

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Klüter)

Einfluss von mesenchymalen Stromazellen auf die
Thrombozytenaktivierung

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Philipp Netsch

aus
Wertheim
2017

Dekan: Prof. Dr. med. S. Goerd
Referentin: Frau Prof. Dr. rer. nat. K. Bieback

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG.....	3
1.1 Zellbasierte Therapie.....	3
1.2 Anforderung an transplantierte Zellen	3
1.3 Mesenchymale Stromazellen	5
1.3.1 Aufkommen und Definition mesenchymaler Stromazellen	5
1.3.2 Quellen zur Isolation von mesenchymalen Stromazellen.....	6
1.3.3 In vitro Kultivierung und Expansion von MSC	6
1.3.4 Eigenschaften von MSC.....	7
1.3.5 Klinische Anwendung von MSC	8
1.3.6 Nebenwirkungen der MSC Therapie	11
1.4 Blutgerinnung	15
1.5 Vorarbeiten.....	16
1.6 Zielsetzung der Arbeit	17
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Herkunft und Isolation von MSC, HUVEC und HeLa Zellen	19
2.2 Zellkultur.....	19
2.3 Blutpräparation.....	20
2.4 Kontrollen und Agonisten	20
2.5 Impedanzaggregometrie	21
2.6 Durchflusszytometrie.....	23
2.6.1 Versuche mit unterschiedlichen Agonisten.....	26
2.6.2 Dosisversuche, Passagierungen und Aggregate	27
2.6.3 Mechanistische Versuche	27
2.7 Fluoreszenzmikroskopie.....	30
2.8 Quantitative real time Polymerase Kettenreaktion.....	30
2.9 Statistische Auswertung	36

3	ERGEBNISSE	37
3.1	Durchflusszytometrie	37
3.1.1	Einfluss von MSC unterschiedlicher Quellen auf Thrombozyten	37
3.1.2	Einfluss unterschiedlicher Zelldosen	42
3.1.3	Vergleich von Stimulationen mit ADP, TRAP und U46619	47
3.1.4	Vergleich unterschiedlicher Passagen	52
3.1.5	Vergleich von xenogenem und humanem Zellkulturmedien	55
3.1.6	MSC-Thrombozytenaggregate	55
3.1.7	Mögliche Mechanismen	56
3.2	Fluoreszenzmikroskopie	60
3.3	Impedanz Aggregometrie	66
3.4	Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion	69
4	DISKUSSION	73
4.1	Methodische Überlegungen	73
4.1.1	Durchflusszytometrie und Impedanzaggregometrie	74
4.1.2	PRP	75
4.2	Einfluss von MSC auf die Gerinnung	75
4.2.1	Einfluss der unterschiedlichen Zellarten	75
4.2.2	MSC Passagierung	79
4.2.3	Vergleich der MSC Zellkulturmedien	80
4.2.4	MSC-Thrombozytenaggregate	80
4.2.5	Mechanismen der Interaktion	81
4.3	Schlussfolgerung & Ausblick	86
	ZUSAMMENFASSUNG	89
5	LITERATURVERZEICHNIS	91
6	LEBENS LAUF	107
	DANKSAGUNG	109

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA = Arachidonic Acid
AMP = Adenosin Monophosphat
AMP-CP = Adenosine 5' diphosphate
ADP = Adenosin Diphosphat
ATP = Adenosin Triphosphat
APC = Allophycocyanin
AUC = Area under the curve
BD = Beckman, Dickinson
BM = Bone marrow
CB = Cord blood
cDNA = Complementary DNA
CED = Chronisch entzündliche Darmerkrankung
COX = Cyclooxygenase
CPDA = Citrate Phosphate Dextrose Adenine
DMSO = Dimethylsulfoxid
DNA = Desoxyribonukleinsäure
dNTP = Desoxyribonukleosidtriphosphate
FBS = Fetal bovine serum (=FCS)
FCS = Fetal calf serum (=FBS)
FITC = Fluorescein isothiocyanate
FSC = Forward scatter
GAPDH = Glucose-6-phosphate dehydrogenase
GMP = Good manufacturing practice
GP = Glykoprotein
GvHD = Graft versus host disease
HSC = hämatopoetische Stammzellen
HUVEC = Human umbilical vein endothelial cells
LA = Lipoaspirat
LNA = Locked nucleotide acid
MFI = Median fluorescence intensity
MSC = Mesenchymal stromal cells
mRNA = messenger Ribonukleinsäure
NaCl = Natrium Chlorid
NO = Nitric Oxide
PAI = Plasminogen activator inhibitor
PAR = Proteinase activated receptor
PBS = Phosphate buffered saline
PBSC = Peripheral mononuclear blood cells
PE = Phycoerythrin
PE-Cy7 = Phycoerythrin-Cyanide 7
PGI₂ = Prostaglandin I₂
PL = Phospholipide
PLAT = Plasminogen activator, tissue type
PLAU = Plasminogen activator, urokinase type
PLG = Plasminogen
POM-1 = Polyoxotungstat
PRP = Platelet rich plasma
RNA = Ribonukleinsäure

RT- qPCR = real-time quantitative PCR
SFRS4 = Serine/arginine-rich splicing factor 4
SSC = Sideward scatter
TF = Tissue factor
TFPI = Tissue factor pathway inhibitor
TRAP = Thrombin receptor agonist peptide
TXA₂ = Thromboxan A₂
uPAR = Urokinase plasminogen activator receptor
UPL = Universal probe library
w/o = without

1 EINLEITUNG

1.1 Zellbasierte Therapie

Neben der traditionellen Pharmatherapie haben sich in den letzten Jahrzehnten neue Konzepte entwickelt, die lebende Zellen als Therapeutika nutzen. Im Gegensatz zu konventionellen Medikamenten sind diese in der Lage sich dem individuellen Zustand des Patienten anzupassen und auf ihn zu reagieren. Ziel der zellbasierten Therapiekonzepte ist es durch deren Adaptionfähigkeit die Erneuerung beschädigter Zellen und Gewebe gezielt zu unterstützen oder ganze Organsysteme zu ersetzen. Auf der Grundlage dieser Überlegungen wurden 1968 die ersten erfolgreichen Stammzelltransplantationen mit hämatopoetischen Stammzellen (HSC) durchgeführt. In den folgenden Jahrzehnten hat sich die therapeutische Applikation der HSC in der Medizin etabliert (Armitage, 1994).

Routinemäßig wird dieses Verfahren beispielsweise zur Behandlung akuter Leukämien eingesetzt. Das entartete Knochenmark des Patienten produziert unkontrolliert dysfunktionale Leukozyten, wobei auch alle anderen Blutreihen verdrängt werden und es zu einer Panzytopenie kommt. Die Resultate sind eine erhöhte Infektanfälligkeit, Blutungen und Anämie. Therapeutisch kann in diesem Fall eine Stammzelltransplantation erwogen werden. Dabei werden die Stammzellen des Spenders zuerst aus dem Knochenmark mobilisiert, dann peripher entnommen und zuletzt dem immundepletierten Empfänger über einen Hickman-Katheter infundiert. Anschließend findet ein „Homing“ statt: die transplantierten HSC suchen selbstständig das Knochenmark auf, wo sie sich niederlassen. Schlussendlich bilden sie ein vollständiges und funktionales neues hämatopoetisches System aus. Im Gegensatz zur Chemotherapie kann durch eine Transplantation eine vollständige Heilung erzielt werden (Cutler and Antin, 2001).

Auf der Basis dieser Erfolgsgeschichte ist der Ausbau zellbasierter Therapien Gegenstand intensiver Forschung und mit weitreichenden Hoffnungen verbunden. Dies trifft auf alle medizinischen Fachrichtungen zu und reicht von klassisch-regenerativen Indikationen wie Leberschädigungen (Shiota and Itaba, 2016) bis zur Behandlung erektiler Dysfunktion (Kim et al., 2016). Am besten etabliert und am weitesten fortgeschritten sind Studien zur Behandlung der GvHD und von Analfisteln (Sharma et al., 2014). Trotz aller Bemühungen bleibt die Transplantation von HSC bislang die einzige routinemäßig praktizierte Therapieform, die den Einsatz lebender Zellen beinhaltet.

1.2 Anforderung an transplantierte Zellen

Am Beispiel der Transplantation von HSC lassen sich die Anforderungen an die üblicherweise in Betracht gezogenen Zellarten und deren Problematiken ableiten.

Grundsätzlich sind die Anforderungen abhängig von der Indikation. Zelltherapie wird hauptsächlich genutzt, um die Regeneration beschädigter Zellen und Gewebe spezifisch zu unterstützen. Dementsprechend sind Zellen mit hohem regenerativem und hohem Differenzierungs- und Proliferationspotential zu bevorzugen. Deshalb werden generell Stamm- oder Vorläuferzellen zur Therapie genutzt.

Zuerst gilt es einen geeigneten Spender zu finden. Dafür gibt es grundsätzlich drei unterschiedliche Möglichkeiten: vom Empfänger selbst (autolog), von einem genetisch identischen Zwilling (syngen) oder von einer anderen Person (allogen). Autologe und

syngene Transplantate bieten den Vorteil einer uneingeschränkten Verträglichkeit bei vollständiger Immunkompatibilität. In Fällen, in denen die empfängereigenen Progenitorzellen bereits erkrankt sind oder aufgrund zu starker Krankheitsprogression keine Möglichkeit mehr besteht gesunde Zellen zu gewinnen, wird es erforderlich allogene Transplantate zu nutzen. Diese bieten den Nachteil einer erhöhten Immunogenität beim Empfänger mit konsekutivem Abstoß des Zelltransplantats. Um eine allogene Übertragbarkeit zu ermöglichen ist es deshalb trotz vorübergehendem HLA-Matching notwendig beim Empfänger eine Immunsuppression mit den entsprechenden Risiken (Infektionen mit opportunistischen Erregern, Sepsis) durchzuführen. Eine geringe intrinsische Immunogenität der Zellen selbst ist demnach ein immenser Vorteil.

Im nächsten Schritt müssen dem Spender die zu transplantierenden Zellen entnommen werden. Ein wesentlicher Vorteil der HSC ist die Möglichkeit adulte Spender zu nutzen, während pluripotente Stammzellen hauptsächlich aus fetalen Geweben gewonnen werden müssen (Yin et al., 2016). Im Falle der HSC besteht mittlerweile weiterhin die Möglichkeit diese durch die Applikation von Granulocyte-Stimulating Factor aus dem Knochenmark ins periphere Blut zu mobilisieren, wodurch eine Knochenmarkspunktion vermieden werden kann (Schmitz et al., 1995). Eine weitere wichtige Eigenschaft therapeutischer Zellen ist demnach die einfache Verfügbarkeit, bestenfalls ohne die Notwendigkeit eines größeren, invasiven Eingriffs.

Zusätzlich gilt es, eine entsprechend große Zellzahl zu erreichen. Bei den HSC kann in der Regel durch Apherese aus dem peripheren Blut oder Aspiration von Knochenmark eine suffiziente HSC Zahl erreicht werden. Somit besteht keine Notwendigkeit einer weiteren Kultivierung ex vivo. Andererseits können die Spendersuche und die Entnahme nach wie vor nicht vermieden werden, da sich HSC ex vivo bisher nicht ausreichend kultivieren und expandieren lassen (Park et al., 2015). Eine einfache ex vivo Kultivierung, ebenso wie eine hohe Teilungsrate der Zellen in vivo sind jedoch wünschenswert, um auch bei geringer Ausbeute durch die Entnahme angemessene Zelldosen zu erzielen.

Schließlich besteht die Notwendigkeit, die Zellen an die erforderliche Wirkstätte zu befördern. Entweder können sie direkt lokal appliziert werden, oder sie sind selbst zum Homing, d.h. dem Einwandern in das Zielgewebe befähigt, wie es die HSC sind (Cutler and Antin, 2001).

Eine wesentliche Komplikation nach allogener HSC Transplantation ist die Entwicklung einer Graft-versus-Host Erkrankung (GvHD), bei der das neu implementierte Immunsystem den Wirt als fremd erkennt und angreift. Häufige Symptome sind Schädigungen von Haut, Leber oder Darm. Daher ist zur Gewährleistung der Immunkompatibilität vor der Transplantation ein „Matching“ der humanen Leukozyten Antigene erforderlich.

Bei der allogenen HSC Transplantation ist genau diese Fremd-Erkennung jedoch gleichzeitig ein gewünschter Wirkmechanismus, der „Graft-versus-Leukemia“ Effekt (Kolb, 2008). Bei dieser Art der Transplantation besteht folglich die Herausforderung darin, eine gute Balance zwischen therapeutisch gewünschter und pathologisch überschießender Abstoßung zu erzielen.

Ebenso ist auch bei anderen (Stamm-) Zell-Transplantationen ein Matching der HLA-Transplantationsantigene zu berücksichtigen, um das Risiko immunogener, wie auch

aller anderer Nebenwirkungen zu reduzieren. Die transplantierbaren Zellen, zumindest für die meisten Indikationen, sollten nicht selbst eine Entzündung verursachen können. Wie bei allen anderen Medikamenten sollten natürlich die Nebenwirkungen durch und nach der Applikation der therapeutischen Zellen generell möglichst gering ausfallen.

Zusammenfassend lassen sich folgende Anforderungen an therapeutisch angewandte Zellen ableiten:

1. Hohes therapeutisches Potenzial
2. Hohes proliferatives Potenzial in und/oder ex vivo
3. Gute Kultivierbarkeit in vitro
4. Einfache Verfügbarkeit/ Entnahme
5. Homing Kapazität
6. Geringe Immunogenität beim Empfänger
7. Geringe Nebenwirkungsrate

1.3 Mesenchymale Stromazellen

1.3.1 Aufkommen und Definition mesenchymaler Stromazellen

Eine Zellpopulation, die viele der erwähnten Anforderungen erfüllt sind mesenchymale Stromazellen (MSC).

Mesenchymale Stromazellen wurden erstmals in den 1970er Jahren in der Umgebung hämatopoetischer Zellen im Knochenmark beschrieben und als adhesive Vorläuferzellen mit der Fähigkeit fibroblastische Kolonien zu bilden bezeichnet. Ihre wesentliche Aufgabe sah man in der Bereitstellung der Mikroumgebung für hämatopoetische Zellen (Friedenstein et al., 1974; Luria et al., 1971). Größere Beachtung kam ihnen allerdings erst in den 1990ern zuteil. Ursächlich waren Studien, die das Potential mesenchymaler Stromazellen zur Differenzierung in sowohl Fett-, als auch Knochen- und Knorpelgewebe nachweisen konnten. Weiterhin konnten einzelne Zellen dargestellt werden, die auch nach mehrfacher Zellteilung das Potential zur Differenzierung in unterschiedliche Zelllinien beibehielten (Pittenger et al., 1999). Aus diesen Erkenntnissen wurde die frühere Bezeichnung „mesenchymale Stammzelle“ abgeleitet (Caplan, 1991).

Mittlerweile ist jedoch umstritten, ob tatsächlich alle Voraussetzungen zur Charakterisierung von MSC als Stammzellen erfüllt werden. Ein wesentlicher Kritikpunkt ist der fehlende sichere Nachweis einer klonalen Selbsterneuerung der Zellen nach Teilung. Daher wurde der neutralere Begriff der „mesenchymalen Stromazelle“ eingeführt, der die supportiven, passiven Eigenschaften der Population betont (Bieback et al., 2012b).

Eine besondere Herausforderung stellt nach wie vor die eindeutige Qualifikation einer Zellpopulation als „mesenchymale Stromazellen“ dar. Die vielfältigen Eigenschaften und potentiellen Herkunftsquellen von MSC (s.u.) führen zu einer fehlenden Uniformität der untersuchten Zellpopulationen und letztlich zu einer erschwerten Vergleichbarkeit. Um gewisse grundsätzliche Eigenschaften festzusetzen wurden aufgrund dieser Problematik 2006 von der International Society for Cellular Therapy (ISCT) drei Mindestkriterien festgelegt, die Voraussetzung für die Klassifizierung einer Zellpopulation als „mesenchymale Stromazellen“ sind (Dominici et al., 2006):

- Unter gängigen Zellkulturbedingungen müssen MSC an Plastikoberflächen adhären;

- Die molekularen Marker CD90, CD73, und CD105 müssen auf MSC exprimiert werden, während CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 und HLA-DR Oberflächenmoleküle nicht vorhanden sein dürfen;
- Die Fähigkeit der Differenzierung in Osteoblasten, Chondroblasten, und Adipozyten in vitro muss gegeben sein.

1.3.2 Quellen zur Isolation von mesenchymalen Stromazellen

Anders als viele andere Stamm- oder Vorläuferzellen finden sich MSC neben perinatalen und embryonalen auch in adulten Geweben. Als fest etablierte Quellen gelten bisher vornehmlich Knochenmark (BM-MSK) und Lipoaspirat (LA-MSK) (Bieback et al., 2012b).

Knochenmark war die erste Quelle, woraus MSC isoliert wurden. Daher stellen BM-MSK auch die am weitesten verbreitete und am besten charakterisierte MSC Population dar. Es existieren bereits erste Protokolle zur robusten standardisierten Vermehrung dieser Zellen unter GMP-Bedingungen (Wuchter et al., 2015).

Da Knochenmark allerdings nur relativ invasiv zugänglich ist, wurde Fettgewebe als besser erreichbare Quelle erschlossen. Hier lässt sich am wenigsten invasiv eine große Menge an Gewebe mit einer entsprechend großen Anzahl an MSC gewinnen (Kern et al., 2006; Zuk et al., 2002; Zuk et al., 2001).

Diverse weitere Gewebe werden zusätzlich untersucht. Hierzu zählen hauptsächlich perinatale Gewebe wie Nabelschnurblut (CB-MSK) (Bieback and Klüter, 2007; Bieback and Netsch, 2015), Synovia (Fan et al., 2009), Plazenta (Fierabracci et al., 2015) oder Nabelschnur- Matrix (Zeddou et al., 2014).

Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass MSC aus unterschiedlichen Geweben auch bezüglich ihrer Eigenschaften durchaus variabel sind. Während BM- und LA-MSK eine Differenzierung in Fett, Knochen und Knorpel zulassen fehlt bei CB-MSK das Potential Fettgewebe auszubilden. Dagegen weisen CB-MSK die höchste Potenz bezüglich der Proliferationsrate auch in späteren Passagen auf. Auch die molekularen Marker variieren zum Teil deutlich zwischen den MSC der unterschiedlichen Quellen. Beispielsweise ist der Nachweis der MSC Marker CD90 und CD105 auf CB-MSK deutlich geringer als auf LA- und BM-MSK (Kern et al., 2006). Weitere Differenzen konnten in den immunmodulatorischen Eigenschaften gezeigt werden (Mattar and Bieback, 2015). CB-MSK weisen beispielsweise unter Co-Kultur mit inflammatorisch stimulierten Makrophagen den geringsten Spiegel inflammatorischer Zytokine auf (Jin et al., 2013). Auch bezüglich der Hämokompatibilität scheint es Unterschiede zu geben: LA-MSK und CB-MSK wurden mit einem höheren Risiko für embolische Ereignisse assoziiert als BM-MSK (Moll et al., 2015; Shiratsuki et al., 2015).

1.3.3 In vitro Kultivierung und Expansion von MSC

Die Kultivierung von MSC ist relativ unkompliziert und kann prinzipiell sehr variabel gestaltet werden. Um eine Standardisierung der in vitro Kultur von therapeutisch eingesetzten MSC zu erreichen, wird daher auf eine Einhaltung der sogenannten „good manufacturing practice“ (GMP) Richtlinien geachtet. Weitere Qualitätsmerkmale, die derzeit noch untersucht werden, beinhalten u.a. Vorgaben bezüglich der Isolationsquelle, des Kulturmediums oder des Immunphänotyps (Wuchter et al., 2015).

Die Expansion lässt sich mit gängigen Kulturmedien wie beispielsweise dem Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) durchführen. Traditionell wird das Medium mit fetalem Kälber Serum (FCS) versetzt. Der Zusatz von FCS wird jedoch kritisch betrachtet, da die Möglichkeit einer Immunreaktion gegen die xenogenen Bestandteile nicht ausgeschlossen werden kann (Caterston et al., 2002). Mittlerweile sind bereits erste Alternativseren humanen Ursprungs etabliert (Bieback et al., 2010; Bieback et al., 2012a; Kinzebach and Bieback, 2013).

MSC wachsen adhärent (s.o.) bis sie einen Monolayer ausgebildet haben. Anschließend müssen sie durch Passagierung geteilt werden, damit sie sich weiter vermehren können. Allerdings ist die Anzahl der durchführbaren Passagen begrenzt. Die Expansion ist demnach primär abhängig von der vorhandenen Wachstumsfläche. Für eine therapeutische Anwendung müssen hohe Zellzahlen von ca. 0.5×10^6 bis 5×10^6 MSC/kg Körpergewicht erreicht werden. Zu diesem Zweck wird intensiv an automatisierten und standardisierten Verfahren gearbeitet. Aktuell gibt es zwei hauptsächlich angewandte Verfahren: Vielschichtige „Zellfabriken“ und Bioreaktoren. Erste Protokolle für eine komplett automatisierte und standardisierte MSC Expansion in großem Maßstab in vitro sind derzeit in der Erprobung (Fekete et al., 2012; Sharma et al., 2014).

Auch eine längerfristige Aufbewahrung von MSC durch Kryopreservation in Dimethylsulfoxid- (DMSO) haltigem Medium in flüssigem Stickstoff bei -180°C ist unkompliziert und beeinträchtigt MSC nicht (Bieback and Netsch, 2015; Mamidi et al., 2012; Wuchter et al., 2015).

1.3.4 Eigenschaften von MSC

Die Untersuchungen an MSC konnten multiple Eigenschaften feststellen, welche das große Interesse an dieser Population rechtfertigen und die Basis für vielfältige klinische Anwendungen darstellen.

Das grundsätzliche Potential von MSC sich in unterschiedliche weiter ausdifferenzierte Zelllinien entwickeln zu können wird neben Knochen, Fett und Knorpel zunehmend auf weitere Gewebearten ausgedehnt. Unter anderem wurden die Generierung von Hepatozyten (Hang et al., 2014), Kardiomyozyten (Galli et al., 2014) oder Neuronen (Huat et al., 2014) beschrieben. Diese Berichte erwiesen sich allerdings nicht in allen Fällen als reproduzierbar, weshalb nach wie vor nur die drei erstbeschriebenen Differenzierungsmerkmale Fett, Knochen und Knorpel als gesichert gelten (Bieback et al., 2012b).

Neben dem Differenzierungspotential gilt die Immunmodulation als wesentliche therapeutisch nutzbare Fähigkeit von MSC.

MSC selbst gelten als „immunprivilegiert“ (Ankrum et al., 2014). Sie überleben unabhängig vom Immunstatus des Empfängers nach Injektion gleich lange, während HSC im selben Modell eine deutlich geringere Lebensdauer aufweisen (Liechty et al., 2000). Außerdem führen sie in allogener Ko-Kultur zu keiner T-Zell Aktivierung (Klyushnenkova et al., 2005). Dies bedeutet den immensen Vorteil, dass nach bisherigem Erkenntnisstand auf ein HLA-Matching weitgehend verzichtet werden kann.

Insbesondere immunsuppressive Eigenschaften konnten nachgewiesen werden. Hierunter fallen Einflüsse von MSC auf das angeborene sowie das erworbene Immunsystem. MSC können B-Zell Aktivierung und Proliferation inhibieren (Krampera et al., 2006), T-Zell Proliferation und Zytotoxizität verringern, ebenso wie die Reifung und Aktivierung dendritischer Zellen (Nauta et al., 2006; Wang et al., 2012b). Diese

Einflüsse werden sowohl durch direkte Zell-Zell Interaktionen, als auch parakrin durch die Sekretion von Mediatoren vermittelt (Lotfinegad et al., 2014).

Weiterhin gelten MSC als wichtige Unterstützer des umgebenden Parenchyms. Sie können das Wachstum von Knochenmark nach Transplantation hämatopoetischer Stammzellen fördern (Koc et al., 2000; Tavassoli and Friedenstein, 1983). Außerdem verbessern sie die Regeneration nach Gewebeschäden, indem sie zum Ort der Schädigung migrieren („Homing“) und dort Faktoren mit trophischer Aktivität freisetzen (Rustad and Gurtner, 2012). Dadurch werden andere Zellen zur Proliferation angeregt, Apoptose reduziert, oder Angiogenese induziert (Park et al., 2010). Aufgrund der vielfältigen Möglichkeiten von MSC in den Prozess der Heilung einzugreifen wurde ihnen der Beiname „injury drugstore“ gegeben (Caplan and Correa, 2011).

Auch metabolische Effekte von MSC konnten bereits beschrieben werden. Insbesondere im Zusammenhang mit Diabetes mellitus ruht neue Hoffnung auf MSC, nachdem diese in einigen Studien nach Infusion eine Verringerung des Blutzuckers bewirken konnten. In der Folge wurden auch Diabetes bedingte Komplikationen reduziert (Ezquer et al., 2008; Xie et al., 2009).

1.3.5 Klinische Anwendung von MSC

MSC erfüllen beinahe alle unter 1.2 genannten Anforderungen (Tab. 1). Folglich ist die Erwartungshaltung gegenüber einer therapeutischen Anwendbarkeit und einer Translation der vielversprechenden bisherigen Erkenntnisse in die Klinik groß. Die Erwartungen gründen vor allem auf

- der Homing Kapazität,
- der Sekretion von antiinflammatorischen und trophischen Zytokinen,
- der Immunprivilegierung und Immunsuppression, sowie auf
- dem Differenzierungspotenzial (Sharma et al., 2014; Wang et al., 2012b).

Bezüglich der Applikation von MSC bestehen unterschiedliche Möglichkeiten: bei gut zugänglichen lokalen Problematiken wie degenerativen Gelenkerkrankungen kann eine lokale Injektion erfolgen. Für die supportive Anwendung bei Erkrankungen der inneren Organe können MSC aufgrund ihrer Homing-Fähigkeiten systemisch eingesetzt werden. Weiterhin ist die systemische Gabe bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen erforderlich. Dies geschieht in der Regel durch die Infusion eines Zellbolus (Sharma et al., 2014; Squillaro et al., 2016; Wei et al., 2013).

Tabelle 1: Anforderungen an therapeutisch eingesetzte Zellen und deren Erfüllung in MSC

Anforderung	MSC
Therapeutisches Potenzial	<ul style="list-style-type: none"> - Differenzierung - Trophische/regenerative Unterstützung - Immunsuppression - Metabolischer Einfluss
Proliferatives Potenzial	<ul style="list-style-type: none"> - Keine/wenig Proliferation nach Transplantation - Expansion in vitro möglich
Kultivierbarkeit	<ul style="list-style-type: none"> - Unkomplizierte Kultur - Konservierung möglich
Verfügbarkeit	<ul style="list-style-type: none"> - Gängige Quellen gut zugänglich: Knochenmark, Lipo-Aspirat, Nabelschnur
Applikation/ Homing	<ul style="list-style-type: none"> - Homing zu entzündeten/ geschädigten Geweben - Systemische/ lokale Applikation nach Bedarf
Immunogenität	<ul style="list-style-type: none"> - „immunprivilegiert“

In den letzten Jahren hat die Zahl klinischer Studien mit MSC rapide zugenommen. Während 2012 204 Studien bei clinicaltrial.gov gelistet waren (Wei et al., 2013) finden sich Anfang 2017 bereits 694 (Abbildung 1 und 2). Diese klinischen Anwendungen spiegeln alle benannten Eigenschaften der MSC wieder.

Eine starke Repräsentation findet sich im Bereich der immunbedingten Krankheiten wie steroidrefraktäre Graft-versus-Host disease, Multiple Sklerose oder chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), vor allem der M. Crohn. Dazu kommen noch Erkrankungen des rheumatischen Formkreises. Die immunsuppressiven Eigenschaften der MSC sollen genutzt werden, um eventuell die konventionellen immunsuppressiven Therapieschemata abzulösen, die mit starken Nebenwirkungen einhergehen. Die GvHD stellt mit einem Anteil von 5% an den gelisteten Studien einen Sonderfall dar. Abgeschlossene Phase I und II Studien konnten bereits vielversprechende Resultate liefern (Sharma et al., 2014; Squillaro et al., 2016).

Die Anwendung von MSC im Rahmen von Knochen- und Knorpelerkrankungen ist besonders naheliegend, da deren Differenzierung in Osteo- und Chondrozyten eines der Hauptkriterien ihrer Definition darstellt. Hier werden die regenerativen Eigenschaften von MSC genutzt, indem die Zellen hauptsächlich lokal appliziert werden und den Wiederaufbau des Gewebes unterstützen sollen oder selbst an Stelle der zerstörten Zellen neuen Knochen oder Knorpel formen. In diesem sehr breit gefassten Bereich findet sich ein großer Anteil der klinischen Studien (21%) (Aicher et al., 2011; Squillaro et al., 2016).

Ein ähnlicher Ansatz unterliegt dem Einsatz von MSC bei degenerativen Vorgängen im Rahmen von Nieren-, Leber- und Lungenerkrankungen (insb. Zirrhose).

Der Anteil der kardiovaskulären Erkrankungen beläuft sich auf 8%. Die hauptsächlichsten Entitäten stellen dabei Kardiomyopathien unterschiedlicher Genese und Infarkte dar. Neben undifferenzierten MSC kommen auch bereits kardial vordifferenzierte MSC zum Einsatz um die Regeneration des Herzmuskels zu unterstützen und diesen zu stärken (Mathiasen et al., 2009; Squillaro et al., 2016).

Stark angestiegen ist auch der Anteil an neurologischen Untersuchungen (17%). Die führenden Krankheitsbilder sind Schlaganfälle, die bereits erwähnte Multiple Sklerose, sowie die Amyotrophe Lateralsklerose (Uccelli et al., 2011).

Zuletzt finden sich Studien im Zusammenhang mit Diabetes Mellitus. Dabei werden einerseits die längerfristigen Auswirkungen von MSC Infusionen auf den Blutzucker und auf diabetesbedingte Komplikationen, meist angiopathisch, untersucht.

Andererseits werden MSC zur direkten Behandlung der Komplikationen genutzt (Bieback et al., 2012b; Sharma et al., 2014; Squillaro et al., 2016; Wang et al., 2012b).

Trotz aller Bemühungen wurde bisher nur in Kanada ein MSC basiertes medizinisches Produkt zugelassen (2012). Ursächlich sind neben organisatorischen und monetären Gründen die klinisch häufig nicht ausreichend nachweisbare Wirksamkeit oder zu starke bzw. nicht tolerierbare Nebenwirkungen (Rosemann, 2014).

MSC in klinischen Studien: Phasen

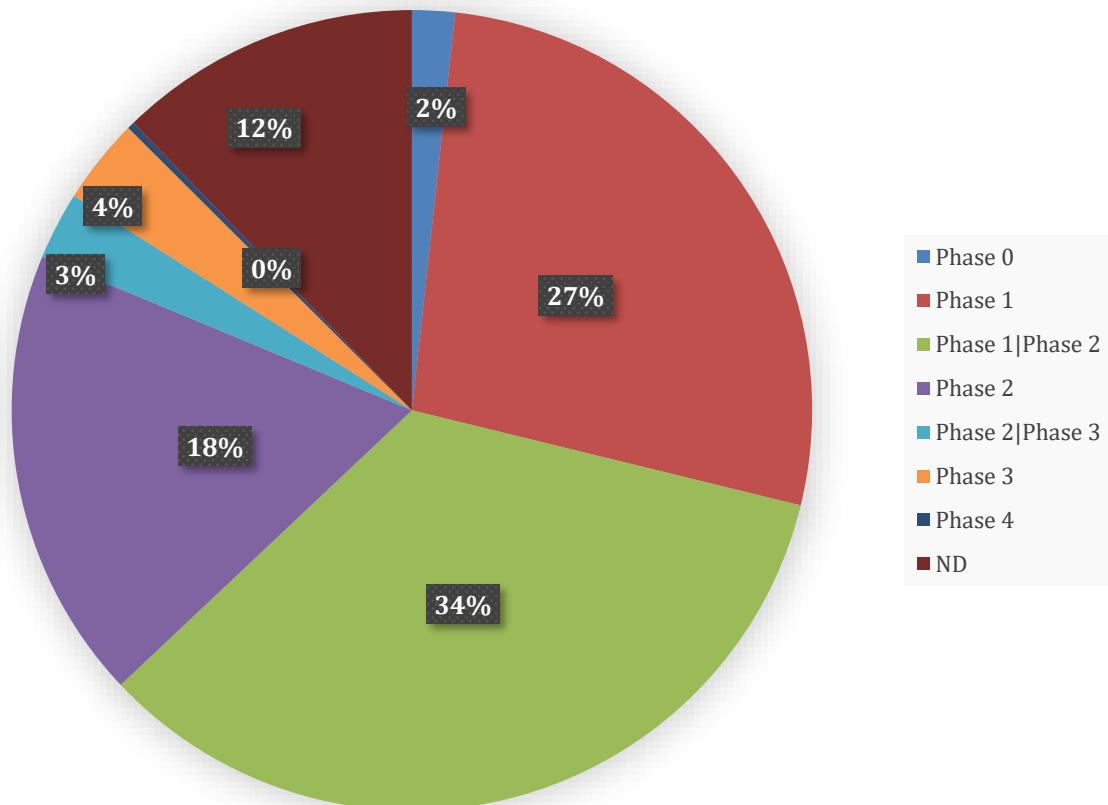


Abbildung 1: Fortschritt klinischer Studien mit MSC. ND= nicht definiert. Der überwiegende Teil der klinischen Studien mit MSC befindet sich noch in Phase I und II (79%). Der Anteil von Studien, die sich jenseits der Phase II befinden, beläuft sich auf gerade einmal 6%. Von den 694 gelisteten Studien befinden sich zwei in Phase 4. Daten von clinicaltrials.gov, Zugriff 10.01.2017.

MSC in klinischen Studien: Bereiche

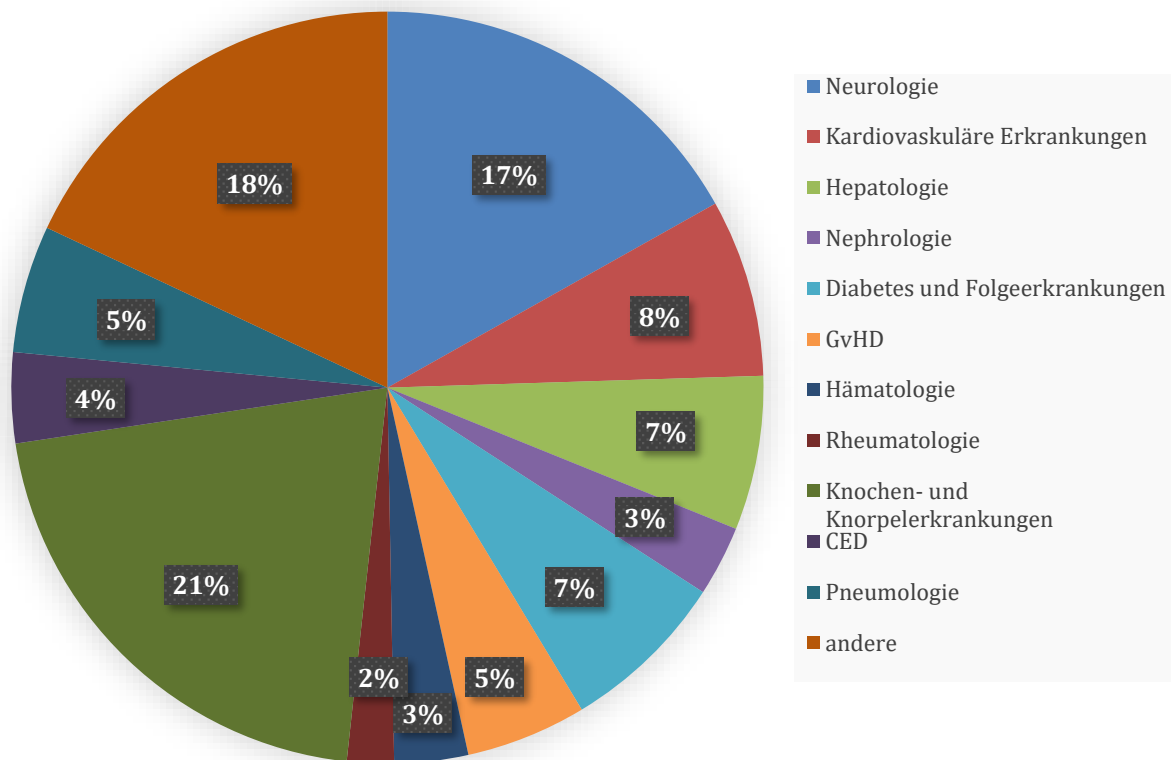


Abbildung 2: Verteilung der klinischen Studien mit MSC auf Krankheitsbilder. Der überwiegende Anteil der Studien bedient degenerative oder autoimmunbedingte Erkrankungen aus den Fächern Neurologie, Knochen- und Knorpelerkrankungen und unterschiedlichen Disziplinen der Inneren Medizin, insbesondere die GvHD und CED. Auch Diabetes Mellitus und dessen Folgeerkrankungen stellen einen nennenswerten Anteil dar. Daten von clinicaltrial.gov, Zugriff 10.01.2017.

1.3.6 Nebenwirkungen der MSC Therapie

Bei allen genannten Vorteilen von MSC ist für die klinische Anwendung neben der therapeutischen Wirksamkeit die Sicherheit eines der wichtigsten Kriterien. In den bisherigen Phase I und II Studien zeigte sich die Therapie mit MSC als nebenwirkungsarm und gut verträglich (Bank et al., 2015; Lalu et al., 2012; Sharma et al., 2014; Wang et al., 2012b).

Mögliche gefürchtete Nebenwirkungen der MSC Therapie sind eine maligne Transformation der verabreichten Vorläuferzellen, ein erhöhtes Infektionsrisiko durch die Infusion oder akute Toxizität, beispielsweise in Form eines Lungenödems. Diese Risiken erwiesen sich bisher alle als nicht signifikant (Lalu et al., 2012).

Von besonderem Interesse ist die Thrombogenität von MSC. Einige Studien und eine Meta-Analyse ergaben keine Gefahr kardiovaskulärer/thromboembolischer Ereignisse

durch die MSC Applikation (Bank et al., 2015; Lalu et al., 2012; Sharma et al., 2014). Demgegenüber zeigen mehrere Studien am Tiermodell, dass ein wesentlicher Teil der infundierten MSC direkt nach der Infusion in den Kapillargefäßen der Lunge verbleibt, bzw. dorthin embolisiert. Aufgrund der Häufigkeit dieser Beobachtungen hat dieses Phänomen den Namen „pulmonary first- pass effect“ erhalten (Fischer et al., 2009; Furlani et al., 2009; Gao et al., 2001; Rustad and Gurtner, 2012; Tatsumi et al., 2013). Bereits in der Lunge embolisierte MSC scheinen andererseits gerinnungshemmende und anti-inflammatorische Faktoren zu produzieren, wie beispielsweise das anti-inflammatorische Protein TSG-6, und dadurch die Schäden nach Myokardinfarkten zu verringern (Lee et al., 2009). Bei Hunden wurde dagegen sogar eine erhöhte Rate an Myokardinfarkten nach der Anwendung von MSC beobachtet (Vulliet et al., 2004).

Untersuchungen bezüglich molekularer Mechanismen waren bisher auf einige Faktoren, die die plasmatische Gerinnung fördern, beschränkt. Eine mehrfach beschriebene Ursache ist die erhöhte Nachweisbarkeit von tissue factor (TF) in MSC, sowohl auf expressioneller wie funktioneller Ebene (Gleeson et al., 2015; Moll et al., 2015; Moll et al., 2012; Stephenne et al., 2012; Tatsumi et al., 2013). TF initiiert den extrinsischen Weg der Gerinnungskaskade. Durch diese erhöhte Expression konnte ein gesteigertes Risiko von Lungenembolien nach MSC Infusionen bei Mäusen nachgewiesen werden (Tatsumi et al., 2013).

Außerdem wurde die Auslösung einer milden, sogenannten „instant blood -mediated inflammatory reaction“ beschrieben, die zu einer Reduktion der Thrombozytenzahl, möglicherweise durch einen erhöhten Verbrauch, und zu einer Erhöhung der Aktivierungsmarker im Blut führte. In einem makroskopischen Versuch wurde eine Thrombusbildung aus MSC und Plättchen beobachtet. Diese Ergebnisse korrelierten mit der Expansionszeit ex vivo und mit der Passagennummer der MSC. Denkbar wäre eine Auslösung der Plättchenaktivierung durch Kollagene auf der MSC Oberfläche. Im flussbasierten Modell zeigte sich dagegen primär kein Thrombozytenverbrauch (Moll et al., 2012).

Der erste Bericht über einen dramatischen Vorfall im Zusammenhang mit der Anwendung von MSC stammt aus dem Jahr 2010, als über einen möglichen Todesfall durch eine Lungenembolie nach der Infusion von MSC berichtet wurde. Es ist allerdings nicht eindeutig belegt, ob die Embolie ursächlich auf die MSC zurückzuführen ist (Cyranoski, 2010). Weiterhin wurde von einer familiären Häufung pulmonaler Thromboembolien nach der intravenösen Infusion von LA-MSC berichtet. Diese bildeten sich spontan zurück (Jung et al., 2013). (Tab. 2, Abb. 3).

Im Gegensatz dazu stehen einige Berichte, die wiederum sogar anti-thrombotische Eigenschaften von MSC beschreiben. An vaskulären MSC Grafts konnten verringerte Raten an Thrombozytenadhesion und -aktivierung festgestellt werden (Hashi et al., 2007). Außerdem wurden erhöhte Expression von Plasminogen activator, urokinase type (PLAU) in BM-MSC nach Inkubation mit dem Überstand von Thrombozyten nachgewiesen (Agis et al., 2009). PLAU scheint es MSC auch zu ermöglichen, Fibrinklots zu lysieren, um in diese zu migrieren (Neuss et al., 2010). PLAU ist wesentlich mit an der Aktivierung von Plasminogen beteiligt, das für die Lyse von Fibrin verantwortlich ist (Tab. 3, Abb. 8).

