.; Feng, J.; Andrews, W. H.; Enlow, B. E.; Saati, S. M.; Tonkin, L. A.; Funk, W. D.; Villeponteau, B., Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display. *Nucleic Acids Res* **1995**, 23, (16), 3244-51.
192. Sherwood, S. W.; Rush, D.; Ellsworth, J. L.; Schimke, R. T., Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**, 85, (23), 9086-90.
193. Dimri, G. P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C.; Medrano, E. E.; Linskens, M.; Rubelj, I.; Pereira-Smith, O.; et al., A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, 92, (20), 9363-7.
194. Bianchi, G.; Banfi, A.; Mastrogiacomo, M.; Notaro, R.; Luzzatto, L.; Cancedda, R.; Quarto, R., Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp Cell Res* **2003**, 287, (1), 98-105.
195. Solchaga, L. A.; Penick, K.; Porter, J. D.; Goldberg, V. M.; Caplan, A. I.; Welter, J. F., FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* **2005**, 203, (2), 398-409.
196. Tsutsumi, S.; Shimazu, A.; Miyazaki, K.; Pan, H.; Koike, C.; Yoshida, E.; Takagishi, K.; Kato, Y., Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**, 288, (2), 413-9.
197. Sotiropoulou, P. A.; Perez, S. A.; Salagianni, M.; Baxevanis, C. N.; Papamichail, M., Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **2006**, 24, (2), 462-71.
198. Chow, D. C.; Wenning, L. A.; Miller, W. M.; Papoutsakis, E. T., Modeling pO<sub>2</sub> distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model. *Biophys J* **2001**, 81, (2), 675-84.
199. Harrison, J. S.; Rameshwar, P.; Chang, V.; Bandari, P., Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood* **2002**, 99, (1), 394.
200. Abdollahi, H.; Harris, L. J.; Zhang, P.; McIlhenny, S.; Srinivas, V.; Tulenko, T.; DiMuzio, P. J., The role of hypoxia in stem cell differentiation and therapeutics. *J Surg Res* **2009**, 165, (1), 112-7.



201. Lavrentieva, A.; Majore, I.; Kasper, C.; Hass, R., Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell Commun Signal* **2010**, 8, 18.
202. Banfalvi, G., Cell cycle synchronization of animal cells and nuclei by centrifugal elutriation. *Nat. Protocols* **2008**, 3, (4), 663.
203. Beckman Instruments Inc., *Citing web resources: Developing Elutriation Protocols*. <http://www.beckmancoulter.com/literature/Bioresearch/1785A%28T%29.pdf> **1994**. **Letzter Zugriff am 04.03.2011**.
204. Bachere, E.; Chagot, D.; Grizel, H., Cell separation by centrifugal elutriation. *American Fisheries Society Special Publication*, **1988**, 18, 281-285.
205. Winkler, R. Diplomarbeit. Leibniz Universität Hannover, Hannover, 2011.
206. Rosen, E. D.; Spiegelman, B. M., PPAR $\gamma$ : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* **2001**, 276, (41), 37731-4.
207. Tontonoz, P.; Hu, E.; Graves, R. A.; Budavari, A. I.; Spiegelman, B. M., mPPAR $\gamma$  2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* **1994**, 8, (10), 1224-34.
208. Frayn, K. N.; Karpe, F.; Fielding, B. A.; Macdonald, I. A.; Coppack, S. W., Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* **2003**, 27, (8), 875-88.
209. Hu, E.; Liang, P.; Spiegelman, B. M., AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* **1996**, 271, (18), 10697-703.
210. Ryden, M.; Dicker, A.; Gotheystrom, C.; Astrom, G.; Tammik, C.; Arner, P.; Le Blanc, K., Functional characterization of human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **2003**, 311, (2), 391-7.
211. Sarugaser, R.; Ennis, J.; Stanford, W. L.; Davies, J. E., Isolation, propagation, and characterization of human umbilical cord perivascular cells (HUCPVCs). *Methods Mol Biol* **2009**, 482, 269-79.
212. Fink, T.; Abildtrup, L.; Fogd, K.; Abdallah, B. M.; Kassem, M.; Ebbesen, P.; Zachar, V., Induction of adipocyte-like phenotype in human mesenchymal stem cells by hypoxia. *Stem Cells* **2004**, 22, (7), 1346-55.
213. Lee, J. H.; Kemp, D. M., Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* **2006**, 341, (3), 882-8.
214. Jerrentrup, C. Differenzierung mesenchymaler Stammzell-ähnlicher Zellen aus Nabelschnur. Leibniz Universität Hannover, Hannover, 2009.
215. Neumann, A. Untersuchungen zum Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen aus Nabelschnurgewebe in statischer und dynamischer Kultur. Leibniz Universität Hannover, Hannover, 2010.
216. Khan, W. S.; Adesida, A. B.; Hardingham, T. E., Hypoxic conditions increase hypoxia-inducible transcription factor 2 $\alpha$  and enhance chondrogenesis in stem cells from the infrapatellar fat pad of osteoarthritis patients. *Arthritis Res Ther* **2007**, 9, (3), R55.
217. Scherer, K.; Schunke, M.; Sellckau, R.; Hassenpflug, J.; Kurz, B., The influence of oxygen and hydrostatic pressure on articular chondrocytes and adherent bone marrow cells in vitro. *Biorheology* **2004**, 41, (3-4), 323-33.
218. Wang, D. W.; Fermor, B.; Gimble, J. M.; Awad, H. A.; Guilak, F., Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells. *J Cell Physiol* **2005**, 204, (1), 184-91.
219. Ducy, P.; Zhang, R.; Geoffroy, V.; Ridall, A. L.; Karsenty, G., Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **1997**, 89, (5), 747-54.
220. Komori, T.; Yagi, H.; Nomura, S.; Yamaguchi, A.; Sasaki, K.; Deguchi, K.; Shimizu, Y.; Bronson, R. T.; Gao, Y. H.; Inada, M.; Sato, M.; Okamoto, R.; Kitamura, Y.; Yoshiki, S.; Kishimoto, T., Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **1997**, 89, (5), 755-64.
221. Otto, F.; Thornell, A. P.; Crompton, T.; Denzel, A.; Gilmour, K. C.; Rosewell, I. R.; Stamp, G. W.; Beddington, R. S.; Mundlos, S.; Olsen, B. R.; Selby, P. B.; Owen, M. J.,

- Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* **1997**, 89, (5), 765-71.
222. Hou, T.; Xu, J.; Wu, X.; Xie, Z.; Luo, F.; Zhang, Z.; Zeng, L., Umbilical cord Wharton's Jelly: a new potential cell source of mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A* **2009**, 15, (9), 2325-34.
223. Girdlestone, J.; Limbani, V. A.; Cutler, A. J.; Navarrete, C. V., Efficient expansion of mesenchymal stromal cells from umbilical cord under low serum conditions. *Cytotherapy* **2009**, 11, (6), 738-48.
224. Boquest, A. C.; Shahdadfar, A.; Fronsdal, K.; Sigurjonsson, O.; Tunheim, S. H.; Collas, P.; Brinchmann, J. E., Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture. *Mol Biol Cell* **2005**, 16, (3), 1131-41.
225. Mitchell, J. B.; McIntosh, K.; Zvonic, S.; Garrett, S.; Floyd, Z. E.; Kloster, A.; Di Halvorsen, Y.; Storms, R. W.; Goh, B.; Kilroy, G.; Wu, X.; Gimble, J. M., Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* **2006**, 24, (2), 376-85.
226. Yoshimura, K.; Shigeura, T.; Matsumoto, D.; Sato, T.; Takaki, Y.; Aiba-Kojima, E.; Sato, K.; Inoue, K.; Nagase, T.; Koshima, I.; Gonda, K., Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol* **2006**, 208, (1), 64-76.
227. Ishige, I.; Nagamura-Inoue, T.; Honda, M.; Harnprasopwat, R.; Kido, M.; Sugimoto, M.; Nakauchi, H.; Tojo, A., Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. *International Journal of Hematology* **2009**, 90, (2), 261.
228. Can, A.; Karahuseyinoglu, S., Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells* **2007**, 25, (11), 2886-95.
229. D'Ippolito, G.; Diabira, S.; Howard, G. A.; Roos, B. A.; Schiller, P. C., Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Bone* **2006**, 39, (3), 513-22.
230. Malladi, P.; Xu, Y.; Chiou, M.; Giaccia, A. J.; Longaker, M. T., Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **2006**, 290, (4), C1139-46.
231. Grayson, W. L.; Zhao, F.; Bunnell, B.; Ma, T., Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2007**, 358, (3), 948-53.
232. Grayson, W. L.; Zhao, F.; Izadpanah, R.; Bunnell, B.; Ma, T., Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J Cell Physiol* **2006**, 207, (2), 331-9.
233. Lin, Q.; Lee, Y. J.; Yun, Z., Differentiation arrest by hypoxia. *J Biol Chem* **2006**, 281, (41), 30678-83.
234. Lennon, D. P.; Edmison, J. M.; Caplan, A. I., Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *J Cell Physiol* **2001**, 187, (3), 345-55.
235. Kreß, S. laufende Dissertation. Leibniz Universität Hannover, Hannover.
236. Devine, S. M.; Cobbs, C.; Jennings, M.; Bartholomew, A.; Hoffman, R., Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* **2003**, 101, (8), 2999-3001.
237. Kraitman, D. L.; Heldman, A. W.; Atalar, E.; Amado, L. C.; Martin, B. J.; Pittenger, M. F.; Hare, J. M.; Bulte, J. W., In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Circulation* **2003**, 107, (18), 2290-3.
238. Pochampally, R. R.; Neville, B. T.; Schwarz, E. J.; Li, M. M.; Prockop, D. J., Rat adult stem cells (marrow stromal cells) engraft and differentiate in chick embryos without evidence of cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, 101, (25), 9282-5.

239. Deans, R. J.; Moseley, A. B., Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* **2000**, 28, (8), 875-84.
240. Di Nicola, M.; Carlo-Stella, C.; Magni, M.; Milanese, M.; Longoni, P. D.; Matteucci, P.; Grisanti, S.; Gianni, A. M., Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* **2002**, 99, (10), 3838-43.
241. Le Blanc, K.; Tammik, C.; Rosendahl, K.; Zetterberg, E.; Ringden, O., HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* **2003**, 31, (10), 890-6.
242. Le Blanc, K.; Tammik, L.; Sundberg, B.; Haynesworth, S. E.; Ringden, O., Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* **2003**, 57, (1), 11-20.
243. Uccelli, A.; Moretta, L.; Pistoia, V., Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* **2006**, 36, (10), 2566-73.
244. Bartholomew, A.; Sturgeon, C.; Siatskas, M.; Ferrer, K.; McIntosh, K.; Patil, S.; Hardy, W.; Devine, S.; Ucker, D.; Deans, R.; Moseley, A.; Hoffman, R., Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* **2002**, 30, (1), 42-8.
245. Le Blanc, K.; Rasmusson, I.; Sundberg, B.; Gotherstrom, C.; Hassan, M.; Uzunel, M.; Ringden, O., Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* **2004**, 363, (9419), 1439-41.
246. Ringden, O.; Uzunel, M.; Rasmusson, I.; Remberger, M.; Sundberg, B.; Lonnie, H.; Marschall, H. U.; Dlugosz, A.; Szakos, A.; Hassan, Z.; Omazic, B.; Aschan, J.; Barkholt, L.; Le Blanc, K., Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* **2006**, 81, (10), 1390-7.
247. Weiss, M. L.; Mitchell, K. E.; Hix, J. E.; Medicetty, S.; El-Zarkouny, S. Z.; Grieger, D.; Troyer, D. L., Transplantation of porcine umbilical cord matrix cells into the rat brain. *Exp Neurol* **2003**, 182, (2), 288-99.
248. Delves Peter J. Et. Al, *Roitt's Essential Immunology*. 11 ed.; Blackwell Publishers Ltd/business: 2006.
249. Parish, C. R., Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol* **1999**, 77, (6), 499-508.
250. Molecular Probes, *Citing web resources: CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit*. <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp34554.pdf> **2005. Letzter Zugriff am 04.02.2011.**
251. Glennie, S.; Soeiro, I.; Dyson, P. J.; Lam, E. W.; Dazzi, F., Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* **2005**, 105, (7), 2821-7.
252. Krampera, M.; Glennie, S.; Dyson, J.; Scott, D.; Laylor, R.; Simpson, E.; Dazzi, F., Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* **2003**, 101, (9), 3722-9.
253. Puissant, B.; Barreau, C.; Bourin, P.; Clavel, C.; Corre, J.; Bousquet, C.; Taureau, C.; Cousin, B.; Abbal, M.; Laharrague, P.; Penicaud, L.; Casteilla, L.; Blancher, A., Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* **2005**, 129, (1), 118-29.
254. Pierdomenico, L.; Bonsi, L.; Calvitti, M.; Rondelli, D.; Arpinati, M.; Chirumbolo, G.; Becchetti, E.; Marchionni, C.; Alviano, F.; Fossati, V.; Staffolani, N.; Franchina, M.; Grossi, A.; Bagnara, G. P., Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* **2005**, 80, (6), 836-42.
255. Walport, K. M. P. T. M., *Janeway's Immunobiology*. 7th ed.; Taylor & Francis: 2008.
256. Sotiropoulou, P. A.; Perez, S. A.; Gritzapis, A. D.; Baxevanis, C. N.; Papamichail, M., Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* **2006**, 24, (1), 74-85.

