

"Untersuchungen zur Bedeutung mesenchymaler Stammzellen in der Geweberegeneration"

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte
Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Sabine Neuß-Stein, geb. Neuß

aus Düren

Berichter: Prof. Dr. rer. nat. W. Jahnen-Dechent

Prof. Dr. rer. nat. K. Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2004

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
à	je
α	Alpha
Abb.	Abbildung
AC133	Oberflächenantigen unbekannter Funktion
ADP	Adenosindiphosphat
ALS	amyotrophische Lateralsklerose
AP	alkalische Phosphatase
ApoD	Apolipoprotein D
ApoE	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicichoninsäure Assay
BCIP/NBT	5-bromo,4-chloro,3-indolyl- Phosphat/Nitroblau-Tetrazolium
β	Beta
bFGF	basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C3H/An	Mausstamm
ca.	cirka
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copyDNA</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
c-kit	Stammzellfaktor-Rezeptor
CO ₂	Kohlendioxid
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin

Abkürzungsverzeichnis

dCTP	Desoxycytidin
dGTP	Desoxyguanosin
DKFZ	Klon P586H212 DKFZ
DMA	N,N-Dimethylacrylamid
DMEM	<i>Dulbeccos modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Didesoxynukleotide
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin
ε	Epsilon
EB	<i>embryoid body</i>
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	<i>enzyme-linked-immunosorbent-assay</i>
EschG	Embryonenschutzgesetz
Fa.	Firma
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FDA	Fluoreszeindiacetat
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FLK-1	VEGF-Rezeptor
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
γ	Gamma
g	Erdbeschleunigung
G	Guanosin
GAB-1	signalübertragendes Protein
G-CSF	granulozytenkoloniestimulierender Faktor
GRB-2	Adapterprotein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HGF	Hepatozytenwachstumsfaktor
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
HOMC	humane <i>Omentum Majus</i> Zellen/ Mesothelzellen

IBMX	1-Isobutyl-3-methyl-Xanthin
IgG	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRAK	IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase
ISO	<i>International Organization of Standardization</i>
ITS	Insulin-Transferrin-Selensäure
k	Kilo (1×10^3)
Kca4	<i>intermediate conductance Ca-activated K-channel</i>
KGf	Keratinocytenwachstumsfaktor
L929	Mausfibroblasten-Zelllinie
LBP	Lipopolysaccharid-Binde-Protein
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MAOA	Monoaminoxidase A
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
MCDB	<i>Chick Fibroblast Basal Medium</i>
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
m	Milli (1×10^{-3}); Meter
μ	mikro (1×10^{-6})
MMP	Matrixmetalloproteinase
Myd88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
n	Nano (1×10^{-9})
NF-κB	Transkriptionsfaktor
NKS	Neugeborenen-Kälberserum
NSF	<i>National Science Foundation</i>
Oct-4	Oktamerbindeprotein 4
OXD	Oxadiazol-Derivat
ρ	Para
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCL	Polycaprolakton
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDMS	Plasmadesorptions-Massenspektrometrie
PEG	Polyethylenglykol
pH	Säuregrad
PI	Propidiumiodid
Pi	Phosphat
PI3	Phosphatidylinositol
PIG12	Prostaglandin E Synthase
PPDL	Polypentadecanolid
PU	Polyurethan
PVDF	Polyvinyliden-Fluorid
RAS	GTP bindendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Standardmedium
RT	reverse Transkription
Sca-1	Spinocerebelläre Ataxie Typ 1
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH2	signalübertragendes Protein
SHC	signalübertragendes Protein
SOS	<i>son of sevenless</i>
σ	Sigma
STAT	<i>signal transducer activator of T-cells</i>
s.u.	siehe unten
SYBRGreen	Fluoreszenzfarbstoff
T25	Gewebekulturflasche 25 cm ²
T75	Gewebekulturflasche 75 cm ²
Tab.	Tabelle
TAK	TGF- β -aktivierte Kinase
Taq-Polymerase	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure EDTA
TEMED	N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TEP	Totale Endoprothese

