

Optimierung der Kulturbedingungen zur Expansion humaner mesenchymaler Stromazellen

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der
RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Gudrun Walenda, geb. Bokermann

aus Bielefeld

Berichter: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. rer. nat. Wolfgang Wagner
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Martin Zenke

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2013

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	II
1 EINLEITUNG	1
1.1 Stammzellen	1
1.2 Mesenchymale Stromazellen	2
1.2.1 Charakterisierung mesenchymaler Stromazellen <i>in vitro</i>	3
1.2.2 Interaktion von MSC mit anderen Zelltypen	4
1.2.3 Klinischer Einsatz humaner MSC	5
1.2.4 Replikative Seneszenz kultivierter MSC	6
1.3 Isolation und Kultivierung humaner MSC	7
1.3.1 Heterogenität von MSC-Kulturen	7
1.3.2 Humanes Plättchenlysate als Mediumzusatz zur Expansion von MSC	8
1.3.3 Heparine als Zusatzstoffe in HPL-Medium	9
1.3.4 Dreidimensionale Matrizen zur MSC-Kultivierung	10
1.3.5 Fibringele aus HPL zur Expansion humaner MSC	11
1.4 Transformierender Wachstumsfaktor-β	12
1.4.1 TGF- β Signalweg	13
1.4.2 Spezifische Wirkung von TGF- β	14
2 ZIELE DIESER ARBEIT	16
3 MATERIAL UND METHODEN	17
3.1 Methoden zur Zellkultivierung	17
3.1.1 Ethik	17
3.1.2 Isolation humaner MSC aus Knochenmark	17
3.1.3 Isolation humaner dermaler Fibroblasten	18
3.1.4 Herstellung von humanem Plättchenlysate	18

3.1.5	Herstellung von HPL-Gelen	18
3.1.6	Elastizitätsmessungen von HPL-Gelen	18
3.1.7	Herstellung von Kollagengelen	19
3.1.8	Herstellung von Fibringelen aus Fibrinogen	19
3.1.9	Passagieren von MSC und Bestimmung der kumulativen Gesamtzellzahl	20
3.1.10	<i>In vitro</i> Differenzierungen	20
3.2	Analysemethoden der Zellproliferation	21
3.2.1	MTT-Proliferationsassay	21
3.2.2	BrdU-Proliferationsassay	22
3.2.3	Kernfärbung von MSC mit DAPI	22
3.3	Färbungen zur Mikroskopie und Durchflusszytometrie	22
3.3.1	Histologische Analyse von MSC auf HPL-Gelen	22
3.3.2	Kombinierte FDA- und PI-Färbung zur Quantifizierung vitaler und toter MSC	23
3.3.3	Rasterelektronenmikroskopie von MSC auf HPL-Gelen	23
3.3.4	Nachweis der seneszenzassoziierten β -Galactosidaseaktivität	23
3.3.5	Färbung von Triglyceriden mit BODIPY	23
3.3.6	Färbung von Calciumphosphat mit Alizarinrot S	24
3.3.7	Färbung von Glycosaminoglycanen mit Alcianblau	24
3.3.8	Durchflusszytometrische Analyse des Immunphänotyps	24
3.3.9	Zellzyklusanalyse	25
3.4	Molekularbiologische Methoden	25
3.4.1	Relative Zytokinquantifizierung humaner Plättchenlysate	25
3.4.2	TGF- β 1 Inkubation für Genexpressionsanalysen	26
3.4.3	RNA-Isolation	26
3.4.4	cDNA-Synthese und Real Time PCR	26
3.4.5	RNA-Qualitätskontrolle	28
3.4.6	Microarray Analyse	28
3.4.7	DNA-Isolation, Bisulfidkonversion, Pyrosequenzierung	28
3.5	Mathematische und bioinformatische Analysemethoden	29
3.5.1	Vorhersage von cPD und Passagenzahl anhand der DNA-Methylierung	29
3.5.2	Statistik	29
3.5.3	Bioinformatische Auswertung der Microarray Daten	29
4	ERGEBNISSE	31
4.1	Individuelle humane Plättchenlysate zur MSC-Expansion	31
4.1.1	Isolation und Charakterisierung von MSC mit FCS und individuellem HPL	31
4.1.2	Einfluss individueller Plättchenlysate auf MSC-Langzeitkultivierung	33

4.1.3	Einfluss individueller Plättchenlysate auf MSC-Proliferation	34
4.1.4	Zytokinprofile individueller Plättchenlysate	36
4.2	Entwicklung von HPL-Fibringelen zur Kulturexpansion humaner MSC	40
4.2.1	Charakterisierung von HPL-Gelen zur MSC-Kultivierung	40
4.2.2	Kultivierung auf HPL-Gelen steigert die MSC-Proliferation	42
4.2.3	Optimierung der Passagiermethode zur MSC-Expansion auf HPL-Gelen	44
4.2.4	Charakterisierung von auf HPL-Gelen expandierten MSC	45
4.3	Wirkung der Antikoagulantia Heparin und Enoxaparin in HPL-Medium auf die MSC-Vitalität	49
4.3.1	Heparin und Enoxaparin reduzieren die MSC-Proliferation	49
4.3.2	Hohe Konzentrationen an Heparin und Benzylalkohol wirken zytotoxisch	51
4.4	Analyse des Effekts von TGF-β1 auf MSC Langzeitkulturexpansion und spezifische Reaktion auf TGF-β1 in früher und später Passage	53
4.4.1	Evaluierung geeigneter Stimulationsbedingungen	53
4.4.2	TGF- β 1 beeinflusst die MSC-Morphologie und ihr adipogenes und osteogenes Differenzierungspotential	54
4.4.3	TGF- β 1 stimuliert die MSC-Proliferation	58
4.4.4	Langzeitwirkung von TGF- β 1 auf MSC-Expansion und Seneszenz	59
4.4.5	Einfluss von TGF- β 1 auf epigenetische seneszenzassoziierte Marker in MSC	62
4.4.6	Hohe Korrelation differentiell exprimierter Gene in MSC früher und später Passage nach TGF- β 1 Stimulation	64
4.4.7	Assoziation zu GO-Termini und KEGG-Signalwegen	68
5	DISKUSSION	70
5.1	Individuelle Plättchenlysate eignen sich zur effizienten Isolation und Expansion humaner MSC	70
5.2	Humane Plättchenlysategele als neues Substrat zur MSC-Kultur	74
5.3	Antikoagulantia und Konservierungsstoffe zeigen antiproliferative und zytotoxische Wirkung auf MSC	77
5.4	Spezifischer Einfluss von TGF-β1 auf MSC-Expansion und zelluläre Alterung	78
5.5	Ausblick	82

6	LITERATUR	86
7	ANHANG	98
7.1	Tabellen	98
7.2	Heatmaps	98
8	ABKÜRZUNGEN	109
9	DANKSAGUNG	111
10	LEBENS LAUF	112
11	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	113

Zusammenfassung

Mesenchymale Stromazellen (MSC) sind aufgrund ihres mesodermalen Differenzierungspotentials und ihrer immunsuppressiven Eigenschaften zu klinischen Transplantationen beispielsweise bei Knochen- und Bindegewebserkrankungen oder Autoimmunerkrankungen geeignet. Für die *in vitro* Expansion und Manipulation der MSC werden verschiedene Substrate und Medien verwendet und dadurch die Heterogenität und Charakteristika von MSC beeinflusst. Bislang stehen noch keine optimalen Kulturbedingungen zur MSC-Expansion zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde das Potential von humanem Plättchenlysate (HPL) als allogener Mediumzusatz und die Wirkung des transformierenden Wachstumsfaktors (TGF)- β 1 auf die MSC-Kulturexpansion systematisch untersucht. Dazu wurde ihr Einfluss auf MSC-Charakteristika wie Vitalität, Proliferation, Differenzierungspotential und replikative Seneszenz analysiert. In einer Testreihe mit individuellen Plättchenlysaten konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass diese eine hohe Variabilität in der Förderung der MSC-Proliferation aufwiesen, welche mit ihrer Zytokinkonzentration an PDGF-AB und IGFBP1/2 positiv korrelierte. Dennoch unterstützte jedes der Lysate die Charakteristika der MSC und trug zur effizienten Expansion bei. Da in HPL Fibrinogen und Gerinnungsfaktoren enthalten sind, ist der Zusatz von Antikoagulantia wie Heparin zu HPL-Medium erforderlich, um eine Koagulation zu verhindern. In dieser Arbeit wurde eine verbesserte Proliferation der MSC durch Verwendung einer möglichst niedrigen Konzentration (0,61 IU/mL) an konservierungsmittelfreiem Heparin erzielt. Heparin zeigte antiproliferative und in hoher Konzentration (625 IU/mL) zytotoxische Effekte, was durch den Zusatz des Konservierungsstoffs Benzylalkohol verstärkt wurde. Koaguliertes HPL-Medium wurde zusätzlich als ein dreidimensionales Substrat zur Isolation und effizienten mehrschichtigen Kulturexpansion von MSC etabliert. Zur Vereinfachung der Zellkultivierung erlaubte die Gelviskosität darüber hinaus eine nichtenzymatische Passagiermethode durch Fragmentierung des Gels. Weiterhin wurde die MSC-Proliferation durch Zusatz von rekombinantem TGF- β 1 kurzfristig gesteigert. TGF- β 1 zeigte zusätzlich einen reversiblen Effekt auf die MSC-Morphologie und eine Beeinträchtigung der adipogenen und osteogenen Differenzierung. Eine vergleichende transkriptomumfassende Untersuchung des Effekts von TGF- β 1 auf MSC in früher und später Passage verdeutlichte, dass die Reaktion auf TGF- β 1 durch Kulturexpansion nicht verändert wird. Zusammenfassend liefern die Ergebnisse dieser Arbeit wichtige Erkenntnisse, die zu einer weiter optimierten *in vitro* Kulturexpansion von MSC beitragen.

Summary

Mesenchymal stromal cells (MSC) show a mesodermal differentiation and immunosuppressive potential and are suitable for various clinical applications like for treatment of bone and connective tissue disorders or autoimmune diseases. Different substrates and media are used for *in vitro* expansion and manipulation of MSC, but they may affect MSC-heterogeneity and characteristics. Currently, there are no optimal culture conditions available for MSC. In this work, the properties of the culture-media supplement human platelet lysate (HPL) and the effect of transforming growth factor (TGF)- β 1 on MSC-culture-expansion was systematically tested. Therefore, their effects on MSC-characteristics like vitality, expansion, differentiation potential and replicative senescence were analyzed. An examination of individual platelet lysates for MSC-culture revealed high variations in their potential to support MSC-proliferation, which showed a positive correlation to the PDGF-AB and IGFBP1/2 cytokine concentrations of the platelet lysates. Nevertheless, each individual HPL supported MSC-characteristics and was suitable for efficient MSC-expansion. An improvement of MSC-proliferation could be achieved by using preferably low concentrations of preservative-free heparin (0.61 IU/mL). This anti-coagulant is necessary to prevent coagulation of HPL-media, but showed an anti-proliferative and in high concentrations (625 IU/mL) a cytotoxic effect that was enhanced by benzyl alcohol as a preservative. On the basis of its content of fibrinogen and factors of the coagulation cascade coagulated HPL-media, could be further established as a more efficient three-dimensional substrate for the isolation and multi-layered and rapid culture-expansion of MSC. The viscosity allowed for a non-enzymatic passaging method by fragmentation of the gel, thereby facilitating this critical cell-culture step. MSC-proliferation could be further promoted over a short period by addition of recombinant TGF- β 1. Yet, TGF- β 1 induced reversible changes in MSC growth-pattern and impaired adipogenic and osteogenic differentiation. A comparative transcriptome-wide analysis of the effect of TGF- β 1 on MSC of early and late passage additionally indicated that culture-expansion does not change the response towards this cytokine. Taken together, the results of this thesis offer valuable information that can be used for further optimization of MSC-culture-expansion.

1 Einleitung

1.1 Stammzellen

Stammzellen sind nicht ausdifferenzierte Körperzellen, die sich durch asymmetrische Zellteilungen sowohl ‚selbsterneuern‘, d.h. ihre Stammzeleigenschaften beibehalten, und eine weiter differenzierte Tochterzelle bilden können (Clevers, 2005). Als totipotent werden bei höheren Tierarten Zellen der Zygote bezeichnet, da aus ihnen sämtliche intra- und extraembryonalen Gewebe und die Keimzellen gebildet werden. Die Zellen der inneren und äußeren Zellmasse der Blastozyste (Epiblast und Hypoblast) sind pluripotent und bilden die Keimbahnen Ektoderm, Mesoderm und Endoderm. Aus weiteren Zellteilungen zu sogenannten multipotenten, tripotenten, bipotenten und unipotenten Vorläuferzellen entstehen die ausdifferenzierten Zellen und Gewebe (Young und Black, Jr., 2004). Aus pluripotenten humanen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen), die erstmals von Thomson 1998 aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen und als Zelllinien etabliert werden konnten, ist es aufgrund ihrer Pluripotenz theoretisch möglich, alle Körperzellen und Gewebe *in vitro* zu züchten und beispielsweise Patienten als Ersatz zu defekten Zellen z.B. bei Diabetes oder Parkinson zu transplantieren (Thomson et al., 1998). Da ES-Zellen jedoch *in vitro* chromosomal instabil sind, besteht eine hohe Gefahr der Teratombildung *in vivo* (Hanson und Caisander, 2005). Zudem ist die Arbeit mit ES-Zellen ethisch umstritten, unter anderem weil sie aus menschlichen Embryonen gewonnen werden (de Wert und Mummery, 2003).

Während der Embryogenese bleiben einige wenige Zellen mit Stammzeleigenschaften erhalten, die zum Erhalt und zur Regeneration von Geweben beitragen. Einige dieser Vorläuferzellen können nur gewebespezifisch unipotent differenzieren, und werden als *lineage committed* (auf eine Verwandtschaft festgelegt) bezeichnet. Beispiele hierfür sind Myoblasten und neuronale Vorläuferzellen. Im Gegensatz dazu werden hämatopoetische Stammzellen (HSC) des Knochenmarks als multipotent bezeichnet, da aus ihnen alle Blutzellen gebildet werden können. Als Beispiele für bi- und tripotente Vorläuferzellen gelten Adipofibroblasten und mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks (Young und Black, Jr.,

2004). Es ist umstritten, ob Vorläuferzellen zu Zellen anderer Gewebe reprogrammiert werden können, ein Vorgang, der auch als Transdifferenzierung bekannt ist. Es gibt Indizien, dass beispielsweise Knochenmarkszellen zu Neuronen differenzieren oder neuronales Stützgewebe bilden. Andere Forschungsergebnisse belegen jedoch, dass in den scheinbar transdifferenzierten Zellpräparationen andere pluripotente Stammzellen enthalten sein können (Young und Black, Jr., 2004).

Aus adulten Zellen können *in vitro* wieder pluripotente Zellen generiert werden, wenn sie mit einer Kombination bestimmter embryonaler Transkriptionsfaktoren wie OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC oder OCT4, SOX2, NANOG, und LIN28 reprogrammiert werden. Diese als induzierte Pluripotente Stammzellen (iPS) bezeichneten Zellen, welche zuerst von Takahashi und Yamanaka (Takahashi et al., 2007) entwickelt wurden, sind wie ES-Zellen in der Lage, zu Zellen jedes Keimblatts zu differenzieren. IPS-Zellen können als krankheitsspezifische Modellzellen zur Erforschung verschiedener Krankheiten verwendet werden, bei denen das Untersuchungsmaterial gering ist, wie spinaler Muskelatrophie, Rett-Syndrom, Schizophrenie oder Typ 1 Diabetes (Chen et al., 2012). Zudem eignen sich iPS-Zellen möglicherweise zu Transplantationszwecken. Jedoch ist eine weitere Optimierung der Generierung von iPS-Zellen in Hinblick auf Effektivität und Sicherheit notwendig, da z.B. auch bei iPS-Zell-Linien chromosomale Veränderungen festgestellt werden konnten und ein epigenetisches „Erinnerungsvermögen“ (*epigenetic memory*) ihr Potential beeinflussen kann (Drews et al., 2012).

1.2 Mesenchymale Stromazellen

Mesenchymale Stromazellen (MSC) sind Zellen des mesenchymalen Stützgewebes und finden sich in Fettgewebe, Knochenmark, Nabelschnur, Gehirn, Muskelgewebe und der Zahnpulpa (Horwitz et al., 2005). Sie wurden erstmals Anfang der 1970er Jahre von A.J. Friedenstein charakterisiert (Friedenstein et al., 1974; Friedenstein et al., 1976). MSC werden alternativ auch als mesenchymale Stammzellen bezeichnet, da sie eine Subfraktion multipotenter Vorläuferzellen enthalten. Sie weisen ein mesodermales Differenzierungspotential zu Zelltypen wie Fett-, Knochen- und Knorpelzellen auf. Umstritten ist, ob MSC auch keimblattübergreifend transdifferenzieren können. Untersuchungen die unter anderem eine Differenzierung zu Neuronen, Hepatozyten, Endothelzellen oder Epithelzellen nachwiesen, waren teilweise nicht reproduzierbar, wiesen anstelle von

Transdifferenzierung Zellfusionen mit kokultivierten Zellen nach oder stützten sich auf unzureichende Differenzierungsmarker (Phinney und Prockop, 2007; Barzilay et al., 2009).

1.2.1 Charakterisierung mesenchymaler Stromazellen *in vitro*

Die Charakterisierung von MSC erfolgt nach Empfehlungen der *International Society for Cellular Therapy* anhand ihrer Plastikadhäsion, ihres spezifischen Immunophänotyps und des *in vitro* Differenzierungspotentials (Horwitz et al., 2005). Ein eindeutiger Oberflächenmarker zur Identifizierung von MSC ist nicht bekannt. Sie können jedoch anhand der Kombination von exprimierten Markern wie CD29, CD44, CD49a-f, CD51, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166 und Stro1 und nicht exprimierten Oberflächenmolekülen wie CD45, CD14, CD11b, CD79 α , CD19, HLA-DR und CD34 charakterisiert werden, wobei letzterer in MSC aus Fettgewebe exprimiert sein kann (Dominici et al., 2006). Das *in vitro* Differenzierungspotential wird hauptsächlich anhand der adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierung nachgewiesen. Während der adipogenen Differenzierung lässt sich eine Hochregulation der Expression spezifischer Gene nachweisen, wie u.a. *peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR- γ) 2*, *CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) alpha* und *fatty acid binding protein 4 (FABP4)*, wohingegen Osteopontin (*SPP1*), Osteocalcin (*BGLAP*) und *run-related transcription factor 2 (RUNX2)* bei der osteogenen Differenzierung verstärkt exprimiert werden. Für die chondrogene Differenzierung ist eine verstärkte Genexpression der Kollagene I und II (*COL1A1* und *COL2A1*) und Aggrecan (*ACAN*) messbar (Siersbaek et al., 2010; Arnsdorf et al., 2010; Lee und Im, 2010; Polini et al., 2011; Merceron et al., 2011; Rippon et al., 2013). Zum Ende der Differenzierung sind deutliche Veränderungen in der MSC-Kultur lichtmikroskopisch nachweisbar. Adipogen differenzierten MSC weisen mit Triglyceriden gefüllte Vakuolen auf, wohingegen osteogen differenzierte MSC Calciumphosphat und chondrogen differenzierte MSC Mucopolysaccharide extrazellulär ablagern (Pittenger et al., 1999).

Mesenchymale Stromazellen

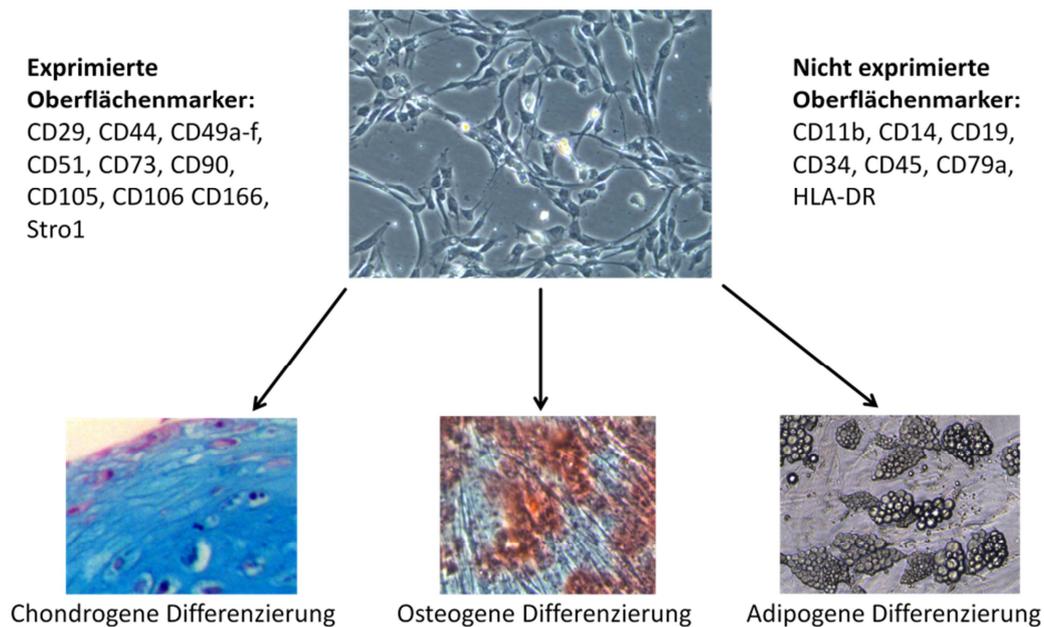


Abbildung 1: Die Charakterisierung von MSC erfolgt anhand ihrer Plastikadhärenz, der Expression spezifischer Oberflächenmarker und ihrer *in vitro* Differenzierungskapazität zu chondrogenen, osteogenen und adipogenen Linien. (Nachweis von Proteoglykanen bei chondrogener Differenzierung mit Alcianblau und Gegenfärbung mit Nuclear Fast Red; Nachweis von Calciumphosphat bei osteogener Differenzierung mit Alizarinrot S; Nachweis von Fetttropfchen bei adipogener Differenzierung durch Phasenkontrastmikroskopie.

1.2.2 Interaktion von MSC mit anderen Zelltypen

MSC können mit anderen Zelltypen über parakrine Faktoren und Zell-Zell-Kontakte interagieren. So sezernieren MSC beispielsweise die Zytokine EGF, VEGF- α , IGF-1, KGF, Angiopoietin-1, CXCL-12, MIP-1 α und - β und Erythropoetin, die auf unterschiedliche Zelltypen wie Keratinozyten, Endothelzellen und hämatopoetische Zellen bei Kokultivierung mit MSC *in vitro* proliferations- oder migrationsfördernd wirken. MSC üben zudem einen modulatorischen Einfluss sowohl auf das angeborene als auch das adaptive Immunsystem aus, wobei sie z.B. Proliferation, die spezifische Wirkung und Migration von T- und B-Zellen, NK-Zellen, dendritischen Zellen, Neutrophilen und Monozyten beeinflussen. Dieser Einfluss kann über Zell-Zell-Kontakte oder sezernierte Botenstoffe wie Indoleamin 2,3-Dioxygenase, Prostaglandin E2, Stickoxid, HLA-G, (TGF)- β , Interferon- γ oder Interleukin (IL)-1 β erfolgen (Sensebe et al., 2009; Shi et al., 2011; Le Blanc K. und Mougiakakos, 2012). *In vivo* zeigte sich der Einfluss von MSC auf andere Zellen nach Transplantationen anhand erhöhter Angiogenese und verbesserter Wundheilung u.a. durch Rekrutierung von Endothelzellen (Chen et al., 2008; Herdrich et al., 2008). Darüber hinaus interagieren MSC über

Oberflächenrezeptoren wie z.B. Integrin- β 1 mit hämatopoetischen Stammzellen, mit denen sie sich *in vivo* in der sogenannten Stammzellnische des Knochenmarks befinden, und fördern sowohl deren Selbsterneuerungskapazität und Erhalt der Stammzellcharakteristika (Huang et al., 2007; Docheva et al., 2007; Walenda et al., 2010; Mendez-Ferrer et al., 2010).

1.2.3 Klinischer Einsatz humaner MSC

Der therapeutische Einsatz von MSC ist in Hinblick auf ihre Differenzierungskapazität, regenerationsfördernden Eigenschaften und ihren suppressiven Einfluss auf das Immunsystem Gegenstand aktueller klinischer Forschung. Allein in der ersten Hälfte von 2013 waren über 300 klinische Studien der Phasen I („*safety*“) und II („*proof of concept for efficacy*“) zum Einsatz von MSC bei verschiedenen Krankheitsbildern gelistet (U.S.National Institutes of Health, 2013). Insbesondere aufgrund ihres Differenzierungspotentials ist ein Einsatz in der Gewebekonstruktion (*Tissue Engineering*) von Knochen, Knorpel, Knochenmarkstroma, Sehnen, Fett und anderer Bindegewebe bei Knochen- und Bindegewebserkrankungen von Interesse. Wegen ihres positiven Einflusses auf die Angiogenese oder die Proliferation und Differenzierung endogener Progenitorzellen wird die Applikation von MSC bei Herzerkrankungen, Diabetes, gastrointestinalen und neurodegenerativen Erkrankungen getestet. Aufgrund ihrer immunsuppressiven Eigenschaften wird zudem untersucht, ob applizierte MSC beispielsweise *graft-vs-host disease* (GvHD) oder Multiple Sklerose lindern können (Phinney und Prockop, 2007; Sensebe et al., 2009; Al Battah F. et al., 2011; Trounson et al., 2011). MSC sind weiterhin als *feeder cells* (Fütterzellen) zur HSC-Expansion *in vitro* zu klinischen Transplantationszwecken nach Chemotherapie geeignet (Walenda et al., 2011b).

Ein mögliches Risiko der mesenchymalen Stammzelltransplantation stellt die potentielle Immortalisierung oder Transformation von MSC dar. Ebenso gibt es Hinweise, dass MSC in Geweben unerwünscht differenzieren können. Karyotypische Untersuchungen langzeitkultivierter humaner MSC weisen darauf hin, dass sie eine nur geringe genomische Instabilität besitzen (Torsvik et al., 2010; Garcia et al., 2010). Ein weiteres ein Risiko besteht darin, dass MSC durch ihre immunsuppressiven Eigenschaften das Wachstum von Tumoren fördern können (Bernardo und Fibbe, 2012), oder dass MSC in Geweben unerwünscht differenzieren (Torsvik et al., 2010; Garcia et al., 2010). Des Weiteren besteht für den Einsatz von MSC wie bei allen zellbasierten Produkten ein Infektionsrisiko durch das

Ausgangsmaterial, wie durch Erkrankungen des Spenders oder infektiöses Kulturmedium. Die Gewinnung von MSC zum klinischen Einsatz wird daher in den USA und in der Europäischen Union streng durch die *Current Good Tissue Practice* (CGTP) bzw. der Direktive 2004/23/EC zur Festlegung von Qualitäts- und Sicherheitsstandards, besonders zu Methoden, Einrichtungen und Kontrollen reguliert (Europäische Union, 2004; Sensebe et al., 2009).

1.2.4 Replikative Seneszenz kultivierter MSC

Autosomale diploide Zellen können sich nur begrenzt teilen und gehen dann in einen nicht-proliferativen Zustand über, was erstmals von Hayflick 1961 beschrieben wurde und als *Hayflick Limit* bekannt ist (Hayflick L. und Moorhead P.S., 1961). Die Mechanismen dieser zellulären replikativen Seneszenz sind noch nicht vollständig geklärt. Sie gehen jedoch mit einer Verkürzung der repetitiven DNA-Sequenzen am Ende der linearen Chromosomen, der Telomere, einher, die bei jeder Zellteilung stattfindet. Dabei führen kurze, ungeschützte Telomere zu einem irreversiblen Stopp der Zellteilung (Shay und Wright, 2000). Weitere Faktoren, die eine Zellalterung hervorrufen können, sind UV-Strahlung, oxidativer Stress oder γ -Strahlen (Chen et al., 1995; Toussaint et al., 2002).

MSC bilden auf Zellkulturplastik (*tissue culture plastic*; TCP) Kolonien, aus denen sich die Zellen unter optimalen Bedingungen bis zu 50 Mal verdoppeln können, bevor sie seneszent werden (Colter et al., 2001). Seneszente MSC weisen eine veränderte, als „fried egg“ (Spiegelei) bezeichnete, flächige Morphologie auf und haben ein verringertes *in vitro* Differenzierungspotential. Des Weiteren exprimieren MSC im seneszenten Zustand spezifisch die seneszenzassoziierte β -Galaktosidase (SA- β -Gal), die ihre Aktivität im Gegensatz zur sauren β -Galaktosidase bei pH-6 zeigt. In langzeitkultivierten MSC wurden spezifische Veränderungen in der Genexpression nachgewiesen. So konnte gezeigt werden, dass die verstärkte Expression von *cyclin-dependent kinase-inhibitor 2 A* (*CDKN2A*; *p16^{Ink4A}*), *CDKN2B* (*p15^{Ink4B}*) und *phosphate-associated rhoGAP protein-tyrosine* (*PARG1*) und die verminderte Expression von *mini-chromosome maintenance complex component 3* (*MCM3*) und *Pleiotrophin* (*PTN*) als seneszenzassoziierte Marker verwendet werden können. Des Weiteren wurden seneszenzassoziierte Regulationen auf miRNA Ebene und epigenetische Modifikationen, wie die Methylierung von Cytosinresten an spezifischen CpG-sites (CpG-Stellen) des Genoms nachgewiesen (Schallmoser K et al., 2010; Schellenberg et al., 2011). Im

Verlauf der replikativen Alterung von MSC zeigen sich spezifische CpG-sites die z.B. mit den Genen *glutamate receptor metabotropic 7 (GRM7)* und *calcium-sensing receptor (CASR)* assoziiert sind hypermethyliert, wohingegen spezifische CpG-sites der Gene *PRAME family member 2 (PRAMEF2)*, *Selectin P (SELP)*, *Caspase 14 (CASP14)* und *keratin associated protein 13-3 (KRTAP13)* eine Hypomethylierung aufweisen. Diese epigenetischen Veränderungen finden dabei kontinuierlich während der MSC-Replikation *in vitro* statt. Aus diesem Grund können sie als epigenetische Signatur zur Schätzung der kumulativen Verdopplung der Zellpopulation (*cumulative population doublings; cPD*) verwendet werden (Wagner et al., 2008; Koch et al., 2012).

1.3 Isolation und Kultivierung humaner MSC

1.3.1 Heterogenität von MSC-Kulturen

MSC-Präparationen weisen eine hohe Variabilität auf. Die Isolation von MSC erfolgt aufgrund der einfachen Isolierbarkeit häufig aus Knochenmark, Peripherblut, Fettgewebe oder geburtsassoziiertem Gewebe, wie Nabelschnurblut, Plazenta oder *Wharton's Jelly*. Abhängig vom Ursprungsgewebe weisen MSC Unterschiede in der Expression bestimmter Oberflächenmarker auf. Unter anderem zeigen aus Fettgewebe isolierte MSC im Gegensatz zu aus Knochenmark isolierten MSC eine Expression von CD49d, jedoch keine Expression von CD106 (Hass et al., 2011). Zudem unterscheiden sich MSC verschiedener Gewebe in ihrer Pluripotenz. Beispielsweise exprimieren Nabelschnurblut-MSC den Pluripotenzmarker Oct-4 und besitzen ein höheres Differenzierungspotenzial als Knochenmark-MSC (Tondreau et al., 2005; Kern et al., 2006; Schneider et al., 2010; Jackson et al., 2011; Paul et al., 2012). Des Weiteren sind Unterschiede zwischen MSC-Präparationen spenderabhängig. MSC-Präparationen älterer Spender können z.B. weniger gut adipogen differenzieren als von jüngeren Spendern. Auch innerhalb einer MSC Population weisen die Zellen eine starke Heterogenität auf. Eine klonale MSC-Kultur zeigte, dass unter anderem nur 30 % der Klone einer MSC Präparation adipogen, osteogen und chondrogen, jedoch 60 – 80 % osteogen und chondrogen differenzieren (Muraglia et al., 2000). Auch die proliferative Kapazität und Migrationsfähigkeit unterscheidet sich bei MSC-Klonen, und nur wenige MSC besitzen die Möglichkeit zur Selbsterneuerung (Colter et al., 2001; Horn et al., 2008).

Zur Isolation von MSC werden verschiedene Methoden eingesetzt, wie beispielsweise die Isolation mittels Dichtegradientenzentrifugation oder Positiv- und Negativselektion über Oberflächenmarker mittels spezifischer Antikörper. Dadurch können Subpopulationen angereichert werden, die sich in ihren Eigenschaften wie z.B. ihrem Differenzierungspotential unterscheiden. CD133 positiv angereicherte MSC weisen beispielsweise eine höhere Proliferationskapazität auf als MSC, welche durch einfache Plastikadhärenz isoliert wurden (Tondreau et al., 2005). MSC stellen ihre Proliferation ein, wenn sie einen Monolayer gebildet haben und kontaktinhibiert sind. Kontaktinhibition erfolgt hauptsächlich in der Mitte von MSC-Kolonien, wodurch Zelldichte und Häufigkeit von Passagierschritten die Heterogenität der Zellkultur beeinflussen. Dieses zeigt sich ebenfalls an Unterschieden in Proliferation und *in vitro* Differenzierungskapazität (Colter et al., 2000; Sekiya et al., 2002; Cholewa et al., 2011). Des Weiteren nimmt der Anteil kolonienbildender Zellen aufgrund der begrenzten proliferativen Kapazität einzelner Zellen nach den ersten Passagen ab, wodurch eine Selektion schneller proliferierender Zellklone erfolgt und dadurch die Heterogenität reduziert wird (Schellenberg et al., 2011).

1.3.2 Humanes Plättchenlysat als Mediumzusatz zur Expansion von MSC

MSC werden *in vitro* expandiert, um eine hohe Zellzahl zur *in vitro* Manipulation oder klinischen Applikationen zu bekommen. Zur Expansion benötigen MSC Wachstumsfaktoren, die beispielsweise in Serum enthalten sind. Fötale Kälberserum (*fetal calf serum*; FCS) gilt als geeigneter Mediumzusatz, da es reich an Wachstumsfaktoren ist, welche die MSC-Expansion fördern. Da FCS jedoch ein xenogener Zusatz ist, besteht für den klinischen Einsatz ein Sicherheitsrisiko hinsichtlich infektiöser Partikel wie z.B. Prionen oder ungewünschter Immunreaktionen (Sundin et al., 2007; Heiskanen et al., 2007; Sensebe et al., 2009). In der europäischen Union und den USA ist daher nur FCS aus Ländern, die nachweislich frei von boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE) sind, zum Einsatz in klinischen Studien zugelassen (Europäische Union, 2002). Ein weiterer Nachteil von FCS besteht darin, dass die Qualität zur Zellkultivierung stark chargenabhängig ist.

Als allogene Alternativen zu FCS wurden in mehreren Studien humane Zusätze wie humanes Serum (HS), plättchenreiches Plasma (PRP) und HPL zur *in vitro* MSC-Expansion getestet. HPL zeigte in diesen Studien einen deutlichen proliferationsfördernden Effekt im Vergleich zu PRP, HS und FCS (Muller et al., 2006; Schallmoser et al., 2007; Capelli et al., 2007; Bieback et

al., 2009), wobei die *in vitro* Differenzierungskapazität und der Immunphänotyp der MSC beibehalten wurden. HPL wird aus humanen Thrombozytenkonzentraten gewonnen, die durch Apherese mit anschließender Leukozytendepletion aus Spenderblut hergestellt werden und einen Gehalt von mehr als 2×10^{11} Thrombozyten pro Einheit aufweisen (Bundesärztekammer, 2010). Die Herstellung von HPL erfolgt durch mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Thrombozytenkonzentrate, wodurch die Thrombozyten zerplatzen und Wachstumsfaktoren wie bFGF, *platelet-derived growth factor* (PDGF)-AA, AB, BB, *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *endothelial growth factor* (EGF) freigesetzt werden (Schallmoser et al., 2007). Die Überreste der Thrombozytenmembranen können durch Zentrifugation entfernt werden.

Medium mit HPL Zusatz wurde zur Isolation und Expansion von MSC unter *Good Manufacturing Practice* (GMP) konformen Bedingungen angewendet (Capelli et al., 2007). Des Weiteren wurden in HPL-Medium expandierte MSC bereits in klinischen Studien z.B. gegen chronische oder akute refraktäre GVHD ohne auffällige Nebenwirkungen eingesetzt (Bonin et al., 2009; Lucchini et al., 2010). Zur Minimierung der Variation zwischen Plättchenlysaten von Einzelspendern wurden gemischte Plättchenlysate von bis zu 40 bis 50 verschiedenen Spendern als Mediumzusatz zur MSC-Expansion verwendet (Bieback et al., 2009). Es ist jedoch wenig über die Kapazität und Variation individueller Plättchenlysate zur Expansion humaner MSC bekannt. Plättchenlysate von Einzelspendern, welche möglichst histokompatibel zu den Rezipienten oder autolog sind, könnten andererseits ein mögliches Risiko unerwünschter Immunreaktionen vermindern.

1.3.3 Heparine als Zusatzstoffe in HPL-Medium

Weil in HPL Fibrinogen, Thrombin und Gerinnungsfaktoren enthalten sind, wird HPL-Medium standardmäßig das Antikoagulantium Heparin zugesetzt, um eine Polymerisation des Fibrinogens zu Fibrin zu vermeiden (Schallmoser et al., 2007; Hemeda et al., 2013). Heparine bilden eine Mischung von linearen Polysacchariden aus Glukosamin-N-Schwefelsäure und Schwefelsäureestern der Glukuronsäure, die glykosidisch verknüpft sind und variable Kettenlängen (40 bis 50 Zuckereinheiten) und Molekulargewichte (5000 bis 30000 Da) aufweisen. Heparin wirkt über die Bindung an die Serinprotease Antithrombin III und verstärkt dadurch ihre Aktivität. Aktiviertes Antithrombin III inhibiert gerinnungsfördernde Serinproteasen, speziell Thrombin und die Faktoren IXa, Xa, XIa und XIIa (Horlocker und Heit,

1997). Durch chemische oder enzymatische Spaltung der Zuckerketten (Fraktionierung) werden niedermolekulare Heparine mit einer Kettenlänge von 13 bis 22 Zuckern und einem Molekulargewicht von 4000 bis 6500 Da gebildet. Die niedermolekularen Heparine wirken ähnlich wie unfraktioniertes Heparin, zeigen jedoch eine geringere Inhibition von Thrombin (Horlocker und Heit, 1997). Das niedermolekulare Heparin Enoxaparin besteht ebenfalls aus einer Mischung verschiedener Oligosacchariden (Kettenlängen zwischen zehn und 27) und weist ein durchschnittliches Molekulargewicht von 4500 Da auf. Enoxaparin zeigt andere biochemische Eigenschaften als Heparin und wirkt möglicherweise antiproliferativ auf Fibroblasten oder Glattmuskelzellen (Horlocker und Heit, 1997; Fareed et al., 2004). Die Wirkung von fraktioniertem und unfraktioniertem Heparin auf MSC *in vitro* ist noch nicht systematisch untersucht worden, obwohl Heparin auf verschiedene Zellen antiproliferative Wirkung zeigt (Pukac et al., 1997; Newman et al., 2004).

1.3.4 Dreidimensionale Matrizen zur MSC-Kultivierung

Zusätzlich zur Isolationsmethode und dem Kulturmedium werden MSC durch das Substrat, auf dem sie kultiviert werden, beeinflusst. MSC werden standardmäßig auf TCP mit funktionalisierter Polystyrenoberfläche kultiviert. Es konnte gezeigt werden, dass auf TCP kultivierten MSC spontan differenzieren können, wodurch die Stammzeleigenschaften der MSC-Population verloren gehen. Durch spezielle Beschichtungen, Nanostrukturierungen oder Modifikation der Substratelastizität von Zellkulturplastik können die Eigenschaften von MSC verändert werden (McMurray et al., 2011). Eine definierte Strukturierung mit Fibronectin beeinflusste beispielsweise die Zellmorphologie über Regulation von RhoA und die Actin-Myosininteraktion. Eine Fibronectinbeschichtung, durch die MSC adhären und sich ausbreiten konnten, förderte die osteogene Differenzierung, wohingegen eine Fibronectinstrukturierung, die eine runde MSC-Morphologie bewirkte, das adipogene Differenzierungspotential verstärkte (McBeath et al., 2004). Wie unter 1.3.1 beschrieben, bewirkt Kontaktinhibition eine verstärkte MSC-Proliferation am Rand von MSC-Kolonien, und beeinträchtigt dadurch die MSC-Heterogenität, was speziell bei der zweidimensionalen Zellkultur auf TCP eine Rolle spielt (Cholewa et al., 2011).

Statt TCP sind dreidimensionale Matrizen, welche verschiedene Charakteristika der körpereigenen extrazellulären Matrix nachahmen, zum Anwachsen, zur Proliferation und Differenzierung von MSC für verschiedene Applikationen verwendbar. Sie können aus

unterschiedlichen natürlichen und synthetischen Substraten hergestellt werden, wie z.B. Calciumphosphat, Hyaluronsäure, Kollagen, Fibrin, Polyethylenglycol (PEG) oder Polylactiden (PLA). Abhängig vom Material und ihrem Aufbau beeinflusst eine Matrix die Adhäsion oder Mobilität von MSC, speichert Wachstumsfaktoren und beeinflusst je nach Festigkeit die Zelldifferenzierung (Ahmed et al., 2004; Tessmar und Gopferich, 2007; Lee et al., 2008). Eine Matrix aus Kollagenen eignet sich zur osteogenen und chondrogenen Differenzierung von MSC, wohingegen eine Fibrinmatrix die Expression von Glattmuskelactin (SMA) fördert. Mit MSC besiedelte Matrizen aus Calciumphosphat oder Hyaluronsäure können zudem zur Knochen- bzw. Knorpelregeneration transplantiert werden (Caplan, 2007).

1.3.5 Fibringele aus HPL zur Expansion humaner MSC

Fibrin ist ein faserartiges Polymer, welches physiologisch bei der Blutgerinnungskaskade aus Fibrinogen gebildet wird. Fibrinogen wird aus den äußeren D-Domänen gebildet, welche über eine Proteindoppelwendel mit der zentralen E-Domäne verbunden sind. Fibrinogen ist aus den Polypeptidketten $A\alpha$, $B\beta$ und γ zusammengesetzt, welche sich über Disulfidbrücken zusammenlagern und sich N-terminal über die E-Domäne verbinden. Die Peptide A und B werden von den $A\alpha$ - und $B\beta$ -Ketten durch die Protease Thrombin abgespalten, wodurch sich die Proteinkonformation ändert und Bindestellen zur Polymerisation freigelegt werden. Die Fibrinmonomere bilden durch Selbstassoziation ein unlösliches Fibrinnetzwerk, welches durch den Faktor XIIIa der Gerinnungskaskade über die γ -Kette vernetzt wird (Mosesson, 2005) (Abbildung 2).

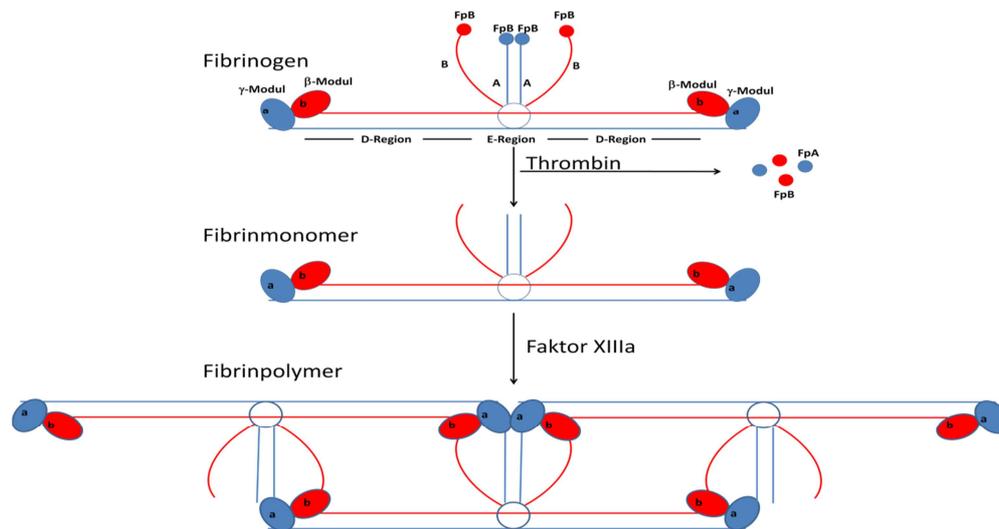


Abbildung 2: Fibrinvernetzung. Thrombin spaltet die Fibrinogenpeptide A und B (FpA/B) von Fibrinogenmonomeren ab. Dadurch werden Bindestellen frei, über die das γ - und β -Modul an die N-terminalen Enden der α - und β -Ketten (A und B) binden kann. Der Faktor XIIIa katalysiert diesen Schritt. Nach (Janmey et al., 2009).