257. Spaggiari, G. M.; Capobianco, A.; Becchetti, S.; Mingari, M. C.; Moretta, L., Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* **2006**, 107, (4), 1484-90.
258. Rizzo, R.; Vercammen, M.; van de Velde, H.; Horn, P. A.; Rebmann, V., The importance of HLA-G expression in embryos, trophoblast cells, and embryonic stem cells. *Cell Mol Life Sci* 68, (3), 341-52.
259. Clements, C. S.; Kjer-Nielsen, L.; Kostenko, L.; Hoare, H. L.; Dunstone, M. A.; Moses, E.; Freed, K.; Brooks, A. G.; Rossjohn, J.; McCluskey, J., Crystal structure of HLA-G: A nonclassical MHC class I molecule expressed at the fetal-maternal interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, 102, (9), 3360-3365.
260. Klyushnenkova, E.; Mosca, J. D.; Zernetkina, V.; Majumdar, M. K.; Beggs, K. J.; Simonetti, D. W.; Deans, R. J.; McIntosh, K. R., T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci* **2005**, 12, (1), 47-57.
261. Le Blanc, K.; Rasmusson, I.; Gotherstrom, C.; Seidel, C.; Sundberg, B.; Sundin, M.; Rosendahl, K.; Tammik, C.; Ringden, O., Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol* **2004**, 60, (3), 307-15.
262. Tse, W. T.; Pendleton, J. D.; Beyer, W. M.; Egalka, M. C.; Guinan, E. C., Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* **2003**, 75, (3), 389-97.
263. Bachmann, M. F.; Oxenius, A., Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Rep* **2007**, 8, (12), 1142-8.
264. Wang, X.; Rickert, M.; Garcia, K. C., Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gamma receptors. *Science* **2005**, 310, (5751), 1159-63.
265. Rasmusson, I.; Ringden, O.; Sundberg, B.; Le Blanc, K., Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res* **2005**, 305, (1), 33-41.
266. Meisel, R.; Zibert, A.; Laryea, M.; Gobel, U.; Daubener, W.; Dilloo, D., Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* **2004**, 103, (12), 4619-21.
267. Munn, D. H.; Zhou, M.; Attwood, J. T.; Bondarev, I.; Conway, S. J.; Marshall, B.; Brown, C.; Mellor, A. L., Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* **1998**, 281, (5380), 1191-3.
268. Aggarwal, S.; Pittenger, M. F., Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **2005**, 105, (4), 1815-22.
269. Bassi, E.; Aita, C.; Câmara, N., Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? *World J Stem Cells* **2011**, 3, (1), 1-8.
270. Corcione, A.; Benvenuto, F.; Ferretti, E.; Giunti, D.; Cappiello, V.; Cazzanti, F.; Risso, M.; Gualandi, F.; Mancardi, G. L.; Pistoia, V.; Uccelli, A., Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* **2006**, 107, (1), 367-72.
271. Ponte, A. L.; Marais, E.; Gallay, N.; Langonne, A.; Delorme, B.; Herault, 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. *Stem Cells* **2007**, 25, (7), 1737-45.
272. Son, B. R.; Marquez-Curtis, L. A.; Kucia, M.; Wysoczynski, M.; Turner, A. R.; Ratajczak, J.; Ratajczak, M. Z.; 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. *Stem Cells* **2006**, 24, (5), 1254-64.

## 5 Anhang

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
BD Falcon Cell Strainers, 70µm	BD Biosciences, Heidelberg
Kryoröhrchen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Millicell culture plate inserts	Millipore, Schwalbach
Reagiergefäße (1,5ml und 2ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Petrischalen (60mm)	Greiner Bio One, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Schutzhandschuhe Semperguard	Semperit AG Holding, Vienna
Serologische Pipetten (1, 2, 5, 10, 25, 50ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Sterilfilter, Minisart (0,2µm)	Sartorius-Stedim Biotech GmbH, Göttingen
T-Flaschen (25, 75 und 175 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Well-Platten (6-, 12- und 96-Wells)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (15ml und 50ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

#### 5.1.2 Primer

Name	Produkt- größe [bp]	5' forward	3' reverse	Annealing Temp. [°C]
PPAR $\gamma$	257	gaccactcccactcctttga	cgacattcaattgccatgag	60,1
RUNX2	280	tctggccttcactctcagt	tatggagtgctgctggtctg	60,0

### 5.1.3 Antikörper

Die Liste der Antikörper wurde adaptiert aus <sup>163</sup>.

[µg/ml]	Company	Antigen	Fluorophore	Reactivity	Isotype	Product#
<b>Labeled antibodies</b>						
	Invitrogen	HLA I	FITC	human	Mouse IgG2a	MHBC01 0.800
	BD	Oct3/4	PE	mouse/human	Mouse IgG1, κ	560186 0.013
	BD	SSEA-1	FITC	mouse/human	Mouse IgM, κ	560127 0.013
	Miltenyi Biotec	CD31	FITC	human	Mouse IgG1	130-092-654 0.077
	BD	CD34	FITC	human	Mouse IgG1, κ	555821 0.006
	BD	CD34	PE-Cy5	human		555823 0.006
	BD	CD 45	PE-Cy5	human		555484 0.002
	BD	CD 45	FITC	human	Mouse IgG1, κ	555482 0.006
	BD	CD 44	PE	human	Mouse IgG1, κ	550989 0.013
	BD	CD73	PE	human	Mouse IgG1, κ	550257 0.006
	BD	CD 90	FITC	human	Mouse IgG1, κ	555595 0.500
	Invitrogen	CD105	R-PE	human	Mouse IgG1	MHCD10504 0.100
	Miltenyi Biotec	CD271	PE	human	Mouse IgG1	130-091-885 /
<b>Primary antibodies</b>						
	BD	GD2	/	human	Mouse IgG2a	554272 0.500
	Santa cruz biotec	Runx2	/	human	mouse IgG2b	sc-101145 0.100
	Santa cruz biotec	His6	/	/	Mouse IgG2b	sc-57598 0.100
<b>Secondary antibody</b>						
	BD	mouse IG	PE	mouse	Goat Ig	550589 0.200
<b>Isotype controls</b>						
	BD			FITC	Mouse IgM, κ	553474 0.500
	BD			PE	Mouse IgM, κ	555584 0.050
	BD			FITC	Mouse IgG2a, κ	553456 0.500
	BD			FITC	Mouse IgG1, κ	555748 0.050
	BD			PE	Mouse IgG1, κ	555749 0.050
	Invitrogen			FITC	Mouse IgG2a	MG2a01 0.100
	Invitrogen			R-PE	Mouse IgG1	MG104 0.100
	BD			PE-Cy5	Mouse IgG1, κ	555750 0.006