Abkürzungsverzeichnis

TGF	transformierender Wachstumsfaktor
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TIR	Toll/Interleukin Rezeptor Domäne
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
tPA	<i>tissue</i> Plasminogen-Aktivator
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziiertes-Faktor
u. a.	unter anderem
UCBT	<i>Umbilical Cord Blood Transplantation</i>
uPA	Urokinase Plasminogen-Aktivator
uPAR	Urokinase Plasminogen-Aktivator-Rezeptor
uv	ultraviolett
V	Volt
VEGF	vaskulo-endothelialer Wachstumsfaktor
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Stammzellen	1
1.1.1	Stammbaum der Zellen	1
1.1.2	Embryonale Stammzellen	3
1.1.3	Adulte Stammzellen	5
1.1.3.1	Hämatopoetische Stammzellen	5
1.1.3.2	Nabelschnur-Stammzellen	6
1.1.3.3	Mesenchymale Stammzellen	7
1.1.4	Stammzellnischen	10
1.1.5	Rekrutierung am Beispiel des HGF/c-met Systems	11
1.1.6	Therapiemöglichkeiten mit Stammzellen	12
1.1.6.1	Aktuelle Therapien mit hämatopoetischen Stammzellen	12
1.1.6.2	Aktuelle Therapien mit Nabelschnur-Stammzellen	13
1.1.6.3	Aktuelle Therapien mit mesenchymalen Stammzellen	14
1.1.7	Immunmodulatorische Fähigkeiten von mesenchymalen Stammzellen	16
1.1.8	Toll-like-Rezeptoren	17
1.2	<i>Tissue Engineering</i>	18
1.2.1	Formgedächtnispolymere	19
1.2.2	Funktionelle Kompatibilität und zelluläre Gewebekompatibilität	20
1.2.3	Degradation	21
1.3	Wundheilung	21
1.3.1	Definitionen und Einteilungen	21
1.3.2	Gerinnungskaskade/Fibrinolyse	23
1.4	Ziele der Arbeit	25
2.	Material und Methoden	27
2.1	Materialien	27
2.1.1	Antikörper	27
2.1.1.1	Primärantikörper	27
2.1.1.2	Sekundärantikörper	27

2.1.2	ELISA	27
2.1.3	Gebrauchskemikalien	27
2.1.4	Gebrauchslösungen	29
2.1.5	Geräte	29
2.1.6	Glaswaren	30
2.1.7	Kits	30
2.1.8	Lösungsmittel	30
2.1.9	Molekularbiologische Chemikalien	30
2.1.10	Primer	31
2.1.11	Software	32
2.1.12	Verbrauchsmaterial	32
2.1.13	Zellen	32
2.1.14	Zellkulturmedien	33
2.1.14.1	Stammzellmedium	33
2.1.14.2	Adipozyten-Induktionsmedium	33
2.1.14.3	Adipozyten-Erhaltungsmedium	33
2.1.14.4	Osteoblasten-Induktionsmedium	33
2.1.14.5	L929-Kulturmedium	34
2.1.15	Zytokine / Wachstumsfaktoren	34
2.2	Methoden	34
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	34
2.2.1.1	RT-PCR	34
2.2.1.2	<i>Real-Time</i> -PCR	38
2.2.1.3	Array-Technologie	39
2.2.2	Physikalische Methoden	40
2.2.2.1	Kontaktwinkelmessung	40
2.2.3	Proteinchemische Methoden	41
2.2.3.1	Western Blot	41
2.2.3.2	Zymographie	42
2.2.4	Zellbiologische Methoden	44
2.2.4.1	Isolation und Kultivierung adulter humaner mesenchymaler Stammzellen	44
2.2.4.2	Zellzahlbestimmung mittels CASY 1	44
2.2.4.3	Differenzierung adulter humaner mesenchymaler Stammzellen	45