Gele aus Fibrin sind bereits in mehreren Studien zur Zellkultivierung und zur Gewebekonstruktion eingesetzt worden, wobei sich insbesondere ihre Biokompatibilität und Resorbierbarkeit als vorteilhaft erwiesen. Außerdem können Elastizität und Stabilität der Fibringele gezielt moduliert oder spezifische Wachstumsfaktoren eingebettet werden (Barsotti et al., 2011). Fibringele werden aus allogenen aufgereinigten Fibrinogen und Thrombin hergestellt. Humanes PRP aus Thrombozytenkonzentraten ist ebenfalls zur Bildung von Fibringelen geeignet, da es wie HPL Fibrinogen, Thrombin und Gerinnungsfaktoren enthält (Harrison und Cramer, 1993). Gele aus PRP eignen sich insbesondere für die Kultivierung mesodermaler Zellen, wie *human umbilical cord artery smooth muscle cells* (HUVECS) und MSC, da sie proliferationsfördernde Wachstumsfaktoren wie PDGF enthalten und zudem die *in vitro* osteogene Differenzierung von MSC fördern können (van den Dolder J. et al., 2006; Wirz et al., 2011). Weil HPL-Medium ohne Zusatz von Antikoagulantia gleichfalls zu einem Fibringel geliert, ist eine MSC-Kultivierung auf diesen HPL-Gelen denkbar. Das Potential von HPL-Gelen zur MSC-Kulturexpansion und ihre Wirkung auf MSC-Charakteristika wurden bislang nicht getestet.

1.4 Transformierender Wachstumsfaktor- β

Die Familie der transformierenden Wachstumsfaktoren (engl. *transforming growth factor*-(TGF)) besteht bei höheren Tieren aus hochkonservierten Proteinen, die sowohl während

der Embryogenese als auch bei der Gewebemöostase entscheidende Funktionen ausüben. Mitglieder dieser Familie sind unter anderem TGF- β , *bone morphogenetic protein* (BMP), *growth and differentiation factor* (GDF), Nodal und Myostatin. TGF- β tritt bei Säugetieren als Homodimer von 25 kDa in drei strukturell sehr ähnlichen Isoformen (TGF- β 1-3) auf (Massague und Chen, 2000; Massague, 2000; Massague, 2008a).

1.4.1 TGF- β Signalweg

TGF- β wirkt als extrazelluläres Zytokin durch die Bindung an spezifische Membranrezeptoren (TGF- β Rezeptoren Typ I und Typ II), die sich durch die Bindung von TGF- β so gruppieren, dass der Typ II Rezeptor ein intrazelluläres Segment des Typ I Rezeptors phosphoryliert, wodurch der Typ I Rezeptor aktiviert wird und intrazelluläre Rezeptor-Smad-Proteine (R-Smads) an C-terminalen Serin-Resten phosphoryliert. Diese bilden mit dem Smad4-Protein einen Komplex, welcher in den Zellkern transloziert. Dort beeinflusst der Smad-Komplex zusammen mit transkriptionellen Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren die Genexpression (Abbildung 3). Die Wirkung der TGFs auf Zellen kann zum einen extrazellulär durch die Bindung an ihre assoziierten Propeptide (*latency-associated protein* (LAP)) und spezifische sezernierte Glykoproteine (*latent TGF- β -binding proteins* (LTBPs)) wirken. Zum anderen kann sie durch die inhibitorischen Smads6 und 7 oder Degradation der Smad-Komplexe durch E3 Ubiquitin Ligasen reguliert werden (Massague und Chen, 2000; Massague, 2000; Derynck und Zhang, 2003).

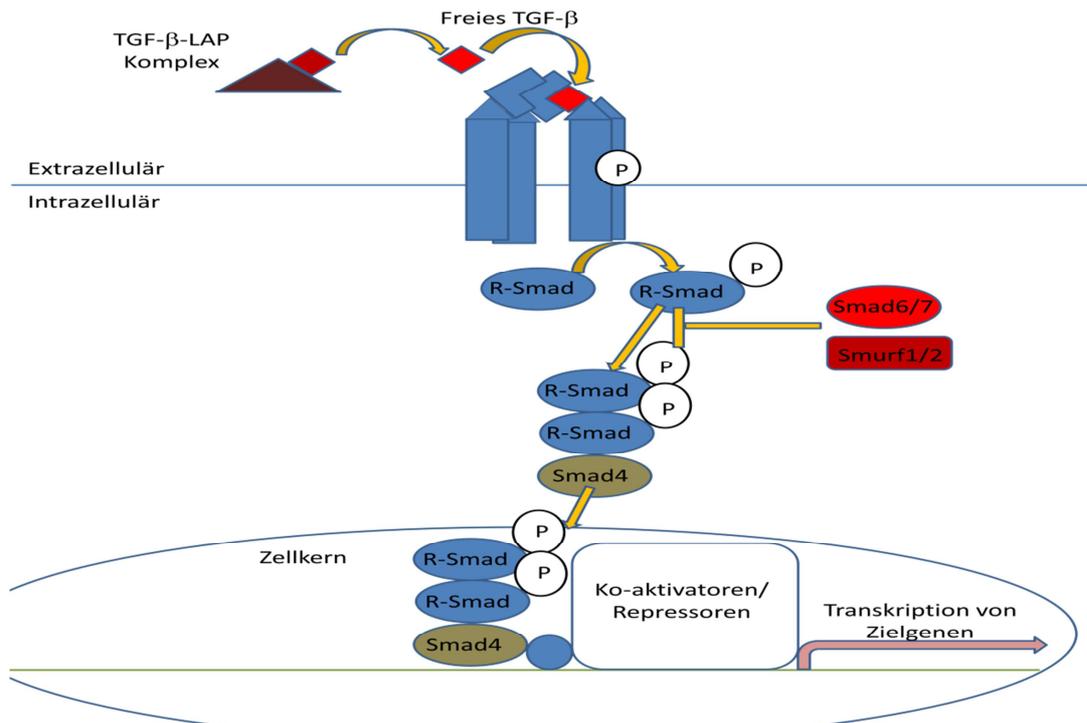


Abbildung 3 Vereinfachtes Schema des TGF- β /Smad Signalwegs. TGF- β 1 bindet extrazellulär an LAP und ist inaktiv. Durch Freisetzung kann es aktiv an spezifische Zellmembranrezeptoren binden. Diese aktivieren spezifische Smad-Proteine, welche Komplexe bilden, die in den Zellkern migrieren und mit Koaktivatoren und Repressoren spezifisch die Genexpression regulieren. Inhibitorische Smads können diesen Signalweg regulieren. Adaptiert aus: Derynck and Zhang, 2003.

1.4.2 Spezifische Wirkung von TGF- β

TGF- β induziert verschiedene Reaktionen, deren Spezifität abhängig vom Zelltyp, der zellulären Umgebung und dem Differenzierungsstatus ist. Die Spezifität wird z.B. über die Interaktion des TGF- β Signalwegs mit anderen Signalwegen wie den Signalkaskaden der *mitogen activated protein kinase* (MAPK), der *Jun N-terminal kinase* (JNK), und des Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR Signalwegs bewirkt. Zudem interagiert der TGF- β 1 Signalweg mit den Signalkaskaden der kleinen GTPasen Rho, Rac, and Cdc42 (Massague und Chen, 2000; Siegel und Massague, 2003; Mu et al., 2012). Der spezifische Einfluss durch die drei TGF- β Isoformen kann unterschiedlich und antagonistisch sein, was unter anderem Beobachtungen zur mesodermalen Zelldifferenzierung und Apoptose nahelegen (Fitzpatrick et al., 1990; Opperman et al., 1997; Fagenholz et al., 2001; James et al., 2009).

Auf verschiedene Zelltypen wie Epithel- und Endothelzellen bewirkt TGF- β 1 eine Arretierung des Zellzyklus in der G₀/G₁-Phase durch verstärkte Expression der *cyclin-dependent kinase* (CDK) Inhibitoren *CDKN2A*, *CDKN2B* und *CDKN1A* und verringerte Expression von *c-Myc* und

der *Inhibitor of DNA-binding/differentiation* (ID) Transkriptionsfaktoren (Siegel und Massague, 2003). Mehrere Studien, belegen, dass TGF- β auch auf mesenchymale Zellen wie MSC zytostatisch wirkt und eine vorzeitige Seneszenz induziert (Fripiat et al., 2001; Debacq-Chainiaux et al., 2005; Ito et al., 2007). Andere Untersuchungen weisen jedoch auf einen wachstumsfördernden Effekt von TGF- β auf MSC hin, wenn dieses einzeln oder in Kombination mit PDGF und *fibroblast growth factor* (FGF) dem Zellkulturmedium zugesetzt wird (Strutz et al., 2001; Ng et al., 2008).

In einigen Zelltypen reguliert TGF- β 1 die Differenzierung. Dies erfolgt beispielsweise durch die Regulation der *ID1-3* Transkriptionsfaktoren (Siegel und Massague, 2003; Peng et al., 2004). In MSC induziert TGF- β 1 unter spezifischen dreidimensionalen Kulturbedingungen die chondrogene Differenzierung (Pittenger et al., 1999), wohingegen MSC unter 2-dimensionalen Kulturbedingungen durch TGF- β 1 Stimulation einen myogenen Phänotyp annehmen und verstärkt glattmuskelspezifische Proteine exprimieren (Gao et al., 2010). Studien legen nahe, dass die adipogene Differenzierung von MSC durch den TGF- β Signalweg inhibiert wird. Die osteogene Differenzierung wird durch TGF- β in der erste Phase der stimuliert und die finale osteogene Differenzierung inhibiert, welche durch die Bildung von Calciumphosphat charakterisiert ist (Koli et al., 2008; Zhao et al., 2010; Kumar et al., 2012).

Wie unter Punkt 1.2.4 dargestellt, verursacht zelluläre Alterung starke physiologische Veränderungen *in vitro* expandierter MSC. Obwohl Studien die spezifische alterungsbedingte Wirkungen von TGF- β auf mesenchymale Zellen und Gewebe nahelegen (McCaffrey und Falcone, 1993; van Beuningen et al., 1994; Edwards et al., 1996; Zeng et al., 1996; Iqbal et al., 2000), sind die molekularen Hintergründe weitgehend unbekannt.

2 Ziele dieser Arbeit

Zur Verbesserung der *in vitro* Kulturbedingungen für MSC sollten verschiedene Mediumzusätze zu ihrer Wirkung auf spezielle MSC-Charakteristika wie Vitalität, Morphologie, Immunphänotyp, trilineares Differenzierungspotential und replikative Seneszenz im Verlauf einer Kulturexpansion getestet werden. Zunächst sollte zur Verbesserung der xenogenfreien MSC-Kultur mit HPL eine Untersuchung individueller Plättchenlysate zeigen, ob sie sich im Vergleich zu FCS zur effizienten Isolation und Expansion von MSC eignen. Eine Quantifizierung ihrer relativen Zytokinkonzentration sollte zusätzlich Aufschluss über die Variation zwischen den Plättchenlysaten geben, um Faktoren zu identifizieren, welche die MSC-Proliferation besonders fördern oder inhibieren. Weiterhin sollte untersucht werden, ob das Antikoagulantium Heparin, welches dem HPL-Medium zur Vermeidung der Koagulation zugesetzt wird, Auswirkung auf MSC-Proliferation und Vitalität zeigt und ob sich das niedermolekulare Heparin Enoxaparin als alternativer Mediumzusatz eignet. Da Antikoagulantialösungen häufig der Konservierungsstoff Benzylalkohol zugesetzt wird, sollte die Wirkung von Benzylalkohol zusätzlich analysiert werden. Fortführend sollte eine Methode zur Expansion von MSC auf koaguliertem HPL-Medium entwickelt werden, um eine mehrschichtige und durch verringerte Kontaktinhibition potentiell schnellere MSC-Proliferation zu erzielen. Zur seriellen Passagierung der auf HPL-Gelen proliferierten Zellen sollte dabei eine enzymatische Degradation des Gels durch die Protease Plasmin mit einer nichtenzymatischen Methode durch mechanische Fragmentierung verglichen werden. Zusätzlich sollten funktionelle Analysen zum Effekt des Zytokins TGF- β 1 auf die MSC-Expansion durch Zugabe von rekombinantem TGF- β 1 durchgeführt werden. Zur Untersuchung, ob sich die Reaktion auf TGF- β 1 im während einer Langzeitkultivierung verändert, sollten Genexpressionsprofile von MSC in früher und später Passage nach TGF- β 1 Stimulation vergleichend untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Methoden zur Zellkultivierung

3.1.1 Ethik

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben wurden nach schriftlichem Einverständnis der Patienten nach Vorgaben und Genehmigung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Aachen (UKA; Genehmigungsnummern EK128/09 für MSC und EK163/07 für Fibroblasten) oder durch die Ethikkommission der Ethikkommission der Universität Heidelberg entnommen (Genehmigungsnummer EK348/2004).

3.1.2 Isolation humaner MSC aus Knochenmark

MSC wurden aus dem Hüftkopf von Patienten, die einer Hüftkopfprothesenoperation unterzogen wurden, gewonnen. Zur Zellisolation wurden die Knochenfragmente mit PBS (PAA, Pasching, Österreich) gespült. Die Zellsuspension wurde durch 100 µm Zellsiebe (BD Falcon, Heidelberg) pipettiert und bei 400xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium aufgenommen und, wenn nicht anders angegeben, in 75 cm² Flaschen ausgesät (Nunc, Roskilde, Dänemark). Alternativ wurden MSC aus humanen Knochenmarkaspiraten am Universitätsklinikum Heidelberg isoliert und nach Erythrozytenlyse mit Ammoniumchlorid mit Zellkulturmedium ausplattiert. Die Zellen wurden bei 37 °C bei 5 % CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Nicht adhärierende Zellen wurden bei zweimal wöchentlichem durchgeführtem Mediumwechsel abgespült. Das Kulturmedium hatte die folgende Zusammensetzung: DMEM-LG (PAA), 2 mM L-Glutamin (Sigma Aldrich, Deisenhofen), 100 U/mL Pen/Strep (Lonza, Basel, Schweiz), 10 % FCS (PAA), alternativ 10 % HPL, 2 IU/mL Heparin (25.000 IU; Ratiopharm, Ulm; bei HPL-Zusatz). Für die Untersuchung zur Wirkung von Antikoagulantia auf die MSC-Expansion wurden Heparin (20.000 IU; ohne Konservierungsstoff; Ratiopharm), Enoxaprin (Clexane 40 mg 0,4 mL Fertigspritzen; Sanofi Aventis, Frankfurt) oder Benzylalkohol (Sigma) in den im Ergebnissteil angegebenen Konzentrationen verwendet.

3.1.3 Isolation humaner dermaler Fibroblasten

Fibroblasten wurden aus Hautproben von Patienten gewonnen, die einer kosmetischen Operation unterzogen wurden, wobei die Isolation und Expansion am Institut für plastische Chirurgie am UKA durchgeführt wurde (Koch et al., 2011). Die Fibroblasten wurden initial in FCS-Medium expandiert und in Passage drei bis fünf in Kulturmedium mit HPL-Zusatz überführt.

3.1.4 Herstellung von humanem Plättchenlysat

Thrombozytenkonzentrate wurden von dem Institut für Transfusionsmedizin des UKA fünf Tage nach ihrer Gewinnung nach Ablauf ihrer klinischen Verwertbarkeit bereitgestellt. Thrombozyteneinheiten mit $2,0-4,2 \times 10^{11}$ Thrombozyten pro 200 mL Plasma und Zusatz von Acid-Citrate-Dextrose (1:11 v/v) wurden durch Apherese mit dem Trima Accel Collection System hergestellt. Die Thrombozytenkonzentrate wurden zu 45 mL aliquotiert und bis zu ihrer Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Um die Thrombozyten zu lysieren, wurden die Aliquots bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad aufgetaut und erneut zweimal bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und wieder aufgetaut. Anschließend wurden die Konzentrate für 30 min bei $2600 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde für individuelle Plättchenlysate durch $0,2\text{ }\mu\text{m}$ GD/X PVDF-Filter (Whatman, Dassel) filtriert. Für gemischtes Plättchenlysat (pHPL) wurden Plättchenlysate von mindestens fünf verschiedenen Spendern gemischt und durch $0,2\text{ }\mu\text{m}$ Steritop Filter (Merck, Darmstadt) filtriert. Die Plättchenlysate wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.1.5 Herstellung von HPL-Gelen

HPL-Gele wurden als Zellkultursubstrat zur Isolation, Expansion und Differenzierung von MSC verwendet. Kulturmedium mit HPL ohne Antikoagulantium wurde in Zellkulturplatten pipettiert. Für Vertiefungen einer 96-well Platte wurden $50\text{ }\mu\text{L}$, einer 12-well Platte $500\text{ }\mu\text{L}$ und einer 6-well Platte $1,5\text{ mL}$ Medium verwendet (Kulturplatten von Nunc). HPL-Medium gelierte innerhalb von einer Stunde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durch Polymerisation des Fibrins. Zellen wurden anschließend in HPL-Kulturmedium auf die Gele gegeben.

3.1.6 Elastizitätsmessungen von HPL-Gelen

Elastizitätsmessungen von HPL-Gelen wurden von Dr. Bernd Hoffmann, Dr. Hatim Hemedi und Nico Hampe am *Institute of Complex Systems*, Biomechanic des Forschungszentrums Jülich mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Rudolf Merkel durchgeführt. Dazu wurden

5 %, 10 % und 20 % HPL-Gele auf Deckgläser in Plastikzylindern (14 mm Durchmesser und 2 mm Höhe) gegossen. Nachdem das Medium geliert war, wurden die Plastikzylinder entfernt und die Gele mit einem Deckgläschen mit definiertem Gewicht beschwert. Die Dicke der Gele wurde mittels eines konfokalen *Laser Scanning* Mikroskops (LSM 510 Meta, Zeiss) mit einem Weitwinkel 40 Achroplan Objektiv (NA 0.6, PH2) bestimmt. Nach Auflegen zusätzlicher Objektträger mit bekanntem Gewicht wurde die Geldicke erneut bestimmt. Der Elastizitätskoeffizient (E) wurde aus der Geldichte (h), der Gesamtmasse der Deckgläsern (m), der reduzierten Dicke durch das Ladegewicht (DL), dem Querschnitt durch das Gel (A) und der Gravitationskonstante (g) nach der Formel

$$E = \frac{m \cdot g}{A} * \frac{h}{DL} \text{ berechnet.}$$

3.1.7 Herstellung von Kollagengelen

Kollagengele aus Collagen G (Biochrom, Berlin), einer Mischung aus 90 % Kollagen Typ 1 und 10 % Kollagen Typ 3 in einer Konzentration von 3 mg/mL in 12 mM HCl (Roth, Karlsruhe) wurden nach einem Protokoll von Dr. Rebekka Schneider-Kramann hergestellt (Schneider et al., 2010). Collagen G wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und unter leichtem Rühren 10xDMEM (Gibco) dazugegeben. 1 M NaOH (Roth) wurde mit einer Pasteurpipette in die Mischung bis zum Farbumschlag des Indikators Phenolrot gegeben und 1xDMEM-LG zugemischt. Je 50 µL der Mischung wurden in 96-well Platten Vertiefungen pipettiert. Die Gele wurden nach wenigen Stunden bei 37 °C fest und Zellen in Kulturmedium auf die Gele pipettiert.

3.1.8 Herstellung von Fibringelen aus Fibrinogen

Fibringele in einer Konzentration von 4,15 mg/mL wurden nach einem modifizierten Protokoll von Koroleva hergestellt (Koroleva et al., 2012). Dazu wurde lyophilisiertes humanes Fibrinogenpulver (F3789; Sigma) über Nacht in einer Konzentration von 10 mg/mL in einem 50:50 Gemisch aus A. dest. und TBS-Puffer (0,5 M NaCl, 0,00035M Tris, 0,0165M Tris-HCl; pH 7,4; alle Chemikalien von Roth) gelöst. Anschließend wurde 1/5 des Volumens an 10xTBS hinzugefügt, so dass das Lösungsmittel die Endkonzentration von 1xTBS erhielt. Zur Vernetzung des Fibrinogens wurden 500 µL Fibrinogenlösung mit 350 µL TBS, 75 µL CaCl₂ (Stammkonzentration 50 mM, Endkonzentration 3,75 mM; Roth) und 75 µL Thrombin (T1063; Stammkonzentration 40 IU/mL in A. dest., Endkonzentration 3 IU/mL; Sigma) unter

Röhren in den Vertiefungen einer 96er-well Platte zugesetzt. Die Vernetzung setzte direkt ein. Das Endvolumen pro Vertiefung betrug 50 μ L. Die Gele wurden bis zur vollständigen Vernetzung nach ca. 1 h in den Zellkulturinkubator gestellt und Zellen in Kulturmedium anschließend auf die Gele gegeben.

3.1.9 Passagieren von MSC und Bestimmung der kumulativen Gesamtzellzahl

Auf TCP kultivierte MSC wurden bei ca. 80 % Konfluenz passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen wurden nach 2x Washen mit PBS mit 0,25 % Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Lösung (Sigma) für ca. 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde mit serumhaltigem Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 400xg zentrifugiert und die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim) bestimmt, wobei tote Zellen mit Trypanblau (Roth) angefärbt und somit ausgeschlossen werden konnten. Auf HPL-Gele kultivierte Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben durch mehrfaches auf- und abpipettieren von den Gelen geerntet. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Teil der MSC-HPL-Gel Suspension für 24 h auf TCP gesät. Die plastikadhärenten Zellen wurden anschließend durch Trypsinverdau abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Zur Analyse der Verdopplung der Gesamtzellzahl (PDP) unter verschiedenen Bedingungen wurden MSC einer möglichst niedrigen Passage in einer Dichte von 4000 bis 8000 Zellen/cm² ausgesät. Die Zellzahl wurde bei 80 – 90 % Konfluenz bestimmt. Die PDP errechnet sich aus der Formel $PDP_i = \log_2(h_i / s_i)$, wobei s_i die Zahl der ausgesäten (seeded), h_i die Zahl der geernteten (harvested) Zellen und i die Passage beschreiben. Zur Berechnung der kumulativen Verdopplung der Gesamtzellzahl werden die PDP_i über den gesamten Expansionszeitraum aufsummiert: $cPD = \sum_{i=1}^n PDP_i$, wobei n (number) die Gesamtzahl der Passagen beschreibt (Cholewa et al., 2011).

3.1.10 *In vitro* Differenzierungen

Osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierungen von MSC wurden abgewandelt nach Pittenger (Pittenger et al., 1999) durchgeführt. Zur osteogenen und adipogenen Differenzierung wurden 30.000 Zellen pro Vertiefung einer 24-well Platte in Kulturmedium auf TCP oder HPL-Gele ausgesät. Bei Erreichen von 60 % Konfluenz wurde das Kulturmedium gegen osteogenes Differenzierungsmedium (Zusammensetzung: DMEM-LG, 2 mM L-Glutamin, 100 U/mL Pen/Strep, 100 nM Dexamethason, 200 μ M L-Ascorbinsäure-2-phosphat [Sigma], 10 mM β -Glycerophosphat [Sigma], 10% FCS, alternativ 10% HPL) oder

adipogenes Medium (Zusammensetzung: DMEM-HG [PAA], 2 mM L- Glutamin, 100 U/mL Pen/Strep, 1 μ M Dexamethason [Sigma Aldrich], 0,5 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthin [IBMX, Sigma], 10 μ g/mL Insulin [Sigma], 10 % FCS, alternativ 10% HPL) gewechselt. Als Negativkontrollen dienten MSC in Kulturmedium. Zur osteogenen und adipogenen Differenzierung mit TGF- β 1 präkultivierten Zellen, wurde dem Differenzierungsmedium 1 ng/mL TGF- β 1 zugesetzt. Die chondrogene Differenzierung erfolgte als dreidimensionale Pelletkultur. Dazu wurden MSC durch Trypsinverdau von den Platten gelöst oder die HPL-Gel-MS-C-Mischung durch Pipettieren fragmentiert. Die Suspension wurde bei 400xg für 7 min zentrifugiert, das restliche Kulturmedium entfernt und chondrogenes Differenzierungsmedium (Zusammensetzung: 10 ng/mL *Recombinant human* TGF- β 3 [Biomol; Hamburg], 100 nM Dexamethason, 0,17 mM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat, 40 μ g/mL Prolin [Sigma Aldrich], 1 % ITS Liquid Media Supplement [100x; Sigma]) auf die Zellen gegeben. Der Medienwechsel erfolgte zweimal wöchentlich.

3.2 Analysemethoden der Zellproliferation

3.2.1 MTT-Proliferationsassay

Die Proliferation von MSC wurde mit dem Thiazolylblau Tetrazolium Bromid (MTT) Test bestimmt. Das gelbe lösliche MTT wird in den Mitochondrien zu blauem Formazan reduziert. Eine Quantifizierung des gebildeten Formazans kann Rückschlüsse auf die Zellaktivität und somit die Zellzahl geben (Mosmann, 1983). Für den Test wurden 3000 Zellen/cm² in Zellkulturmedium mit FCS- oder HPL-Zusatz auf TCP, HPL-Gele, Kollagengele oder Fibringele in 96-well Platten ausgesät. 7 Tage später wurden die Zellen mit 1 mM MTT (Sigma) in PBS für 3,5 h - oder ü.N. bei auf Gelen proliferierten MSC - zur Umsetzung des Tetrazols inkubiert. Der Kulturüberstand wurde entfernt, und die Formazankristalle in 4 mM HCl in Isopropanol (Roth) gelöst. Bei auf Gelen proliferierten Zellen dauerte das Auflösen der Kristalle bis zu 48 h. Die optische Dichte (OD) wurde bei einer Wellenlänge von 590 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm mit dem Tecan Infinite 200 Plattenleser (Tecan Trading, Männedorf, Schweiz) bestimmt.

3.2.2 BrdU-Proliferationsassay

Die Integration von BrdU in die DNA sich teilender Zellen wurde mit dem Cell Proliferation ELISA, colorimetric (Roche, Hannover) nach Herstellerangaben analysiert. Dazu wurden MSC für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen TGF- β 1 kultiviert, bevor BrdU für 24 h dazugegeben wurde. Die Inkubation mit Anti-BrdU-Peroxidase wurde für 90 min durchgeführt, und die Messung des Substratumsatzes erfolgte nach 5 – 10 min mit dem Tecan Infinite 200 Plattenleser.

3.2.3 Kernfärbung von MSC mit DAPI

Der Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) bindet an AT reiche Regionen der DNA im Zellkern. DAPI (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) wurde in A. dest. in einer Konzentration von 1 mg/mL gelöst und in einer Konzentration von 1 μ g/mL eingesetzt. Zur Färbung wurden die Zellen für 5 min in 4 % PFA (Roth) inkubiert und somit fixiert. Das Fixativ wurde durch zweifaches Waschen mit PBS quantitativ entfernt. Um die Zellmembranen für den Farbstoff durchlässig zu machen, wurden die Zellen für 5 min mit 0,2 % Triton X-100 (Sigma) inkubiert. Durch zweifaches Waschen mit PBS wurde das Triton entfernt, und 1 μ g/mL DAPI (Molecular Probes, Leiden, Niederlande gelöst in A. dest.) zu den Zellen gegeben. Die gefärbten Zellkerne wurden nach 5 min fluoreszenzmikroskopisch mit einem Leica DM IL HC Mikroskop mit Breitbandfilter N2.1 und I3 (Leica) betrachtet. Zur Bestimmung der MSC-Zahl in 96-well Platten wurden Bilder mit dem 10x Objektiv aufgenommen und die Kerne quantitativ erfasst.

3.3 Färbungen zur Mikroskopie und Durchflusszytometrie

3.3.1 Histologische Analyse von MSC auf HPL-Gelen

Die Präparation der HPL-Gele zur histologischen Analyse des Zellwachstums wurde von Dr. Rebekka Schneider-Kraman am Institut für Pathologie (UKA) durchgeführt. MSC-Gele wurden in 3,7% Formaldehyd für 24 h fixiert. Die Proben wurden anschließend in Paraffin eingebettet und mithilfe eines Mikrotoms in 2 μ m dick geschnitten. Die Schnitte wurden routinemäßig im Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Aachen gefärbt. Zur Färbung der Zellkerne wurde dabei Hämatoxylin, welches basophile Strukturen blau färbt und Eosin zur Färbung der basischen Zellplasmaproteine verwendet.

3.3.2 Kombinierte FDA- und PI-Färbung zur Quantifizierung vitaler und toter MSC

Zur Unterscheidung von vitalen und toten Zellen wurden MSC mit 5 µg/mL Fluoresceindiacetat (FDA; Sigma) und 50 µg/mL Propidiumiodid (PI; Sigma) für 30 sec gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch betrachtet.

3.3.3 Rasterelektronenmikroskopie von MSC auf HPL-Gelen

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Dipl.-Ing. Manfred Bovi an der elektronenmikroskopischen Einrichtung am UKA durchgeführt. Die Proben wurden von Dr. Hatim Hemeda vorbereitet. MSC auf der HPL-Gelmatrix wurden in 3 % Glutaraldehyd für 1 h bei Raumtemperatur fixiert, mit PBS gewaschen und durch aufeinanderfolgende Inkubationsschritte in 0 %, 50 %, 70 %, 90 % und 100 % Ethanol in 3 bis 10 min bei Raumtemperatur dehydriert. Anschließend wurden die Gele bis zum kritischen Punkt in flüssigem CO₂ getrocknet und mit einer 30 nm dicken Goldschicht mit einem Ion Sputter Coater (Leica EM SCD 500) überzogen. Die Proben wurden mit einem ESEM XL 30 FEG, FEI Elektronenmikroskop (Philips, Eindhoven, Niederlande) analysiert.

3.3.4 Nachweis der seneszenzassoziierten β -Galactosidaseaktivität

Die Aktivität der SA- β -gal wurde mithilfe des SA- β -gal Staining Kits (Cell Signaling Technology; Boston, MA, USA) gemäß den Herstellerangaben analysiert. Dabei wird das Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl β -D-Galaktopyranosid (X-Gal) eingesetzt, welches durch Spaltung der β -Galactosidase zu einem unlöslichen blauen Farbstoff umgesetzt wird. Durch Verwendung eines Natriumcitratpuffers bei pH 6 ist die Reaktion spezifisch für die SA- β -gal. Alternativ wurde die Aktivität durchflusszytometrisch nach Debacq-Chainiaux (Debacq-Chainiaux et al., 2009) bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit 100 nM Bafilomycin A1 (Sigma Aldrich) für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ vorbehandelt, um die Lysosomen zu alkalisieren. Anschließend wurde 5-Dodecanoylaminofluorescein di- β -D-Galactopyranosid C₁₂FDG (Invitrogen, Darmstadt) in einer Konzentration von 33 µM für 2 h zugegeben. Dann wurden die Zellen durch Trypsin-EDTA-Behandlung isoliert und direkt zur FACS-Analyse eingesetzt (Debacq-Chainiaux et al., 2009).

3.3.5 Färbung von Triglyceriden mit BODIPY

Die Färbung von Triglyceriden in adipogen differenzierten Zellen erfolgte abgewandelt mit dem lipophilen Farbstoff 4,4-difluoro-1,2,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY; Molecular Probes) nach Fink (Fink et al., 2004). BODIPY wurde in einer

Endkonzentration von 10 µg/mL direkt mit DAPI zu den mit PFA fixierten Zellen pipettiert. Nach 20 min Inkubationszeit wurde die Färbelösung entfernt, und die Proben konnten fluoreszenzmikroskopisch betrachtet werden. In den jeweiligen Kanälen wurden Fotos getrennt aufgenommen und mithilfe der Adobe Photoshop Bildbearbeitungssoftware zusammengeführt. Zur Quantifizierung der Differenzierung wurden Bilder von mindestens fünf zufällig gewählten Regionen verwendet, und die Anzahl der Zellkerne Anzahl der BODIPY gefärbten Zellen ins Verhältnis gesetzt.

3.3.6 Färbung von Calciumphosphat mit Alizarinrot S

Osteogen differenzierte Zellen bilden Calciumphosphat, das mit dem Farbstoff Alizarinrot S nachgewiesen werden kann. Dazu wurden die mit 4% PFA fixierten Zellen mit 0,5% Alizarinrot S (Sigma; pH 4,1; eingestellt mit 10% Ammoniumhydroxid) für 20 min gefärbt. Der überschüssige Farbstoff wurde durch mehrfaches Waschen mit Aqua dest. entfernt. Die Zellen wurden anschließend lichtmikroskopisch betrachtet.

3.3.7 Färbung von Glycosaminoglycanen mit Alcianblau

Chondrogen differenzierte MSC bilden Glyksaminoglykane. Diese lassen sich mit Alcianblau nachweisen. Die Zellpellets wurden in der Abteilung für Pathologie am UKA in Paraffin eingebettet und 2 µm dicke Schnitte mit einem Mikrotom (Leica) angefertigt. Die Schnitte wurden anschließend mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und mit H₂O gewaschen. Die Glykosaminoglykane wurden danach mit 1% Alcianblau (pH 2,5) gefärbt und die Zellkerne mit Kernechtrot oder PAS gegengefärbt. Überschüssige Farbe wurde mit H₂O entfernt, und die Schnitte in eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol gegeben und eingedeckt. Anschließend wurden die Schnitte lichtmikroskopisch analysiert.

3.3.8 Durchflusszytometrische Analyse des Immunphänotyps

Zur immunphänotypischen Charakterisierung wurden die folgenden Antikörper verwendet: CD14-Allophycocyanin (APC; Klon M5E2), CD29-Phycoerythrin (PE; Klon MAR4), CD31-PE (Klon WM59), CD34-APC (Klon 8G12), CD45-APC (Klon HI30), CD73-PE (Klon AD2), CD90-APC (Klon 5E10) and CD325-PE (Klon 8C11) (alle BD Bioscience, Heidelberg) und CD105-Fluoreszeinisothiocyanat (FITC; Klon MEM-226; ImmunoTools, Friesoythe) oder CD105 PE (Klon 266; BD Bioscience). Dazu wurden MSC mittels Trypsinverdau gelöst, 1x mit Zellkulturmedium gewaschen und in FACS-Röhrchen überführt. Auf HPL-Gelen isolierte und expandierte MSC wurden durch Fragmentierung des Gels geerntet, 1x mit Zellkulturmedium

gewaschen und direkt zur Analyse verwendet. Die Inkubation mit Antikörpern in Konzentrationen von 1:50 bis 1:100 erfolgte bei 4 °C für 30 min. Die ungebundenen Antikörper wurden durch Waschen mit Zellkulturmedium entfernt und die Proben direkt am FACS Canto II mit der FACS Diva Software (BD Bioscience) gemessen. Als Referenzwerte der Fluoreszenz dienten die Autofluoreszenzen der Proben. Die Daten wurden mit FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA) oder WinMDI 2.9 (The Scripps Institute, San Diego, CA, USA) Software analysiert. Zum statistischen Vergleich verschiedener Proben wurden die Fluoreszenzintensitäten auf die zugehörigen Autofluoreszenzen normalisiert.

3.3.9 Zellzyklusanalyse

MSC wurden in einer Dichte von 8000 Zellen/cm² mit oder ohne 1 ng/mL TGF-β1 ausgesät. Nach zwei Tagen wurden die Zellen durch Trypsinverdau von der Kulturplatte gelöst und für 5 min bei 400xg pelletiert. Zur Fixierung wurden die Zellen mit 300 µL PBS resuspendiert. 700 µL 99,9 % EtOH wurde tropfenweise unter Rühren zugefügt. Nach mindestens 24 h Fixierung bei -20 °C wurden die MSC für 5 min bei 400xg pelletiert und mit 0,2 mg/mL RNase A (Sigma) in PBS für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 µg/mL PI zugefügt und die Zellzyklusphasen durchflusszytometrisch bestimmt.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Relative Zytokinquantifizierung humaner Plättchenlysate

Zur Analyse des Zytokinexpressionsprofils der verschiedenen Plättchenlysate wurden RayBio human cytokine antibody array C Series 2000 (RayBiotech, Norcross, GA, USA) verwendet. Dieser Assay erlaubt die antikörperbasierte und zeitgleiche Detektion von 174 Zytokinen einer Probe. Die Proben wurden dazu 1:2 verdünnt und die Messungen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mit einem LAS-3000 Reader und die Quantifizierung mit dem Programm Multi Gauge (beides Fujifilm Europe, Düsseldorf). Zur Normalisierung der Daten wurde die Hintergrundfluoreszenz subtrahiert und durch die Signalintensität der Positivkontrollen auf den Arrays dividiert. Zur Berechnung der Korrelation zwischen relativer Zytokinkonzentration und der Messwerte zur MSC-Proliferation mit den entsprechenden Plättchenlysaten wurde das Microarray

Auswertprogramm TIGR MeV v4.4 für Pavlidis template matching (PTM) (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA) verwendet.

3.4.2 TGF- β 1 Inkubation für Genexpressionsanalysen

Zur Untersuchung der Genexpression nach TGF- β 1 Inkubation von MSC früher (p3-5) und später Passage (p10) wurden Zellen in FCS-Medium expandiert. Zur Inkubation mit TGF- β 1 wurden 1×10^6 MSC in 6-well Platten ausgesät. Bei vorheriger Serumdeprivation wurde das Kulturmedium 24 h vor Stimulation durch zweifaches Spülen mit PBS quantitativ entfernt und durch Kulturmedium ohne Serumzusatz ersetzt. TGF- β 1 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten ins Medium pipettiert, so dass die Proben zum selben Zeitpunkt in 700 μ L Quiazol (Quiagen, Hilden) bei -80 °C eingefroren werden konnten.

3.4.3 RNA-Isolation

RNA wurde mittels Phenol/Chloroform Extraktion mit dem miRNeasy kit (Quiagen) und zusätzlichem DNase Verdau isoliert. Eine photometrische Konzentrationsbestimmung und Messung der Reinheit der RNA erfolgte am Nanodrop ND-1000 Spektrometer (NanoDrop Technologies, Wilmigton, Del).

3.4.4 cDNA-Synthese und Real Time PCR

cDNA wurde aus 500 ng RNA mit dem High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Qiagen) an einer Mastercycler PCR Maschine (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) synthetisiert. Der Reaktionsansatz und das Temperaturprogramm sind in den Tabellen 1 und 2 dargestellt.

Tabelle 1: Versuchsansatz zur reversen Transkription von 500 ng RNA für ein Gesamtvolumen von 50 μ L.

Reagenz	Konzentration	Volumen
10x Reverse Transcription Buffer	10x	5 μ L
dNTPs	25x	2 μ L
Random Primers	10x	5 μ L
H ₂ O		10 μ L
Multiscribe Reverse Transcriptase	50 U/ μ L	2,5 μ L
RNAse Inhibitor		0,5 μ L
Template RNA in H ₂ O	20 ng/ μ L	25 μ L

Tabelle 2: Temperaturprogramm zur reversen Transkription

Schritt	Temperatur	Dauer
Primerbindung	25 °C	10 min
Reverse Transkription	37 °C	120 min
Denaturierung	85 °C	5 min
Programmende	4 °C	∞

Die Real Time PCR wurde mit dem SYBR Green Power oder Fast PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) an der StepOne PCR-Maschine (Applied Biosystems) durchgeführt. Der Reaktionsansatz und das Temperaturprogramm und PCR-Primer sind in den Tabellen 3 und 4 dargestellt.

Tabelle 3: Reaktionsansatz zur Real Time PCR.

Reagenz	Konzentration	Volumen
SYBR Green Master Mix (Power oder Fast)	2x	10 µL
Forward Primer	10 µM	1 µL
Reverse Primer	10 µM	1 µL
Template cDNA in H ₂ O		2 µL
H ₂ O		6 µL

Tabelle 4: Programm zur Real Time PCR Fast / Power SYBR Green.

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95 °C	20 sec / 10 min	1x
Denaturierung	95 °C	3 sec / 15 sec	40x
Primerbindung und Elongation	60 °C	30 sec / 1 min	40x

Tabelle 5: Primersequenzen zur Real Time PCR.

Zielgen	Forward Primer (5'--> 3')	Reverse Primer (5'--> 3')
ID1	CCAGAACCGCAAGGTGAG	GGTCCCTGATGTAGTCGATGA
ID2	ATATCAGCATCCTGTCCTTGC	AAAGAAATCATGAACACCGCTTA
ID3	CATCTCCAACGACAAAAG GAG	CTTCCGGCAGGAGAGGTT
GAPDH	TTCGTCATGGGTGTGAACCA	CTGTGGTCATGAGTCCTTCCA
CDKN2B	AGTGGAGAAGGTGCGACAG	TCTACATCGGCGATCTAGG
CDKN2A	CAACGCACCGAATAGTTACG	AGCACCACCAGCGTGTC
MCM3	GTCTCAGCTTCTGCGGTATG	GTGAGTCCTGTAGCCCAACAATG
PTN	CTTGAGTTTGGGCTTGGTC	TGGAGAATGGCAGTGGAGTG
PARG1	TTGCCAGGACAAGCTGATG	ATTAGGCCAAGGCCACAAC

3.4.5 RNA-Qualitätskontrolle

Eine Qualitätskontrolle der RNA-Proben erfolgte am Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) in der BioMat am Universitätsklinikum Aachen. Eine RNA Integrity Number (RIN) nahe an 10, wies darauf hin, dass die RNA nicht degradiert war. Die RIN berechnete sich durch einen vom den Hersteller vorgegebenen Algorithmus. Zur Analyse der Proben auf den Microarrays wurden die der im Duplikat isolierten Proben verwendet, welche die höhere RIN hatten.

3.4.6 Microarray Analyse

Die Hybridisierung der RNA auf GeneChip Human Gene 1.0 ST Arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) zur Transkriptomanalyse wurde unter Leitung von Prof. Dr. Hubert Smeets am Intitute for Molecular Cell Biology, CARIM School for Cardiovascular Diseases, Universität Maastricht durchgeführt. Die Qualitätskontrolle erfolgte durch Khalid Abnaof am Institut für Algorithmic Bioinformatics, Bonn-Aachen International Center for Information Technology (B-IT) unter der Leitung von Prof. Dr. Holger Fröhlich.

3.4.7 DNA-Isolation, Bisulfitkonversion, Pyrosequenzierung

DNA aus $2-4 \times 10^5$ Zellen wurde mithilfe des NucleoSpin Blood Kits (Machery Nagel, Ulm) isoliert und die Konzentration am Nanodrop Spektrometer bestimmt. 500 ng genomische DNA / Probe wurden an die Firma Varionostik (Varionostik GmbH, Ulm) zur Bisulfitkonvertierung und anschließender Pyrosequenzierung spezifischer CpG-sites versandt. Diese CpG-sites sind assoziiert mit den Genen *GRM7*, *CASR*, *PRAMEF2*, *SELP*, *CASP14* und *KRTAP13*. Die dazu verwendeten Primer sind aus der Veröffentlichung von Koch (Koch et al., 2012) entnommen und in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Primer und Sequenzierprimer zur Pyrosequenzierung spezifischer CpG-sites, die mit den aufgelisteten Genen assoziiert sind.

Assoziiertes Gen	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')	Sequencing Primer (5'→3')
GRM7	TTGGGATTATTGTTGATTT	CCCCTACTACCTACTAAAAATA	TACCTACTAAAAATACTCCT
CASR	TGTAATAGGTATTTGGTTGTAGT	CCCAAACCTTACTCATTCTA	TTGGTTGTAGTTAGGAA
PRAMEF2	TTTGAGGGTATTTAGAAGAGAT	TCCCTAACTAACTAACTAATC	TAGAATTTTGAAAGTGAG
SELP	AGAAGGTAGAAAATTAGTAGAGTT	CAACATAAACTCCATAACTA	AGGTAAAGGTTTAGAAAAG
CASP14	TTGGAGATTTAGTGAGATAATA	AACAAAACAAATAACCCATATA	TATTTTTTTGAGATGGT
KRTAP13-3	GAGATTTGTTGGAGGTTTAA	CCCAATAAAAAACAACCTCC	ATTTTTGTTTGATTATGTA

3.5 Mathematische und bioinformatische Analysemethoden

3.5.1 Vorhersage von cPD und Passagenzahl anhand der DNA-Methylierung

Anhand der prozentualen Methylierung der spezifischen CpG-sites wurden cPD und Passagenzahl nach den folgenden Formeln in Tabelle 7 nach Koch (Koch et al., 2012) berechnet.