#### 5.1.4 Kits

<b>Produkt</b>	<b>Anbieter</b>
Apo-ONE® Homogeneous Caspase3-/7 Assay	Promega, Mannheim
β-Galactosidase Staining Kit	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNeasy Plus Mini Kit	QIAGEN, Hilden

#### 5.1.5 Chemikalien

<b>Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
α MEM (Pulver)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
β-Glycerolphosphat	Fluka Chemie AG, Buchs
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Agarose ABgene	Thermo Fisher Scientific Inc., Epsom, UK
Alcianblau 8GX	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Alizarin Rot S	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Amphotericin B	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CaCl <sub>2</sub>	Fluka Chemie AG, Buchs
Calcein	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CFSE	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
CellTiterBlue	Promega Cooperation, Madison
DAPI	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DEPC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dexamethason-21-di-Natrium-Phosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMEM (Pulver)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt

EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt
Essigsäure	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
FCS <i>“standard quality”</i>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
FCS <i>“gold quality”</i>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
FCS <i>“heat inactivated”</i>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
FCS <i>“pre-tested for amnion cells”</i>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
FGF- 2	tebu-bio, Offenbach
Fibronektin	Roche GmbH, Penzberg
Gelatine	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Gentamycin (10 mg/mL)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Humanes Serumalbumin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Humanserum	Institut für Transfusionsmedizin, Medizinische Hochschule Hannover
Hyaluronidase (vom Rind)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Insulin-Transferrin- Sodiumpelenit (ITS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
KCl	Fluka Chemie AG, Buchs
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fluka Chemie AG, Buchs
Kollagenase Typ II	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kollagenase Typ I	Worthington, Lakewood, NJ
L-Ascorbat-2-phosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Methanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe



MgCl <sub>2</sub>	Merck KGaA, Darmstadt
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Fluka Chemie AG, Buchs
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fluka Chemie AG, Buchs
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub>	Fluka Chemie AG, Buchs
NH AdipoDiff Medium	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
NH ChondroDiff Medium	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
NH OsteoDiff Medium	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
dNTP	Fermentas, St. Leon- Rot
Oil Red O	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
oligo(dT) Primer	Promega Cooperation, Madison
para-Formaldehyd	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Phytohämagglutinin (PHA)- M	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Propidiumiodid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
reverse Transkriptase	Promega Cooperation, Madison
Sibernitratlösung	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
taq-Polymerase	OLS Omni Life Science, Bremen
Trypanblau	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

---

### 5.1.6 Geräte und Laboraustattung

Gerät	Hersteller
Analysenwaage Analytik AC 210S	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav	Integra Bioscience Tecnomeric Deutschland GmbH
CASY <sup>®</sup> 1 DT Cell Counter	Roche Innovatis AG, Penzberg
Cell <sup>B</sup> Imaging Software	Olympus Corporation, Puchheim

Digitalkamera Olympus Camedia C-4040 Zoom	Olympus Corporation, Puchheim
Durchflusszytometer Epics XL/MCL Filter: FL1: BP 505-545nm, FL2: BP 560-590nm, FL3: 660-690nm	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Elutriationskammer 5 ml, Standart	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Elutriationsrotor JE-5,0	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Elutriationszentrifuge J6-MC	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Fluorskan Ascent	Thermo Fisher Science, Inc., Waltham
Fluoreszenzmikroskop IX50	Olympus Corporation, Tokio
Gelstation ClassicTM	Thermo Fisher Science, Inc., Waltham
Gel Dokumentation Gel IX Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH
Glasflaschen	Schott Duran, Prag
Inkubator Hera Cell 240	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Kryocontainer Nalgene® Cryo 1°C	Krackeler Scientific, Inc. NY, USA
Microplate Reader Benchmark 680	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Orbitalshaker Zellkultur DOS-10M Elmi Skyline	Elmi Ltd., Riga, Lettland
PCR-Thermocycler Px2 Thermal Cycler	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
pH-Elektrode Checker®	Hanna Instruments Ltd, Leighton Buzzard
Phasenkontrastmikroskop BX41	Olympus Corporation, Tokio
Photospektrometer „ND1000“	Nano Drop Technologies, Wilmington
Pipetten Research®	Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG
Pumpe Ismatec ip-4	Ismatec Engineering, Aachen
Rührer Ikamag® REO	IKA Labortechnik, Staufen
Schüttler Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf
Sterilbank Technoflow 2F150-II GS	Integra Bioscience AG, Zürich
Ultra Turrax T10 basic	IKA Labortechnik, Staufen
Ultraschallbad Bandelin Sonorex Super RK 510 H	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG
UV-Lampe	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Vi-Cell 1,01 Counter	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Wasseraufbereitungsanlage Arium	Satorius AG, Göttingen

Wasserbad	Memmert GmbH, Büchenbach
YSI 2300 STAT PLUS	Kreienbaum, Langenfeld
Zählkammer	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Zentrifuge centrifuge 5702	Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf
Zentrifuge centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf

---

### 5.1.7 Primärzellen

#### *Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs)*

Die PBMCs wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Britta Eiz-Vesper (Institut für Transfusionsmedizin, Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden aus dem peripheren Blut mittels Lymphosep (c.c.pro, Oberdorla) Dichtegradientenzentrifugation isoliert.

#### *MSCs aus Nabelschnurgewebe*

Die Verwendung des biologischen Materials wurde von der Ethikkommission unter der Projektnummer 3037 in einer verlängerten Genehmigung am 17. Juni 2006 zugelassen. Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten UC-MSCs sind in untenstehender Tabelle zusammengefasst

<b>Name</b>	<b>Tag der Isolation</b>
MK2407	24.07.2007
NS010408	01.04.2008
HD140509	14.05.2009
NS051009	05.10.2009
AK270410	27.04.2010
RK270410	27.04.2010
NS300810	30.08.2010
NS2070910	07.09.2010

### *MSCs aus humanem Fettgewebe*

Die MSCs (huF53 (N127)) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Martijn van Griensven (Ludwig Boltzmann Institut für experimentelle und klinische Traumatologie, Wien, Österreich) zur Verfügung gestellt.

### **5.1.8 Zellkulturmedien**

#### *UC-MSC Expansionsmedium*

Die routinemäßige Kultivierung der UC-MSCs erfolgte in  $\alpha$ MEM, welches mit Gentamycin (50  $\mu$ g/ ml) und 10% HS versetzt wurde. Das HS wurde vom Institut für Transfusionsmedizin der Medizinischen Hochschule Hannover bezogen. Es wurden stets Seren mehrerer Spender gepoolt, ohne Beachtung der Blutgruppe oder des Rhesusfaktors.

#### *UC-MSC Kontrollmedium Differenzierung*

Für Kontrollansätze bei Differenzierungsexperimenten wurden UC-MSCs in DMEM *high glucose*, welches mit Gentamycin (50  $\mu$ g/ ml) und 5% HS versetzt wurde, kultiviert.