In der Gesamtheit sind die Berichte über den Einfluss bzw. die Auswirkungen von MSC auf die Gerinnung nicht eindeutig. Daher erscheint es notwendig, einen systematischen Ansatz durchzuführen, um Zugang zu der Problematik zu bekommen.

Insbesondere mit Bezug auf den zellulären Aspekt der Gerinnung gibt es sehr wenige spezielle Untersuchungen.

Tabelle 2: Übersicht von Studien, die pro-koagulatorische Eigenschaften von MSC beschreiben

Ereignis	Ursache	Studie
Embolisierung eines Großteils der infundierten MSC in der Lunge	Zellgröße	Gao et al. (2001)
Erhöhte Thrombusbildung nach intracoronärer MSC Applikation nach akutem Myokard bei Schweinen	TF	Gleeson et al. (2015)
Lethale Lungenembolien nach i.v. Applikation bei Mäusen	Gesteigerte TF Expression nach in vitro Kultur/ Passagezahl	Tatsumi et al. (2013)
Embolisierung eines Großteils der infundierten MSC in der Lunge	Nicht bekannt	Rocheftort et al. (2005)
Kardiale Mikroinfarkte und Ischämien nach intrakoronärer MSC Applikation bei Hunden	Zellgröße diskutiert	Vulliet et al. (2004)
Embolisierung eines Großteils der i.v. infundierten MSC in der Lunge bei Mäusen	Höhere Lungenanreicherung der MSC nach i.v. Applikation im Vergleich zur i.a. Applikation	Lee et al. (2009)
Lungenembolie nach i.v. MSC Applikation beim Menschen	Nicht bekannt	Cyranoski (2010)
Erhöhte Koagulationsmarker und reduzierte Plättchenzahl im Blut nach MSC Infusion	Passagezahl	Moll et al. (2012)
Lungenembolien nach autologer MSC Infusion bei mehreren Mitgliedern derselben Familie	Nicht bekannt, spontane Rückbildung der Embolien	Jung et al. (2013)
Verringerte Gerinnungszeit in vitro durch MSC, reduzierte Plättchenzahl kurz nach i.v. Infusion bei Menschen	MSC Quelle: BM-MSc weniger pro-koagulatorisch als MSC aus Deziduagewebe, MSC Anzahl, TF, Passagezahl	Moll et al. (2015)

Unterschiedliches Adhäsionsverhalten von MSC an Laminin und Endothelzell	Zellgröße; Zellkulturmedium (verringerte Adhäsion und Lungenanreicherung bei humanem Serum verglichen mit FCS)	Dreher et al. (2013)
Erhöhte Tissue factor Expression	Kryopreservation und Auftauen	Hoogduijn et al. (2016)
Embolisierung eines Großteils der infundierten MSC in der Lunge	Nicht bekannt	Harting et al. (2009)
Embolisierung eines Großteils der infundierten MSC in der Lunge	Zellgröße	Zanetti et al. (2015)
Embolisierung eines Großteils der infundierten MSC in der Lunge	Zellgröße, CD49d	Fischer et al. (2009)
Niedrige Anreicherung von MSC im Zielorgan nach Infusion wegen Koagulation	TF, verringerte Expression von Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)	Stephene et al. (2012)
Verbleiben eines Großteils der infundierten MSC in der Lunge ohne sichtbare Embolien	Höhere Lungenanreicherung der MSC nach i.v. Applikation im Vergleich zur i.a. Applikation	Makela et al. (2015)
Beteiligung von MSC an der Wundheilung durch Inhibition fibrinolytischer Proteasen	Plasminogen activator inhibitor (PAI)	Heissig et al. (2015)
Letale Embolien nach MSC Infusionen bei Mäusen	TF, MSC Quelle	Ramot et al. (2010)

Beschriebene Ursachen für MSC Embolisierung

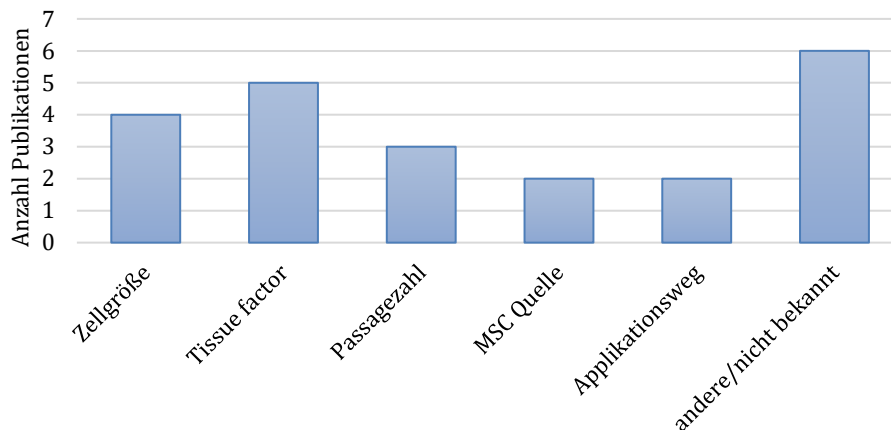


Abbildung 3: Häufig beschriebene Ursachen pro-koagulatorischer Wirkung von MSC

Tabelle 3: Übersicht von Studien, die anti-koagulatorische Eigenschaften von MSC beschreiben

Ereignis	Ursache	Studie
Reduzierung von Plättchenadhäsion und Thrombusbildung in Gefäßtransplantaten durch das Aussäen von MSC	Heparansulfat-Proteoglykane auf der MSC Oberfläche	Hashi et al. (2007)
Erhöhte fibrinolytische Aktivität von MSC nach Inkubation mit Plättchenüberstand	PLAU, Urokinase plasminogen activator receptor (uPAR), PAI	Agis et al. (2009)
Sekretion fibrinolytischer Moleküle von MSC nach Embolisierung in Lungenkapillaren	TSG-6	Lee et al. (2009)
Hohe fibrinolytische Aktivität von MSC zur Invasion von Fibrinklots	PLAU, uPAR, PLAT, PAI	Neuss et al. (2010)
Beteiligung von MSC an der Wundheilung durch fibrinolytische Proteasen	uPAR	Heissig et al. (2015)

1.4 Blutgerinnung

Um Interaktionen von MSC und Thrombozyten untersuchen zu können, gilt es einen grundlegenden Überblick über das Gerinnungssystem zu erhalten. Der erste Schritt der physiologischen Aktivierung von Blutplättchen nach Verletzung eines Gefäßes ist die Aktivierung durch Proteine der subendothelialen Matrix, wie Kollagen oder von Willebrand Faktor (Angiolillo et al., 2010). Diese sind nur zugänglich, wenn das darüber liegende Endothel geschädigt wurde. Die Bindung entsprechender Proteine löst in

Thrombozyten diverse Signalkaskaden aus. Das Resultat ist ein Anstieg der intrazellulären Calcium Konzentration, Metabolismus von Phosphatidylinositol, oder Phosphorylierung von zytoplasmatischen oder intranukleären Proteinen. Dadurch werden Ausschüttungen der Thrombozytengranula initiiert, wodurch lösliche Faktoren wie Thromboxan A2 (TXA2), Adenosindiphosphat (ADP) oder Thrombin freigesetzt werden, die wiederum weitere Plättchen aktivieren. Proteine wie Integrine, die eine Thrombozytenadhäsion vermitteln, werden auf die Zelloberfläche transportiert. Zusätzlich verändert das Zytoskelett seine Konformation. Pseudopodien werden ausgebildet, wodurch die ehemals runden Plättchen eine deutliche Vergrößerung der Oberfläche erfahren. Im aktivierten Zustand werden die Thrombozyten adhäsiv, was eine Anhaftung im beschädigten Bereich des Gefäßes bewirkt und zu einem primären Verschluss der Wunde führt, bis die plasmatische Gerinnung greift (Andrews et al., 1997; Angiolillo et al., 2010; Cimmino and Golino, 2013). Die beschriebenen Veränderungen an und in Thrombozyten erlauben die Unterscheidung von Thrombozyten im aktivierten und nicht-aktivierten Zustand, welche sich Methoden wie die Durchflusszytometrie zunutze machen.

1.5 Vorarbeiten

Prinzipiell sind zwei Möglichkeiten der Interaktion von MSC mit Thrombozyten möglich. Denkbar wäre einerseits die Produktion von löslichen Faktoren, die auf Thrombozyten wirken, andererseits könnte aber auch ein direkter Kontakt von MSC und Thrombozyten zu einer Beeinflussung führen.

Zur Untersuchung der ersten genannten Möglichkeit habe ich in meiner Masterarbeit bereits eine Beeinflussung von Thrombozyten durch konditioniertes Medium von MSC untersucht. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der Aktivierung zwischen Thrombozyten, die mit unkonditioniertem oder konditioniertem MSC Zellkulturmedium inkubiert wurden. Abbildung 4 stellt diese Daten dar.

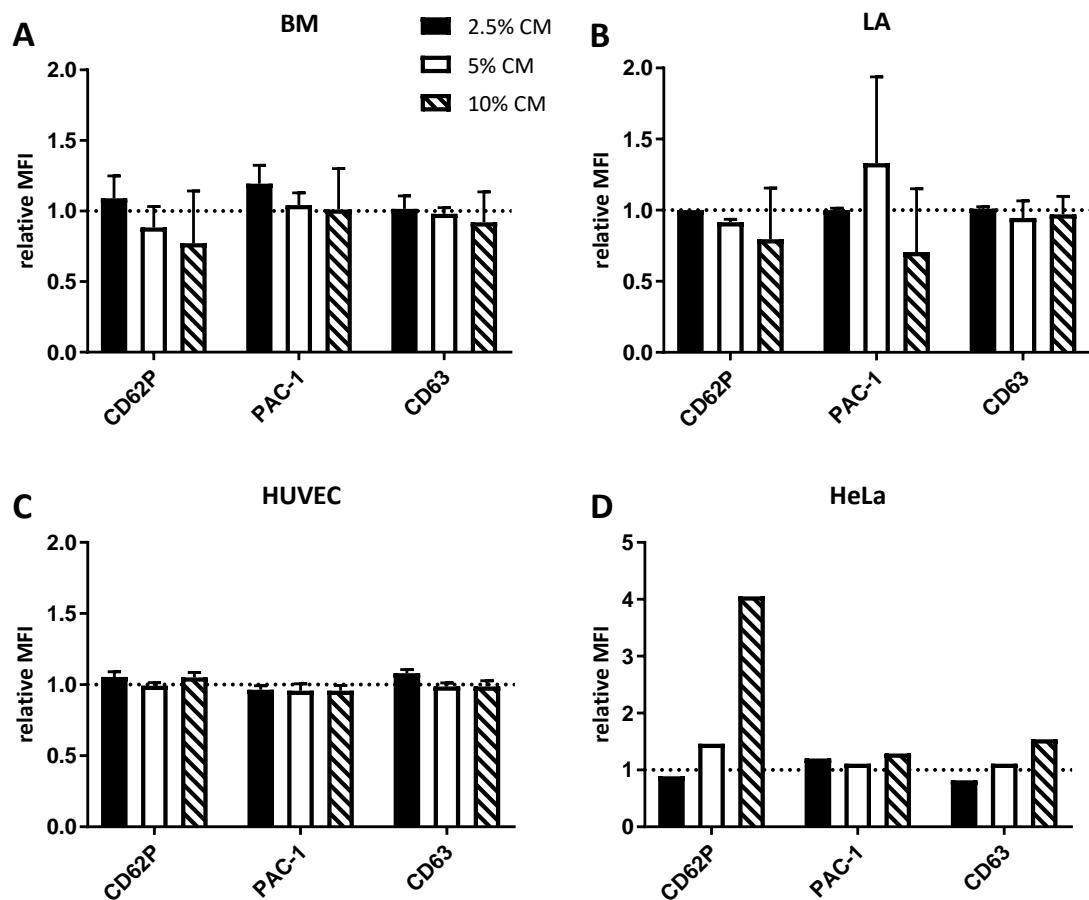


Abbildung 4: Vergleich des Einflusses von konditioniertem und nicht konditioniertem MSC Medium auf die Thrombozytenaktivierung in der Durchflusszytometrie. Die Quantifizierung der Aktivierung erfolgte anhand der drei aktivierungsabhängigen Marker CD62P, PAC-1 und CD63 (vgl. 2.6). Die Y-Achse stellt die relative prozentuale Aktivierung der Thrombozyten in Anwesenheit von konditioniertem Medium im Vergleich zu unkonditioniertem Medium dar (entsprechend besteht bei $Y=1$ kein Unterschied). Die drei verschiedenfarbigen Balken illustrieren die Konzentrationen 2,5%, 5% und 10% Mediumanteil im Versuchsvolumen. CM= konditioniertes Medium

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Da das Risiko thromboembolischer Ereignisse durch MSC Infusionen bisher nur wenig Aufmerksamkeit erfahren hat und insbesondere der zelluläre Aspekt der Koagulation in diesem Zusammenhang beinahe gänzlich unberücksichtigt blieb, sollte diese Arbeit ein erstes Screening auf Interaktionen von Thrombozyten mit MSC darstellen.

Mithilfe unterschiedlicher Methoden sollte untersucht werden, ob Einflüsse von MSC auf Thrombozyten bestehen, bzw. ob deren Aktivierung durch MSC erhöht, verringert, oder überhaupt nicht beeinflusst wird. Frühere Versuche hatten bereits eine Beeinflussung der Thrombozytenaktivierung durch konditioniertes MSC Medium ausgeschlossen (vgl. 1.5), sodass nun die direkte Interaktion von MSC und Thrombozyten untersucht werden sollte. Zur Quantifizierung der Thrombozytenaktivierung dienten die Durchflusszytometrie und die Impedanzaggregometrie. Zusätzlich erfolgte eine visuelle Kontrolle der gemessenen Ergebnisse unter dem Fluoreszenzmikroskop. Um auch Anteile der plasmatischen Gerinnung abzubilden erfolgten erweiternde RT-qPCR Experimente zur Untersuchung der Expression entsprechender Gene in MSC.

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Eigenschaften von MSC aus unterschiedlichen Quellen (siehe 1.1.2) stellte neben der grundsätzlichen Frage nach einem Einfluss von MSC auf Thrombozyten auch der Vergleich unterschiedlicher MSC Populationen einen wesentlichen Anteil dar. Zusätzlich wurden Versuche unternommen, um zugrundeliegende Mechanismen und weitere Einflussfaktoren zu identifizieren. Als Kontrollen wurden Zellen verwendet, die bekannt sind, eine positive/negative Beeinflussung der Thrombozytenaktivierung zu verursachen. Es gibt Daten, dass Tumorzellen (in dieser Arbeit Hela Zellen) Thrombozyten aktivieren (Alonso-Escolano et al., 2004; Bastida et al., 1987; Medina et al., 2012; Mehta, 1984), während Endothelzellen aus der menschlichen Nabelschnurvene (HUVEC) unter physiologischen Bedingungen Thrombozyten hemmen sollten (Broekman et al., 1991; Kroll et al., 1996).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Herkunft und Isolation von MSC, HUVEC und HeLa Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten HeLa Zellen wurden von Prof. Ilse Hofmanns Arbeitsgruppe „Zelluläre Adhäsion und Signalketten“ aus dem Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg zur Verfügung gestellt.

Die eingesetzten MSC und HUVEC wurden entsprechend etablierter Protokolle isoliert.

Kurz zusammengefasst wurden BM-MSC aus Knochenmarksaspirat gewonnen. Um die mononukleären Zellen zu gewinnen durchlief dieses eine Dichtegradientenzentrifugation. Die resultierende Zellsuspension wurde anschließend in Zellkulturflaschen ausgesät, wobei die adhesiven Eigenschaften von MSC an Plastikoberflächen wesentlich waren, während andere mononukleäre Zellen bei Mediumwechseln abgesaugt wurden (Kern et al., 2006).

Die initiale Verarbeitung zur Gewinnung von LA-MSC folgte bekannten Protokollen (Kern et al., 2006; Zuk et al., 2002). Das Isolat wurde dann gewaschen, mit Kollagenase verdaut, zentrifugiert, gefiltert und erneut zentrifugiert. Nach der Resuspension des Pellets wurden die Zellen ebenso wie auch BM-MSC in Zellkulturflaschen ausgesät. Nicht adhärante Zellen wurden bei Mediumwechseln entfernt.

Wesentliche Aspekte der Gewinnung von Nabelschnurblut sind an anderer Stelle beschrieben (Bieback and Netsch, 2015). Die Isolation von CB-MSC aus Nabelschnurblut entspricht weitgehend dem Verfahren der BM-MSC Isolation.

HUVEC wurden aus Nabelschnüren mithilfe einer Kollagenase I Verdauung abgelöst und anschließend gesammelt und ausgesät (Baudin et al., 2007; Bieback et al., 2013).

2.2 Zellkultur

Zur Expansion der isolierten MSC erfolgte in vitro Kultur. Die gewählte Zieldosis basiert auf der Kalkulation, dass bei einer Transfusion eine Dosis von etwa $1-2 \times 10^6$ ($0,5 - 6 \times 10^6$) MSC /kg Körpergewicht des Empfängers in einem Volumen von 20-100ml infundiert werden (Duijvestein et al., 2010; Hare et al., 2009; Mazzini et al., 2010; Panes et al., 2016). Die eingesetzte Standardkonzentration wurde mit 5×10^5 /ml kalkuliert.

MSC und HeLa Zellen wurden in DMEM-Medium (Lonza) gezüchtet, dem außerdem 10% fetales Kälberserum (PromoCell) oder 10% gepooltes humanes AB-Serum sowie Penizillin, Streptomycin und L-Glutamin zugesetzt wurden. HUVEC wurden in EGM-2 Medium (Lonza) kultiviert. Zur Herstellung von humanem AB Serum vgl. frühere Publikationen (Bieback et al., 2010; Bieback et al., 2012a; Wuchter et al., 2015).

Für die Durchführung der Versuche wurden kryokonservierte MSC genutzt. Die Konservierung erfolgte mit Konzentrationen von $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ Zellen /ml in Zellkulturmedium versetzt mit 10% DMSO. Für die längerfristige Aufbewahrung der Zellen wurden diese bei -180°C in flüssigem Stickstoff gelagert und bei Bedarf langsam aufgetaut und in Kultur genommen.

In der Zellkultur erfolgte zweimal pro Woche ein Mediumwechsel. Während der Kultur wurden die Zellen in einem Inkubator bei 37°C bei 5% CO_2 aufbewahrt. Bei einer Konfluenz von 70-80% wurden die Zellen durch Zugabe von Trypsin/EDTA gesplittet und in neuen Kulturflaschen ausgesät. Zwei Tage vor den Messungen wurden je 10^6 Zellen desselben Spenders in zwei T175 (MSC)/ T75 (HeLa Zellen, HUVEC) Flaschen ausgesät. Nach 48 Stunden wurden diese geerntet und für die

impedanzaggregometrischen Versuche und für das Durchflusszytometer genutzt. Die Passagennummer von HUVEC und MSC variierte bei experimenteller Anwendung zwischen 3 und 6. Nach der Abernung wurden die Zellen gezählt (CASY-TT; Roche, Germany), zentrifugiert und entsprechend konzentriert für die folgenden Experimente in phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) resuspendiert. Bis zur Anwendung wurden die Zellen in PBS aufbewahrt.

2.3 Blutpräparation

Zur Gewinnung von Plättchen wurden für jeden Versuch frische Blutproben gewonnen. Die freiwilligen Spender wurden über die Verwendung ihres Blutes aufgeklärt und ihr Einverständnis wurde eingeholt. Bei allen Spendern wurde sichergestellt, dass diese keine cyclooxygenasehemmenden Substanzen wie ASS oder Ibuprofen in den vergangenen 14 Tagen eingenommen hatten. Das Blut wurde aus der antecubitalen Vene mit 21 Gauge Butterflynadeln bei geringer oder ohne Stauung abgenommen. Das Blut wurde in hirudinbeschichteten 2,7ml Röhrchen oder in 9,0ml Citrat-Dextrose-Phosphate-Adenin (CPDA) Röhrchen gesammelt.

Da für die Impedanzaggregometrie-Versuche Vollblut verwendet wurde, waren hier keine weiteren Schritte notwendig. Für die Durchflusszytometrie wurde das CPDA antikoagulierte Blut bei 100g für 10 Minuten zentrifugiert und 1ml der daraus resultierenden PRP Phase abgenommen und, um den Plättchencount zu reduzieren, mit 1ml PBS verdünnt. Die Versuche zur Dosisabhängigkeit erfolgten aufgrund besserer PAC-1 Bindung in Hirudin antikoaguliertem Blut. Hier wurde zur PRP Gewinnung aufgrund des geringeren Volumens (2,7ml) nur mit 100g für 10 Minuten zentrifugiert.

2.4 Kontrollen und Agonisten

Um die Validität der Messmethoden sicherzustellen wurden jeweils Zellpopulationen eingesetzt, deren Potential die Thrombozytenstimulation zu hemmen bzw. zu induzieren bereits vielfach beschrieben wurde.

Als Zellpopulation, die potentiell zu einer Thrombozytenaktivierung führt, wurden HeLa Zellen verwendet (Alonso-Escolano et al., 2004; Bastida et al., 1987; Medina et al., 2012; Mehta, 1984).

Als potentieller Inhibitor der Thrombozyten wurden HUVEC eingesetzt (Broekman et al., 1991; Durante et al., 1992; van Hinsbergh, 2012)

Da neben dem Einfluss der Zellen auf ruhende Thrombozyten auch der Effekt auf deren Aktivierung untersucht werden sollte war eine Stimulation der Thrombozyten mit entsprechenden Agonisten notwendig.

Um dabei bereits Hinweise auf molekulare Mechanismen der potentiellen Interaktion von HUVEC, HeLa Zellen und MSC mit Thrombozyten zu bekommen, wurden in der Durchflusszytometrie und in der Impedanzaggregometrie unterschiedliche Aktivierungswege untersucht. Insbesondere das Multiplate® liefert nur eine rein mechanische Auswertung der Ergebnisse. Die Verwendung unterschiedlicher Agonisten zur Plättchenstimulierung stellt hier eine Möglichkeit dar, Hinweise auf molekulare Mechanismen zu erhalten.

Einerseits erfolgte eine Thrombozytenaktivierung mit ADP. ADP bindet an den P2Y₁ und an den P2Y₁₂ Rezeptor auf der Oberfläche von Thrombozyten. Beide Rezeptoren

sind an G-Proteine gekoppelt und führen zu einer Calciumausschüttung aus den intrazellulären Speichern ins Cytosol, zu einer Aktivierung von Integrinen, zur vermehrten Expression von CD62P und zur Sekretion von Thromboxan A₂ (TXA₂), wodurch weitere Thrombozyten stimuliert werden. Durch diese Mechanismen werden insbesondere die Stabilisierung des Thrombus, sowie die Rekrutierung weiterer Plättchen zum Thrombus gefördert (Angiolillo et al., 2010; Cimmino and Golino, 2013; Dorsam and Kunapuli, 2004).

Der zweite eingesetzte Agonist war das Thrombin Receptor Agonist Peptide (TRAP). TRAP ist ein synthetisches Thrombinäquivalent, das aber im Gegensatz zu Thrombin nicht durch Hirudin inhibiert wird. Es bindet wie Thrombin an die Protease aktivierten Rezeptoren (PAR) 1 und 4. PAR werden durch Spaltung durch Thrombin aktiviert. Thrombin ist ein sehr potenter Agonist, von dem bereits geringe Konzentrationen ausreichend sind, um insbesondere PAR1 zu aktivieren. Über die Aktivierung von G-Proteinen werden diverse Mechanismen in den Plättchen induziert. Dazu gehören beispielsweise die Sekretion von TXA₂ und ADP oder die Mobilisierung von CD62P aus den α -Granula. PAR4 zeigt eine geringere Affinität zu Thrombin. Allerdings bewirkt eine PAR4 Aktivierung eine deutlich stärkere Erhöhung der intrazellulären Calciumspiegel, die u.a. Umbauvorgänge im Cytoskelett bewirken und an der morphologischen Änderung der Thrombozyten beteiligt sind (Sidhu et al., 2014).

Zuletzt wurde U46619 genutzt, ein Agonist des G-Protein gekoppelten Thromboxan Rezeptors. Nach Aktivierung wird über Phosphoinositol- und Diacylglycerinbildung die Proteinkinase C aktiviert, die ebenfalls eine Erhöhung der Calciumkonzentration mit den oben beschriebenen, darauffolgenden Mechanismen bewirkt (Cimmino and Golino, 2013).

2.5 Impedanzaggregometrie

Die Impedanzaggregometrie diente als physikalisches Verfahren, um den Einfluss der eingesetzten Zellen auf Thrombozyten und deren Aktivierung, bzw. deren Aggregationsneigung, zu quantifizieren. Dementsprechend sollte dieses Verfahren die Funktionalität der Thrombozyten in MSC Anwesenheit untersuchen.

Bei der Impedanzaggregometrie handelt es sich um eine schnell durchführbare, mechanische Methode, um Thrombozytenaktivierung nachzuweisen. Daher erlaubt sie auch keine direkten Rückschlüsse auf molekulare Mechanismen, sondern ist v.a. für die klinische Routine zur Diagnostik von Thrombozytenfunktionsstörungen und zum Monitoring von plättchenhemmender Therapie geeignet (Wurtz et al., 2014). Im wissenschaftlichen Bereich eignet sich die Methode, um erste Screenings auf mögliche Einflüsse von untersuchten Faktoren auf Thrombozytenaktivierung durchzuführen (Schedel et al., 2010; Schedel et al., 2011).

Die Methode arbeitet mit Hirudin antikoaguliertem Vollblut, wodurch zusätzliche Schritte, die das Ergebnis der Messung beeinflussen könnten, wie weitere Isolation der Thrombozyten oder zusätzliche Waschschrte entfallen.

Das von für diese Arbeit genutzte Gerät war das Multiplate® von Roche. Es besteht aus einem Computer mit Monitor, einem Heizblock, sowie 5 Öffnungen für die jeweiligen Messzylinder mit den zu messenden Proben. Es werden spezielle

Messgefäße benutzt, die in die Maschine eingesetzt werden und in die das Vollblut pipettiert wird. Bis zu fünf dieser Zylinder können gleichzeitig in die Maschine eingesetzt und gemessen werden. In die Messzylinder sind zwei Elektrodenpaare integriert. Zu dem Blut in den Messzylindern werden Salzlösung und nach einer Erwärmung auf 37°C im Gerät die Thrombozytenagonisten zugefügt. Durch einen in jedem Gefäß enthaltenen Magnetrührer wird eine gute Durchmischung aller Komponenten gewährleistet. Durch die Agonisten werden die beschriebenen Veränderungen wie erhöhte Adhäsivität und Aggregation in den Plättchen ausgelöst. Die Thrombozyten beginnen nun um die Elektroden zu aggregieren und einen sukzessive wachsenden Thrombus zu bilden. Im Ergebnis steigt der elektrische Widerstand zwischen den beiden Elektroden. Dieser Prozess wird kontinuierlich registriert und als Funktion des Widerstands über die Zeit dargestellt. Der kritische, das Messergebnis beschreibende Wert beruht auf der Integration der beiden Werte elektrischer Widerstand und Zeit, und wird als „area under the curve“ (AUC) quantifiziert. Da in jedem Messzylinder zwei Elektrodenpaare vorhanden sind beinhaltet jede Messung eine integrierte Qualitätskontrolle und resultiert in jeweils zwei Kurven, deren Mittelwert für die Berechnung der AUC genutzt wird.

Das Probenvolumen im Multiplate® umfasst insgesamt 600µl, wovon 300µl auf Vollblut entfallen und 300µl auf physiologische NaCl Lösung. Für die Experimente wurden ADP 3,33µM und TRAP 6,66µM (Roche Diagnostics, Mannheim) als Agonisten eingesetzt (Tab. 4). Die Konzentrationen wurden basierend auf Erfahrungswerten unserer Arbeitsgruppe gewählt (Schedel et al., 2010; Schedel et al., 2011).

Während der Experimente wurden die Agonisten auf Eis gelagert. Da die Zellen in PBS aufbewahrt wurden, wurde dem Blutvolumen ein entsprechendes Volumen PBS zugefügt, das mit dem Volumen an Zellen in PBS auf 300µl aufgefüllt wurde. Für jeden Spender wurden Messungen mit ADP und TRAP ohne zusätzliche Zellen und mit Zellen durchgeführt. Es wurden jeweils zwei Zellkonzentrationen getestet, 3×10^5 und 6×10^5 Zellen pro Test (600µl Gesamtvolumen), entsprechend 5×10^5 /ml bzw. 10^6 /ml. Außerdem wurde, um sicherzustellen, dass keine relevante Stimulation der Thrombozyten vor Zugabe der Agonisten vorlag, eine Probe unstimulierter Plättchen gemessen, sowie eine Probe unstimulierter Plättchen in der Anwesenheit unstimulierter Zellen.

Zellen und Plättchen wurden vor Zugabe der Agonisten 10 Minuten vorinkubiert, 7 Minuten außerhalb der Maschine und 3 Minuten in der Maschine. Die Messungen starteten unmittelbar nach Zugabe der Agonisten und dauerten jeweils 6 Minuten.

Tabelle 4: Beispiel für ein Pipettierschema am Multiplate®. Volumenangaben beziehen sich auf μl . Vollblut wurde mit Hirudin antikoaguliert. Die Stocklösung des Agonisten beinhaltet TRAP 1mM. Die Stocklösung der eingesetzten MSC beinhaltet $6 \times 10^6/\text{ml}$. Gemessen wurde die Ausgangsstimulation der Thrombozyten, der Einfluss der MSC auf unstimulierte Thrombozyten, die Stimulationsstärke nach Zugabe von TRAP $6,66\mu\text{M}$ und der Einfluss zweier MSC Dosen auf diese Stimulation.

TRAP	Vollblut	PBS	MSC	Agonist
unstimuliert	300	300		4 PBS
unstimuliert+MSC 3x10e5	300	250	50	4 PBS
stimuliert (TRAP)	300	300		4 TRAP
stimuliert (TRAP)+3x10e5	300	250	50	4 TRAP
Stimuliert (TRAP)+6x10e5	300		100	4 TRAP

2.6 Durchflusszytometrie

Um die Thrombozytenaktivierung anhand von molekularen Markern nachzuweisen diente die Durchflusszytometrie als zweites Quantifizierungsverfahren.

Das fluorescence activated cell sorting (FACS) erlaubt den spezifischen Nachweis von Antigenen auf und in Zellen. Dazu werden Antikörper verwendet, die spezifisch an die entsprechenden antigenen Strukturen binden. An die Antikörper sind fluoreszierende Moleküle gekoppelt. Nachdem die Zellen mit den entsprechenden Antikörpern markiert wurden laufen sie in einem Flüssigkeitsstrom, wodurch sichergestellt wird, dass die Zellen einzeln in einer Reihe fließen. Während die Zellen in diesem Strom fließen werden die Fluorochrome von gebundenen Antikörpern mit Lasern angeregt. Die fluoreszierenden Moleküle absorbieren die Lichtenergie des Lasers, wodurch Elektronen vorübergehend auf ein höheres Energieniveau befördert werden. Die Elektronen fallen schnell zurück auf ein geringeres Energielevel, wobei die überschüssige Energie in Form eines Photons freigesetzt wird. Das Photon wird durch ein Filtersystem in Richtung eines Detektors gelenkt, der die Photonenenergie in elektrische Signale umwandelt. Ein Computer registriert schlussendlich die elektrischen Energieimpulse. Demzufolge ergibt eine hohe Zahl gebundener Antikörper ein starkes Signal, während eine geringe Menge gebundener Antikörper in einem schwachen Signal resultiert. Es sind unterschiedliche Fluorochrome wie Fluorescein Isothiocyanat (FITC), Allophycocyanin (APC) oder Phycoerythrin (PE) verfügbar, was die Detektierung mehrerer Antigene auf einer Zelle ermöglicht, da die unterschiedlichen Fluorochrome durch Laser unterschiedlicher Wellenlängen erregt werden. Die Erregung ist jedoch durch einen Bereich von Wellenlängen möglich, der auch bei unterschiedlichen Fluorochromen teilweise überlappen kann. Dadurch entsteht auf Kanälen für unterschiedliche Fluorochrome eine gewisse Erregung durch Laserstrahlen derselben Wellenlänge. Wird nur ein Antigen bestimmt spielt diese Problematik keine Rolle, bei Messung mehrerer fluoreszenzmarkierter Antikörper mit überlappenden Spektren muss jedoch der Anteil der Überlappung herausgerechnet werden (=Kompensation), was durch entsprechende Messungen mit einfach gefärbten Zellen möglich ist.

Zusätzlich können unterschiedliche Zellpopulationen einer Probe anhand zweier morphologischer Kriterien verglichen werden. Ermöglicht wird dies durch die Streuung des Lichts. Streuung bedeutet, dass auf die Zellen treffendes Licht einerseits durch die

Zelloberfläche und andererseits durch Einschlusskörper in der Zelle abgelenkt werden. Die Zellmembran bewirkt eine geringfügige parallele Verschiebung der Achse des auftreffenden Lichts, die von einem Detektor erfasst wird. Diese Abweichung wird als forward scatter (FSC) bezeichnet. Sie erlaubt die Differenzierung unterschiedlicher Zellpopulationen einer Probe anhand der Größe. Die durch Granula entstehende Ablenkung erfolgt in einem Winkel von circa 90° zur Seite und lässt Rückschlüsse auf die relative Dichte einer Zellpopulation verglichen mit einer anderen Population aus derselben Probe zu. Diese seitliche Ablenkung wird als „sideward scatter“ (SSC) bezeichnet. FSC und SSC sind allerdings, wie auch alle anderen ermittelten Messwerte in der Durchflusszytometrie, relative Angaben und können stets nur im Verhältnis zu Kontrollpopulationen beurteilt werden (BDBiosciences, 2000).

Die Beurteilung von Thrombozytenaktivierung in der Durchflusszytometrie macht sich die Tatsache zunutze, dass bestimmte Marker nur im aktivierten Zustand auf der Oberfläche von Plättchen nachweisbar sind. Dadurch können unstimulierte Plättchen mit geringer Antikörperbindung von stimulierten Plättchen mit starker Antikörperbindung unterschieden werden. Bei den gemessenen Antigenen handelt es sich generell vor allem um Proteine wie Integrine oder Glykoproteine, die an der Bindung von Thrombozyten an Endothelzellen oder untereinander beteiligt sind. Für diese Arbeit wurden die Antigene CD62P (P-Selectin, GMP-140), CD63 und die aktivierte Konformation des Glykoproteinkomplexes IIa/IIIb (CD41/CD62) als aktivierungsabhängige Marker bestimmt. Zusätzlich, um eine eindeutige Identifizierung der Thrombozyten in Anwesenheit anderer Zellen wie HUVEC, HeLas und MSC sicherzustellen wurde ein weiterer, gegen CD41 gerichteter Antikörper, zugefügt, der aktivierungsunabhängig exprimiert wird.

CD62P ist ein membranständiges Protein und wird im nicht aktivierten Zustand in den Membranen der α -Granula der Plättchen gespeichert. Im Zuge der Aktivierung werden die Granula an die Zelloberfläche transportiert und fusionieren mit dieser, wodurch membranständige Proteine wie CD62P nun auf der Oberfläche nachweisbar werden. CD62P vermittelt die Bindung aktivierter Thrombozyten an Oberflächenproteine von Endothelzellen wie beispielsweise an den Glykoprotein Ib-IX-V (Gong et al., 2012) Komplex und trägt dadurch zum primären Wundverschluss durch Thrombozytenanhaftung bei (McEver, 1990; Stenberg et al., 1985). Weiterhin vermittelt CD62P die Bindung von Thrombozyten an Leukozyten wie Neutrophile und Monozyten (Hamburger and McEver, 1990; Larsen et al., 1989), aber auch an CD4- und CD8-positive Lymphozyten oder natürliche Killerzellen (de Bruijne-Admiraal et al., 1992).

CD63 ist, wie CD62P, ein membranständiges Protein. Allerdings wird es in unstimulierten Plättchen nicht in Granula, sondern in den Membranen von Lysosomen gespeichert. Ähnlich wie die CD62P enthaltenden α -Granula verschmelzen die Lysosomen nach der Thrombozytenaktivierung mit der Zellmembran, wodurch CD63 auf der Oberfläche nachweisbar wird. Es gehört zur Familie der Tetraspanine, die typischerweise vier Transmembrandomänen aufweisen und ist außerdem ein wichtiger Cofaktor für CD62P (Doyle et al., 2011). Auch diverse intrazelluläre Signalkaskaden werden durch CD63 beeinflusst, was Auswirkungen auf den Zellzyklus, -wachstum und -entwicklung hat (Aerts et al., 2009; Verweij et al., 2011). Ein CD63 Defizit ist assoziiert mit dem Hermansky-Pudlak Syndrom, bei dem es zu Ablagerungen in thrombozytären Lysosomen u.a. mit erhöhter Blutungsneigung kommt (Nieuwenhuis et al., 1987).

Der letzte aktivierungsabhängige Marker, der untersucht wurde, war die aktive Konformation des Glykoprotein (GP) IIb/IIIa Komplexes. Der heterodimere Komplex besteht aus den zwei Bestandteilen CD41 und CD61, beide Integrine, die auch auf unstimulierten Thrombozyten nachweisbar sind. Nach Aktivierung ändert sich jedoch die Konformation des Komplexes, was eine spezifische Bindung des Antikörpers PAC-1 ermöglicht. Nach Aktivierung assoziieren die beiden Bestandteile Calcium abhängig und ermöglichen eine Bindung des Komplexes an Fibrinogen, was die Plättchenaggregation fördert (Shattil, 1999; Shattil et al., 1985).

Zuletzt wurde noch ein Antikörper zur spezifischen Identifikation von Thrombozyten eingesetzt. Der Antikörper erkennt CD41, bzw. die IIb Untereinheit des GPIIb/IIIa Komplexes, sowohl auf unstimulierten, als auch auf stimulierten Plättchen (Duperray et al., 1989). Dadurch kann eine Gating-Strategie angewandt werden, die eine eindeutige Differenzierung der Thrombozyten von HUVEC, HeLa Zellen und MSC erlaubt.

Bei den angewandten Antikörpern handelte es sich um CD62p-APC (Maus anti-human IgG1 κ ; BD, New Jersey), PAC-1-FITC (Maus anti-human IgM κ ; BD, New Jersey), CD63-PE-Cy7 (Tandemkonjugat bestehend aus PE und Zyanin; Maus anti-human IgG1 κ ; BD, New Jersey) und CD41-PE (Maus anti-human IgG1; Beckman Coulter, Marseille) (Tab.5).

Tabelle 5: Liste der eingesetzten Antikörper.

Abk./Markierung	Name	Klon	Lieferant
CD41-PE	IIb Untereinheit des GPIIb/IIIa Komplexes	HIP8	Beckman Coulter
CD62P-APC	P-selectin, PADGEM, GMP140	AK-4	Becton Dickinson
CD63-PECy7	LAMP-3	H5C6	Becton Dickinson
PAC-1-FITC	Aktivierter GPIIb/IIIa Komplex	PAC-1	Becton Dickinson

Die Messungen erfolgten auf einem Becton Dickinson (BD) FACSCanto II. Es wurden zwei Laser genutzt: ein Coherent® Saphire™ 488-20 Laser mit einer Wellenlänge von 488nm und einer Leistung von 20mW und ein JDS Uniphase™ 1144-P Laser mit einer Leistung von 17mW und einer Wellenlänge von 633nm.

Zur Durchführung der Messungen wurde die Software FACSDiva (Version 6) von BD genutzt. Die Darstellung der Zellpopulationen erfolgte auf einer logarithmischen Skala in einem Dot Plot (s. Abb. 5). Das Gate um die auszuwertende Plättchenpopulation wurde anhand der FSC/PE Eigenschaften gesetzt, entsprechend der relativen Größe der Plättchen und der Bindung des plättchenspezifischen CD41 Antikörpers. Die weitere Auswertung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mithilfe der FlowJo Software (FlowJo Version 10, LLC, Ashland).

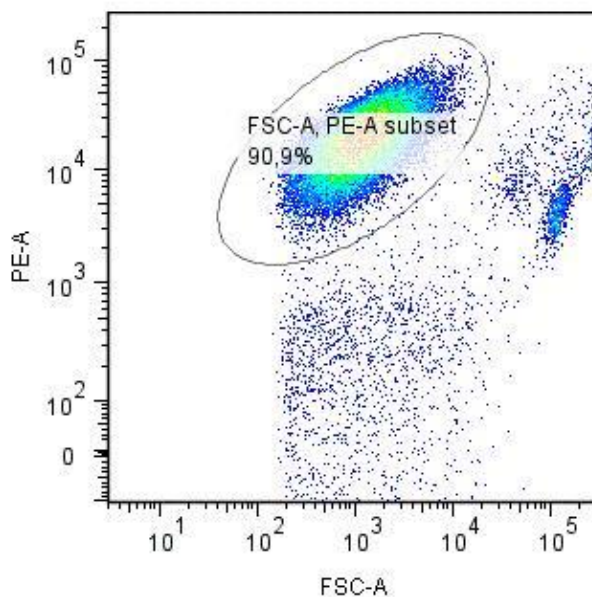


Abbildung 5: Gating. Zelldebris und Mikropartikel stellen sich im gleichen FSC dar wie Thrombozyten. Bei einer Auftragung nach FSC/SSC Eigenschaften verschmelzen beide Populationen. Der Einsatz von CD41-PE lässt ein reines Thrombozytengating im FSC/PE Dot Plot zu.

Um die Messungen zu vereinfachen wurde plättchenreiches Plasma verwendet (PRP). Durch die Verwendung von PRP finden sich in der Probe vernachlässigbar wenige andere Blutbestandteile wie Leukozyten oder Erythrozyten, wodurch das Gating vereinfacht und außerdem der Zellcount im FACS verringert wird (zur Herstellung von PRP siehe Abschnitt „Blutpräparation“). Die Messungen erfolgten entweder sofort nach Ablauf der Inkubationszeiten oder nach Fixierung mit 0.5% Paraformaldehyd.

Die schlussendliche Quantifizierung der Thrombozytenaktivierung erfolgte anhand des Medians der Fluoreszenzintensität (MFI) der Thrombozytenpopulation im Gate (Abb. 5).