Tabelle 7: Formeln zur Berechnung der Passagenzahl und cPD anhand der prozentualen Methylierung der spezifischen CpG-sites.

CpG-site	Berechnung geschätzte Passagenzahl	Berechnung geschätzte cPD
GRM7	$\frac{\% \text{Methylierung} - 2,4}{1,1}$	$\frac{\% \text{Methylierung} + 0,7}{0,6}$
CASR	$\frac{\% \text{Methylierung} - 10,3}{1,4}$	$\frac{\% \text{Methylierung} - 5,4}{0,8}$
PRAMEF2	$\frac{\% \text{Methylierung} - 61,5}{1,2}$	$\frac{\% \text{Methylierung} - 66,9}{0,7}$
SELP	$\frac{\% \text{Methylierung} - 79,4}{1,6}$	$\frac{\% \text{Methylierung} - 83,5}{0,9}$
CASP14	$\frac{\% \text{Methylierung} - 52,6}{1,2}$	$\frac{\% \text{Methylierung} - 57,7}{0,7}$
KRTAP13-3	$\frac{\% \text{Methylierung} - 73,7}{1,9}$	$\frac{\% \text{Methylierung} - 76,1}{1}$

3.5.2 Statistik

Zur Berechnung der Wahrscheinlichkeit von Unterschieden wurde der gepaarte zweiseitige T-test verwendet. P-Werte von $\leq 0,05$ wurden als signifikant erachtet. Ergebnisse wurden als Mittelwerte angegeben. Die Standardabweichung wurde aus unabhängig durchgeführten Experimenten berechnet.

3.5.3 Bioinformatische Auswertung der Microarray Daten

Die Qualitätskontrolle und statistische Auswertung der Microarray Daten wurde vollständig von Khalid Abnaof am Institut für Algorithmic Bioinformatics, Bonn-Aachen International Center for Information Technology (B-IT) unter der Leitung von Prof. Dr. Holger Fröhlich durchgeführt. Die Datenauswertung wurde mit den Programmen R und dem Bioconductor (Gentleman et al., 2004) durchgeführt. Die Rohdaten zur Intensität der Sonden wurden mit *Factor Analysis for Robust Microarray Summarization* FARMS (Hochreiter et al., 2006) summiert und normalisiert. Eine Analyse der differentiell exprimierten Gene wurde für die Gruppe der Sonden durchgeführt, welche die anhand des Bioconductors

“hugenetransclusterst10.db” Entrez Gene IDs zugeordnet werden konnten. Genexpression von MSC in früher und später Passage vor und nach TGF- β 1 Stimulation wurde mit *Linear Models for Microarray Data* (Limma) verglichen (Smyth G., 2005). Eine Fehlerrate (*false discovery rate*; FDR) von < 5 % wurde als signifikant für differentielle Expression (Benjamini und Hochberg, 1995) erachtet. Zur hierarchischen Clusteranalyse wurde der euklidische Abstand als Maß der Unterschiedlichkeit und das *Complete Linkage* Agglomerationsverfahren verwendet. Gesamte Zeitverläufe (*Time Courses*) wurden gleichzeitig mit einem Zufallseffektmodell und der empirische Bayes Methode verglichen, um die Wahrscheinlichkeit einer differentiellen Expression über die Gesamtgenexpression des Zeitverlaufs zu schätzen (Aryee et al., 2009). Eine Wahrscheinlichkeit > 95 % wurde als signifikant errachtet. Für Genassoziationsanalysen wurden *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) Signalwege und *Gene Ontology* (GO) Termini verwendet. Dazu wurden die P-Werte der Limma Analyse und Wahrscheinlichkeiten der Zeitverlaufsanalyse als Rangskala für die Gene verwendet. KEGG-Signalwege und GO-Bezeichnungen wurden dann auf ihre Assoziation mit diesen Rangskalen mittels einer Univariate Logistic Regression (Montaner und Dopazo, 2010) getestet. Ein Abgleich der P-Werte wurde nach Benjamini & Yekutieli False Discovery Rate Control under Dependency (Benjamini und Yekutieli, 2001) durchgeführt. Als signifikant wurden funktionelle Assoziationen mit einer FDR von < 5 % erachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Individuelle humane Plättchenlysate zur MSC-Expansion

HPL-Medium zur Kulturexpansion von MSC wird wegen der Variabilität einzelner Plättchenlysate mit gemischten Plättchenlysaten von bis zu 50 Spendern hergestellt. Dadurch steigt das potentielle Risiko unerwünschter Immunreaktionen und der Übertragung von Infektionskrankheiten. Es wurde daher untersucht, wie die Zusammensetzung individueller Plättchenlysate die MSC-Proliferation und -Charakteristika beeinflusst und ob eine effiziente und sichere Kulturexpansion mit individuellem HPL möglich ist.

4.1.1 Isolation und Charakterisierung von MSC mit FCS und individuellem HPL

MSC wurden frisch isoliert und direkt in FCS-Medium oder HPL-Medium mit individuellen Plättchenlysaten ausgesät. Unter den verschiedenen Kulturbedingungen wiesen die plastikadhärenten Zellen keine deutlichen morphologischen Unterschiede auf (Abbildung 4A). Ebenfalls konnten keine immunophänotypischen Unterschiede in der Expression der Oberflächenmarker CD29, CD73, CD90, CD105, CD14, CD33, CD34 und CD45 gemessen werden (Abbildung 4B).

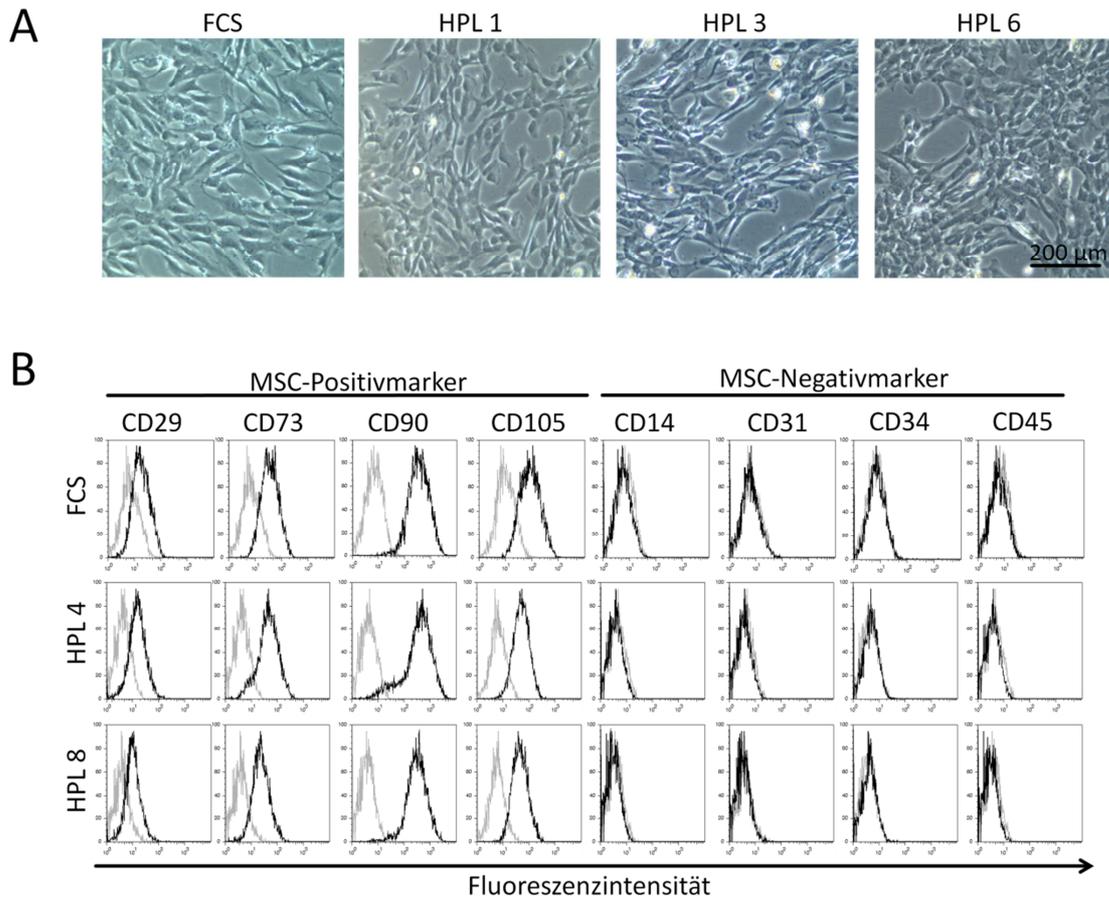


Abbildung: 4 Kulturmedium mit HPL- oder FCS-Zusatz weisen MSC keine signifikanten Unterschiede in ihrer Morphologie und in ihrem Immunphänotyp auf. (A) Aufnahmen von mit HPL- und FCS-Medium isolierten MSC in p0. **(B)** Exemplarische FACS-Histogramme der MSC Oberflächenmarker; graue Linie = Autofluoreszenz, schwarze Linie = Antikörperfluoreszenz. B adaptiert aus: Horn et al., 2010.

Bei drei MSC Präparationen, welche in HPL- wie auch in FCS-Medium initial isoliert waren, wurde analysiert, ob individuelle Plättchenlysate als Zusatz im Differenzierungsmedium einen Einfluss auf die adipogene und osteogene Differenzierung von MSC *in vitro* haben. Insgesamt wurden zehn verschiedene Plättchenlysate getestet. HPL verstärkte die osteogene Differenzierung im Vergleich zu FCS, wie eine Färbung von extrazellulären Calciumphosphatablagerungen mit Alizarin Red S zeigte. Es waren jedoch keine Unterschiede zwischen den einzelnen Plättchenlysaten erkennbar. Die adipogene Differenzierung war mit allen Plättchenlysaten als Zusatz im Differenzierungsmedium möglich, wie eine Färbung mit Oil Red O zeigte (Abbildung 5A). Eine zusätzliche Quantifizierung der adipogen differenzierten MSC durch kombinierte BODIPY- und DAPI-Färbung ergab, dass der prozentuale Anteil der differenzierten Zellen mit HPL im Vergleich zu FCS tendenziell leicht

erhöht war. Signifikant war dieses für einen HPL-Spender (HPL3) ($p = 0,013$, $n = 3$; Abbildung 5B).

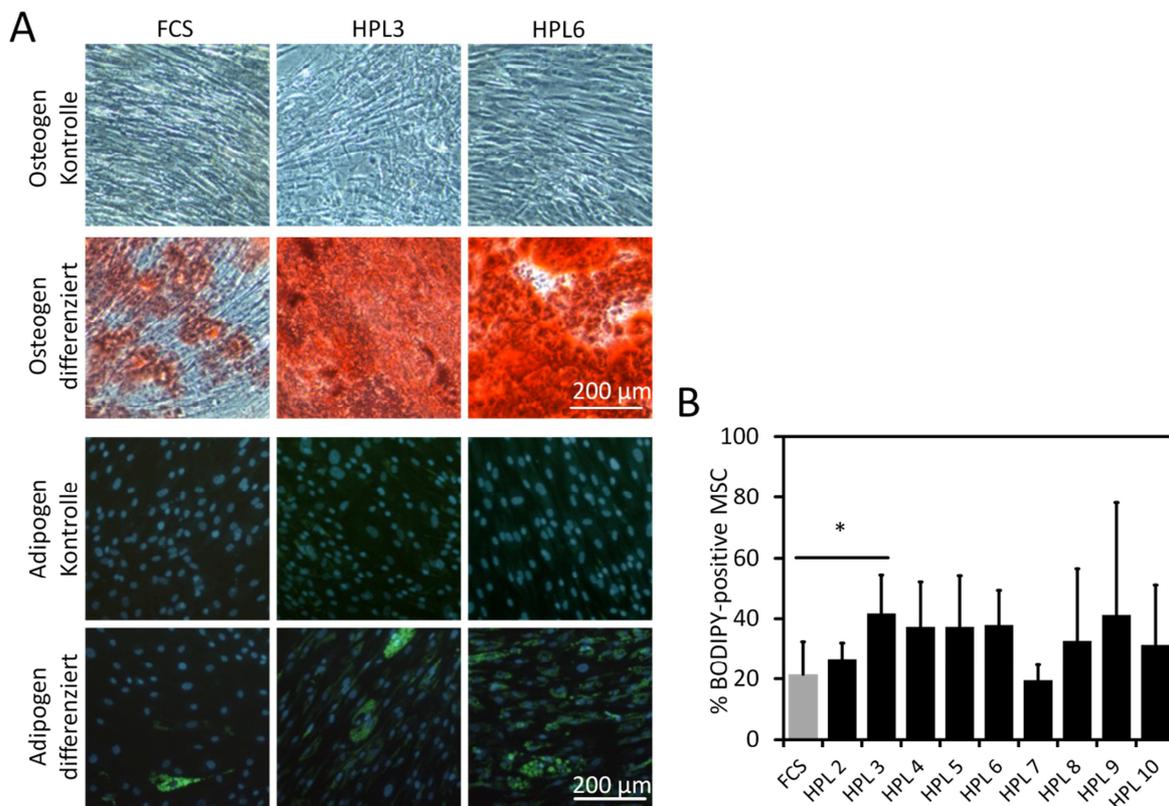


Abbildung 5: Individuelle Plättchenlysate fördern das osteogene Differenzierungspotential von MSC *in vitro*. (A) Exemplarische Aufnahmen osteogen und adipogen differenzierter MSC *in vitro*. HPL oder FCS wurden dem Differenzierungsmedium zugesetzt. (B) Auf die adipogenen Differenzierung hatte ein HPL einen signifikanten stimulativen Effekt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung; * $p \leq 0,05$. A modifiziert nach: Horn et al., 2010.

4.1.2 Einfluss individueller Plättchenlysate auf MSC-Langzeitkultivierung

Zur Untersuchung des Einflusses individueller Plättchenlysate auf Langzeitkultivierung wurden Proliferationskurven erstellt und der Beginn der replikativen Seneszenz von vier verschiedenen MSC-Spendern bestimmt, welche mit jeweils drei bis fünf verschiedenen Plättchenlysaten und FCS als Kontrolle isoliert und kultiviert wurden. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von 48 bis 81 Tagen, wobei die Zellen 8 bis 12 Mal passagiert wurden und die Gesamtzellpopulation eine kumulative Verdopplung von ca. 17 bis 28 erreichte. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den cPDs zwischen FCS- und HPL-kultivierten MSC oder zwischen den einzelnen Plättchenlysaten festgestellt werden (Abbildung 6A). Gegen Ende der Kultivierung wiesen alle MSC eine veränderte „fried egg“ Morphologie auf, und es konnte SA- β -Gal-Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 6B).

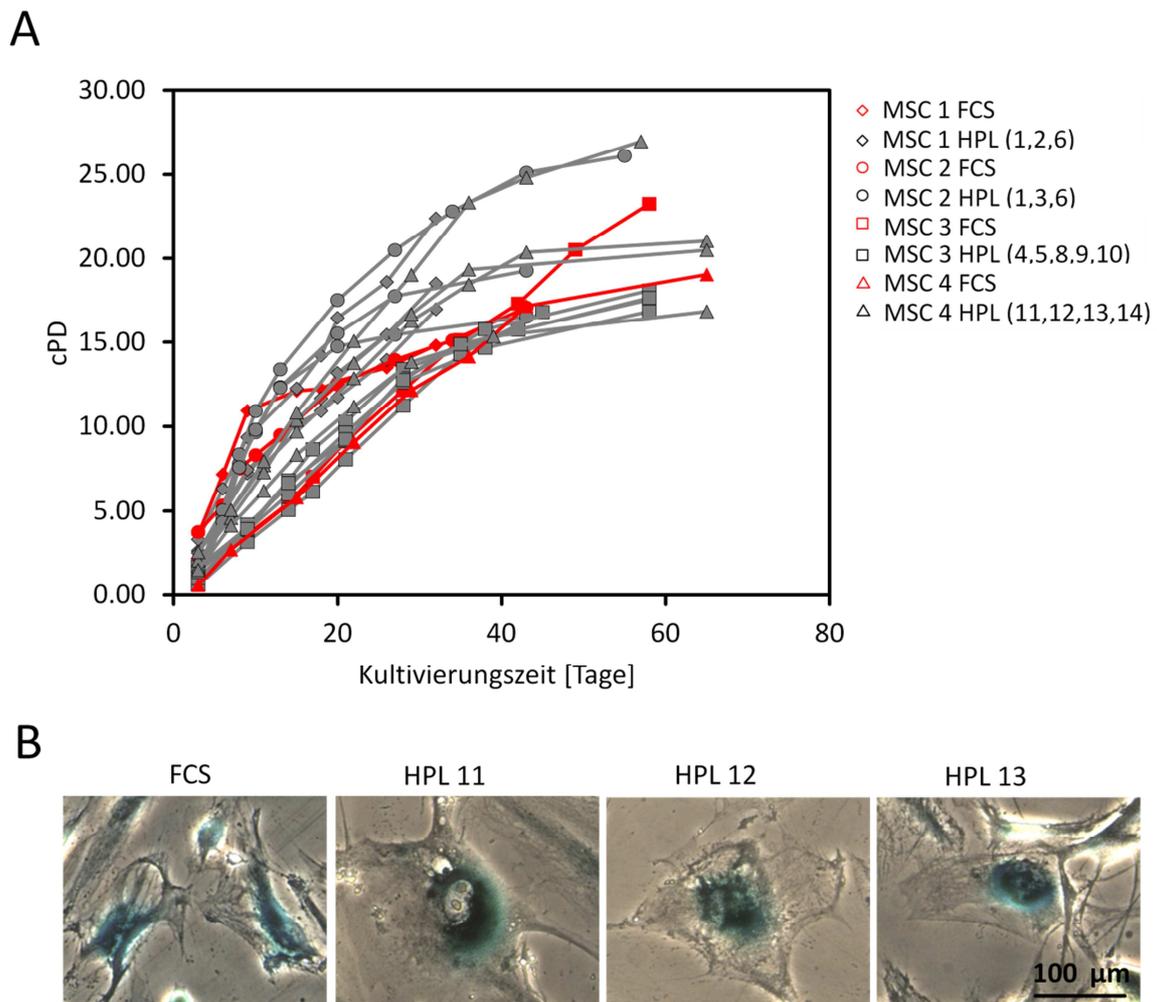


Abbildung 6: Langzeitproliferation und replikative Seneszenz von MSC, die mit HPL und FCS kultiviert wurden. (A) Wachstumskurven von vier MSC-Präparationen, die mit FCS oder verschiedenen Plättchenlysaten expandiert wurden (interne HPL Nummer in Klammern). **(B)** Exemplarische Aufnahmen seneszenten langzeitkultivierter MSC. Der Nachweis zur Seneszenz erfolgte durch ein Blaufärbung nach X-Gal-Substratumsatz mittels der SA- β -Gal. Verändert nach: Horn et al., 2010.

4.1.3 Einfluss individueller Plättchenlysate auf MSC-Proliferation

Zur Analyse eines kurzfristigen Effekts von individuellen Plättchenlysaten auf MSC-Proliferation wurden insgesamt elf verschiedene MSC-Präparationen aus Knochenfragmenten oder Knochenmarkspiraten mit je zehn verschiedenen Plättchenlysaten oder FCS für 7 d kultiviert. Zur Quantifizierung der Proliferation wurde der MTT-Assay verwendet. Die MSC-Proliferation war mit allen HPL-Zusätzen im Vergleich mit FCS signifikant erhöht (p-Werte: HPL1: 0,0012; HPL2: $1,67 \times 10^{-4}$; HPL3: $3,85 \times 10^{-5}$; HPL4: 0,024; HPL5: 0,016; HPL6: 0,009; HPL7: 0,0012; HPL8: $2,00 \times 10^{-4}$; HPL9: 0,0201; HPL10: 0,0013). Auch untereinander zeigten individuelle Plättchenlysaten unterschiedliche

proliferationsfördernde Wirkung, wobei HPL3 eine signifikant höhere Proliferation gegenüber den anderen Plättchenlysaten induzierte (p-Werte: HPL1: $1,46 \times 10^{-5}$; HPL2: 0,006; HPL4: $1,35 \times 10^{-6}$; HPL5: 0,017; HPL6: $1,00 \times 10^{-4}$; HPL7: $6,98 \times 10^{-6}$; HPL8: 0,015; HPL9: $1,55 \times 10^{-7}$; HPL10: 0,0016; Abbildung 7A). Die MSC-Proliferation stieg abhängig von der HPL-Konzentration bei allen getesteten Plättchenlysaten an (Abbildung 7B). Wurden alle Plättchenlysate gemischt, so war die Zellproliferation mit diesem Pool (pHPL) gegenüber einzelnen Plättchenlysaten erhöht (p-Werte gegenüber gemischtem HPL: HPL1: 0,017; HPL4: 0,005; HPL5: 0,0087 HPL6: 0,0049; HPL7: 0,018; HPL9: 0,01; HPL10: 0,028; FCS: 0,012; Abbildung 7C).

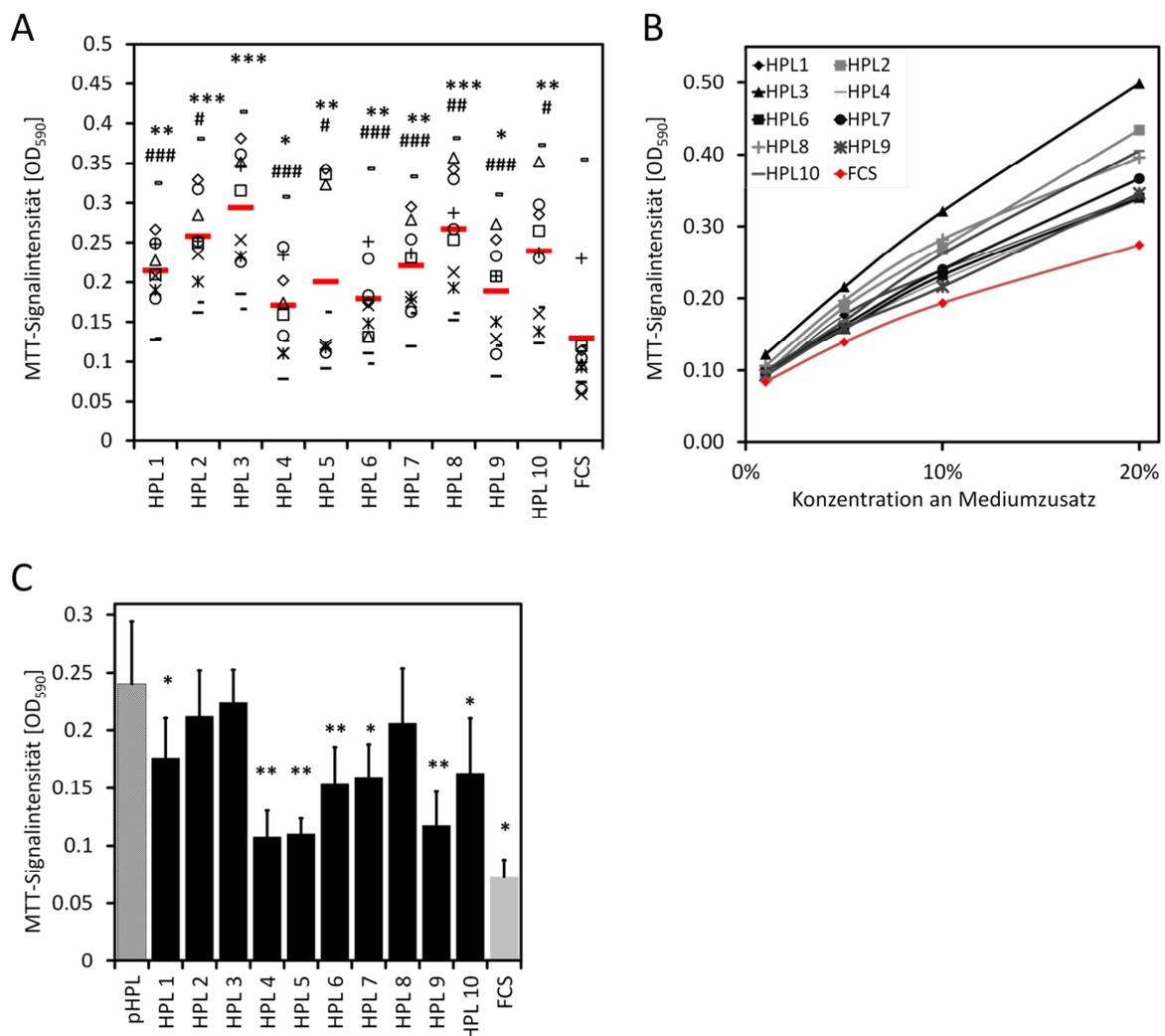


Abbildung 7: Proliferationsfördernder Effekt von individuellen Plättchenlysaten. (A) HPL hat einen supportiven Einfluss auf die Proliferation verschiedener MSC-Präparationen über 7 d im Vergleich zu FCS (schwarze Symbole repräsentieren eine MSC Präparation, die rote Linie den Mittelwert; *signifikant gegenüber FCS; #signifikant gegenüber HPL3; n = 11). **(B)** Die Proliferation korreliert positiv zur der HPL-Konzentration. **(C)** Gemischtes HPL derselben Spender (pHPL), hatte einen signifikant stärkeren Effekt auf die Proliferation als einzelne Plättchenlysate (n = 4). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen; *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001. A und B adaptiert aus: Horn et al., 2010.

4.1.4 Zytokinprofile individueller Plättchenlysate

Um zu untersuchen, durch welche Faktoren der Plättchenlysate die MSC-Proliferation besonders gefördert wurde, wurde zunächst untersucht, ob eine Korrelation zwischen Proliferation und Thrombozytenzahl der entsprechenden Thrombozytenkonzentrate bestand. Thrombozyten bilden ein Reservoir an Wachstumsfaktoren, die bei der Herstellung von HPL freigesetzt werden und eine Zellproliferation verstärken können. Es konnte eine tendenziell leicht positive Korrelation zwischen Thrombozytenzahl und der MSC-Proliferation festgestellt werden (Pearson correlation, $R^2 = 0,2381$; Abbildung 8).

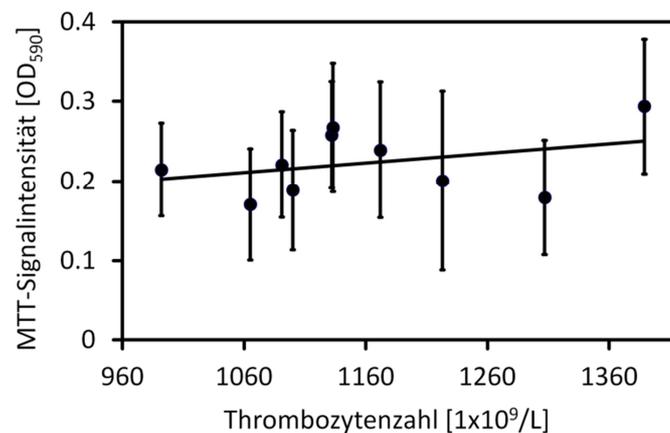


Abbildung 8: Analyse des Zusammenhangs zwischen Thrombozytenzahl der Thrombozytenkonzentrate und MSC-Proliferation. Die Zahl der Thrombozyten vor Lyse weist eine leicht positive Korrelation zur gemittelten Proliferation der MSC im entsprechenden HPL-Medium auf. Die Proliferation wurde mit dem MTT-Assay quantifiziert. Modifiziert nach: Horn et al., 2010.

Zur spezifischeren Analyse wurde mithilfe des RayBio Human Cytokine Antibody Array C Series 2000 simultan eine relative Quantifizierung von 174 Zytokinen der Plättchenlysate Nr. 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 und 9 durchgeführt. Insbesondere Adiponectin (Acrp30), EGF, *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *inter-cellular adhesion molecule-2* (ICAM-2; CD102), PDGF-AA, -AB, -BB, *insulin-like growth factor* (IGF)-II und *insulin-like growth factor-binding protein* (IGFBP)-4 (Abbildung 9) waren in hoher Konzentration in den Lysaten vorhanden.

Zytokindetektion (relative Intensitäten)

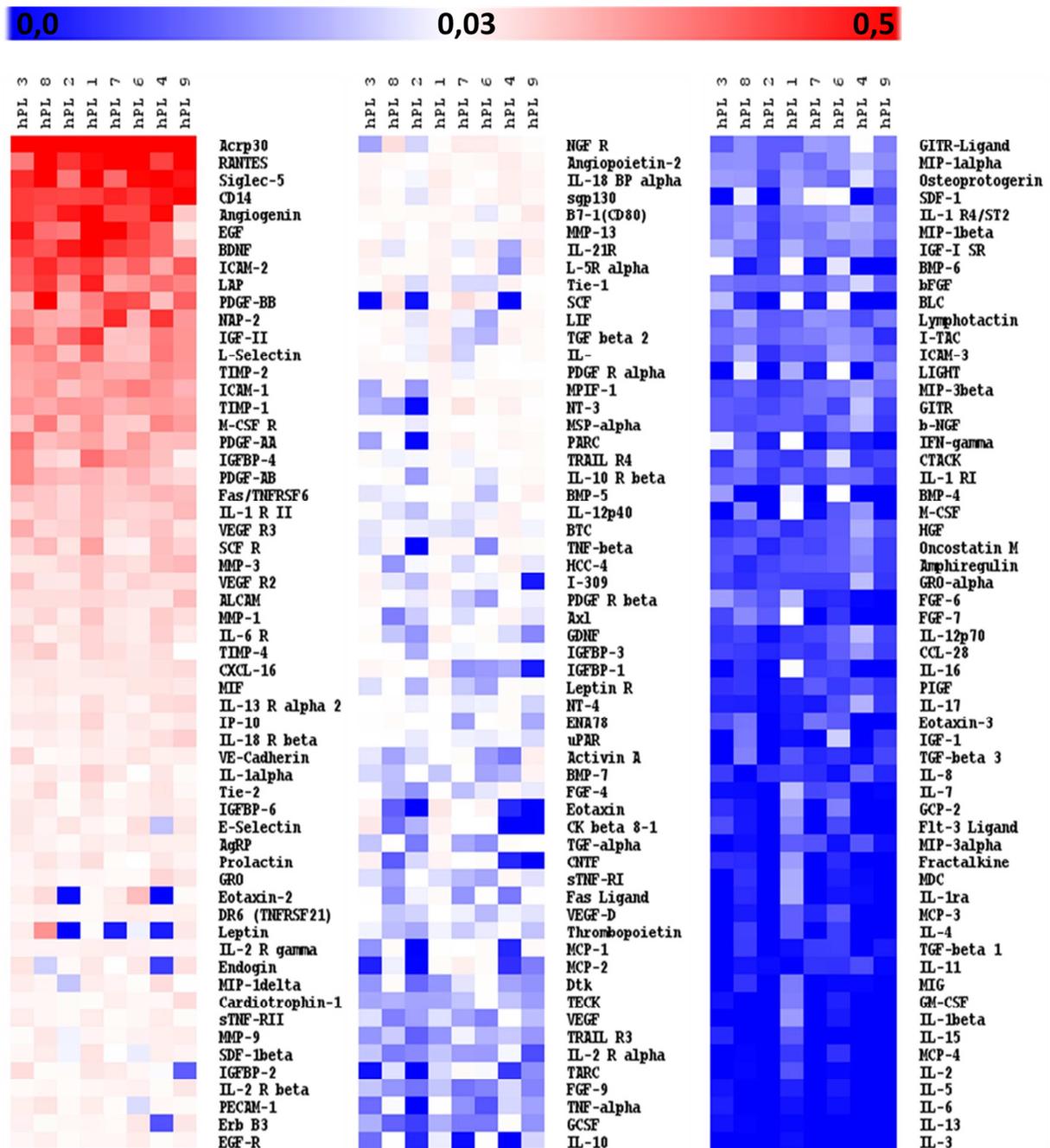


Abbildung 9: Heatmap von 174 Zytokinen einzelner Plättchenlysate, gemessen mit dem RayBio Human Cytokine Antibody Array C Series 2000. Die Konzentrationen sind farblich kodiert. Rot: hohe Konzentration; Blau: niedrige Konzentration. Die Plättchenlysate sind nach ihrer proliferationsfördernden Wirkung von links nach rechts angeordnet. Die Zytokine sind nach ihrer Konzentration von oben nach unten sortiert. Adaptiert aus: Horn et al., 2010.

Mittels PTM-Analyse konnte für PDGF-AB eine positive Korrelation zur MSC-Proliferation festgestellt werden ($p = 0,0003$). Zudem korrelierten IGFBP-1 ($p = 0,0258$), IGFBP-2 ($p = 0,0334$) und *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1; $p = 0,0283$) zur MSC-

Proliferation (Abbildung 10A). Zusätzlich war ein Zusammenhang zwischen den Thrombozytenzahlen und PDGF-AA ($p = 0,0014$), PDGF-AB ($p = 0,0031$) und *vascular endothelial cadherin* ($p = 0,009$) erkennbar. Eine negative Korrelation zwischen Thrombozytenzahl und Zytokinkonzentrationen konnte für Matrix Metallopeptidase 1 (MMP-1; $p = 0,0079$), MMP-3 ($p = 0,01$), IL-1 α ($p = 0,0058$) und IL-13 R α 2 ($p = 0,0071$) nachgewiesen werden (Abbildung 10B).

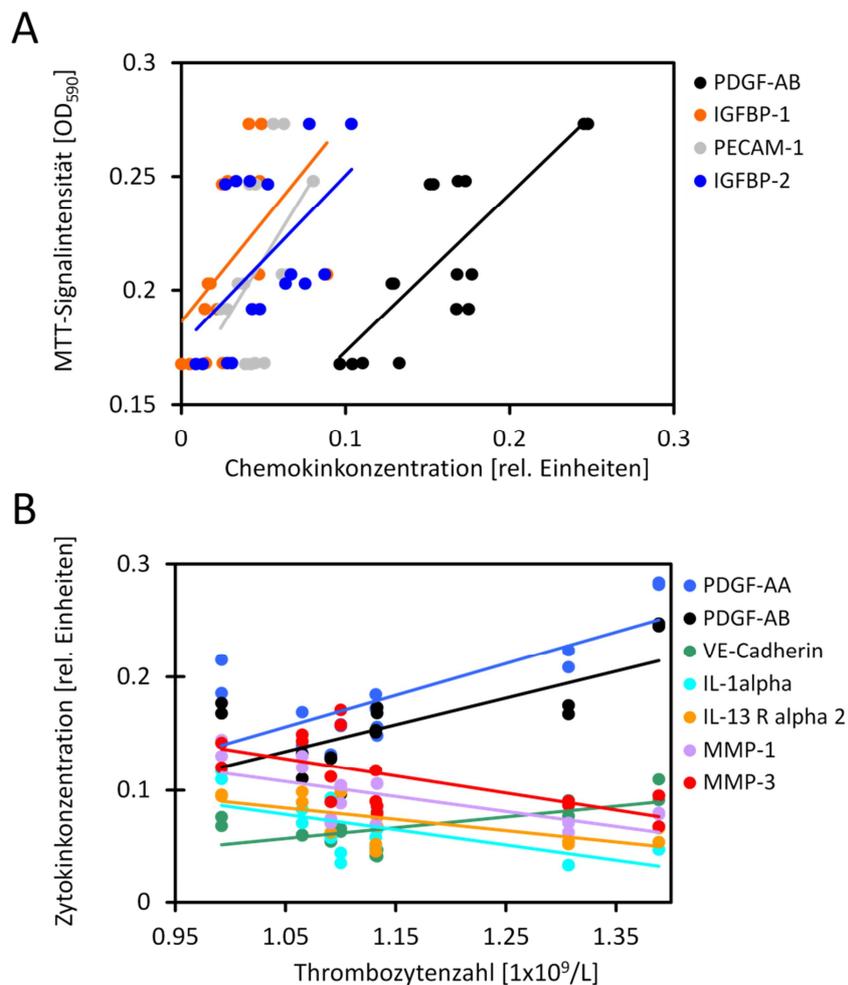


Abbildung 10: Signifikante Korrelationen zwischen relativer Zytokinkonzentration, MSC-Proliferation und Thrombozytenzahl. (A) Vier mit den Zytokinarray detektierte Zytokine weisen eine signifikant positive Korrelation zur MSC-Proliferation auf, die mit dem MTT-Assay quantifiziert wurde. (B) Für drei Zytokine ergab sich eine signifikant positive und für vier Zytokine eine signifikant negative Korrelation zur Thrombozytenzahl. Modifiziert aus: (Horn et al., 2010).

Eine weitere Untersuchung zum spenderabhängigen Effekt der Plättchenlysate auf die MSC-Proliferation ergab, dass besonders die zwei Plättchenlysate weiblicher Spender die Proliferation stimulierten und eine schwach negative Korrelation zwischen dem Alter der

Spender der Thrombozytenkonzentrate und der MSC-Proliferation auftrat ($R = -0,1179$; Abbildung 11A). In einer Folgestudie mit 30 individuellen Plättchenlysaten konnte bestätigt werden, dass das Spenderalter ein bedeutender Faktor auf die proliferationsfördernde Wirkung von HPL hat (Abbildung 11B; durchgeführt von Michael Lohmann).

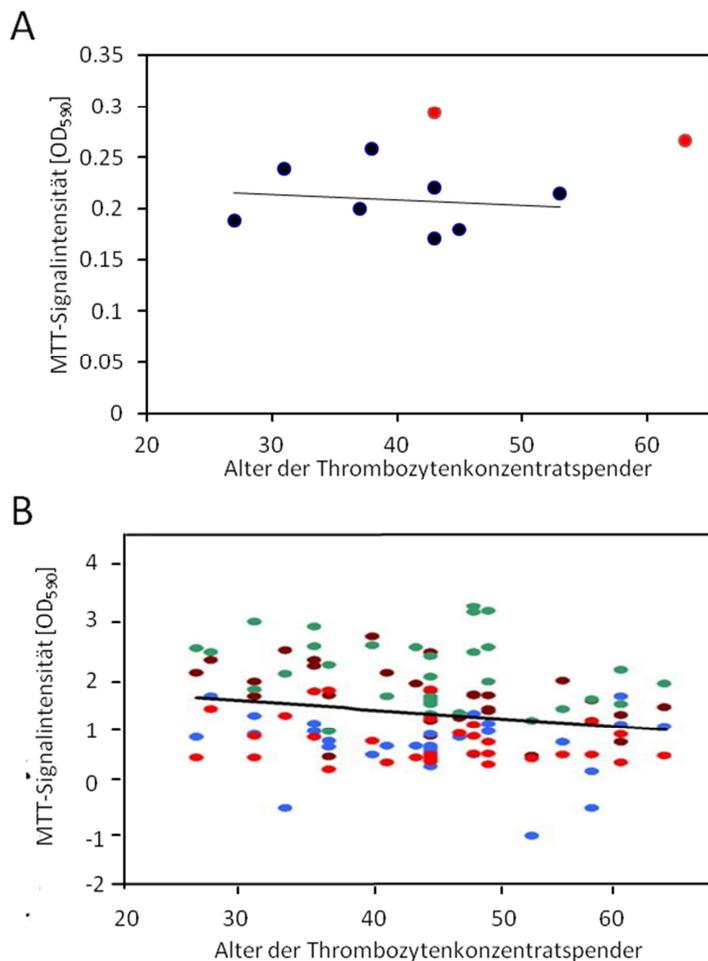


Abbildung 11: Abhängigkeit der proliferationsfördernden Wirkung von HPL zu Alter und Geschlecht der Thrombozytenkonzentratspender. (A) Die MSC-Proliferation, nahm tendenziell mit dem Spenderalter ab. HPL von weiblichen Spendern (rote Punkte) förderte die Proliferation stärker als von männlichen Spendern (schwarze Punkte). **(B)** Eine weiterführende Untersuchung mit 30 individuellen Plättchenlysaten bestätigte die Abhängigkeit der proliferationsfördernden Wirkung von HPL durch das Spenderalter. Die unterschiedlichen Farben beschreiben verschiedene MSC-Präparationen. Aus Lohmann et al. 2012.

4.2 Entwicklung von HPL-Fibringelen zur Kulturexpansion humaner MSC

HPL-Medium bildet durch Polymerisation von enthaltenem Fibrinogen viskose Gele, wenn keine Antikoagulantia zugesetzt werden. Verschiedene Typen von Hydrogelen aus Fibrin werden zur dreidimensionalen Zellkultivierung und zum *Tissue Engineering* eingesetzt. Das Potential von Fibringelen aus HPL-Medium zur MSC-Kultivierung und -Expansion war bisher noch nicht untersucht worden.

4.2.1 Charakterisierung von HPL-Gelen zur MSC-Kultivierung

HPL-Medium in Konzentrationen von 1 bis 20 % HPL ohne Zusatz von Antikoagulantia bildete auf Zellkulturplatten bei 37 °C innerhalb von 30 bis 60 Minuten durchsichtige und viskose Gele. Die Elastizität dieser Gele betrug bei HPL-Konzentrationen von 5 bis 20 % zwischen 15-50 Pa (5 % HPL: 20 Pa; 10 % HPL: 28 Pa; 20 % HPL: 32 Pa; Durchschnittswerte von drei bis sechs Messungen; Abbildung 12).

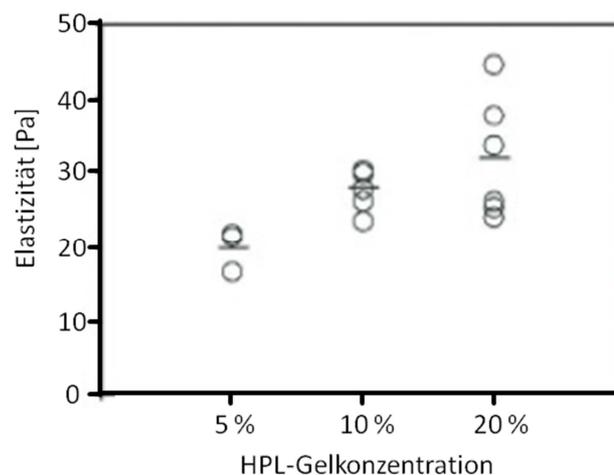


Abbildung 12: HPL-Gele besitzen eine niedrige Elastizität, die mit höherer HPL-Konzentration ansteigt. Die Elastizität wurde Anhand der Verformung des Gels durch Auflegen von Deckgläschen eines definierten Gewichts an einem konfokalen Laserscanningmikroskop bestimmt. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Hatim Hemeda und Nico Hampe. Modifiziert nach: (Walenda et al., 2012).

Auf HPL-Gel ausgesäte MSC wurden zwischen HPL-Gel und HPL-Medium ohne Kontakt TCP expandiert. Histologische Analysen wiesen auf ein mehrschichtiges Wachstum der MSC hin (Abbildung 13A), wodurch die Zelldichte deutlich höher war als auf TCP. Rasterelektronische Messungen zeigten eine netzartige Struktur der Fibrinmatrix. MSC bildeten Zellausläufer in

die Fibrinmatrix (Abbildung 13B, C) und wiesen wie zum Vergleich auf Glasboden ausgesäte MSC eine typische spindelförmige Morphologie auf (Abbildung 13D-E).

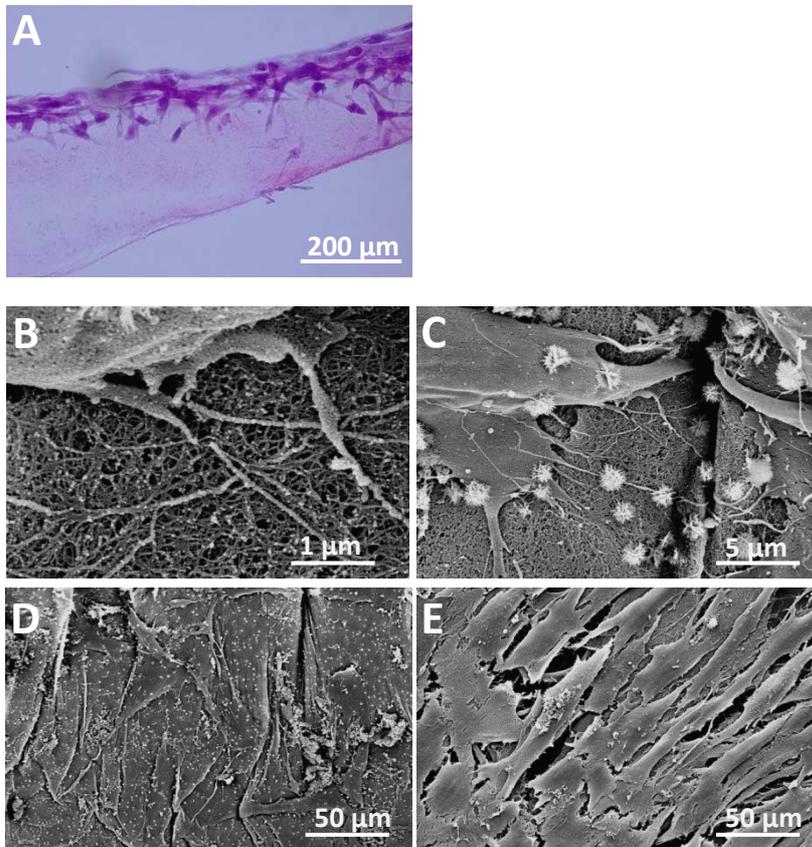


Abbildung 13: Wachstum und Morphologie von MSC auf HPL-Gelen. (A) MSC wuchsen mehrschichtig im HPL-Gel (HE-Färbung; mit freundlicher Genehmigung von Dr. Rebekka Schneider-Kramann). (B-D) Rasterelektronische Aufnahmen zeigen die netzartige Struktur der Fibrinmatrix. MSC bildeten Zellausläufer, wuchsen mehrschichtig und hatten eine spindelförmige Morphologie. (E) Rasterelektronische Aufnahme von MSC auf Glasboden als Kontrolle (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Hatim Hemed). Adaptiert nach: Walenda et al., 2012.