#### *UC-MSC Differenzierungsmedium*

Die Differenzierung von UC-MSCs erfolgte in den Medien NHAdipoDiff, NH ChondroDiff, bzw. NH OsteoDiff (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach), welche zusätzlich mit Gentamycin (50 $\mu$ g/ ml) versetzt wurden.

### **5.1.9 Puffer und Lösungen**

#### *Agarose Gelelektrophorese*

<i>Name</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Ladepuffer	95% Formamide, 0,05 mM EDTA, je 0,025 % SDS, Bromphenolblau, Xylencyanol FF, Ethidiumbromid
TAE Laufpuffer	40 mM Tris Base, 1 mM EDTA, pH 8

### *CFSE Färbung*

<i>Name</i>	<i>Zusammensetzung</i>
CFSE Stammlösung	5 mM CFSE in DMSO
CFSE Arbeitslösung	2 $\mu$ M CFSE Stammlösung in PBS (mit 2% FCS)

### *Histologische Färbungen*

<i>Name</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Alcianblau Lösung	1 % Alcianblau w/v in 3% Essigsäure (pH 2,5)
Alizarin Rot S Reagenz	1% Alizarin Rot S in 2% EtOH
Blockierlösung	2 % FCS in PBS
DAPI Lösung	Verdünnung der Stammlösung (500 $\mu$ g/ ml) 1:1000 in DAPI Färbepuffer
DAPI Färbepuffer	100 mM TRIS pH 7, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 % Nonidet-P 400
FITC Lösung	12 mg FITC in 20 mL 50% EtOH
Kristallviolett	0,5% Kristallviolett in Methanol
Oil Red O	0,5 % Oil Red O in 70% Ethanol bei 56°C über Nacht im Wasserbad lösen
para-Formaldehyd	4 % Paraformaldehyd in PBS bei 90°C im Wasserbad ca. 1 h lang lösen
Propidiumiodid Lösung	50 $\mu$ g/ ml in 0,9 % NaCl
Von Kossa AgNO <sub>3</sub> Lösung	5 % AgNO <sub>3</sub> in ddH <sub>2</sub> O
Von Kossa Formaldehyd Lösung	5% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> und 0,2% Formaldehyde in ddH <sub>2</sub> O

### *Nabelschnurtransport*

<i>Name</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Transportpuffer	5 g/L Glucose, 50 $\mu$ g/mL Gentamycin, 2,5 $\mu$ g/mL Amphotericin B, 100 U/mL Penicillin und 100 $\mu$ g/mL Streptomycin in PBS

### *Phosphate Buffered Saline (PBS)*

140 mM NaCl, 27 mM KCl, 7,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 14,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in ddH<sub>2</sub>O; pH = 7,4

### *Zellkultur*

<i>Name</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Trypanblau	0,4 % Trypanblau w/v in physiologischer Kochsalzlösung
Trypsin	0,2 % Trypsin, pH 7,5 in PBS, 0,02 % EDTA

## **5.2 Methoden**

### **5.2.1 Zellkultur**

#### *Allgemeiner Absatz zu Arbeiten in der Zellkultur*

Sterile Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank der Klasse II (laminare Luftströmung) durchgeführt. Lösungen und Flaschen wurden für 30 min bei 120 °C autoklaviert, bzw. sterilfiltriert. Es wurde Isopropanol (70 %) zur Sterilisation verwendet. Verwendete Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, vor Gebrauch im Wasserbad bei 37 °C vorgewärmt

#### *Isolierung von UC-MSCs aus Nabelschnurgewebe*

Eine detaillierte Beschreibung der Methodik zur Isolierung von UC-MSCs aus Nabelschnurgewebe ist in Abschnitt 3.1 zu finden.

#### *Subkultivierung von UC-MSCs*

UC-MSCs wurde routinemäßig in 25, 75 und 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in Expansionsmedium kultiviert. Die Zellen wurden in einer Dichte von 4000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert und bis zum Erreichen einer Konfluenz von ca. 80%- 90% kultiviert. Wurde diese erreicht, wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde der Zellrasen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Akkutase inkubiert (5 min bei 37 °C). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Medium gestoppt und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation (5 min bei 200g und RT) wurde das Zellpellet erneut im Expansionsmedium resuspendiert.

### *Kryokonservierung von UC-MSCs*

UC-MSCs wurden in 1 ml Aliquoten in einer Dichte von ca.  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml in Kryomedium eingefroren, welches aus 80% HS, 10%  $\alpha$ MEM und 10% DMSO bestand. Die Zellen wurden über Nacht graduell mit einer Rate von 1 °C/min in einem Kryocontainer bei -80 °C eingefroren und anschließend in die Gasphase von flüssigem Stickstoff überführt.

### *Revitalisieren von UC-MSCs*

Das Revitalisieren von UC-MSCs wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- ▾ Das Kryoröhrchen Wasserbad bei 37°C schwenken, bis sich das Eis aufgelöst hat, die Zellsuspension aber noch kalt ist.
- ▾ Die Zellsuspension mit 1 ml kaltem  $\alpha$ MEM auffüllen und 2 min stehen lassen
- ▾ Die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführen, mit 2 ml  $\alpha$ MEM beschichten und 2 min stehen lassen
- ▾ Die Zellsuspension auf 10 ml mit  $\alpha$ MEM auffüllen und 1 min stehen lassen
- ▾ Die Zellen zentrifugieren (5 min, 200 g), in vorgewärmten Expansionsmedium aufnehmen

## **5.2.2 Differenzierungen**

### *Fibronektinbeschichtung*

Zur gezielten Differenzierung von UC-MSCs wurden die Zellkulturgefäßoberflächen zuvor mit 4,2  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> Fibronektin beschichtet. Die Herstellung der Fibronektinlösung erfolgte nach Herstellerangaben.

### *Gezielte Differenzierung*

Die Differenzierung von UC-MSCs erfolgte in 12-Well Platten, welche zuvor mit Fibronektin beschichtet wurden. Die Zellen wurden in einer Dichte von 2000 Zellen/cm<sup>2</sup> in einem Volumen von 600  $\mu$ l Kontrollmedium ausplattiert und im Inkubator bei 37°C und 21% bzw. 5% O<sub>2</sub> bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Anschließend folgte die Umstellung auf das jeweilige Differenzierungsmedium (NH AdipoDiff, NH ChondroDiff, NH OsteoDiff, alle

Miltenyi Biotec, Deutschland). Ein Mediumwechsel von 600 µl/ Well erfolgte alle drei bis vier Tage. Die Kulturüberstände wurden gesammelt und bis zur späteren Analyse bei -20°C gelagert. Die Dauer der Kultur im Differenzierungsmedium betrug 21 Tage.

### 5.2.3 Ko- Kulturen

Eine detaillierte Beschreibung der Ko- Kulturexperimente befindet sich in Abschnitt 3.5.2.