2.2.4.4	Scratch-Assay	46
2.2.4.5	Boyden-Kammer-Assay	46
2.2.4.6	Proliferations-Assay	47
2.2.4.7	ELISA	47
2.2.4.8	Immunhistochemie	48
2.2.4.9	FACS-Analyse	49
2.2.4.10	Zytotoxizitätstests	49
3.	Ergebnisse	51
3.1	Charakterisierung humaner mesenchymaler Stammzellen	51
3.1.1	Humane mesenchymale Stammzellen ließen sich in Adipozyten und Osteoblasten differenzieren	51
3.1.2	Expressionsanalysen humaner mesenchymaler Stammzellen mittels DNA-Chip-Technologie	53
3.2	Rekrutierung von hMSC am Beispiel des HGF/c-met Systems	55
3.2.1	hMSC exprimierten HGF und c-met auf RNA- und Protein-Ebene	55
3.2.2	HGF verstärkte die Migration humaner mesenchymaler Stammzellen	58
3.2.3	HGF wirkte chemotaktisch auf humane mesenchymale Stammzellen	60
3.2.4	HGF inhibierte die Proliferation humaner mesenchymaler Stammzellen	60
3.3	Fibrinolytische Fähigkeiten humaner mesenchymaler Stammzellen	62
3.3.1	Humane mesenchymale Stammzellen exprimierten Enzyme der Fibrinkaskade auf RNA-Ebene	62
3.3.2	Humane mesenchymale Stammzellen exprimierten Enzyme der Fibrinkaskade auf Protein-Ebene	64
3.3.3	Die fibrinolytischen Enzyme uPA und tPA kamen als aktive Proteine in humanen mesenchymalen Stammzellen vor	67
3.4	Zytokompatibilität und Differenzierbarkeit humaner mesenchymaler Stammzellen auf Formgedächtnismaterialien	68
3.4.1	Die Formgedächtnismaterialien unterschieden sich in ihren hydrophilen/hydrophoben Eigenschaften	69
3.4.2	Die Formgedächtnismaterialien unterschieden sich in ihrer Zytokompatibilität/Zytotoxizität	72

3.4.3	Zytokompatibilitätstests mit humanen mesenchymalen Stammzellen	81
3.4.4	Zytokompatibilitätstests der Materialien 3, 13 und 17 mit humanen mesenchymalen Stammzellen	82
3.5	Immunmodulatorische Fähigkeiten humaner mesenchymaler Stammzellen	86
3.5.1	Humane mesenchymale Stammzellen exprimierten TLR-4, jedoch nicht dessen Korezeptor CD14 auf RNA-Ebene	86
3.5.2	Humane mesenchymale Stammzellen exprimierten den Toll-like-Rezeptor 4 auf Protein-Ebene nach LPS-Stimulation	87
4.	Diskussion	89
4.1	Charakterisierung humaner mesenchymaler Stammzellen	89
4.2	HGF/c-met System bei humanen mesenchymalen Stammzellen	90
4.3	Fibrinolytische Eigenschaften humaner mesenchymaler Stammzellen	93
4.4	Immunmodulatorische Fähigkeiten humaner mesenchymaler Stammzellen	96
4.5	<i>Tissue Engineering</i> mit humanen mesenchymalen Stammzellen	97
5.	Zusammenfassung	100
6.	Literaturverzeichnis	101

1. Einleitung

1.1 Stammzellen

1.1.1 Stammbaum der Zellen

Der menschliche Körper enthält ca. 200 unterscheidbare Zelltypen. Der Stammbaum aller Zellen beginnt mit der Zygote. Während der Embryonalentwicklung entstehen aus undifferenzierten Vorläuferzellen (Progenitorzellen) zunehmend spezialisierte Zelltypen. In den Enden seiner Verzweigungen repräsentiert der Stammbaum terminal differenzierte und spezialisierte Zellen des erwachsenen Körpers. An vielen Verzweigungspunkten können die jeweiligen Zellen sich entweder reproduzieren oder in der Differenzierung voranschreiten. Diese Zellen nennt man Stammzellen. Je nach Gewebezugehörigkeit bzw. dem Gewebe, das sie schließlich bilden – hier ist die Nomenklatur unsauber – heißen sie embryonale Stammzellen (ES), germinale (Geschlechtszellen bildende), hämatopoetische (Blut bildende), somatische (Gewebe bildende), mesenchymale (aus dem Mesenchym stammende) oder epitheliale (Epithel (Haut) bildende) Stammzellen. Die Unterscheidung zwischen Stammzellen und Vorläuferzellen wird zunehmend schwieriger, seit bekannt ist, daß Zellen durch Dedifferenzierung bzw. Reprogrammierung auf ein ontogenetisch primitiveres Stadium zurückfallen und anschließend in mehrere Gewebearten differenzieren können. Diese "Plastizität" wird intensiv beforscht ¹. Viele Forscher bezweifeln allerdings das Konzept der Plastizität bzw. Transdifferenzierung, d.h. der Differenzierung über die Grenzen des Keimblattes hinweg, aus der eine Zelle ursprünglich stammte ^{2 3}.

Stammzellen haben die Fähigkeit zur Autoreproduktion und sind nicht endgültig differenziert. Ihre Nachkommen sind entweder selbst Stammzellen oder differenzierter als die Stammzelle, aus der sie hervorgegangen sind. Dies hängt davon ab, ob sich die Stammzelle symmetrisch oder asymmetrisch teilt. Die Signale, welche die Stammzelle aus der jeweiligen Mikroumgebung ihrer Nische erhält und welche dazu führen, daß die Stammzelle entweder einen Selbsterneuerungs- oder einen Differenzierungszyklus startet, sind in Modellsystemen erforscht ^{4, 5}.