Um die Vitalität der MSC auf HPL-Gelen nachzuweisen, wurde nach sieben Tagen Kultivierung eine kombinierte FDA-/PI-Färbung durchgeführt. Es konnten keine toten MSC nachgewiesen werden (Abbildung 14).

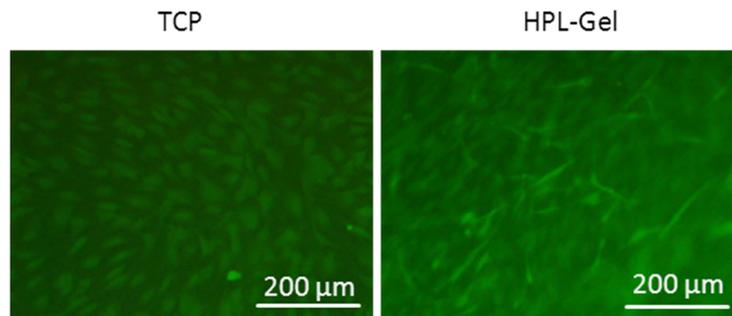


Abbildung 14: Kombinierte FDA-/PI-Färbung zur Bestimmung vitaler und toter MSC auf TCP und HPL-Gelen. Die MSC wurden sieben Tage nach Aussaat mit FDA und PI gefärbt. Auf beiden Substraten waren nur vitale MSC zu erkennen (lebend: grüne Fluoreszenz; tot: rote Fluoreszenz).

MSC sezernieren Enzyme, die Fibrin degradieren können (Hotary et al., 2002; Lozito und Tuan, 2011). Aus diesem Grund wurde untersucht, wie schnell 10 %-ige HPL-Gele von MSC zersetzt werden. Nach vier Tagen war kaum Degradation nachweisbar, wohingegen nach acht Tagen einige HPL-Gele partiell zersetzt waren, so dass MSC in Kontakt mit dem Plastikboden der Zellkulturschale kamen.

4.2.2 Kultivierung auf HPL-Gelen steigert die MSC-Proliferation

Zur Messung der Proliferation wurden MSC parallel auf TCP, Kollagengelen, Fibringelen und HPL-Gelen ausgesät. Das Kulturmedium der Flüssigphase wurde mit steigenden HPL-Konzentrationen von 1 %, 5 %, 10 % und 20 % versetzt und die Proliferation nach sieben Tagen mittels MTT-Assay quantifiziert. Die MSC-Expansion war auf HPL-Gelen signifikant höher als auf TCP (1 % HPL: $p = 0,02$; 5 % HPL: $p = 0,02$; 10 % HPL: $p = 0,04$; 20 % HPL: $p = 0,002$; $n = 7$; einseitiger gepaarter T-test) und Kollagengelen (5 % HPL: $p = 0,04$; 20 % HPL: $p = 0,003$; $n = 7$; einseitiger gepaarter T-test; Abbildung 15A) und tendenziell höher als auf Fibringelen (Abbildung 15B). Es war zudem deutlich, dass die Proliferation mit der HPL-Konzentration anstieg. Im Verlauf über neun Tage wurde der proliferationsfördernde Effekt von HPL-Gelen gegenüber TCP zunehmend stärker (Abbildung 15C). Dermale Fibroblasten zeigten ebenfalls eine signifikant schnellere Proliferation auf HPL-Gelen als auf TCP (10 % HPL: $p = 0,05$; 20 % HPL: $p = 0,04$; $n = 5$; Abbildung 15D). Der MTT-Assay ist nur ein indirekter Indikator der Zellzahl durch Bestimmung der metabolischen Aktivität. Daher wurde die Proliferation eines MSC-Spenders auf HPL-Gelen im Vergleich zu TCP zusätzlich durch Zählen der mit DAPI gefärbten Zellkerne nach sieben Tagen bestimmt. Die Ergebnisse stimmen mit der Quantifizierung mittels MTT-Assay überein (Abbildung 15E).

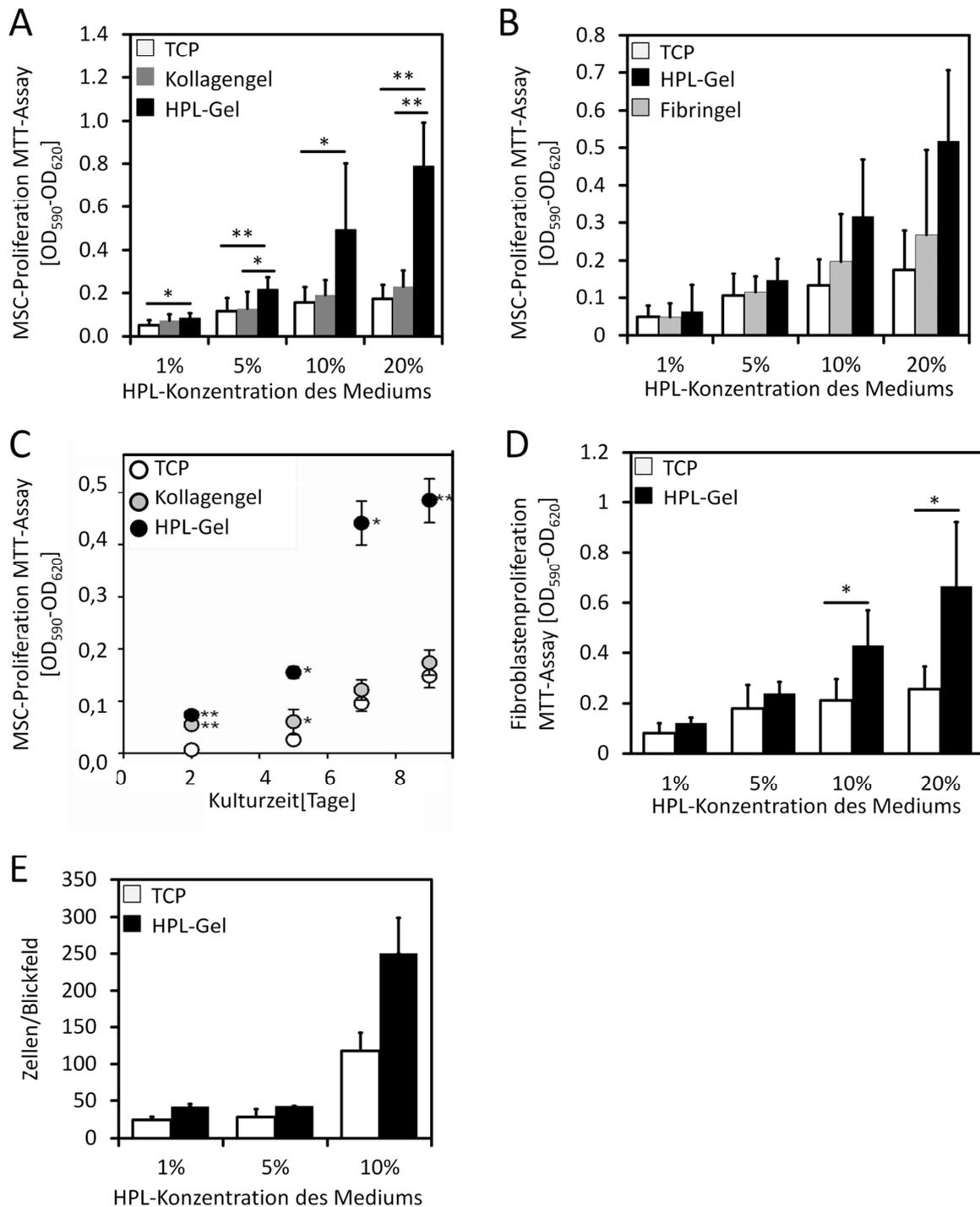


Abbildung 15: Vergleich der Proliferation von MSC und Fibroblasten auf unterschiedlichen Materialien. (A) MSC zeigten eine signifikant stärkere Proliferation auf HPL-Gelen im Vergleich zu TCP und Kollagengelen ($n = 7$) und (B) eine tendenziell stärkere Proliferation als auf Fibringelen ($n = 3$). (C) Über einen Zeitverlauf von acht Tagen stieg die Proliferation auf HPL-Gelen kontinuierlich im Vergleich zu TCP an ($n = 3$; mit freundlicher Genehmigung von Dr. Hatim Hameda). (D) Auch Fibroblasten proliferierten signifikant stärker auf HPL-Gelen im Vergleich zu TCP ($n = 4$). (E) Zur Bestätigung der Messmethode wurden mit DAPI gefärbte Zellkerne nach sieben Tagen MSC-Proliferation auf TCP und HPL-Gelen quantifiziert. Es konnten mehr Zellkerne auf den HPL-Gelen gezählt werden als auf TCP ($n = 3$). In den Diagrammen sind Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Modifiziert nach: Walenda et al., 2012.

4.2.3 Optimierung der Passagiermethode zur MSC-Expansion auf HPL-Gelen

Für eine Expansion von MSC sind in der Regel serielle Passagierschritte erforderlich. Auf TCP kultivierte MSC können zur Lösung von Zellkontakten durch proteolytischen Verdau und Chelation zweiwertiger Ionen z.B. durch die Protease Trypsin und EDTA geerntet werden. Dieses ist mit HPL-Gelen nicht möglich, da im Gel vorhandene Proteine sowie Calcium den Trypsinverdau und die Wirkung des EDTA inhibieren. Um MSC aus den Gelen zu lösen, wurden die im Folgenden aufgelisteten drei Methoden getestet: 1. Fragmentierung des viskosen HPL-Gels einschließlich MSC durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren, anschließender Zentrifugation des MSC-Gel-Gemisches bei 400xg und Aussaat der MSC mitsamt den Gelresten. 2. Wie unter Punkt 1. beschrieben, jedoch mit zusätzlicher Behandlung mit Trypsin-EDTA zur Reduktion von Zellverbindungen. Dazu wurde das MSC-Gel-Gemisch zweimal mit PBS gewaschen und vor der Aussaat für 5 min mit Trypsin-EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert. 3. Degradation der Fibrinmatrix des HPL-Gels durch Inkubation mit 20 µg/mL Plasmin für 18 h bei 37 °C. Dadurch konnten die Zellen auf dem TCP adhären und die konventionelle Passagiermethode mit Trypsin-EDTA durchgeführt werden.

Zur Analyse der Effizienz dieser Methoden, wurde mithilfe des MTT Assays bestimmt, wie viele Zellen einen Tag nach der Passage auf TCP adhären. Als Kontrolle dienten von TCP passagierte Zellen. Ein Drittel der durch einfache Fragmentierung des Gels durch Pipettieren passagierten MSC blieb nichtadhärent. Die Anzahl der nicht plastikadhärenten MSC konnte durch zusätzliche Behandlung mit Trypsin-EDTA verringert werden, jedoch war die Anzahl der plastikadhärenten MSC nicht erhöht. Eine Isolation der MSC durch Plasminverdau der Gele ergab ebenfalls keine erhöhte Ausbeute plastikadhärenter MSC (Abbildung 16A). Aus HPL-Gelen isolierte MSC waren auch ohne Trypsin-EDTA-Behandlung vereinzelt (Abbildung 16B).

Zum konsekutiven Passagieren von MSC auf HPL-Gelen wurde aufbauend auf den Ergebnissen die Fragmentierung des Gels durch Pipettieren ohne anschließende Behandlung mit Trypsin-EDTA angewendet. Um eine geringere Zelldichte bei der Passage zu erzielen, wurde jeweils nur 1/10 des MSC-Gel-Gemisches auf neue HPL-Gele ausgesät. Mit Gelresten assoziierte MSC konnten in die neuen Gele migrieren (Abbildung 16C). Die Expansionsrate der auf HPL-Gel kultivierten MSC wurde für vier aufeinanderfolgende Passagen bestimmt

und mit der Expansionsrate konventionell auf TCP kultivierter MSC verglichen. Die Expansionsrate war über die erste Passage auf HPL-Gelen erhöht. Nach vier Passagen hatten die MSC unter beiden Bedingungen die gleiche Anzahl an cPD (Abbildung 16D).

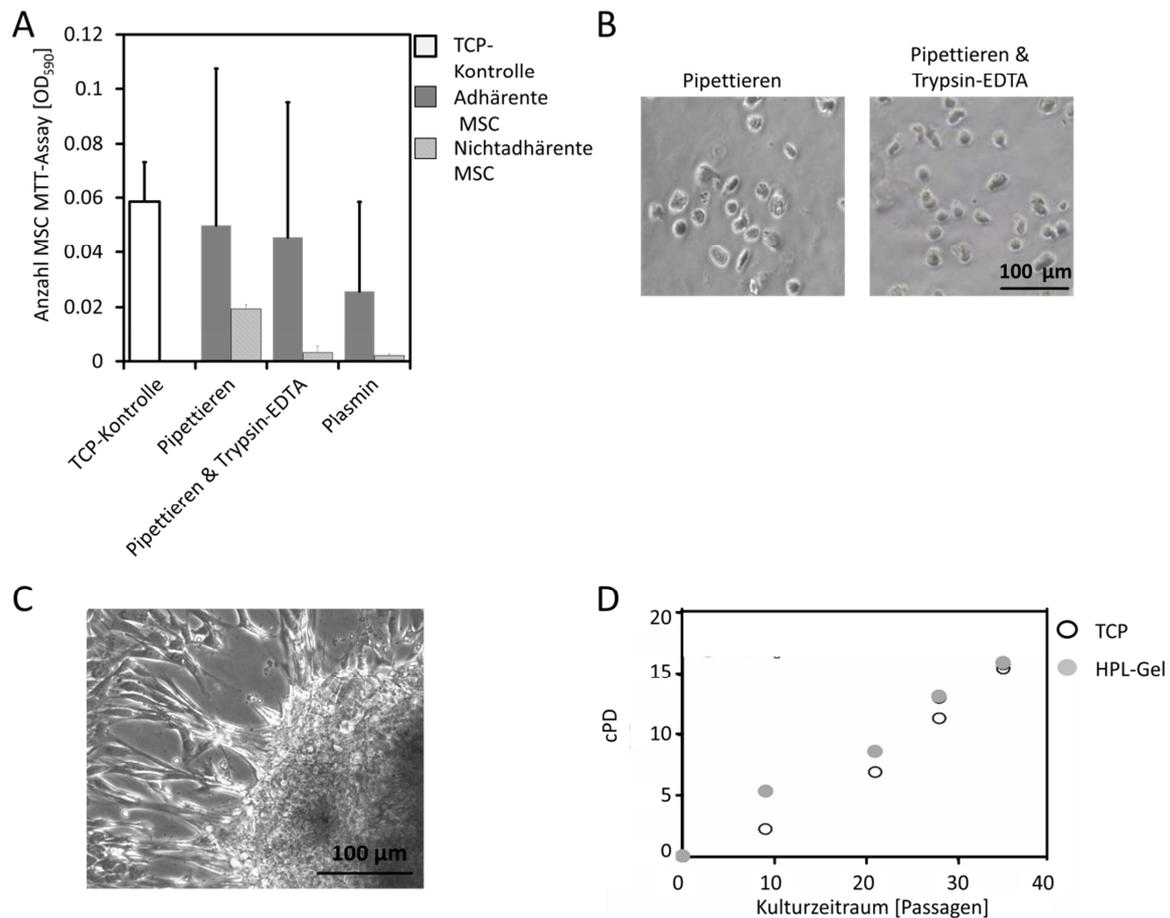


Abbildung 16: Einfache Fragmentierung von HPL-Gelen ist ausreichend, um MSC zu passagieren. (A) Quantifizierung nach 12 h der auf TCP adhärenzenden und nichtadhärenzenden MSC, welche durch die dargestellten Methoden passagiert wurden. Von TCP passagierte MSC dienten als Referenz (n = 2). **(B)** Durch einfaches Pipettieren ohne Zusätzliche Behandlung mit Trypsin-EDTA waren die isolierten MSC vereinzelt. **(C)** Wurden mit Gelresten assoziierte MSC, auf neue Gele ausgesät, konnten sie in die neuen Gele migrieren; die Aufnahme erfolgte einen Tag nach Passagierung. **(D)** Vergleich der Expansionsrate auf TCP und HPL-Gel kultivierter MSC über vier Passagen (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Hatim Hemedi). Abbildungen A und C adaptiert nach: Walenda et al., 2012.

4.2.4 Charakterisierung von auf HPL-Gelen expandierten MSC

Weil Zelleigenschaften durch ihr Substrat beeinflusst werden können, wurden Morphologie, Immunphänotyp und Differenzierungsverhalten von auf HPL-Gelen und auf TCP isolierten und expandierten MSC verglichen. Zur Analyse der Morphologie wurden auf HPL-Gel und auf

TCP angewachsene Zellen für eine Passage auf TCP ausgesät. Es konnten keine morphologischen Unterschiede zwischen den Präparationen festgestellt werden (Abbildung 17A). Eine Immunphänotypische Analyse der auf HPL-Gel expandierten MSC mittels FACS ergab ebenfalls keinen Unterschied in der Expression der Oberflächenmarker CD14, CD31, CD34, CD45, CD29, CD73, CD90 und CD105 zu Kontrollzellen (n = 4; Abbildung 17B).

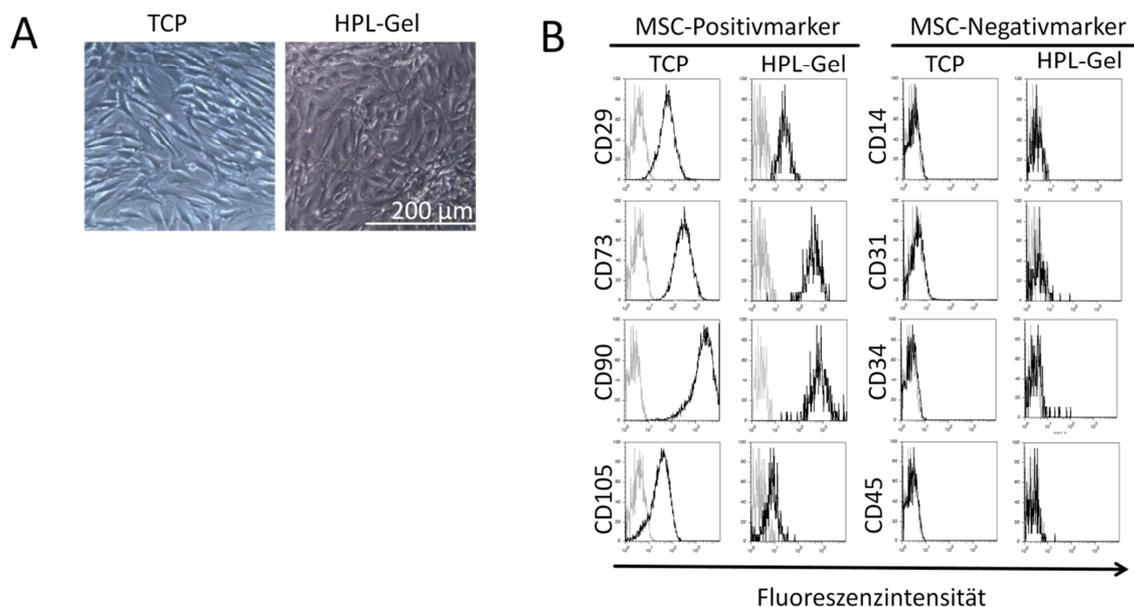


Abbildung 17: Vergleich der Morphologie und immunphänotypische Charakterisierung auf HPL-Gelen und TCP isolierter und expandierter MSC. (A) Exemplarische Aufnahmen von auf HPL-Gelen und TCP expandierten MSC wiesen auf keine morphologischen Unterschiede hin. **(B)** Messungen charakteristischer Oberflächenmarker von MSC zeigten ebenfalls keine Unterschiede; dargestellt als exemplarische FACS-Plots (graue Linie = Autofluoreszenz, schwarze Linie = Antikörperfluoreszenz). B modifiziert nach: Walenda et al., 2012.

Um die Kapazität von HPL-Gelen zur Unterstützung der adipogenen und osteogenen Differenzierung zu bestimmen und zu untersuchen, ob sich in HPL-Gelen MSC-Subpopulationen mit unterschiedlicher Differenzierungskapazität anreichern, wurden folgende Bedingungen miteinander verglichen: 1. MSC wurden auf HPL-Gelen oder TCP isoliert und expandiert. Die anschließende Differenzierung wurde auf dem jeweiligen Substrat durchgeführt. 2. MSC wurden auf TCP isoliert und expandiert. Die Differenzierung wurde anschließend auf HPL-Gelen durchgeführt. 3. MSC wurden auf HPL-Gelen oder TCP isoliert und expandiert. Die Differenzierung wurde anschließend auf TCP durchgeführt.

Auf HPL-Gelen expandierte MSC wiesen sowohl adipogenes, osteogenes als auch chondrogenes Differenzierungspotential auf. Im Vergleich von HPL-Gelen zu TCP nach Bedingung 1 war die Anzahl der adipogen differenzierten MSC auf beiden Substraten gleich, was durch eine kombinierte DAPI- und BODIPY-Färbung nachgewiesen werden konnte. Eine getesteten MSC-Präparation konnte nach Bedingung 1 deutlich besser osteogen auf HPL-Gelen differenzieren als auf TCP, wie eine Färbung mit Alizarinrot S zeigte; dieses war jedoch nicht repräsentativ. Bei der chondrogenen Differenzierung, die als Pelletkultur durchgeführt wurde, konnten mittels histologischer Analyse der Proteoglykanbildung durch Färbung mit Alzianblau keine Unterschiede von auf HPL-Gelen und TCP kultivierten MSC nachgewiesen werden (Abbildung 18A).

Des Weiteren konnten auf TCP expandierte MSC auf beiden Substraten in gleichem Maße adipogen (Anteil der adipogen differenzierten MSC auf HPL-Gel: 42 %, auf TCP: 37 %; n = 3) und osteogen differenzieren (Abbildung 18B). Dies belegt, das HPL-Gel als Substrat für auf TCP expandierten MSC keinen Einfluss auf die adipogene oder osteogene Differenzierung hat. Sowohl auf TCP als auch auf HPL-Gelen expandierte MSC konnten ebenfalls gleichermaßen auf TCP differenzieren (nicht dargestellt; durchgeführt von Dr. Hatim Hemedda). Dadurch konnte gezeigt werden, dass auf HPL-Gelen keine Subpopulationen mit unterschiedlicher Differenzierungskapazität angereichert wurden.

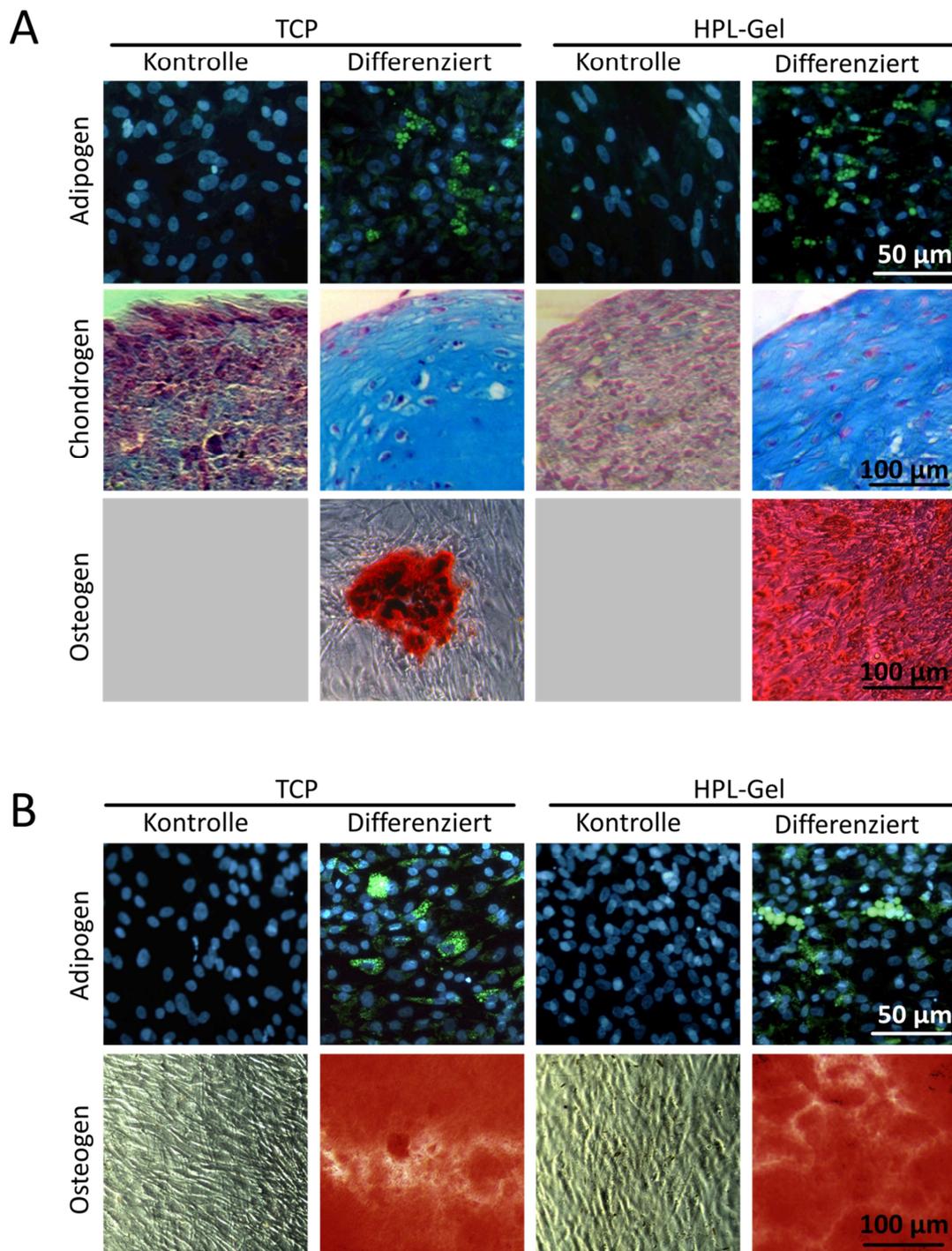


Abbildung 18: Differenzierung auf HPL-Gelen und TCP isolierter und expandierter MSC *in vitro*. (A) Auf HPL-Gelen oder auf TCP isolierte und expandierte MSC wiesen eine gleich starke adipogene Differenzierung auf ihrem jeweiligen Substrat auf, wohingegen die osteogene Differenzierung bei einer MSC-Präparation auf HPL-Gel erhöht war. Die chondrogene Differenzierung war nicht beeinflusst (n = 2) (B). Auf TCP isolierte und expandierte MSC zeigten keine Unterschiede in der osteogenen und adipogenen Differenzierung, wenn sie auf TCP oder HPL-Gelen zur Differenzierung gebracht wurden (n = 3). Adaptiert aus: Walenda et al., 2012.

4.3 Wirkung der Antikoagulantia Heparin und Enoxaparin in HPL-Medium auf die MSC-Vitalität

Zur Vermeidung der Koagulation von HPL-Medium wird das Antikoagulantium Heparin zugesetzt, obwohl die Wirkung auf MSC nur ungenügend bekannt ist. Als Alternative zu Heparin könnte das modifizierte niedermolekulare Heparin Enoxaparin verwendet werden, das im Vergleich zu Heparin modifizierte Eigenschaften aufweist (Horlocker und Heit, 1997). Lösungen dieser Antikoagulantia wird häufig der Konservierungsstoff Benzylalkohol zugesetzt, um eine längere Haltbarkeit zu erzielen. Dieser Konservierungsstoff wirkt auf einige Zelltypen zytotoxisch (Chang et al., 2011), jedoch wurde bislang nicht untersucht, ob die Benzylalkoholkonzentrationen im HPL-Medium einen negativen Einfluss auf MSC hat.

4.3.1 Heparin und Enoxaparin reduzieren die MSC-Proliferation

Heparin ohne und mit Benzylalkohol (10 mg/mL) als Konservierungsstoff und Enoxaparin (ohne Konservierungsstoff) wurden auf ihre Wirkung auf die MSC-Proliferation getestet. Dazu wurden die Antikoagulantia in steigender Konzentration von 0,01 IU/mL bis 625 IU/mL zugesetzt und die MSC-Proliferation mit dem MTT-Assay quantifiziert. Die höchste MSC-Proliferation wurde für eine Konzentration von 0,15 IU/mL für Heparin und Enoxaparin gemessen und sank mit steigender Konzentration der Antikoagulantia. In den Konzentrationen von 0,01 bis 0,04 IU/mL gelierte das Medium, so dass eine zuverlässige Messung nicht möglich war. Der Zusatz von Benzylalkohol bewirkte eine zusätzliche Reduktion der MSC-Proliferation (Abbildung 19A-B). Die antiproliferative Wirkung von Heparin mit Benzylalkohol war auch auf HPL-Gelen vorhanden, jedoch nicht so stark wie auf TCP (Abbildung 19C).

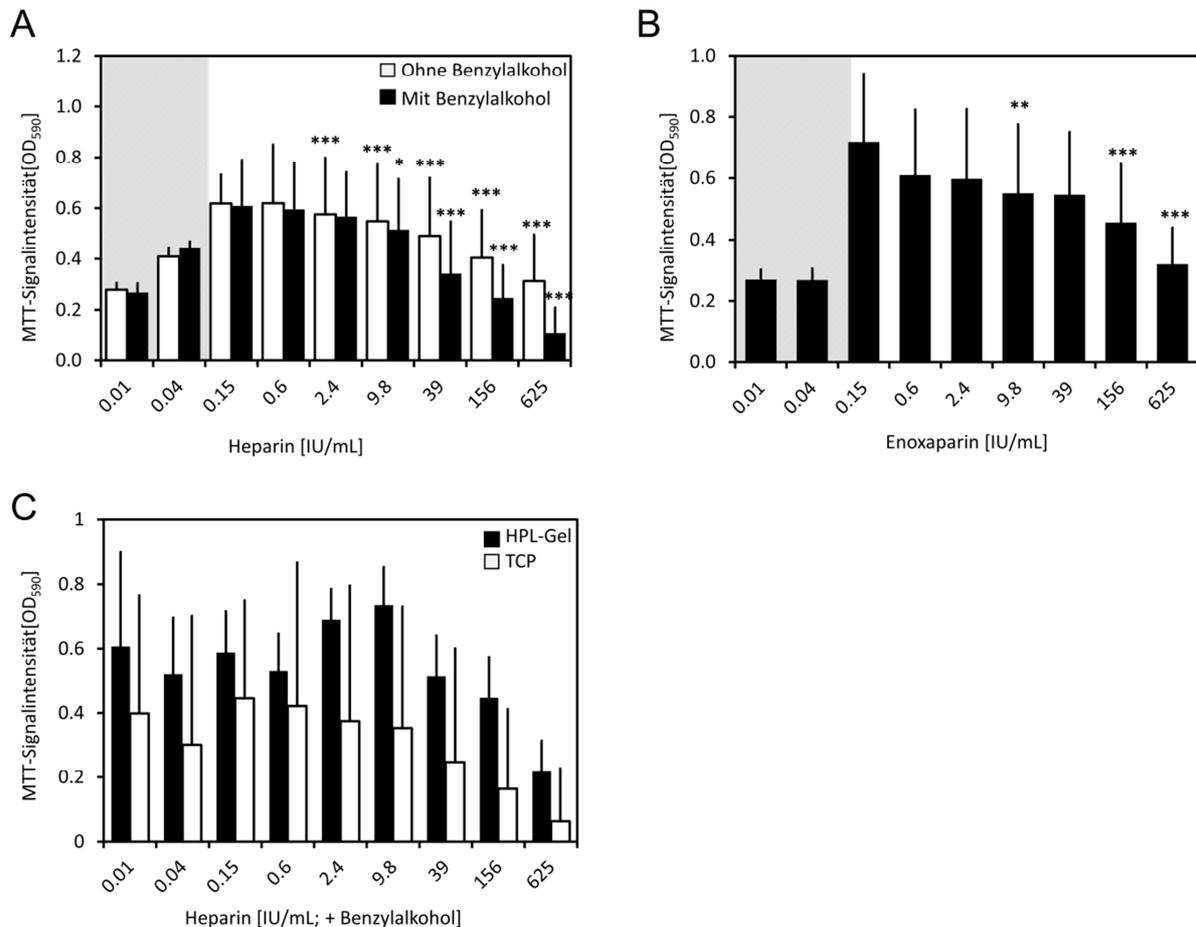


Abbildung 19: Heparin und Enoxaparin zeigen antiproliferative Wirkung auf MSC. (A) MSC wurden mit steigenden Konzentrationen von Heparin mit und ohne Benzylalkohol inkubiert. Die Proliferation wurde nach sieben Tagen mittels MTT-Assay quantifiziert. Die höchste MSC-Proliferation wurde bei Heparinkonzentrationen von 0,15 und 0,61 IU/mL gemessen. Bei höherer Konzentration sank die MSC-Proliferation. Durch Benzylalkohol war die Proliferation zusätzlich inhibiert (n = 6). (B) Die MSC-Proliferation sank mit steigender Konzentration an Enoxaparin, und die höchste Proliferation lag bei 0,15 IU/mL. (n = 6). (C) Die MSC-Proliferation war auf HPL-Gelen durch hohe Heparinkonzentrationen tendenziell nicht so stark reduziert wie auf TCP (n = 3). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung; ***p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; *p ≤ 0,001, Die graue Schattierung in A und B weist auf eine Gelation des Mediums hin. Adaptiert aus: Hemedá et al. 2013.

Weil der MTT-Assay nur eine indirekte Analyse der Zellproliferation erlaubt, wurde die Teilungsrate der MSC durch Zellzahlbestimmung mittels einer Neubauerzählkammer quantifiziert, nachdem sie für sieben Tage mit einer niedrigen (0,61 IU/mL für Heparin mit oder ohne Konservierungsstoff und 2,4 IU/mL für Enoxaparin), einer mittleren (156 IU/mL) und einer hohen Konzentration (625 IU/mL, nur für Heparin mit oder ohne Benzylalkohol) der Antikoagulantia inkubiert wurden. Die Konzentration von 2,4 IU/mL an Enoxaparin wurde gewählt, da in Vorarbeiten (durchgeführt von Jana Kalz) gezeigt worden war, dass HPL-Medium spenderabhängig bei einer niedrigeren Konzentration an Enoxaparin koagulierte

war. Zusätzlich wurden MSC mit Benzylalkohol inkubiert, wobei die Konzentration des Benzylalkohols der in der Heparinlösung entsprach. Durch die Zellzahlbestimmung konnten die Ergebnisse des MTT-Assays bestätigt werden. Die MSC proliferierten in der niedrigen Heparin- und Enoxaparinkonzentration am häufigsten. Zudem war die Teilungsrate mit Zusatz von Heparin mit Benzylalkohol deutlich niedriger als ohne Konservierungsstoff. Die Zellverdopplung nahm weiterhin mit steigenden Konzentrationen an Benzylalkohol ab (Abbildung 20).

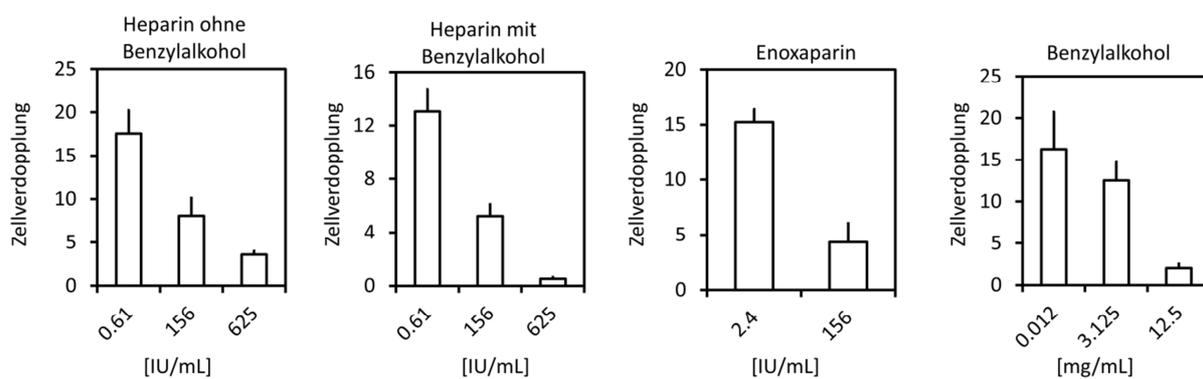


Abbildung 20: Quantifizierung der MSC-Verdopplung nach sieben Tagen Inkubation mit niedriger, mittlerer und hoher Konzentration an (A) Heparin ohne Benzylalkohol, Heparin mit Benzylalkohol, Enoxaparin und Benzylalkohol. Die Konzentration an Benzylalkohol entsprach der Konzentration des Konservierungsstoffs, wie in Heparin mit Benzylalkohol. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen. Adaptiert aus: Hemedá et al. 2013.

4.3.2 Hohe Konzentrationen an Heparin und Benzylalkohol wirken zytotoxisch

Weiterhin wurde untersucht, ob die Antikoagulantia und Benzylalkohol zytotoxisch auf MSC wirken. Dazu wurden die MSC sieben Tage mit den unter Punkt 4.3.1 beschriebenen niedrigen, mittleren und hohen Konzentrationen der Antikoagulantia und des Konservierungsstoffs inkubiert. Die Quantifizierung toter Zellen erfolgte durchflusszytometrisch mittels PI-Färbung. Die Zahl der PI-positiven MSC war durch mittlere und hohe Konzentrationen an Heparin (mit oder ohne Benzylalkohol) und reinem Benzylalkohol im Vergleich zu der niedrigen Zusatzkonzentration erhöht. Eine mittlere Konzentration an Enoxaparin führte nicht zu erhöhter Anzahl PI-positiver Zellen (Abbildung 21). Eine kombinierte Färbung mit FDA und PI zur fluoreszenzmikroskopischen Quantifizierung vitaler und toter Zellen zeigte ebenfalls, dass in den hohen Konzentrationen an Heparin mit und ohne Konservierungsstoff PI-positive tote Zellen vorhanden waren, und dass die Zelldichte geringer war als mit der niedrigen Konzentration. Besonders durch die

hohe Benzylalkoholkonzentration wurden viele Zellen PI-positiv gefärbt. Die Zelldichte war mit Benzylalkoholzusatz höher als mit der Lösung aus Heparin und Benzylalkohol (Abbildung 21E).

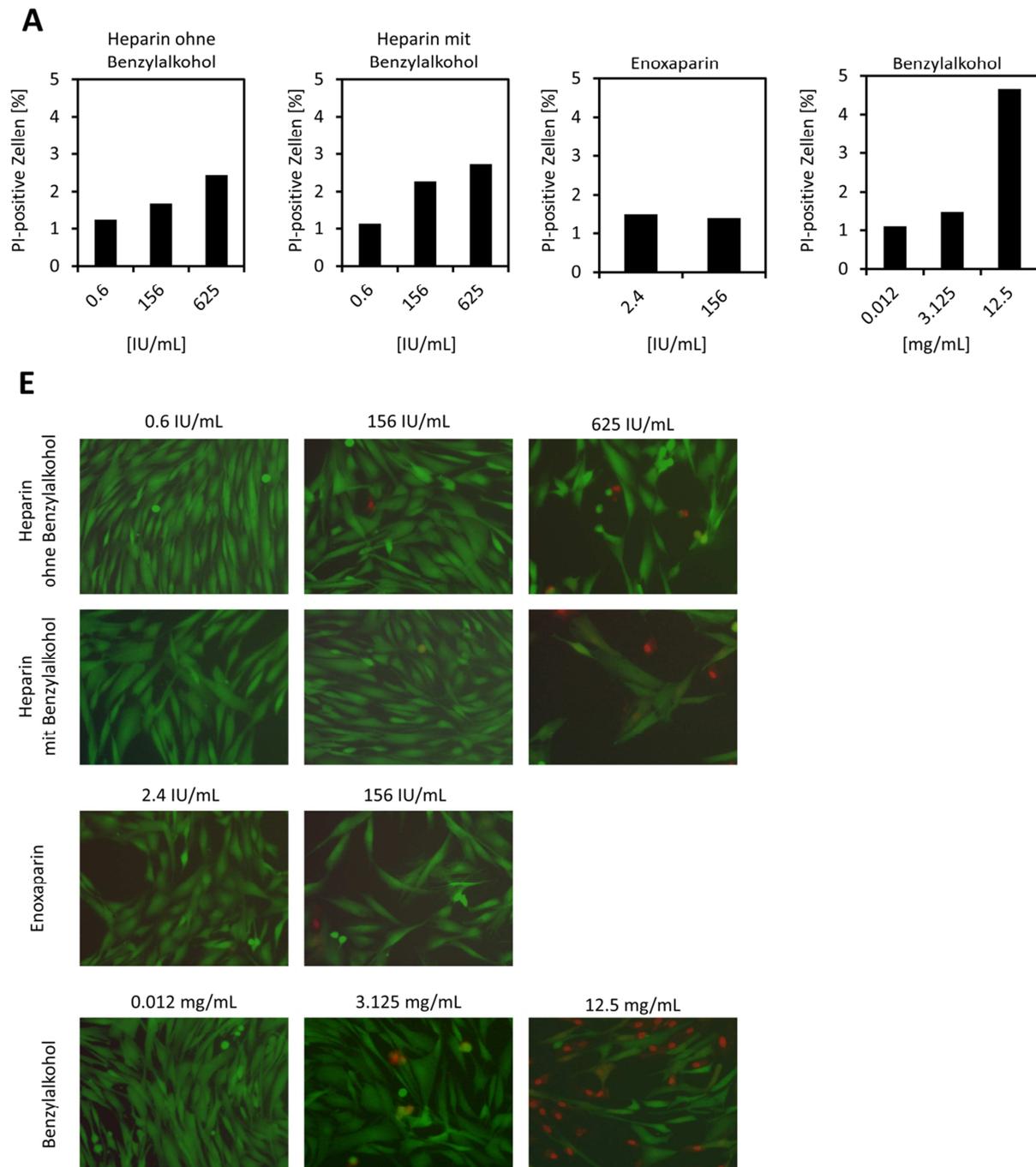


Abbildung 21: Benzylalkohol und Heparin wirken in hohen Konzentrationen zytotoxisch auf MSC. (A) MSC wurden für sieben Tage mit den angegebenen Konzentrationen an Heparin, Enoxaparin und Benzylalkohol inkubiert. Tote Zellen wurden mittels PI-Färbung durchflusszytometrisch quantifiziert. **(D)** Mittels Färbung vitaler Zellen mit FDA (grün) und toter Zellen mit PI (rot) konnten speziell bei der hohen Benzylalkoholkonzentration tote Zellen nachgewiesen werden. Hohe Heparinkonzentration mit oder ohne Benzylalkohol führte zu einer geringen Zelldichte und wenigen PI-positiven Zellen. Modifiziert nach: Hemeda et al. 2013.

4.4 Analyse des Effekts von TGF- β 1 auf MSC Langzeitkulturexpansion und spezifische Reaktion auf TGF- β 1 in früher und später Passage

Die langfristige Wirkung von TGF- β 1 auf MSC, das in latenter Form auch in FCS- und HPL-Kulturmedium präsent ist und auch zur serumfreien Kultivierung von MSC zugesetzt wird (Ng et al., 2008), ist weitgehend unbekannt. Kontroverse Studien zum Effekt von TGF- β 1 auf MSC *in vitro* legen nahe, dass die spezifische Wirkung von mehreren Faktoren, wie möglicherweise der replikativen Alterung der MSC abhängig ist. Zur Analyse des Einflusses von TGF- β 1 auf MSC-Charakteristika während einer Kulturexpansion diente eine Langzeitkulturexpansion mit kontinuierlicher TGF- β 1 Stimulation. Eine alterungsabhängige Wirkung von TGF- β 1 auf MSC wurde auf Genexpressionsebene analysiert.