2.6.1 Versuche mit unterschiedlichen Agonisten

Wie bereits unter 2.4 beschrieben wurden unterschiedliche Agonisten eingesetzt, um die Abhängigkeit des Einflusses der Zellen auf einen bestimmten Aktivierungspfad der Thrombozyten zu untersuchen. Das Probenvolumen umfasste insgesamt 100µl und enthielt die vier benannten Antikörper, 5µl verdünntes PRP, PBS, jeweils 5×10^5 /ml zugesetzte Zellen und die entsprechenden Agonisten ADP, U46619 oder TRAP in den jeweils eingesetzten Konzentrationen (Tab. 6).

Zur Messung der Thrombozytenaktivierung wurden einerseits Aktivierungsmessungen von unstimulierten Thrombozyten in der Gegenwart anderer Zellpopulationen durchgeführt, andererseits wurden die Thrombozyten mit Agonisten aktiviert, um einen möglichen stimulationsfördernden, bzw. -hemmenden Einfluss der anderen Zellpopulationen nachzuweisen.

Vor Stimulierung wurden die Plättchen jeweils 10 Minuten mit den entsprechenden zusätzlichen Zellen vorinkubiert. Die Stimulierung erfolgte anschließend mit TRAP 5µM, TRAP 10µM, ADP 5µM, ADP 10µM oder U46619 5µM für 10min. Die Konzentrationen der Agonisten wurden wie bei der Impedanzaggregometrie entsprechend gängiger Protokolle der Arbeitsgruppe gewählt (Schedel et al., 2010; Schedel et al., 2011). Es wurden jeweils im Vergleich eine reine Plättchenprobe und eine Probe mit Plättchen und weiteren Zellen (HUVEC, HeLa Zellen, MSC) gemessen.

Zusätzlich, um sicherzustellen, dass keine zu starke Vorstimulierung durch die Blutentnahme entstanden war, wurde eine vollständig unstimulierte Plättchenprobe gemessen.

Bei direkter Messung, ohne PFA-Fixierung, wurden die Versuche zeitversetzt gestartet, um die Inkubationszeiten mit der Messdauer abzustimmen.

Tabelle 6: Beispiel für ein Pipettierschema in der Durchflusszytometrie. Das Gesamtvolumen umfasst 100µl. Getestet wurde die Auswirkung dreier unterschiedlicher MSC Dosen auf unstimulierte Thrombozyten und deren Stimulation mit TRAP 5µM. Die Stocklösung des Agonisten beinhaltet TRAP 200µM, die der MSC 10⁷/ml.

Tube	Name	PBS	PRP	MSC	Agonist	CD63 PE-Cy7	CD41 PE	PAC-1 FITC	CD62p APC
1	unstimuliert	82	5			2	3	5	3
2	unstimuliert + 10 ⁴	81	5	1		2	3	5	3
3	unstimuliert + 5x10 ⁴	77	5	5		2	3	5	3
4	unstimuliert + 2,5x10 ⁵	57	5	25		2	3	5	3
5	stimuliert 5µM	79,5	5		2,5	2	3	5	3
6	stimuliert + 10 ⁴	78,5	5	1	2,5	2	3	5	3
7	stimuliert + 5x10 ⁴	74,5	5	5	2,5	2	3	5	3
8	stimuliert + 2,5x10 ⁵	54,5	5	25	2,5	2	3	5	3

2.6.2 Dosisversuche, Passagierungen und Aggregate

Um den Zusammenhang zwischen Effektstärke und eingesetzter Zellzahl nachzuweisen setzten wir weiterhin unterschiedliche Zelldosen ein.

Zu diesem Zweck wurden die Thrombozyten neben der Standarddosis von 5x10⁵/ml mit 10⁵ und 2,5x10⁶/ml Zellen für 10 Minuten vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit TRAP 5µM. Nach weiteren 10 Minuten wurden die Messungen durchgeführt. Zusätzlich wurden dieselben Zellmengen mit unstimulierten Thrombozyten inkubiert, um eine Aktivierung allein durch die Zellen ausschließen zu können. Die Zellen wurden 2 Tage vor den Experimenten ausgesät.

Um den Einfluss der Passagenzahl beurteilen zu können wurden am Versuchstag zusätzlich übrige Zellen erneut ausgesät und eine oder zwei Passagierungen später erneut verwendet.

Außerdem wurde eine Aggregation von Thrombozyten mit MSC untersucht. Dazu wurde auf die MSC Population getaget und diese auf einen erhöhten CD41 Nachweis untersucht.

2.6.3 Mechanistische Versuche

Um Ursachen der beobachteten Interaktionen identifizieren zu können wurden neben den unterschiedlichen Aktivierungspfaden der Thrombozyten einige in Studien berichtete Mechanismen, die zur Beeinflussung von Thrombozyten führen, inhibiert.

Der erste untersuchte Mechanismus beinhaltet die CD62P-abhängige Thrombozyteninhibierung.

Eine mögliche Interaktion von MSC mit Thrombozyten über CD62P, wie bereits für Endothelzellen beschrieben (Abou-Saleh et al., 2015; Abou-Saleh et al., 2009), wurde durch den CD62P blockierenden Antikörper AK-4 (Maus anti-human) untersucht. 50 µl PRP wurden für 20 Minuten mit 1 µg AK-4 inkubiert, zusätzlich erfolgte eine Inkubation mit einer Isotyp-Kontrolle. Um die Interaktion auch nach Zugabe von MSC zu blockieren, erfolgte keine Waschung.

Der nächste unterbundene Mechanismus war die Cyclooxygenase (COX)-abhängige Produktion von Thrombozyten-hemmenden Metaboliten (Abb. 6) (Abou-Saleh et al., 2009). In Zellen ist die COX für die Produktion pro-inflammatorischer Substanzen wie Prostaglandine verantwortlich. Neben der Assoziation zu inflammatorischen Geschehen ist besonders die COX-2 auch wesentlich in die Blutdruckregulation und Blutgerinnung involviert. Starke Expression in Endothelzellen führt zur Produktion von Prostaglandin I₂ (PGI₂, Prostazyklin). PGI₂ bewirkt sowohl Vasodilatation als auch Hemmung der Thrombozytenaktivierung. Es wird COX abhängig aus AA über Prostaglandin G₂ (PGG₂) und Prostaglandin H₂ (PGH₂) produziert und hemmt Plättchenaggregation und -adhäsion (Adelman et al., 1981), indem es als Gegenspieler des TXA₂ fungiert (Bunting et al., 1977). Das Isoenzym COX-1 ist dagegen vor allem in Thrombozyten aktiv, wo es nach deren Aktivierung zur Herstellung von PGG₂ aus AA als Vorstufe zur TXA₂ Synthese dient. TXA₂ dient wiederum der Rekrutierung und Aktivierung weiterer Thrombozyten. Substanzen wie Acetylsalicylsäure oder Indomethacin blockieren die COX und führen dadurch zu einer dauerhaft eingeschränkten Blutgerinnung, da die kernlosen Thrombozyten, im Gegensatz zu Endothelzellen, das Enzym nicht regenerieren können.

Um die Möglichkeit einer COX-abhängigen Interaktion zu untersuchen wurden MSC ausgesät und mit 10 µM Indomethacin (Sigma-Aldrich) versetztem Medium für zwei Tage kultiviert. Das Indomethacin wurde in 99% Ethanol gelöst. Zwei Stunden vor der Durchführung der Versuche wurde das Medium erneut gewechselt und frisches Indomethacin beigemischt. Als Vehikel Kontrolle wurden MSC in Medium, das mit in einem dem Indomethacin äquivalenten Volumen 99% Ethanol versetzt war, kultiviert.

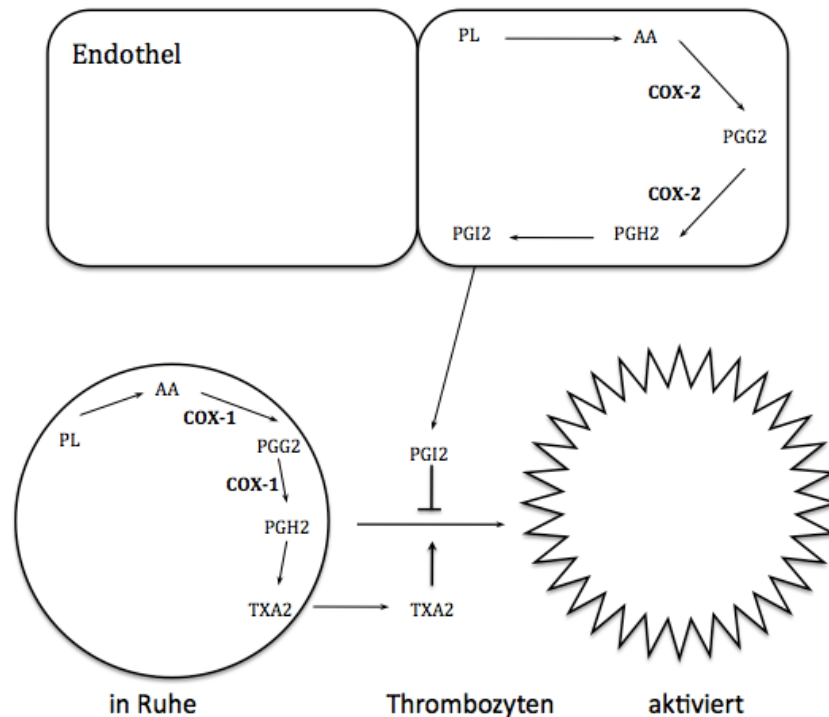


Abbildung 6: Einfluss der COX-1/2 Isoenzyme auf Thrombozyten. Blockierung der COX führt insbesondere zu einem Wirkungsverlust in Thrombozyten, da diese aufgrund der Kernlosigkeit keine neuen Enzyme nachbilden können. Dadurch wird die Gerinnung nachhaltig gehemmt. Im Endothel dagegen können blockierte COX Enzyme rasch nachproduziert werden. Dadurch entsteht zusätzlich zur Thrombozytenhemmung ein relativer Überschuss an Prostacyclin, wodurch ebenfalls die Gerinnung gehemmt wird. Das eingesetzte Indomethacin hemmt unspezifisch beide Formen der COX.

Weiterhin wurden drei Bestandteile des extrazellulären Purinstoffwechsel gehemmt (Abb. 7).

Extrazelluläres ATP wirkt auf Thrombozyten aktivierend. Es wird beispielsweise von zerstörten Zellen oder Leukozyten im entzündeten Milieu in den extrazellulären Raum freigesetzt. Endothelzellen dephosphorylieren dieses extrazelluläre ATP mit dem membrangebundenen Ectonukleaseenzym CD39 zu ADP und AMP. Besonders ADP wirkt stark pro-koagulatorisch und aktiviert Thrombozyten. AMP dagegen ist das erste Molekül dieser Kaskade, das hemmend auf Thrombozyten wirkt. AMP wird durch CD73, eine weitere membrangebundene Ectonuclease, zu Adenosin dephosphoryliert, das ebenfalls plättchenhemmend wirkt. Die Effekte von AMP und Adenosin auf Thrombozyten werden über unterschiedliche, G-Protein gekoppelte Adenosinrezeptoren, u.a. den A_{2A} Rezeptor, vermittelt (Fuentes and Palomo, 2015).

Aufgrund dieser Vorgänge wurden zuerst die Anwesenheit von CD39 und CD73 auf MSC, HUVEC HeLa Zellen und Thrombozyten mit den Antikörpern CD39-PerCP-Cy5.5 (Klon TU66 von Becton Dickinson) und CD73 PE (Klon AD2 von Becton Dickinson) getestet. Anschließend setzten wir Substanzen ein, die diese Enzyme blockieren. Dabei handelte es sich für CD39 um Polyoxotungstat (POM-1) (Smith et al., 2016) und für CD73 um AMP-CP (Ujhazy et al., 1994). Zuletzt wurde der A_{2A}-Rezeptor der Thrombozyten mit SCH 58261 blockiert, um das Andocken der potentiell hemmenden AMP und Adenosin Moleküle zu blockieren (Dionisotti et al., 1997).

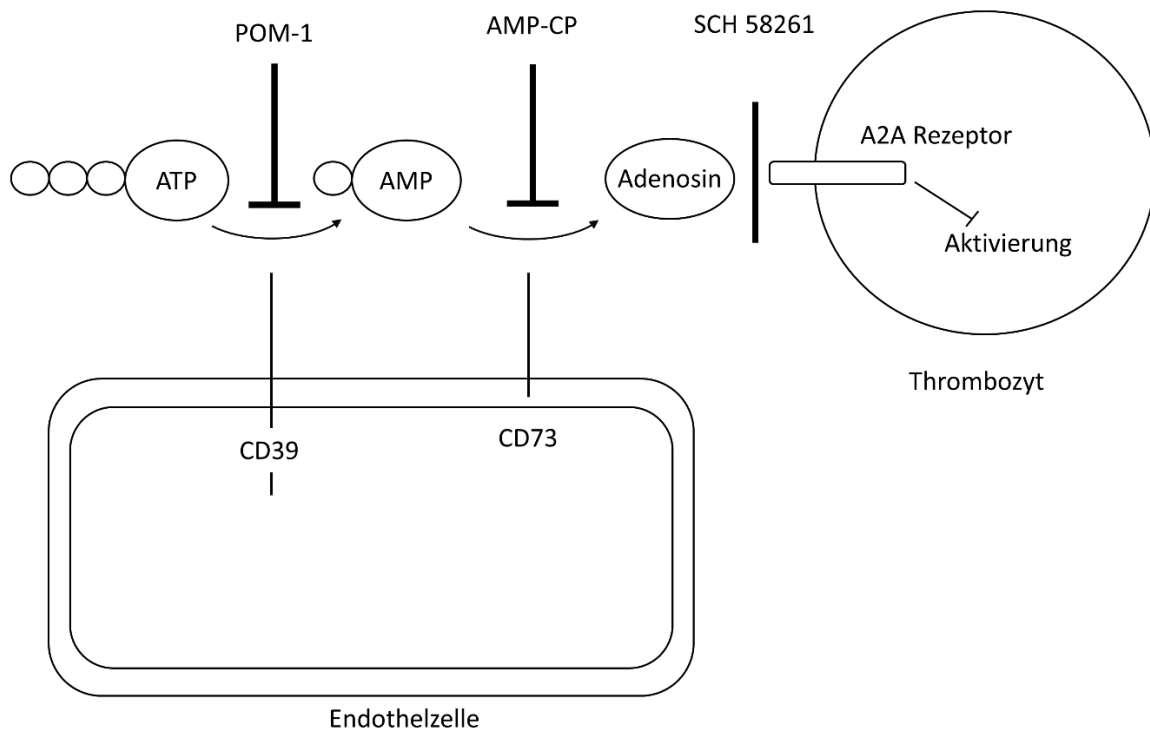


Abbildung 7: Extrazellulärer Adenosinstoffwechsel und eingesetzte Hemmstoffe. ATP wird unter anderem aus dem Endothel und aktiviertem Plättchen in den Extrazellulärraum freigesetzt. AMP und Adenosin wirken anti-koagulatorisch. Der A2A Rezeptor vermittelt die inhibierende Wirkung von Adenosin auf Thrombozyten.

2.7 Fluoreszenzmikroskopie

Um die in der Impedanzaggregometrie und Durchflusszytometrie gemessenen Ergebnisse visuell verifizieren zu können erfolgte eine Darstellung des Versuchsaufbaus unter dem Fluoreszenzmikroskop. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde PRP mit 1µg/ml Calcein gefärbt. PRP und Calcein wurden für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Bildaufnahme wurden in 96 Well Platten Ansatzvolumina von 100µl mit denselben Bestandteilen wie in der Durchflusszytometrie verwendet. Die Akquisition der Bilder erfolgte auf einem Axio Imager.D1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland, www.zeiss.de), mit der dazu bereitgestellten Software AxioVision.

2.8 Quantitative real time Polymerase Kettenreaktion

Nachdem in der Durchflusszytometrie und der Impedanzaggregometrie die zelluläre Gerinnung untersucht worden war, sollten die Ergebnisse mit Hinblick auf die plasmatische Gerinnung erweitert werden. Dazu wurden Expressionsanalysen von Genen, die an der plasmatischen Gerinnung beteiligt sind, durchgeführt.

Das dazu eingesetzte Verfahren war die quantitative real-time Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR). Dabei wird im ersten Schritt messenger RNA (mRNA) aus den zu untersuchenden Zellproben isoliert, die dann durch eine reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben wird. Die mRNA und dementsprechend auch die korrespondierende cDNA steht als direkter Vorläufer der Proteinsynthese in einem quantitativen Zusammenhang mit den resultierenden Proteinen. Aufgrund dieser Überlegung können auf Basis der Analyse von cDNA einer

Zellpopulation beispielsweise Rückschlüsse auf deren Einwirkung auf bestimmte Stoffwechselfvorgänge gezogen werden. Um die jeweiligen Gene zu untersuchen müssen entsprechende, spezifische Primer eingesetzt werden, die eine Amplifizierung des Genabschnitts zu ermöglichen. Dann erfolgen repetitiv mehrere Schritte, die mit spezifischen Temperaturen verbunden sind, um eine Amplifikation der gewünschten Gene zu erreichen. In der Regel beginnt ein Zyklus der Reaktion mit der Denaturierung. Dabei wird durch eine hohe Temperatur (ca.95°C) eine Auftrennung des Doppelstrangs bewirkt. Im nächsten Schritt (Annealing) lagern sich bei einer niedrigeren Temperatur die Primer an die ihre komplementären Sequenzen an (ca. 50°C). Im letzten Schritt (Elongation) erfolgt die Amplifikation der cDNA. Von den Primern ausgehend wird entlang des Strangs neue DNA synthetisiert. Da bei optimalen Rahmenbedingungen (genügend Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP), freie Primer) alle vorhandenen cDNA Kopien eines Gens mit Primern besetzt sind und amplifiziert werden sollte sich nach jedem Zyklus die vorhandene DNA Menge verdoppeln.

Für die Quantifizierung der Genexpression werden durch Amplifizierung entstehende Fluoreszenzsignale gemessen. Für die Generierung dieser gibt es unterschiedliche Möglichkeiten von einfachen, interkalierenden Varianten (z.B. SYBR Green) über molekulare Beacons bis zu den hier verwendeten Hydrolysesonden.

Bei Hydrolysesonden handelt es sich um kurze (8-9 Nukleotide) DNA Abschnitte, die am 3'-Ende einen „Quencher“ enthalten, während sich am 5'-Ende eine Reporterfarbe befindet. Im Ausgangszustand löscht der Quencher durch die räumliche Nähe das Emissionsspektrum der Reporterfarbe, wodurch kein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Während des Annealings hybridisiert die Sonde mit komplementären DNA Abschnitten. Durch die 5'-Nukleaseaktivität der DNA Polymerase wird die Sonde bei der Elongation hydrolysiert, wodurch die Reporterfarbe vom Quencher getrennt wird und nun ein Signal abgeben kann, das detektiert wird.

In der RT-qPCR kann die Genexpression einer Zellpopulation nur relativ mit Bezug auf andere mitanalysierte Zelltypen bewertet werden. Zusätzlich werden pro Lauf Referenzgene („house-keeping genes“) analysiert. Es sollte stets verifiziert werden, dass die gewählten Referenzgene stabil in den Zellen exprimiert werden.

Die RNA Isolation erfolgte mithilfe des RNeasy Mini Kit® (Qiagen, Hilden) entsprechend dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll. In Kürze wurden dabei die entsprechenden Zellen nach Aberntung mit einem speziellen Puffer lysiert und das Lysat mehrfach nach Zugabe weiterer Puffer über eine spezielle Membran zentrifugiert, um die RNA aufzureinigen. Schließlich konnte die RNA in Wasser gelöst werden. Die Quantifizierung erfolgte auf einem Infinite® 200 PRO NanoQuant (Tecan, Männedorf).

Die Umschreibung in cDNA erfolgte mit dem Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Mannheim). Auch hier wurde das vom Hersteller vorgeschlagene Protokoll befolgt. Das Set beinhaltet Primer, die am äußeren Ende des Poly-A-Schwanzes der mRNA binden. Zu mRNA und Primern wurden außerdem der enthaltene Puffer, Deoxynukleotide, RNase Inhibitor, Dithiothreitol und reverse Transkriptase zugefügt. Der gesamte Ansatz wurde in einem Thermocycler für 30 Minuten bei 55°C inkubiert und die reverse Transkriptase anschließend für 5 Minuten bei 85°C deaktiviert. Die cDNA wurde auf Konzentrationen von 25 bzw. 50 ng/µl angepasst.

In der anschließenden qPCR wurden zur Fluoreszenzmarkierung Universal Probe Library (UPL)-Sonden (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Aufgrund der

geringen Länge findet sich in der 146 Sonden umfassenden Bibliothek für nahezu jedes Transkript eine passende Sonde. UPL- Sonden beinhalten zusätzlich zur normalen DNA „locked nucleotide acid“ (LNA)- Sequenzen. Die LNA verbessern die Thermostabilität der Proben und gehen dieselben Paarungen ein wie normale DNA. Durch die Sequenzhomologie wird im Gegensatz zu einfach interkalierenden Fluoreszenzmarkern wie SYBR-Green eine deutliche höhere Spezifität erreicht (RocheDiagnostics, 2009).

Ein PCR Well enthielt ein Volumen von 20 μ l. Darin befanden sich:

Tabelle 7: Reagenzien für die RT-qPCR

Vorwärts- und Rückwärts-Primer	0,2 μ M
UPL-Sonde	0,1 μ M
Master-Mix (FastStart Taq DNA Polymerase, Puffer, dNTP Mix, 6,4mM MgCl ₂)	10 μ l
cDNA Suspension	25/50ng
H ₂ O	Ad 20 μ l

Den Empfehlungen des Herstellers des UPL Systems folgend wurden folgende Temperaturen und Zeitintervalle für die RT-qPCR angewandt:

1. Vorinkubation: 95°C für 10 Minuten
2. Zyklen (45): 95°C für 10 Sekunden/ 60°C für 30 Sekunden
3. Abkühlen: 40°C für 31 Sekunden

Insgesamt wurden in jeder cDNA Probe zehn Gene analysiert, acht Gene mit Einfluss auf die Blutgerinnung, sowie zwei Referenzgene. Bei den für diese Arbeit analysierten Genen handelte es sich um tissue factor pathway inhibitor (TFPI)1, dessen Isoform TFPI2, tissue factor (TF), plasminogen activator inhibitor (PAI), plasminogen (PLG), plasminogen activator urokinase type (PLAU), urokinase plasminogen activator receptor (uPAR), plasminogen activator tissue type (PLAT), Serine/arginine-rich splicing factor 4 (SFSR4) und glucose-6-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Abb. 8 und Tab. 8). SFRS und GAPDH wurden als housekeeping Gene eingesetzt.

Die TFPI Proteine sind ein wesentlicher Bestandteil des anti- koagulativen Systems. TFPI1 greift bereits früh in den Gerinnungsvorgang ein, indem es die für die Gerinnung essentiellen Proteasen TF-Faktor VIIa (FVIIa) und Faktor Xa inhibiert und dadurch vorrangig den extrinsischen Weg der Koagulation beeinträchtigt. TFPI1 ist vor allem im vaskulären Endothel, sowie frei im Plasma zu finden (Lwaleed and Bass, 2006; Wood et al., 2014).

Bei TFPI2 handelt es sich um ein Homolog von TFPI1, das jedoch insbesondere auf den intrinsischen Weg der Gerinnungskaskade durch Inhibierung vor allem von plasmatischem Kallikrein und Faktor XIa Einfluss nimmt. Es lässt sich in Plättchen nachweisen, die Plasmakonzentration ist jedoch sehr gering. Außer der anti-koagulativen Wirkung spielt TFPI2 im Umsatz der extrazellulären Matrix, sowie als Tumorsuppressor eine Rolle (Vadivel et al., 2014; Xu et al., 2013).

PLG ist ein Zymogen, das durch proteolytische Spaltung in die aktivierte Form Plasmin überführt wird. Plasmin ist eine Protease, die in multiplen Geweben des menschlichen Körpers vorkommt, insbesondere jedoch beim Abbau von Fibrinpolymeren eine

wichtige Rolle übernimmt und dadurch das Risiko einer überschießenden Gerinnung reduziert (Henkin et al., 1991).

Die Aktivierung von Plasminogen erfolgt durch die vorgeschalteten Serinproteasen t-PA und PLAU. PLAT ist im Plasma nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden. Hauptsächlich wird es in endothelialen Vesikeln gespeichert und kann bei Aktivierung, beispielsweise mit Thrombin, freigesetzt werden (Emeis et al., 1997; Gebbink, 2011). Die anti-koagulatorisch Wirkung von PLAU findet sich vor allem im extravaskulären Bereich des Urogenitaltrakt. PLAU bindet an den entsprechenden zellulären Rezeptor PLAU Rezeptor (uPAR), der die Wirkung von PLAU auf Plasminogen vermittelt und insbesondere die Aktivität von zellgebundenem Plasminogen gesteigert wird (Flemmig and Melzig, 2012; Ploug, 2003), was neben der antikoagulatorischen Wirkung auch bei migratorischen Prozessen wie Extravasation oder Tumorinvasion und –metastasierung eine wesentliche Rolle spielt (Kirchheimer and Binder, 1991).

Neben der eingeschränkten Freisetzung gibt es noch weitere Mechanismen, die die Aktivität der Proteasen regulieren, wie das plasminogen activator inhibitor System. Ein potenter Vertreter dieses Systems ist PAI-1, ein Glykoprotein, das im Komplex mit Vitronectin sowohl PLAU als auch PLAT inhibiert und dadurch die Konversion von Plasminogen zu Plasmin verhindert (Reilly et al., 1994).

TF ist dagegen wesentlich an der Entstehung von Thromben nach Gefäßverletzungen beteiligt. Durch die Schädigung des Gewebes wird TF (Faktor III) exponiert und die Bindung von TF an plasmatische Gerinnungsfaktoren wie FVIIa ermöglicht. Durch die Bindung von TF wird die katalytische Aktivität von FVIIa deutlich gesteigert und die plasmatische Gerinnung durch weitere proteolytische Aktivierung von FIX und konsekutiv von FX durch TF-FVIIa initiiert (Nemerson, 1988).

Das housekeeping Gen SFRS4 ist weit verbreitet und gilt als selbst in geschädigten oder cancerös veränderten Zellen als stabil (Boujedidi et al., 2012). Auch GAPDH wird in vielen Anwendungen als Referenz genutzt, ist jedoch stärker durch externe Faktoren wie Schwangerschaft oder unterschiedliche Zellspender beeinträchtigt (Bustin, 2000).

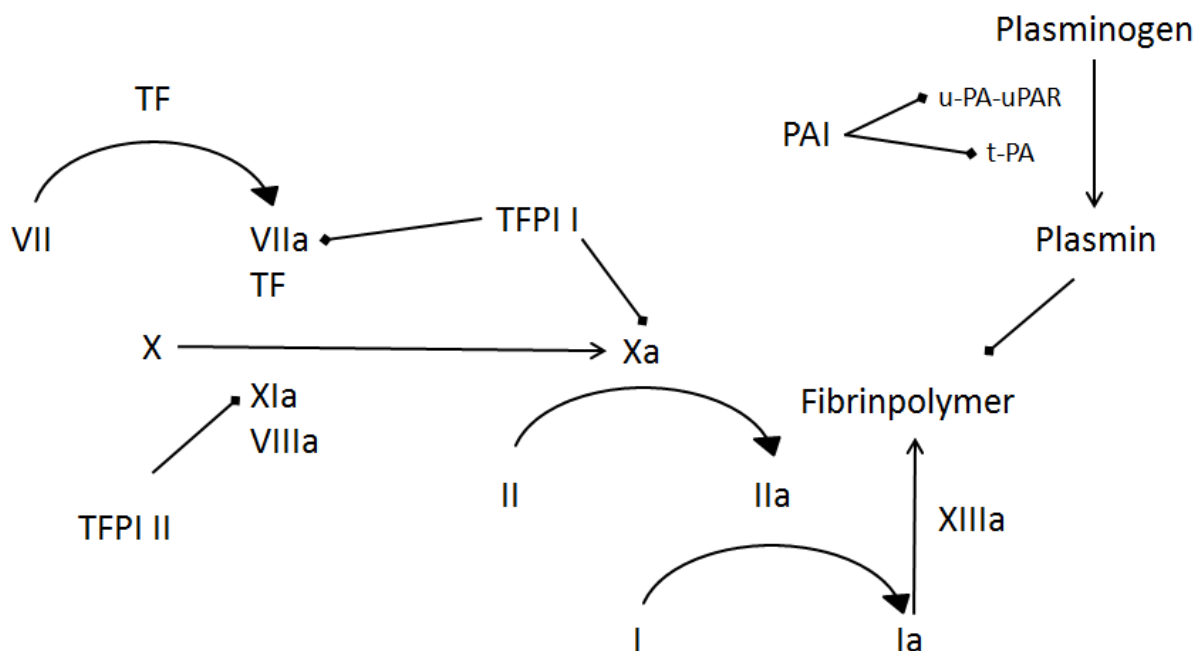


Abbildung 8: Einfluss der untersuchten Gene auf die Gerinnung.

Tabelle 8: Übersicht der Primersequenzen:

Abkürzung	Sonde	Primer	Sequenz	Position	Intron	Ampliconlänge
Homo sapiens tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor) (TFPI), transcript variant 1, mRNA	61	TFPI1_61-F	tgaacggttcaagtatg gtgga	745 - 766	594 nt	114
		TFPI1_61-R	ccataattatccacctg gaaacc	836 - 858		
Homo sapiens tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI2), mRNA	51	TFPI2_51-F	tctgctgcttttctgac g	108 - 126	267 nt	132
		TFPI2_51-R	tcgtagtagtaacgga gaagtaggg	215 - 239		
Homo sapiens coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor) (F3), transcript variant 1, mRNA	51	TF_51-F	ggagaaaggggaatt cagaga	953 - 973	1722 nt	140
		TF_51-R	gggagtctccttccag ctc	1073 - 1092		
Homo sapiens serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1 (SERPINE1), mRNA	80	PAI_80-F	ctcctggttctgccc aagt	1031 - 1049	1598 nt	66
		PAI_80-R	caggttctctagggg cttcc	1077 - 1096		
Homo sapiens plasminogen (PLG), mRNA	22	PLG_22-F	aacaagcgctggg aacttt	814 - 832	1530 nt	74
		PLG_22-R	cactggtaggtggg acagacaga	868 - 887		
Homo sapiens plasminogen activator, urokinase (PLAU), transcript variant 1, mRNA	46	PLAU_46-F	ttgctcaccacaac gacatt	955 - 974	646 nt	94

		PLAU_46-R	ggcaggcagatggtct gtat	1029 - 1048		
Homo sapiens plasminogen activator, urokinase receptor (PLAUR), transcript variant 1, mRNA	22	uPAR_22-F	cctctgcaggaccacg at	362 - 379	2119	89
		uPAR_22-R	tggtcttctctgagtggg taca	429 - 450		
Homo sapiens plasminogen activator, tissue (PLAT), transcript variant 1, mRNA	15	PLAT_15-F	gctgacgtgggagtac tgtg	1064 - 1083	1251 nt	70
		PLAT_15-R	ctgaggctggctgtact gtct	1113 - 1133		
glyceraldehyd-3-phosphat dehydrogenase (GAPDH)	45	GAPDH_45-F	tccactggcgtcttcac c			
		GAPDH_45-R	ggcagagatgatgac cctttt			
Splicing-Factor4 (SFRS4)	51	SFRS4_51-F	agctggcaagaccta aagga			
		SFRS4_51-R	cccttgtagcatctgc at			

Vor Durchführung der eigentlichen RT-qPCR Experimente wurden die Effizienzen der einzelnen Primer bestimmt. Dafür wurden aus einem Standard Zellpool unterschiedliche cDNA Konzentrationen in einer Verdünnungsreihe mit dem entsprechenden Primer versetzt und anschließend eine Standardkurve erstellt. Für die Effizienzbestimmung von Primern wird ermittelt, ab welchem Replikationszyklus sich ein vom Hintergrund deutlich abgrenzbares Fluoreszenzsignal ergibt. Dieser Zyklus wird als „cycle threshold“ (ct) bezeichnet und ebenfalls zur Quantifizierung der zu untersuchenden Proben in RT-qPCR Versuchen gemessen. Theoretisch sollte sich aus logarithmisch steigender cDNA Konzentration und ct-Wert ein negativer linearer Zusammenhang ergeben. Graphisch dargestellt ergibt sich die Standardkurve. Diese entspricht optimaler Weise einer Geraden mit der Effizienz 2, d.h. einer Verdoppelung der DNA in jedem Zyklus. Aufgrund des Rechenalgorithmus des verwendeten Gerätes werden Effizienzen von 1,8 bis 2,2 toleriert. Sollten sie darüber- oder darunterliegen muss eine Primeroptimierung erfolgen.

Die ermittelten Effizienzen waren wie folgt:

Tabelle 9: Primer Effizienzen

Primer	Effizienz
TFPI1_61	1,96
TFPI2_51	1,96
TF_51	2,155
PAI_80	2
PLG_22	2
PLAU_46	2,1
uPAR_22	2,1
PLAT_15	1,94
GAPDH_45	1,899
SFRS4_51	1,925

Für die Auswertung wurden die Fluoreszenzen der Referenzgene GAPDH und SFRS4 gemittelt und die Fluoreszenzintensitäten der anderen gemessenen Gene jeweils relativ zu diesem Wert ermittelt. Aus den Intensitäten der Doppelansätze wurde jeweils ein Mittelwert gebildet. Nicht gelaufene Wells wurden vorher manuell identifiziert und von der Analyse ausgeschlossen.

Bei den analysierten Zellproben handelte es sich um LA-MSC, die in Kälberserum (n=3) oder humanem Serum (n=2) enthaltendem Medium kultiviert worden waren, CB-MSC (n=3), BM-MSC (n=3), endotheliale Progenitorzellen (ECB) (n=3), HUVEC (n=2), periphere mononucleäre Zellen (n=1) und die Tumorzelllinie HepG2 (n=1).

2.9 Statistische Auswertung

Zur Auswertung und Statistik wurden Microsoft Excel und Sigma Plot (Version 11.0) genutzt. Graphische Darstellungen wurden in Excel und GraphPadPrism (Version 7.02) angefertigt. Zur Signifikanztestung wurden gepaarte T- Tests, repeated measures one- way ANOVAs oder one- way ANOVAs gefolgt von Holmes-Sidak oder Dunnett's Test angewandt. Falls keine Normalverteilung vorlag wurde ein Rangsummentest benutzt. Die jeweiligen Kontrollen, gegen die getestet wurde, werden an der entsprechenden Stelle im Ergebnisteil dargestellt.

3 ERGEBNISSE

Das Ziel der Untersuchungen war es herauszufinden, ob, und wenn ja, wie MSC mit Thrombozyten interagieren. Hierfür wurden unterschiedliche Methoden verwendet, um den Einfluss der Zellen auf die Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten zu messen. Getestet wurde sowohl ob die Zellen zu einer Aktivierung ruhender Thrombozyten führen, als auch ob sie die Agonisten-induzierte Aktivierung steigern/hemmen. Dazu kam noch eine Untersuchung der plasmatischen Gerinnung mit der RT-qPCR.

3.1 Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie wurden die beschriebenen drei aktivierungsabhängigen Marker CD62P, CD63 und die aktivierte Konformation des GPIIb/IIIa Komplexes, sowie der thrombozytenspezifische Marker CD41 analysiert. Zur Analyse wurde PRP aus CPDA oder Hirudin antikoagulierte Blut genutzt.

Die statistische Auswertung der Experimente basierte auf der Berechnung des Mittelwertes (Mean) und der Standardabweichung (SD) der MFI der einzelnen Wiederholungen.

3.1.1 Einfluss von MSC unterschiedlicher Quellen auf Thrombozyten

Primär wurde untersucht, ob es einen Einfluss der unterschiedlichen Zellarten auf ruhende Plättchen oder deren Aktivierung gibt. Dabei erfolgte die Stimulierung mit TRAP 5µM. Zu den Thrombozyten wurden 5×10^5 /ml MSC zugesetzt (vgl. 2.2). Später wurden weitere Versuche mit den zusätzlichen Agonisten ADP und U46619 durchgeführt (vgl. 3.1.3).

3.1.1.1 HUVEC

Auf unstimulierte Thrombozyten hatten HUVEC keinen wesentlichen Einfluss, im Vergleich zu anderen Populationen bewirkten sie dennoch eine leichte Erhöhung der Aktivitätsmarker, v.a von PAC-1 (siehe nachfolgende Tabelle und zusammenfassende Abb.9).

Tabelle 10: Einfluss von HUVEC auf unstimulierte Thrombozyten.

HUVEC: Thrombozyten unstimuliert						
	CD62P		PAC-1		CD63	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
w/o	412	223	491	485	603	143
mit HUVEC	653	473	740	402	642	151
n	16		16		15	
p	0,073		0,053		0,426	

Die TRAP induzierte Stimulation der Thrombozyten wurden von HUVEC signifikant abgeschwächt.

Tabelle 11: Einfluss von HUVEC auf die Stimulation von Thrombozyten mit 5µM TRAP.

HUVEC: Thrombozyten stimuliert						
	CD62P		PAC-1		CD63	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
w/o	16273	8041	7306	6871	3797	1842
mit HUVEC	9214	5598	3538	3059	2131	904
n	17		15		14	
p	<0,001		0,026		<0,001	

3.1.1.2 HeLa Zellen

HeLa Zellen bewirkten eine relevante Stimulation ruhender Plättchen. Die Aktivierung war verglichen mit der TRAP Stimulation zwar weniger stark ausgeprägt, ist allerdings durchaus als Aktivierung betrachten (s.u.).

Tabelle 12: Einfluss von HeLa Zellen auf unstimulierte Thrombozyten.

HeLa: Thrombozyten unstimuliert						
	CD62P		PAC-1		CD63	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
w/o	395	171	373	240	626	122
mit HeLa	2380	3731	2099	1644	1060	546
n	12		12		11	
p	<0,001		<0,001		<0,001	

Die TRAP-Stimulation der Plättchen wurden dagegen kaum von den HeLa Zellen beeinflusst. Lediglich die PAC-1 Bindung erhöhte sich im Vergleich zur Stimulation ohne HeLa Zellen leicht.

Tabelle 13: Einfluss von HeLa Zellen auf die Stimulation von Thrombozyten mit 5µM TRAP.

HeLa: Thrombozyten stimuliert						
	CD62P		PAC-1		CD63	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
w/o	15965	8534	7138	4772	4070	1565
mit HeLas	14812	8946	9612	5574	3906	1676
n	12		12		11	
p	0,724		0,288		0,432	

3.1.1.3 BM-MSK

Auf unstimulierte Thrombozyten zeigten BM-MSK keinen Effekt. Tendenziell erhöhten sich die Aktivierungsmarker geringfügig, dies kann jedoch im Vergleich zu den Werten, die bei tatsächlicher Stimulation erreicht werden nicht als relevant angesehen werden.

Tabelle 14: Einfluss von BM-MSC auf unstimulierte Thrombozyten.

BM: Thrombozyten unstimuliert						
	CD62P		PAC-1		CD63	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
w/o	394	116	346	239	579	108
mit MSC	471	266	667	567	546	65
n	9		8		8	
p	0,258		0,092		0,218	

Die Zugabe von BM-MSC zu PRP führte zu einer deutlichen Reduktion der Stimulierung mit TRAP um ungefähr die Hälfte. Das Ausmaß war dabei für alle Aktivierungsmarker vergleichbar. Hieraus ergibt sich offensichtlich eine deutlich hemmender Einfluss der BM-MSC auf die TRAP induzierte Plättchenaktivierung.

Tabelle 15: Einfluss von BM-MSC auf die Stimulation von Thrombozyten mit 5µM TRAP.

BM: Thrombozyten stimuliert						
	CD62P		PAC-1		CD63	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
w/o	12411	7346	4524	4573	2811	1315
mit MSC	4539	4045	1495	1214	1460	943
n	14		14		13	
p	0,001		0,005		<0,001	

3.1.1.4 LA-MSC

Wie auch bei BM-MSC führte die Zugabe von LA-MSC nicht zu einer relevanten Aktivierung. Tendenziell zeigten sich die Plättchen allerdings stärker angeregt. Die erzielte Signifikanz der erhöhten PAC-1 Bindung lässt aufgrund der Erfahrungswerte nicht den Rückschluss einer Aktivierung der Thrombozyten zu, da die Werte trotz der Erhöhung im Vergleich zu unstimulierten Plättchen alleine keinesfalls an die Werte einer tatsächlichen Stimulation wie nach Agonistenzugabe (MFI >1000) herankommen.

Tabelle 16: Einfluss von LA-MSC auf unstimulierte Thrombozyten.

LA: Thrombozyten unstimuliert						
	CD62P		PAC-1		CD63	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
w/o	404	170	346	239	597	117
mit MSC	652	772	667	567	611	180
n	15		15		14	
p	0,064		<0,001		0,326	

Wie auch HUVEC und BM-MSC reduzierten LA-MSC die TRAP-induzierte Aktivierung der Plättchen deutlich.

Tabelle 17: Einfluss von LA-MSC auf die Stimulation von Thrombozyten mit 5µM TRAP.

LA: Thrombozyten stimuliert						
	CD62P		PAC-1		CD63	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
w/o	12871	5248	4258	3481	1821	1091
mit MSC	5560	4446	1769	1077	1161	879
n	15		15		14	
p	<0,001		<0,001		0,003	

3.1.1.5 CB-MSC

CB-MSC lieferten ein nicht eindeutiges Ergebnis. In manchen Fällen führten $5 \times 10^5/\text{ml}$ CB-MSC zu einer deutlichen Aktivierung ruhender Plättchen, in anderen waren diese nicht beeinflusst. In der Summe der 11-12 durchgeführten Experimente errechnet sich jedoch ein signifikanter Effekt, d.h. erhöhte Expression der 3 Aktivierungsmarker, nach Kontakt mit CB-MSC.

Tabelle 18: Einfluss von CB-MSC auf unstimulierte Thrombozyten.