#### *CFSE-Färbung*

PBMCs wurden mittels des CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) gefärbt. Hierfür wurden  $1 \times 10^7$  Zellen mit 2 µM Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) in 1 ml PBS (mit 2% FCS) für 3 min bei RT im Dunkeln unter Schütteln inkubiert. Die Färbung wurde anschließend durch die Zugabe von 2 ml Kulturmedium gestoppt. Die PBMCs wurden zweimal mit PBS gewaschen, in 2 ml Kulturmedium resuspendiert und mittels Trypanblau Färbung und Neubauerkammer gezählt.

### 5.2.4 Analytik

#### *Bestimmung von Zellzahl und Viabilität*

Die Bestimmung von Zellzahl und Viabilität erfolgte mittels Trypanblau-Ausschluss und Neubauer Hemazytometer.

#### *Bestimmung von spezifischen Wachstumsraten und Verdopplungszeiten*

Die Bestimmung erfolgte nach folgender Formel:

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{und} \quad \mu = \frac{\ln(X_1) - \ln(X_0)}{T_1 - T_0} \quad \text{mit:}$$

$T_d = \text{Verdopplungszeit}(h)$   
 $\mu = \text{Wachstumsrate}$   
 $X_0 = \text{Zellzahl}(t = 0)$   
 $X_1 = \text{Zellzahl}(t = 1)$



### *Bestimmung von L-Lactat und D-Glucose*

Die Bestimmung erfolgte in Zellkulturüberständen mittels des YSI 2700 Select analyzer (YSI Incorporated Life Sciences, Yellow Springs, US).

### *Bestimmung der Caspase-3/ 7 Aktivität*

Zur Bestimmung der Apoptoserate in UC-MSK Kulturen wurde die Caspase-3/ 7 Aktivität bestimmt. Dies erfolgte mittels des *Apo-ONE<sup>®</sup> Homogeneous Caspase3-/7 Assay* (Promega, Mannheim). Der Zellrasen wurde zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl Apo-One<sup>®</sup> Reagenz/ cm<sup>2</sup> Kulturoberfläche für 1 Std. bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 485/ 538 nm gemessen. Die Messwerte wurden auf die Zellzahl normiert.

### *Nachweis seneszenter Zellen*

Die Anzahl seneszenter Zellen in UC-MSK Kulturen wurde mittels des *Senescence-associated β-Galactosidase (SA-β-gal) Staining Kit* (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) bestimmt. Zusätzlich wurden die Zellkerne mittels DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid) visualisiert. Hierfür wurden Zellen in einer Dichte von 4000 Zellen/ cm<sup>2</sup> in 6-Well Platten ausplattiert und für 48 Std. im jeweiligen Medium inkubiert. Die DAPI, sowie SA-β-gal Färbungen erfolgten nach Herstellerangaben. Im Anschluss wurden je Well vier repräsentative Aufnahmen mittels Phasenkontrastmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie, sowie der Cell<sup>®</sup>Imaging Software (Olympus GmbH, Hamburg) aufgenommen. Zur Bestimmung der Anzahl seneszenter Zellen wurden pro Bild die Anzahl aller Zellkerne, sowie die der von blaugrünem Farbstoff umgebenen Zellkerne bestimmt.

### *CFU-F Assay*

Für die Bestimmung der zur Bildung von Kolonien fähigen Zellen in UC-MSK Kulturen (CFU-F Frequenz) wurden die Zellen in einer Dichte von 50 Zellen/ cm<sup>2</sup> in T-75 Flaschen im entsprechenden Kulturmedium ausplattiert und über einen Zeitraum von acht Tagen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer Lösung aus 0,5% Kristallviolett in Methanol fixiert und gefärbt. Die Zellen wurden erneut mit PBS

gewaschen und über Nacht an der Luft getrocknet. Kolonien, welche aus 30 oder mehr Zellen bestanden wurden unter dem Phasenkontrastmikroskop gezählt.

### 5.2.5 Histologische Nachweismethoden

#### *Fixierung*

Die Fixierung der Zellen mit para-Formaldehyd wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- ▽ Medium abnehmen
- ▽ 2 x mit 500 µl PBS waschen
- ▽ 30 min mit 500 µl 4 % para-Formaldehydlösung inkubieren
- ▽ 1 x mit 500 µl PBS waschen
- ▽ (bei von Kossa den letzten Schritt mehrfach wiederholen)

#### *Alcianblau Färbung*

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- ▽ 3 min mit 500 µl Essigsäure (3 %) waschen
- ▽ 30 min mit 500 µl Alcianblau Färbelösung inkubieren
- ▽ 3 x mit 500 µl Essigsäure (3 %) waschen
- ▽ 2 x mit 500 µl  $\text{ddH}_2\text{O}$  waschen
- ▽ Dokumentation

#### *Alizarin Rot Färbung*

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- ▽ 2 x mit 500 µl  $\text{ddH}_2\text{O}$  waschen
- ▽ 15 min mit 250 µl Alizarin Rot S Lösung inkubieren
- ▽ 5 x mit 500 µl  $\text{ddH}_2\text{O}$  waschen
- ▽ Dokumentation

### *Oilred O Färbung*

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- ▽ 2 x 2 min mit 500 µl Ethanol (50 %) waschen
- ▽ 20 min mit 500 µl Oil Red O Lösung inkubieren
- ▽ 2 x 3 min mit 500 µl Ethanol (50 %) waschen
- ▽ 1 x 5 min mit 500 µl PBS waschen
- ▽ Dokumentation

### *von Kossa Färbung*

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- ▽ 1 x mit 500 µl  $\text{ddH}_2\text{O}$  waschen
- ▽ 30 min mit 500 µl  $\text{AgNO}_3$ -Lösung im Dunkeln bei RT inkubieren
- ▽ 3 x mit 500 µl  $\text{ddH}_2\text{O}$  waschen
- ▽ mit 500 µl Entwicklerlösung inkubieren und die Reaktion je nach Stärke der Färbung durch Abnehmen der Lösung stoppen
- ▽ 3 x mit 500 µl  $\text{ddH}_2\text{O}$  waschen
- ▽ Dokumentation

## **5.2.6 Monoparametrische Analyse des Immunphänotyps von UC-MSCs**

Die beschriebenen Arbeiten wurden von Dr. Pierre Moretti durchgeführt <sup>163</sup>.

Primäre UC-MSCs wurden zunächst mittels Accutase geerntet, zweimal mit kaltem Blockierpuffer (PBS mit 2% FCS) gewaschen und in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml resuspendiert. Die Färbung erfolgte durch Zugabe von 20 µl einer vorverdünnten Antikörperlösung zu 100 µl der Zellsuspension. Für die Färbung der Negativkontrolle wurde der entsprechende Isotypenkontroll-Antikörper verwendet. Die optimale Konzentration der Detektionsantikörper wurde für jedes Experiment mittels Titration bestimmt. Eine Übersicht der eingesetzten Konzentrationen ist der folgenden Tabelle gegeben.