4.4.1 Evaluierung geeigneter Stimulationsbedingungen

Zur Bestimmung einer geeigneten Konzentration von TGF- β 1 wurden MSC nach 12 h Serumdeprivation mit 0,01 bis 10 ng/mL TGF- β 1 für 60 min stimuliert. Die Reaktion auf TGF- β 1-Stimulation kann auf Genexpressionsebene anhand der frühen Regulation spezifischer Transkriptionsfaktoren wie der ID Proteine nach 60 min nachgewiesen werden (Liang et al., 2009). Die stärkste Expression lag für *ID1* und *ID3* bei 1 ng/mL. Bei keiner Konzentration konnte ein Effekt auf die Expression von *ID2* detektiert werden (Abbildung 22A). Da die MSC-Proliferation unter serumfreien Bedingungen stark beeinträchtigt ist, wurde untersucht, ob TGF- β 1 auf MSC in 10 % FCS-Medium ähnlich wirkt wie nach 12 h Serumdeprivation. Sowohl unter Serumdeprivation, als auch mit 10 % Serumzusatz, konnte eine ähnliche Regulation von *ID1*, *ID2* und *ID3* gemessen werden (Abbildung 22B). Anhand dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Experimente, falls nicht anders angegeben, in normalem Kulturmedium und mit 1 ng/mL TGF- β 1 durchgeführt.

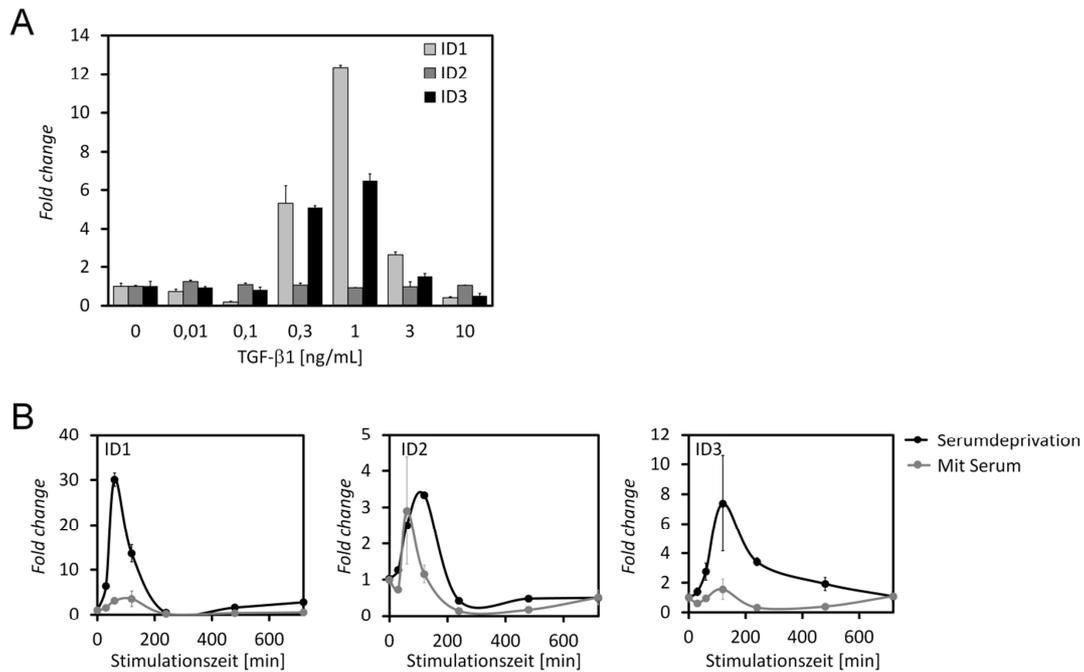


Abbildung 22: Evaluierung geeigneter Stimulationsbedingungen mit TGF-β1 (A) *Fold changes* der Expression von *ID1*, *ID2*, *ID3* 60 min nach Stimulation mit TGF-β1 unter Serumdeprivation in Konzentrationen von 0,01 – 10 ng/mL, bezogen auf 0 ng/mL ($n = 2$). **(B)** Vergleich der Genexpression nach Stimulation mit 1 ng/mL TGF-β1 mit und ohne Serumdeprivation über einen Zeitraum von 0-12 h ($n = 2$). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen.

4.4.2 TGF-β1 beeinflusst die MSC-Morphologie und ihr adipogenes und osteogenes Differenzierungspotential

MSC wurden mit oder ohne TGF-β1 in FCS-Medium kultiviert. In einigen MSC-Präparationen wiesen die Zellen mit TGF-β1 Stimulation nach ein bis vier Tagen eine flächigere Morphologie auf, welches nach weiteren Passagen deutlicher wurde (Abbildung 23A). Nach sieben Tagen lagerten sich alle mit TGF-β1 behandelten MSC-Präparationen netzwerkartig zusammen, wohingegen sich die unbehandelten MSC gleichmäßig flächig auf dem Kulturschalenboden verteilten. Diese Veränderungen erfolgten auch nach Zugabe höherer Konzentrationen an TGF-β1 von 10 und 100 ng/mL (nicht dargestellt). Nach Aussaat der stimulierten MSC in Kulturmedium ohne TGF-β1 konnte dieser Phänotyp auch 100 Tage nach Beginn der kontinuierlichen Stimulation rückgängig gemacht werden (Abbildung 23B). Messungen des für MSC charakteristischen Oberflächenmarkerprofils (positiv für CD29, CD73, CD90 und CD105, negativ für CD14, CD31, CD34, CD45) ergaben keine Unterschiede zwischen mit TGF-β1 behandelten MSC und unbehandelten Kontrollzellen. Es gab keinen

Hinweis auf eine erhöhte Expression des myogenen Markers CD325 (N-Cadherin) (Abbildung 23C).

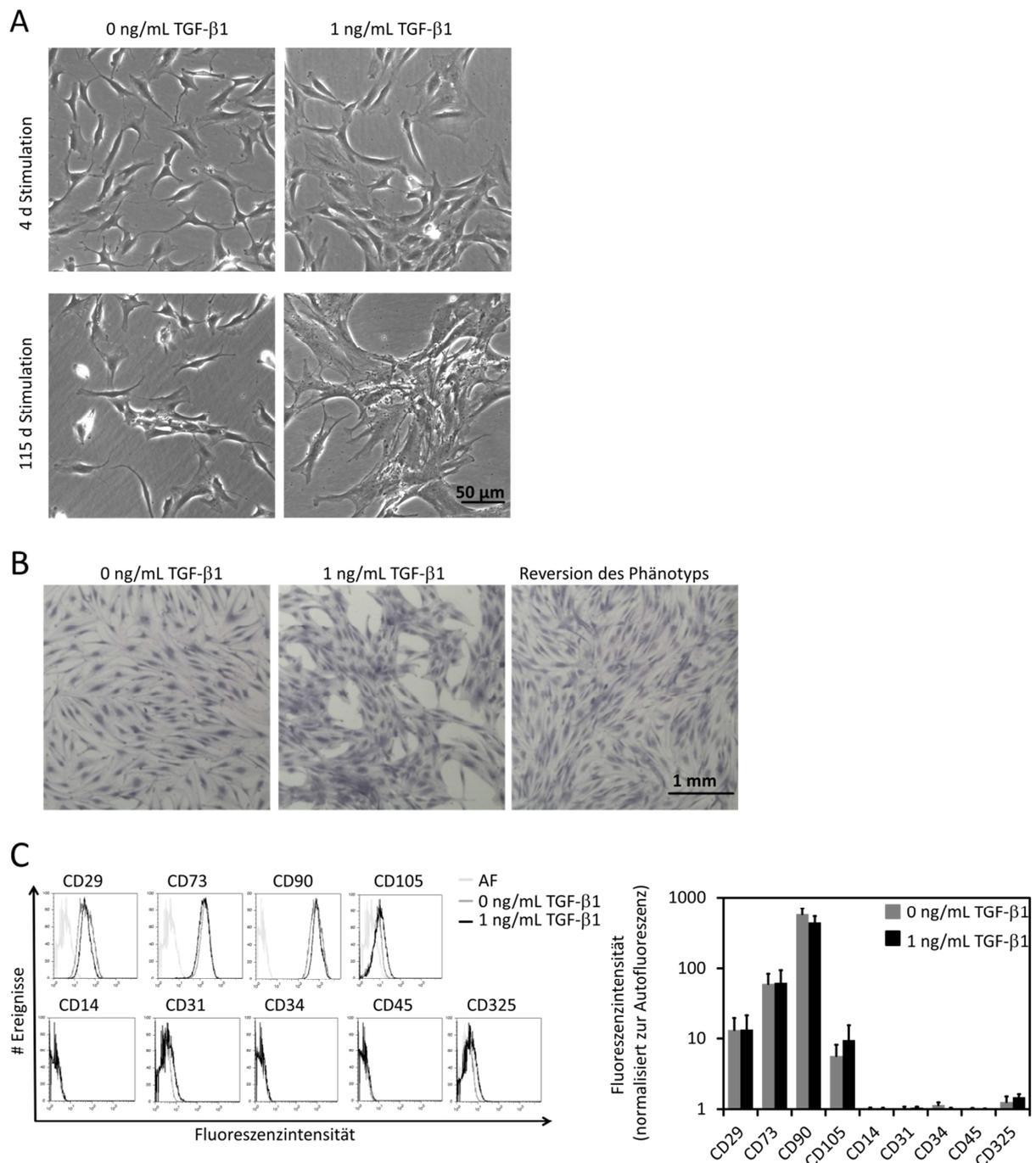


Abbildung 23: Einfluss von TGF- β 1 auf MSC-Morphologie und Immunphänotyp. (A) TGF- β 1 verursachte in einigen MSC-Präparationen eine flächigere Morphologie, besonders in später Passage. (B) TGF- β 1 bewirkt ein netzwerkartiges Wachstumsmuster. Dieses ist reversibel, wenn die Zellen in Kulturmedium ohne TGF- β 1 wieder ausgesät werden. Die Zellen wurden nach sieben Tagen Proliferation fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. (C) Immunphänotypische Analyse nach vier bis fünf Passagen unter kontinuierlicher Stimulation mit TGF- β 1 zeigte das für MSC typische Oberflächenmarkerprofil. Eine quantitative Analyse der Fluoreszenzintensität zeigte keine Unterschiede zur unbehandelten MSC (n = 5; das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen). B und C publiziert unter: Walenda et al., 2013.

Als nächstes wurde das *in vitro* Differenzierungspotential von MSC, die über ein bis vier Passagen mit TGF- β 1 stimuliert worden waren, untersucht. Als Kontrolle dienten unbehandelte MSC derselben Spender. Die adipogene Differenzierung war komplett inhibiert, wenn dem Differenzierungsmedium TGF- β 1 zugesetzt wurde, was sich durch das Fehlen von Fetttropfchen zeigte. Auch die osteogene Differenzierung war in vier von sieben MSC-Präparationen reduziert, wenn TGF- β 1 dem Differenzierungsmedium zugesetzt wurde, was anhand geringerer Calciumphosphatpräzipitation erkennbar war. Bei der chondrogenen Differenzierung konnte mittels Glykosaminoglykanfärbung kein Unterschied zwischen mit TGF- β 1 behandelten und unbehandelten Kontrollzellen nachgewiesen werden (Abbildung 24A). Eine per Microarray durchgeführte Genexpressionsanalyse zeigte, dass 12 h nach TGF- β 1 Stimulation ohne zusätzlich differenzierungsfördernde Mediumzusätze der adipogene Differenzierungsmarker *PPAR γ* signifikant runterreguliert war. Jedoch konnte keine Veränderung der Geneexpression von *C/EBPA* oder *FABP4* nach 12 h festgestellt werden. Es konnte ebenfalls eine signifikante verstärkte Expression des osteogenen Markers *Runx2* nachgewiesen werden, wohingegen es keine Regulation von *SPP1* und *BGLAP* gab. Auch die Expression des chondrogenen Differenzierungsmarkers *ACAN* wurde durch TGF- β 1 beeinflusst (Abbildung 24B).

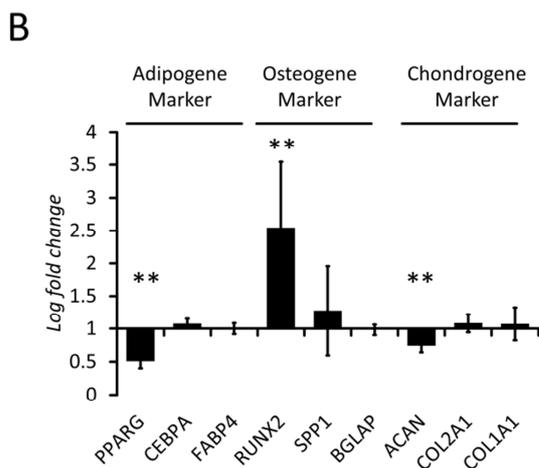
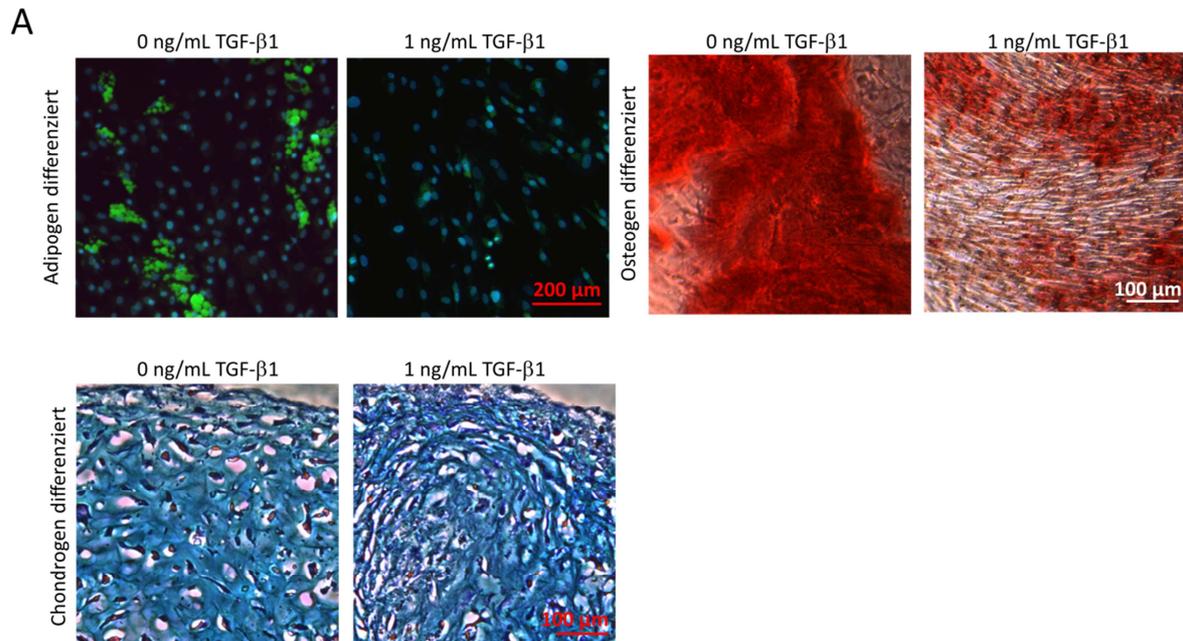


Abbildung 24: Einfluss von TGF- β 1 auf das Differenzierungspotential von MSC *in vitro*. (A) MSC, die für 1-4 Passagen mit oder ohne 1 ng/mL TGF- β 1 kultiviert waren, wurden zur *in vitro* Differenzierung verwendet. Zu den mit TGF- β 1 präkultivierten MSC wurde 1 ng/mL TGF- β 1 ins osteogene oder adipogene Differenzierungsmedium gegeben. Die osteogene und adipogene Differenzierung war mit TGF- β 1 reduziert, bei der chondrogenen Differenzierung zeigte sich kein Unterschied zur Kontrolle. (B) TGF- β 1 Stimulation für 12 h bewirkte signifikante Veränderung der Genexpression von MSC Differenzierungsmarkern. Die Analyse wurde mittels Microarray durchgeführt (** $p \leq 0,01$; $n = 6$; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen). A publiziert unter: Walenda et al., 2013.

4.4.3 TGF- β 1 stimuliert die MSC-Proliferation

Zur Bestimmung der Wirkung von TGF- β 1 auf die MSC-Proliferation wurden MSC für sieben Tage mit TGF- β 1 in Konzentrationen von 0,1 bis 100 ng/mL kultiviert. Die Quantifizierung der Proliferation erfolgte mit dem MTT-Assay. Ein signifikant proliferationsfördernder Effekt von TGF- β 1 war bei einer Konzentration von 0,1 und 1 ng/mL gegenüber den unbehandelten Kontrollen nachweisbar ($p = 0,01$ und $p = 0,03$; $n = 5$; Abbildung 25A). Zur Verifizierung wurde die Anzahl DAPI gefärbter Zellkerne nach sieben Tagen Proliferation gezählt und zusätzlich der Einbau von BrdU in die DNA sich teilender MSC drei Tage nach Inkubation mit TGF- β 1 quantifiziert. Beide Methoden wiesen tendenziell auf einen proliferationsfördernden Effekt von TGF- β 1 in den Konzentrationen von 0,1 - 10 ng/mL hin (Abbildung 25B-C). Gemäß Literaturangaben bewirkt TGF- β 1 über die verstärkte Expression der CDK-Inhibitoren CDKN2A und CDKN2B zytostatische Reaktionen (Untergasser et al., 2005; Ito et al., 2007). Mittels Real Time PCR wurde die *CDKN2A* und *CDKN2B* Genexpression nach 1 bis 12 h TGF- β 1 Stimulation in fünf MSC-Präparationen gemessen. *CDKN2B* mRNA war 12 h nach TGF- β 1 Stimulation signifikant erhöht, wohingegen die Expression von *CDKN2A* kaum Unterschiede zeigte (Abbildung 25D). Eine Zellzyklusanalyse von zwei MSC-Präparationen mittels PI-Färbung, die zwei Tage nach Beginn der TGF- β 1 Stimulation durchgeführt wurde, ergab keine deutlichen Unterschiede in der Anzahl der Zellen in G₀/G₁-, S- und G₂/M-Phase zwischen behandelten und unbehandelten MSC (Abbildung 25E).

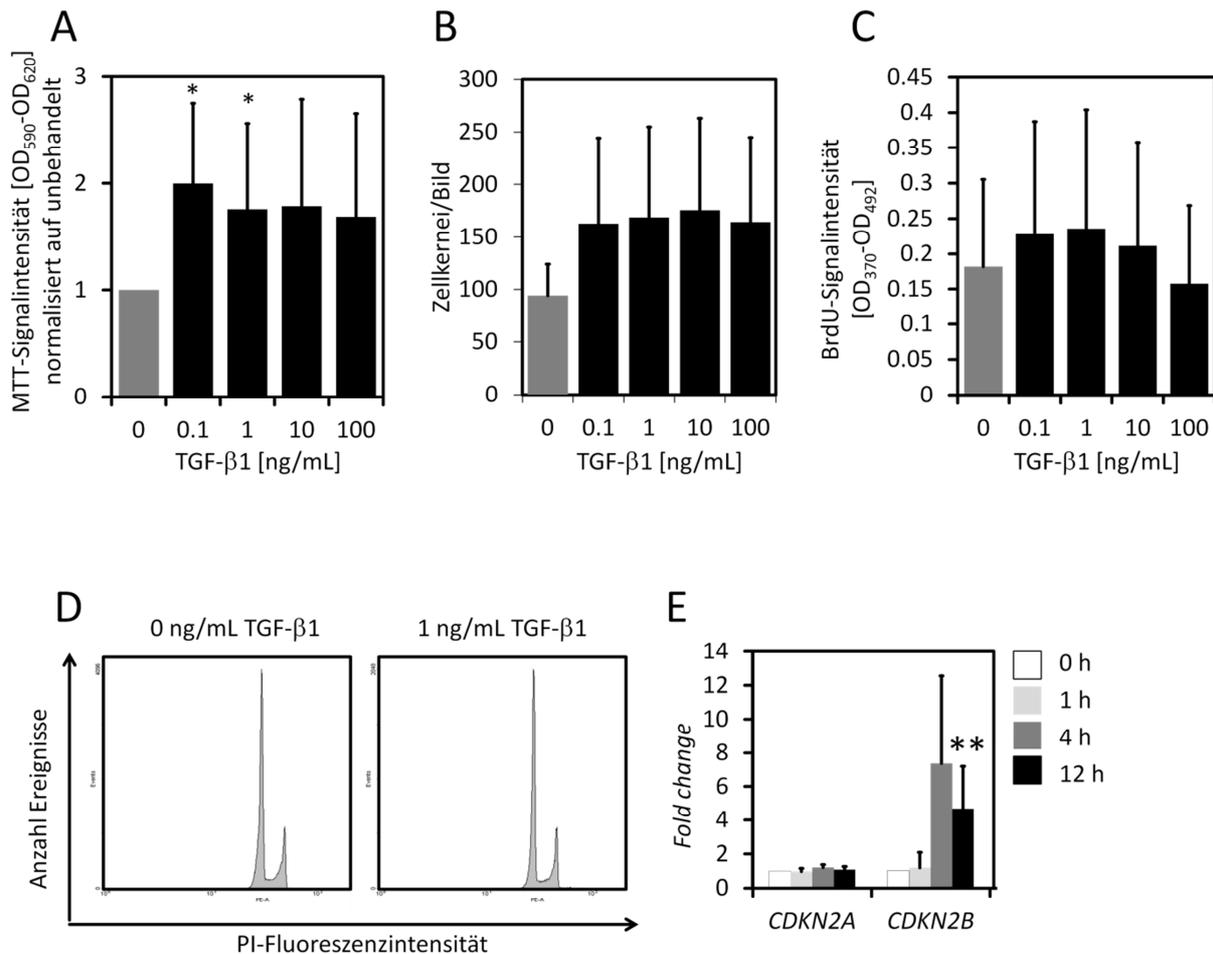


Abbildung 25: Einfluss von TGF-β1 auf MSC-Proliferation und Zellzyklus. (A) Eine Quantifizierung mittels MTT-Assay zeigte einen signifikant proliferationsfördernden Effekt von TGF-β1 in den Konzentrationen von 0,1 und 1 ng/mL nach sieben Tagen Stimulation (n = 5). **(B)** Zellkernzählung (n = 3) nach sieben und **(C)** kolorimetrische Quantifizierung von BrdU Einbau (n = 6) nach drei Tagen Proliferation wiesen ebenfalls auf die proliferationsfördernde Wirkung hin. **(D)** Eine Zellzyklusanalyse ergab keinen Unterschied zwischen stimulierten und unstimulierten MSC nach zwei Tagen. **(E)** Genexpressionsanalysen der CDK-Inhibitoren zeigte eine signifikante Hochregulation von *CDKN2B* nach 12 h Stimulation mit 1 ng/mL TGF-β1 (n = 5). In den Diagrammen sind Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt; *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01. A publiziert unter: Walenda et al., 2013.

4.4.4 Langzeitwirkung von TGF-β1 auf MSC-Expansion und Seneszenz

Um die langfristige Wirkung von TGF-β1 auf die MSC-Proliferation zu bestimmen, wurden sieben MSC-Präparationen ab p1 oder p4 in Kulturmedium mit Zusatz von 1 ng/mL TGF-β1 kultiviert, wobei TGF-β1 bei jedem Mediumwechsel frisch zugesetzt wurde. Wachstumskurven wurden mit unbehandelten MSC derselben Zellpräparationen verglichen (Abbildung 26A). Es zeigte sich, dass mit TGF-β1 behandelte MSC signifikant früher das Ende der proliferativen Phase erreichten als die unbehandelten Kontrollen (Abbildung 26B). In den

ersten Passagen wiesen sie hingegen eine signifikant erhöhte Proliferation auf (Differenz der cPD zwischen mit TGF- β 1 stimulierten und unstimulierten MSC in p1: 0,7; in p2: 1,73 und in p3: 2,94 Abbildung 26C). Die Differenz an cPD blieb über die darauffolgenden vier Passagen zunächst im Durchschnitt konstant. Danach wurde die Expansionsgeschwindigkeit der TGF- β 1 behandelten MSC niedriger, wodurch behandelte und unbehandelte MSC zum Ende ihrer Proliferation die gleiche maximale Zahl an cPD aufwiesen (Abbildung 26D). Ein vorzeitiger Eintritt in die zelluläre Seneszenz TGF- β 1 stimulierter MSC konnte mittels zusätzlicher Messung der SA- β -Gal-Aktivität nach den ersten acht Wochen der Langzeitkultivierung nicht festgestellt werden (Abbildung 26E-F).

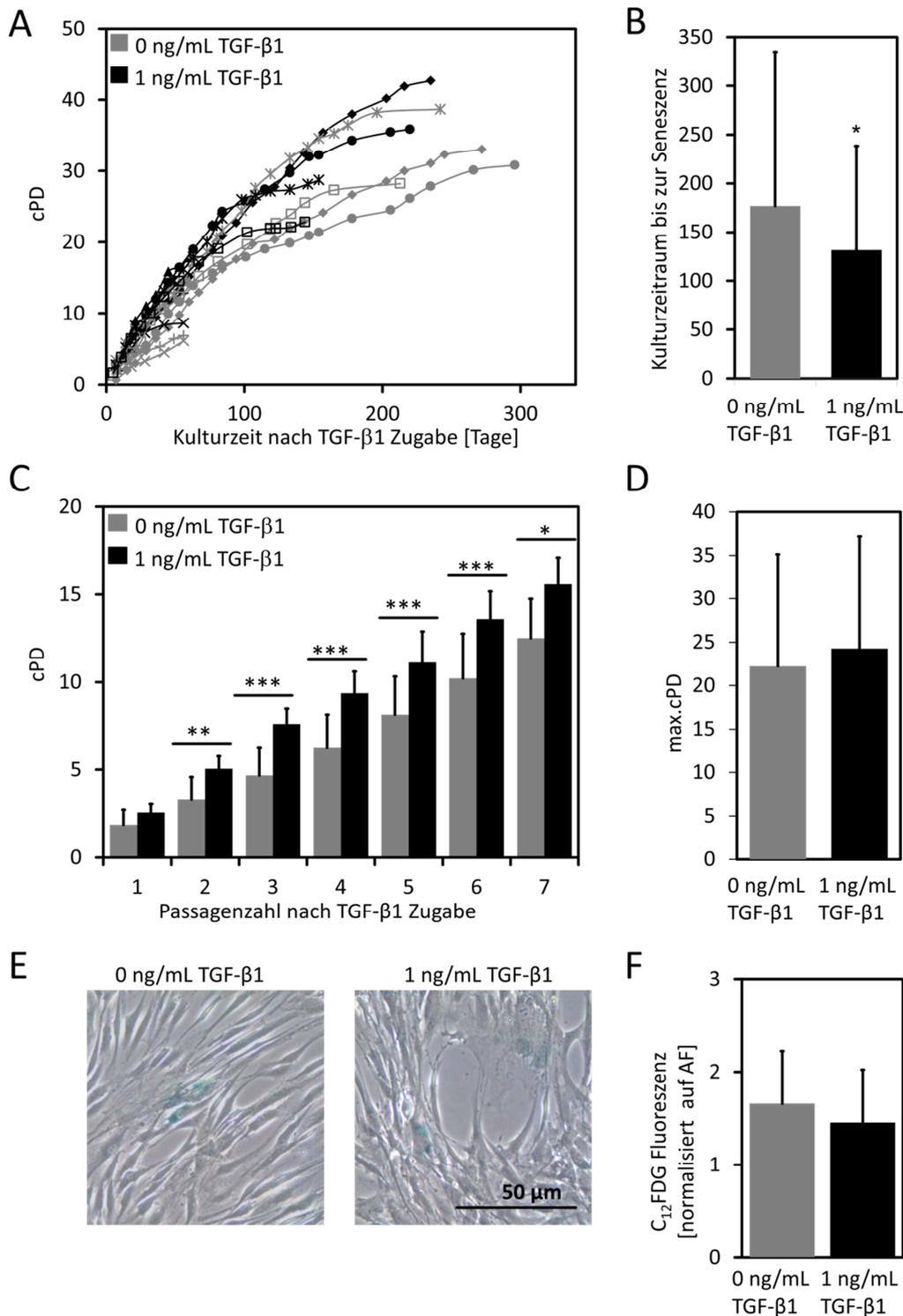


Abbildung 26: Langfristige Wirkung von TGF-β1 auf MSC-Proliferation und zelluläre Seneszenz. (A) Wachstumskurven langzeitkultivierter MSC mit oder ohne kontinuierliche Stimulation mit TGF-β1. (B) Kulturzeit bis zum Ende der proliferativen Phase mit oder ohne TGF-β1 Stimulation (n = 6). (C) Vergleich der cPD über mehrere Passagen und (D) maximale cPD der MSC mit oder ohne TGF-β1 Stimulation (n = 6). (E) Exemplarische Bilder von der Bestimmung der SA-β-Gal-Aktivität nach drei Passagen mittels X-Gal Färbung und (F) fluorozytometrischer Messung von C₁₂FDG Substratumsatz (n = 3). Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichungen; *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001. Veröffentlicht unter: Walenda et al., 2013.

4.4.5 Einfluss von TGF- β 1 auf epigenetische seneszenzassoziierte Marker in MSC

Das Methylierungsprofil spezifischer mit den Genen *CASR*, *PRAMEF2*, *CASP14*, *KRTAP13-3*, *SELP* und *GRM7* assoziierter CpG-sites weist eine hohe Korrelation zur Passagenzahl und cPD von MSC auf, und ist dadurch ein Indikator der zellulären Alterung (Koch et al., 2012). Um epigenetische seneszenzassoziierte Veränderungen langzeitkultivierter MSC mit oder ohne TGF- β 1 zu untersuchen, wurde von fünf Spendern nach fünf oder 14 Passagen nach Stimulationsbeginn (entsprechend einer Gesamtzahl von sechs bzw. 17 Passagen) das Methylierungsprofil dieser CpG-sites mittels Bisulfitkonversion und Pyrosequenzierung untersucht. Die anhand der Methylierung geschätzte Passagenzahl und cPD sind für jede CpG-site und für jeden Spender in Tabelle 8 aufgelistet. Für die weitere Analyse wurden die Mittelwerte zu den einzelnen CpG-sites verwendet.

Tabelle 8: Darstellung der berechneten Passagen und cPDs anhand der prozentualen Methylierung für jede CpG-site und jede MSC Präparation. Anhand der prozentualen Methylierung der spezifischen CpG-sites lassen sich Passage und cPDs der MSC-Präparationen anhand der Formeln in Tabelle 7 extrapolieren. Die Mittelwerte für die einzelnen CpG-sites wurden für die weitere Analyse des Effekts von TGF- β 1 auf zelluläre Alterung verwendet.

CpG-site		MSC 1 - TGF	MSC1 + TGF	MSC 2 - TGF	MSC2 + TGF	MSC 3 - TGF	MSC3 + TGF	MSC 4 - TGF	MSC4 + TGF	MSC 5 - TGF	MSC5 + TGF
	Passage	6	6	6	6	17	17	17	17	6	6
	cPD	7,69	13,49	6,89	9,39	26,08	31,87	26,78	36,64	13,07	15,01
CASR	Meth. (%)	33	25	42	47	31	37	19	24	23	41
	Berechnete Passage	15,93	10,22	22,57	26,21	14,91	19,30	6,05	9,74	9,27	21,69
	Berechnete cPD	34	24	45,63	52	32,23	39,9	16,71	23,16	22,35	44,08
PRAMEF2	Meth. (%)	52	38	60	33	37	20	41	34	52	33
	Berechnete Passage	7,66	19,72	1,37	23,78	20,48	34,93	16,68	22,57	8,31	23,58
	Berechnete cPD	20,84	41,51	10,06	48,47	42,81	67,59	36,3	46,4	21,96	48,14
SELP	Meth. (%)	79	67	74	37	62	46	69	62	64	60
	Berechnete Passage	0,32	7,91	3,33	26,47	11,19	20,88	6,35	10,93	9,60	12,16
	Berechnete cPD	5,12	18,62	10,47	51,61	24,44	41,68	15,84	23,98	21,62	26,17
GRM7	Meth. (%)	6	2	0	4	8	4	2	2	5	4
	Berechnete Passage	2,95	-0,39	-2,18	1,27	5,10	1,45	-0,15	-0,16	2,51	1,20
	Berechnete cPD	10,58	4,45	1,17	7,51	14,51	7,83	4,9	4,86	9,77	7,37
KRTAP13-3	Meth. (%)	26	21	75	32	7	8	10	8	38	18
	Berechnete Passage	24,92	27,82	-0,46	21,72	35,20	34,36	33,78	34,62	19,04	29,43
	Berechnete cPD	49,75	55,25	1,53	43,67	69,28	67,68	66,58	68,17	38,58	58,31
CASP14	Meth. (%)	30	26	44	27	18	8	27	24	18	26
	Berechnete Passage	18,48	22,35	7,15	21,62	28,50	36,92	21,08	23,92	29,18	22,05
	Berechnete cPD	38,97	45,6	19,54	44,34	56,12	70,57	43,43	48,29	57,3	45,09
	Gemittelte berechnete Passage	11,71	14,60	5,30	20,18	19,23	24,64	13,97	16,93	12,98	18,35
	Gemittelte berechnete cPD	26,54	31,54	14,73	41,26	39,9	49,21	30,63	35,81	28,6	38,19

Mit TGF- β 1 kultivierte MSC wiesen eine Methylierungssignatur auf, die einer deutlich höheren geschätzten Passagenzahl als die unbehandelten MSC entsprach (Abbildung 27A).

Die Differenz der geschätzten Passagenzahl zu der tatsächlichen Passagenzahl war bei mit TGF- β 1 kultivierten MSC signifikant höher als in den Kontrollen ($p = 0,02$; einseitiger ungepaarter T-test; Abbildung 27B). Auch die geschätzten cPD der mit TGF- β 1 kultivierten MSC waren höher als die der unbehandelten MSC (Abbildung 27C), jedoch gab es keinen Unterschied in der Differenz der geschätzten cPD zu den tatsächlichen cPD zwischen TGF- β 1 behandelten und unbehandelten MSC (Abbildung 27D). Dieses deutet darauf hin, dass die verstärkte Expansion mit TGF- β 1 zu einer schnelleren replikativen Seneszenz führt.

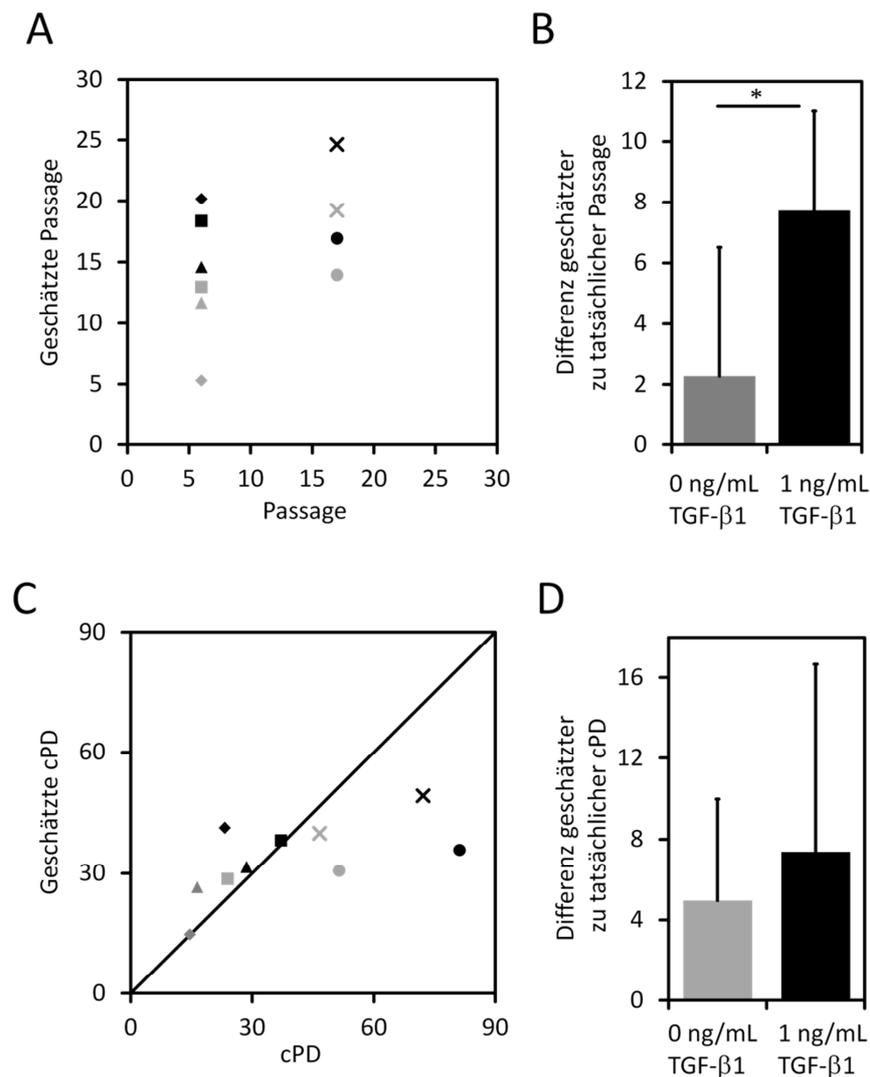


Abbildung 27: Analyse seneszenzassoziierter DNA-Methylierung von sechs CpG-sites nach Langzeitkultivierung mit oder ohne TGF- β 1. (A) Darstellung der anhand der DNA-Methylierung geschätzten Passagen- gegenüber der tatsächlichen Passagenzahl. (B) Gemittelte Differenz der geschätzten Passage zu der tatsächlichen Passage für jede MSC-Präparation. (C) Darstellung der geschätzten cPD gegenüber den tatsächlichen cPD; zur besseren Verdeutlichung ist die Ursprungsgerade eingezeichnet. (D) Gemittelte Differenz der errechneten cPD zu den tatsächlichen cPD für jede MSC-Präparation. In A und B: Jedes Symbol repräsentiert eine MSC-Präparation, graue Symbole mit TGF- β 1, schwarz ohne TGF- β 1, * $p \leq 0,05$. B, C modifiziert publiziert unter: Walenda et al., 2013.

4.4.6 Hohe Korrelation differentiell exprimierter Gene in MSC früher und später Passage nach TGF- β 1 Stimulation

Zum Vergleich des Effekts von TGF- β 1 im Verlauf einer Kulturexpansion wurden drei MSC-Präparationen in jeweils früher (p3-5) und später Passage (p10) mit TGF- β 1 für 0, 1, 4 und 12 Stunden stimuliert. Anschließend wurde die globale Genexpression der Proben mit Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0 ST Arrays gemessen. Die Hybridisierung erfolgte unter der Leitung von Prof. Dr. Hubert Smeets am Institute for Molecular Cell Biology, CARIM School for Cardiovascular Diseases, Universität Maastricht.

Die mittels Microarray bestimmte Expression der Transkriptionsfaktoren *ID1*, *ID2* und *ID3* wurde für alle Proben mit einer per Real Time PCR gemessenen Expression verglichen. Mit beiden Methoden zeigte sich eine sehr hohe Übereinstimmung in dem Expressionsverlauf (Abbildung 28).

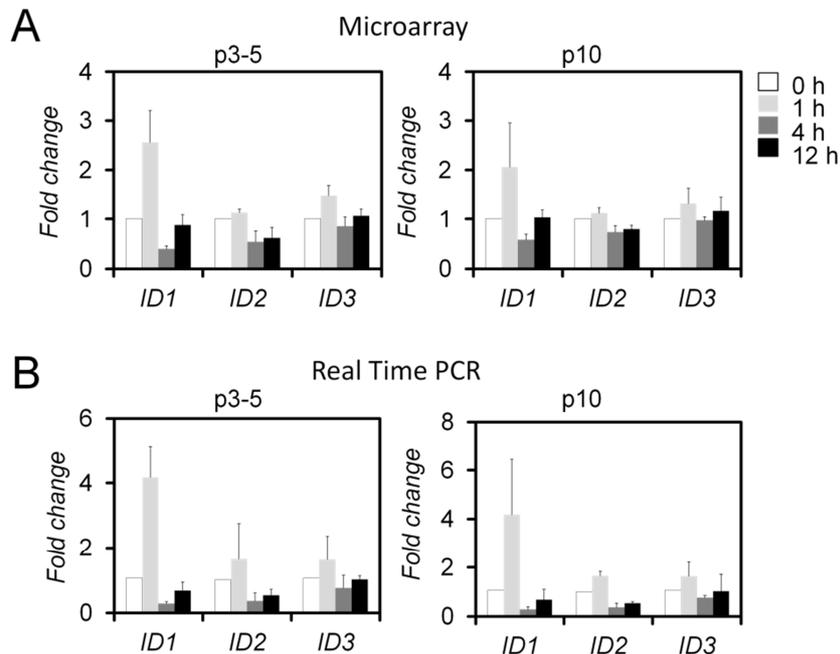


Abbildung 28: Vergleich der mittels Microarray und Real Time PCR bestimmten Expression der *ID1*, *ID2* und *ID3* Transkriptionsfaktoren in den MSC-Präparationen in früher und später Passage 0, 1, 4 und 12 h nach TGF- β 1 Stimulation. (A) Mittelwerte und Standardabweichungen der *fold changes* gemessen per Microarray (n = 3) und (B) gemessen per Real Time PCR (n = 3) sind dargestellt.

Eine hierarchische Clusteranalyse der Genexpressionsprofile und ein PC1/PC2-Plot (erstellt von Khalid Abnaof am B-IT) zeigten eine spenderabhängige Trennung der MSC Präparationen und es zeigte sich eine deutliche Trennung der MSC in früher und später Passage. Zusätzlich waren die Proben anhand des Zeitpunktes nach TGF- β 1 Stimulation angeordnet, wodurch sich andeutet, dass die Genexpression in ähnlicher Weise durch TGF- β 1 reguliert wurde (Abbildung 29A-B).

Wurden unstimulierte mit für 1, 4 und 12 h TGF- β 1 stimulierten MSC verglichen, zeigte sich, dass die Anzahl der signifikant differentiell exprimierten Gene über die Zeit sowohl bei früher als auch bei später Passage zunahm. Dabei konnte eine hohe Korrelation der *Log Fold changes* signifikant differentiell exprimierter Gene zwischen den Passagen festgestellt werden (Abbildung 29C, Tabelle 9 und Anhang Heatmaps 1-6).