CB: Thrombozyten unstimuliert						
	CD62P		PAC-1		CD63	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
w/o	508	315	421	238	611	135
mit MSC	2546	4388	1835	2176	958	501
n	12		12		11	
p	0,005		<0,001		0,002	

Dasselbe galt für die TRAP-Aktivierung. In einigen Versuchen wurde die Plättchenaktivierung durch ihre Anwesenheit nicht beeinflusst, in anderen Versuchen zeigten CB-MSC eine ebenso deutliche Hemmung wie BM- oder LA-MSC. Allerdings konnten bisher keine Einflussfaktoren, die diese Unterschiede erklären könnten, identifiziert werden.

Tabelle 19: Einfluss von CB-MSC auf die Stimulation von Thrombozyten mit 5µM TRAP.

CB: Thrombozyten stimuliert						
	CD62P		PAC-1		CD63	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
w/o	18545	7175	8185	4925	3791	1226
mit MSC	14012	9842	6722	5582	2845	1428
n	13		13		12	
p	0,005		0,146		0,002	

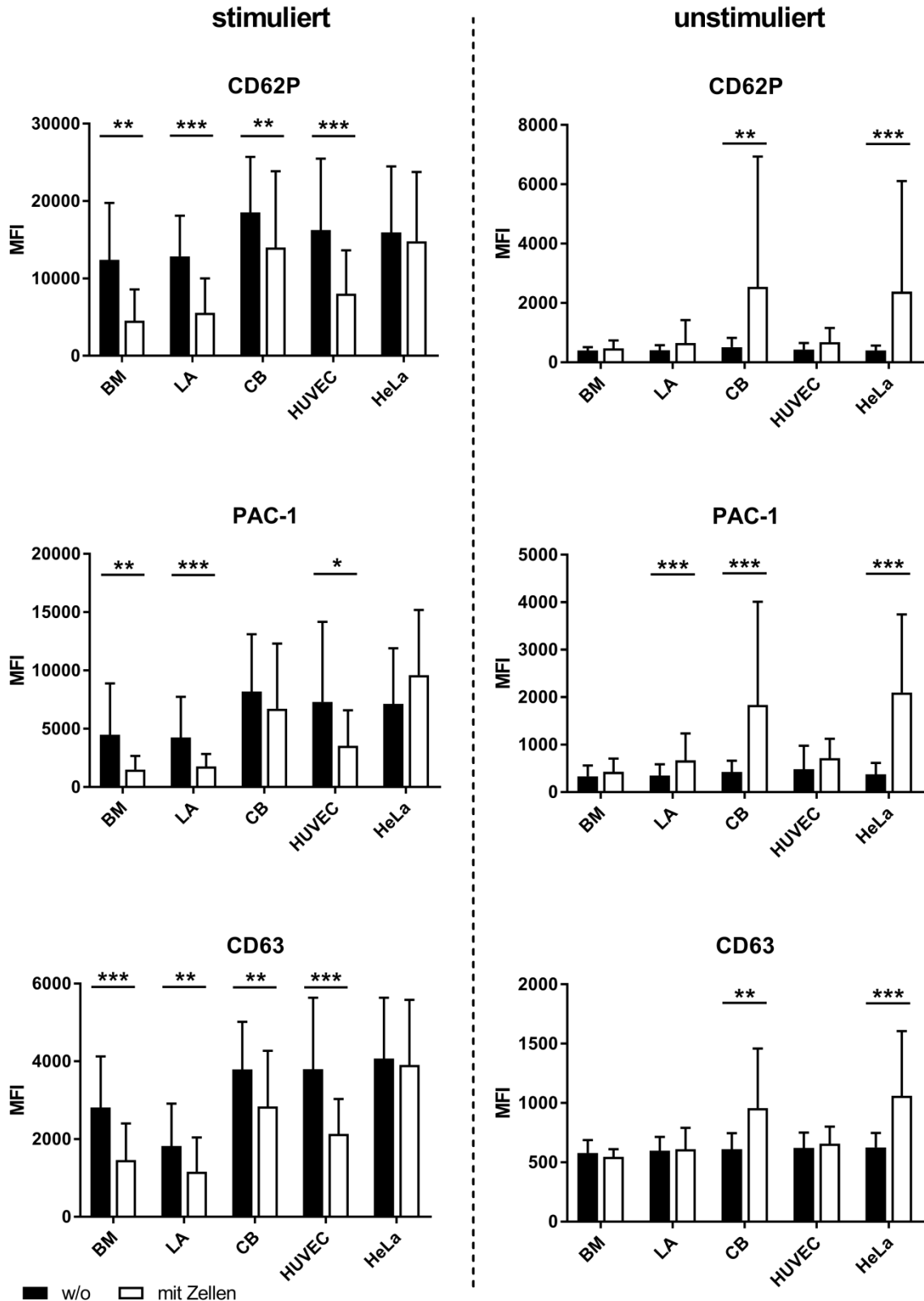


Abbildung 9: Einfluss unterschiedlicher Zellsorten auf Thrombozytenaktivierung in der Durchflusszytomtrie. Dargestellt werden die Expression der aktivierungsabhängigen Marker CD62P (A, B), PAC-1 (C, D) und CD63 (E, F) nach Stimulation mit 5µM TRAP (linke Spalte) und ohne Stimulation (rechte Spalte) jeweils in An- und Abwesenheit (w/o) der zusätzlichen Zellen. * p<0,05; ** P<0,01; *** p<0,001

3.1.2 Einfluss unterschiedlicher Zelldosen

Anschließend erfolgten Experimente zum Nachweis einer Dosisabhängigkeit des beobachteten Effekts der MSC.

Die eingesetzten Zelldosen variierten dabei jeweils um den Faktor 5 in einer 100µl Probe (10^5 , 5×10^5 , $2,5 \times 10^6$ /ml). Es wurden sowohl unstimulierte, als auch mit 5µM TRAP stimulierte Thrombozyten mit allen drei Zelldosen versetzt. Die Ergebnisse sind zusammenfassend in Abbildung 13 dargestellt und werden nachfolgend erläutert.

Getestet wurde ein Unterschied zwischen der jeweiligen MSC Dosis und der MFI ohne zugesetzte MSC als Kontrolle.

3.1.2.1 HUVEC

Die erwartete, plättchenhemmende Wirkung der Endothelzellen bestätigte sich in den Dosisexperimenten.

Bei unstimulierten Thrombozyten führte die Zugabe größerer HUVEC Zahlen zu einer geringfügigen Steigerung der Aktivierungsmarker, allerdings erreichten diese in keinem Fall eine einer Aktivierung entsprechende Dimension.

Tabelle 20: Einfluss unterschiedlicher HUVEC Dosen auf unstimulierte Thrombozyten.

HUVEC: Thrombozyten unstimuliert (n=6)									
	CD62P			PAC-1			CD63		
	Mean	SD	p	Mean	SD	p	Mean	SD	p
w/o	384	92	---	225	64	---	569	140	---
1,00E+05	401	87	0,815	298	86	0,393	568	119	0,983
5x10e5	507	177	0,111	474	261	0,009	571	114	0,917
2,5x10e6	749	190	<0,001	709	240	<0,001	641	106	0,008

Die induzierte Aktivierung verringerte sich dagegen mit steigender Zellzahl deutlich. Bei der maximalen Zahl wurde die MFI auf circa ein Drittel reduziert.

Tabelle 21: Einfluss unterschiedlicher HUVEC Dosen auf die Stimulation von Thrombozyten mit 5µM TRAP.

HUVEC: Thrombozyten stimuliert (n=6)									
	CD62P			PAC-1			CD63		
	Mean	SD	p	Mean	SD	p	Mean	SD	p
w/o	23167	10430	---	10627	7011	---	4629	2176	---
1,00E+05	17331	9934	0,114	8275	5752	0,224	3416	1712	0,050
5x10e5	9789	8451	0,002	4644	4563	0,006	2237	1324	<0,001
2,5x10e6	8042	5851	<0,001	3559	3165	0,002	1790	884	<0,001

3.1.2.2 HeLa Zellen

Die Hela Tumorzelllinie wurde unter der Annahme eingesetzt, dass sie zu einer Stimulierung von Thrombozyten führt. Diese Annahme bestätigte sich neben den primären Versuchen mit nur einer Zellkonzentration auch in den Experimenten mit unterschiedlichen Zelldosen.

Im Gegensatz zu HUVEC stellte sich bei HeLa Zellen im Kontakt mit unstimulierten Thrombozyten eine relevante Aktivierung ein. Die PAC-1 Bindung war am deutlichsten betroffen. Während bei 10^5 und 5×10^5 HeLa Zellen die Thrombozyten nur eine marginale Erhöhung der Aktivierungsmarker zeigten, führte die höchste Zelldosis zu MFI-Werten, die einer mittleren bis starken Aktivierung mit TRAP $5 \mu\text{M}$ entsprechen. Abbildung 10 visualisiert eindrucksvoll den Effekt der HeLa-Zellzugabe auf die Expression der Aktivierungsmarker.

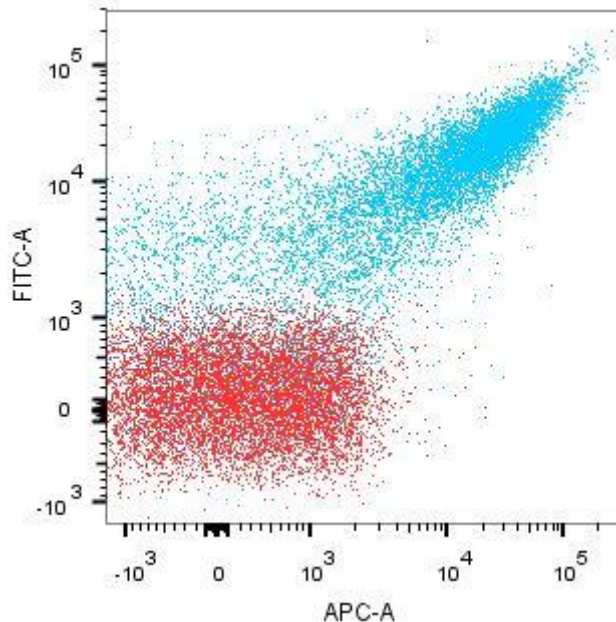


Abbildung 10: Beispiel für Thrombozytenaktivierung durch HeLa Zellen. Nicht aktivierte Thrombozyten (rot) sind sowohl für CD62P (APC) als auch für die aktivierte Form des GPIIb/IIIa- Komplexes (FITC) negativ. Durch Anwesenheit von $2,5 \times 10^5$ HeLa Zellen entsteht dagegen eine ausgeprägte Positivierung beider Aktivierungsmarker in der Thrombozytenpopulation (blau). Die lineare Konfiguration lässt sich durch eine Aggregation der Thrombozyten miteinander und dadurch entstehende Kumulation der Marker erklären. Die HeLa Zellpopulation ist im Thrombozytengating nicht zu sehen.

Tabelle 22: Einfluss unterschiedlicher HeLa Dosen auf unstimulierte Thrombozyten.

HeLa: Thrombozyten unstimuliert (n=6)									
	CD62P			PAC-1			CD63		
	Mean	SD	p	Mean	SD	p	Mean	SD	p
w/o	321	87	---	210	31	---	542	85	---
$1,00 \times 10^5$	409	75	n.s.	503	171	n.s.	563	84	n.s.
5×10^5	895	705	n.s.	1784	1732	<0,05	751	283	n.s.
$2,5 \times 10^6$	5748	4802	<0,05	7737	5236	<0,05	1429	664	<0,05

Nach Stimulation waren CD62P und CD63 bei den beiden geringeren Zelldosen auf Thrombozyten geringfügig schwächer nachweisbar. In der höchsten Dosis stiegen die beiden Parameter ebenfalls über den Kontrollwert ohne Zellzugabe hinaus. Die PAC-1 Bindung erhöhte sich dagegen bereits bei 10^5 HeLa. $2,5 \times 10^6$ Zellen führten sogar zu einer Verdopplung der Ausgangsstimulation.

Tabelle 23: Einfluss unterschiedlicher HeLa Dosen auf die Stimulation von Thrombozyten mit 5µM TRAP.

HeLa: Thrombozyten stimuliert (n=6)									
	CD62P			PAC-1			CD63		
	Mean	SD	p	Mean	SD	p	Mean	SD	p
w/o	20868	9740	---	8959	5498	---	4198	1999	---
1,00E+05	19324	9819	0,288	9230	5732	0,795	3864	1984	n.s.
5x10e5	19267	11493	0,271	11074	7352	0,057	3866	2108	n.s.
2,5x10e6	24157	9130	0,033	17129	8434	<0,001	4386	1993	n.s.

3.1.2.3 BM-MSc

Der bereits beobachtete hemmende Effekt von BM-MSc bestätigt sich auch in den Dosisexperimenten. Auf unstimulierte Thrombozyten zeigte sich auch in hohen Dosen kein Einfluss der BM-MSc, mit Ausnahme von PAC-1 bei höchster Zelldosis. Hier ergibt sich zwar ein kalkulierter signifikanter Unterschied, die Aktivierung kann jedoch auch hier nicht als relevant betrachtet werden.

Tabelle 24: Einfluss unterschiedlicher BM-MSc Dosen auf unstimulierte Thrombozyten.

BM: Thrombozyten unstimuliert (n=5)									
	CD62P			PAC-1			CD63		
	Mean	SD	p	Mean	SD	p	Mean	SD	p
w/o	337	51	---	220	43	---	544	77	---
1,00E+05	366	78	n.s.	261	43	0,586	546	51	n.s.
5x10e5	362	168	n.s.	294	94	0,333	512	57	n.s.
2,5x10e6	434	271	n.s.	471	237	0,005	556	141	n.s.

Die Aktivierungsmarker nach TRAP-Stimulation wurden durch die Zugabe von BM-MSc dosisabhängig stark reduziert (Abb. 11 und 12). Ein Experiment musste wegen hoher Grundaktivierung der Thrombozyten, sowie Entstehung mehrerer ungewöhnlicher Subpopulationen im CD41/PE Gate nach Aktivierung ausgeschlossen werden.

Tabelle 25: Einfluss unterschiedlicher BM-MSc Dosen auf die Stimulation von Thrombozyten mit 5µM TRAP.

BM: Thrombozyten stimuliert (n=5)									
	CD62P			PAC-1			CD63		
	Mean	SD	p	Mean	SD	p	Mean	SD	p
w/o	13742	10239		5879	6008		2739	1825	
1,00E+05	5630	8174	0,026	2165	2996	0,067	1513	1329	0,033
5x10e5	2848	4119	0,005	906	759	0,019	1045	720	0,006
2,5x10e6	804	407	0,002	557	167	0,014	652	158	0,001

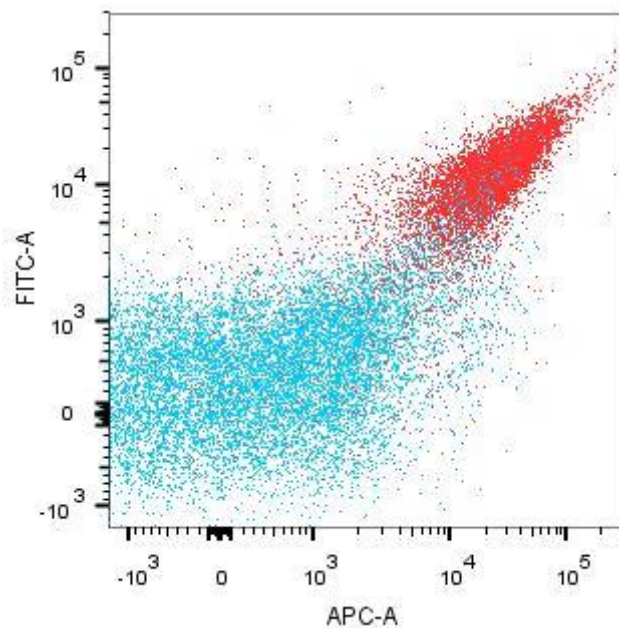


Abbildung 11: Beispiel für die Inhibierung der Thrombozytenaktivierung durch BM-MSC. Durch Aktivierung mit $5\mu\text{M}$ TRAP werden die Thrombozyten deutlich positiv für CD62P (APC) und die aktivierte Form des GPIIb/IIIa-Komplexes (FITC) (rote Population). Die Anwesenheit von $2,5 \times 10^5$ BM-MSC führt dagegen zu einer nahezu vollständigen Inhibierung der Plättchenaktivierung (blau).

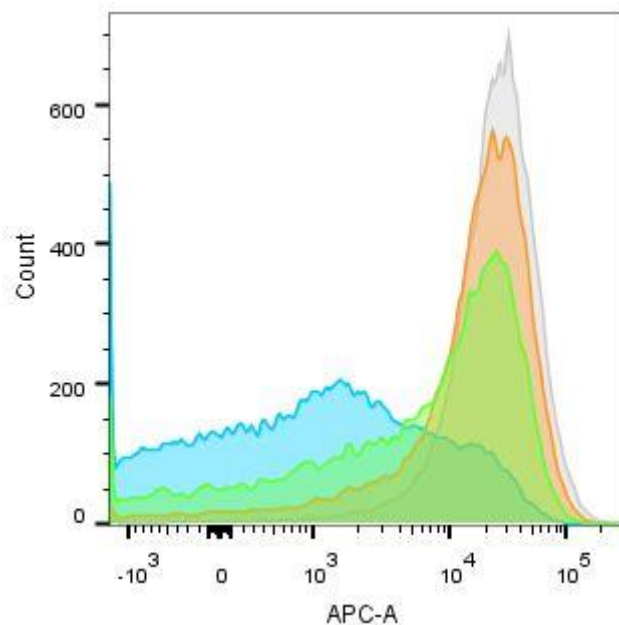


Abbildung 12: Beispiel für Dosiseffekt auf die Verringerung von CD62P durch BM-MSC. Durch die Anwesenheit von BM-MSC zeigt sich eine dosisabhängige Abnahme der CD62P (APC) Detektion auf Thrombozyten. **Lila:** CD62P-Nachweis auf Thrombozyten in Abwesenheit von BM-MSC. **Orange:** CD62P Nachweis auf Thrombozyten in Anwesenheit von 10^5 BM-MSC pro ml. **Grün:** CD62P Nachweis auf Thrombozyten in Anwesenheit von 5×10^5 BM-MSC pro ml. **Blau:** CD62P Nachweis auf Thrombozyten in Anwesenheit von $2,5 \times 10^6$ BM-MSC pro ml.

3.1.2.4 LA-MSC

Einen dosisabhängigen Einfluss zeigten LA-MSC auch auf unstimulierte Plättchen. Werte, die einer tatsächlichen Agonisten-vermittelten Stimulation entsprechen, wurden aber in nur einem Experiment erreicht und ließen sich in einer späteren Passage nicht reproduzieren.

Tabelle 26: Einfluss unterschiedlicher LA-MSC Dosen auf unstimulierte Thrombozyten.

LA: Thrombozyten unstimuliert (n=6)									
	CD62P			PAC-1			CD63		
	Mean	SD	p	Mean	SD	p	Mean	SD	p
w/o	377	149		216	43		550	95	
1,00E+05	339	189	n.s.	240	60	n.s.	513	134	n.s.
5x10e5	354	179	n.s.	329	94	n.s.	526	107	n.s.
2,5x10e6	729	600	n.s.	1139	1286	<0,05	636	174	n.s.

Bei LA-MSC zeigten sich im Vergleich zu BM-MSC etwas stärkere Schwankungen und eine weniger stark ausgeprägte Dosisabhängigkeit in der Thrombozyteninhibierung. Nach einer starken Ausgangsreduktion auf ca. ein Drittel bereits bei 10^5 MSC /ml konnte die MFI durch die höheren Dosen nur noch wenig reduziert werden. Dies war jedoch wesentlich mitverursacht durch ein einzelnes Experiment, in dem sich ein inverses Verhalten der Thrombozytenaktivierung in Anwesenheit der MSC zeigte. Jedoch war diese Beobachtung nicht auf den LA-MSC Spender zurückzuführen, da in der späteren Passage wieder eine verringerte Thrombozytenaktivierung gemessen werden konnte.

Tabelle 27: Einfluss unterschiedlicher LA-MSC Dosen auf die Stimulation von Thrombozyten mit 5µM TRAP.

LA: Thrombozyten stimuliert (n=6)									
	CD62P			PAC-1			CD63		
	Mean	SD	p	Mean	SD	p	Mean	SD	p
w/o	14645	7712	---	5337	5062	---	2807	1249	---
1,00E+05	5771	4344	0,021	1534	1239	n.s.	1473	578	n.s.
5x10e5	4577	3993	0,021	1347	966	n.s.	1344	604	n.s.
2,5x10e6	3257	2513	0,017	1526	993	<0,05	1170	442	n.s.

3.1.2.5 CB-MSC

CB-MSC zeigten wie zuvor heterogene Ergebnisse.

Auf ruhende Thrombozyten ergab sich ein dosisabhängiger stimulierender Einfluss, der zwar nicht das Ausmaß der Aktivierung durch HeLa Zellen erreichte, jedoch immerhin zu einer leichten bis mittleren Stimulation gemessen an Werten nach 5µM TRAP führte. Ähnlich wie bei HeLa Zellen war der Effekt bezüglich der PAC-1 Bindung am stärksten ausgeprägt.

Tabelle 28: Einfluss unterschiedlicher CB-MSC Dosen auf unstimulierte Thrombozyten.

CB: Thrombozyten unstimuliert									
	CD62P			PAC-1			CD63		
	Mean	SD	p	Mean	SD	p	Mean	SD	p
w/o	346	38	---	269	22	---	531	61	---
1,00E+05	385	82	n.s.	389	68	n.s.	561	41	n.s.
5x10e5	687	339	n.s.	949	522	<0,05	702	166	n.s.
2,5x10e6	1829	1568	<0,05	3225	2741	<0,05	1091	507	<0,05

Bei stimulierten Thrombozyten fand sich durch die Anwesenheit von CB-MSK häufig eine Reduktion der Aktivierung. Diskrepanz zu den Beobachtungen mit BM- und LA-MSK, ergab sich hier jedoch eine inverse Dosiskorrelation: Mit steigenden Zellzahlen war dieser Inhibitionseffekt tendenziell rückläufig statt stärker zu werden.

Tabelle 29: Einfluss unterschiedlicher CB-MSK Dosen auf die Stimulation von Thrombozyten mit 5µM TRAP.

CB: Thrombozyten stimuliert									
	CD62P			PAC-1			CD63		
	Mean	SD	p	Mean	SD	p	Mean	SD	p
w/o	18827	5718	---	11035	4976	---	3941	1238	---
1,00E+05	11262	7402	0,002	6652	5958	n.s.	2584	1369	0,004
5x10e5	12037	7324	0,004	7834	6481	n.s.	2731	1359	0,008
2,5x10e6	13015	8222	0,012	10739	7216	n.s.	2985	1459	0,029

Dosiseffekte auf CD62P

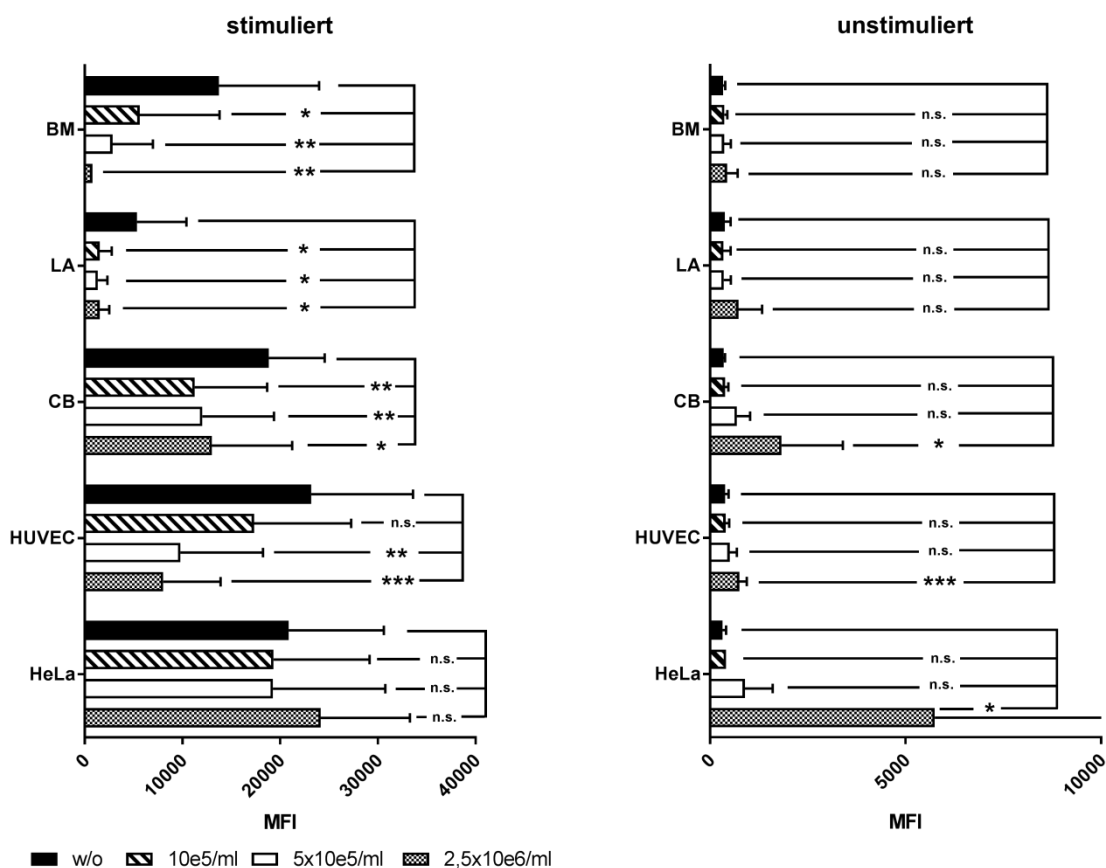


Abbildung 13: Dosis- und Zellsorteneffekte unterschiedlicher Zellsorten auf den CD62P-Nachweis bei 5 µM TRAP stimulierten Thrombozyten (links) und unstimulierten Thrombozyten (rechts). Getestet wurde gegen die Kontrolle „w/o“. * p<0,05; ** P<0,01; *** p<0,001

3.1.3 Vergleich von Stimulationen mit ADP, TRAP und U46619

Als naheliegende Untersuchung eines Mechanismus, der den beobachteten hemmenden Effekten insbesondere von BM- und LA-MSK zugrunde liegen könnte,

wurden unterschiedliche Agonisten zur Plättchenaktivierung untersucht (vgl. 2.6.3). Zuerst erfolgten Experimente mit ADP und TRAP. Die Resultate waren allerdings sehr inkonsistent, besonders die Stimulationsstärke zwischen TRAP und ADP war deutlich unterschiedlich ausgeprägt. Während TRAP eine konstant starke Aktivierung erzeugte waren die Werte nach ADP Stimulation teilweise sehr niedrig, weshalb häufig nicht von einer tatsächlichen Aktivierung ausgegangen werden konnte. Ebenso unerwartet fanden sich nach Stimulation mit ADP 10 μ M häufig geringere Aktivierungswerte als nach Stimulation mit der geringeren Dosis von 5 μ M.

Statistisch ergaben sich zwar einige signifikante Unterschiede zwischen den MSC Wirkungen bei unterschiedlichen Agonisten, diese sind aber meiner Meinung nach durch die unterschiedliche initiale Stimulationsstärke zu erklären. Aufgrund der beschriebenen inkonsistenten Ergebnisse nach ungenügender ADP Stimulation soll an dieser Stelle der Vollständigkeit halber nur eine Darstellung der reinen MFI Ergebnisse ohne Signifikanzniveaus erfolgen. Später folgte eine zweite Versuchsreihe mit LA-MSC und den Agonisten ADP, TRAP und zusätzlich U46619. Hier werden auch p-Werte angegeben.

3.1.3.1 HUVEC

In diesen Versuchen zeigten HUVEC überraschend keine ausgiebige Inhibition der Thrombozytenaktivierung, weder nach Stimulation mit TRAP, noch mit ADP. Es wurde sogar stattdessen umgekehrt deren Stimulation nach ADP Aktivierung erhöht.

Tabelle 30: Einfluss von HUVEC auf die Stimulation von Thrombozyten mit unterschiedlichen Agonisten.

	w/o		HUVEC	
n=3	Mean	SD	Mean	SD
CD62P				
TRAP 10 μ M	19400	1916	19533	1401
TRAP 5 μ M	12967	1767	11406	1700
ADP 10 μ M	1426	551	2109	307
ADP 5 μ M	2406	376	2125	225
PAC-1				
TRAP 10 μ M	1386	670	1883	407
TRAP 5 μ M	969	426	1480	351
ADP 10 μ M	788	186	1022	141
ADP 5 μ M	792	256	870	119
CD63				
TRAP 10 μ M	3507	378	3113	201
TRAP 5 μ M	2318	93	2052	244
ADP 10 μ M	929	229	1266	197
ADP 5 μ M	1218	269	1351	102

3.1.3.2 HeLa Zellen

HeLas führten zu einer Erhöhung der Aktivierungsparameter nach Stimulation. CD62P stieg vor allem nach ADP Aktivierung der Thrombozyten nochmals deutlich durch

HeLa Anwesenheit an, während sich die Bindung von PAC-1 insbesondere nach TRAP Stimulation erhöhte.

Tabelle 31: Einfluss von HeLa Zellen auf die Stimulation von Thrombozyten mit unterschiedlichen Agonisten.

n=2	w/o		HeLa	
	Mean	SD	Mean	SD
CD62P				
TRAP 10 μ M	23150	1485	29750	1485
TRAP 5 μ M	20950	2475	27950	2475
ADP 10 μ M	2427	49	6534	4168
ADP 5 μ M	3748	190	8996	4956
PAC-1				
TRAP 10 μ M	4325	267	8817	1445
TRAP 5 μ M	4488	625	8803	2259
ADP 10 μ M	1886	168	2742	1221
ADP 5 μ M	1919	29	4166	2245
CD63				
TRAP 10 μ M	5095	257	5857	2
TRAP 5 μ M	4292	508	5142	310
ADP 10 μ M	1309	21	2107	636
ADP 5 μ M	1645	92	2337	585

3.1.3.3 BM-MSK

In den Versuchen mit TRAP und ADP verringerte sich die Darstellung der Aktivierungsmarker ohne Unterschiede zwischen den Agonisten. Die ADP Stimulation war insgesamt, wie oben erwähnt, vergleichsweise schwach gegenüber TRAP.

Tabelle 32: Einfluss von BM-MSc auf die Stimulation von Thrombozyten mit unterschiedlichen Agonisten.

n=2	w/o		BM-MSc	
	Mean	SD	Mean	SD
CD62P				
TRAP 10µM	17900	3111	12900	1556
TRAP 5µM	17250	3465	7069	371
ADP 10µM	1945	120	1380	91
ADP 5µM	2831	3	1884	298
PAC-1				
TRAP 10µM	3362	561	2829	236
TRAP 5µM	3544	750	1817	235
ADP 10µM	1076	13	610	21
ADP 5µM	1395	13	830	226
CD63				
TRAP 10µM	3815	327	2624	327
TRAP 5µM	3282	535	1653	28
ADP 10µM	1043	2	892	13
ADP 5µM	1199	18	932	18

3.1.3.4 LA-MSc

Bei der Anwendung von LA-MSc resultierten vergleichbare Reduktionen der MFI zwischen ADP und TRAP.

Tabelle 33: Einfluss von LA-MSc auf die Stimulation von Thrombozyten mit unterschiedlichen Agonisten.

n=3	w/o		LA-MSc	
	Mean	SD	Mean	SD
CD62P				
TRAP 10µM	15577	4632	11634	5639
TRAP 5µM	11354	4357	8728	5965
ADP 10µM	1878	750	1794	861
ADP 5µM	2730	980	2036	862
PAC-1				
TRAP 10µM	2860	1511	2536	1470
TRAP 5µM	2428	1434	1761	1234
ADP 10µM	1226	470	1119	678
ADP 5µM	1418	608	1165	600
CD63				
TRAP 10µM	3174	1108	2364	1037
TRAP 5µM	2256	681	1844	962
ADP 10µM	1038	214	1071	222
ADP 5µM	1213	192	1019	210

In einer zweiten Versuchsreihe mit LA-MSC wurden 10^5 MSC/ml eingesetzt und zusätzlich zu $5\mu\text{M}$ TRAP und $5\mu\text{M}$ ADP noch $5\mu\text{M}$ U46619 untersucht. Hier führte ADP deutlich konstanter zu einer nennenswerten Thrombozytenaktivierung. Bei ADP Stimulation zeigte sich die stärkste Reduktion der Aktivierung auf weniger als ein Drittel, gefolgt von TRAP, während die Inhibierung der Aktivierung nach U46619 Stimulation anteilmäßig geringer ausfiel. Die Unterschiede zwischen den Agonisten waren jedoch nicht signifikant. Abb. 14 stellt die Experimente graphisch anhand von MFI Werten dar. Dagegen gibt Tab. 34 zur besseren Vergleichbarkeit des Einflusses von LA-MSC auf die Stimulation mit unterschiedlichen Agonisten den relativen Anteil der Thrombozytenaktivierung in Bezug auf die Ausgangswerte ohne LA-MSC wieder.

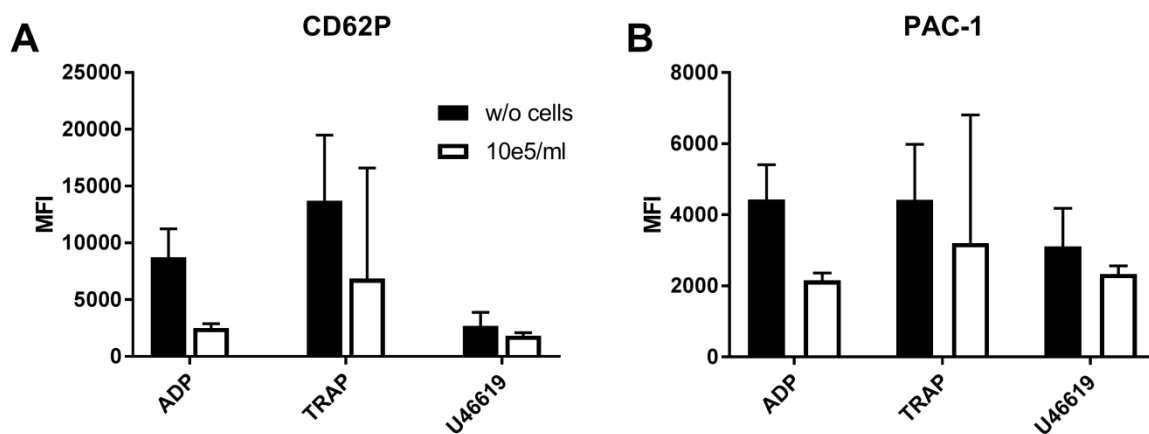


Abbildung 14: Einfluss von LA-MSC auf die Stimulation von Thrombozyten mit unterschiedlichen Agonisten.

Tabelle 34: Relative Aktivierung von Thrombozyten in Anwesenheit von LA-MSC im Vergleich zur Aktivierung ohne LA-MSC nach Stimulation mit unterschiedlichen Agonisten (ohne Zellen =1). P-Werte beschreiben einen möglichen Unterschied zwischen den Agonisten.

n=4	CD62P		PAC-1		p
	Mean	SD	Mean	SD	
ADP	0,27	0,11	0,52	0,19	n.s.
TRAP	0,30	0,39	0,61	0,45	n.s.
U46619	0,71	0,21	0,82	0,26	n.s.

3.1.3.5 CB-MSC

Im Gegensatz zu den anderen beiden MSC Populationen BM-MSC und LA-MSC führte die Zugabe von CB-MSC zu den Plättchenproben zu einer verstärkten Nachweisbarkeit der Aktivierungsmarker.

Tabelle 35: Einfluss von CB-MSK auf die Stimulation von Thrombozyten mit unterschiedlichen Agonisten.

n=4	w/o		CB-MSK	
	Mean	SD	Mean	SD
CD62P				
TRAP 10µM	23800	5420	25200	5773
TRAP 5µM	24525	6044	24125	6700
ADP 10µM	3164	812	4822	3168
ADP 5µM	6163	1721	9432	4340
PAC-1				
TRAP 10µM	5584	2510	8440	4596
TRAP 5µM	7214	4103	8473	4937
ADP 10µM	1858	1290	2162	773
ADP 5µM	3832	1443	4382	2275
CD63				
TRAP 10µM	4266	979	4258	1001
TRAP 5µM	4195	1178	3832	1127
ADP 10µM	1224	140	1454	426
ADP 5µM	1870	493	1564	279

3.1.4 Vergleich unterschiedlicher Passagen

Die Passagezahl von MSC wurde mehrfach als relevant für Eigenschaften von MSC wie u.a. Hämostase beschrieben (Moll et al., 2015; Moll et al., 2012). Andere Studien konnten dagegen stabile Eigenschaften von MSC bezüglich ihrer Immunsuppressiven Eigenschaften auch nach mehrfacher Passagierung nachweisen (Bieback et al., 2012a; Prockop et al., 2010). Daher erfolgten auch einige Experimente um einen möglichen Einfluss der Passagezahl zu untersuchen. In den Experimenten mit unterschiedlichen Zelldosen wurden jeweils Experimente mit früheren und korrespondierende Experimente mit späteren Passagen durchgeführt. Es zeigte sich dabei kein wesentlicher Unterschied bezüglich der Wirkung auf Thrombozyten (s. Abb. 15).

Es gilt allerdings zu beachten, dass es sich um relativ frühe Passagen handelte, und auch nur ein Unterschied um 1-2 Passagen untersucht wurde, weshalb nicht ausgeschlossen werden kann, dass in sehr späten Passagen Unterschiede auftreten. Diese würden nach aktuellen Erkenntnissen jedoch auch nicht mehr für Infusionen verwendet (Wuchter et al., 2015).

Vergleich unterschiedlicher Passagen (CD62P)

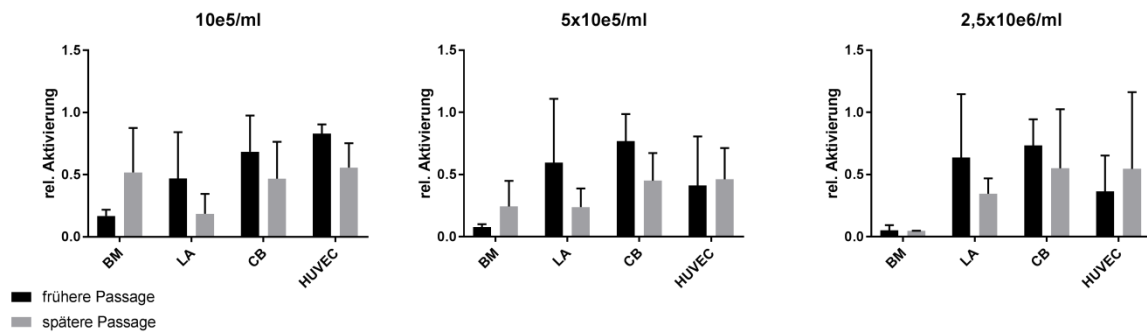


Abbildung 15: Vergleich unterschiedlicher Zellpassagen. Die Thrombozytenstimulation erfolgte mit 5 μ M TRAP. Zur Quantifizierung dargestellt ist CD62P. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die MFI von Thrombozyten mit zusätzlichen Zellen gegen die MFI ohne Zellzugabe (Wert =1) normalisiert. Eingesetzte Passagen variierten zwischen 3-6. Der Unterschied zwischen den Passagenzahlen beträgt 1-2. BM: n=2/Passage; LA n=3/Passage; CB: n=3/Passage; HUVEC: n=3/Passage.

Tabelle 36: Einfluss des Passagierens der zugesetzten Zellen auf die Plättchenstimulation mit 5µM TRAP.

			BM (n=2/Passage)			LA (n=3/Passage)			CB (n=3/Passage)			HUVEC (n=3/Passage)		
			10e5	5x 10e4	2,5 x10e5	10e5	5x 10e4	2,5 x10e5	10e5	5x 10e4	2,5 x10e5	10e5	5x 10e4	2,5 x10e5
CD62P	frühere Passage	Mean	0,17	0,08	0,05	0,47	0,60	0,64	0,68	0,77	0,73	0,83	0,41	0,36
		SD	0,05	0,02	0,04	0,37	0,51	0,51	0,29	0,22	0,21	0,07	0,39	0,29
	spätere Passage	Mean	0,52	0,24	0,05	0,19	0,24	0,35	0,47	0,45	0,55	0,56	0,46	0,55
		SD	0,36	0,21	0,00	0,16	0,15	0,12	0,30	0,22	0,47	0,20	0,25	0,62
	T-Test (zweiseitig, gepaart)	p	0,44	0,49	0,90	0,29	0,32	0,50	0,34	0,03	0,54	0,18	0,84	0,67
PAC-1	frühere Passage	Mean	0,21	0,14	0,15	1,18	0,70	0,54	0,67	0,89	1,02	0,66	0,55	0,29
		SD	0,15	0,11	0,16	1,46	0,57	0,42	0,39	0,28	0,34	0,29	0,39	0,18
	spätere Passage	Mean	0,55	0,20	0,15	0,41	0,31	0,39	0,47	0,44	0,84	0,71	0,46	0,59
		SD	0,10	0,02	0,13	0,40	0,25	0,15	0,31	0,30	0,70	0,11	0,25	0,76
	T-Test (zweiseitig, gepaart)	p	0,30	0,53	0,93	0,49	0,35	0,56	0,49	0,12	0,70	0,85	0,43	0,47
CD63	frühere Passage	Mean	0,40	0,31	0,25	0,58	0,69	0,66	0,70	0,78	0,77	0,78	0,48	0,39
		SD	0,14	0,12	0,13	0,34	0,40	0,37	0,27	0,22	0,22	0,10	0,32	0,21
	spätere Passage	Mean	0,63	0,42	0,24	0,43	0,43	0,52	0,62	0,63	0,74	0,67	0,56	0,58
		SD	0,17	0,05	0,10	0,29	0,21	0,11	0,24	0,30	0,31	0,12	0,16	0,49
	T-Test (zweiseitig, gepaart)	p	0,48	0,52	0,77	0,50	0,25	0,56	0,70	0,45	0,80	0,26	0,57	0,54

3.1.5 Vergleich von xenogenem und humanem Zellkulturmedien

Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnten den Einfluss des Zellkulturmediums, bzw. dessen Zusatzes, auf das Adhäsions- und auch auf das Embolisierungsverhalten von MSC zeigen (Bieback et al., 2010; Dreher et al., 2013). Deshalb erfolgten auch in dieser Arbeit zwei entsprechende Experimente.