	Antibody	Volume Antibody [ $\mu$ L]	Blocking buffer [ $\mu$ L]	$\mu$ g antibody/ test
<b>Test antibody</b>	anti CD34-PE-Cy5	1.5	18.5	0.01
<b>Test antibody</b>	anti CD45PE-Cy5	6	14	0.01
<b>Isotype control</b>	BD mouse IgG1, k PE-Cy5	1.5	18.5	0.01
<b>Test antibody</b>	anti CD44-PE	2	18	0.03
<b>Test antibody</b>	anti CD73-PE	4	16	0.03
<b>Isotype control</b>	BD mouse IgG1, k PE	0.5	19.5	0.03
<b>Test antibody</b>	anti CD105-PE	0.5	19.5	0.05
<b>Isotype control</b>	Invitrogen mouse IgG1, (R-PE)	0.5	19.5	0.05
<b>Test antibody</b>	anti HLA-I-FITC	1	19	0.80
<b>Test antibody</b>	anti CD90-FITC	1	99	0.10
<b>Test antibody</b>	anti CD31-FITC	1.3	18.7	0.10
<b>Isotype control</b>	BD mouse IgG1, k FITC	2	18	0.10

Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei RT im Dunkeln wurden 400  $\mu$ l Blockierpuffer hinzu gegeben und die Zellen mit dem EPICS XL/MCL Durchflusszytometer analysiert. Mindestens 10.000 Ereignisse im entsprechenden *gate* wurden auf einer LOG Fluoreszenz Skala erfasst. Lebende Zellen wurden in einem *dot plot* aus *forward* gegen *side scatter* Signalen *gegatet*<sup>163</sup>.

### 5.2.7 Counterflow Centrifugal Elutriation (CCE)

Die CCE wurde mit dem Elutriator Beckman J6- MC, dem Rotor JE- 5.0 und der 5 ml Elutriationskammer (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) durchgeführt. Die zuvor geernteten Zellen wurden in PBS aufgenommen und in die Kammer mittels eines „*digital flow controllers*“ (Cole-Palmer Instruments Inc., Chicago, IL, USA) injiziert (Rotation: 1600 rpm bei RT). Fraktionen von je 50 ml der elutrierten Zellen wurden durch sukzessives Erhöhen der Pumprate gesammelt.

Beispielhafte Ergebnisse eines Elutriationsexperiments sind in untenstehender Tabelle gezeigt.

Fraktion	Flussrate (ml/ min)	durchschn. Dusmesser ( $\mu\text{m}$ )	Zellviabilität (%)
1	1,2	10,43	61,21
2	1,5	13,27	73,5
3	2,0	14,43	73,2
4	2,8	16,68	77,7
5	4,0	18,88	66,1
6	6,0	19,96	58,0
Mischpopulation (Kontrolle)		14,67	76,2

### 5.2.8 Reverse Transkriptase (RT)- PCR

#### *Isolierung von RNA*

RNA wurde mit Hilfe des „RNeasy Plus Mini Kit“ isoliert. Die zu analysierenden Zellen wurden zunächst geerntet und das Zellpellet in 0,5 ml RLT-Puffer (Lysispuffer mit 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol) resuspendiert und für 1 min inkubiert. Die Lösung wurde anschließend mit einer Pipette homogenisiert, für 10 min auf Eis inkubiert und dabei mehrmals *gevortext*. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Herstellerangaben. Die Konzentration, sowie Reinheit der RNA wurde mittels des Spektralphotometers NanoDrop 1000 überprüft.

#### *Reverse Transkriptase Reaktion*

Die Reverse Transkriptase Reaktion erfolgte nach folgendem Protokoll:

- ▽ Überführe 2  $\mu\text{g}$  der isolierten RNA in ein Reagiergefäß
- ▽ Füge 3  $\mu\text{l}$  der oligo-dT- Primer Lösung hinzu
- ▽ Stelle das finale Volumen auf 21  $\mu\text{l}$  mit RNase freiem Wasser ein
- ▽ Denaturiere für 5 min bei 65 °C
- ▽ Platziere die Lösung für 1min auf Eis
- ▽ Füge 8  $\mu\text{l}$  5x M- MLV Puffer hinzu
- ▽ Füge 4  $\mu\text{l}$  dNTPs hinzu
- ▽ Füge 6  $\mu\text{l}$  RNase freies Wasser hinzu
- ▽ Füge 1  $\mu\text{l}$  Reverse Transkriptase (MLV RT) hinzu
- ▽ Inkubiere die Lösung für 1 Std. bei 37 °C

### *Polymerase- Kettenreaktion (PCR)*

Die PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Zusammensetzung des PCR- Mix :

- ▽ 10 µL 5x Puffer (HotOls)
- ▽ 4 µL dNTPs
- ▽ 1 µL forward Primer
- ▽ 1 µL reverse Primer
- ▽ 1 µL cDNA
- ▽ 0.25 µL HotOls DNA-Polymerase
- ▽ 32.75 µL PCR Wasser
- ▽ Denaturiere für 5 min bei 95 °C

Folgendes Protokoll wurde für die Reaktion im Thermocycler verwendet:

<b>Schritt</b>	<b>Dauer</b>	<b>Temperatur</b>
Denaturieren	30 sec	95 °C
Hybridisierung der Primer	30 sec	Siehe Primer
Synthese	30 sec	72 °C

Anzahl der Zyklen: 30

### *Agarosegelelektrophorese*

Die Analyse der PCR erfolgte mittels Elektrophorese (2% Agarose, 100 Volt).

## Publikationsliste

### Veröffentlichungen

---

---

**Tim Hatlapatka**, Pierre Moretti, Antonina Lavrentieva, Ralf Hass, Nicole Marquardt, Roland Jacobs, Cornelia Kasper

*Optimization of an expansion strategy for umbilical cord derived MSC like cells using xeno-free culture conditions*

Tissue Eng Part C Methods. 2011 Jan 19. [Epub ahead of print]. (Impact Factor: 4.582)

**Tim Hatlapatka**, Pierre Moretti, Dana Marten, Antonina Lavrentieva, Ingrida Majore, Ralf Hass, Cornelia Kasper

*Mesenchymal Stromal Cells Derived from Human Umbilical Cord Tissues: Primitive Cells with Potential for Clinical and Tissue Engineering Applications.*

Adv Biochem Eng Biotechnol. 2010;123:29-54. (Impact Factor: 4,165)

**Tim Hatlapatka**, Pierre Moretti, Ralf Hass, Cornelia Kasper

*Mesenchymale Stromazellen (MSC) aus Nabelschnurgewebe - Zellen mit Potential für Tissue Engineering Anwendungen*