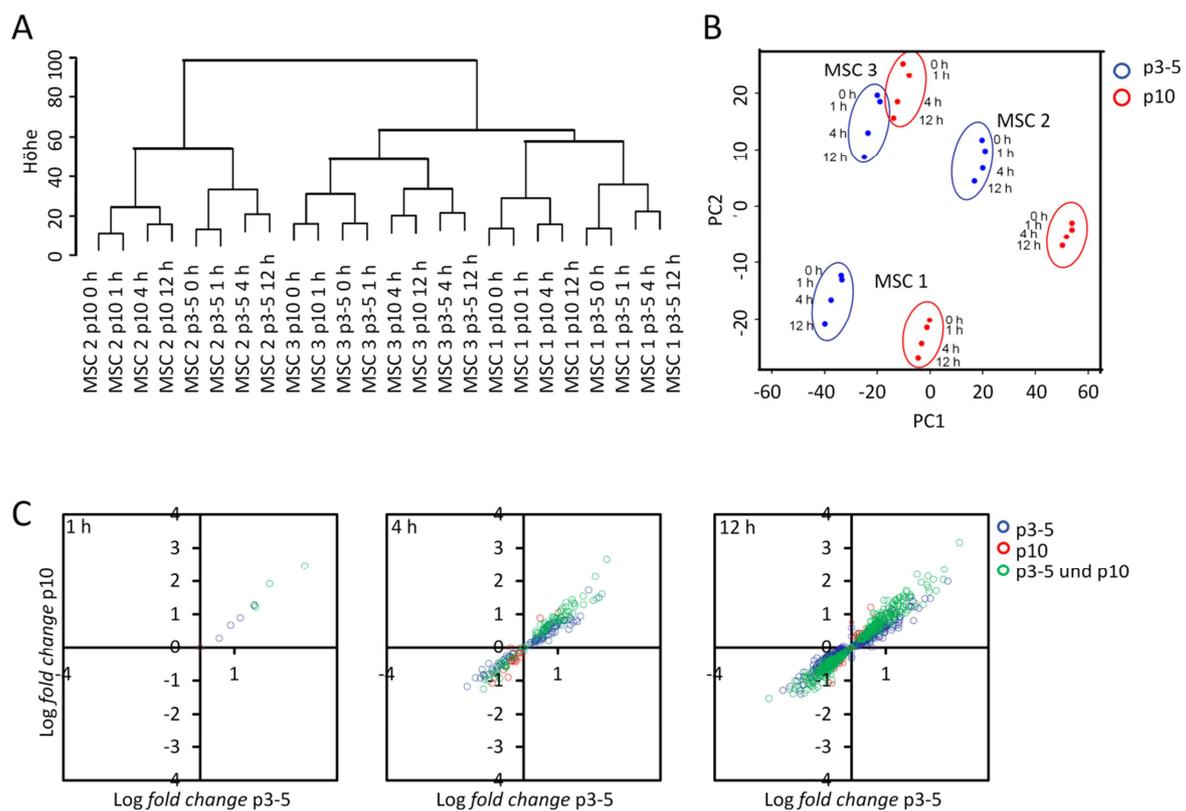


Abbildung 29: Veränderung der Genexpression nach TGF- β 1 Stimulation in MSC früher und später Passage. (A) Eine Hierarchische Clusteranalyse und ein (B) PC1/PC2-Plot zeigen, dass sich TGF- β 1 stimulierte MSC anhand ihres Expressionsprofils primär nach Spender und Alter trennen, jedoch die Auftrennung nach TGF- β 1 Stimulation zu den verschiedenen Zeitpunkten für alle Präparation gleich ist. (C) Auftragung der *log Fold change* Werte signifikant differentiell exprimierter Gene nach TGF- β 1 Stimulation zeigt eine hohe Korrelation in der Reaktion zwischen früher und später Passage. Mit freundlicher Genehmigung von Khalid Abnaof. Publiziert unter: Walenda et al., 2013.

Aufgrund der begrenzten statistischen *Power*, welche eine Analyse pro Zeitpunkt mit nur drei Replikaten bietet, wurde eine Zeitverlaufsanalyse (*Time Course Analysis*) durchgeführt. Diese Analyse ergab eine differentielle Genexpression von 2469 Transkripten von MSC der frühen und 1966 Transkripten der späten Passage durch TGF- β 1 über den gesamten Stimulationszeitraum (Wahrscheinlichkeit > 95%) mit einer Übereinstimmung von 1285 Genen in beiden Passagen (Tabelle 9 und Anhang Tabellen 2 - 3). Letzteres weist ebenfalls darauf hin, dass MSC früher und später Passage ähnlich auf TGF- β 1 reagieren.

Tabelle 9: Anzahl differentiell exprimierter Gene nach TGF- β 1 Stimulation im Vergleich zu unbehandelten MSC. Die Veränderungen wurden in MSC früher und später Passage zu einzelnen Zeitpunkten (Limma T-test, FDR < 5 %) oder durch eine Zeitverlaufsanalyse (empirische Bayes Methode, Wahrscheinlichkeit > 95 %) analysiert. Mit freundlicher Genehmigung von Khalid Abnaof.

Anzahl der signifikant differentiell exprimierten Gene nach TGF- β 1 Stimulation				
	1 h	4 h	12 h	Zeitverlaufsanalyse
p3-5 unstimuliert vs. stimuliert	10	326	2108	2469
p10 unstimuliert vs. stimuliert	5	336	952	1966
p3-5 u. p10 unstimuliert vs. stimuliert	4	129	646	1285

Im Vergleich der Genexpression zwischen früher und später Passage ohne TGF- β 1 Stimulation konnten 345 signifikant differentiell exprimierte Gene (FDR < 5 %) gefunden werden. Nach TGF- β 1 Stimulation waren zwischen 237 und 494 Gene zwischen früher und später Passage signifikant differentiell exprimiert, von denen 132 Gene zu allen Zeitpunkten eine differenzielle Expression aufwiesen. Demnach war die Anzahl der differentiell exprimierten Gene zwischen früher und später Passage vor und nach TGF- β 1 Stimulation nahezu konstant (Tabelle 10 und Anhang Heatmaps 7-10).

Tabelle 10: Anzahl differentiell exprimierter Gene vor und nach TGF- β 1 Stimulation im Vergleich zwischen MSC (Limma T-test, FDR < 5 %) früher und später Passage. Davon waren 132 Gene zu allen Zeitpunkten differentiell exprimiert. Mit freundlicher Genehmigung von Khalid Abnaof.

Anzahl signifikant differentiell exprimierter Gene zwischen p3-5 und p10 (unstimuliert und stimuliert)					
	0 h	1 h	4 h	12 h	Alle Zeitpunkte
p3-5 vs p10	345	469	238	494	132

In der Zeitverlaufsanalyse zeigten vier Gene namentlich *sulfatase 1 (SULF 1)*, *progesteron and adipoQ receptor family member V (PAQR5)*, *ribosomal protein large P1 (RPLP1)* und *thrombospondin 4 (THBS4)*, mit einer Wahrscheinlichkeit von > 95 % und drei Gene

namentlich *transmembrane 4 L six family member 1 (TM4SF1)*, *family with sequence similarity 45 member A (FAM45A)* und *EGF latrophilin and seven transmembrane domain containing 1 (ELTD1)* mit einer Wahrscheinlichkeit von > 80 % eine differentielle Expression zwischen früher und später Passage. Von diesen Genen zeigten nur *PAQR5* in früher ($p = 0.024$) und *TM4SF1* in früher und später Passage eine signifikante Regulation durch TGF- β 1 nach 12 h ($p = 0.00068$ in p3-5 und $p = 0.024$ in p10) (Abbildung 30).

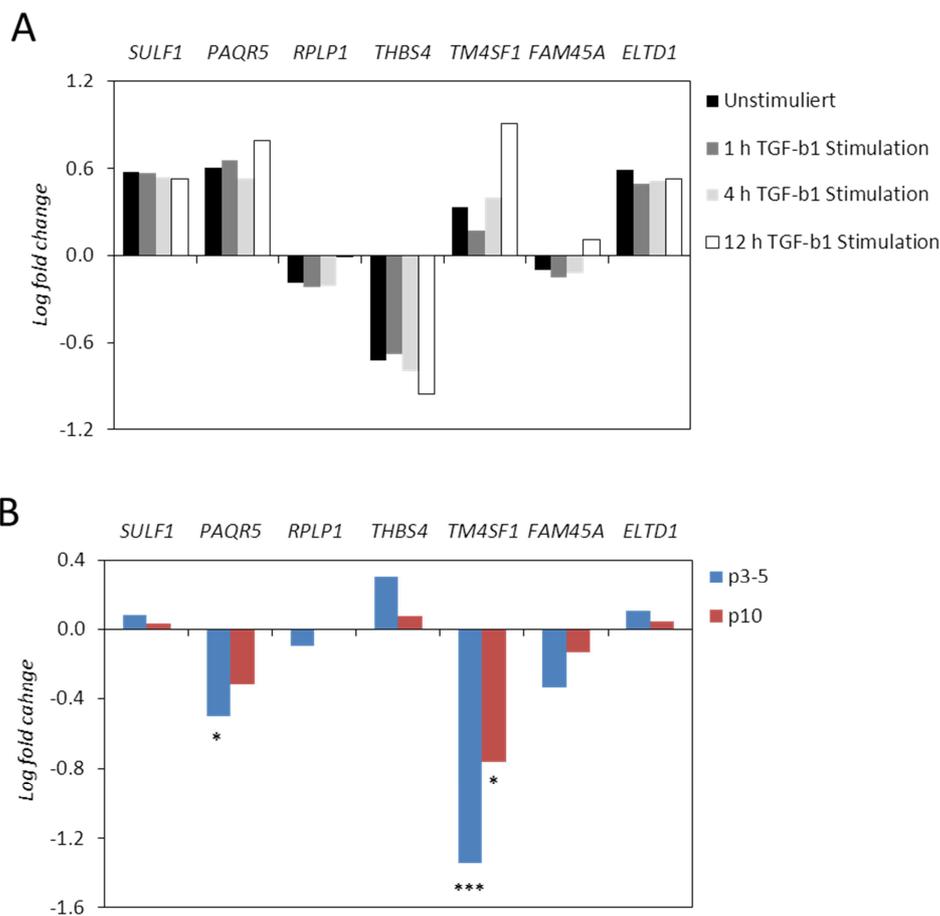


Abbildung 30: Differenziell exprimierte Gene zwischen früher und später Passage gemäß Zeitverlaufsanalyse.

(A) Die Gene *SULF1*, *PAQR5*, *RPLP1* und *THBS4* wiesen mit einer Wahrscheinlichkeit > 95 %, *TM4SF1*, *FAM45A* und *ELTD1* mit einer Wahrscheinlichkeit > 80 % eine differentielle Expression über den gesamten Zeitverlauf zwischen früher und später Passage auf. Dargestellt als Log fold change zu jedem Zeitpunkt nach TGF- β 1 Stimulation (Log fold change > 0: stärkere Expression in p10, Log fold change < 0: stärkere Expression in p3-5). **(B)** Mit Ausnahme von *TMS4F1* wurden diese Gene durch TGF- β 1 nur gering reguliert waren daher nicht relevant. Dargestellt sind die Log fold changes 12 h nach TGF-b1 Stimulation bezogen auf die Expression unstimulierter MSC. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.4.7 Assoziation zu GO-Termini und KEGG-Signalwegen

Anschließend wurden funktionelle Analysen zur Assoziation differentiell exprimierter Gene in der Zeitverlaufsanalyse zu KEGG-Signalwegen und GO-Termini durchgeführt. Es konnte eine signifikante Assoziation regulierter Gene zu insgesamt 110 KEGG-Signalwegen bei MSC der frühen und 99 der späten Passage festgestellt werden. Unter den nach der niedrigsten FDR sortierten zehn Signalwegen fielen *TGF-beta signaling pathway* (TGF-beta Signalweg), *MAPK pathway* (MAPK Signalweg), *lysosome* (Lysosom), *regulation of actin cytoskeleton* (Regulation des Actinzytoskeletts) und *focal adhesion* (Fokaladhäsion) (Tabelle 13). Des Weiteren waren differentiell exprimierte Gene zu 322 bzw. 278 GO-Termini signifikant assoziiert, darunter *signal transduction* (Signaltransduktion), *(positive /negative) regulation of cell proliferation* (positive/negative Regulation der Zellproliferation), *cell adhesion* (Zelladhäsion) und *apoptosis* (Apoptose) unter den ersten zehn Signalwegen (Tabelle 14).

Tabelle 11: Die zehn am stärksten signifikanten KEGG-Signalwege, die mit differentiell exprimierten Genen nach TGF- β 1 Stimulation assoziiert sind. Die Gene wurden anhand einer Zeitverlaufsanalyse bestimmt. Die Signalwege sind nach der niedrigsten FDR sortiert. Mit freundlicher Genehmigung von Khalid Abnaof.

Frühe Passage		Späte Passage		
	KEGG-Signalweg ID	FDR	KEGG-Signalweg ID	FDR
1	05200_pathways in cancer	3.43E-29	05200_pathways in cancer	2.77E-26
2	01100_metabolic pathways	1.27E-28	01100_metabolic pathways	5.90E-20
3	04510_focal adhesion	4.03E-16	04510_focal adhesion	3.88E-15
4	04142_lyosome	4.03E-16	04810_regulation of actin cytoskeleton	9.65E-12
5	04010_MAPK signaling pathway	8.53E-13	04010_MAPK signaling pathway	1.22E-10
6	04810_regulation of actin cytoskeleton	2.53E-12	00230_purine metabolism	5.85E-10
7	04360_axon guidance	7.50E-12	04512_ECM-receptor interaction	4.20E-09
8	04512_ECM-receptor interaction	4.09E-11	04360_axon guidance	8.81E-09
9	03030_DNA replication	4.67E-10	05212_pancreatic cancer	8.81E-09
10	04350_TGF-beta signaling pathway	1.91E-09	04350_TGF-beta signaling pathway	1.45E-08

Tabelle 12: Die zehn am stärksten signifikanten GO-Termini, die mit differentiell exprimierten Genen nach TGF- β 1 Stimulation assoziiert sind. Die Gene wurden anhand einer Zeitverlaufsanalyse bestimmt. Die Signalwege sind nach der niedrigsten FDR sortiert. Mit freundlicher Genehmigung von Khalid Abnaof.

Frühe Passage			Späte Passage	
	GO-Terminus	FDR	GO-Terminus	FDR
1	GO:0007165_signal transduction	1.11E-32	GO:0007165_signal transduction	4.01E-25
2	GO:0045944_positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	1.11E-32	GO:0045944_positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	1.71E-22
3	GO:0006915_apoptosis	4.70E-26	GO:0008285_negative regulation of cell proliferation	7.57E-20
4	GO:0007275_multicellular organismal development	1.98E-21	GO:0008284_positive regulation of cell proliferation	2.80E-19
5	GO:0008285_negative regulation of cell proliferation	9.01E-21	GO:0007275_multicellular organismal development	3.19E-17
6	GO:0007155_cell adhesion	2.14E-20	GO:0006915_apoptosis	3.19E-17
7	GO:0045893_positive regulation of transcription DNA-dependent	8.27E-20	GO:0045893_positive regulation of transcription DNA-dependent	5.65E-17
8	GO:0043065_positive regulation of apoptosis	2.71E-19	GO:0007411_axon guidance	2.25E-16
9	GO:0008284_positive regulation of cell proliferation	2.99E-19	GO:0043066_negative regulation of apoptosis	2.82E-15
10	GO:0007411_axon guidance	2.00E-18	GO:0000122_negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	3.44E-15

5 Diskussion

Isolations- und Kulturbedingungen beeinflussen die Expansionsgeschwindigkeit, das Differenzierungspotential wie auch die Heterogenität von MSC *in vitro* (Wagner und Ho, 2007). Bislang werden dazu humane oder tierische Additiva, wie HPL oder FCS, zur Kulturexpansion von MSC benötigt. Allogene Serumzusätze werden zur klinischen MSC-Kulturexpansion zur Vermeidung des xenogenen Infektionsrisikos bevorzugt. Speziell HPL eignet sich als Additiv, da es eine effiziente und sichere MSC-Expansion erlaubt (Schallmoser et al., 2007) und zusätzlich die osteogene Differenzierung fördert, ohne weitere MSC-Charakteristika zu beeinflussen (Chevallier et al., 2009; Bieback et al., 2009). HPL oder FCS wirken auf MSC durch die in ihnen enthaltenen Wachstumsfaktoren. Die Bestimmung der Wirkung spezifischer Wachstumsfaktoren unter anderem auf die Proliferation oder Differenzierung von MSC *in vitro* ist notwendig, um die Zytokine beispielsweise gezielt zuzusetzen oder zu inhibieren. Der MSC-Phänotyp wird weiterhin durch ihr Substrat beeinflusst (Abbott, 2003). Zur MSC-Kultivierung sind dabei zwei- oder dreidimensionale Substrate, wie TCP oder Hydrogele zur MSC-Kultivierung geeignet.

5.1 Individuelle Plättchenlysate eignen sich zur effizienten Isolation und Expansion humaner MSC

Die Wirkung von individuellen Plättchenlysaten zur MSC-Kultivierung ist nur wenig beschrieben. Da sich Plättchenlysate deutlich spenderabhängig voneinander unterscheiden, werden bevorzugt gemischte Plättchenlysate zur MSC-Kultivierung eingesetzt (Schallmoser et al., 2008). Hingegen könnte die Verwendung individueller Plättchenlysate unter anderem das Risiko zur Übertragung von Infektionskrankheiten minimieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine effiziente Isolation und Expansion von MSC auch mit Plättchenlysaten aus individuellen Thrombozytenkonzentraten ermöglicht wird.

Keins der zehn getesteten Plättchenlysate hatte Auswirkung auf MSC-Charakteristika wie Morphologie und Immunphänotyp. Auf das adipogene Differenzierungspotential zeigte

individuelles HPL im Vergleich zu FCS nur geringen Einfluss. Hingegen wurde die osteogene Differenzierung durch individuelles Plättchenlysate verstärkt. Dieser Effekt wurde bereits von Chevallier für gemischtes HPL beschrieben (Chevallier et al., 2009). In den verwendeten Plättchenlysaten konnten die Wachstumsfaktoren PDGF-AA, -AB, -BB und TGF- β 2 detektiert werden, welche eine Funktion in der Knochenregeneration besitzen. In einer Untersuchung von van den Dolder konnten zudem weitere Zytokine in HPL TGF- β 1, *platelet-derived epidermal growth factor* (PDEGF), *platelet-derived angiogenesis factor* (PDAF), *insulin growth factor-1* (IGF-1), *platelet factor-4* (PF-4), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *epithelial cell growth factor* (ECGF), IL-1 und Osteonectin in HPL nachgewiesen werden, die ebenfalls den Knochenaufbau regulieren (van den Dolder J. et al., 2006), und möglicherweise die verstärkte osteogene Differenzierung mit HPL als Zusatz im Differenzierungsmedium bedingen.

Die MSC-Proliferation war mit allen individuellen Plättchenlysaten als Mediumzusatz höher als mit FCS. Sie zeigten jedoch auch untereinander signifikante Unterschiede in ihrer proliferationsfördernden Kapazität. Interessanterweise bewirkte die Mischung der einzelnen Lysate eine signifikante oder tendenziell verstärkte MSC-Proliferation gegenüber nahezu allen einzelnen Plättchenlysaten, wohingegen eine mittlere MSC-Proliferation zu erwarten gewesen wäre. Dieses ließ darauf schließen, dass in einzelnen Plättchenlysaten Faktoren enthalten sein können, die eher eine antiproliferative Wirkung haben und die durch Faktoren in anderen Plättchenlysaten neutralisiert wurden. Aus diesem Grund wurde die proliferationsfördernde Kapazität der einzelnen Plättchenlysate untersucht und zunächst mit der Konzentration an Thrombozyten vor Lyse der Thrombozytenkonzentrate verglichen, da Thrombozyten ein Vehikel für Wachstumsfaktoren wie PDGF und EGF bilden (Weibric et al., 2002). Eine Studie von Ogino legt nahe, dass die Thrombozytenzahl in PRP mit der MSC-Expansion korrelierten (Ogino et al., 2006). Die Thrombozytenzahl vor der Lyse zeigte erwartungsgemäß eine tendenziell positive Korrelation zur MSC-Proliferation mit den entsprechenden Plättchenlysaten. Eine weiterführende simultane relative Quantifizierung von 174 Zytokinen in den Plättchenlysate ergab, dass insbesondere die Konzentration an PDGF-AB mit der MSC-Proliferation signifikant positiv korrelierte. PDGF-AB bindet an die Tyrosinkinase Rezeptoren PDGFR α/α und PDGFR α/β , die auf MSC exprimiert werden und die intrazellulär u.a. auf die proliferationsfördernden MAPK- und PI3K-Signalwege wirken (Ball et

al., 2007; Andrae et al., 2008). Auch weitere Studien legen einen Einfluss von PDGF-AB auf die MSC-Proliferation nahe (Ogino et al., 2006; Huang et al., 2009). Dennoch konnte eine auf dieser Arbeit aufbauende Untersuchung mit insgesamt 30 verschiedenen Plättchenlysaten eine Korrelation von PDGF-AB zur MSC-Proliferation nicht bestätigen (Lohmann et al., 2012). Diese gegensätzlichen Ergebnisse resultierten möglicherweise aus unterschiedlichen Messmethoden. In dieser Arbeit wurde ein Zytokinarray auf *enzyme linked immuno absorbent assay* (ELISA)-Basis der Firma RayBiotech verwendet, der die Bestimmung relativer Zytokinkonzentrationen erlaubte. Die Detektion erfolgte durch eine Chemilumineszenzdetektion über peroxidasegekoppelte Antikörper, wobei die Detektionszeit permanent der Signalstärke angepasst werden konnte. In der Arbeit von Lohmann wurde ein ELISA der Firma R&D-Systems verwendet, durch den absolute Zytokinkonzentrationen bestimmt wurden. Ein Nachteil dieses ELISAS war, dass die Detektionszeit nicht variiert werden konnte, wenn die Signalstärke beispielsweise zu stark oder zu schwach war. Zudem können unterschiedliche Antikörperspezifitäten zu den gegensätzlichen Ergebnissen geführt haben. Zur Klärung der spezifischen Wirkung von PDGF-AB könnte es beispielsweise rekombinant MSC-Kulturmedium zugesetzt werden. Des Weiteren bestand eine positive Assoziation zwischen den Konzentrationen an IGFBP-1 und -2 und der MSC-Proliferation. Diese Zytokine können von MSC sezerniert werden (Wagner et al., 2007), und sind am IGF-1 Signalweg beteiligt, der bei der Regulation von Proliferation und Apoptose eine Rolle spielt (Firth und Baxter, 2002). Eine weitere positive signifikante Korrelation zur MSC-Proliferation bestand zur Konzentration des Zellmembranproteins PECAM-1 (CD31), welche wahrscheinlich durch eine erhöhte Zahl von Thrombozytenmembranfragmenten in einzelnen Plättchenlysaten bedingt ist (Newman, 1997). Dementsprechend wiesen die Konzentrationen von PDGF-AA, PDGF-AB und VE-Cadherin eine positive Korrelation zu der Thrombozytenkonzentration vor der Lyse der Thrombozytenkonzentrate auf. Eine negative Korrelation einzelner Wachstumsfaktoren zur MSC-Proliferation konnte nicht nachgewiesen werden. Insgesamt weisen die Daten zur Zytokinzusammensetzung in HPL daraufhin, dass nicht hauptsächlich einzelne Faktoren, sondern ihre Kombination die MSC-Proliferation fördert. Dennoch ist es denkbar, dass die Konzentration der Faktoren IGFBP-1 und IGFBP-2 verwendet werden kann, um die proliferationsfördernde Wirkung von Plättchenlysaten vorherzubestimmen und Zellkulturbedingungen mit HPL besser standardisierbar zu gestalten.

Bei der Analyse der Plättchenlysate zur MSC-Proliferation ergab sich zudem die interessante Beobachtung, dass ihre stimulierende Wirkung tendenziell mit höherem Alter der acht männlichen HPL-Spender abnahm, und dass besonders die Lysate der beiden weiblichen Spender (HPL3 und HPL8) zu der stärksten MSC-Proliferation führten. Die Folgestudie von Lohmann konnte den altersabhängigen Effekt bestätigen, und zudem nachweisen, dass auch die osteogene Differenzierung in HPL älterer Spender reduziert ist (Lohmann et al., 2012). Die geschlechtsspezifische Wirkung konnte hingegen nicht bestätigt werden, da zu wenig Thrombozytenkonzentrate von weiblichen Spendern vorhanden waren.

Wie alle primären Zelllinien werden MSC in einer Langzeitkultur replikativ seneszent, wodurch ihre proliferative Phase endet. Dieser Prozess kann durch Kulturbedingungen, wie Zelldichte oder Serumzusatz verlangsamt werden (Gregory et al., 2003; Cholewa et al., 2011). Theoretisch besteht das Risiko, dass durch die Zusammensetzung von Serumzusätzen MSC transformieren können und immortalisiert werden (Bieback et al., 2009). In dieser Arbeit konnte im Rahmen einer Langzeitkultivierung festgestellt werden, dass alle getesteten MSC-Präparationen mit individuellen Plättchenlysaten ihre Proliferation nach ca. 17-25 kumulativen Verdopplungen der Gesamtzellzahl einstellten und auch Aktivität der seneszenzassoziierten β -Galaktosidase aufwiesen. Dies weist darauf hin, dass individuelles HPL keine Transformation von MSC fördert. Eine karyotypische Analyse wird jedoch notwendig sein, um dies zu bestätigen (Bieback et al., 2009).

Die Gesamtzahl an cPDs war mit individuellen Plättchenlysaten im Vergleich zu FCS nur leicht erhöht, wohingegen gemischtes HPL die maximale Anzahl an cPD deutlich steigert (Capelli et al., 2007). Dennoch sollte eine Einheit Thrombozytenkonzentrat mit 200 mL Volumen ausreichend sein, um MSC aus 100 mL Knochenmarkaspirat, mit einer CFU-F von 34 pro mL (Horn et al., 2010) mit einer Verdopplung der Gesamtzellzahl von 8,3 zu $1,5 \times 10^9$ Zellen zu expandieren. Diese Zahl übersteigt die in klinischen Studien verwendete Anzahl von $1-2 \times 10^6$ MSC/kg Körpergewicht deutlich (Bartmann et al., 2007). In klinischen Studien wurden bereits HPL-Medium expandierte MSC transplantiert, zu deren Expansion Lysate aus zwei individuellen Thrombozytenkonzentraten verwendet wurden (Bonin et al., 2009). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine verlässliche MSC-Expansion auch mit individuellem

HPL und wahrscheinlich auch mit Spender und Empfänger kompatibelem oder autologem HPL möglich ist (Horwitz et al., 2005; Schallmoser et al., 2008; Blande et al., 2009). Dies kann zu einer erhöhten Sicherheit bei der Herstellung von Zellprodukten dienen, da das Infektionsrisiko durch Verwendung einzelner Plättchenlysate minimiert wird. Zu experimentellen Arbeiten mit MSC, die definierte Kulturbedingungen benötigen, ist jedoch gemischtes HPL aufgrund der Standardisierbarkeit und der größeren Menge zu bevorzugen.

5.2 Humane Plättchenlysategele als neues Substrat zur MSC-Kultur

HPL ist ein geeigneter Mediumzusatz zur konventionellen MSC-Expansion auf TCP. Als Alternative zu TCP können dreidimensionale Hydrogele zur MSC-Kultur verwendet werden, in denen unter anderem die Proliferation weniger durch Kontaktinhibition beschränkt ist und spezifische MSC-Eigenschaften gefördert werden (Caplan, 2007). Eine Verbindung der positiven Eigenschaften von HPL mit denen von Hydrogelen zur MSC-Expansion kann daher zur weiteren Optimierung der Zellkultur dienen.

Aus HPL-Medium ohne Zusatz von Antikoagulantia konnten viskose Fibringele hergestellt werden. Wurden sie mit HPL-Medium überschichtet, entstand ein zweiphasiges Kultursystem, das in dieser Arbeit zur Isolation und Expansion humaner MSC getestet wurde. Die HPL-Gele wiesen eine hohe Viskosität auf und die netzwerkartige Anordnung der Fibrinfasern war ähnlich zu der von aus aufgereinigtem Fibrin hergestellten Gelen. Anders zu den konventionellen Fibringelen fehlte den HPL-Gelen die hohe Elastizität (Janmey et al., 2009). HPL von verschiedenen Spendern führte zu Unterschieden in der Geschwindigkeit der Bildung und Degradation der Gelmatrix. Dies hing möglicherweise mit der Konzentration an Fibrin oder von Gerinnungsfaktoren in den Thrombozytenkonzentraten zusammen.

Auffällig war, dass MSC auf HPL-Gelen MSC signifikant besser proliferierten als auf TCP. Dieser proliferationsfördernde Effekt kann durch das mehrschichtige Wachstum und die daraus resultierende reduzierte Kontaktinhibition der MSC bewirkt sein (Cholewa et al., 2011). Auch im Vergleich zu Kollagengelen war die Proliferation auf HPL-Gelen signifikant und gegenüber konventionellen Fibringelen tendenziell erhöht. Dieses kann zum einen damit zusammenhängen, dass die Kollagen- und Fibringele im Gegensatz zu HPL-Gelen ohne Zusatz von Serum oder Wachstumsfaktoren hergestellt wurden, wodurch ein leichter

Verdünnungseffekt des Mediums vorhanden war. Es ist zudem wahrscheinlich, dass die MSC nicht so schnell in die Matrix der Kollagen- und Fibringele einwandern und mehrschichtig proliferieren konnten, da diese eine höhere Festigkeit aufwiesen. Dazu stimmen Beobachtungen überein, die zeigen, dass mit steigender Festigkeit von Fibringelen die MSC-Proliferation reduziert ist (Catelas et al., 2006).

Zur konsekutiven Passagierung von MSC zur Expansion auf TCP werden die Zellen standardmäßig durch enzymatischen Verdau, z.B. mit der Protease Trypsin von der Zellkulturschale gelöst und in einer geringeren Zelldichte ausgesät (Weber et al., 2007). Diese Methode war zur Passagierung von MSC auf HPL-Gelen nicht geeignet, da Restproteine in der Gelmatrix eine Proteasereaktion inhibieren. Durch Plasmin, einer physiologischen Serinprotease, welche Fibrin irreversibel spaltet, konnten HPL-Gele aufgelöst und MSC isoliert werden. Mit dieser Methode passagierte MSC wiesen einen tendenziell verminderten MTT-Substratumsatz auf. Dieses könnte sich aus der negativen Wirkung von exogen appliziertem Plasmin auf Zellvitalität erklären (Copland et al., 2009). Eine alternative Methode zur Passagierung der Zellen ergab sich aus der viskosen Eigenschaft der HPL-Gele. Durch diese konnte das Gel einschließlich der Zellen durch Pipettieren fragmentiert und auf neue HPL-Gele ausplattiert werden. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass Zellen durch die Scherkräfte beim Pipettieren potentiell beschädigt werden können. Zudem blieben MSC in HPL-Gelfragmenten eingeschlossen, und wurden durch Medienwechsel während der weiteren Kultivierung abgespült. Der Zellverlust war jedoch so niedrig, dass die Expansionsrate auf HPL-Gelen über einen Kulturzeitraum von vier Passagen der auf TCP entsprach, und konnte vermutlich durch die erhöhte Proliferationsgeschwindigkeit ausgeglichen werden.

MSC-Morphologie und *in vitro* Differenzierung werden durch die Substratelastizität beeinflusst, wobei eine niedrige Elastizität die adipogene, und höhere Festigkeiten die myogene und osteogene Differenzierung fördert (Engler et al., 2006). HPL-Gel hat eine sehr geringe Substratelastizität von etwa 30 Pa, welches deutlich geringer als die geschätzte Festigkeit von Fettgewebe von 1,9 kPa ist (Iivarinen et al., 2011). Eine verbesserte adipogene Differenzierung auf HPL-Gelen im Vergleich zu TCP war jedoch nicht nachweisbar. Ebenfalls zeigte sich kein verändertes chondrogenes Differenzierungspotential. Eine Studie von

Catelas zeigte, dass MSC auf Fibringelen mit einer hohen Fibrinkonzentration osteogene Differenzierungsmarker wie *SPP1* und alkaline Phosphatase verstärkt exprimieren (Catelas et al., 2006). Die osteogene Differenzierung war bei einer MSC-Präparation, die sowohl auf HPL-Gelen expandiert und differenziert wurde deutlich im Vergleich zu Kontrollzellen desselben Spenders erhöht, welche auf TCP expandiert und differenziert wurden. Dies kann darauf hindeuten, dass HPL-Gel zumindest bei einigen MSC-Präparationen das osteogene Differenzierungspotential fördert. MSC können auf Fibringelen einen myogenen Phänotyp annehmen (Caplan, 2007). Ein Effekt auf Zellmorphologie oder Immunphänotyp konnte auf HPL-Gelen nicht detektiert werden. Diese Ergebnisse deuten an, dass die MSC-Heterogenität auf HPL-Gelen und TCP sehr ähnlich ist, und Subpopulationen nur bedingt bevorzugt proliferieren können.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich HPL-Gele als Substrat zur MSC-Kultivierung besonders eignen. Die eingebetteten Zellen können von allen Seiten an Mediumkomponenten gelangen, ohne Kontakt zu künstlichen Kulturoberflächen zu haben. Auch ein mehrschichtiges Wachstum ist in dieser Matrix möglich, wodurch die Proliferationsrate höher ist als auf TCP. Zur Zellkultivierung und Gewebekonstruktion besitzen Fibringele insgesamt mehrere Vorteile, insbesondere im Hinblick auf klinische Applikationen. Zum einen ist Fibrin ein Bestandteil der Wundheilung und daher physiologisch kompatibel und degradierbar (Jockenhoevel et al., 2001; Bensaid et al., 2003). Zudem gibt es Hinweise, dass in einer Matrix eingebettete MSC bei Transplantationen eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit haben als in wässriger Lösung (Dozza et al., 2011). Die zum *Tissue Engineering* verwendeten Fibringele weisen eine hohe Elastizität auf, und können hohen Zugkräften widerstehen (Janmey et al., 2009). Die in dieser Arbeit verwendeten HPL-Gele sind im Gegensatz zu den allgemein verwendeten Fibringelen aufgrund ihrer geringen Elastizität nicht zur Gewebekonstruktion geeignet. Andererseits erlaubt die Viskosität der HPL-Gele eine Passagierung der MSC durch einfaches Pipettieren, ohne sie durch zusätzliche Waschschriffe oder potentiell zelltoxische Fibrinolyse von den Gelen zu trennen, was für eine automatisierte Zellkultur von Vorteil sein kann. Allgemein könnten HPL-Gele für eine schnelle Bildung einer hohen Zellzahl u.a. für therapeutische Anwendungen eingesetzt werden. Aufgrund der Variation zwischen Plättchenlysaten, welche zu Unterschieden in der Gelbildungsgeschwindigkeit und Degradation führen, sollten für eine standardisierte MSC-Expansion verschiedene Plättchenlysate gemischt werden, um Unterschiede der

Fibrinkonzentration auszugleichen. Für eine möglichst effiziente Kulturexpansion sollte dazu die Anzahl der Passagierschritte möglichst minimiert werden, um Zellverluste zu minimieren. Dies könnte z.B. durch eine dünne Aussaat der MSC erreicht werden (Cholewa et al., 2011), wobei eine Stabilisation der Fibrinmatrix z.B. durch Aprotinin oder Tranexamic acid notwendig ist (Cholewinski et al., 2009).

5.3 Antikoagulantia und Konservierungsstoffe zeigen antiproliferative und zytotoxische Wirkung auf MSC

In dieser Arbeit sowie in zahlreichen Studien wird HPL-Medium Heparin zugesetzt, um die Fibrinbildung zu inhibieren (Schallmoser et al., 2007; Capelli et al., 2007; Blande et al., 2009). Die Wirkung von Heparin auf MSC ist jedoch nicht beschrieben, und es fehlen Untersuchungen zur optimalen Heparinkonzentration oder zur Verwendung alternativer Antikoagulantia, wie z.B. dem chemisch modifizierten Heparin Enoxaparin. Heparinlösungen werden zur Konservierung Benzylalkohol zugesetzt, welcher in einer Konzentration von mehr als 1 mg/mL zytotoxische Wirkung zeigte (Chang et al., 2011). Die Wirkung von Benzylalkohol auf MSC in den Konzentrationen, wie sie in HPL-Medium durch Verwendung von benzylalkoholhaltiger Heparinlösung vorkommen, ist unbekannt.

Es konnte demonstriert werden, dass Heparin mit und ohne Zusatz von Benzylalkohol in steigenden Konzentrationen die MSC-Proliferation zunehmend inhibierte und dass der Zusatz von Benzylalkohol in einer Konzentration von 0,02 mg/IU Heparin zusätzlich antiproliferativ wirkte. Ebenso hatte das als Alternative eingesetzte Enoxaparin einen negativen Einfluss auf die MSC-Proliferation. Es wurde bereits beschrieben, dass Heparin proliferationsfördernde Wachstumsfaktoren wie PDGF und FGF bindet, welche dadurch den für die Zellen nicht mehr verfügbar sind (Hausser und Brenner, 2004). Weiterhin zeigten Studien, dass Heparin über die Inhibition des PDGF-BB/MAPK-Signalwegs in vaskulären Glattmuskelzellen oder Inhibition des FGF-1/2/MAPK-Signalwegs in alveolaren Typ II-Zellen antiproliferativ wirken kann (Pukac et al., 1997; Newman et al., 2004). Ebenfalls konnte eine antiproliferative Wirkung von Enoxaparin auf vasculare Endothelzellen *in vitro* und *in vivo* werden (Khorana et al., 2003) und eine Inhibition u.a. der MAPK- und JNK-Signalkaskaden

gezeigt werden (Manduteanu et al., 2007). Durch Kultivierung auf HPL-Gelen wurde der Einfluss dieser Antikoagulantia wahrscheinlich durch einen Verdünnungseffekt reduziert. Ob die HPL-Gele darüber hinaus die Sensitivität der MSC gegenüber Heparin reduzierten, müsste in weiterführenden Studien noch analysiert werden. Eine negative Wirkung hoher Konzentrationen an Heparin mit und ohne Konservierungsstoff konnte zusätzlich auf die MSC-Vitalität nachgewiesen werden. Dieses stimmt mit Untersuchungen zu einer apoptotischen Wirkung von Heparin u.a. auf Neutrophile Leukozyten oder Melanome überein (Manaster et al., 1996; Bae et al., 2008), wohingegen auch ein antiapoptotischer Effekt von Heparin auf Epithelzellen beschrieben wurde (Ishikawa und Kitamura, 1999). Die apoptotische Wirkung von Heparin scheint daher zelltypspezifisch und möglicherweise von den Kulturbedingungen abhängig zu sein. Enoxaparin hatte im Gegensatz zu Heparin keine negative Wirkung auf MSC-Vitalität. Diese Ergebnisse müssten jedoch mit einer höheren Konzentration von 625 IU/mL Enoxaparin und einer größeren Zahl biologischer Replika bestätigt werden, da auch für Enoxaparin eine apoptotische Wirkung auf mesodermale Zellen beschrieben wurde (Street et al., 2002). In dieser Arbeit wurde die hohe Konzentration nicht verwendet, da Enoxaparin nur niedrig konzentriert erhältlich war, weshalb ein zu großer Verdünnungseffekt des Mediums auftrat.

Die Ergebnisse zur negativen Wirkung von Heparin und Enoxaparin legen nahe, dass sie nur in einer möglichst niedrigen Konzentration und für jedes HPL-Medium austitriert eingesetzt werden sollten, da HPL-Medien spenderabhängig unterschiedliche Konzentrationen an Antikoagulantia erfordern. Zusätzlich sollte der Konservierungsstoff Benzylalkohol nicht verwendet werden.

5.4 Spezifischer Einfluss von TGF- β 1 auf MSC-Expansion und zelluläre

Alterung

Die Wirkung des Zytokins TGF- β 1 ist in der Zellkultur von vielen verschiedenen Faktoren abhängig, wie dem Zelltyp, Differenzierungszustand oder zellulären Umfeld. Sie kann von zytostatischen Effekten, über die Regulation von Differenzierung bis zur Förderung der Zellproliferation reichen (Massague, 2000). TGF- β 1 findet sich, zumeist in latent gebundener

Form, in Zellkulturzusätzen wie beispielsweise FCS oder HPL (Schallmoser et al., 2007; Oida und Weiner, 2010; Lohmann et al., 2012), und Studien weisen darauf hin, dass TGF- β 1 einen großen Einfluss auf MSC *in vitro* hat, da es sowohl ihre Morphologie, Differenzierung als auch Proliferation und Seneszenz beeinflussen kann (Kinner et al., 2002; Debacq-Chainiaux et al., 2005; Kumar et al., 2012). In dieser Arbeit wurde der spezifische Effekt von rekombinantem TGF- β 1 auf eine Langzeitkultivierung von MSC untersucht und seine spezifische Wirkung auf replikativ gealterte MSC analysiert.

Weil eine effiziente Expansion von MSC ohne Serumzusatz bislang nicht möglich ist, wurden MSC in FCS-Medium mit TGF- β 1 stimuliert. Die Wirkung von TGF- β 1 war unter diesen Bedingungen zwar schwächer als unter serumfreien Bedingungen, es zeigte sich jedoch ein gleicher Verlauf in der Regulation spezifischer *immediate early genes* (unmittelbare frühe Gene). Es konnte übereinstimmend zu vorherigen Beobachtungen von Kinner und Wang (Kinner et al., 2002; Wang et al., 2004) gezeigt werden, dass TGF- β 1 Veränderungen der MSC-Morphologie verursacht. Eine Zeitverlaufsanalyse der Genexpression nach TGF- β 1 Stimulation über 12 h zeigte darüber hinaus, dass differentiell exprimierte Gene hoch signifikant zu den KEGG-Signalwegen Regulation des Actinzytoskeletts (*regulation of actin cytoskeleton*) und Fokaldhäsion (*focal adhesion*) und den GO-Termini Zelladhäsion (*cell adhesion*) und Axon Leitung (*axon guidance*) assoziiert waren. Dieses deutet darauf hin, dass TGF- β 1 Gene reguliert, die an diesen Prozessen potentiell beteiligt sind. Bemerkenswerterweise waren die durch TGF- β 1 hervorgerufenen morphologischen Veränderungen auch nach einer langen Stimulationsdauer von über 100 Tagen reversibel. Dies belegt, dass der veränderte Phänotyp nicht auf eine beispielsweise myogene Differenzierung zurückzuführen ist, wie die oben genannten Studien postulierten. In dieser Arbeit konnte zudem nur in einigen MSC-Präparationen und hauptsächlich in höherer Passage, die in diesen Studien gezeigte flächigere Morphologie nachgewiesen werden. Diese Differenzen können möglicherweise auf eine unterschiedliche MSC-Komposition bedingt durch Unterschiede im Ausgangsmaterial oder den Isolationsmethoden zur MSC-Gewinnung zurückzuführen sein (Wagner und Ho, 2007).

Übereinstimmend mit einer Studie von Kumar (Kumar et al., 2012) war die adipogene Differenzierung von MSC, welche über einen längeren Zeitraum mit TGF- β 1 präkultiviert worden waren, komplett inhibiert. Interessanterweise konnte eine signifikante

Runterregulation des adipogenen Differenzierungsmarkers *PPAR- γ* 12 h nach TGF- β 1 Stimulation auf Genexpressionsebene nachgewiesen werden. Die osteogene Differenzierung war teilweise in TGF- β 1 präkultivierten MSC reduziert, wenn TGF- β 1 dem Differenzierungsmedium zugesetzt wurde. Jedoch war 12 h nach TGF- β 1 Stimulation der osteogene Differenzierungsmarker *RUNX2* signifikant hochreguliert. Diese scheinbar gegensätzlichen Ergebnisse entsprechen Beobachtungen, dass TGF- β die frühe Phase der osteogenen Differenzierung fördern kann und nur die finale Differenzierung, welche durch extrazelluläre Ablagerung von Calciumphosphat charakterisiert ist, inhibiert (Bonewald und Dallas, 1994; Koli et al., 2008; Zhao et al., 2010).

Durch Induktion von Apoptose und zellulärer Seneszenz übt TGF- β essentielle Funktionen aus. Dieses wird beispielweise als Mechanismus zur Entfernung maligner transformierter Zellen, wie hepatozelluläre Carcinomzellen (Senturk et al., 2010) und myc-induzierten Lymphomzellen (Muller et al., 2010), diskutiert. TGF- β kann zudem Apoptose oder Seneszenz in nichttransformierten Zellen wie Epithel- oder T-Zellen, beispielsweise zur Immunregulation, induzieren (Schuster und Kriegelstein, 2002; Pandiyan et al., 2007). Andererseits kann TGF- β eine Steigerung der Proliferation bestimmter maligner und nicht maligner Zelltypen wie Glioma- bzw. Glattmuskelzellen bewirken (Stouffer und Owens, 1994; Massague, 2008b). In Bezug auf den Einfluss von TGF- β auf Proliferation und Seneszenz in MSC finden sich widersprüchliche Angaben. Einerseits konnte gezeigt werden, dass TGF- β die MSC-Proliferation fördern kann (Jian et al., 2006; Ng et al., 2008; Koli et al., 2008). Andere Beobachtungen legen jedoch nahe, dass TGF- β in MSC eine Zellzyklus Arretierung oder sogar zelluläre Seneszenz verursacht (Debacq-Chainiaux et al., 2005; Ito et al., 2007). Bislang wurde die seneszenzinduzierende Wirkung von TGF- β 1 durch Zellzyklusanalyse oder Aktivität der SA- β -Gal festgestellt (Ito et al., 2007). In dieser Arbeit konnte keine durch TGF- β 1 verursachte Arretierung des Zellzyklus festgestellt werden, obwohl die Expression des CDK-Inhibitors *CDKN2B* 12 h nach TGF- β 1 Stimulation signifikant erhöht war. In dieser Arbeit konnte belegt werden, dass TGF- β 1 in einer Konzentration von 1 ng/mL eine positive Wirkung auf die MSC-Proliferation hatte. Bemerkenswert dazu war, dass TGF- β 1 Stimulation in MSC früher und später Passage eine verstärkte Genexpression verschiedener Wachstumsfaktoren wie PDGF-A, FGF-18, HP-EGF und VEGF-A bewirkte (Anhang Heatmaps 1-6). Mit TGF- β 1 langzeitkultivierte MSC erreichten das Ende ihrer proliferativen Phase

früher als die unbehandelten Kontrollen, zu der behandelte und unbehandelte MSC jedoch die gleiche Zahl an maximalen Zellverdopplungen aufwiesen. Darüber hinaus zeigte eine epigenetische Signatur von sechs CpG-sites, anhand der sich das zelluläre Alter von MSC korrelieren lässt (Koch et al., 2012), eine hohe Korrelation zwischen dem zellulären Alter und der Anzahl an Zellverdopplungen in TGF- β 1 kultivierten MSC. Die replikative Alterung der TGF- β 1 behandelten MSC wurde daher wahrscheinlich die kurzfristige Steigerung der Expansionsrate beschleunigt. Andererseits zeigten sich keine Anzeichen einer vorzeitigen Seneszenz bei TGF- β 1 behandelten Zellen. Da diese Ergebnisse im Widerspruch zu vorherigen Studien stehen, ist es sehr wichtig, die spezifischen Bedingungen, unter denen TGF- β 1 Stimulation erfolgt, bei der Interpretation des Effekts zu berücksichtigen. In dieser Arbeit erfolgte die Stimulation mit TGF- β 1 unter serumhaltigen Standardkulturbedingungen. Im Serum enthaltene Wachstumsfaktoren wie PDGF können möglicherweise den proliferationsinhibierenden Effekt von TGF- β 1 aufheben, worauf auch die Untersuchung von Ng hinweist (Ng et al., 2008). Ebenso können die Unterschiede auch aus der MSC-Homogenität resultieren.