Dabei wurden LA MSC, die in Medium mit FCS kultiviert worden waren und MSC aus Medium mit humanem Serum verglichen.

In den Versuchen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Wirkung von LA-MSC, deren Medium mit FCS versetzt worden war, und LA-MSC aus Kulturmedium mit humanen Zusätzen festgestellt werden (Abb. 16).

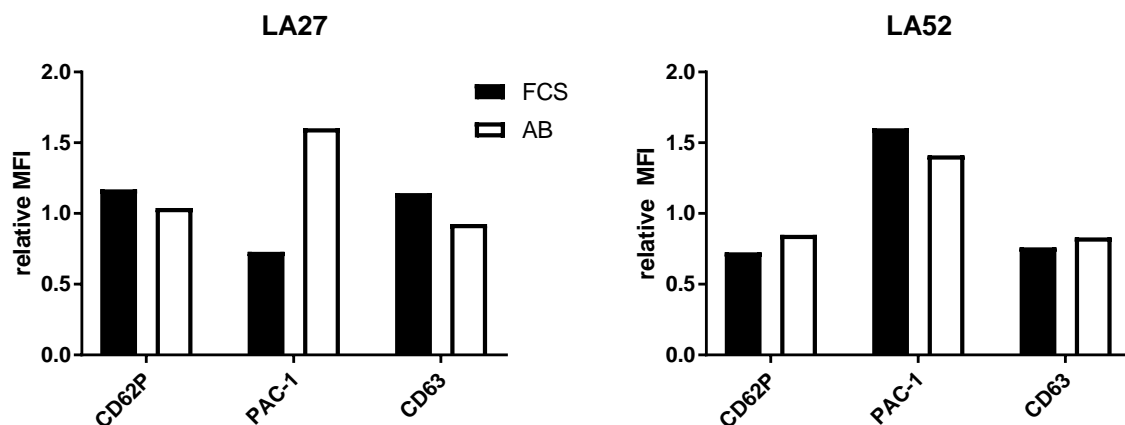


Abbildung 16: Vergleich von LA-MSC kultiviert in Medium mit xenogenen (FCS) und humanen (AB) Zusätzen. Gezeigt sind die zwei getesteten MSC Spender. Zur besseren Vergleichbarkeit von FCS und LA-kultivierten MSC wurde die jeweilige Ausgangsstimulation ohne MSC gleich 1 gesetzt und die MFI in MSC Anwesenheit in Relation dazu gesetzt.

3.1.6 MSC-Thrombozytenaggregate

Bei stimulierender Wirkung anderer Zellen auf Thrombozyten wird häufig eine Aggregation der Populationen beschrieben (Bastida et al., 1987; Gerrits et al., 2016; Medina et al., 2012; Menter et al., 2014; Stegner et al., 2014). Daher wurde in der Durchflusszytometrie die MSC Population auf anheftende Thrombozyten untersucht. CD41 war jedoch in der Anwesenheit nicht stimulierter und stimulierter Thrombozyten nicht erhöht (Abb. 17; vgl. auch 3.2).

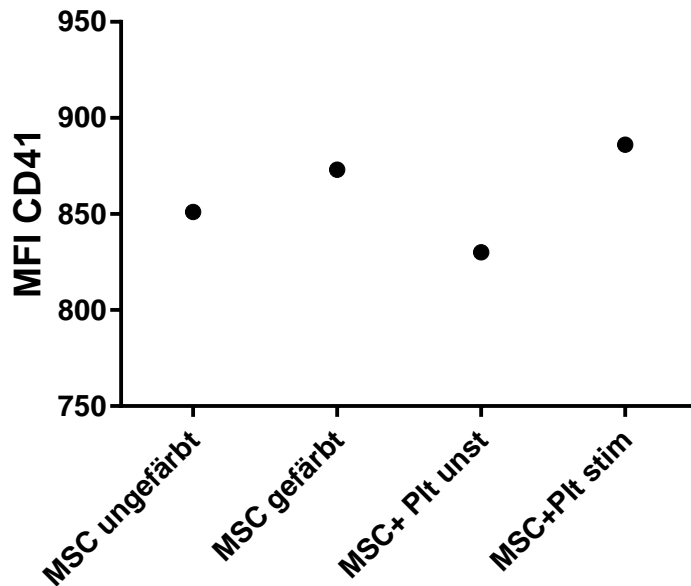


Abbildung 17: MFI Werte in der MSC Population für den Thrombozytenmarker CD41. Untersucht wurden ungefärbte, gefärbte MSC, sowie MSC zusammen mit unstimulierten und stimulierten Thrombozyten.

3.1.7 Mögliche Mechanismen

Die zuvor dargelegten Daten zeigen, dass LA- und BM-MSC die Agonisten-induzierte Thrombozytenaktivierung hemmen können, ebenso wie HUVEC. CB-MSC hingegen zeigen sehr heterogene Daten mit einer Tendenz zu additiven Effekten. Ebenso wie HeLa-Zellen stimulieren sie Aktivierungsmarker auf ruhenden Thrombozyten, jedoch in geringerem Maße als Hela. Die Effekte hatten sich unabhängig vom Aktivierungsweg der Thrombozyten gezeigt.

Um herauszufinden, über welchen Mechanismus MSC die Plättchenaktivierung beeinflussen wurden weiterhin unterschiedliche Inhibitoren getestet.

3.1.7.1 Cyclooxygenase und CD62P

Zunächst wurden Thrombozyten mit dem CD62P inhibierenden Antikörper AK-4 versetzt, um eine mögliche Interaktion von mit MSC über P-Selectin zu unterbinden. Diese ist beispielsweise als ursächlich für die Hemmung von Thrombozyten durch Endothelzellen beschrieben (Abou-Saleh et al., 2015), kann umgekehrt aber auch eine Aktivierung durch Tumorzellen auslösen (vgl. 2.6.3). In diesen Versuchen konnte jedoch die Hemmung durch BM-MSC und LA-MSC nicht verhindert werden (Abb. 18).

In einem zweiten Schritt wurden LA- und BM-MSC mit Indomethacin (als nichtselektiver Inhibitor der Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2)) kultiviert. Es wurde untersucht, ob sich die beobachteten Auswirkungen der MSC auf die Plättchenaktivierung dadurch reduzieren lassen. Auch dieser Mechanismus ist als mitverantwortlich für die Thrombozytenregulation durch Endothelzellen beobachtet worden (Abou-Saleh et al., 2009) (vgl. 2.6.3). Weder bei LA-, noch bei BM-MSC konnte jedoch im Vergleich normal kultivierter Zellen mit Indomethacin kultivierten Zellen

Unterschiede im Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung festgestellt werden (Abb 18).

Aufgrund der fehlenden Auswirkung nach den ersten Versuchen folgten keine weiteren Experimente mit Indomethacin und AK-4 (jeweils n=2).

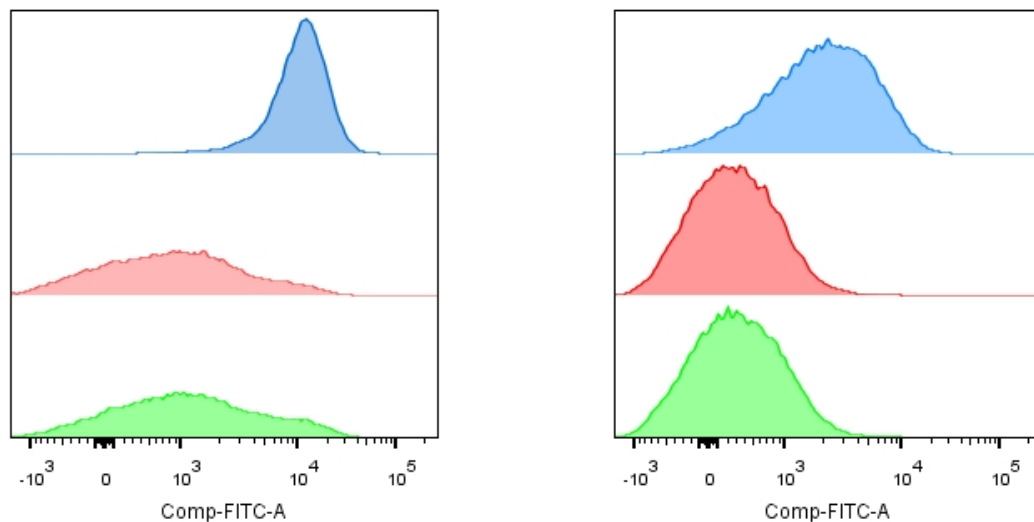


Abbildung 18: Beispielexperimente mit AK-4 und Indomethacin: PAC-1 Nachweis. Links: AK4. Thrombozyten wurden mit dem CD62P inhibierenden Antikörper AK-4 inkubiert, anschließend mit BM-MSc inkubiert und in deren Beisein aktiviert. Blau: PAC-1 Nachweis nach Stimulierung ohne BM-MSc. Rot: PAC-1 Nachweis nach Stimulierung in BM-MSc Anwesenheit. Grün: PAC-1 Nachweis nach Stimulierung auf AK-4 blockierten Plättchen im Beisein von BM-MSc. Es zeigt sich keinerlei Beeinträchtigung der Inhibierung der Plättchen durch die AK-4 Blockade. **Rechts: Indomethacin.** BM-MSc wurden in mit Indomethacin versetztem Medium kultiviert, um eine vollständige Blockade der COX in den BM-MSc zu erreichen. Blau: PAC-1 Nachweis nach Stimulierung ohne BM-MSc. Rot: PAC-1 Nachweis nach Stimulierung im Beisein von normal kultivierten BM-MSc. Grün: PAC-1 Nachweis nach Stimulierung im Beisein von mit Indomethacin kultivierten BM-MSc.

3.1.7.2 CD39, CD73, A2A-Rezeptor

Zuletzt erfolgten Blockierungen unterschiedlicher Enzyme des plättcheninhibierenden Anteils des extrazellulären ATP/ADP/AMP Signalweges. Dieser spielt bei der Regulation der Thrombozytenaktivität u.a. durch Endothelzellen oder Leukozyten eine wesentliche Rolle (Fuentes and Palomo, 2015) (vgl. 2.6.3).

Zuerst wurde die Expression von CD39 und CD73 auf MSC, HUVEC, HeLa Zellen, unstimulierten und stimulierten Thrombozyten untersucht.

CD39 wurde auf MSC nicht/nur extrem schwach exprimiert. Auch auf HUVEC und HeLa Zellen war CD39 nicht nachweisbar. Auf ruhenden Thrombozyten war CD39 mit einer MFI von 6000 dagegen stark vertreten, auf aktivierten mit ca. einer MFI 4500 auch noch deutlich stärker als bei allen anderen Populationen.

Eine starke Positivität zeigten MSC aller Quellen dagegen für CD73. Im Vergleich dazu war die Nachweisbarkeit von CD73 auf HUVEC nur noch ca. ein Sechstel, auf HeLa Zellen war CD73 nicht vorhanden. Interessanterweise erbrachten nur ruhende Plättchen einen CD73 Nachweis, während bei Stimulierten CD73 abwesend war.

Anschließend wurden die Auswirkungen der Blockade der beiden Enzyme und des A2A-Rezeptors getestet. Der Fokus lag auf der Messung von CD62P und PAC-1. Es wurden LA-MSc, HUVEC und HeLa Zellen untersucht. Die Auswirkung der Inhibitoren

von CD39 (POM-1), CD73 (AMP-CP) und dem A2A-Rezeptor (SCH 58261) wurden zur Reduzierung der Bandbreite der MFI in Relation zur Ausgangsstimulation mit 5 µM TRAP gesetzt.

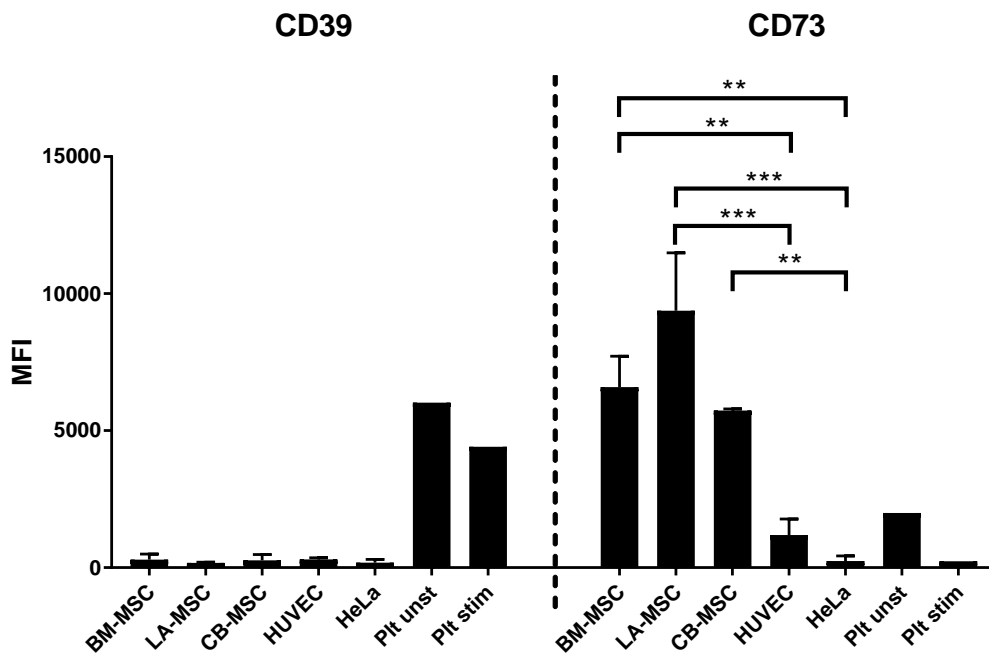


Abbildung 19: Nachweis von CD39 und CD73 auf den eingesetzten Zellpopulationen und Thrombozyten. BM-MSc, CB-MSc, HUVEC, HeLa jeweils n=2; Plt unst, Plt stim jeweils n= 1; LA-MSc n=4. * p<0,05; ** P<0,01; *** p<0,001

Zuerst wurden die Einflüsse der Reagenzien selbst auf Thrombozyten untersucht. Hier zeigte sich für alle eingesetzten Substanzen eine hemmende Wirkung, am stärksten bei POM-1.

Tabelle 37: Einfluss mehrerer Reagenzien auf die Thrombozytenstimulation mit 5µM TRAP.

	CD62P				PAC-1			
	Mean	SD	n	p	Mean	SD	n	p
TRAP	14116	7398	8		8569	6300	6	
AMP-CP	10356	3177	8	n.s.	5000	1875	6	n.s.
SCH 58261	9272	3673	4	n.s.	3660	2502	2	n.s.
POM-1	5656	2057	8	<0,05	1459	470	6	<0,05

Die CD39 Inhibierung mit POM-1 bewirkte keine Aufhebung des MSC Effekts, stattdessen wurde die Hemmung noch stärker. Die Unterbindung von CD73 mittels AMP-CP dagegen führte zu einer signifikanten Antagonisierung des LA-MSc Effektes auf CD62P und CD63. Auch der HUVEC Effekt verringerte sich tendenziell, allerdings nicht signifikant. Der Effekt der HeLa Zellen war nicht betroffen. Interessanterweise wurde die PAC-1 Bindung durch AMP-CP bei allen eingesetzten Zellarten tendenziell gesteigert, teilweise sogar über den Ausgangswert durch ausschließlich TRAP hinaus. Gegenüber dem Vorwert mit Zellen war jedoch die Erhöhung von PAC-1 nur für LA-MSc signifikant.

Tabelle 38: Einfluss mehrerer Reagenzien auf die veränderte Thrombozytenstimulation mit 5µM TRAP durch weitere Zellen. Zur Reduktion der Streuung wurden die Werte gegen die reine 5µM TRAP Stimulation normalisiert. P-Werte beschreiben den Unterschied gegen den zuoberst stehenden Kontrollwert aus 5µM TRAP mit anwesenden weiteren Zellen ohne Inhibitor.

	CD62P				PAC-1			
	Mean	SD	n	p	Mean	SD	n	p
LA								
LA/TRAP	0,34	0,18	6		0,65	0,22	4	
AMP-CP + LA/TRAP	0,61	0,21	6	0,009	1,32	0,46	4	0,002
SCH 58261 + LA/TRAP	0,54	0,12	4	0,070	0,68	0,05	2	0,027
POM-1 + LA/TRAP	0,39	0,16	6	0,555	0,24	0,07	4	0,809
HUVEC								
HUVEC/TRAP	0,50	0,27	6		0,73	0,44	4	
AMP-CP + HUVEC/TRAP	0,68	0,32	6	0,033	0,89	0,57	4	n.s.
SCH 58261 + HUVEC TRAP	0,78	0,27	4	0,071	0,57	0,50	2	n.s.
POM-1 + HUVEC /TRAP	0,35	0,24	6	0,058	0,24	0,11	4	n.s.
HeLa								
HeLa/TRAP	0,97	0,18	6		1,43	0,41	4	
AMP-CP + HeLa /TRAP	1,00	0,46	6	0,823	1,62	0,67	4	0,377
SCH 58261 + HeLa /TRAP	1,02	0,41	4	0,977	1,09	0,28	2	0,102
POM-1 + HeLa /TRAP	0,57	0,31	6	0,011	0,29	0,17	4	<0,001

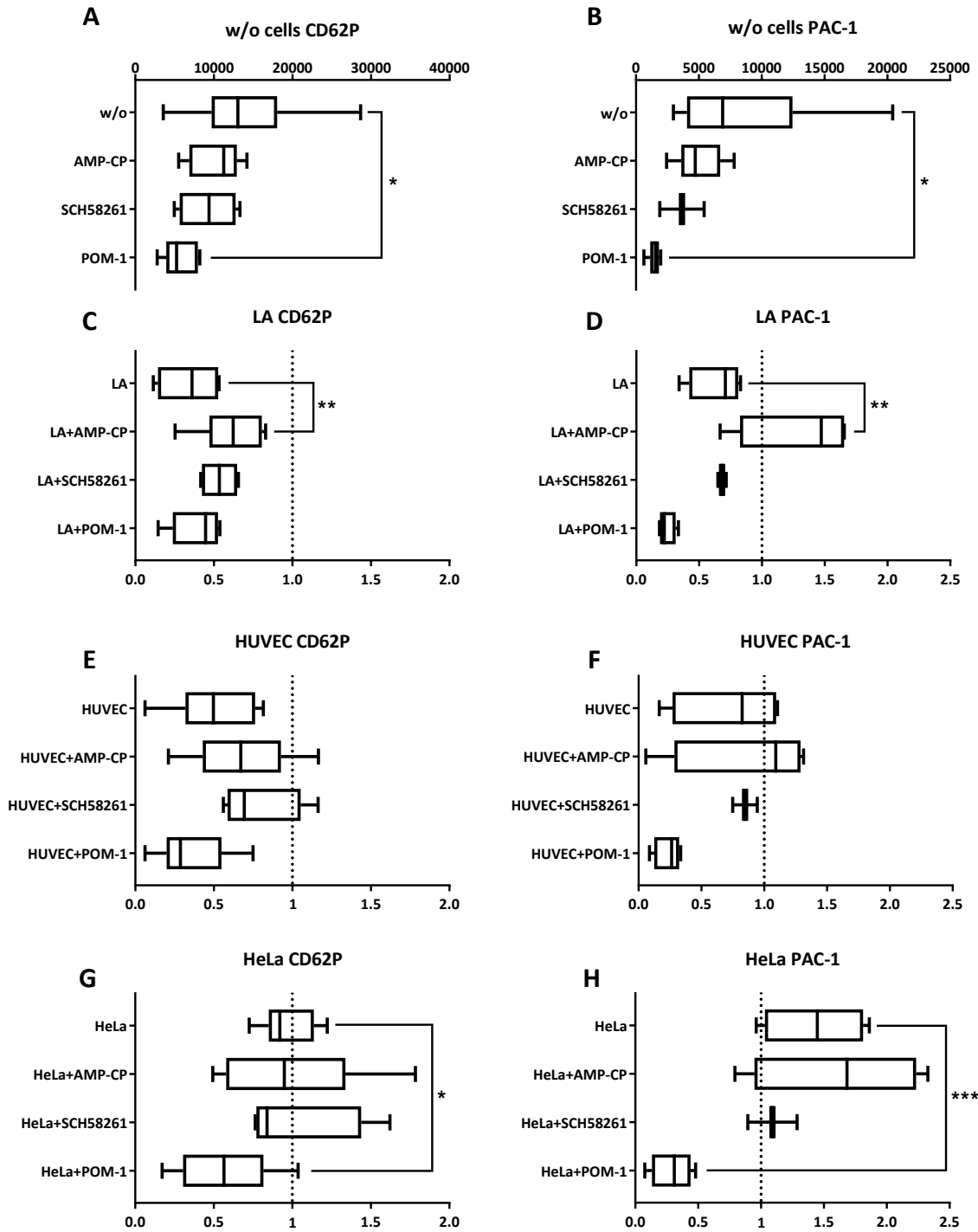


Abbildung 20: Einfluss mehrerer Inhibitoren des extrazellulären ATP/ADP/AMP Wwegs auf die veränderte Thrombozytenstimulation mit 5µM TRAP durch weitere Zellen. Dargestellt sind CD62P (links) und PAC-1 (rechts). Für die Versuchszahlen siehe Tabelle 31. * p<0,05; ** P<0,01; *** p<0,001

3.2 Fluoreszenzmikroskopie

Um einen visuellen Nachweis der im FACS beobachteten Effekte der CBA- und BM-vermittelten Reduktion der Agonisten-induzierten Thrombozytenaktivierung zu ermöglichen, wurden die Plättchen mit Calcein gefärbt, anschließend mit BM-MS, CB-MS oder HeLa Zellen inkubiert und stimuliert. Bilder wurden von unstimulierten

und stimulierten Thrombozyten aufgenommen. Da diese Versuche von den Abläufen denen der Durchflusszytometrie entsprachen und vor allem der Visualisierung dienten erfolgte keine quantitative Auswertung.

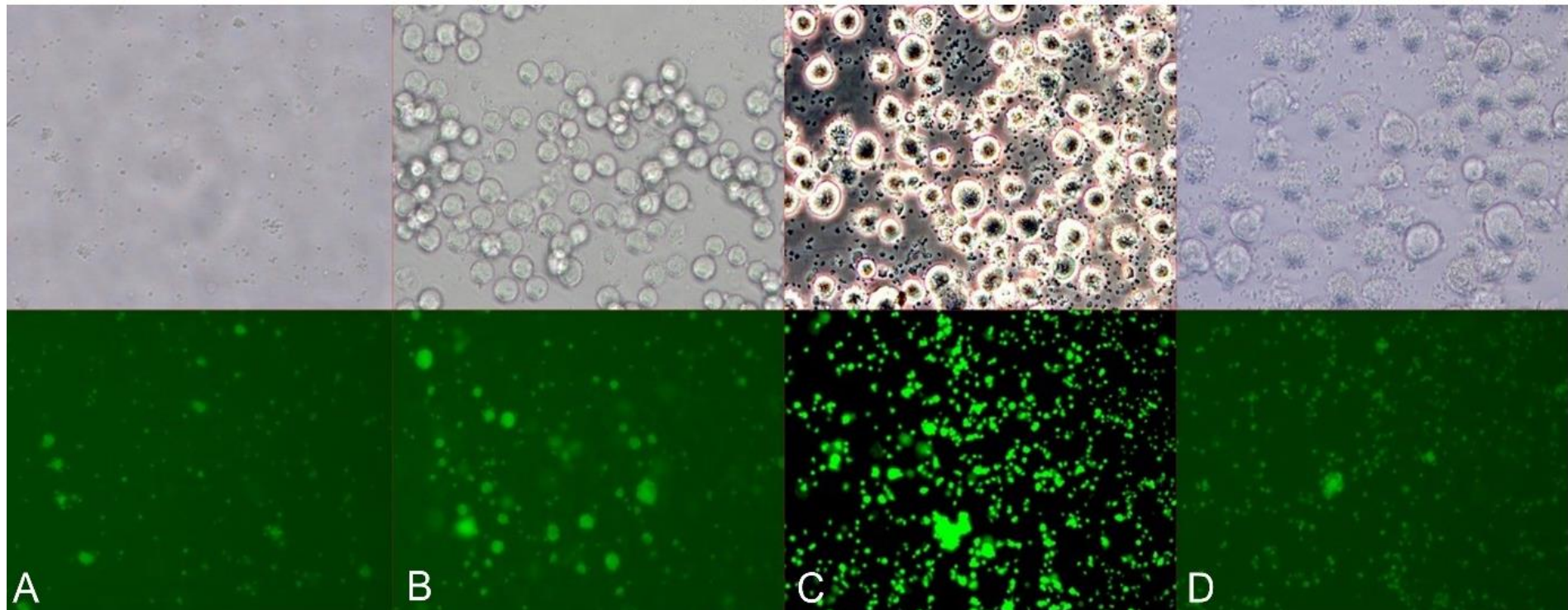


Abbildung 21: 5µM TRAP stimulierte Thrombozyten am Rand des Wells. Obere Reihe jeweils Phasenkontrastaufnahme der Zellen, untere Reihe Fluoreszenzaufnahme der markierten Thrombozyten. **A:** Stimulierte Thrombozyten. Es zeigt sich eine Aggregation der Plättchen, wenige liegen einzeln vor. **B:** Stimulierte Thrombozyten in HeLa Anwesenheit. Auch hier zeigt sich eine ausgeprägte Aggregation. **C:** Stimulierte Thrombozyten in CB-MSC Anwesenheit. Eine Aggregation ist immer noch sichtbar, allerdings zeigen sich deutlich mehr vereinzelte Thrombozyten als bei den alleine stimulierten Plättchen oder in HeLa Anwesenheit. **D:** Stimulierte Thrombozyten in BM-MSC Anwesenheit. Es zeigt sich eine deutlich reduzierte Aggregation der Thrombozyten, der überwiegende Anteil liegt einzeln vor.

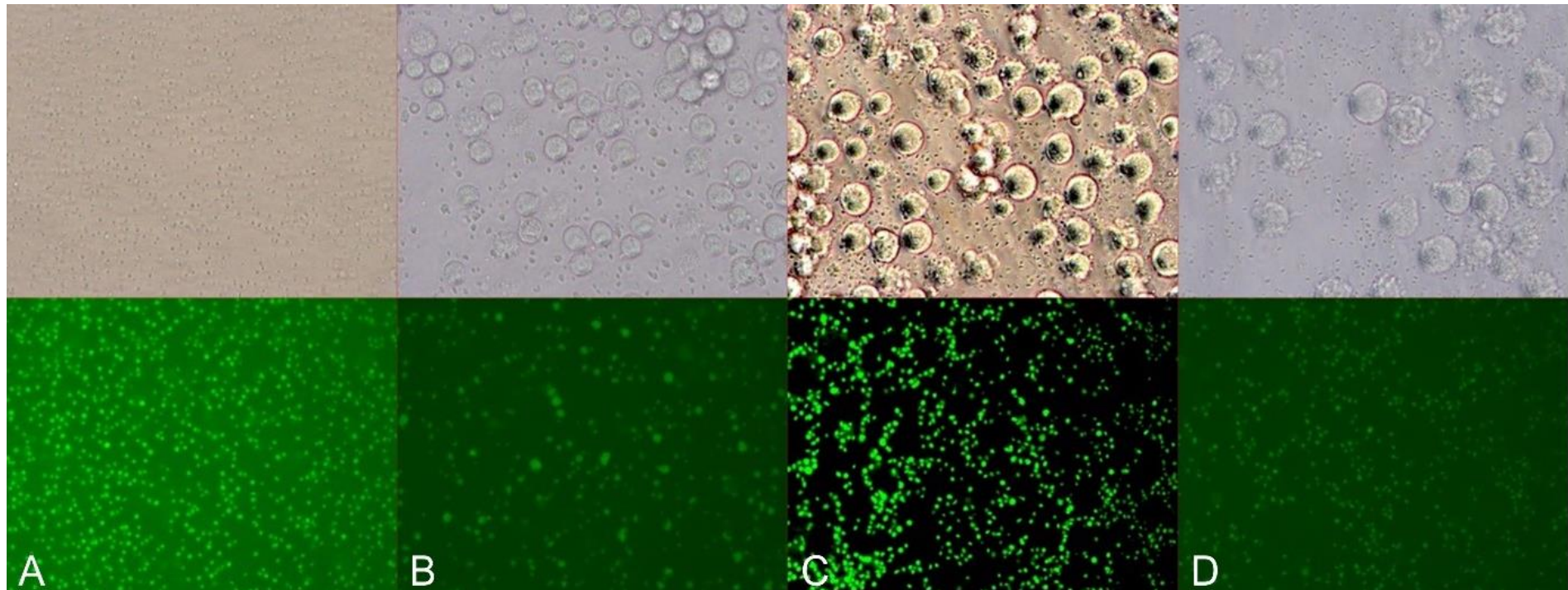


Abbildung 22: Unstimulierte Thrombozyten am Rand des Wells. Obere Reihe jeweils Phasenkontrastaufnahme der Zellen, untere Reihe Fluoreszenzaufnahme der markierten Thrombozyten. **A:** Unstimulierte Thrombozyten. Alle Plättchen liegen vereinzelt vor. **B:** Unstimulierte Thrombozyten in HeLa Anwesenheit. Eine deutliche Klumpung ist sichtbar. Die Aggregate sind allerdings nicht mit den HeLa Zellen assoziiert, sondern liegen größtenteils unabhängig von den HeLa Zellen vor. **C:** Unstimulierte Thrombozyten in CB-MSc Anwesenheit. Es zeigt sich keine Aggregation. **D:** Unstimulierte Thrombozyten in BM-MSc Anwesenheit. Auch hier ergeben sich keine Hinweise auf eine Stimulierung der Thrombozyten.

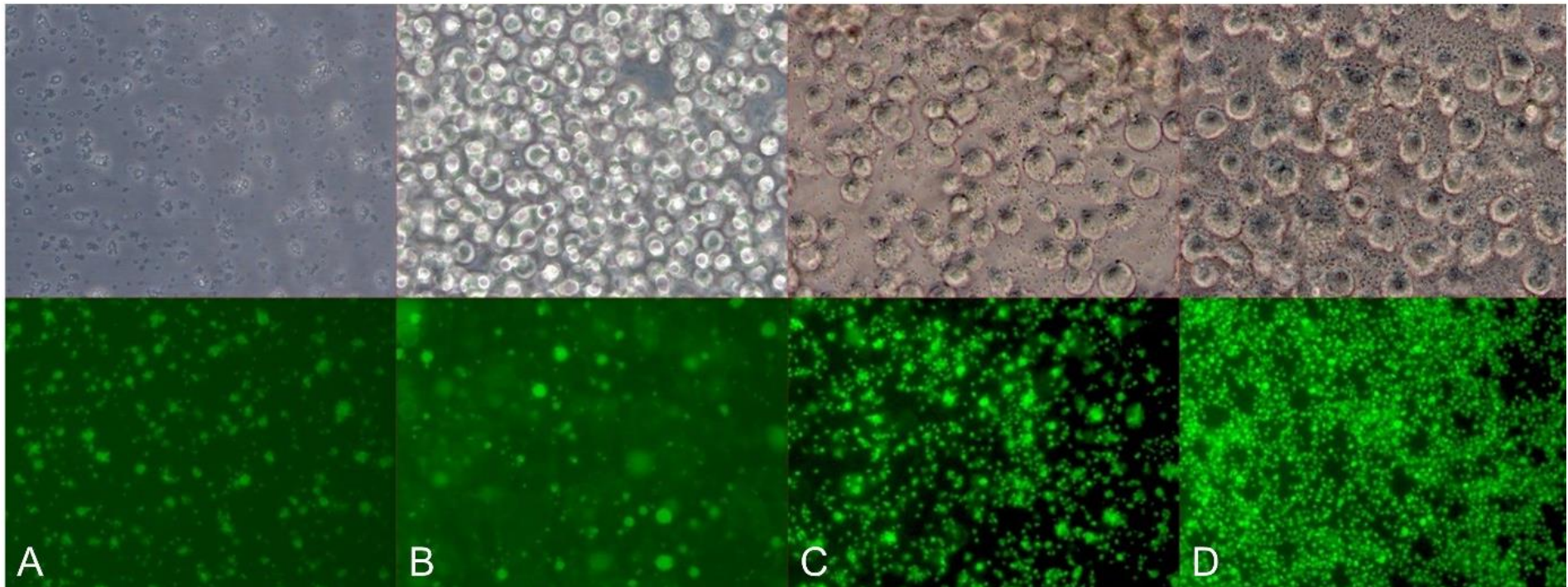


Abbildung 23: 5µM TRAP stimulierte Thrombozyten im Zentrum des Wells. Obere Reihe jeweils Phasenkontrastaufnahme der Zellen, untere Reihe Fluoreszenzaufnahme der markierten Thrombozyten. **A:** Stimulierte Thrombozyten. Eine ausgeprägte Aggregation ist sichtbar. Wenige Plättchen sind einzeln erkennbar. **B:** Stimulierte Thrombozyten in HeLa Anwesenheit. Auch hier zeigt sich eine ausgeprägte Aggregation, die Aggregate sind sogar deutlich größer als die der Plättchen alleine. **C:** Stimulierte Thrombozyten in CB-MSK Anwesenheit. Einige Aggregate sind erkennbar, allerdings liegen auch viele Thrombozyten einzeln vor. **D:** Stimulierte Thrombozyten in BM-MSK Anwesenheit. Praktisch alle Plättchen sind einzeln erkennbar, es bilden sich keinerlei Aggregate.

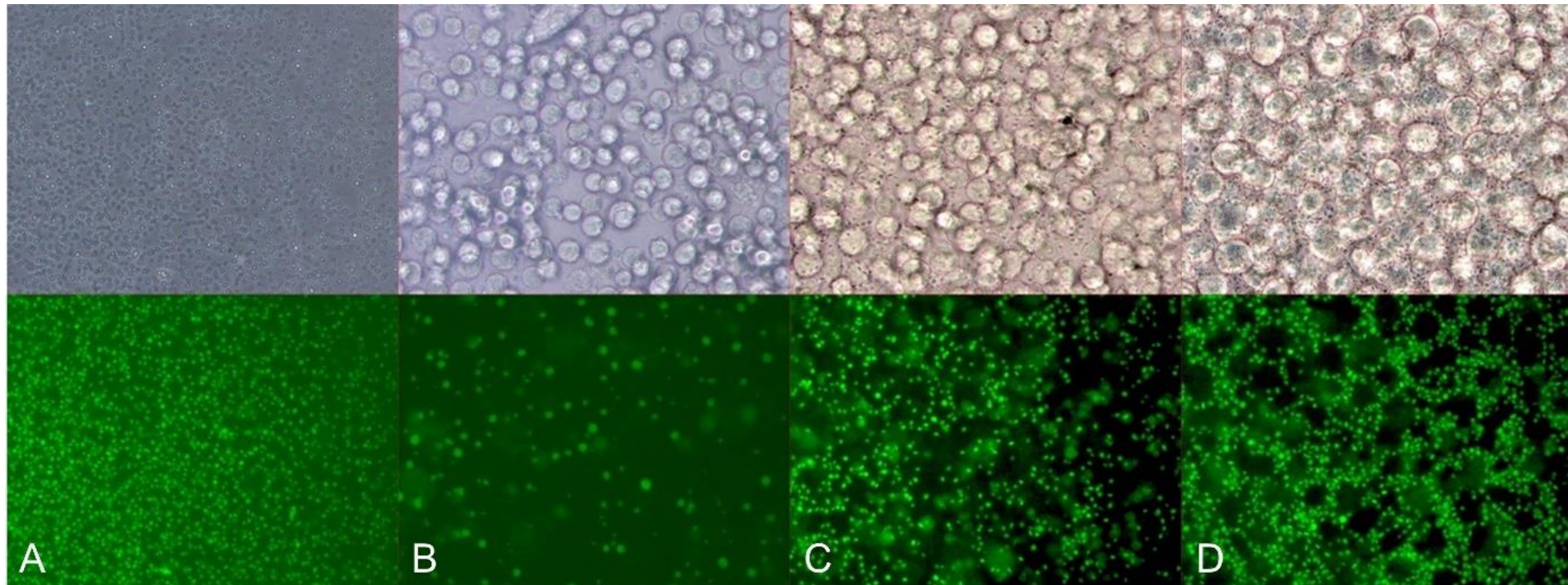


Abbildung 24: Unstimulierte Thrombozyten im Zentrum des Wells. Obere Reihe jeweils Phasenkontrastaufnahme der Zellen, untere Reihe Fluoreszenzaufnahme der markierten Thrombozyten. **A:** Unstimulierte Thrombozyten. Die Plättchen liegen vereinzelt vor. **B:** Unstimulierte Thrombozyten in HeLa Anwesenheit. Eine ausgeprägte Aggregation ist sichtbar. Nur wenige Plättchen sind einzeln erkennbar, der überwiegende Anteil ist in Aggregate eingebunden. **C:** Unstimulierte Thrombozyten in CB-MSC Anwesenheit. Es zeigt sich eine leichte Aggregation, um einige Plättchen sind sphärische Strukturen erkennbar, die ebenfalls auf eine Aktivierung und Adhäsion hinweisen. **D:** Unstimulierte Thrombozyten in BM-MSC Anwesenheit. Die Plättchen liegen vereinzelt vor, es zeigt sich kein Hinweis auf Aggregation oder Adhäsion

3.3 Impedanz Aggregometrie

Die FACS-Daten zeigten einen Einfluss der MSC auf Thrombozyten-Aktivierungsmarker und die mikroskopischen Daten scheinbar auch einen Einfluss auf deren Aggregationsverhalten. Es stellte sich nun die Frage, ob diese auch mit einer modifizierten messbaren Funktion = Aggregationsneigung der Thrombozyten einhergeht. Um dies zu testen, wurde die Methode der Impedanzaggregometrie am Multiplate® gewählt. In der Impedanzaggregometrie wurden Thrombozyten mit unterschiedlichen MSC Arten (BM-, LA-, und CB-MSC) inkubiert und in deren Anwesenheit mit TRAP und ADP aktiviert. Es wurden dabei zwei Zelldosen ($5 \times 10^5/\text{ml}$ und $10^6/\text{ml}$) getestet. Außerdem wurden unstimulierte Thrombozyten mit einer Einzeldosis von $10^5/\text{ml}$ versetzt, um eine Aktivierung durch die Zellen selbst zu untersuchen. Als Kontrollen dienten wieder HeLa Zellen und HUVEC (Abb.25, Tab. 39).

Die Auswertung erfolgte anhand der gemessenen Impedanzzunahme über die Zeit (AUC).

BM-MSC. Unstimuliert erhöhte sich die AUC durch Zugabe von $5 \times 10^5/\text{ml}$ BM-MSC zwar, allerdings zeigte sich dieses Ergebnis in einem von zwei Experimenten, während in dem anderen keine Änderung zu verzeichnen war. Die Stimulationswerte verringerten sich durch BM-MSC für TRAP und ADP. Eine Verdoppelung der Zelldosis zeigte sowohl bei ADP und TRAP einen leicht gesteigerten Effekt.

LA-MSC. Aus Lipoaspirat gewonnene MSC lieferten ähnliche Ergebnisse. Der Zusatz von LA-MSC zu unstimuliertem Blut führte praktisch zu keiner Veränderung. Nach Agonisten-Stimulation verringerte sich die AUC.

CB-MSC. Auch hier entsprachen die Resultate denen der anderen beiden MSC Arten, nicht jedoch denen der Durchflusszytometrie (s.o.). Während im FACS CB-MSC zu erhöhten Aktivierungsparametern in Ruhe führten zeigte sich in der Impedanz Aggregometrie durch Zusatz von $5 \times 10^5/\text{ml}$ CB-MSC zu unstimulierten Blutproben eine weitere Reduktion der AUC. Nach Stimulation verringerte sich die AUC wie bei den anderen Zellsorten. Bei CB-MSC zeigte sich am deutlichsten ein Dosiseffekt, ohne jedoch signifikant zu sein.

HUVEC. HUVEC verringerten die AUC, was aufgrund ihrer Funktion als Kontrolle im Sinne einer Inhibierung der Thrombozytenaktivierung auch erwartet war. Die Zugabe von $5 \times 10^5/\text{ml}$ HUVEC zu ruhendem Vollblut ergab keine Veränderung, während die Stimulierung mit TRAP und ADP reduziert wurde.

HeLa Zellen. Die letzte zugesetzte Zellpopulation waren HeLa Zellen, die als plättchenaktivierende Zellpopulation vorgesehen waren. Am Multiplate® ergaben sich allerdings den der anderen eingesetzten Zellen entsprechende Ergebnisse, die nicht mit den Resultaten aus dem FACS übereinstimmten. Auf unstimuliertes Blut zeigte sich keinerlei aktivierender Einfluss, die Werte erreichten stattdessen einen absoluten Tiefpunkt. Im Vergleich zur reinen Vollblutprobe ergab sich durch bei Stimulierung anwesende HeLas eine reduzierte AUC.

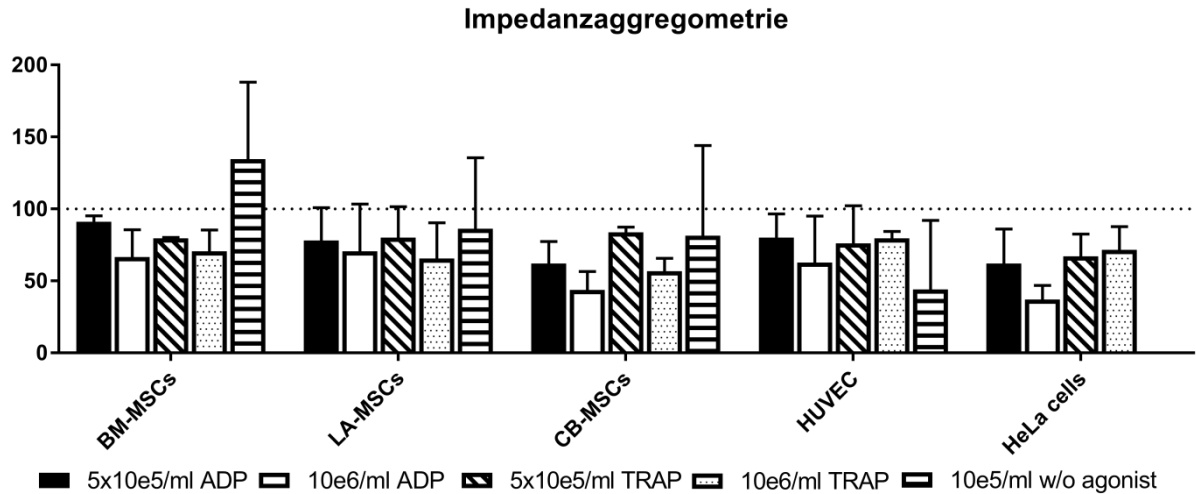


Abbildung 25: Einflüsse unterschiedlicher Zellsorten auf die Thrombozytenaktivierung in der Impedanzaggregometrie. Die Stimulationswerte sind als relativ im Vergleich zur Area under the curve (AUC) ohne zusätzliche Zellen angegeben. Bei Zugabe von HeLa Zellen ohne Agonisten war die AUC stets 0.