BIOForum 1/2010, 15

**Tim Hatlapatka**, Antonina Lavrentieva, Ralf Hass, Chen Ran, Thomas Scheper, Cornelia Kasper

*Investigations towards expansion efficiency of mesenchymal stromal cells under different cultivation conditions*

In Vorbereitung zur Einreichung

Nicole Marquardt, Cornelia Kasper, Ralf Hass, **Tim Hatlapatka**, Reinhold Ernst Schmidt, Roland Jacobs

*Umbilical-Cord Mesenchymal Stem Cells inhibit NK cell effector functions by direct cell-cell-contact independently from LFA-1- or LAIR-1-ligation*

Einreichung geplant im Herbst 2011

### Tagungsbeiträge (als extended abstract veröffentlicht)

---

---

4<sup>th</sup> Congress on Regenerative Biology and Medicine (BioStar), Stuttgart 2010

**Tim Hatlapatka**, Antonina Lavrentieva, Ralf Hass, Nicole Marquardt, Roland Jacobs, Cornelia Kasper

*Shaping the Microenvironment of Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cell-like Cells*

Tissue Engineering Part A. February 2011, Vol. 17, No. 3-4: 531-584. (Impact Factor: 4.582)

4<sup>th</sup> Annual Congress of the German Society for Stem Cell Research (GSZ), Hannover 2009  
**Tim Hatlapatka**, Pierre Moretti, Dana Marten, Antonina Lavrentieva, Ingrida Majore, Ralf Hass, Thomas Scheper, Cornelia Kasper  
*Human Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cell-like Cells exhibit in vitro immunoprivileged and immunomodulatory properties*  
Human Gene Therapy, November 2009, Vol. 20, No. 11. (Impact Factor: 4.202)

World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig 2009  
**Tim Hatlapatka**, Pierre Moretti, Antonina Lavrentieva, Ingrida Majore, Ralf Hass, Thomas Scheper, Cornelia Kasper  
*Immunologic Properties of Human Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cell-like Cells*  
Regenerative Medicine, November 2009, Vol. 4, No. 6s. (Impact Factor: 2.929)

International Bone-Tissue-Engineering Congress (Bone-Tec), Hannover 2008  
Ingrida Majore, Pierre Moretti, **Tim Hatlapatka**, Frank Stahl, Cornelia Kasper  
*Development of a Biotechnological Proceeding for the Extensive Expansion of Mesenchymal Stem Cells Obtained from Human Umbilical Cord*  
Tissue Engineering Part A. May 2009: O-1-O-29. (Impact Factor: 4.582)

TERMIS EU meeting, Porto, Portugal 2008  
Ingrida Majore, Pierre Moretti, **Tim Hatlapatka**, Cornelia Kasper, Frank Stahl, Thomas Scheper  
*Optimization of In-Vitro Expansion of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Human Umbilical Cord*  
Tissue Engineering Part A. May 2008, 14(5): 691-943. (Impact Factor: 4.582)

### **Tagungsbeiträge**

---

5<sup>th</sup> Annual Congress of the German Society for Stem Cell Research (GSZ), Lübeck 2010  
**Tim Hatlapatka**, Antonina Lavrentieva, Pierre Moretti, Ralf Hass, Nicole Marquardt, Roland Jacobs, Cornelia Kasper  
*Shaping the Microenvironment of Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cell-like Cells*

International Bone-Tissue-Engineering Congress (Bone-Tec), Hannover 2010  
Sonja Kress, **Tim Hatlapatka**, Pierre Moretti, Stefanie Boehm, Ralf Hass, Cornelia Kasper  
*Human Umbilical Cord Tissue-derived Mesenchymal Stem Cell-like Cells: Cells with Potential for Tissue Engineering Applications*

28. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen und ProcessNet-Jahrestagung, Aachen 2010  
**Tim Hatlapatka**, Pierre Moretti, Ralf Hass, Cornelia Kasper  
*Isolierung und Charakterisierung von Mesenchymalen Stammzellen aus dem Nabelschnurgewebe*



TERMIS EU meeting, Galway, Irland 2010

**Tim Hatlapatka**, Ingrida Majore, Pierre Moretti, Ralf Hass, Cornelia Kasper

*Subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord: Identification and Characterization.*

TERMIS EU meeting, Galway, Irland 2010

Pierre Moretti, Stefanie Böhm, Antonina Lavrentieva, **Tim Hatlapatka**, Ralf Hass, Thomas Scheper, Cornelia Kasper

*Investigation of the osteogenic potential of mesenchymal stromal cells derived from human umbilical cord tissue*

2<sup>nd</sup> annual Stem Cells & Regenerative Medicine Europe conference, Edinburgh 2009

**Tim Hatlapatka**, Pierre Moretti, Antonina Lavrentieva, Ingrida Majore, Ralf Hass, Thomas Scheper, Cornelia Kasper

*Human Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cell-like Cells exhibit similar in vitro immunologic properties as described for Bone Marrow-MSCs*

21<sup>st</sup> Annual Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT), Dublin 2009

Pierre Moretti, **Tim Hatlapatka**, Magda Tomala, Ingrida Majore, Ralf Hass, Thomas Scheper, Cornelia Kasper

*Monitoring of Long-Term Cultivation and Osteogenic Differentiation of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell-Like Cultures*

2<sup>nd</sup> International Congress on Stem Cells and Tissue Formation, Dresden 2008

**Tim Hatlapatka**, Magda Tomala, Pierre Moretti, Ingrida Majore, Frank Stahl, Thomas Scheper, Cornelia Kasper

*Optimization of long-term cultivation of Human Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells: Comparative study of Human Serum and FCS*

## **Förderungen**

---

**Promotionsstipendium** der Graduiertenakademie der Leibniz Universität Hannover im Rahmen der „Feasibility Studies: Förderung herausragender Forschungsideen“. Förderung durch Sach- und Personalmittel für einen Zeitraum von sechs Monaten (Juni - November 2010).

**Kurzzeitstipendium für Doktoranden** des Deutschen Akademischen Austausch Dienstes (DAAD). Förderung eines Gastaufenthaltes am „*Institute of Biomaterials & Biomedical Engineering*“ der „*University of Toronto*“, Kanada (April - Juli 2008).

## Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

---

---

Name	Tim Hatlapatka
Geburtsdatum	13.03.1981
Geburtsort	Hildesheim, Deutschland
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Schulbildung

---

---

1987 - 1993	Grundschule und Orientierungsstufe Bad Salzdetfurth
1993 - 2000	Abitur am Goethegymnasium in Hildesheim

### Hochschulausbildung

---

---

2001- 2004	Bachelor-Studium im Fach Molekulare Biotechnologie an der Universität zu Lübeck, Lübeck, Deutschland
2004 - 2007	Master-Studium im Fach Life Science an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Hannover, Deutschland
2007 - 2011	Promotion am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Hannover, Deutschland