Die zelluläre Alterung hat weitreichende Auswirkungen auf MSC-Physiologie und bewirkt Genregulatorische Veränderungen, welche sich u.a. in der Hyper- oder Hypomethylierung spezifischer CpG-sites oder veränderter Genexpressionsprofile zeigen (Wagner et al., 2008). Es gibt nicht viele Untersuchungen zu der Wirkung, die TGF- β 1 speziell auf alternde Zellen hat, obwohl einige Beobachtungen einen altersabhängigen Effekt von TGF- β 1 auf mesodermale Gewebe und Zellen nahelegen. So ist beispielsweise die Regulation spezifischer MMPs durch TGF- β 1 in gealterten Fibroblasten reduziert und die Balance zwischen der Wirkung von IL-1 und TGF- β 1 in Knorpelgewebe verändert (McCaffrey und Falcone, 1993; van Beuningen et al., 1994; Edwards et al., 1996; Zeng et al., 1996; Iqbal et al., 2000). In dieser Arbeit wurden Genexpressionsprofile von MSC in früher und später Passage nach TGF- β 1 Stimulation über 12 h vergleichend analysiert. Obwohl sich die Genexpressionsprofile von MSC zwischen beiden Passagen deutlich unterschieden, war ihre Reaktion auf TGF- β 1 überraschend ähnlich, was anhand der hohen Korrelation der Regulation differentiell exprimierter Gene und deren Assoziation zu überwiegend denselben Signalwegen (KEGG und GO) deutlich wurde. Über den gesamten Zeitverlauf zeigten dabei nur sieben Gene eine differentielle Expression zwischen früher und später Passage, von

denen nur *PAQR5* und *TM4SF1* durch TGF- β 1 reguliert wurden. *PAQR5* gehört zu den über G-Proteine wirkenden Progesteronrezeptoren, und es gibt Hinweise, dass Progesteron über die Regulation von TGF- β 1 apoptotisch wirkt (Modugno et al., 2012). *TM4SF1* ist ein *tetraspanin-like* Membranprotein, das eine Reorganisation des Zytoskeletts bei Endothelzellen bewirkt (Zukauskas et al., 2011). Eine Interaktion zwischen *TMS4F1* und TGF- β 1 wurde bislang noch nicht beschrieben. Die zwischen früher und später Passage differentiell exprimierten Gene könnten andererseits als zusätzliche potentielle Marker der zellulären Alterung geeignet sein. Speziell die Expression der Gruppe der Thrombospondine (*THBS1-4*), die in früher Passage signifikant stärker exprimiert war als in später Passage könnte als Indikator der zellulären Alterung in Betracht gezogen werden. Die Genexpressionsdaten deuten zusammenfassend darauf hin, dass durch Langzeitkultivierung induzierte Veränderungen keinen großen Einfluss auf die heterogene Wirkung von TGF- β 1 haben. Andererseits befanden sich die MSC in p10 noch in ihrer proliferativen Phase, weswegen weiterführende Analysen zum Effekt von TGF- β 1 auf replikativ senescente MSC alterungsspezifische Reaktionen zeigen könnten.

Insgesamt zeigte TGF- β 1 große Auswirkungen auf MSC während einer Langzeitkultivierung speziell auf ihren Phänotyp und ihr Differenzierungspotential. Zur Verwendung von rekombinantem TGF- β 1 z.B. zur standardisierten serumfreien Kulturexpansion könnte insbesondere seine proliferationsfördernde Wirkung von Interesse sein. Weil TGF- β 1 in MSC in früher und später Passage die gleichen Veränderungen auf Genexpressionsebene bewirkte, ist es darüber hinaus potentiell möglich TGF- β 1 zu verschiedenen Zeitpunkten der Zellkultur zuzusetzen, um eine Förderung der Proliferation zu erzielen.

5.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte der Einfluss unterschiedlicher Kulturbedingungen zur MSC-Expansion demonstriert werden. Wie zuvor beschrieben, zeigte sich speziell Kulturmedium mit Zusatz von humanen Plättchenlysaten zur MSC-Kultivierung geeignet (Doucet et al., 2005; Blande et al., 2009). Eine Optimierung der Kulturbedingungen zur schnellen MSC-Proliferation erfolgte durch Verwendung von HPL-Gelen zur mehrschichtigen Expansion. Aufgrund der vereinfachten nichtenzymatischen Passagiermethode könnte die MSC-Expansion auf HPL-Gelen speziell für eine automatisierte Zellkultur von Vorteil sein, da Zentrifugationsschritte

entfallen. Dass Plättchenlysate aus Thrombozytenkonzentraten von Einzelspendern eine zuverlässige Expansion ermöglichen, könnten genutzt werden, um die Expansion von MSC zur klinischen Verwendung hinsichtlich ihrer Sicherheit weiter zu verbessern. Dazu wäre es ideal, Spender und Empfänger histokompatibles oder autologes Material sowohl zur konventionellen Kultivierung von MSC auf TCP als auch zur Proliferation auf HPL-Gelen zu testen (Horwitz et al., 2005; Schallmoser et al., 2008; Blande et al., 2009). Die Ergebnisse dieser Arbeit und von Lohmann (Lohmann et al., 2012) legen weiterhin nahe, dass die Wirkung von HPL durch das Spenderalter und wahrscheinlich auch anderer Faktoren, wie möglicherweise Krankheiten des Spenders beeinflusst wird. Daher sind zusätzliche Studien über die Effizienz zur Verwendung insbesondere autologen Materials notwendig, wozu u.a. die Bestimmung von proliferationsfördernden oder –inhibierenden Faktoren in HPL dienen kann. Eine weitere Verbesserung der MSC-Kulturbedingungen konnte durch möglichst niedrigen Heparinzusatz als Antikoagulantium im HPL-Medium und durch Vermeidung des Konservierungsstoffs Benzylalkohol erzielt werden. In fortführenden Studien sollten weitere Antikoagulantia auf ihre Wirkung auf MSC-Proliferation und Expansion getestet werden, um negative Effekte zu vermeiden. Die Zugabe von rekombinantem TGF- β 1 zu FCS-Kulturmedium konnte ebenfalls eine kurzfristige Steigerung der MSC-Proliferation bewirken. Es ist denkbar, dass dieser Faktor auch in HPL-Medium oder auf HPL-Gelen die Expansionsrate erhöht, und damit eine noch effizientere MSC-Expansion ermöglicht. In weiteren Studien könnte getestet werden, ob die in dieser Arbeit verwendeten Kulturbedingungen weitere MSC-Charakteristika beeinträchtigt werden, wie ihre supportiven Eigenschaften zur Kokultivierung mit anderen Zelltypen. In zwei Studien konnte bereits gezeigt werden, dass MSC, die sowohl mit individuellen als auch mit gemischten Plättchenlysaten expandiert wurden, sich zur Unterstützung der HSC-Proliferation eignen (Walenda et al., 2011a; Walenda et al., 2011b). Insbesondere der Zusatz von TGF- β 1, das als inflammatorisches Zytokin gilt (Kofler et al., 2005), sollte weiterführend auch auf seine Auswirkung auf die immunregulatorischen Eigenschaften von MSC untersucht werden. Besonders für klinische Applikationen sind zudem karyotypische Analysen erforderlich, um sicherzustellen, dass die Kulturbedingungen keine Transformation der Zellen fördern (Bieback et al., 2009).

6 Literatur

Abbott,A. (2003). Cell culture: biology's new dimension. *Nature* 424, 870-872.

Ahmed,F., Ings,S.J., Pizzey,A.R., Blundell,M.P., Thrasher,A.J., Ye,H.T., Fahey,A., Linch,D.C., und Yong,K.L. (2004). Impaired bone marrow homing of cytokine-activated CD34+ cells in the NOD/SCID model. *Blood* 103, 2079-2087.

Al Battah F., De,K.J., Vanhaecke,T., und Rogiers,V. (2011). Current status of human adipose-derived stem cells: differentiation into hepatocyte-like cells. *ScientificWorldJournal*. 11, 1568-1581.

Andrae,J., Gallini,R., und Betsholtz,C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 22, 1276-1312.

Arnsdorf,E.J., Tummala,P., Castillo,A.B., Zhang,F., und Jacobs,C.R. (2010). The epigenetic mechanism of mechanically induced osteogenic differentiation. *J. Biomech.* 43, 2881-2886.

Aryee,M.J., Gutierrez-Pabello,J.A., Kramnik,I., Maiti,T., und Quackenbush,J. (2009). An improved empirical bayes approach to estimating differential gene expression in microarray time-course data: BETR (Bayesian Estimation of Temporal Regulation). *BMC. Bioinformatics.* 10, 409.

Bae,K.H., Mok,H., und Park,T.G. (2008). Synthesis, characterization, and intracellular delivery of reducible heparin nanogels for apoptotic cell death. *Biomaterials* 29, 3376-3383.

Ball,S.G., Shuttleworth,C.A., und Kielty,C.M. (2007). Platelet-derived growth factor receptor-alpha is a key determinant of smooth muscle alpha-actin filaments in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 379-391.

Barsotti,M.C., Felice,F., Balbarini,A., und Di,S.R. (2011). Fibrin as a scaffold for cardiac tissue engineering. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 58, 301-310.

Bartmann,C., Rohde,E., Schallmoser,K., Purstner,P., Lanzer,G., Linkesch,W., und Strunk,D. (2007). Two steps to functional mesenchymal stromal cells for clinical application. *Transfusion* 47, 1426-1435.

Barzilay,R., Melamed,E., und Offen,D. (2009). Introducing transcription factors to multipotent mesenchymal stem cells: making transdifferentiation possible. *Stem Cells* 27, 2509-2515.

Benjamini,Y. und Hochberg,Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57, 289-300.

Benjamini,Y. und Yekutieli,D. (2001). The Control of the False Discovery Rate in Multiple Testing under Dependency. *The Annals of Statistics* 29, 1165-1188.

- Bensaid,W., Triffitt,J.T., Blanchat,C., Oudina,K., Sedel,L., und Petite,H. (2003). A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials* 24, 2497-2502.
- Bernardo,M.E. und Fibbe,W.E. (2012). Safety and efficacy of mesenchymal stromal cell therapy in autoimmune disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1266, 107-117.
- Bieback,K., Hecker,A., Kocaomer,A., Lannert,H., Schallmoser,K., Strunk,D., und Kluter,H. (2009). Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells* 27, 2331-2341.
- Blande,I.S., Bassaneze,V., Lavini-Ramos,C., Fae,K.C., Kalil,J., Miyakawa,A.A., Schettert,I.T., und Krieger,J.E. (2009). Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. *Transfusion* 49, 2680-2685.
- Bonewald,L.F. und Dallas,S.L. (1994). Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation. *J. Cell Biochem.* 55, 350-357.
- Bonin,M., Stolzel,F., Goedecke,A., Richter,K., Wuschek,N., Holig,K., Platzbecker,U., Illmer,T., Schaich,M., Schetelig,J., Kiani,A., Ordemann,R., Ehninger,G., Schmitz,M., und Bornhauser,M. (2009). Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transplant.* 43, 245-251.
- Bundesärztekammer. Zweite Richtlinienanpassung 2010 Hämotherapie-Richtlinien nach §§ 12a und 18 TFG. 52. 9-7-2010. Ref Type: Bill/Resolution
- Capelli,C., Domenghini,M., Borleri,G., Bellavita,P., Poma,R., Carobbio,A., Mico,C., Rambaldi,A., Golay,J., und Introna,M. (2007). Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from small samples of bone marrow aspirates or marrow filter washouts. *Bone Marrow Transplant.* 40, 785-791.
- Caplan,A.I. (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J. Cell Physiol* 213, 341-347.
- Catelas,I., Sese,N., Wu,B.M., Dunn,J.C., Helgerson,S., und Tawil,B. (2006). Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in fibrin gels in vitro. *Tissue Eng* 12, 2385-2396.
- Chang,Y.S., Lin,C.F., Wu,C.L., Kuo,P.Y., Wu,F.S., Shieh,C.C., Gean,P.W., Chen,S.T., Chen,M.S., Wu,W.C., Tai,M.H., und Tseng,S.H. (2011). Mechanisms underlying benzyl alcohol cytotoxicity (triamcinolone acetone preservative) in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 4214-4222.
- Chen,L., Tredget,E.E., Wu,P.Y., und Wu,Y. (2008). Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS ONE.* 3, e1886.
- Chen,Q., Fischer,A., Reagan,J.D., Yan,L.J., und Ames,B.N. (1995). Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 4337-4341.

- Chen,Z., Zhao,T., und Xu,Y. (2012). The genomic stability of induced pluripotent stem cells. *Protein Cell* 3, 271-277.
- Chevallier,N., Anagnostou,F., Zilber,S., Bodivit,G., Maurin,S., Barrault,A., Bierling,P., Hernigou,P., Layrolle,P., und Rouard,H. (2009). Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. *Biomaterials* 270-278.
- Cholewa,D., Stiehl,T., Schellenberg,A., Bokermann,G., Jousen,S., Koch,C., Walenda,T., Pallua,N., Marciniak-Czochra,A., Suschek,C.V., und Wagner,W. (2011). Expansion of adipose mesenchymal stromal cells is affected by human platelet lysate and plating density. *Cell Transplant.* 20, 1409-1422.
- Clevers,H. (2005). Stem cells, asymmetric division and cancer. *Nat. Genet.* 37, 1027-1028.
- Colter,D.C., Class,R., DiGirolamo,C.M., und Prockop,D.J. (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 3213-3218.
- Colter,D.C., Sekiya,I., und Prockop,D.J. (2001). Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 7841-7845.
- Copland,I.B., Lord-Dufour,S., Cuerquis,J., Coutu,D.L., Annabi,B., Wang,E., und Galipeau,J. (2009). Improved autograft survival of mesenchymal stromal cells by plasminogen activator inhibitor 1 inhibition. *Stem Cells* 27, 467-477.
- de Wert,G. und Mummery,C. (2003). Human embryonic stem cells: research, ethics and policy. *Hum. Reprod.* 18, 672-682.
- Debacq-Chainiaux,F., Borlon,C., Pascal,T., Royer,V., Eliaers,F., Ninane,N., Carrard,G., Friguet,B., de,L.F., Boffe,S., Remacle,J., und Toussaint,O. (2005). Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J. Cell Sci.* 118, 743-758.
- Debacq-Chainiaux,F., Erusalimsky,J.D., Campisi,J., und Toussaint,O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat. Protoc.* 4, 1798-1806.
- Derynck,R. und Zhang,Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577-584.
- Docheva,D., Popov,C., Mutschler,W., und Schieker,M. (2007). Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J. Cell Mol. Med.* 11, 21-38.
- Dominici,M., Le Blanc,K., Mueller,I., Slaper-Cortenbach,I., Marini,F., Krause,D., Deans,R., Keating,A., Prockop,D., und Horwitz,E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8, 315-317.

- Doucet,C., Ernou,I., Zhang,Y., Llense,J.R., Begot,L., Holy,X., und Lataillade,J.J. (2005). Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J. Cell Physiol* 205, 228-236.
- Dozza,B., Di,B.C., Lucarelli,E., Giavaresi,G., Fini,M., Tazzari,P.L., Giannini,S., und Donati,D. (2011). Mesenchymal stem cells and platelet lysate in fibrin or collagen scaffold promote non-cemented hip prosthesis integration. *J. Orthop. Res.* 29, 961-968.
- Drews,K., Jozefczuk,J., Prigione,A., und Adjaye,J. (2012). Human induced pluripotent stem cells--from mechanisms to clinical applications. *J. Mol. Med. (Berl)* 90, 735-745.
- Edwards,D.R., Leco,K.J., Beaudry,P.P., Atadja,P.W., Veillette,C., und Riabowol,K.T. (1996). Differential effects of transforming growth factor-beta 1 on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in young and old human fibroblasts. *Exp. Gerontol.* 31, 207-223.
- Engler,A.J., Sen,S., Sweeney,H.L., und Discher,D.E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 126, 677-689.
- Europäische Union. VERORDNUNG (EG) Nr. 1774/2002 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES. eur-lex.europa.eu . 3-10-2002.
Ref Type: Internet Communication
- Europäische Union. Richtlinie 2004/23/EG Des Europäischen Parlaments Und Des Rates. Europäische Union, <http://eur-lex.europa.eu/> . 31-3-2004. 6-5-2013. Ref Type: Internet Communication
- Fagenholz,P.J., Warren,S.M., Greenwald,J.A., Bouletreau,P.J., Spector,J.A., Crisera,F.E., und Longaker,M.T. (2001). Osteoblast gene expression is differentially regulated by TGF-beta isoforms. *J. Craniofac. Surg.* 12, 183-190.
- Fareed,J., Leong,W.L., Hoppensteadt,D.A., Jeske,W.P., Walenga,J., Wahi,R., und Bick,R.L. (2004). Generic low-molecular-weight heparins: some practical considerations. *Semin. Thromb. Hemost.* 30, 703-713.
- Fink,T., Abildtrup,L., Fogd,K., Abdallah,B.M., Kassem,M., Ebbesen,P., und Zachar,V. (2004). Induction of adipocyte-like phenotype in human mesenchymal stem cells by hypoxia. *Stem Cells* 22, 1346-1355.
- Firth,S.M. und Baxter,R.C. (2002). Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr. Rev.* 23, 824-854.
- Fitzpatrick,D.R., Denhez,F., Kondaiyah,P., und Akhurst,R.J. (1990). Differential expression of TGF beta isoforms in murine palatogenesis. *Development* 109, 585-595.
- Friedenstein,A.J., Deriglasova,U.F., Kulagina,N.N., Panasuk,A.F., Rudakowa,S.F., Luria,E.A., und Ruadkow,I.A. (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol.* 2, 83-92.

- Friedenstein,A.J., Gorskaja,J.F., und Kulagina,N.N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* 4, 267-274.
- Frippiat,C., Chen,Q.M., Zdanov,S., Magalhaes,J.P., Remacle,J., und Toussaint,O. (2001). Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276, 2531-2537.
- Gao,L., McBeath,R., und Chen,C.S. (2010). Stem cell shape regulates a chondrogenic versus myogenic fate through Rac1 and N-cadherin. *Stem Cells* 28, 564-572.
- Garcia,S., Bernad,A., Martin,M.C., Cigudosa,J.C., Garcia-Castro,J., und de la,F.R. (2010). Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* 316, 1648-1650.
- Gentleman,R.C., Carey,V.J., Bates,D.M., Bolstad,B., Dettling,M., Dudoit,S., Ellis,B., Gautier,L., Ge,Y., Gentry,J., Hornik,K., Hothorn,T., Huber,W., Iacus,S., Irizarry,R., Leisch,F., Li,C., Maechler,M., Rossini,A.J., Sawitzki,G., Smith,C., Smyth,G., Tierney,L., Yang,J.Y., und Zhang,J. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5, R80.
- Gregory,C.A., Singh,H., Perry,A.S., und Prockop,D.J. (2003). The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow. *J. Biol. Chem.* 278, 28067-28078.
- Hanson,C. und Caisander,G. (2005). Human embryonic stem cells and chromosome stability. *APMIS* 113, 751-755.
- Harrison,P. und Cramer,E.M. (1993). Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* 7, 52-62.
- Hass,R., Kasper,C., Bohm,S., und Jacobs,R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun. Signal.* 9, 12.
- Hausser,H.J. und Brenner,R.E. (2004). Low doses and high doses of heparin have different effects on osteoblast-like Saos-2 cells in vitro. *J. Cell Biochem.* 91, 1062-1073.
- Hayflick L. und Moorhead P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585-621.
- Heiskanen,A., Satomaa,T., Tiitinen,S., Laitinen,A., Mannelin,S., Impola,U., Mikkola,M., Olsson,C., Miller-Podraza,H., Blomqvist,M., Olonen,A., Salo,H., Lehenkari,P., Tuuri,T., Otonkoski,T., Natunen,J., Saarinen,J., und Laine,J. (2007). N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem Cells* 25, 197-202.
- Hemeda,H., Kalz,J., Walenda,G., Lohmann,M., und Wagner,W. (2013). Heparin Concentration is Critical for Cell Culture with Human Platelet Lysate. *Cytotherapy*.

- Herdrich,B.J., Lind,R.C., und Liechty,K.W. (2008). Multipotent adult progenitor cells: their role in wound healing and the treatment of dermal wounds. *Cytotherapy*. 10, 543-550.
- Hochreiter,S., Clevert,D.A., und Obermayer,K. (2006). A new summarization method for Affymetrix probe level data. *Bioinformatics*. 22, 943-949.
- Horlocker,T.T. und Heit,J.A. (1997). Low molecular weight heparin: biochemistry, pharmacology, perioperative prophylaxis regimens, and guidelines for regional anesthetic management. *Anesth. Analg.* 85, 874-885.
- Horn,P., Bokermann,G., Cholewa,D., Bork,S., Walenda,T., Koch,C., Drescher,W., Hutschenreuther,G., Zenke,M., Ho,A., und Wagner W (2010). Comparison of Individual Platelet Lysates for Isolation of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Cytotherapy* 12, 888-898.
- Horn,P., Bork,S., Diehlmann,A., Walenda,T., Eckstein,V., Ho,A.D., und Wagner,W. (2008). Isolation of human mesenchymal stromal cells is more efficient by red blood cell lysis. *Cytotherapy* 10, 676-685.
- Horwitz,E.M., Le,B.K., Dominici,M., Mueller,I., Slaper-Cortenbach,I., Marini,F.C., Deans,R.J., Krause,D.S., und Keating,A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 7, 393-395.
- Hotary,K.B., Yana,I., Sabeh,F., Li,X.Y., Holmbeck,K., Birkedal-Hansen,H., Allen,E.D., Hiraoka,N., und Weiss,S.J. (2002). Matrix metalloproteinases (MMPs) regulate fibrin-invasive activity via MT1-MMP-dependent and -independent processes. *J. Exp. Med.* 195, 295-308.
- Huang,G.P., Pan,Z.J., Jia,B.B., Zheng,Q., Xie,C.G., Gu,J.H., McNiece,I.K., und Wang,J.F. (2007). Ex vivo expansion and transplantation of hematopoietic stem/progenitor cells supported by mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *Cell Transplant.* 16, 579-585.
- Huang,Q., Wang,Y.D., Wu,T., Jiang,S., Hu,Y.L., und Pei,G.X. (2009). Preliminary separation of the growth factors in platelet-rich plasma: effects on the proliferation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chin Med. J. (Engl.)* 122, 83-87.
- Iivarinen,J.T., Korhonen,R.K., Julkunen,P., und Jurvelin,J.S. (2011). Experimental and computational analysis of soft tissue stiffness in forearm using a manual indentation device. *Med. Eng Phys.* 33, 1245-1253.
- Iqbal,J., Dudhia,J., Bird,J.L., und Bayliss,M.T. (2000). Age-related effects of TGF-beta on proteoglycan synthesis in equine articular cartilage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274, 467-471.
- Ishikawa,Y. und Kitamura,M. (1999). Inhibition of glomerular cell apoptosis by heparin. *Kidney Int.* 56, 954-963.
- Ito,T., Sawada,R., Fujiwara,Y., Seyama,Y., und Tsuchiya,T. (2007). FGF-2 suppresses cellular senescence of human mesenchymal stem cells by down-regulation of TGF-beta2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359, 108-114.

- Jackson,W.M., Lozito,T.P., Djouad,F., Kuhn,N.Z., Nesti,L.J., und Tuan,R.S. (2011). Differentiation and regeneration potential of mesenchymal progenitor cells derived from traumatized muscle tissue. *J. Cell Mol. Med.* *15*, 2377-2388.
- James,A.W., Xu,Y., Lee,J.K., Wang,R., und Longaker,M.T. (2009). Differential effects of TGF-beta1 and TGF-beta3 on chondrogenesis in posterofrontal cranial suture-derived mesenchymal cells in vitro. *Plast. Reconstr. Surg.* *123*, 31-43.
- Janmey,P.A., Winer,J.P., und Weisel,J.W. (2009). Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications. *J. R. Soc. Interface* *6*, 1-10.
- Jian,H., Shen,X., Liu,I., Semenov,M., He,X., und Wang,X.F. (2006). Smad3-dependent nuclear translocation of beta-catenin is required for TGF-beta1-induced proliferation of bone marrow-derived adult human mesenchymal stem cells. *Genes Dev.* *20*, 666-674.
- Jockenhoevel,S., Zund,G., Hoerstrup,S.P., Chalabi,K., Sachweh,J.S., Demircan,L., Messmer,B.J., und Turina,M. (2001). Fibrin gel -- advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering. *Eur J. Cardiothorac. Surg.* *19*, 424-430.
- Kern,S., Eichler,H., Stoeve,J., Kluter,H., und Bieback,K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* *24*, 1294-1301.
- Khorana,A.A., Sahni,A., Altland,O.D., und Francis,C.W. (2003). Heparin inhibition of endothelial cell proliferation and organization is dependent on molecular weight. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *23*, 2110-2115.
- Kinner,B., Zaleskas,J.M., und Spector,M. (2002). Regulation of smooth muscle actin expression and contraction in adult human mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* *278*, 72-83.
- Koch,C., Suschek,C.V., Lin Q, Bork S, Goergens M, Jousen S, Pallua,N., Ho A.D., Zenke M, und Wagner W (2011). Specific Age-associated DNA Methylation Changes in Human Dermal Fibroblasts. *PLoS ONE* *accepted for publication*.
- Koch,C.M., Jousen,S., Schellenberg,A., Lin,Q., Zenke,M., und Wagner,W. (2012). Monitoring of cellular senescence by DNA-methylation at specific CpG sites. *Aging Cell* *11*, 366-369.
- Kofler,S., Nickel,T., und Weis,M. (2005). Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. *Clin. Sci. (Lond)* *108*, 205-213.
- Koli,K., Ryyanen,M.J., und Keski-Oja,J. (2008). Latent TGF-beta binding proteins (LTBPs)-1 and -3 coordinate proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone* *43*, 679-688.
- Koroleva,A., Gittard,S., Schlie,S., Deiwick,A., Jockenhoevel,S., und Chichkov,B. (2012). Fabrication of fibrin scaffolds with controlled microscale architecture by a two-photon polymerization-micromolding technique. *Biofabrication.* *4*, 015001.

- Kumar,A., Ruan,M., Clifton,K., Syed,F., Khosla,S., und Oursler,M.J. (2012). TGF-beta mediates suppression of adipogenesis by estradiol through connective tissue growth factor induction. *Endocrinology* 153, 254-263.
- Le Blanc K. und Mougiakakos,D. (2012). Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 383-396.
- Lee,J., Cuddihy,M.J., und Kotov,N.A. (2008). Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B Rev.* 14, 61-86.
- Lee,J.S. und Im,G.I. (2010). Influence of chondrocytes on the chondrogenic differentiation of adipose stem cells. *Tissue Eng Part A* 16, 3569-3577.
- Liang,Y.Y., Brunicardi,F.C., und Lin,X. (2009). Smad3 mediates immediate early induction of Id1 by TGF-beta. *Cell Res.* 19, 140-148.
- Lohmann,M., Walenda,G., Hemedas,H., Jousen,S., Drescher,W., Jockenhoevel,S., Hutschenreuter,G., Zenke,M., und Wagner,W. (2012). Donor age of human platelet lysate affects proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS. ONE.* 7, e37839.
- Lozito,T.P. und Tuan,R.S. (2011). Mesenchymal stem cells inhibit both endogenous and exogenous MMPs via secreted TIMPs. *J. Cell Physiol* 226, 385-396.
- Lucchini,G., Introna,M., Dander,E., Rovelli,A., Balduzzi,A., Bonanomi,S., Salvade,A., Capelli,C., Belotti,D., Gaipa,G., Perseghin,P., Vinci,P., Lanino,E., Chiusolo,P., Orofino,M.G., Marktel,S., Golay,J., Rambaldi,A., Biondi,A., D'Amico,G., und Biagi,E. (2010). Platelet-lysate-expanded mesenchymal stromal cells as a salvage therapy for severe resistant graft-versus-host disease in a pediatric population. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 16, 1293-1301.
- Manaster,J., Chezar,J., Shurtz-Swirski,R., Shapiro,G., Tendler,Y., Kristal,B., Shasha,S.M., und Sela,S. (1996). Heparin induces apoptosis in human peripheral blood neutrophils. *Br. J. Haematol.* 94, 48-52.
- Manduteanu,I., Dragomir,E., Voinea,M., Capraru,M., und Simionescu,M. (2007). Enoxaparin reduces H₂O₂-induced activation of human endothelial cells by a mechanism involving cell adhesion molecules and nuclear transcription factors. *Pharmacology* 79, 154-162.
- Massague,J. (2008a). A very private TGF-beta receptor embrace. *Mol. Cell* 29, 149-150.
- Massague,J. (2008b). TGFbeta in Cancer. *Cell* 134, 215-230.
- Massague,J. (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 169-178.
- Massague,J. und Chen,Y.G. (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* 14, 627-644.
- McBeath,R., Pirone,D.M., Nelson,C.M., Bhadriraju,K., und Chen,C.S. (2004). Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell* 6, 483-495.

- McCaffrey,T.A. und Falcone,D.J. (1993). Evidence for an age-related dysfunction in the antiproliferative response to transforming growth factor-beta in vascular smooth muscle cells. *Mol. Biol. Cell* 4, 315-322.
- McMurray,R.J., Gadegaard,N., Tsimbouri,P.M., Burgess,K.V., McNamara,L.E., Tare,R., Murawski,K., Kingham,E., Oreffo,R.O., und Dalby,M.J. (2011). Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency. *Nat. Mater.* 10, 637-644.
- Mendez-Ferrer,S., Michurina,T.V., Ferraro,F., Mazloom,A.R., Macarthur,B.D., Lira,S.A., Scadden,D.T., Ma'ayan,A., Enikolopov,G.N., und Frenette,P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466, 829-834.
- Merceron,C., Portron,S., Masson,M., Lesoeur,J., Fellah,B.H., Gauthier,O., Geffroy,O., Weiss,P., Guicheux,J., und Vinatier,C. (2011). The effect of two- and three-dimensional cell culture on the chondrogenic potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells after subcutaneous transplantation with an injectable hydrogel. *Cell Transplant.* 20, 1575-1588.
- Modugno,F., Laskey,R., Smith,A.L., Andersen,C.L., Haluska,P., und Oesterreich,S. (2012). Hormone response in ovarian cancer: time to reconsider as a clinical target? *Endocr. Relat Cancer* 19, R255-R279.
- Montaner,D. und Dopazo,J. (2010). Multidimensional gene set analysis of genomic data. *PLoS. ONE.* 5, e10348.
- Mosesson,M.W. (2005). Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J. Thromb. Haemost.* 3, 1894-1904.
- Mosmann,T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- Mu,Y., Gudey,S.K., und Landstrom,M. (2012). Non-Smad signaling pathways. *Cell Tissue Res.* 347, 11-20.
- Muller,I., Kordowich,S., Holzwarth,C., Spano,C., Isensee,G., Staiber,A., Viebahn,S., Gieseke,F., Langer,H., Gawaz,M.P., Horwitz,E.M., Conte,P., Handgretinger,R., und Dominici,M. (2006). Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy.* 8, 437-444.
- Muller,J., Samans,B., van,R.J., Faga,G., Peh,K.N.R., Wei,C.L., Muller,H., Amati,B., Felsher,D., und Eilers,M. (2010). TGFbeta-dependent gene expression shows that senescence correlates with abortive differentiation along several lineages in Myc-induced lymphomas. *Cell Cycle* 9, 4622-4626.
- Muraglia,A., Cancedda,R., und Quarto,R. (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J. Cell Sci.* 113, 1161-1166.

Newman,D.R., Li,C.M., Simmons,R., Khosla,J., und Sannes,P.L. (2004). Heparin affects signaling pathways stimulated by fibroblast growth factor-1 and -2 in type II cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 287, L191-L200.

Newman,P.J. (1997). The biology of PECAM-1. *J. Clin. Invest* 99, 3-8.

Ng,F., Boucher,S., Koh,S., Sastry,K.S., Chase,L., Lakshmipathy,U., Choong,C., Yang,Z., Vemuri,M.C., Rao,M.S., und Tanavde,V. (2008). PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood* 112, 295-307.

Ogino,Y., Ayukawa,Y., Kukita,T., und Koyano,K. (2006). The contribution of platelet-derived growth factor, transforming growth factor-beta1, and insulin-like growth factor-I in platelet-rich plasma to the proliferation of osteoblast-like cells. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 101, 724-729.

Oida,T. und Weiner,H.L. (2010). Depletion of TGF-beta from fetal bovine serum. *J. Immunol. Methods* 362, 195-198.

Opperman,L.A., Nolen,A.A., und Ogle,R.C. (1997). TGF-beta 1, TGF-beta 2, and TGF-beta 3 exhibit distinct patterns of expression during cranial suture formation and obliteration in vivo and in vitro. *J. Bone Miner. Res.* 12, 301-310.

Pandiyar,P., Zheng,L., Ishihara,S., Reed,J., und Lenardo,M.J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* 8, 1353-1362.

Paul,G., Ozen,I., Christophersen,N.S., Reinbothe,T., Bengzon,J., Visse,E., Jansson,K., Dannaeus,K., Henriques-Oliveira,C., Roybon,L., Anisimov,S.V., Renstrom,E., Svensson,M., Haegerstrand,A., und Brundin,P. (2012). The adult human brain harbors multipotent perivascular mesenchymal stem cells. *PLoS. ONE.* 7, e35577.

Peng,Y., Kang,Q., Luo,Q., Jiang,W., Si,W., Liu,B.A., Luu,H.H., Park,J.K., Li,X., Luo,J., Montag,A.G., Haydon,R.C., und He,T.C. (2004). Inhibitor of DNA binding/differentiation helix-loop-helix proteins mediate bone morphogenetic protein-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Biol. Chem.* 279, 32941-32949.

Phinney,D.G. und Prockop,D.J. (2007). Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 25, 2896-2902.

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

Polini,A., Pisignano,D., Parodi,M., Quarto,R., und Scaglione,S. (2011). Osteoinduction of human mesenchymal stem cells by bioactive composite scaffolds without supplemental osteogenic growth factors. *PLoS. ONE.* 6, e26211.

- Pukac,L.A., Carter,J.E., Ottlinger,M.E., und Karnovsky,M.J. (1997). Mechanisms of inhibition by heparin of PDGF stimulated MAP kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J. Cell Physiol* 172, 69-78.
- Rippo,M.R., Babini,L., Prattichizzo,F., Graciotti,L., Fulgenzi,G., Tomassoni,A.F., Olivieri,F., Borghetti,G., Cinti,S., Poloni,A., Fazioli,F., und Procopio,A.D. (2013). Low FasL levels promote proliferation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells, higher levels inhibit their differentiation into adipocytes. *Cell Death. Dis.* 4, e594.
- Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Bork S, Guelly C, Obenauf AC, Reinisch A, Horn P, Ho AD, Strunk D, und Wagner W (2010). Replicative Senescence-Associated Gene Expression Changes in Mesenchymal Stromal Cells are Similar under Different Culture Conditions. *Haematologica* 95, 867-874.
- Schallmoser,K., Bartmann,C., Rohde,E., Reinisch,A., Kashofer,K., Stadelmeyer,E., Drexler,C., Lanzer,G., Linkesch,W., und Strunk,D. (2007). Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion* 47, 1436-1446.
- Schallmoser,K., Rohde,E., Reinisch,A., Bartmann,C., Thaler,D., Drexler,C., Obenauf,A.C., Lanzer,G., Linkesch,W., und Strunk,D. (2008). Rapid Large-Scale Expansion of Functional Mesenchymal Stem Cells from Unmanipulated Bone Marrow without Animal Serum. *Tissue Eng Part C. Methods* 14, 185-196.
- Schellenberg,A., Lin,Q., Schuler,H., Koch,C.M., Jousen,S., Denecke,B., Walenda,G., Pallua,N., Suschek,C.V., Zenke,M., und Wagner,W. (2011). Replicative senescence of mesenchymal stem cells causes DNA-methylation changes which correlate with repressive histone marks. *Aging (Albany. NY)* 3, 873-888.
- Schneider,R.K., Puellen,A., Kramann,R., Raupach,K., Bornemann,J., Knuechel,R., Perez-Bouza,A., und Neuss,S. (2010). The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds. *Biomaterials* 31, 467-480.
- Schuster,N. und Kriegstein,K. (2002). Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res.* 307, 1-14.
- Sekiya,I., Larson,B.L., Smith,J.R., Pochampally,R., Cui,J.G., und Prockop,D.J. (2002). Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells* 20, 530-541.
- Sensebe,L., Krampera,M., Schrezenmeier,H., Bourin,P., und Giordano,R. (2009). Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang.* 98, 93-107.
- Senturk,S., Mumcuoglu,M., Gursoy-Yuzugullu,O., Cingoz,B., Akcali,K.C., und Ozturk,M. (2010). Transforming growth factor-beta induces senescence in hepatocellular carcinoma cells and inhibits tumor growth. *Hepatology* 52, 966-974.
- Shay,J.W. und Wright,W.E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 72-76.

- Shi,M., Liu,Z.W., und Wang,F.S. (2011). Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clin. Exp. Immunol.* 164, 1-8.
- Siegel,P.M. und Massague,J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 807-821.
- Siersbaek,R., Nielsen,R., und Mandrup,S. (2010). PPARgamma in adipocyte differentiation and metabolism--novel insights from genome-wide studies. *FEBS Lett.* 584, 3242-3249.
- Smyth G. (2005). limma: Linear Models for Microarray Data. In *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*, Gentleman R., Carey V., Dudoit S., Huber W., and Irizarry R.A., eds. (New York: Springer), pp. 397-420.
- Stouffer,G.A. und Owens,G.K. (1994). TGF-beta promotes proliferation of cultured SMC via both PDGF-AA-dependent and PDGF-AA-independent mechanisms. *J. Clin. Invest* 93, 2048-2055.
- Street,J., Power,C., Wakai,A., Wang,J.H., McGuinness,A., und Redmond,H.P. (2002). LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARINS INDUCE OSTEOBLAST APOPTOSIS: A PUTATIVE MECHANISM FOR IATROGENIC OSTEOPENIA. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume* 84-B, 7-c.
- Strutz,F., Zeisberg,M., Renziehausen,A., Raschke,B., Becker,V., van,K.C., und Muller,G. (2001). TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int.* 59, 579-592.
- Sundin,M., Ringden,O., Sundberg,B., Nava,S., Gotherstrom,C., und Le,B.K. (2007). No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica* 92, 1208-1215.
- Takahashi,K., Tanabe,K., Ohnuki,M., Narita,M., Ichisaka,T., Tomoda,K., und Yamanaka,S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
- Tessmar,J.K. und Gopferich,A.M. (2007). Customized PEG-derived copolymers for tissue-engineering applications. *Macromol. Biosci.* 7, 23-39.
- Thomson,J.A., Itskovitz-Eldor,J., Shapiro,S.S., Waknitz,M.A., Swiergiel,J.J., Marshall,V.S., und Jones,J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Tondreau,T., Meuleman,N., Delforge,A., Dejeneffe,M., Leroy,R., Massy,M., Mortier,C., Bron,D., und Lagneaux,L. (2005). Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells* 23, 1105-1112.
- Torsvik,A., Rosland,G.V., Svendsen,A., Molven,A., Immervoll,H., McCormack,E., Lonning,P.E., Primon,M., Sobala,E., Tonn,J.C., Goldbrunner,R., Schichor,C., Mysliwietz,J., Lah,T.T., Motaln,H., Knappskog,S., und Bjerkvig,R. (2010). Spontaneous malignant transformation of

human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter. *Cancer Res.* 70, 6393-6396.

Toussaint,O., Remacle,J., Dierick,J.F., Pascal,T., Fripiat,C., Royer,V., Magalhacs,J.P., Zdanov,S., und Chainiaux,F. (2002). Stress-induced premature senescence: from biomarkers to likelihood of in vivo occurrence. *Biogerontology.* 3, 13-17.

Trounson,A., Thakar,R.G., Lomax,G., und Gibbons,D. (2011). Clinical trials for stem cell therapies. *BMC. Med.* 9, 52.

U.S.National Institutes of Health. ClinicalTrials.gov . 5-5-2013. 6-5-2013. Ref Type: Internet Communication

Untergasser,G., Gander,R., Lilg,C., Lepperdinger,G., Plas,E., und Berger,P. (2005). Profiling molecular targets of TGF-beta1 in prostate fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation. *Mech. Ageing Dev.* 126, 59-69.

van Beuningen,H.M., van der Kraan,P.M., Arntz,O.J., und van den Berg,W.B. (1994). In vivo protection against interleukin-1-induced articular cartilage damage by transforming growth factor-beta 1: age-related differences. *Ann. Rheum. Dis.* 53, 593-600.

van den Dolder J., Mooren,R., Vloon,A.P., Stoeltinga,P.J., und Jansen,J.A. (2006). Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *Tissue Eng* 12, 3067-3073.

Wagner,W. und Ho,A.D. (2007). Mesenchymal stem cell preparations-comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev* 3, 239-248.

Wagner,W., Horn,P., Castoldi,M., Diehlmann,A., Bork,S., Saffrich,R., Benes,V., Blake,J., Pfister,S., Eckstein,V., und Ho,A.D. (2008). Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells - a Continuous and Organized Process. *PLoS ONE* 5, e2213.

Wagner,W., Roderburg,C., Wein,F., Diehlmann,A., Frankhauser,M., Schubert,R., Eckstein,V., und Ho,A.D. (2007). Molecular and Secretory Profiles of Human Mesenchymal Stromal Cells and their Abilities to Maintain Primitive Hematopoietic Progenitors. *Stem Cells* 10, 2638-2657.

Walenda,G., Abnaof,K., Jousen,S., Meurer,S., Smeets,H., Rath,B., Hoffmann,K., Frohlich,H., Zenke,M., Weiskirchen,R., und Wagner,W. (2013). TGF-beta1 does not induce senescence of multipotent mesenchymal stromal cells and has similar effects in early and late passages. *PLoS. ONE.* 8, e77656.

Walenda,G., Hameda,H., Schneider,R.K., Merkel,R., Hoffmann,B., und Wagner,W. (2012). Human platelet lysate gel provides a novel three dimensional-matrix for enhanced culture expansion of mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part C. Methods* 18, 924-934.

Walenda,T., Bokermann,G., Jost,E., Galm,O., Schellenberg,A., Koch,C.M., Piroth,D.M., Drescher,W., Brümmendorf,T.H., und Wagner,W. (2011a). Serum after autologous transplantation stimulates proliferation and expansion of human hematopoietic progenitor cells. *PLoS ONE* 6(3): e18012..