Tabelle 39: Einflüsse unterschiedlicher Zellsorten auf die Thrombozytenaktivierung in der Impedanzaggregometry. Die Zahlen beschreiben die gemessene Area under the curve (AUC).

		BM (n=2)		LA (n=7)		CB (n=3)		HUVEC (n=3)		HeLa (n=2)	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
	unst	10	1,4	10,9	5,7	5,3	4,9	6,3	5,5	8,0	5,7
	+10e5/ml	16,5	3,5	11,9	6,3	2,7	0,6	2,7	3,8	0,0	0,0
TRAP											
	stim	95	19,8	77,4	21,2	97,3	6,4	75,0	9,5	56,5	21,9
	+5x10e5/ml	75,5	16,3	60,0	31,8	81,3	2,1	56,7	20,2	39,5	23,3
	+10e6/ml	68,5	27,6	51,0	31,7	55,0	4,6	56,0	2,8	38,5	6,4
ADP											
	stim	47,5	17,7	44,3	21,9	55,0	13,0	36,7	15,5	27,0	9,9
	+5x10e5/ml	43	14,1	36,5	25,2	35,3	17,2	27,7	5,7	18,0	12,7
	+10e6/ml	30	2,8	32,8	32,1	24,7	11,6	20,3	4,7	10,5	6,4

3.4 Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion

Als letzte experimentelle Untersuchung wurde eine Genexpressionsanalyse von Koagulationsparametern in den verschiedenen Zellentitäten vorgenommen. Interessant war dabei, ob sich die Ergebnisse der Versuche mit MSC und Thrombozyten, in denen vor allem LA- und BM-MSC im Gegensatz zu den Tumorzellen zu einer deutlichen Inhibierung der Thrombozytenaktivierung geführt hatten, auch mit Bezug auf die plasmatische Gerinnung widerspiegeln würde.

In der PCR zeigten sich die relativen Genexpressionen innerhalb der einzelnen Zelltypen nicht immer konstant, so dass bei der geringen Probenzahl nur Trends bewertet werden können. Folgende Zellentitäten wurden in die Analyse eingeschlossen:

- LA-MSC, die in FCS (n=3) kultiviert worden waren
- LA-MSC, die in humanem Plättchenlysate (n=2) enthaltendem Medium kultiviert worden waren
- CB-MSC (n=3), kultiviert in FCS
- BM-MSC (n=3), kultiviert in FCS
- endotheliale Progenitorzellen (ECB) (n=3)
- HUVEC (n=2)
- periphere mononucleäre Zellen (PBMC) (n=1)
- die Tumorzelllinie HepG2 (n=1)

Abbildung 26 visualisiert die im Folgenden ausgeführten Ergebnisse.

Die grundsätzliche Erwartungshaltung wäre, dass die endothelialen Zellreihen (ECB und HUVEC) höhere Expressionen der anti-koagulatorischen Gene TFPI1, TFPI2, uPA, u-PAR, t-PA und PLG aufweisen würden als insbesondere die Tumorzelllinien, während die pro-koagulatorischen Gene TF und PAI verringerte Werte gegenüber Kontrollzellen, wie z.B: Hela und HepG2 (hepatozytäre Karzinom Zelllinie) erwarten lassen würden.

Für TFPI1 traf diese Annahme weitgehend zu. Insgesamt konnte TFPI1 über alle Zellpopulationen als relativ stark ausgeprägt festgestellt werden. Die Expression war am stärksten in HUVEC, wobei ein vergleichbar starker Wert in HepG2 ermittelt werden konnte. Etwas schwächer fiel der cDNA Nachweis in ECB aus, wobei diese ungefähr vergleichbar mit BM-MSC waren. Deutlich abgemindert war dagegen die Expression in CB-MSC, wobei die Einzelwerte hier relativ stark schwankten. In LA-MSC, sowohl aus humanem Medium als auch aus FCS, zeigte sich dagegen ein deutlich verringerter Nachweis von TFPI1. In PBMC war kein Nachweis von TFPI1 möglich.

TFPI2 zeigte sich insgesamt über die untersuchten Zellarten hinweg als ebenfalls relativ stark exprimiert. Am stärksten fand es sich in PBMC. Es folgten ECB und auch BM-MSC wiesen eine relativ starke Expression von TFPI2 auf. Im Vergleich etwas schwächer stellten sich HUVEC dar, gefolgt von LA-MSC aus humanem Zellkulturmedium und LA-MSC aus FCS Medium. Deutlich abgeschwächt stellte sich TFPI2 in CB-MSC dar, in denen im Vergleich zu ECB bereits eine um den Faktor 10 reduzierte Expression nachweisen ließ. Mit Abstand am schwächsten präsentierte sich TFPI2 in HepG2 Zellen.

PLAU wies nur geringfügige Unterschiede über die unterschiedlichen Populationen auf und war insgesamt im Vergleich zu den stark exprimierten Genen PAI oder TFPI1 eher schwach ausgeprägt. Am stärksten erwies sich PLAU in CB-MSC. Es folgten, beinahe gleichwertig, LA-MSC aus FCS Medium, BM-MSC und ECB. Zwischen diesen beiden Populationen variierten die Werte jeweils um den Faktor 3. Eine wiederum um die Hälfte reduzierte Expression fand sich in LA-MSC aus humanem Kulturmedium und HUVEC. Ein deutlicher Abfall folgte schließlich zu PBSC, während der Unterschied von HepG2 Zellen zu CB-MSC bereits den Faktor 10 betrug.

Bei PLAT war von einer ähnlichen Verteilung wie bei PLAU auszugehen, nachdem beide Proteasen an Plasminogen angreifen. Tatsächlich war die grundsätzliche Genexpression von PLAT gegenüber PLAU in allen untersuchten Populationen deutlich erhöht. Die höchste Expression ließ sich bei LA-MSC nachweisen, die in FCS Kulturmedium gezüchtet worden waren. Weiterhin hohe Werte zeigten sich in BM-MSC, HUVEC und ECB, die sich jeweils nur geringfügig unterschieden. Die folgenden LA-MSC aus Humanerum supplementiertem Medium fielen dagegen deutlicher ab. Besonders schwach war der PLAT Nachweis in CB-MSC. Hier betrug die relative Expression von PLAT nur noch ca. 25% derer in LA-MSC. PBSC zeigten keine Amplifizierung von PLAT.

Die Verteilung der uPAR Expression entsprach weitgehend der von u-PA. Die Werte lagen in etwa im selben Bereich (10^{-2} im Verhältnis zu den Referenzgenen), allerdings ließen sich für uPAR beinahe keine Unterschiede zwischen den Zellarten ausmachen. Am stärksten war der Nachweis in BM-MSC. Es folgten weiterhin LA-MSC aus humanem Kulturmedium, CB-MSC und LA-MSC aus FCS Medium. Auch HUVEC und ECBs lagen in etwa im selben Bereich, wenn auch der uPAR geringfügig schwächer ausfiel. Der Unterschied hier war marginal. Einen deutlicheren Abfall zeigte sich, wie auch bei PLAU, bei PBSC, deren Wert nur noch etwa ein Fünftel der BM-MSC betrug und HepG2 Zellen, die beinahe nur noch ein Hundertstel der BM-MSC Expression von uPAR zeigten.

Im starken Kontrast dazu war die Nachweisbarkeit von PLG über alle Zellpopulationen extrem niedrig. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Zellarten erwiesen sich auch als relativ gering ausgeprägt. Am stärksten fand sich PLG in CB-MSC. Es folgten HepG2 mit ähnlichen Werten. Etwas geringer fand sich PLG in ECB. Vergleichbare Expressionsstärken zeigten sich in HUVEC und BM-MSC. Geringfügig schwächer war dagegen der Nachweis in LA-MSC, insbesondere LA-MSC aus humanem Medium fielen im Vergleich zu den restlichen Populationen ab. In PBSC war kein Nachweis einer PLG Expression möglich.

Ähnlich wie auch TFPI1 und TFPI2 zeigte sich PAI am stärksten in den endothelialen Zellreihen und in BM-MSC exprimiert. Insgesamt fiel auf, dass PAI über alle Zellreihen im Vergleich zu den anderen untersuchten Genen relativ stark nachweisbar war. Dabei gingen ECB mit einer Expression in Höhe der Stärke der Referenzgene voran. Es folgten BM-MSC, deren Werte nahezu denen der HUVEC entsprachen und die sich auch nahe an den Referenz Genen bewegten. Etwas schwächer präsentierte sich PAI in LA-MSC. Anders als bei TFPI2 wiesen LA-MSC aus humanem Kulturmedium jedoch höhere Werte auf als LA-MSC aus FCS Medium. Mit nur noch ungefähr 20% der Expressionsstärke von ECB fielen CB-MSC bereits deutlich ab und zeigten einen signifikant niedrigeren PAI Nachweis als ECB. während HepG2 mit Abstand den

geringsten Nachweis von PAI zuließen. Wie auch TFPI1 ließ sich PAI in PBMC nicht amplifizieren.

Das letzte untersuchte Gen war TF. Eine erhöhte Expression von TF in MSC war bereits berichtet worden und mit einem erhöhten Risiko von Lungenembolien in Mäusen assoziiert worden (Tatsumi et al., 2013). Insgesamt zeigte sich die höchste Nachweisbarkeit von TF in LA-MSC aus FCS Medium. Eine starke Ausprägung von TF fand sich auch in BM-MSC. Danach fielen die Werte merklich ab, CB-MSC und MSC aus AB-Medium waren bereits auf ein Siebtel der Expression von LA-MSC aus FCS Medium reduziert. Es folgten HepG2. Noch deutlicher verringert waren die endothelialen Reihen HUVEC und ECB, deren Unterschied zur am meisten exprimierten Zellart sich bereits auf den Faktor 100 belief. In PBSC konnte keine Expression von TF nachgewiesen werden (Abb. 26).

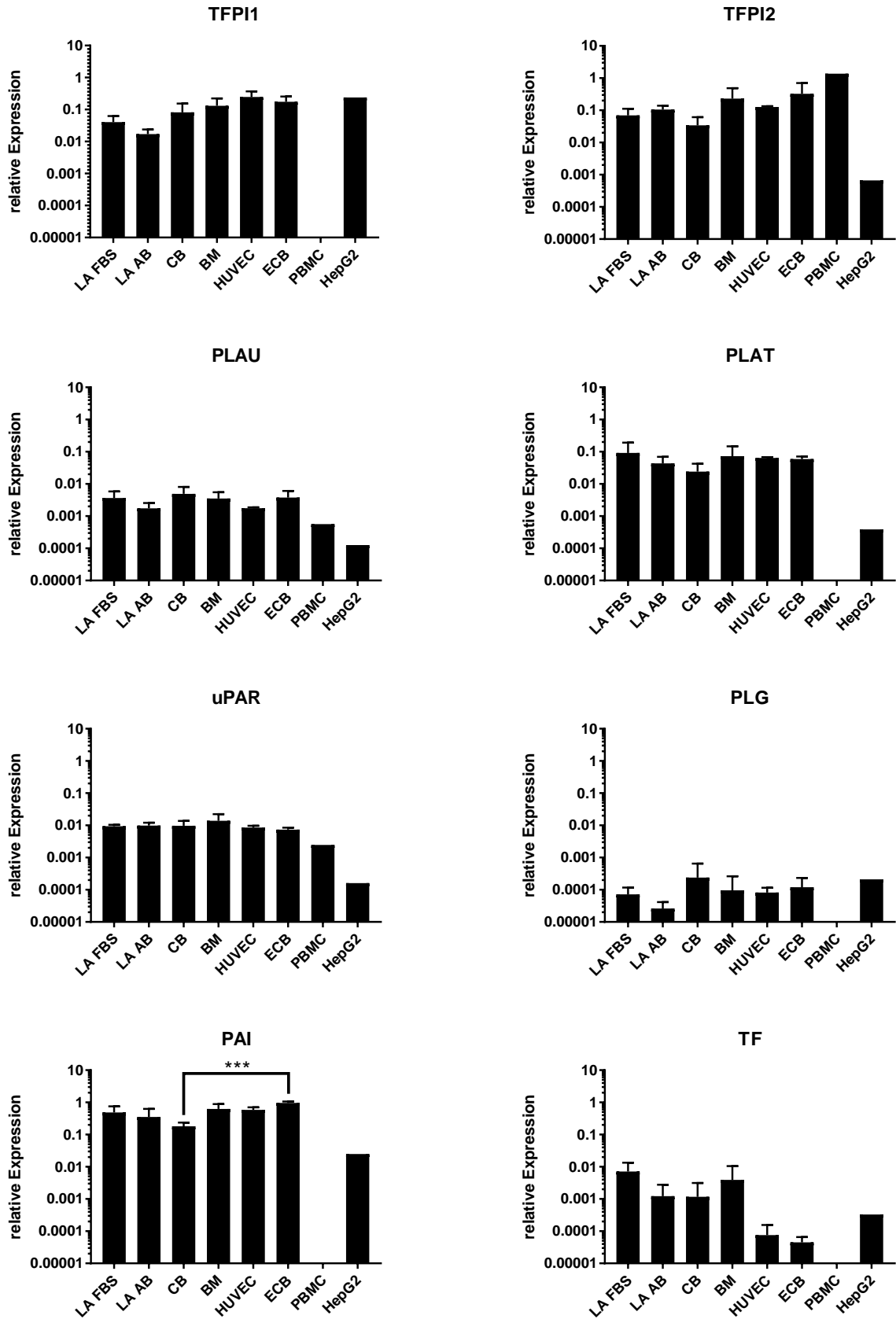


Abbildung 26: Expression unterschiedlicher für die Koagulation relevanter Gene. Die relative Expression bezieht sich auf die Normalisierung mit den Referenzgenen GAPDH und SFRS4. * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $p < 0,001$

4 DISKUSSION

MSC werden aufgrund ihrer multiplen Eigenschaften vielfach in klinischen Studien angewandt. Relevante Nebenwirkungen wurden bisher nicht beschrieben, sodass die Applikation als sicher betrachtet wird (Bieback et al., 2012b; Kim and Cho, 2013; Otto and Wright, 2011; Sharma et al., 2014; Wang et al., 2012b). Demgegenüber zeigte sich im Tierversuch mehrfach das Vorkommen von thromboembolischen Ereignissen, die u.a. zu fatalen Lungenembolien führten (Dreher et al., 2013; Fischer et al., 2009; Gao et al., 2001; Gleeson et al., 2015; Lee et al., 2009; Rochefort et al., 2005; Tatsumi et al., 2013). Die bisherigen Untersuchungen diesbezüglich waren stark auf die plasmatische Gerinnung fokussiert und konnten insbesondere TF als wesentliche Ursache identifizieren (Gleeson et al., 2015; Stephenne et al., 2012; Tatsumi et al., 2013).

Mit Hinblick auf die zelluläre Gerinnung liegen dagegen wenige Untersuchungen vor, deren Ergebnisse auch nicht ganz eindeutig sind, jedoch eher auf pro-koagulatorische Eigenschaften hinweisen. Zusätzlich wurden bereits Unterschiede bezüglich der Thrombogenität zwischen MSC aus unterschiedlichen Quellen und unterschiedlicher Passagezahl beschrieben (Agis et al., 2009; Hashi et al., 2007; Moll et al., 2015; Moll et al., 2012).

Daraus ergab sich die zentrale Fragestellung dieser Arbeit nach dem Einfluss von MSC unterschiedlicher Quellen auf die Aktivierung von Thrombozyten und die möglicherweise damit verbundene Thromboemboliegefahr durch deren Applikation. Weiterhin wurden zugrundeliegende Mechanismen untersucht und einige Gene, die relevant für die plasmatische Gerinnung sind, gescreent.

4.1 Methodische Überlegungen

Die eingesetzten Methoden Durchflusszytometrie und Impedanzaggregometrie hatten primär das Ziel Plättchenaktivierung in Anwesenheit von MSC bzw. der entsprechenden Kontrollen zu quantifizieren. Diese Ergebnisse sollten in der Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden. Die RT-qPCR sollte die Versuche noch mit Hinblick auf die plasmatische Gerinnung abrunden. Einige Überlegungen bezüglich der Validität der Methoden und ihrer möglichen Schwächen sollen im Folgenden dargestellt werden.

Grundsätzlich gab es bei allen Experimentreihen mit Thrombozyten in allen Methoden Schwankungen, deren Ursache sich nicht immer eindeutig nachvollziehen ließ. Davon waren Experimente mit LA- und CB-MSK stärker betroffen als jene mit BM-MSK.

Primär kann die hohe Schwankungsbreite der Daten sicherlich durch individuelle Spender (sowohl der MSC als auch der Thrombozyten) erklärt werden. Eine häufige Ursache solcher Schwankungen (unabhängig von den MSC) ist die Labilität der Thrombozyten. Neben der generellen spenderabhängigen Variationen ihrer Eigenschaften können vor allem physikalische Umstände das Verhalten der Plättchen beeinflussen. Dazu gehören u.a. zu starke Stauung bei der Blutentnahme oder starkes Schütteln der Probe (Michelson, 2006).

4.1.1 Durchflusszytometrie und Impedanzaggregometrie

Die Durchflusszytometrie konnte bereits in der Vergangenheit Zell-Zell Interaktionen nachweisen. Dabei konnten neben Einflüssen anderer Zellen auf Thrombozyten auch Aggregate von Thrombozyten mit anderen Zellarten, beispielsweise endothelialen Vorläuferzellen, Monozyten oder Neutrophilen, dargestellt werden (Abou-Saleh et al., 2009; Barnard et al., 2005).

Auch in den Versuchen dieser Arbeit erwies sich die Durchflusszytometrie als geeignetes Mittel, um Thrombozytenaktivierung generell und insbesondere auch in Anwesenheit anderer Zellen analysieren zu können, was sich in der erfolgreichen Anwendung der Kontrollen bestätigte (s.o.). Eine Schwäche der Messungen mit der Durchflusszytometrie ist dagegen die unvollständige Widerspiegelung der tatsächlichen Verhältnisse im Vollblut durch die Untersuchung von PRP (vgl. 4.1.2).

Die Impedanzaggregometrie dagegen konnte diese Effekte nicht wiedergeben. Unabhängig von der zugesetzten Zellart verringerte sich in allen Versuchen der Impedanzaggregometrie dosisabhängig die gemessene Impedanz und damit die Thrombozytenaggregation. HeLa Zellen, die zu starker Thrombozytenaktivierung in der Durchflusszytometrie und auch Mikroskopie geführt hatten, resultierten ebenso in einer verringerten Aggregation wie die auch im FACS inhibierend wirkenden BM-, LA-MSK und HUVEC. Aus diesen Ergebnissen lässt sich die Vermutung ableiten, dass die Impedanzaggregometrie nicht geeignet ist, zellvermittelte Effekte darzustellen.

Im Vergleich zur Durchflusszytometrie wird hierbei allerdings ein auf Vollblut basierendes Verfahren angewandt. Mögliche Ursachen der reduzierten Aggregation von Plättchen um die Elektroden wären beispielsweise eine mechanische Verdrängung von Plättchen durch die zugefügten Zellen bei hohen Zellzahlen, was theoretisch jedoch durch die in die Multiplate® Tubes integrierten magnetischen Rührer verhindert werden sollte. Diese Hypothese würde auch die Dosis-Korrelation erklären.

Eine andere Erklärung wäre eine starke Aggregation bzw. Aggregatbildung der Plättchen mit den zugesetzten Zellen selbst, wodurch Thrombozyten möglicherweise verbraucht würden. Allerdings ließen sich sowohl in den durchflusszytometrischen Experimenten als auch mikroskopisch keine Aggregate aus Plättchen und MSC/HUVEC/HeLa Zellen nachweisen. Es lässt sich aber nicht ausschließen, dass eine Aggregation in Vollblutproben erfolgt, nicht aber im für das FACS und für die Mikroskopie eingesetzten PRP. Auch einzelne Versuche, die Impedanzmessung direkt nach Zugabe von HeLa Zellen ohne Inkubation zu starten, um eine mögliche direkte Aktivierung und Aggregation der Plättchen während der „blinden“ Inkubationsphase zu sehen, blieben ergebnislos.

Demgegenüber steht ein Bericht von Seyfert et al., der eine negative Korrelation der Leukozytenanzahl mit der Thrombozytenaggregation in der Turbimetrie nachweist, jedoch keinen Einfluss der Leukozytenzahl auf die Impedanzaggregometrie zeigt (Seyfert et al., 2007), wodurch sich keine Behinderung der Messung durch die erhöhte Zellzahl nachweisen lässt. Es existiert jedoch keine weitere Literatur, die explizit den direkten Einfluss einer Zellpopulation auf Thrombozyten im Multiplate untersucht.

Das Multiplate hat sich in der Vergangenheit in der Untersuchung der Auswirkung löslicher Substanzen, insbesondere von vielerlei Medikamenten, auf die Thrombozytenaggregation, als sehr sensible Methode etabliert (Schedel et al., 2010; Schedel et al., 2011). Einen (stimulierenden) Einfluss externer Zellen damit darzustellen scheint jedoch aufgrund von den Ergebnissen dieser Arbeit nicht möglich zu sein.

Studien, die in der Vergangenheit aggregometrische Verfahren zur Untersuchung von Thrombozytenstimulation anwendeten, nutzten in der Regel die Lumiaggregometrie, bei der optische Dichtemessungen und/oder Verfahren zur Quantifizierung von Substanzen, die von aktivierten Plättchen freigesetzt werden, eingesetzt werden (Abou-Saleh et al., 2009; Alonso-Escolano et al., 2004; Manoharan et al., 2006).

Ein klarer Nachteil beider Methoden ist die Untersuchung der Thrombozyten im statischen Modell. Es ist bekannt, dass physikalische Faktoren wie Flussgeschwindigkeit und „shear stress“ einen relevanten Einfluss auf Thrombozyten ausüben, der weder in der Durchflusszytometrie noch in der Impedanzaggregometrie adäquat simuliert werden kann (Kroll et al., 1996).

4.1.2 PRP

Wie bereits erwähnt gilt es zu bedenken, dass für alle Versuche der Durchflusszytometrie und auch für die Fluoreszenzmikroskopie plättchenreiches Plasma benutzt wurde. Dieses bietet den Vorteil, dass Thrombozyten sehr spezifisch untersucht werden können, im Gegenzug allerdings den Nachteil, dass weitere wesentliche Blutbestandteile, allen voran die zellulären (Erythrozyten, Leukozyten) fehlen, die auch auf MSC einwirken und beispielsweise in einer entzündlichen Umgebung zu einer deutlich erhöhten Thrombogenität führen können (Moll et al., 2012). Natürlich interagieren auch die Plättchen selbst mit den roten und weißen Blutlinien. Diese Interaktionen werden durch die Anwendung von PRP ebenfalls nicht dargestellt. Ein häufig beschriebener Mechanismus ist beispielsweise die Aggregatbildung von Leukozyten mit Thrombozyten via CD62P bei thrombotischen oder inflammatorischen Vorgängen (Gerrits et al., 2016).

Bei der Herstellung des PRP entsteht weiterhin die Gefahr einer mechanischen Irritation der Thrombozyten durch die Zentrifugation, die eine potentielle Quelle artifizieller Aktivierung darstellt (Michelson, 2006). Die Mitführung der HeLa und HUVEC-Kontrollen legt allerdings nahe, dass die in meinen Experimenten gewonnenen Daten übertragbar sind.

4.2 Einfluss von MSC auf die Gerinnung

Ob und welche Auswirkungen MSC auf Thrombozyten haben, wurde anhand unterschiedlicher Ansatzpunkte untersucht. Zuerst wurde ein grundsätzlicher Einfluss von MSC unterschiedlicher Quellen geprüft. Danach wurden weitere Einflussfaktoren wie Zelldosis, MSC Passagezahl, Zellkulturmedium und schließlich noch Mechanismen der Interaktion untersucht, sowie die Expression einiger für die Gerinnung relevanter Gene analysiert.

Grundsätzlich gilt es zur Beurteilung des Einflusses der MSC eine rein mechanische Ursache auszuschließen. Eine inhibitorischer Effekt durch Behinderung der Verteilung des Agonisten kann aufgrund der stimulierenden Wirkung der HeLa Zellen ausgeschlossen werden.

4.2.1 Einfluss der unterschiedlichen Zellarten

Zuerst sollen die Auswirkungen der einzelnen Zellarten besprochen werden, anschließend weitere mögliche Einflussfaktoren und die untersuchten Mechanismen.

4.2.1.1 Kontrollen: HUVEC und HeLa Zellen

Wie erwartet, zeigte sich bei HUVEC als inhibierende Population eine Reduktion der Plättchenaktivierung (vgl. 3.1, 3.2). Häufig beschriebene Mechanismen beinhalten die CD62P- abhängige Interaktion von HUVEC mit Thrombozyten, die cyclooxygenaseabhängige Produktin von Prostaglandinen oder NO, sowie die Aktivität extrazellulärer Ectonucleasen (Fuentes and Palomo, 2015; van Hinsbergh, 2012). In den nicht dargestellten Experimenten mit Inhibierung von CD62P auf HUVEC zeigte sich keine Veränderung der Thrombozyteninhibierung, während andere Autoren einen Hauptteil der Wirkung von Endothelzellen CD62P zuschreiben (Abou-Saleh et al., 2015). Die Untersuchungen zeigen dagegen, eine deutliche, wenn auch nicht signifikante Tendenz die von HUVEC ausgehende Inhibierung der Thrombozytenaktivierung durch Blockade von CD73 abzuschwächen. Der extrazelluläre Adenosin Stoffwechsel scheint dementsprechend besonders unter statischen Bedingungen an der Inhibierung der Thrombozytenaktivierung durch HUVEC beteiligt zu sein.

HeLa Zellen resultierten dagegen in einer erhöhten Expression der Aktivierungsmarker, insbesondere bei unstimulierten Plättchen. Es ist mittlerweile in großem Umfang über die Interaktionen von Tumorzellen und Plättchen geforscht worden und es gilt als gesichert, dass die Aktivierung von Thrombozyten zur Metastasierung von soliden Tumoren beiträgt (Alonso-Escolano et al., 2004; Bastida et al., 1987; Broekman et al., 1991; Durante et al., 1992; Medina et al., 2012; Mehta, 1984; Menter et al., 2014). Auffällig war, dass die PAC-1 Bindung tendenziell stärker erhöht war, als die Degranulation mit Erhöhung von CD62P und CD63, während durch Zugabe externer Agonisten deren Nachweis stärker erhöht wurde als die PAC-1 Bindung.

Der GPIIb/IIIa Komplex gilt als wesentlich an der Abschirmung von Tumorzellen vor dem Immunsystem beteiligt, indem mithilfe von Fibrinbrücken GPIIb/IIIa Komplexe unterschiedlicher Thrombozyten quervernetzt werden und dadurch um die Tumorzellen herum ein Aggregat als „Schutzschirm“ vor dem Immunsystem bilden. CD62P ist dagegen wesentlich mit an der direkten Bindung zwischen Tumorzellen und Plättchen beteiligt (Stegner et al., 2014). Allerdings konnten auch unter dem Mikroskop nur Plättchenthromben, aber keine Aggregate aus Plättchen und Tumorzellen identifiziert werden.

Grundsätzlich decken sich die Ergebnisse mit den Kontrollzellen mit den Ergebnissen der Studien, die die Grundlage für die Wahl der HeLa und HUVEC Zellpopulationen als Kontrollen bildeten, und konnten sowohl eine Stimulation von Thrombozyten, als auch eine Inhibierung der Aktivierung darstellen.

4.2.1.2 BM-MSK

Von allen untersuchten Zellarten hatten BM-MSK die stabilste und stärkste inhibierende Wirkung auf Thrombozytenaktivierung, sogar stärker als HUVEC. Das zeigte sich in den Ausgangsversuchen mit einer Zelldosis ebenso wie in den Dosisversuchen, in denen ein deutlicher Zusammenhang zwischen eingesetzter Zellzahl und MFI Reduzierung zu sehen war (statistisch nicht quantifiziert). Die anti-koagulatorische Wirkung von BM-MSK wurde in Bezug auf verringerte Thrombozytenaktivierung im BM-MSK Graft Modell berichtet, sowie in der Verhinderung einer disseminierten intravasalen Koagulation (Hashi et al., 2007; Wang

et al., 2012a), was die Ergebnisse dieser Arbeit, wonach BM-MSC die Aktivierung von Thrombozyten stark hemmen, unterstützt.

Auf ruhende Plättchen hatten BM-MSC keinerlei Effekt. Passend dazu zeigte sich auch in einigen Tiermodellen mit Mäusen und Schweinen eine geringe oder gar keine Embolierate nach der BM-MSC Applikation (Makela et al., 2015; Shiratsuki et al., 2015). Es finden sich jedoch ebenso widersprüchliche Untersuchungen, die den raschen Verbrauch und die Aggregation von Thrombozyten, möglicherweise aufgrund von Kollagenen auf der BM-MSC Oberfläche, beschreiben (Moll et al., 2012). Die mikroskopische Beurteilung der mit MSC inkubierten Plättchen (vgl. 3.2) konnte diese Ergebnisse nicht bestätigen. Möglicherweise sind also noch weitere Voraussetzungen wie eine „Stimulierung“ der MSC durch andere Bestandteile des Fremdbluts notwendig um eine Thrombozytenaktivierung zu initiieren. Beschrieben werden unter anderem eine pro-inflammatorische Mikroumgebung oder späte MSC Zellpassagen (größer als 5) (vgl. 4.2.2, 4.3) (Moll et al., 2012)

Die beschriebenen pro-koagulatorischen Eigenschaften der BM-MSC, die unter anderem zu myokardialen Infarkten und Lungenembolien führten (Vulliet et al., 2004), bestätigten sich in Bezug auf Thrombozyten nicht. Da jedoch TF als hauptsächlich verantwortlich gilt, müssen Plättchen nicht zwangsweise mitbetroffen sein (Gleeson et al., 2015; Tatsumi et al., 2013). Tatsächlich, wie auch bei allen anderen MSC-Populationen, war in der RT-qPCR die Expression von TF im Vergleich zu den Endothelpopulationen deutlich stärker exprimiert, und auch verglichen mit MSC anderer Herkunft zeigten BM-MSC die stärkste Expression (vgl. 3.4). Diesen Ergebnissen folgend sind therapeutische Effekte von BM-MSC bei Blutungen möglicherweise neben der Aktivierung der plasmatischen Gerinnung eher auf deren trophische Eigenschaften im Sinne einer Unterstützung der Wundheilung zurückzuführen. In einem Fallreport, in dem über schnelles Sistieren einer ansonsten therapierefraktären gastrointestinalen Blutung berichtet wird, wird aufgrund des zügigen Effekts außerdem die Vermutung geäußert, dass MSC eine Vasokonstriktion bewirken könnten (Ringden and Leblanc, 2011). Den Wundverschluss durch Plättchenaggregation scheinen sie dagegen nicht zu verstärken.

Folglich können ein hauptsächlich die plasmatische Gerinnung verstärkender Einfluss von BM-MSC angenommen werden, während der zelluläre Aspekt in der Ruhesituation unbeeinflusst bleibt und die (überschießende) Aktivierung sogar gehemmt wird.

4.2.1.3 LA-MSC

Insgesamt gelten die Eigenschaften von LA- und BM-MSC als grundsätzlich weitgehend übereinstimmend. Dazu zählen neben den von der ISCT definierten immunphänotypischen Markern (s. 1.3.1) das Differenzierungspotential in Fett-, Knorpel- und Knochengewebe (Karagianni et al., 2013) sowie die immunmodulatorischen Eigenschaften, beispielsweise die Suppression der T-Zell Modulation (Heo et al., 2016; Jin et al., 2013; Mattar and Bieback, 2015). Im Gegensatz dazu unterscheiden sich CB-MSC von LA- und BM MSC in einigen Aspekten (s. 1.3.3, 4.2.1.4) Ein kürzlich in der Arbeitsgruppe verfasstes Review konnte sogar ein Überwiegen der immunsuppressiven Eigenschaften der LA-MSC gegenüber den BM-MSC in mehreren Studien feststellen (Mattar and Bieback, 2015).

Aufgrund der vorliegenden Berichte über pulmonale Thromboembolien nach systemischer LA-MSC Applikation bei Menschen (Jung et al., 2013) und über erhöhte Embolieraten im Tierversuch verglichen mit BM-MSC war der Einfluss von LA-MSC

auf Thrombozyten besonders interessant. Die verglichen mit BM-MSc hohen Embolieraten wurden dabei mithilfe diverser in vitro Verfahren auf eine höhere TF Expression in LA-MSc zurückgeführt (Shiratsuki et al., 2015). Auch in der eigenen Arbeitsgruppe wurden bereits Embolien bei Mäusen nach LA-MSc Applikation festgestellt (Dreher et al., 2013).

In den Versuchen mit Thrombozyten fanden sich ähnliche Ergebnisse wie bei den BM-MSc: LA-MSc führten zu einer ausgeprägten Inhibition der Agonisten-induzierten Aktivierung, wobei diese Wirkung tendenziell weniger stabil nachzuweisen war als bei den BM-MSc. In der Durchflusszytometrie waren davon alle getesteten Marker gleichmäßig betroffen. In den Dosisversuchen fand sich im Mittel kein Zusammenhang zwischen steigenden Zellzahlen und Inhibition der Aktivierung. Eine eindeutige Zuordnung dieser Beobachtung zu einzelnen Spendern oder bestimmten Faktoren war jedoch nicht möglich, spätere Passagen des gleichen Spenders zeigten dosisabhängige Plättcheninhibition, wenn bei vorhergegangenen Versuchen diese nicht zu beobachten gewesen war.

Auf ruhende Plättchen hatten die LA-MSc keine aktivierende Auswirkung, was eine intrinsische plättchenaktivierende Wirkung der LA-MSc ausschließen lässt.

Ebenfalls wie bei BM-MSc ließ sich in der PCR eine erhöhte TF Expression verglichen zu den endothelialen Zellreihen nachweisen, was auch hier die Bedeutung von TF als vermutlich wesentlichen pro-koagulatorischen Aspekt der MSc unterstützt. Interessanterweise war die Expressionsstärke von TF in LA-MSc, die in FCS kultiviert worden waren, vergleichbar mit der von BM-MSc (ebenfalls aus FCS). LA-MSc aus humanem Kulturmedium zeigten dagegen eine geringere TF Expression (vgl. 4.2.3).

So kann zusammenfassend basierend auf den Daten dieser Arbeit ebenso wie bei BM-MSc, nicht von einer erhöhten Thrombosegefahr durch LA-MSc aufgrund von Plättchenaktivierung ausgegangen werden, was sich in das Bild der hohen Übereinstimmung zwischen LA- und BM-MSc einfügt. Stattdessen inhibieren auch LA-MSc die Aktivierung von Thrombozyten.

4.2.1.4 CB-MSc

Im Vergleich zu BM- und LA-MSc auffällig waren dagegen CB-MSc, die ein ambivalentes Bild zeigten.

Während BM- und LA-MSc ruhende Thrombozyten nicht beeinflussten waren die CB-MSc die einzige Population (neben den Tumorzellen), die ruhende Thrombozyten tatsächlich in einem Ausmaß aktivieren konnten, das mit der von Agonisten ausgelösten Aktivierung vergleichbar war. Diese Ergebnisse passen zu den Berichten über die erhöhten hämostatischen Eigenschaften von MSc aus perinatalen Geweben im Vergleich zu MSc aus anderen Quellen. Dabei wurden vornehmlich die plasmatische Gerinnung betreffende Faktoren identifiziert. Als hauptverantwortlich gilt TF, zusammen mit einer im Vergleich zu anderen MSc nicht vorhandenen Expression der antikoagulatorischen Prostacyclin Synthase. An Thrombozyten betreffenden Faktoren wurden die endotheliale und induzierbare Stickstoffsynthase, sowie der von Willebrandt Faktor untersucht, die alle im Vergleich zu den anderen Genen sehr gering exprimiert wurden (Moll et al., 2015).

Allerdings variierten die Ergebnisse stark zwischen den Einzelexperimenten, was auf eine inhomogene Zellpopulation oder das Vorliegen von mehreren unterschiedlichen Zelltypen innerhalb der CB-MSc zurückzuführen sein könnte. In früheren Arbeiten

zeigte sich bereits, dass unterschiedliche Wachstumsmuster bei den kultivierten MSC vorliegen können: konfluentes oder clusterartiges Wachstum (Bieback and Netsch, 2015). Es gibt weiterhin Berichte über unterschiedliche Zellpopulationen innerhalb der CB-MSC, die mesenchymalen Stromazellen und die „uneingeschränkten somatischen Stammzellen“ (USSC). Sie unterscheiden sich von den klassischen CB-MSC vor allem durch ihre erhaltene Pluripotenz sowie die Abwesenheit einiger immunphänotypischer Marker wie CD50, CD62L, CD106, und HAS1 (Kögler et al., 2004; Kögler et al., 2006).

Gleichzeitig führte ihre Anwesenheit bei Stimulation insgesamt jedoch auch zu einer signifikanten Reduktion der Aktivierungsparameter. Die Zellzahl korrelierte aber nicht mit dem Ausmaß der Reduktion der Thrombozytenaktivierung. Diese Beobachtung fügt sich in das heterogene Bild der CB-MSC ein, die sich auch in anderen basalen Merkmalen wie Differenzierbarkeit und Markerexpression von anderen MSC Arten unterscheiden (Kern et al., 2006; Wegmeyer et al., 2013). Dass MSC aus perinatalen Geweben eine stärkere hämostatische Potenz als andere MSC haben, wurde auch in der zuvor erwähnten Studie von Moll et al. berichtet (Moll et al., 2015).

Im Gegensatz dazu fanden sich in den PCR Versuchen bei CB-MSC signifikant niedrigere Mengen an PAI als bei ECB, was eher für einen anti-thrombotischen Einfluss auf die plasmatische Gerinnung spricht.

Außerdem zeigten CB-MSC eine geringere Expression von TF als BM-MSC und LA-MSC, die allerdings immer noch deutlich höher war, als die der endothelialen Zelllinien.

Die Ergebnisse der CB-MSC sind sowohl mit Hinblick auf die plasmatische als auch auf die zelluläre Gerinnung ambivalent. Entgegen der beschriebenen höheren hämostatischen Potenz von perinatalen MSC verglichen mit BM-MSC finden sich niedrigere Expressionsraten an pro-koagulatorischen Proteinen.

Ebenso war die Wirkung auf Thrombozyten nicht eindeutig, da neben der Hemmung der Aktivierung gleichzeitig eine Stimulation ruhender Thrombozyten möglich war.

4.2.2 MSC Passagierung

Ein häufig genannter Einflussfaktor auf diverse MSC Eigenschaften wie Zellvolumen, aber auch auf die Expression vieler Gene ist die Anzahl der Passagierungen seit der Isolation (Bieback et al., 2012a; Mamidi et al., 2012; Moll et al., 2015; Moll et al., 2012). Das Design der Experimente wurde so gewählt, MSC zu testen, die für die klinische Anwendung verwendet werden könnten. Es besteht mittlerweile ein Konsens, dass aufgrund der replikativen Alterung, der MSC unterliegen, nur noch Zellen transplantiert werden sollten, die max. 15 kumulative Verdoppelungen (in diesem Falle etwa 4 Passagen) kultiviert wurden (Prockop et al., 2010).

Bezüglich unterschiedlicher Passagezahlen ließ sich keine signifikante Differenz feststellen. Ein bis zwei Passagen später eingesetzte MSC konnten die gleichen, in einigen Fällen stärkere inhibitorische Effekte bewirken, als die früheren Passagen. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass die ursächlichen Mechanismen konstitutiv in MSC vorhanden sind und unabhängig von der ex vivo Kultur erhalten bleiben. Allerdings werden in Untersuchungen der Veränderung von MSC Eigenschaften im Zuge des Passagierens häufig deutlich größere Sprünge untersucht, bspw. Passage 3 und 10 (Moll et al., 2015) oder 2 bis 6 (Di Battista et al., 2014). Dazu kommt noch die sehr kleine Probenzahl mit n=2-3/Passage, die bei größeren Schwankungen zwischen einzelnen Experimenten und dazu möglicherweise

unterschiedlichen Thrombozytenspendern zu gering sein könnte, um sicher einen Einfluss ausschließen oder nachweisen zu können.

4.2.3 Vergleich der MSC Zellkulturmedien

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung von MSC in Zellkulturmedium mit ausschließlich humanen Zusätzen im Vergleich zur Kultur in FCS Medium deren Eigenschaften beeinflusst. In humanem Serum kultivierte LA-MSCs embolisierten im Tiermodell weniger und adhärten weniger an Proteine der extrazellulären Matrix und Endothelzellen (Dreher et al., 2013). Auch auf der Transkriptions- und Proteinebene konnte eine verringerte Expression von Adhäsionsmolekülen bei MSC, die Medium mit humanen Zusätzen kultiviert worden waren, gezeigt werden (Bieback et al., 2010).

In den beiden getesteten LA-MSCs aus unterschiedlichen Kulturmedien zeigte sich kein Unterschied bezüglich ihrer Wirkung auf die Thrombozytenaktivierung. Die Wirkung auf alle in der Durchflusszytometrie getesteten Marker entsprach sich weitestgehend in der Tendenz und in der Stärke. Nur für die PAC-1 Bindung zeigte sich bei einem Spender ein deutlicher Unterschied zwischen den unterschiedlichen Kulturmedien.