- Walenda,T., Bork,S., Horn,P., Wein,F., Saffrich,R., Diehlmann,A., Eckstein,V., Ho,A.D., und Wagner,W. (2010). Co-Culture with Mesenchymal Stromal Cells Increases Proliferation and Maintenance of Hematopoietic Progenitor Cells. *J. Cell Mol. Med.* *14*, 337-350.
- Walenda,T.*, Bokermann,G.*, Ventura Ferreira,M.S., Piroth,D.M., Hieronymus,T., Neuss,S., Zenke,M., Ho,A.D., Müller,A.M., Wagner,W., und (* equal contribution) (2011b). Synergistic effects of growth factors and mesenchymal stromal cells for expansion of hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol* *36*(4), 617-628.
- Wang,D., Park,J.S., Chu,J.S., Krakowski,A., Luo,K., Chen,D.J., und Li,S. (2004). Proteomic profiling of bone marrow mesenchymal stem cells upon transforming growth factor beta1 stimulation. *J. Biol. Chem.* *279*, 43725-43734.
- Weber,C., Pohl,S., Portner,R., Wallrapp,C., Kassem,M., Geigle,P., und Czermak,P. (2007). Expansion and Harvesting of hMSC-TERT. *Open. Biomed. Eng J.* *1*, 38-46.
- Weibric,G., Buch,R.S., Kleis,W.K., Hafner,G., Hitzler,W.E., und Wagner,W. (2002). Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation. *Growth Factors* *20*, 93-97.
- Wirz,S., Dietrich,M., Flanagan,T.C., Bokermann,G., Wagner,W., Schmitz-Rode,T., und Jockenhoevel,S. (2011). Influence of platelet-derived growth factor-AB on tissue development in autologous platelet-rich plasma gels. *Tissue Eng Part A* *17*, 1891-1899.
- Young,H.E. und Black,A.C., Jr. (2004). Adult stem cells. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* *276*, 75-102.
- Zeng,G., McCue,H.M., Mastrangelo,L., und Millis,A.J. (1996). Endogenous TGF-beta activity is modified during cellular aging: effects on metalloproteinase and TIMP-1 expression. *Exp. Cell Res.* *228*, 271-276.
- Zhao,L., Jiang,S., und Hantash,B.M. (2010). Transforming growth factor beta1 induces osteogenic differentiation of murine bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A* *16*, 725-733.
- Zukauskas,A., Merley,A., Li,D., Ang,L.H., Sciuto,T.E., Salman,S., Dvorak,A.M., Dvorak,H.F., und Jaminet,S.C. (2011). TM4SF1: a tetraspanin-like protein necessary for nanopodia formation and endothelial cell migration. *Angiogenesis.* *14*, 345-354.

7 Anhang

7.1 Tabellen

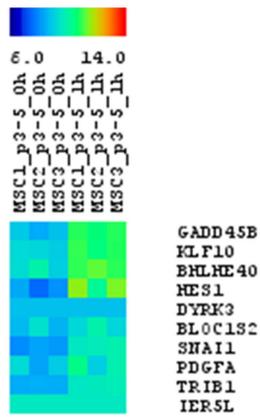
Anhang Tabelle 1: Blutgruppe, Thrombozytenkonzentration, Geburtsdatum und Geschlecht des Spenders von Thrombozytenkonzentraten. Die aufgelisteten Thrombozytenkonzentrate wurden im ersten Teil der Arbeit zur Untersuchung der Variation zwischen individuellen Plättchenlysaten verwendet. * Nur verwendet zur Langzeitkulturexpansion.

HPL- Nummer dieser Arbeit	Klinikinterne Spendernummer	Blutgruppe	Thrombo- zyten [G/L]	Geburtsdatum Spender	Geschlecht Spender
1	9725511	AB RH+ Cc D Ee K-	992	28.06.1955	m
2	9725520	O Rh- cc dd ee K- Jka+ M+	1132	11.07.1970	m
3	9725521	AB RH+ Cc D ee K-	1389	14.09.1965	w
4	9725523	A Rh- cc dd ee K-	1065	11.11.1965	m
5	9725525	O Rh- cc dd ee K- Jka+ P+	1223	16.02.1972	m
6	9725527	A Rh+ CC D ee K-	1307	12.06.1963	m
7	9725528	A Rh+ cc D EE K- M-	1091	19.04.1966	m
8	9725529	A Rh- cc dd ee K- Jka+ Jkb+ Leb+ P+ M+ S+ Lua- Kpa-	1133	25.03.1946	w
9	9725530	O Rh+ CC D ee K- P+ M+	1100	26.02.1982	m
10	9725531	A Rh+ Cc D Ee K-	1172	06.10.1977	m
11*	9726116	A Rh- cc dd ee K-		11.05.1985	m
12*	9726117	O Rh- cc dd ee K- Jkb+ P- S+		29.04.1971	w
13*	9726118	B Rh+ cc D Ee K-		02.09.1980	m
14*	9726120	O Rh+ cc D Ee K- Jka+ Leb- M+		29.05.1982	m

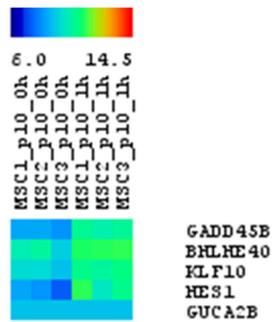
7.2 Heatmaps

Die im Folgenden dargestellten Heatmaps zeigen die mit den Microarrays detektierten und anschließend normalisierte Expressionswerte signifikant differentiell exprimierter Gene von MSC vor und nach Stimulation mit TGF- β 1. Die Gene sind nach ihrer Signifikanz angeordnet (oben links: höchste Signifikanz; unten rechts: niedrigste Signifikanz). Die Heatmaps 1-6 zeigen jeweils die Expression vor und nach 1, 4 und 12 h nach TGF- β 1 Stimulation für jeden Spender in früher und später Passage. In den Heatmaps 7 bis 10 ist die Expression differentiell exprimierter Gene zwischen früher und später Passage zu den verschiedenen Stimulationszeitpunkten dargestellt.

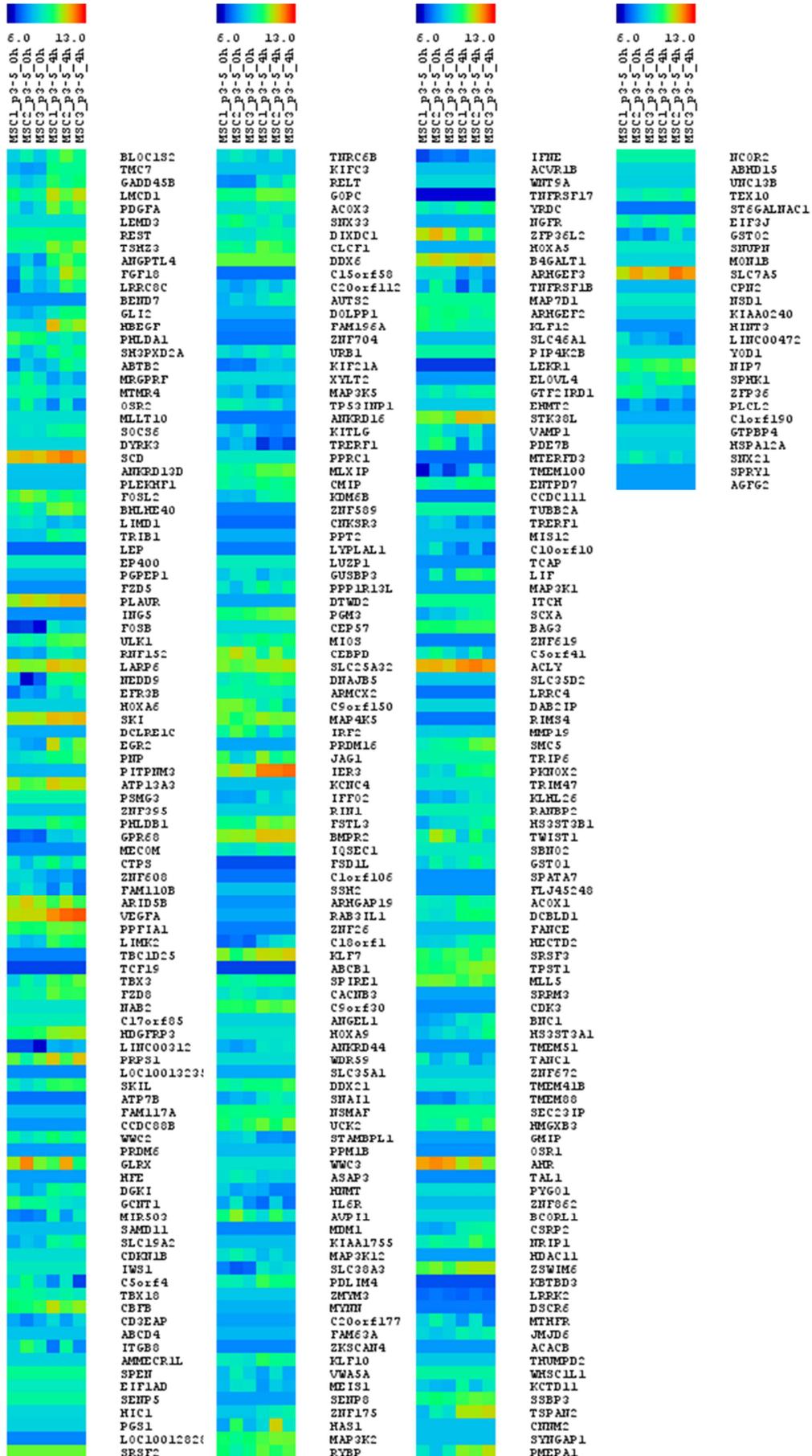
Anhang Heatmap 1: Differenziell exprimierte Gene nach 1 h TGF- β 1 Stimulation, frühe Passage.



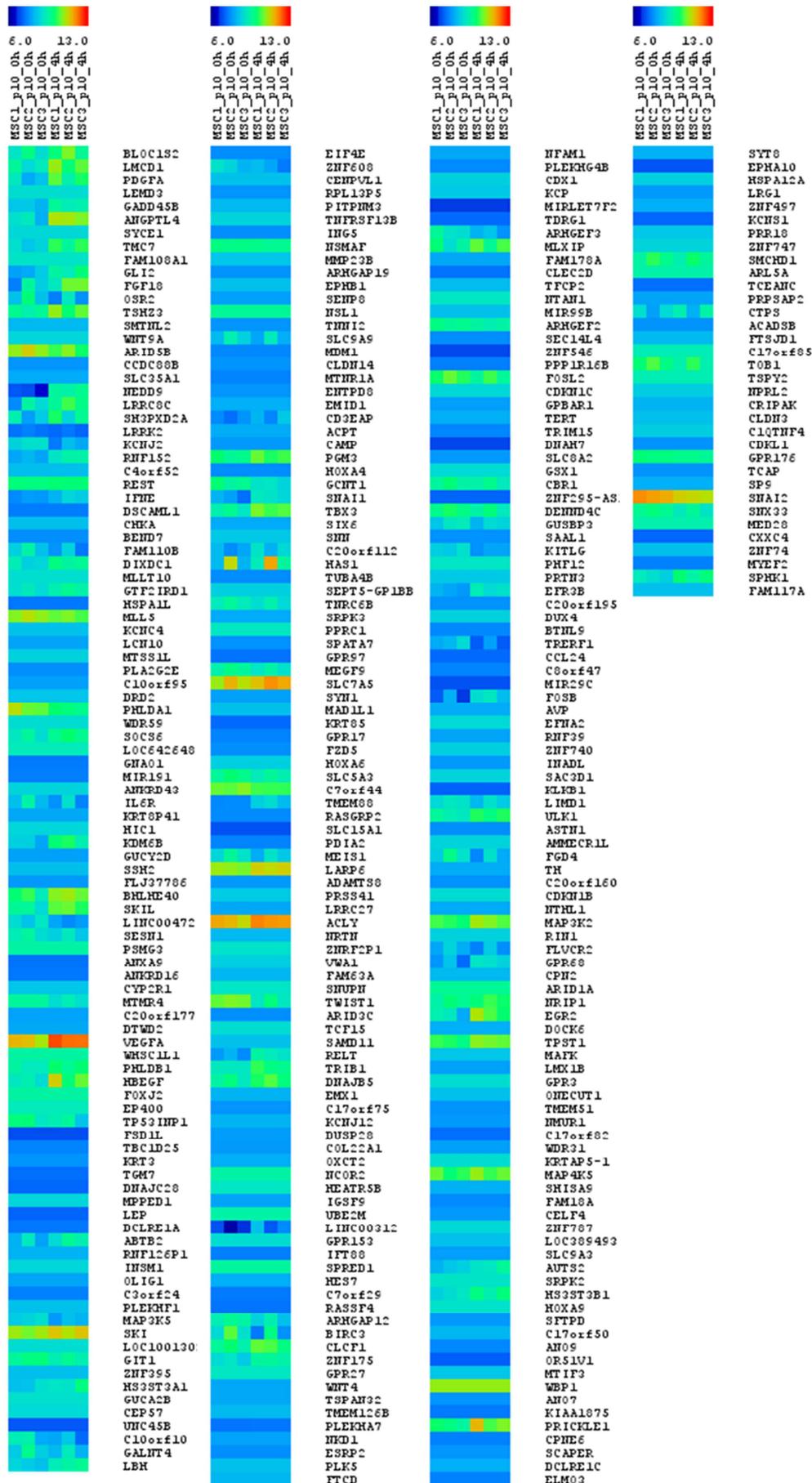
Anhang Heatmap 2: Differenziell exprimierte Gene nach 1 h TGF- β 1 Stimulation, späte Passage.



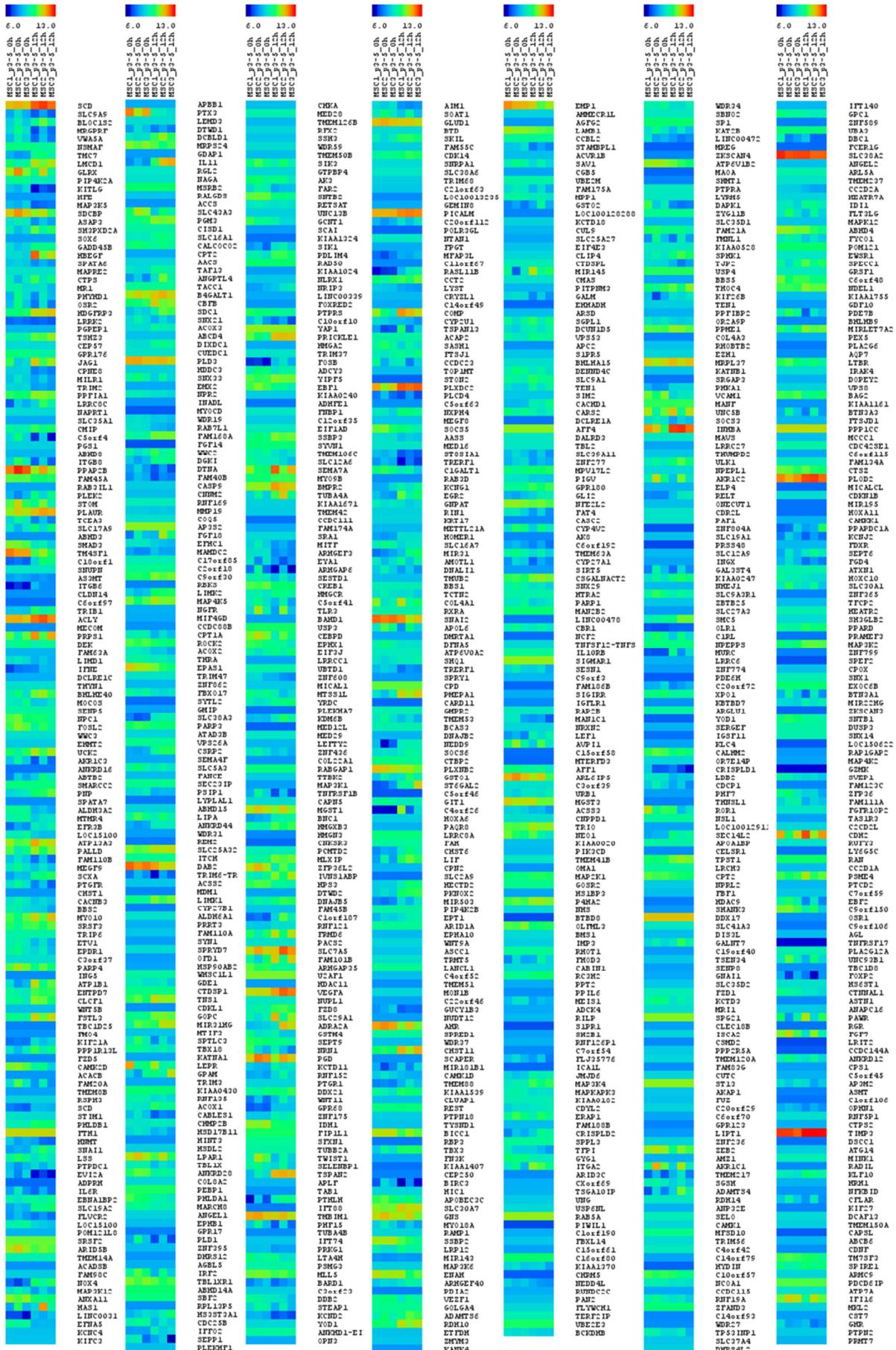
Anhang Heatmap 3: Differenziell exprimierte Gene nach 4 h TGF-β1 Stimulation, frühe Passage.

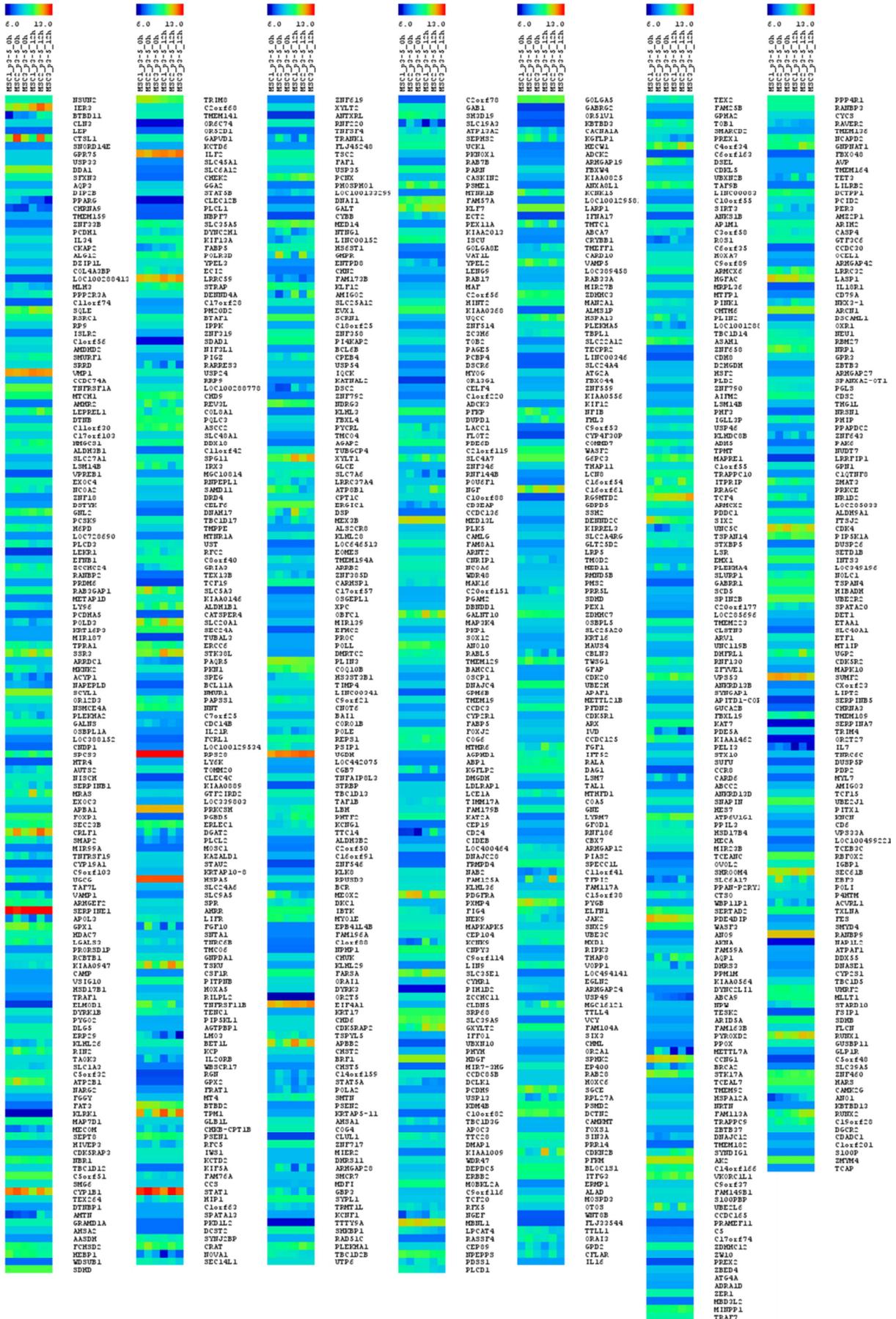


Anhang Heatmap 4: Differenziell exprimierte Gene nach 4 h TGF-β1 Stimulation, späte Passage.

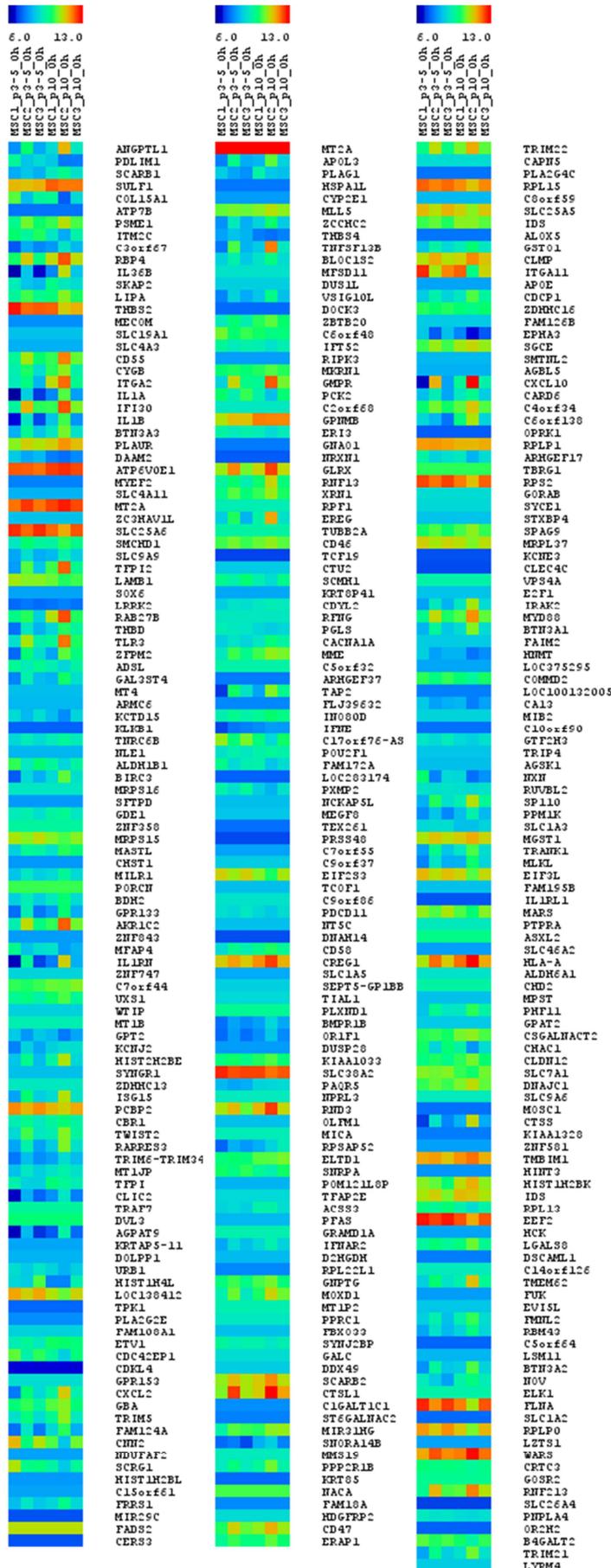


Anhang Heatmap 5: Differentiell exprimierte Gene nach 12h TGF- β 1 Stimulation, fruhe Passage.

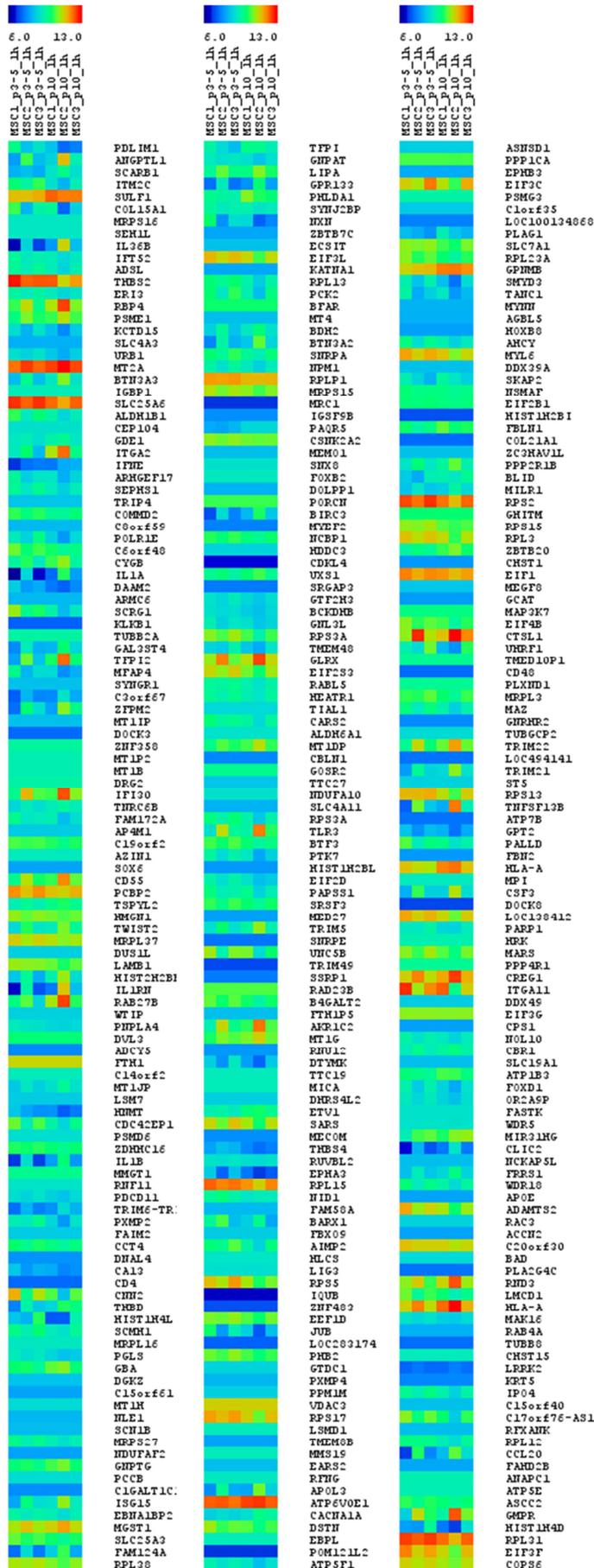




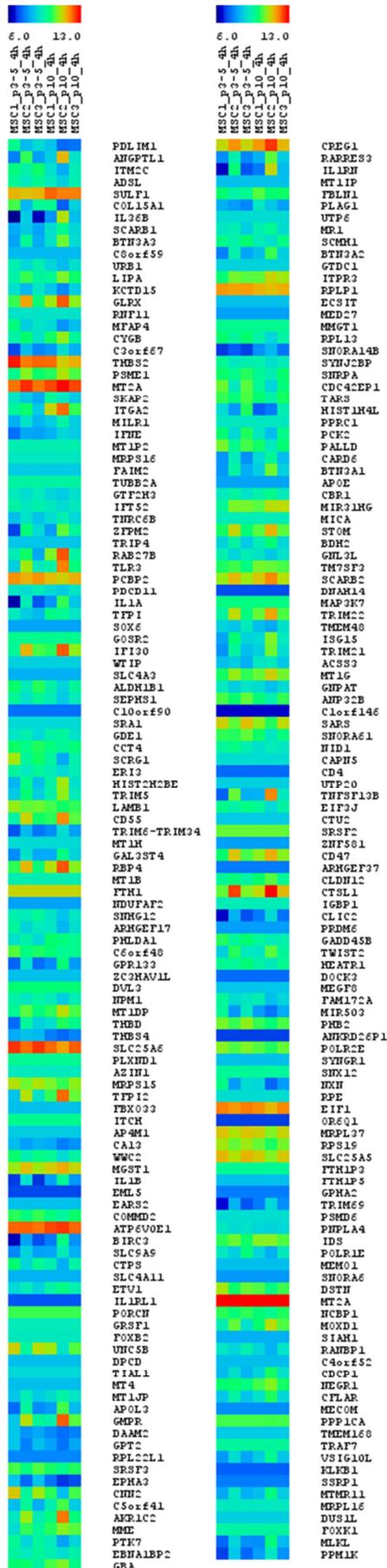
Anhang Heatmap 7: Differenziell exprimierte Gene zwischen früher und später Passage, unstimuliert.



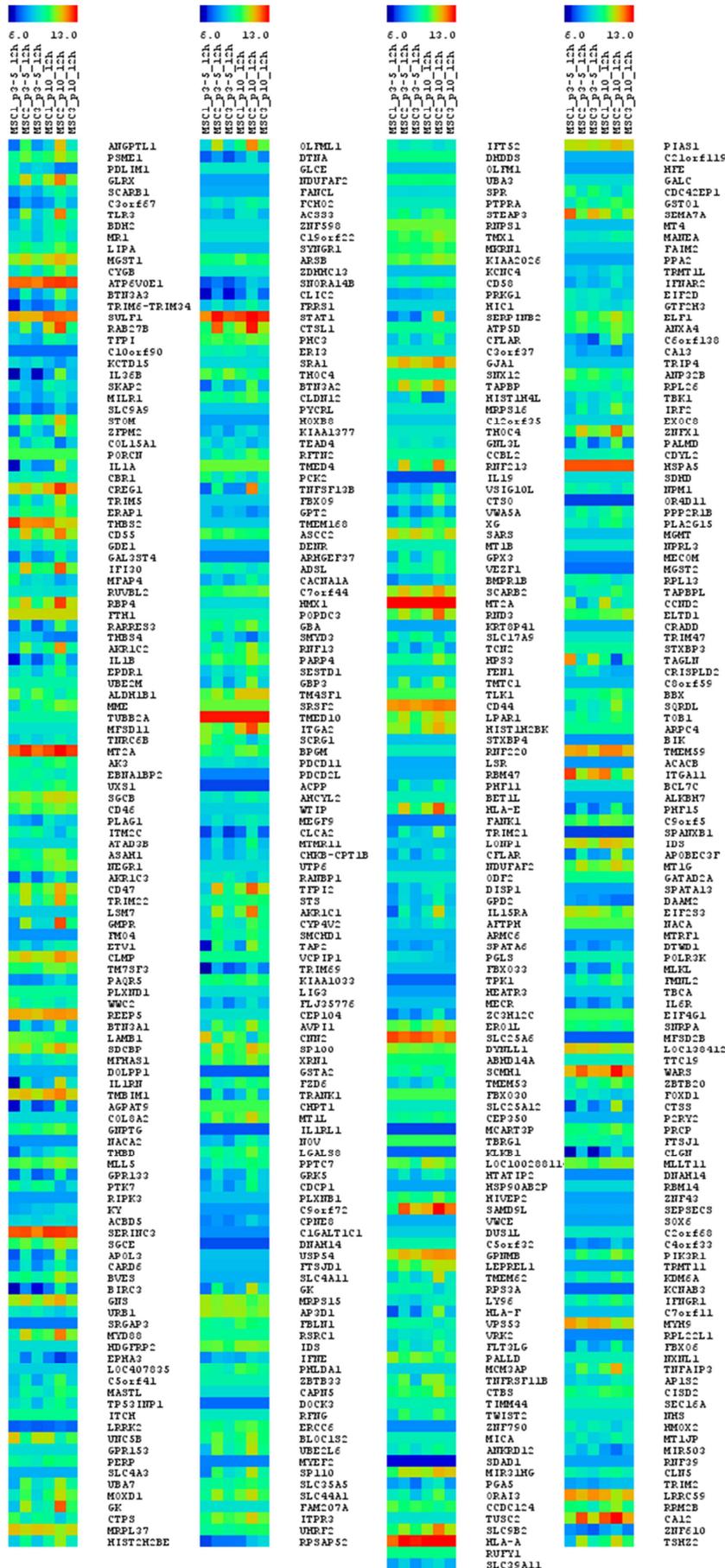
Anhang Heatmap 8: Differenziell exprimierte Gene zwischen früher und später Passage, je 1 h stimuliert.



Anhang Heatmap 9: Differenziell exprimierte Gene zwischen früher und später Passage, je 4 h stimuliert.



Anhang Heatmap 10: Differenziell exprimierte Gene zwischen früher und später Passage, je 12 h stimuliert.



8 Abkürzungen

ACAN	Aggrecan
A.dest.	destilliertes Wasser
APC	Allophycocyanin
BGLAP	Osteocalcin
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BODIPY	4,4-difluoro-1,2,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDKN2A (INK4A; p16)	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CDKN2B (INK4B; p15)	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2B</i>
cDNA	<i>copyDNA</i>
C ₁₂ FDG	5-Dodecanoylamino fluorescein di-β-D-Galactopyranosid
C/EBPA	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) alpha</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
CO ₂	Kohlendioxid
COL1A1	Kollagen Typ 1
COL2A1	Kollagen Typ 2
cPD	<i>cumulative population doublings</i>
Da	Dalton
DAPI	5-Dodecanoylamino fluorescein di-b-D-galactopyranoside
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ETDA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ES	embryonale Stammzellen
FABP4	<i>fatty acid binding protein 4</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FDA	Fluoresceindiacetat
FDR	<i>false discovery rate</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GO	<i>Gene Ontology</i>
GvHD	<i>graft-vs-host disease</i>
HCl	Salzsäure
HPL	humanes Plättchenlysat
ICAM	<i>inter-cellular adhesion molecule</i>

ID	<i>inhibitor of differentiation/DNA-binding</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IGFBP	<i>insulin-like growth factor binding protein</i>
IL	Interleukin
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen
IST	Insulin-Transferrin-Selensäure
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
MMP	Matrix Metallopeptidase
MSC	mesodermale Stromazelle
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
OD	optische Dichte
PA	Pascal
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PFA	Paraformaldehyd
pHPL	<i>pooled</i> humanes Plättchenlysat
PI	Propidiumiodid
PPAR- γ 2	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PRP	Plättchenreiches Plasma
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase <i>chain reaction</i>
RUNX2	<i>runt-related transcription factor 2</i>
SA- β -Gal	seneszenzassoziierte beta Galaktosidase
SD	<i>standard deviation</i>
SPP1	<i>Osteopontin</i>
SYBR	N',N'-Dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-yliden)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropan-1,3-diamin
TCP	<i>tissue culture plastic</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TK	Thrombozytenkonzentrat
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-Galaktopyranosid

9 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht haben. Als erstes gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wagner und Herrn Prof. Dr. Martin Zenke für die hervorragende Betreuung und die Möglichkeit, die Dissertation an diesem Institut anzufertigen. Besonders möchte ich Herrn Prof. Wagner für die Bereitstellung des Themas, und die ständige Bereitschaft zu anregenden Diskussionen danken.

Auch möchte ich den allen Kollegen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Stammzellbiologie und Cellular Engineering, besonders Dr. Hatim Hemeda für die Unterstützung des Projekts zu den HPL-Gelen und Sylvia Jousen für die ständige Mitarbeit und Hilfe, Dr. Carmen Koch, Anne Schellenberg, Carola Weidner, Giulio Abagnale, Michael Lohmann, Sandra Jätzold, Marie Kalwa, Dominik Cholewa und allen weiteren Mitarbeitern für die gute Arbeitsatmosphäre und ständige Hilfsbereitschaft danken. Einen großen Dank auch an die Mitarbeiter des Instituts für Pathologie, vor allem an Dr. Rebekka Schneider-Kramann, Dr. Sabine Neuss-Stein, Manfred Bovi (posthum), Dr. Mónica Ventura Ferreira, Isabel Leisten und Norina Labude für die Anleitung zur Herstellung der Kollagengele, der Hilfe bei der Rasterelektronenmikroskopie und der Herstellung und Färbung histologischer Schnitte. Vielen Dank auch an Prof. Dr. Stefan Jockenhövel und Maren Dietrich am Institut für Angewandte Medizintechnik für die Anleitung zur Herstellung der Fibringele. Ich möchte mich auch vielmals bei den Initiatoren und Mitarbeitern des Projekts Interregional Program Alma in Silico für die Möglichkeit an dem TGF- β 1 Projekt zu arbeiten und der guten Kooperationsbereitschaft bedanken, besonders bei Prof. Dr. Hubert Smeets am Institute for Molecular Cell Biology, CARIM School for Cardiovascular Diseases an der Universität Maastricht für die Hybridisierung der Microarrays und Prof. Dr. Holger Fröhlich und Khalid Abnaof am Institut Bonn-Aachen International Center for Information Technology für die hervorragende Analyse der Microarraydaten. Auch danke ich allen Mitarbeitern der Zellbiologie und den Mitarbeitern des IZKF für eine gute Zusammenarbeit und Nutzungsmöglichkeit der Gerätschaften und den Mitarbeitern der Klinik für Orthopädie und der Klinik für Plastische Chirurgie, Hand- und Verbrennungschirurgie für die Bereitstellung von humanen Zellen und Gewebeproben.

Mein größter Dank gilt meinem Mann und Kollegen Thomas, der mich bei dieser Arbeit stets unterstützt hat und meinem Sohn Benjamin Henri, der mich durch seine Fröhlichkeit und lustigen Ideen immer erfolgreich auf andere Gedanken bringen konnte.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Gudrun Walenda, geb. Bokermann
Geburtsdatum: 23.04.1982
Geburtsort: Bielefeld
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Promotion

Seit Oktober 2007
Seit April 2009
Eingeschrieben als Promotionsstudentin an der RWTH Aachen
Start des Promotionsvorhabens im Lehr- und Forschungsgebiet
Stammzellbiologie und Cellular Engineering, Helmholtz-Institut
für Biomedizinische Technologien, RWTH Universitätsklinikum
Aachen

Berufliche Tätigkeit

Oktober 2007 – April 2009
Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für innere Medizin
III am RWTH Universitätsklinikum Aachen; Schwerpunkt:
Funktion von Monozyten bei der Entstehung von Toleranz im
Mausmodell und Relevanz von Immunzellen in
Lebererkrankungsmodellen der Maus

Hochschulausbildung

Oktober 2001 – Oktober 2007
Studium der Biologie an der Universität Bielefeld, Abschluss:
Diplom
Juni 2006 – Juni 2007
Diplomarbeit über das Thema „Rekombinante Darstellung von
Varianten der humanen XT-I zur Aufklärung des *Shedding*-
Mechanismus und weiterführender Strukturanalysen“ am
Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, Herz- und
Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen, Universitätsklinik der
Ruhr-Universität Bochum in Bad-Oeynhausen

Schulbildung

September 1992 – Juni 2001
September 1988 - Juli 1992
Marienschule der Ursulinen Bielefeld, Abschluss Abitur
Grundschule

11 Eigene Veröffentlichungen

Originalarbeiten mit Erstautorenschaft

Walenda,G., Abnaof,K., Jousen,S., Meurer,S., Smeets,B., Rath,B., Zenke,M., Hoffmann,K., Fröhlich,H., Weiskirchen,R., und Wagner,W. (2013). TGF- β 1 accelerates senescence of mesenchymal stromal cells and has similar effects in early and late passages. PLoS ONE. *Manuscript accepted for publication.*

Hemeda,H.*, Kalz,J.*, **Walenda,G.***, Lohmann,M., und Wagner,W. (* equal contribution) (2013). Heparin Concentration is Critical for Cell Culture with Human Platelet Lysate. *Cytotherapy* 15(9), 1174-81.

Walenda,G., Hemeda,H., Schneider,R.K., Merkel,R., Hoffmann,B., und Wagner,W. (2012). Human platelet lysate gel provides a novel three dimensional-matrix for enhanced culture expansion of mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part C. Methods* 18, 924-934.

Walenda,T.*, **Bokermann,G.***, Ventura Ferreira,M.S., Piroth,D.M., Hieronymus,T., Neuss,S., Zenke,M., Ho,A.D., Müller,A.M., und Wagner,W., and (* equal contribution) (2011). Synergistic effects of growth factors and mesenchymal stromal cells for expansion of hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol* 36(4), 617-628.

Horn,P.*, **Bokermann,G.***, Cholewa,D., Bork,S., Walenda,T., Koch,C., Drescher,W., Hutschenreuther,G., Zenke,M., Ho,A., und Wagner W (* equal contribution) (2010). Comparison of Individual Platelet Lysates for Isolation of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Cytotherapy* 12, 888-898.

Originalarbeiten mit Koautorenschaft

Koch,C.M., Reck,K., Shao,K., Lin,Q., Jousen,S., Ziegler,P., **Walenda,G.**, Drescher,W., Opalka,B., May,T., Brummendorf,T., Zenke,M., Saric,T., und Wagner,W. (2013). Pluripotent stem cells escape from senescence-associated DNA methylation changes. *Genome Res.* 23, 248-259.

Lohmann,M., **Walenda,G.**, Hemeda,H., Jousen,S., Drescher,W., Jockenhoevel,S., Hutschenreuter,G., Zenke,M., und Wagner,W. (2012). Donor age of human platelet lysate affects proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. PLoS. ONE. 7, e37839.

Schneider,C., Teufel,A., Yevsa,T., Staib,F., Hohmeyer,A., **Walenda,G.**, Zimmermann,H.W., Vucur,M., Huss,S., Gassler,N., Wasmuth,H.E., Lira,S.A., Zender,L., Luedde,T., Trautwein,C., und Tacke,F. (2012). Adaptive immunity suppresses formation and progression of diethylnitrosamine-induced liver cancer. *Gut* 61, 1733-1743.

Ventura Ferreira,M.S., Labude,N., **Walenda,G.**, Adamzyk,C., Wagner,W., Piroth,D., Muller,A.M., Knuchel,R., Hieronymus,T., Zenke,M., Jahnen-Dechent,W., und Neuss,S. (2012). Ex vivo expansion of cord blood-CD34(+) cells using IGFBP(2) and Angptl-5 impairs short-term lymphoid repopulation in vivo. *J. Tissue Eng Regen. Med.*

Schellenberg,A., Lin,Q., Schuler,H., Koch,C.M., Jousen,S., Denecke,B., **Walenda,G.**, Pallua,N., Suschek,C.V., Zenke,M., und Wagner,W. (2011). Replicative senescence of mesenchymal stem cells causes DNA-methylation changes which correlate with repressive histone marks. *Aging (Albany. NY)* 3, 873-888.

Walenda,T., **Bokermann,G.**, Jost,E., Galm,O., Schellenberg,A., Koch,C.M., Piroth,D.M., Drescher,W., Brümmendorf,T.H., und Wagner,W. (2011). Serum after autologous transplantation stimulates proliferation and expansion of human hematopoietic progenitor cells. *PLoS ONE* 6(3): e18012.

Wirz,S., Dietrich,M., Flanagan,T.C., **Bokermann,G.**, Wagner,W., Schmitz-Rode,T., und Jockenhoevel,S. (2011). Influence of platelet-derived growth factor-AB on tissue development in autologous platelet-rich plasma gels. *Tissue Eng Part A* 17, 1891-1899.

Cholewa,D., Stiehl,T., Schellenberg,A., **Bokermann,G.**, Jousen,S., Koch,C., Walenda,T., Pallua,N., Marciniak-Czochra,A., Suschek,C.V., und Wagner,W. (2011). Expansion of adipose mesenchymal stromal cells is affected by human platelet lysate and plating density. *Cell Transplant.* 20, 1409-1422.

Patentanmeldung

Wagner,W., **Walenda,G.** (2012) Method for cultivating cells in platelet-lysate-containing medium. European Patent Office. Pub.No. WO/2013/000672. International Application No.: PCT/EP2012/060597.

Posterpräsentationen

Walenda,G., Abnaof,K., Jousen,S., Weiskirchen,R., Meurer,S., Zenke,M., Hoffmann,K., Fröhlich,H., und Wagner, W. (2013) TGF-b1 stimulates proliferation and consequently replicative senescence in mesenchymal stromal cells . 7th International Meeting, 23. - 24. April. Kompetenznetzwerk Stammzellforschung NRW in Köln.

Bokermann,G., Horn,P., Cholewa,D., Walenda,T., Drescher,W., Hutschenreuter,G., und Wagner,W. (2010). Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells. 3. International Congress on Stem Cells and Tissue Formation vom 11.-14. Juli 2010 in Dresden.