In der PCR fanden sich dagegen keine signifikanten, aber deutliche tendenzielle Unterschiede zwischen FCS- und AB- kultivierten LA-MSCs. Diese fanden sich ausgeprägt in der stärkeren Expression des pro-koagulatorischen TF in FCS kultivierten MSC, ebenso wie der anti-koagulatorisch wirkenden PLAT, PLAU, TFPI2 und PLG. Nur TFPI1 war in den FCS kultivierten MSC eher niedriger exprimiert. Die generelle Tendenz, dass die meisten Gene in FCS-kultivierten MSC stärker exprimiert werden deckt sich mit früheren Untersuchungen (Bieback et al., 2010). In den Experimenten dieser Arbeit waren sowohl pro- als auch anti-koagulatorische Gene betroffen, am auffälligsten war der Unterschied für den stark pro-koagulatorischen TF. Diesbezüglich legen frühere Untersuchungen ein Überwiegen der pro-koagulatorischen Gene nahe, wodurch erhöhte Zelladhäsion und Embolisierung verursacht werden (Bieback et al., 2010; Dreher et al., 2013).

In Anbetracht der sonst übereinstimmenden Ergebnisse kann nicht von einem Einfluss des Kulturmediums auf die Wirkung von MSC auf Thrombozyten ausgegangen werden. Die Expression von Genen, die die plasmatische Gerinnung beeinflussen, scheint dagegen höher in MSC, die mit FCS kultiviert worden sind.

4.2.4 MSC-Thrombozytenaggregate

Bei der Aktivierung von Plättchen durch andere Zellen wird häufig von einer Aggregation der Populationen miteinander berichtet. Aggregate zwischen Leukozyten und Thrombozyten werden beispielsweise im Rahmen eines akuten Koronarsyndroms beschrieben (Faraday et al., 2001). Tumorzellen ummanteln sich mit aggregierten Plättchen um sich dem Zugriff des Immunsystems zu entziehen (Bastida et al., 1987; Helland et al., 1997; Mehta, 1984; Stegner et al., 2014).

Daher wurden in der Durchflusszytometrie und der Fluoreszenzmikroskopie ebenfalls MSC-Plättchenaggregate gesucht. Da MSC die Thrombozytenaktivierung verringert hatten war keine Aggregation zu erwarten.

In der Durchflusszytometrie zeigte sich nach Stimulation von Thrombozyten alleine eine typische Veränderung der Population von einer wolkigen zu einer linearen Konfiguration mit steigendem FSC und steigender CD41 Intensität entsprechend einer Aggregation der Thrombozyten untereinander.

MSC-Plättchen Aggregate waren dagegen, wie erwartet, nicht nachzuweisen. In der MSC Population war keine erhöhte CD41 Intensität als Korrelat für die Anwesenheit von Plättchentromben zu erkennen. Passend dazu waren in der Fluoreszenzmikroskopie ebenfalls keine Aggregate und auch keine an MSC anhaftende Plättchen zu sehen.

Allerdings konnten auch keine Aggregate aus Thrombozyten und Tumorzellen nachgewiesen werden. Es ließ sich ausschließlich eine starke Aggregation der Plättchen selbst untereinander darstellen. Möglicherweise kommt dem „Zusammenpressen“ von Thrombozyten beispielsweise mit Tumorzellen durch den Blutfluss eine wesentliche Funktion bei deren Aggregation zuteil. Scherstress alleine bewirkt u.a. eine Hochregulation des zur primären Aggregation notwendigen CD62P (Hu et al., 2003) und schafft möglicherweise die Voraussetzung für eine ausreichend lange und enge Interaktion der Thrombozyten mit den Tumorzellen. Die Aggregation der Thrombozyten untereinander, die hauptsächlich durch die GPIIb/IIIa Quervernetzung via Fibrin erfolgt war dagegen nach HeLa Zugabe stark ausgeprägt (vgl. Abb. 21-24).

4.2.5 Mechanismen der Interaktion

4.2.5.1 Agonisten und Aktivierungsmarker

Für die durchflusszytometrische Messung wurde ein Mehrfarbansatz gewählt, um vier Oberflächenmoleküle parallel zu untersuchen, von denen drei aktivierungsabhängig nachweisbar sind und über jeweils unterschiedliche Wege auf der Zelloberfläche nachweisbar werden (vgl. 2.6). Es bestand die Frage, ob alle Aktivierungsparameter der Thrombozyten in gleicher Weise durch MSC beeinflusst werden.

Die Beeinflussung einzelner Marker wurde vor allem im Zusammenhang mit seltenen Erbkrankheiten beschrieben. Bei der Glanzmann-Thrombasthenie ist die PAC-1 Bindung weitestgehend verhindert. Die alpha Storage-pool-disease ist eine selektive Erkrankung der alpha-Granula, wodurch die CD62P Translokation auf die Thrombozytenoberfläche nach Aktivierung beeinträchtigt ist (van Velzen et al., 2012). In den durchgeführten Versuchen war CD62P am stärksten durch die Anwesenheit weiterer Zellen beeinflusst und reagierte am stabilsten auf Dosisinflüsse. Im Vergleich dazu war der aktivierte GPIIb/IIIa Komplex vor allem auf stimulatorische Einflüsse anderer Zellen sensibler. CD63 verhielt sich regelhaft wie CD62P, allerdings war die Stimulierung im Sinne hoher MFI Werte nicht immer gegeben und daher die Effekte weniger eindrucksvoll.

Ein weitgehend übereinstimmendes Verhalten der Expressionsmarker, wie in den hier erfolgten Versuchen, wird häufig berichtet. Nach Aspirin- oder Statineinnahme ebenso wie nach Alkoholgenuss zeigten die drei Marker gleichläufige Veränderungen (McKenzie et al., 2002; McKenzie et al., 2003; Nomura et al., 2004).

Wie die anderen genannten externen Faktoren inhibieren also auch MSC die Thrombozytenaktivierung ohne spezifische Wirkung auf einen der analysierten Marker.

Ähnlich wie die getesteten Marker über unterschiedliche Mechanismen auf der Zelloberfläche nachweisbar sind aktivieren die eingesetzten Agonisten TRAP, ADP und U46619 Thrombozyten über jeweils unterschiedliche Rezeptoren und triggern dadurch initial unterschiedliche Aktivierungspfade.

Bei den Versuchen mit unterschiedlichen Konzentrationen von TRAP und ADP fiel die Stimulation besonders mit ADP oft unzureichend aus. Auch die höhere Konzentration von ADP verbesserte diese Problematik nicht, die Stimulation wurde eher noch schwächer. In den späteren Versuchsreihen zeigte sich dagegen eine stabilere Stimulationsstärke auch bei ADP. Die eingesetzten ADP Konzentrationen basierten auf gängig eingesetzten Mengen, daher könnte nur eine Unzulänglichkeit in dem eingesetzten Reagenz ursächlich sein (van Velzen et al., 2012).

Die Stimulation der Thrombozyten mit U46619 war von der LA-MSC verursachten Hemmung tendenziell am wenigsten betroffen. ADP und TRAP verursachte Hemmungen entsprachen sich weitgehend, wenn auch in diesen Experimenten die durch TRAP verursachte Hemmung inkonsistenter verringert war als in Früheren (vgl. 3.1.3).

Das Ergebnis, dass alle Thrombozytenaktivierungswege von einer Inhibition mehr oder weniger gleichermaßen betroffen waren, findet sich in diversen anderen Untersuchungen, u.a. bei Blockade einzelner Rezeptoren wie der P2Y- Rezeptoren. Diese Rezeptoren sind zwar hauptverantwortlich für die Bindung von ADP, während die Aktivierung über andere Agonisten nicht beeinflusst sein sollte (vgl. 2.6.1), eine starke Blockade führt aber trotzdem zur vollständigen Inhibierung der Thrombozytenaggregation auch durch andere Agonisten wie U46619 oder Kollagen (Armstrong et al., 2011).

Die hier durchgeführte Untersuchung zeigt, dass der Einfluss von MSC auf Thrombozyten nicht auf spezifische Aktivierungswege reduziert ist und die unterschiedlichen Funktionsmarker der Thrombozyten gleichermaßen betrifft.

4.2.5.2 P-Selectin

Ein häufig beschriebener Mechanismus für die Beeinflussung von Thrombozytenaktivierung ist die direkte Zell-Plättchen Interaktionen via CD62P (Abou-Saleh et al., 2015; Abou-Saleh et al., 2009; de Bruijne-Admiraal et al., 1992; Gong et al., 2012). Die Einflussnahme auf Thrombozyten über CD62P ist ein sehr gängiger Pfad, über den Endothelzellen Thrombozyten hemmen (Abou-Saleh et al., 2015), Tumorzellen Thrombozyten aktivieren (Coupland and Parish, 2014) oder Leukozyten mit Thrombozyten aggregieren (Gerrits et al., 2016).

Rüster et al. (2006) beschreiben die Interaktion von MSC mit dem Endothel im Zuge der Extravasation über CD62P- abhängige Mechanismen unter Fluss. CD62P Anwesenheit führte dabei zum „Rolling“ von MSC. „Rolling“ ist einer der ersten Schritte der Extravasation und ein wesentlicher Bestandteil der Bindung von Zellen an die Gefäßwand, um diese zu ermöglichen. Eine Blockade von CD62P auf Endothelzellen unterdrückte den Vorgang. Typische CD62P bindende Proteine wie PSGL-1 oder CD24 konnten dabei allerdings nicht auf MSC nachgewiesen werden. Passend dazu berichten Brooke et al. (2008) ebenfalls über das Fehlen von CD62P- bindenden Proteinen wie PSGL-1 oder sialyl Lewis X Kohlenhydraten auf MSC und im Widerspruch zu Rüster et al. auch über die fehlende Fähigkeit von MSC funktional an CD62P zu binden.

Die hier durchgeführte Blockade von CD62P auf Thrombozyten durch AK-4 führte nicht zu einer Reduktion der durch MSC verursachten Inhibierung. Daher kann dieser Mechanismus für die erhaltenen Ergebnisse in weitestgehendem Einklang mit den erwähnten Studien ausgeschlossen werden. Die beschriebene Interaktion von MSC mit dem Endothel über CD62P unterliegt ungeklärten Mechanismen und scheint für

die Wechselwirkung von MSC und Thrombozyten unter den experimentellen Bedingungen dieser Arbeit nicht relevant zu sein.

4.2.5.3 COX

Ein weiterhin häufig beobachteter, Thrombozyten hemmender Einfluss ist die hohe Aktivität der COX in anderen Zellen (Abou-Saleh et al., 2009).

Nach Kultur von MSC mit Indomethacin, einem COX Inhibitor, konnte kein Effekt auf die inhibierende Wirkung von BM- und LA-MSC beobachtet werden. Aufgrund der Ergebnisse aus diesen Versuchen kann eine Cyclooxygenase bedingte Inhibierung der Thrombozytenaktivierung durch MSC ausgeschlossen werden. Dazu kommt, dass bei NO, bzw. PGI₂ abhängiger Wirkung Effekte der Überstände zu erwarten gewesen wären, die sich jedoch in früheren Experimenten als völlig gleichwertig mit unkonditioniertem Zellkulturmedium dargestellt hatten (vgl. 1.5). Dementsprechend passen die Ergebnisse der Indomethacin kultivierten MSC zu denen aus den vorangegangenen Experimenten. Weiterhin werden diese Ergebnisse durch Untersuchungen gestützt, in denen nur eine sehr geringe Expression von anderen Genen, die zur Produktion von löslichen gerinnungshemmenden Substanzen wie NO führen, gefunden wurde (Moll et al., 2012)

4.2.5.4 CD39, CD73, A2A Rezeptor

Weitere, direkt zell-abhängige Mechanismen beinhalten Einflüsse auf den extrazellulären Adenosin Metabolismus. Dieser ist relevant an immunsuppressiven und hämostatischen Vorgängen beteiligt (Chen et al., 2016; Fuentes and Palomo, 2015; Kerkelä et al., 2016).

Extrazelluläres ATP wird unter anderem von aktivierten Plättchen oder Endothelzellen freigesetzt. Die Umwandlung von pro-koagulatorischem ATP und ADP in anti-koagulatorisches AMP und Adenosin erfolgt durch die membrangebundenen Enzyme CD39 und CD73, die beispielsweise auf Endothelzellen vorhanden sind (Colgan et al., 2006; Fuentes and Palomo, 2015).

Die Messungen zeigten keine Nachweisbarkeit von CD39 auf MSC aller Quellen sowie HUVEC und HeLa. Entsprechende Ergebnisse bzgl. CD39 auf MSC liefern die Untersuchungen anderer Autoren (Chen et al., 2016; Kerkelä et al., 2016; Sundin et al., 2011). Es besteht aber die Möglichkeit einer Hochregulation von CD39 auf der MSC Oberfläche in Abhängigkeit von deren Aktivierungszustand. Dazu können beispielsweise die Überstände aktivierter T-Zellen führen (Saldanha-Araujo et al., 2011). Bei Thrombozyten war die CD39 Expression dagegen deutlich positiv (vgl. Abb. 19)

Die Anwesenheit von CD39 im Versuchsaufbau begründete sich also mindestens auf den Thrombozyten. Weiterhin könnte CD39 beispielsweise durch Thrombozyten auf MSC induziert werden und es besteht die Annahme, dass auch lösliches CD39 aus dem Serum einen Einfluss auf den extrazellulären Purinmetabolismus besitzt (Atkinson et al., 2006; Yegutkin et al., 2012).

Da durch die Hemmung von CD39 der ATP und ADP Abbau zu AMP blockiert werden sollte, wäre – sollte dieser Mechanismus mitverantwortlich sein - eine Aufhebung der ausgelösten Inhibition aller Zellarten zu erwarten gewesen. Der Hemmstoff von CD39, POM-1, (Smith et al., 2016; Yegutkin et al., 2012) selbst reduzierte die Thrombozytenaktivierung entgegen der Erwartungen bereits signifikant (vgl. Abb. 20).

Im Zusammenspiel mit MSC, HUVEC und HeLa Zellen wurden deren jeweilige Einflüsse nicht aufgehoben. Die Aktivierung der Thrombozyten wurde nach POM-1 Zugabe stets deutlich reduziert. Es ließ sich keinerlei Zusammenhang zwischen POM-1 Anwendung und der Wirkung der unterschiedlichen Zelltypen erkennen, was zu den vorhergegangenen Ergebnissen, die keinen Nachweis von CD39 auf allen Zellarten außer Thrombozyten erlaubten, passt.

Da POM-1 in allen Fällen, mit und ohne Zellen, die Aktivierung der Thrombozyten entgegen der Erwartungen stark reduzierte, lässt sich die Funktion des Enzyms CD39 im Zusammenhang mit dem Einfluss von MSC auf Thrombozyten nicht ausreichend beurteilen.

Die Wirkung des CD73 der MSC wurde bisher ebenfalls im Zusammenhang mit Immunsuppression, beispielsweise durch die Inhibition von T-Lymphozyten erwähnt (Chen et al., 2016; Kerkelä et al., 2016). CD73 ist selbst ein MSC-definierender Marker (Dominici et al., 2006). Auch in den hier durchgeführten Messungen war CD73 auf allen MSC stark positiv, gering positiv auf HUVEC und nicht nachweisbar auf HeLa Zellen (vgl. Abb. 19).

Die Blockade der Umwandlung von AMP zu Adenosin durch CD73 führte in den vorliegenden Experimenten tatsächlich zur Veränderung der Plättchen Inhibition durch LA-MSC. Der verminderte CD62P-Nachweis wurde durch AMP-CP teilweise aufgehoben. Interessanterweise wurde die reduzierte PAC-1 Bindung durch LA-MSC durch den AMP-CP Zusatz sogar über das ursprüngliche Maß bei TRAP Stimulation hinaus erhöht, was neben den LA-MSC auch bei HUVEC und den nicht inhibierenden HeLa Zellen der Fall war. Signifikant war das Ergebnis allerdings nur bei den MSC. CD73 wird in vielen Tumorzelllinien erhöht exprimiert, weshalb der Einfluss von AMP-CP auch bei HeLa Zellen denkbar war (Gao et al., 2014), jedoch aufgrund der geringen Nachweisbarkeit in den Versuchen überraschte. Möglicherweise ist aber diese geringe Aktivität zusammen mit der Aktivität von CD73 auf Thrombozyten ausreichend, um eine leichte Inhibition über einige CD73 Moleküle zu unterbinden (Castilhos et al., 2016) (vgl. Abb. 19). Insgesamt ist die Stärke der Auswirkung der CD73 Blockierung mit der Expressionsstärke von CD73 auf der Zelloberfläche vergleichbar: die größte Auswirkung war bei MSC zu finden, eine etwas geringere bei HUVEC und die schwächste Auswirkung bei HeLa Zellen.

Da das Reagenz AMP-CP alleine zu einer Reduktion der Thrombozytenaktivierung führte, lassen sich Vermutungen ableiten, warum die Anwesenheit von Zellen und AMP-CP zusammen umgekehrt zu einer verstärkten Aktivierung, bzw. Aufhebung der Inhibition über das ursprüngliche Maß hinaus, führten:

- (1) Die Umwandlung von AMP durch CD73 in Adenosin wird blockiert.
- (2) Es wird ein zusätzlicher Mechanismus in den Zellen durch AMP-CP getriggert, der die Thrombozytenaktivierung verstärkt.
- (3) Ein konstitutiv vorhandener Mechanismus, der stimulatorisch auf Plättchen wirkt, fällt nun mehr ins Gewicht, da die durch CD73 initiierte Plättchenhemmung durch AMP-CP reduziert wird.

Die erste beschriebene These (1) ist die Naheliegendste. Dafür spricht die deutliche Aufhebung der Inhibition durch LA-MSC. Dass dieser Mechanismus alleine für die Auswirkung von AMP-CP verantwortlich ist, gilt es jedoch aufgrund der Daten zu hinterfragen.

Zuerst ist es verwunderlich, dass die PAC-1 Bindung nach AMP-CP Zugabe in der Anwesenheit von Zellen teilweise deutlich über das ursprüngliche Ausmaß, das bei der Stimulation der Thrombozyten alleine erreicht wird, hinausgeht. Da die Wirkung

von AMP-CP auf die enzymatische Aktivität von CD73 als spezifisch beschrieben wird ist es unwahrscheinlich, dass ein zusätzlich aktivierender Mechanismus (2) durch AMP-CP in den Zellen getriggert wird (Monks and Fraser, 1988).

Es ließ sich jedoch bei unstimulierten Thrombozyten ebenfalls eine geringfügige Erhöhung der Aktivierung durch die Anwesenheit beinahe jeglicher Zellart feststellen. Diese mag mechanischer oder molekularer Genese sein (3). Ein denkbarer Effekt, der zur erhöhten PAC-1 Bindung führen könnte, wäre die mechanische Irritation der Thrombozyten durch die Anwesenheit der MSC und den dadurch erhöhten „shear stress“ (Kroll et al., 1996). In Kombination mit der Blockierung von CD73 könnte dieser Effekt nun deutlich stärker ins Gewicht fallen und dadurch bei fehlender CD73 induzierter Hemmung durch MSC und HUVEC eine Aktivierung über das ursprüngliche Ausmaß hinaus auf mechanischer Basis verursachen.

Es bleibt allerdings die Frage nach der Herkunft des von CD73 als Substrat verwendeten AMP. Da CD73 nur Monophosphate als Substrat verarbeiten kann (Mohlin et al., 2009) besteht nicht die Möglichkeit einer Produktion von AMP durch CD73 selbst.

Die Frage der Herkunft des AMP, das von MSC verarbeitet wird, wurde bereits von anderen Autoren im Zusammenhang mit der immunsuppressiven Wirkung von MSC untersucht. Kerkelä et al. beschreiben, dass CD39 auf aktivierten T-Zellen wesentlich zu der Bereitstellung von AMP beiträgt (Kerkelä et al., 2016). Andere Quellen berichten von einer zusätzlichen Hochregulation von CD39 auf MSC, die wiederum ebenfalls von aktivierten T-Zellen ausgelöst werden kann (Saldanha-Araujo et al., 2011).

Denkbar wäre primär eine Verarbeitung von ATP und ADP durch das auch hier nachgewiesene thrombozyteneigene CD39 (vgl. 3.1.7.2) zu AMP, dessen Aktivität extern beeinflussbar ist (Caiazza et al., 2016). Treibende Kraft wäre im Fall der MSC der erhöhte Umsatz von AMP zu Adenosin durch CD73 und das dadurch verschobene enzymatische Gleichgewicht von AMP zu Adenosin. Zwar wäre in diesem Fall theoretisch auch eine Erhöhung der Plättchenaktivierung nach CD39 Blockade zu erwarten gewesen, da der CD73 abhängige Mechanismus durch die Blockade weiter „upstream“ nicht mehr funktionieren sollte. Da jedoch POM-1 immer zu einer Reduktion der Thrombozytenaktivierung führte, sollte diese Möglichkeit eventuell in der Zukunft mit einem anderen Hemmstoff für CD39 erneut untersucht werden.

Die Wirkung von Adenosin wird u.a. über die Bindung an den A2A Rezeptor auf Plättchen vermittelt, wodurch cAMP als stark hemmende Substanz gebildet wird (Fuentes and Palomo, 2015). In der Folge ist bei Blockierung des A2A Rezeptors ebenfalls eine Reduzierung der MSC Wirkung zu erwarten. Zwar konnte für Versuche mit SCH 58261, möglicherweise aufgrund der geringen Probenanzahl, keine Signifikanz erreicht werden, eine Tendenz zur Erhöhung des PAC-1 und CD62P Nachweises ließ sich aber erkennen. Dazu kommt, dass neben dem A2A auch ein A2B Rezeptor für Adenosin auf den Thrombozyten vorhanden ist, der die gleiche Endstrecke vermittelt (Fuentes and Palomo, 2015). Somit wäre die Adenosin Bindung an Plättchen durch die spezifische Blockade des A2A Rezeptors durch SCH 58261 nur teilweise aufhebbar.

Insgesamt ließ sich somit eine Hemmung von Plättchen durch MSC aufgrund von CD73 nachweisen.

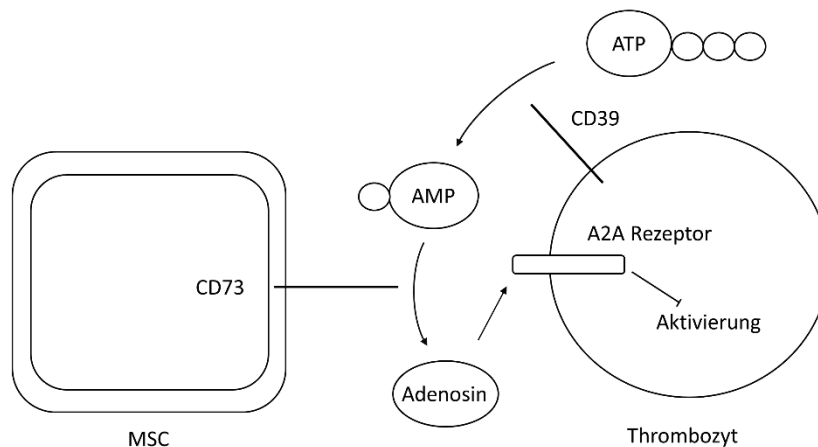


Abbildung 27: Möglicher Mechanismus, durch den MSC Thrombozyten inhibieren. Pro-thrombotisches ATP (und ADP) wird durch CD39 auf Thrombozyten zu anti-thrombotischem AMP dephosphoryliert. AMP wird durch CD73 von MSC zum ebenfalls anti-thrombotischen Adenosin dephosphoryliert, wodurch die Reaktion weiter angetrieben wird. Adenosin hemmt über den A2A Rezeptor die Aktivierung der Thrombozyten.

4.3 Schlussfolgerung & Ausblick

Die Gefahr thromboembolischer Ereignisse bei systemischer MSC Applikation wurde v.a. im Tiermodell vielfach beschrieben. Als Hauptauslöser wurden bisher hauptsächlich die Zellgröße sowie die hohe Expression von TF und die dadurch getriggerte plasmatische Gerinnung identifiziert.

Weitere Parameter, besonders physikalische Eigenschaften wie Größe oder Elastizität und Alter der eingesetzten Zellen konnten weiterhin als verantwortlich für die Embolisierung in Kapillaren identifiziert werden (Bieback et al., 2010; Dreher et al., 2013; Fischer et al., 2009; Gao et al., 2001; Moll et al., 2012; Vulliet et al., 2004; Zanetti et al., 2015). Auch die Umstände bei Entnahme der MSC könnten eine Rolle spielen (Acosta et al., 2013; Moll et al., 2015; Moll et al., 2012). Dazu bestätigen die Ergebnisse der -RT-qPCR eine vergleichsweise starke Expression von TF in allen MSC Populationen, was dessen Bedeutung weiter in den Vordergrund rückt.

Mit Hinblick auf die zelluläre Gerinnung konnten frühere Arbeiten zeigen, dass MSC Überstände keinen Einfluss auf Thrombozyten haben (Masterarbeit P. Netsch). Die vorliegende Untersuchung belegt einen inhibitorischen Einfluss von BM-, LA- und CB-MSC auf die Aktivierung von Thrombozyten, der durch CD73 der MSC Oberfläche vermittelt wird.

Diesen Ergebnissen folgend bestünde durch die reduzierte Thrombozytenaktivierung nach MSC Applikation umgekehrt allerdings möglicherweise ein erhöhtes Blutungsrisiko.

Theoretisch wäre in diesem Zusammenhang eine irreversible Thrombozytenhemmung durch die MSC wie etwa durch Acetylsalicylsäure zu bedenken, wodurch das Blutungsrisiko über einen längeren Zeitraum erhöht sein könnte. Das kann prinzipiell

zwar als unwahrscheinlich betrachtet werden, da MSC sich nur für ca. 24 Stunden (Eggenhofer et al., 2014) in der Zirkulation befinden und die Wirkung mit dem Verlassen der Zirkulation beendet sein sollte, trotzdem sollte diese Möglichkeit durch globale Gerinnungstests überprüft werden.

Da in keiner bisherigen klinischen Studie eine Blutungskomplikation nach MSC Applikation auftrat, ist trotz der hier nachgewiesenen Hemmung der Thrombozytenaktivierung durch MSC bisher nicht von einer klinisch relevanten Blutungsgefahr auszugehen (Bank et al., 2015; Lalu et al., 2012). Eine verzögerte Verschlusszeit von (neuen) Wunden wäre jedoch denkbar.

Im Gegensatz dazu beschreiben Moll et al. eine „instant blood mediated inflammatory reaction“ nach dem Kontakt von MSC mit Blut *in vitro*. Diese geht mit dem Verbrauch von Thrombozyten und Clot-Bildung nach MSC Applikation einher.

Im Chandler Loop Modell, das eine extrakorporale Zirkulation simuliert, war, entsprechend den Ergebnissen dieser Arbeit, kein Verbrauch von Thrombozyten nach der Exposition mit nativen MSC festzustellen. Die Stimulation von MSC durch eine Ko-Kultur mit aktivierten PBMC führte allerdings zu einem deutlich ansteigenden Thrombozytenverbrauch nach MSC Applikation im Chandler Loop (Moll et al., 2012). Die hier beschriebenen, hemmenden Eigenschaften beziehen sich auf unstimulierte MSC. Demgegenüber gilt es zu beachten, dass MSC häufig zur Therapie überschießender Immunreaktionen eingesetzt werden und dabei regelhaft in Kontakt zu aktivierten Immunzellen treten. Es ist bekannt, dass MSC ihre Eigenschaften im inflammatorischen Milieu verändern, wodurch auch der pro-koagulatorische TF verstärkt exprimiert wird (Moll et al., 2012). So ist eine Veränderung des Verhaltens mit Bezug auf Thrombozyten ebenfalls möglich. Mit Hinsicht auf solche Vorgänge sind weitere Versuche anzustreben, die MSC mit und ohne Kontakt zu stimulierten Immunzellen einbeziehen, und deren *in vitro* und *in vivo* Auswirkung auf die Thrombozytenstimulierung analysieren.

Eine Sonderrolle in dieser Arbeit nahmen CB-MSCs mit ihren sowohl aktivierenden als auch hemmenden Auswirkungen auf Thrombozyten ein. Der stark variable Effekt, könnte möglicherweise auf die beschriebene Möglichkeit unterschiedlicher Subklassen von CB-MSCs zurückzuführen sein (Bieback and Netsch, 2015; Kögler et al., 2004; Kögler et al., 2006).

In einer neueren Untersuchung, ebenfalls von Moll et al., wurden MSC aus perinatalen Geweben (Dezidua) auch als potenter bezüglich ihrer hämostatischen Eigenschaften im Vergleich zu BM-MSCs beschrieben, was allerdings ausschließlich auf die plasmatische Gerinnung, insbesondere TF bezogen war (Moll et al., 2015).

Sobald CB-MSCs in den Experimenten dieser Arbeit zu einer Thrombozytenaktivierung führten war der Effekt in der Durchflusszytometrie vergleichbar stark wie der der HeLa Zellen. Mikroskopisch ließ sich eine im Vergleich zu den Tumorzellen schwache Plättchenaggregation/ -adhäsion beobachten, deutlich stärker jedoch als bei BM-MSCs. Daher sollten die bisher nur bei LA-MSCs getesteten Aktivitäten von CD39 und CD73 auch bei CB-MSCs untersucht werden.

So gilt es CB-MSCs besonders kritisch mit Hinblick auf thromboembolische Ereignisse zu beobachten und deren Sicherheit im Vergleich zu den anderen MSC Populationen zu untersuchen oder umgekehrt deren hämostatisch höhere Potenz zu sichern.

Als wesentlich an der inhibierenden Wirkung von MSC auf Plättchen beteiligt konnte CD73 identifiziert werden. Die Funktion von CD73 auf MSC wurde bisher hauptsächlich im Zusammenhang mit ihren immunsuppressiven Fertigkeiten

beschrieben, der genaue Mechanismus ist allerdings noch nicht bekannt. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass CD73 depletierte Mäuse eine deutlich stärkere GvHD erleiden, als CD73 tragende Mäuse (Tsukamoto et al., 2012; Wang et al., 2013). Ein beschriebener, molekularer Mechanismus ist die Hemmung der T-Zell Proliferation durch Adenosin, das von CD73 der MSC produziert wurde (Chen et al., 2016; Kerkelä et al., 2016). Eine Wirkung des MSC CD73 auf die Gerinnung wurde bisher nicht untersucht, obwohl die wesentliche Funktion von CD73 für die Gerinnung bekannt ist (Colgan et al., 2006; Fuentes and Palomo, 2015).

Um die Ergebnisse dieser Arbeit zu festigen, empfehlen sich weitere Experimente mit unterschiedlichen Konzentrationen von AMP-CP, um eine vollständige Blockade von CD73 sicherzustellen, sowie die (z.B. chromatographische) Messung der ATP und Adenosin Konzentrationen, bzw. der Hydrolyse von ATP, ADP und AMP in den Proben mit und ohne MSC.

Die Inhibition von CD73 der MSC führte zu einer teilweise überschießenden Aktivierungsreaktion der Thrombozyten im Vergleich zur Aktivierung ohne MSC. Als Identifikationsmarker für MSC kann die CD73 Anwesenheit auf klinisch eingesetzten MSC aber als gesichert angenommen werden (Dominici et al., 2006). Daher gilt es bei der klinischen Applikation von MSC auch die CD39 Aktivität des Empfängers zu bedenken. Eine eingeschränkte Aktivität von CD39 würde die Bereitstellung von AMP beeinflussen und dadurch zu einem Mangel an CD73 Substrat führen, was wiederum ein erhöhtes Thromboembolierisiko durch die MSC bedingen könnte.

Da die Versuche mit POM-1 zur CD39 Inhibition die Thrombozytenaktivierung generell hemmten konnte die Auswirkung der CD39 Hemmung nicht bewertet werden. Die CD39 Aktivität sollte auf Plättchen, MSC und im Plasma selbst in unterschiedlichen Zuständen (MSC mit und ohne Thrombozyten, Thrombozyten stimuliert und unstimuliert) geprüft werden, um die Herkunft des CD73 Substrats AMP zu bestimmen. Ein Mangel an CD39 allein führt zur Dysregulation der Blutgerinnung mit Bildung von Mikrothromben und gleichzeitigen Blutungen (Enyoloji et al., 1999). Besonders häufig wird im entzündlichen Milieu im Rahmen von Abstoßungsreaktionen nach Transplantation, einer Hauptindikation für MSC (vgl. 1.3.5), von einem CD39 Verlust berichtet (Atkinson et al., 2006; Robson et al., 2005). Dies könnte ein wichtiger Kofaktor für die Sicherheit der MSC Applikation sein. Eine Überprüfung im Tiermodell mit CD39 Knock-out oder Überexpression wäre ein sinnvoller nächster Schritt.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit eine Hemmung der Thrombozytenaktivierung durch BM-, LA- und CB-MSC. CB-MSC scheinen aber auch eine gewisse aktivierende Wirkung zu besitzen.

Hauptfaktor für die induzierte Hemmung von Thrombozyten ist das Molekül CD73 der MSC Oberfläche.

Demgegenüber steht eine hohe Expression des pro-koagulatorischen TF in MSC verglichen zu endothelialen Zellreihen.

ZUSAMMENFASSUNG

Mesenchymale Stromazellen werden aufgrund ihrer multiplen Eigenschaften wie Immunsuppression, Differenzierungspotenzial oder trophischer Unterstützung beschädigter Gewebe vielfach in klinischen Studien angewandt. Bisher zeigten sich kaum relevante Nebenwirkungen der häufig systemisch applizierten Zellen. Demgegenüber stehen vor allem aus Tiermodellen stammende Berichte über die Häufung von Thromboembolien infolge der Verabreichung. Dazu kamen in den letzten Jahren einige Berichte über ähnliche Vorkommnisse beim Menschen. Als ursächlich für das thrombogene Potenzial wurde bisher vor allem Tissue factor identifiziert. Demgegenüber existieren wenige Untersuchungen, die sich mit den Implikationen von mesenchymalen Stromazellen auf die zelluläre Gerinnung befassen. Die Produktion löslicher Metabolite mit Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung durch mesenchymale Stromazellen konnten in früheren Versuchen bereits ausgeschlossen werden.

Um das thrombogene Risiko der Anwendung mesenchymaler Stromazellen weiterhin zu prüfen war es Ziel dieser Arbeit nach einem möglichen Einfluss von mesenchymalen Stromazellen aus unterschiedlichen Ursprungsgeweben (Knochenmark, Lipoaspirat und Nabelschnurblut) auf Thrombozyten zu suchen und zugrundeliegende Mechanismen aufzudecken.

Dazu wurde einerseits die Aktivierung der Thrombozyten nach aktiver Stimulation im Beisein von mesenchymalen Stromazellen bestimmt. Andererseits wurde die Aktivierung von ruhenden, mit mesenchymalen Stromazellen inkubierten Thrombozyten gemessen. Als Kontrollpopulation, die eine Plättchenaktivierung verursacht, wurden HeLa Tumorzellen eingesetzt. Als hemmende Kontrolle dienten humane Nabelschnurendothelzellen/HUVEC.

Die Quantifizierung der Plättchenaktivierung erfolgte in der Impedanzaggregometrie mit Vollblutproben und in der Durchflusszytometrie in plättchenreichem Plasma. Zusätzlich wurden die Effekte mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Zur Untersuchung zugrundeliegender Mechanismen wurden unterschiedliche Agonisten zur Thrombozytenstimulierung getestet (Thrombin Rezeptor-aktivierendes Peptid, Adenosin Diphosphat, U46619), sowie weitere bekannte zelluläre Mechanismen (Cyclooxygenase, P-Selectin, CD39, CD73) mit Auswirkung auf die Plättchenaktivierung, eingesetzt. Weiterhin wurde der Einfluss unterschiedlicher Zellpassagen, Zellkulturmedien (human versus xenogen) sowie die Möglichkeit einer Aggregatbildung aus MSC und Plättchen geprüft. Zusätzlich wurde die Expression einiger Gene mit Einfluss auf die plasmatische Gerinnung in MSC und weiteren Zellen in der quantitativen real-time Polymerasekettenreaktion gescreent.

Die Stimulation der Plättchen wurde unabhängig vom eingesetzten Agonist von allen eingesetzten MSC signifikant reduziert. Ruhende Plättchen wurden von MSC aus Knochenmark und Lipoaspirat nicht beeinträchtigt, während MSC aus Nabelschnurblut in einigen Fällen zu einer Aktivierung führten. Die Stromazellen aus Knochenmark zeigten dabei die stabilste hemmende Wirkung. Die Hemmung konnte auch in der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden. Stromazellen aus Nabelschnurblut zeigten mikroskopisch eine geringe Aggregation. Ein Einfluss von Passagezahl und Kulturmedium ließ sich nicht nachweisen, ebenso wenig eine Aggregatbildung aus Plättchen und Stromazellen.

Als ursächlich für die beobachtete Hemmung der Thrombozytenaktivierung konnten CD62P-bedingte Zell-Zell Interaktionen ausgeschlossen werden, genauso wie ein Cyclooxygenase-abhängiger Mechanismus.

Der extrazelluläre Adenosinstoffwechsel konnte dagegen als verantwortlich für die MSC induzierte Aktivierungshemmung identifiziert werden. CD39 konnte auf Thrombozyten, nicht aber auf den Stromazellen nachgewiesen werden. CD73 war stark auf den Stromazellen vertreten. Die Blockade von CD39 führte generell zu einer Reduktion der Aktivierung, sodass dessen Einfluss nicht abschließend geklärt ist. Die CD73- Blockade dagegen bewirkte eine signifikante Aufhebung der Plättchenhemmung durch Stromazellen aus Lipoaspirat. Die Blockade des Adenosinrezeptors A2A bewirkte ebenfalls eine tendenzielle Reduktion der Plättchenhemmung.

Die Polymerasekettenreaktion zeigte eine erhöhte Expression von Tissue factor in den mesenchymalen Zellen verglichen mit endothelialen Zellreihen.

Mesenchymale Stromazellen aus Knochenmark, Lipoaspirat und Nabelschnurblut reduzieren die Thrombozytenaktivierung. Mesenchymale Stromazellen aus Nabelschnurblut besitzen jedoch auch das Potenzial ruhende Plättchen zu aktivieren und haben somit die höchste pro-koagulatorische, aber auch hämostatische Potenz. Aufgrund der vorliegenden Daten sollten aber primär weitere Versuchsreihen erfolgen, um die Ursache der ambivalenten Ergebnisse zu klären.

Die hemmende Wirkung der Zellen wird zumindest teilweise über den extrazellulären Adenosin Stoffwechsel, insbesondere über CD73, vermittelt. Da MSC kein CD39 exprimieren gilt es noch abschließend zu klären, über welchen Mechanismus das von CD73 benötigte Substrat AMP generiert wird. Denkbar wären thrombozyteneigenes CD39 und/oder ubiquitär im Serum vorkommende Mikropartikel mit CD39 Aktivität.

Die Daten unterstützen die bisherige Auffassung, dass MSC exprimierter Tissue Factor hauptverantwortlich für deren Thrombogenität ist. Ein thromboembolisches Risiko durch die Aktivierung von Thrombozyten durch mesenchymale Stromazellen kann aufgrund der hier erhobenen Daten ausgeschlossen werden.

Die Hemmung der Thrombozytenaktivierung über CD73 birgt jedoch das Risiko einer klinisch erhöhten Blutungsgefahr, solange sich die Stromazellen in der Zirkulation befinden. Zur Sicherung der Ergebnisse sollte die Relevanz der CD39/73 vermittelten Adenosin Produktion bei der Stromazell- Applikation in weiterführenden, realitätsnäheren Modellen unter Fluss mit entsprechenden Antagonisten, sowie später im Tiermodell beispielsweise durch ein Knock-out überprüft werden.

Als eine der Hauptindikationen für die Stromazell- Applikation gelten überschießende Immunreaktionen. Da ein inflammatorisches Milieu die Eigenschaften von MSC und auch die CD39 Expression auf Thrombozyten verändern kann, ist es wesentlich in der Zukunft auch Einflüsse einer solchen Umgebung zu berücksichtigen.

5 LITERATURVERZEICHNIS

Abou-Saleh, H., Hachem, A., Yacoub, D., Gillis, M.A., and Merhi, Y. (2015). Endothelial progenitor cells inhibit platelet function in a P-selectin-dependent manner. *J Transl Med* 13, 142.

Abou-Saleh, H., Yacoub, D., Theoret, J.F., Gillis, M.A., Neagoe, P.E., Labarthe, B., Theroux, P., Sirois, M.G., Tabrizian, M., Thorin, E., *et al.* (2009). Endothelial progenitor cells bind and inhibit platelet function and thrombus formation. *Circulation* 120, 2230-2239.

Acosta, L., Hmadcha, A., Escacena, N., Perez-Camacho, I., de la Cuesta, A., Ruiz-Salmeron, R., Gauthier, B.R., and Soria, B. (2013). Adipose mesenchymal stromal cells isolated from type 2 diabetic patients display reduced fibrinolytic activity. *Diabetes* 62, 4266-4269.

Adelman, B., Stemerman, M.B., Mennell, D., and Handin, R.I. (1981). The interaction of platelets with aortic subendothelium: inhibition of adhesion and secretion by prostaglandin I₂. *Blood* 58, 198-205.

Aerts, N.E., Dombrecht, E.J., Bridts, C.H., Hagendorens, M.M., de Clerck, L.S., Stevens, W.J., and Ebo, D.G. (2009). Simultaneous flow cytometric detection of basophil activation marker CD63 and intracellular phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase in birch pollen allergy. *Cytometry Part B, Clinical cytometry* 76, 8-17.

Agis, H., Kandler, B., Fischer, M.B., Watzek, G., and Gruber, R. (2009). Activated platelets increase fibrinolysis of mesenchymal progenitor cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 27, 972-980.

Aicher, W.K., Buhring, H.J., Hart, M., Rolauffs, B., Badke, A., and Klein, G. (2011). Regeneration of cartilage and bone by defined subsets of mesenchymal stromal cells-potential and pitfalls. *Advanced drug delivery reviews* 63, 342-351.

Alonso-Escolano, D., Strongin, A.Y., Chung, A.W., Deryugina, E.I., and Radomski, M.W. (2004). Membrane type-1 matrix metalloproteinase stimulates tumour cell-induced platelet aggregation: role of receptor glycoproteins. *Br J Pharmacol* 141, 241-252.

Andrews, R.K., Lopez, J.A., and Berndt, M.C. (1997). Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *The international journal of biochemistry & cell biology* 29, 91-105.

Angiolillo, D.J., Ueno, M., and Goto, S. (2010). Basic principles of platelet biology and clinical implications. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 74, 597-607.

Ankrum, J.A., Ong, J.F., and Karp, J.M. (2014). Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nature biotechnology* 32, 252-260.

Armitage, J.O. (1994). Bone marrow transplantation. *The New England journal of medicine* 330, 827-838.

Armstrong, P.C., Leadbeater, P.D., Chan, M.V., Kirkby, N.S., Jakubowski, J.A., Mitchell, J.A., and Warner, T.D. (2011). In the presence of strong P2Y₁₂ receptor blockade, aspirin provides little additional inhibition of platelet aggregation. *J Thromb Haemost* 9, 552-561.

Atkinson, B., Dwyer, K., Enjyoji, K., and Robson, S.C. (2006). Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. *Blood cells, molecules & diseases* 36, 217-222.

Bank, J.R., Rabelink, T.J., de Fijter, J.W., and Reinders, M.E. (2015). Safety and Efficacy Endpoints for Mesenchymal Stromal Cell Therapy in Renal Transplant Recipients. *Journal of immunology research* 2015, 391797.

Barnard, M.R., Linden, M.D., Frelinger, A.L., 3rd, Li, Y., Fox, M.L., Furman, M.I., and Michelson, A.D. (2005). Effects of platelet binding on whole blood flow cytometry assays of monocyte and neutrophil procoagulant activity. *J Thromb Haemost* 3, 2563-2570.

Bastida, E., Almirall, L., and Ordinas, A. (1987). Tumor-cell-induced platelet aggregation is a glycoprotein-dependent and lipoxygenase-associated process. *International journal of cancer Journal international du cancer* 39, 760-763.

Baudin, B., Bruneel, A., Bosselut, N., and Vaubourdolle, M. (2007). A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nature protocols* 2, 481-485.

BDBiosciences (2000). *Introduction to Flow Cytometry: A learning guide* (San Jose).

Bieback, K., Ha, V.A., Hecker, A., Grassl, M., Kinzebach, S., Solz, H., Sticht, C., Kluter, H., and Bugert, P. (2010). Altered gene expression in human adipose stem cells cultured with fetal bovine serum compared to human supplements. *Tissue engineering Part A* 16, 3467-3484.

Bieback, K., Hecker, A., Schlechter, T., Hofmann, I., Brousos, N., Redmer, T., Besser, D., Kluter, H., Muller, A.M., and Becker, M. (2012a). Replicative aging and differentiation potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells expanded in pooled human or fetal bovine serum. *Cytotherapy* 14, 570-583.

Bieback, K., and Klüter, H. (2007). Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood. *Current stem cell research & therapy* 2, 310-323.

Bieback, K., and Netsch, P. (2015). Isolation, culture and characterization of human umbilical cord blood-derived Mesenchymal Stromal Cells (CB-MSC). In *Mesenchymal Stem Cells, Methods and Protocols*, P. Massimiliano Gnecci MD, ed. (New York: Springer).

Bieback, K., Vinci, M., Elvers-Hornung, S., Bartol, A., Gloe, T., Czabanka, M., Klüter, H., Augustin, H., and Vajkoczy, P. (2013). Recruitment of human cord blood-derived

endothelial colony-forming cells to sites of tumor angiogenesis. *Cytotherapy* 15, 726-739.

Bieback, K., Wuchter, P., Besser, D., Franke, W., Becker, M., Ott, M., Pacher, M., Ma, N., Stamm, C., Klüter, H., *et al.* (2012b). Mesenchymal stromal cells (MSCs): science and f(r)iction. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 90, 773-782.

Boujedidi, H., Bouchet-Delbos, L., Cassard-Doulcier, A.M., Njike-Nakseu, M., Maitre, S., Prevot, S., Dagher, I., Agostini, H., Voican, C.S., Emilie, D., *et al.* (2012). Housekeeping gene variability in the liver of alcoholic patients. *Alcoholism, clinical and experimental research* 36, 258-266.

Broekman, M.J., Eiroa, A.M., and Marcus, A.J. (1991). Inhibition of human platelet reactivity by endothelium-derived relaxing factor from human umbilical vein endothelial cells in suspension: blockade of aggregation and secretion by an aspirin-insensitive mechanism. *Blood* 78, 1033-1040.

Brooke, G., Tong, H., Levesque, J.P., and Atkinson, K. (2008). Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta. *Stem cells and development* 17, 929-940.

Bunting, S., Moncada, S., and Vane, J.R. (1977). Antithrombotic properties of vascular endothelium. *Lancet* 2, 1075-1076.

Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology* 25, 169-193.

Caiazza, E., Tedesco, I., Spagnuolo, C., Russo, G.L., Ialenti, A., and Cicala, C. (2016). Red Wine Inhibits Aggregation and Increases ATP-diphosphohydrolase (CD39) Activity of Rat Platelets in Vitro. *Natural product communications* 11, 771-774.

Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 9, 641-650.

Caplan, A.I., and Correa, D. (2011). The MSC: an injury drugstore. *Cell stem cell* 9, 11-15.

Castilhos, L.G., Doleski, P.H., Adefegha, S.A., Becker, L.V., Ruchel, J.B., and Leal, D.B. (2016). Altered E-NTPDase/E-ADA activities and CD39 expression in platelets of sickle cell anemia patients. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 79, 241-246.

Caterson, E.J., Nesti, L.J., Danielson, K.G., and Tuan, R.S. (2002). Human marrow-derived mesenchymal progenitor cells: isolation, culture expansion, and analysis of differentiation. *Molecular biotechnology* 20, 245-256.

Chen, X., Shao, H., Zhi, Y., Xiao, Q., Su, C., Dong, L., Liu, X., Li, X., and Zhang, X. (2016). CD73 Pathway Contributes to the Immunosuppressive Ability of Mesenchymal Stem Cells in Intraocular Autoimmune Responses. *Stem cells and development* 25, 337-346.

Cimmino, G., and Golino, P. (2013). Platelet biology and receptor pathways. *Journal of cardiovascular translational research* 6, 299-309.

Colgan, S.P., Eltzschig, H.K., Eckle, T., and Thompson, L.F. (2006). Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signalling* 2, 351-360.

Coupland, L.A., and Parish, C.R. (2014). Platelets, selectins, and the control of tumor metastasis. *Seminars in oncology* 41, 422-434.

Cutler, C., and Antin, J.H. (2001). Peripheral blood stem cells for allogeneic transplantation: a review. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 19, 108-117.

Cyranoski, D. (2010). Korean deaths spark inquiry. *Nature* 468, 485.

de Bruijne-Admiraal, L.G., Modderman, P.W., Von dem Borne, A.E., and Sonnenberg, A. (1992). P-selectin mediates Ca(2+)-dependent adhesion of activated platelets to many different types of leukocytes: detection by flow cytometry. *Blood* 80, 134-142.

Di Battista, J.A., Shebawy, W., Kizilay, O., Hamade, E., Abou Merhi, R., Mebarek, S., Abdallah, D., Badran, B., Saad, F., E, K.A., *et al.* (2014). Proliferation and differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) into osteoblastic lineage are passage dependent. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* 63, 907-917.

Dionisotti, S., Ongini, E., Zocchi, C., Kull, B., Arslan, G., and Fredholm, B.B. (1997). Characterization of human A2A adenosine receptors with the antagonist radioligand [3H]-SCH 58261. *Br J Pharmacol* 121, 353-360.

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

Dorsam, R.T., and Kunapuli, S.P. (2004). Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. *The Journal of clinical investigation* 113, 340-345.

Doyle, E.L., Ridger, V., Ferraro, F., Turmaine, M., Saftig, P., and Cutler, D.F. (2011). CD63 is an essential cofactor to leukocyte recruitment by endothelial P-selectin. *Blood* 118, 4265-4273.

Dreher, L., Elvers-Hornung, S., Brinkmann, I., Huck, V., Henschler, R., Gloe, T., Kluter, H., and Bieback, K. (2013). Cultivation in human serum reduces adipose tissue-derived mesenchymal stromal cell adhesion to laminin and endothelium and reduces capillary entrapment. *Stem cells and development* 22, 791-803.

Duijvestein, M., Vos, A.C., Roelofs, H., Wildenberg, M.E., Wendrich, B.B., Verspaget, H.W., Kooy-Winkelaar, E.M., Koning, F., Zwaginga, J.J., Fidder, H.H., *et al.* (2010). Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut* 59, 1662-1669.

- Duperray, A., Troesch, A., Berthier, R., Chagnon, E., Frachet, P., Uzan, G., and Marguerie, G. (1989). Biosynthesis and assembly of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes: evidence that assembly between pro-GPIIb and GPIIIa is a prerequisite for expression of the complex on the cell surface. *Blood* 74, 1603-1611.
- Durante, W., Kroll, M.H., Vanhoutte, P.M., and Schafer, A.I. (1992). Endothelium-derived relaxing factor inhibits thrombin-induced platelet aggregation by inhibiting platelet phospholipase C. *Blood* 79, 110-116.
- Eggenhofer, E., Luk, F., Dahlke, M.H., and Hoogduijn, M.J. (2014). The life and fate of mesenchymal stem cells. *Frontiers in immunology* 5, 148.
- Emeis, J.J., van den Eijnden-Schrauwen, Y., van den Hoogen, C.M., de Priester, W., Westmuckett, A., and Lupu, F. (1997). An endothelial storage granule for tissue-type plasminogen activator. *The Journal of cell biology* 139, 245-256.
- Enyoloji, K., Sevigny, J., Lin, Y., Frenette, P.S., Christie, P.D., Esch, J.S., 2nd, Imai, M., Edelberg, J.M., Rayburn, H., Lech, M., *et al.* (1999). Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nature medicine* 5, 1010-1017.
- Ezquer, F.E., Ezquer, M.E., Parrau, D.B., Carpio, D., Yanez, A.J., and Conget, P.A. (2008). Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 14, 631-640.
- Fan, J., Varshney, R.R., Ren, L., Cai, D., and Wang, D.A. (2009). Synovium-derived mesenchymal stem cells: a new cell source for musculoskeletal regeneration. *Tissue engineering Part B, Reviews* 15, 75-86.
- Faraday, N., Scharpf, R.B., Dodd-o, J.M., Martinez, E.A., Rosenfeld, B.A., and Dorman, T. (2001). Leukocytes can enhance platelet-mediated aggregation and thromboxane release via interaction of P-selectin glycoprotein ligand 1 with P-selectin. *Anesthesiology* 94, 145-151.
- Fekete, N., Rojewski, M.T., Furst, D., Kreja, L., Ignatius, A., Dausend, J., and Schrezenmeier, H. (2012). GMP-compliant isolation and large-scale expansion of bone marrow-derived MSC. *PloS one* 7, e43255.
- Fierabracci, A., Lazzari, L., Muraca, M., and Parolini, O. (2015). How far are we from the clinical use of placental-derived mesenchymal stem cells? *Expert opinion on biological therapy*, 1-5.
- Fischer, U.M., Harting, M.T., Jimenez, F., Monzon-Posadas, W.O., Xue, H., Savitz, S.I., Laine, G.A., and Cox, C.S., Jr. (2009). Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem cells and development* 18, 683-692.
- Flemmig, M., and Melzig, M.F. (2012). Serine-proteases as plasminogen activators in terms of fibrinolysis. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 64, 1025-1039.

Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., Latsinik, N.V., Panasyuk, A.F., and Keiliss-Borok, I.V. (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 17, 331-340.

Fuentes, E., and Palomo, I. (2015). Extracellular ATP metabolism on vascular endothelial cells: A pathway with pro-thrombotic and anti-thrombotic molecules. *Vascular pharmacology* 75, 1-6.

Furlani, D., Ugurlucan, M., Ong, L., Bieback, K., Pittermann, E., Westien, I., Wang, W., Yerebakan, C., Li, W., Gaebel, R., *et al.* (2009). Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? *Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. Microvascular research* 77, 370-376.

Galli, D., Vitale, M., and Vaccarezza, M. (2014). Bone marrow-derived mesenchymal cell differentiation toward myogenic lineages: facts and perspectives. *BioMed research international* 2014, 762695.

Gao, J., Dennis, J.E., Muzic, R.F., Lundberg, M., and Caplan, A.I. (2001). The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells, tissues, organs* 169, 12-20.

Gao, Z.W., Dong, K., and Zhang, H.Z. (2014). The roles of CD73 in cancer. *BioMed research international* 2014, 460654.

Gebbink, M.F. (2011). Tissue-type plasminogen activator-mediated plasminogen activation and contact activation, implications in and beyond haemostasis. *J Thromb Haemost* 9 Suppl 1, 174-181.

Gerrits, A.J., Frelinger, A.L., 3rd, and Michelson, A.D. (2016). Whole Blood Analysis of Leukocyte-Platelet Aggregates. *Current protocols in cytometry* 78, 6.15.11-16.15.10.

Gleeson, B.M., Martin, K., Ali, M.T., Kumar, A.H., Pillai, M.G., Kumar, S.P., O'Sullivan, J.F., Whelan, D., Stocca, A., Khider, W., *et al.* (2015). Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Have Innate Procoagulant Activity and Cause Microvascular Obstruction Following Intracoronary Delivery: Amelioration by Antithrombin Therapy. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 33, 2726-2737.

Gong, L., Mi, H.J., Zhu, H., Zhou, X., and Yang, H. (2012). P-selectin-mediated platelet activation promotes adhesion of non-small cell lung carcinoma cells on vascular endothelial cells under flow. *Molecular medicine reports* 5, 935-942.

Hamburger, S.A., and McEver, R.P. (1990). GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood* 75, 550-554.

Hang, H., Yu, Y., Wu, N., Huang, Q., Xia, Q., and Bian, J. (2014). Induction of Highly Functional Hepatocytes from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells by HNF4alpha Transduction. *PloS one* 9, e104133.

Hare, J.M., Traverse, J.H., Henry, T.D., Dib, N., Strumpf, R.K., Schulman, S.P., Gerstenblith, G., DeMaria, A.N., Denktas, A.E., Gammon, R.S., *et al.* (2009). A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* *54*, 2277-2286.

Harting, M.T., Jimenez, F., Xue, H., Fischer, U.M., Baumgartner, J., Dash, P.K., and Cox, C.S. (2009). Intravenous mesenchymal stem cell therapy for traumatic brain injury. *Journal of neurosurgery* *110*, 1189-1197.

Hashi, C.K., Zhu, Y., Yang, G.Y., Young, W.L., Hsiao, B.S., Wang, K., Chu, B., and Li, S. (2007). Antithrombogenic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 11915-11920.

Heissig, B., Dhahri, D., Eiamboonsert, S., Salama, Y., Shimazu, H., Munakata, S., and Hattori, K. (2015). Role of mesenchymal stem cell-derived fibrinolytic factor in tissue regeneration and cancer progression. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *72*, 4759-4770.

Helland, I.B., Klementsén, B., and Jørgensen, L. (1997). Addition of both platelets and thrombin in combination accelerates tumor cells to adhere to endothelial cells in vitro. *In vitro cellular & developmental biology Animal* *33*, 182-186.

Henkin, J., Marcotte, P., and Yang, H.C. (1991). The plasminogen-plasmin system. *Progress in cardiovascular diseases* *34*, 135-164.

Heo, J.S., Choi, Y., Kim, H.S., and Kim, H.O. (2016). Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *International journal of molecular medicine* *37*, 115-125.

Hoogduijn, M.J., de Witte, S.F., Luk, F., van den Hout-van Vroonhoven, M.C., Ignatowicz, L., Catar, R., Strini, T., Korevaar, S.S., van, I.W.F., Betjes, M.G., *et al.* (2016). Effects of Freeze-Thawing and Intravenous Infusion on Mesenchymal Stromal Cell Gene Expression. *Stem cells and development* *25*, 586-597.

Hu, H., Varon, D., Hjendahl, P., Savion, N., Schulman, S., and Li, N. (2003). Platelet-leukocyte aggregation under shear stress: differential involvement of selectins and integrins. *Thrombosis and haemostasis* *90*, 679-687.

Huat, T.J., Khan, A.A., Pati, S., Mustafa, Z., Abdullah, J.M., and Jaafar, H. (2014). IGF-1 enhances cell proliferation and survival during early differentiation of mesenchymal stem cells to neural progenitor-like cells. *BMC neuroscience* *15*, 91.

Jin, H.J., Bae, Y.K., Kim, M., Kwon, S.J., Jeon, H.B., Choi, S.J., Kim, S.W., Yang, Y.S., Oh, W., and Chang, J.W. (2013). Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *International journal of molecular sciences* *14*, 17986-18001.

Jung, J.W., Kwon, M., Choi, J.C., Shin, J.W., Park, I.W., Choi, B.W., and Kim, J.Y. (2013). Familial occurrence of pulmonary embolism after intravenous, adipose tissue-derived stem cell therapy. *Yonsei medical journal* 54, 1293-1296.

Karagianni, M., Brinkmann, I., Kinzebach, S., Grassl, M., Weiss, C., Bugert, P., and Bieback, K. (2013). A comparative analysis of the adipogenic potential in human mesenchymal stromal cells from cord blood and other sources. *Cytotherapy* 15, 76-88.

Kerkelä, E., Laitinen, A., Rabina, J., Valkonen, S., Takatalo, M., Larjo, A., Veijola, J., Lampinen, M., Siljander, P., Lehenkari, P., *et al.* (2016). Adenosinergic Immunosuppression by Human Mesenchymal Stromal Cells Requires Co-Operation with T cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 34, 781-790.

Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., and Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24, 1294-1301.

Kim, J.H., Lee, H.J., and Song, Y.S. (2016). Mesenchymal stem cell-based gene therapy for erectile dysfunction. *International journal of impotence research* 28, 81-87.

Kim, N., and Cho, S.G. (2013). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *The Korean journal of internal medicine* 28, 387-402.

Kinzebach, S., and Bieback, K. (2013). Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal cells under xenogenic-free culture conditions. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 129, 33-57.

Kirchheimer, J.C., and Binder, B.R. (1991). Function of receptor-bound urokinase. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 17, 246-250.

Klyushnenkova, E., Mosca, J.D., Zernetkina, V., Majumdar, M.K., Beggs, K.J., Simonetti, D.W., Deans, R.J., and McIntosh, K.R. (2005). T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *Journal of biomedical science* 12, 47-57.

Koc, O.N., Gerson, S.L., Cooper, B.W., Dyhouse, S.M., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I., and Lazarus, H.M. (2000). Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 18, 307-316.

Kögler, G., Sensken, S., Airey, J.A., Trapp, T., Muschen, M., Feldhahn, N., Liedtke, S., Sorg, R.V., Fischer, J., Rosenbaum, C., *et al.* (2004). A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *The Journal of experimental medicine* 200, 123-135.

Kögler, G., Sensken, S., and Wernet, P. (2006). Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. *Experimental hematology* 34, 1589-1595.

Kolb, H.J. (2008). Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* 112, 4371-4383.

Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlaschi, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., *et al.* (2006). Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24, 386-398.

Kroll, M.H., Hellums, J.D., McIntire, L.V., Schafer, A.I., and Moake, J.L. (1996). Platelets and shear stress. *Blood* 88, 1525-1541.

Lalu, M.M., McIntyre, L., Pugliese, C., Fergusson, D., Winston, B.W., Marshall, J.C., Granton, J., and Stewart, D.J. (2012). Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PloS one* 7, e47559.

Larsen, E., Celi, A., Gilbert, G.E., Furie, B.C., Erban, J.K., Bonfanti, R., Wagner, D.D., and Furie, B. (1989). PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 59, 305-312.

Lee, R.H., Pulin, A.A., Seo, M.J., Kota, D.J., Ylostalo, J., Larson, B.L., Semprun-Prieto, L., Delafontaine, P., and Prockop, D.J. (2009). Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell stem cell* 5, 54-63.

Liechty, K.W., MacKenzie, T.C., Shaaban, A.F., Radu, A., Moseley, A.M., Deans, R., Marshak, D.R., and Flake, A.W. (2000). Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nature medicine* 6, 1282-1286.

Loffinegad, P., Shamsasenjan, K., Movassaghpour, A., Majidi, J., and Baradaran, B. (2014). Immunomodulatory nature and site specific affinity of mesenchymal stem cells: a hope in cell therapy. *Advanced pharmaceutical bulletin* 4, 5-13.

Luria, E.A., Panasyuk, A.F., and Friedenstien, A.Y. (1971). Fibroblast colony formation from monolayer cultures of blood cells. *Transfusion* 11, 345-349.

Lwaleed, B.A., and Bass, P.S. (2006). Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. *The Journal of pathology* 208, 327-339.

Makela, T., Takalo, R., Arvola, O., Haapanen, H., Yannopoulos, F., Blanco, R., Ahvenjarvi, L., Kiviluoma, K., Kerkela, E., Nystedt, J., *et al.* (2015). Safety and biodistribution study of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells and mononuclear cells and the impact of the administration route in an intact porcine model. *Cytotherapy* 17, 392-402.

Mamidi, M.K., Nathan, K.G., Singh, G., Thrichelvam, S.T., Mohd Yusof, N.A., Fakharuzi, N.A., Zakaria, Z., Bhonde, R., Das, A.K., and Majumdar, A.S. (2012). Comparative cellular and molecular analyses of pooled bone marrow multipotent

mesenchymal stromal cells during continuous passaging and after successive cryopreservation. *Journal of cellular biochemistry* 113, 3153-3164.

Manoharan, A., Gemmell, R., and Hartwell, T. (2006). Use of whole blood platelet lumi-aggregometry to optimize anti-platelet therapy in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Am J Hematol* 81, 676-683.

Mathiasen, A.B., Haack-Sorensen, M., and Kastrup, J. (2009). Mesenchymal stromal cells for cardiovascular repair: current status and future challenges. *Future cardiology* 5, 605-617.

Mattar, P., and Bieback, K. (2015). Comparing the Immunomodulatory Properties of Bone Marrow, Adipose Tissue, and Birth-Associated Tissue Mesenchymal Stromal Cells. *Frontiers in immunology* 6, 560.

Mazzini, L., Ferrero, I., Luparello, V., Rustichelli, D., Gunetti, M., Mareschi, K., Testa, L., Stecco, A., Tarletti, R., Miglioretti, M., *et al.* (2010). Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial. *Experimental neurology* 223, 229-237.

McEver, R.P. (1990). Properties of GMP-140, an inducible granule membrane protein of platelets and endothelium. *Blood cells* 16, 73-80; discussion 80-73.

McKenzie, M.E., Bell, C.R., Horowitz, E.D., Oshrine, B.R., Atar, D., and Serebruany, V.L. (2002). Effects of in vitro exposure of alcohol on surface receptor expression of human platelets. *Clinical physiology and functional imaging* 22, 153-156.

McKenzie, M.E., Malinin, A.I., Bell, C.R., Dzhanashvili, A., Horowitz, E.D., Oshrine, B.R., Atar, D., and Serebruany, V.L. (2003). Aspirin inhibits surface glycoprotein IIb/IIIa, P-selectin, CD63, and CD107a receptor expression on human platelets. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* 14, 249-253.

Medina, C., Harmon, S., Inkielewicz, I., Santos-Martinez, M.J., Jones, M., Cantwell, P., Bazou, D., Ledwidge, M., Radomski, M.W., and Gilmer, J.F. (2012). Differential inhibition of tumour cell-induced platelet aggregation by the nicotinate aspirin prodrug (ST0702) and aspirin. *Br J Pharmacol* 166, 938-949.

Mehta, P. (1984). Potential role of platelets in the pathogenesis of tumor metastasis. *Blood* 63, 55-63.

Menter, D.G., Tucker, S.C., Kopetz, S., Sood, A.K., Crissman, J.D., and Honn, K.V. (2014). Platelets and cancer: a casual or causal relationship: revisited. *Cancer metastasis reviews* 33, 231-269.

Michelson, A.D. (2006). Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis* 35, 67-82.

Mohlin, C., Save, S., Nilsson, M., and Persson, K. (2009). Studies of the extracellular ATP-adenosine pathway in human urinary tract epithelial cells. *Pharmacology* 84, 196-202.

Moll, G., Ignatowicz, L., Catar, R., Luecht, C., Sadeghi, B., Hamad, O., Jungebluth, P., Dragun, D., Schmidtchen, A., and Ringden, O. (2015). Different Procoagulant Activity of Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells Derived from Bone Marrow and Placental Decidua. *Stem cells and development* 24, 2269-2279.

Moll, G., Rasmusson-Duprez, I., von Bahr, L., Connolly-Andersen, A.M., Elgue, G., Funke, L., Hamad, O.A., Lonnie, H., Magnusson, P.U., Sanchez, J., *et al.* (2012). Are therapeutic human mesenchymal stromal cells compatible with human blood? *Stem cells (Dayton, Ohio)* 30, 1565-1574.

Monks, N.J., and Fraser, L.R. (1988). Inhibition of adenosine-metabolizing enzymes modulates mouse sperm fertilizing ability: a changing role for endogenously generated adenosine during capacitation. *Gamete research* 21, 267-276.

Nauta, A.J., Kruisselbrink, A.B., Lurvink, E., Willemze, R., and Fibbe, W.E. (2006). Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 177, 2080-2087.

Nemerson, Y. (1988). Tissue factor and hemostasis. *Blood* 71, 1-8.

Neuss, S., Schneider, R.K., Tietze, L., Knuchel, R., and Jahnen-Dechent, W. (2010). Secretion of fibrinolytic enzymes facilitates human mesenchymal stem cell invasion into fibrin clots. *Cells, tissues, organs* 191, 36-46.

Nieuwenhuis, H.K., van Oosterhout, J.J., Rozemuller, E., van Iwaarden, F., and Sixma, J.J. (1987). Studies with a monoclonal antibody against activated platelets: evidence that a secreted 53,000-molecular weight lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation. *Blood* 70, 838-845.

Nomura, S., Shouzu, A., Omoto, S., Nishikawa, M., Fukuhara, S., and Iwasaka, T. (2004). Losartan and simvastatin inhibit platelet activation in hypertensive patients. *Journal of thrombosis and thrombolysis* 18, 177-185.

Otto, W.R., and Wright, N.A. (2011). Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic. *Fibrogenesis & tissue repair* 4, 20.

Panes, J., Garcia-Olmo, D., Van Assche, G., Colombel, J.F., Reinisch, W., Baumgart, D.C., Dignass, A., Nachury, M., Ferrante, M., Kazemi-Shirazi, L., *et al.* (2016). Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial. *Lancet* 388, 1281-1290.

Park, B., Yoo, K.H., and Kim, C. (2015). Hematopoietic stem cell expansion and generation: the ways to make a breakthrough. *Blood research* 50, 194-203.

Park, K.S., Kim, Y.S., Kim, J.H., Choi, B., Kim, S.H., Tan, A.H., Lee, M.S., Lee, M.K., Kwon, C.H., Joh, J.W., *et al.* (2010). Trophic molecules derived from human mesenchymal stem cells enhance survival, function, and angiogenesis of isolated islets after transplantation. *Transplantation* 89, 509-517.

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., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, NY)* 284, 143-147.

Ploug, M. (2003). Structure-function relationships in the interaction between the urokinase-type plasminogen activator and its receptor. *Current pharmaceutical design* 9, 1499-1528.

Prockop, D.J., Brenner, M., Fibbe, W.E., Horwitz, E., Le Blanc, K., Phinney, D.G., Simmons, P.J., Sensebe, L., and Keating, A. (2010). Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy. *Cytotherapy* 12, 576-578.

Ramot, Y., Steiner, M., Morad, V., Leibovitch, S., Amouyal, N., Cesta, M.F., and Nyska, A. (2010). Pulmonary thrombosis in the mouse following intravenous administration of quantum dot-labeled mesenchymal cells. *Nanotoxicology* 4, 98-105.

Reilly, T.M., Mousa, S.A., Seetharam, R., and Racanelli, A.L. (1994). Recombinant plasminogen activator inhibitor type 1: a review of structural, functional, and biological aspects. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* 5, 73-81.

Ringden, O., and Leblanc, K. (2011). Pooled MSCs for treatment of severe hemorrhage. *Bone marrow transplantation* 46, 1158-1160.

Robson, S.C., Wu, Y., Sun, X., Knosalla, C., Dwyer, K., and Enjyoji, K. (2005). Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 31, 217-233.

RocheDiagnostics (2009). RealTime ready. Universal ProbeLibrary. Redefining and revolutionizing real-time qPCR assays, R.D. GmbH, and R.A. Science, eds. (Werk Penzberg, 82372 Penzberg, Germany).

Rochefort, G.Y., Vaudin, P., Bonnet, N., Pages, J.C., Domenech, J., Charbord, P., and Eder, V. (2005). Influence of hypoxia on the domiciliation of mesenchymal stem cells after infusion into rats: possibilities of targeting pulmonary artery remodeling via cells therapies? *Respiratory research* 6, 125.

Rosemann, A. (2014). Why regenerative stem cell medicine progresses slower than expected. *Journal of cellular biochemistry* 115, 2073-2076.

Rustad, K.C., and Gurtner, G.C. (2012). Mesenchymal Stem Cells Home to Sites of Injury and Inflammation. *Advances in wound care* 1, 147-152.

Rüster, B., Gottig, S., Ludwig, R.J., Bistrrian, R., Muller, S., Seifried, E., Gille, J., and Henschler, R. (2006). Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood* 108, 3938-3944.

Saldanha-Araujo, F., Ferreira, F.I., Palma, P.V., Araujo, A.G., Queiroz, R.H., Covas, D.T., Zago, M.A., and Panepucci, R.A. (2011). Mesenchymal stromal cells up-regulate

CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. *Stem cell research* 7, 66-74.

Schedel, A., Thornton, S., Klüter, H., and Bugert, P. (2010). The Effect of Psychoactive Drugs on in vitro Platelet Function. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* 37, 293-298.

Schedel, A., Thornton, S., Schloss, P., Klüter, H., and Bugert, P. (2011). Human platelets express functional alpha7-nicotinic acetylcholine receptors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31, 928-934.

Schmitz, N., Dreger, P., Suttorp, M., Rohwedder, E.B., Haferlach, T., Löffler, H., Hunter, A., and Russell, N.H. (1995). Primary transplantation of allogeneic peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor). *Blood* 85, 1666-1672.

Seyfert, U.T., Haubelt, H., Vogt, A., and Hellstern, P. (2007). Variables influencing Multiplate(TM) whole blood impedance platelet aggregometry and turbidimetric platelet aggregation in healthy individuals. *Platelets* 18, 199-206.

Sharma, R.R., Pollock, K., Hubel, A., and McKenna, D. (2014). Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion* 54, 1418-1437.

Shattil, S.J. (1999). Signaling through platelet integrin alpha IIb beta 3: inside-out, outside-in, and sideways. *Thrombosis and haemostasis* 82, 318-325.

Shattil, S.J., Hoxie, J.A., Cunningham, M., and Brass, L.F. (1985). Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *The Journal of biological chemistry* 260, 11107-11114.

Shiota, G., and Itaba, N. (2016). Progress in stem cell-based therapy for liver disease. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*.

Shiratsuki, S., Terai, S., Murata, Y., Takami, T., Yamamoto, N., Fujisawa, K., Burganova, G., Quintanilha, L.F., and Sakaida, I. (2015). Enhanced survival of mice infused with bone marrow-derived as compared with adipose-derived mesenchymal stem cells. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 45, 1353-1359.

Sidhu, T.S., French, S.L., and Hamilton, J.R. (2014). Differential signaling by protease-activated receptors: implications for therapeutic targeting. *International journal of molecular sciences* 15, 6169-6183.

Smith, S.B., Xu, Z., Novitskaya, T., Zhang, B., Chepurko, E., Pu, X.A., Wheeler, D.G., Ziolo, M., and Gumina, R.J. (2016). Impact of cardiac-specific expression of CD39 on myocardial infarct size in mice. *Life sciences*.

Squillaro, T., Peluso, G., and Galderisi, U. (2016). Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell transplantation* 25, 829-848.

Stegner, D., Dutting, S., and Nieswandt, B. (2014). Mechanistic explanation for platelet contribution to cancer metastasis. *Thrombosis research* 133 Suppl 2, S149-157.

Stenberg, P.E., McEver, R.P., Shuman, M.A., Jacques, Y.V., and Bainton, D.F. (1985). A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *The Journal of cell biology* 101, 880-886.

Stephene, X., Nicastro, E., Eeckhoudt, S., Hermans, C., Nyabi, O., Lombard, C., Najimi, M., and Sokal, E. (2012). Bivalirudin in combination with heparin to control mesenchymal cell procoagulant activity. *PloS one* 7, e42819.

Sundin, M., D'Arcy, P., Johansson, C.C., Barrett, A.J., Lonnie, H., Sundberg, B., Nava, S., Kiessling, R., Mougiakakos, D., and Le Blanc, K. (2011). Multipotent mesenchymal stromal cells express FoxP3: a marker for the immunosuppressive capacity? *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md : 1997)* 34, 336-342.

Tatsumi, K., Ohashi, K., Matsubara, Y., Kohori, A., Ohno, T., Kakidachi, H., Horii, A., Kanegae, K., Utoh, R., Iwata, T., *et al.* (2013). Tissue factor triggers procoagulation in transplanted mesenchymal stem cells leading to thromboembolism. *Biochemical and biophysical research communications* 431, 203-209.

Tavassoli, M., and Friedenstein, A. (1983). Hemopoietic stromal microenvironment. *Am J Hematol* 15, 195-203.

Tsukamoto, H., Chernogorova, P., Ayata, K., Gerlach, U.V., Rughani, A., Ritchey, J.W., Ganesan, J., Follo, M., Zeiser, R., Thompson, L.F., *et al.* (2012). Deficiency of CD73/ecto-5'-nucleotidase in mice enhances acute graft-versus-host disease. *Blood* 119, 4554-4564.

Uccelli, A., Benvenuto, F., Laroni, A., and Giunti, D. (2011). Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best practice & research Clinical haematology* 24, 59-64.

Ujhazy, P., Klobusicka, M., Babusikova, O., Strausbauch, P., Mihich, E., and Ehrke, M.J. (1994). Ecto-5'-nucleotidase (CD73) in multidrug-resistant cell lines generated by doxorubicin. *International journal of cancer Journal international du cancer* 59, 83-93.

Vadivel, K., Ponnuraj, S.M., Kumar, Y., Zaiss, A.K., Bunce, M.W., Camire, R.M., Wu, L., Evseenko, D., Herschman, H.R., Bajaj, M.S., *et al.* (2014). Platelets contain tissue factor pathway inhibitor-2 derived from megakaryocytes and inhibits fibrinolysis. *The Journal of biological chemistry* 289, 31647-31661.

van Hinsbergh, V.W. (2012). Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation. *Seminars in immunopathology* 34, 93-106.

van Velzen, J.F., Laros-van Gorkom, B.A., Pop, G.A., and van Heerde, W.L. (2012). Multicolor flow cytometry for evaluation of platelet surface antigens and activation markers. *Thrombosis research* 130, 92-98.

Verweij, F.J., van Eijndhoven, M.A., Hopmans, E.S., Vendrig, T., Wurdinger, T., Cahir-McFarland, E., Kieff, E., Geerts, D., van der Kant, R., Neefjes, J., *et al.* (2011). LMP1

association with CD63 in endosomes and secretion via exosomes limits constitutive NF-kappaB activation. *The EMBO journal* 30, 2115-2129.

Vulliet, P.R., Greeley, M., Halloran, S.M., MacDonald, K.A., and Kittleson, M.D. (2004). Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet* 363, 783-784.

Wang, B., Wu, S.M., Wang, T., Liu, K., Zhang, G., Zhang, X.Q., Yu, J.H., Liu, C.Z., and Fang, C.C. (2012a). Pre-treatment with bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibits systemic intravascular coagulation and attenuates organ dysfunction in lipopolysaccharide-induced disseminated intravascular coagulation rat model. *Chin Med J (Engl)* 125, 1753-1759.

Wang, L., Fan, J., Chen, S., Zhang, Y., Curiel, T.J., and Zhang, B. (2013). Graft-versus-host disease is enhanced by selective CD73 blockade in mice. *PloS one* 8, e58397.

Wang, S., Qu, X., and Zhao, R.C. (2012b). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Journal of hematology & oncology* 5, 19.

Wegmeyer, H., Broske, A.M., Leddin, M., Kuentzer, K., Nisslbeck, A.K., Hupfeld, J., Wiechmann, K., Kuhlen, J., von Schwerin, C., Stein, C., *et al.* (2013). Mesenchymal stromal cell characteristics vary depending on their origin. *Stem cells and development* 22, 2606-2618.

Wei, X., Yang, X., Han, Z.P., Qu, F.F., Shao, L., and Shi, Y.F. (2013). Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta pharmacologica Sinica* 34, 747-754.

Wood, J.P., Ellery, P.E., Maroney, S.A., and Mast, A.E. (2014). Biology of tissue factor pathway inhibitor. *Blood* 123, 2934-2943.

Wuchter, P., Bieback, K., Schrezenmeier, H., Bornhauser, M., Muller, L.P., Bonig, H., Wagner, W., Meisel, R., Pavel, P., Tonn, T., *et al.* (2015). Standardization of Good Manufacturing Practice-compliant production of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells for immunotherapeutic applications. *Cytotherapy* 17, 128-139.

Wurtz, M., Hvas, A.M., Christensen, K.H., Rubak, P., Kristensen, S.D., and Grove, E.L. (2014). Rapid evaluation of platelet function using the Multiplate(R) Analyzer. *Platelets* 25, 628-633.

Xie, Q.P., Huang, H., Xu, B., Dong, X., Gao, S.L., Zhang, B., and Wu, Y.L. (2009). Human bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into insulin-producing cells upon microenvironmental manipulation in vitro. *Differentiation; research in biological diversity* 77, 483-491.

Xu, C., Wang, H., He, H., Zheng, F., Chen, Y., Zhang, J., Lin, X., Ma, D., and Zhang, H. (2013). Low expression of TFPI-2 associated with poor survival outcome in patients with breast cancer. *BMC cancer* 13, 118.

Yegutkin, G.G., Wieringa, B., Robson, S.C., and Jalkanen, S. (2012). Metabolism of circulating ADP in the bloodstream is mediated via integrated actions of soluble

adenylate kinase-1 and NTPDase1/CD39 activities. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26, 3875-3883.

Yin, P.T., Han, E., and Lee, K.B. (2016). Engineering Stem Cells for Biomedical Applications. *Advanced healthcare materials* 5, 10-55.

Zanetti, A., Grata, M., Etling, E.B., Panday, R., Villanueva, F.S., and Toma, C. (2015). Suspension-Expansion of Bone Marrow Results in Small Mesenchymal Stem Cells Exhibiting Increased Transpulmonary Passage Following Intravenous Administration. *Tissue engineering Part C, Methods* 21, 683-692.

Zeddou, M., Relic, B., and Malaise, M.G. (2014). Umbilical cord fibroblasts: Could they be considered as mesenchymal stem cells? *World journal of stem cells* 6, 367-370.

Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., and Hedrick, M.H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell* 13, 4279-4295.

Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., and Hedrick, M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering* 7, 211-228.

6 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname:	Netsch Philipp
Geburtsdatum:	13.08.1990
Geburtsort:	Wertheim
Familienstand:	ledig
Vater:	Dr. rer. nat. Wolfgang Netsch
Mutter:	Annette Netsch

SCHULISCHER WERDEGANG

2000 – 2009	Balthasar- Neumann- Gymnasium Marktheidenfeld
12.06.2009	Abitur (1,3)

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2009/10	Beginn des Studiums der Humanmedizin An der medizinischen Fakultät Mannheim der Ruprecht- Karls- Universität Heidelberg
21.09.2011	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1,5)
2014 – 2015	Masterarbeit: „Establishing a Protocol to determine Mesenchymal Stromal Cell Influence on Platelet Activation“
17.07.2015	Master of Medical Translational Research (1,6)
29.11.2016	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1,5)
Publikationen	Bieback, K., und Netsch, P. (2015). Isolation, culture and characterization of human umbilical cord blood-derived Mesenchymal Stromal Cells (CB-MS). In Mesenchymal Stem Cells, Methods and Protocols, P. Massimiliano Gnecchi MD, ed. (New York: Springer). Masterarbeit: „Establishing a Protocol to determine Mesenchymal Stromal Cell Influence on Platelet Activation“ (2015)

Abstracts

Poster

P044 bei der dritten Jahrestagung des German Stem Cell Network (GSCN) 9.-11. September 2015, Frankfurt am Main: Mesenchymal stromal cells can inhibit platelet activation

Vortrag

FV-04-7 beim 48. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI), 15.-18. September 2015, Basel: The influence of mesenchymal stromal cells on platelet activation

Eingeworbene Mittel

Stipendium der deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunologie

DANKSAGUNG

Frau Prof. Dr. rer. nat. K. Bieback danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten, für die Durchsicht und die vielen Hinweise, die zur Vollendung derselben notwendig waren.

Außerdem danke ich allen Kollegen aus dem Labor, die an dieser Arbeit beteiligt waren:

Allen voran Stefanie Uhlig und Susanne Elvers-Hornung, die mich mit viel Geduld in die Arbeit im Labor eingeführt haben und durch deren Hilfe mir die Arbeit an diesem umfangreichen Projekt neben den vielen anderen Verpflichtungen immens erleichtert und vielleicht sogar erst ausreichend ermöglicht wurde.

Weiterhin danke ich Prof. Peter Bugert und seiner Arbeitsgruppe (hier besonders Gabi Rink, Katharina Kemp und Dr. Angelika Schedel) für die Unterstützung mit Expertise und Material im Bereich Thrombozyten.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch für die zahllosen Blutspenden aller Kollegen sowie für die anonymen Spenden aller anderen genutzten Zellpopulationen (besonders der MSC) bedanken.

Weiterer Dank gebührt der Stiftung der deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunologie, deren großzügiges Stipendium meine Arbeit über die letzten vier Jahre unterstützt hat.

Zuletzt bedanke ich mich für den Rückhalt durch meine Freunde und Familie, der sicherlich einen ebenso großen Anteil an der Vollendung dieser Arbeit hatte, wie der fachliche.