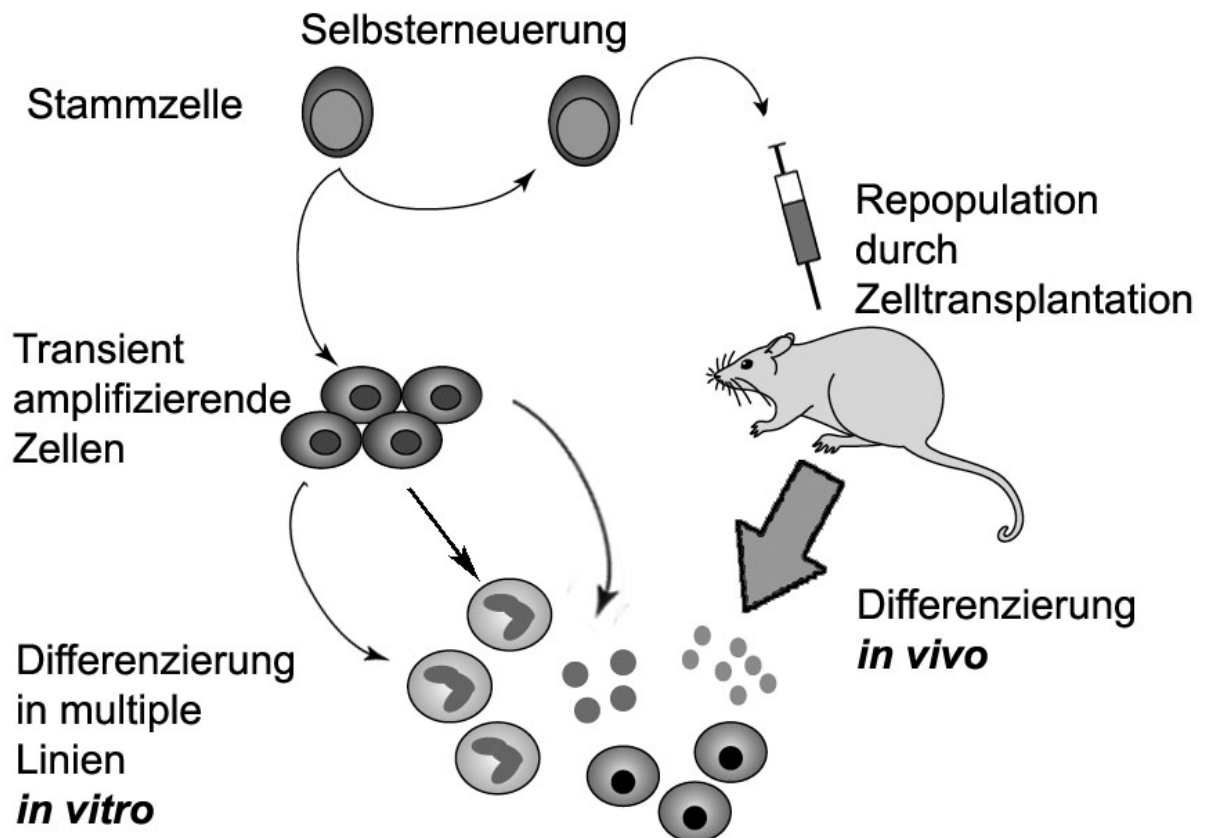


Abbildung 1: Stammzellen können sich selbst erneuern oder über *transient amplifying cells* zur Differenzierung in die verschiedenen Gewebe des Körpers beitragen. Teile der Differenzierung können *in vitro* nachgestellt werden. Der entscheidende Nachweis der Differenzierungsfähigkeit, der "Potenz" einer Stammzelle, erfolgt durch Implantation in ein Wirtstier und die Analyse der Gewebeintegration. Pluripotente embryonale Stammzellen können nach Implantation in Blastozysten ganze Tiere regenerieren, multipotente hämatopoetische Stammzellen können das blutbildende System regenerieren, unipotente muskelresidente Stammzellen können Muskelgewebe regenerieren....

Konzeptionell unterscheidet man zwischen totipotenten (lat. „zu allem fähig“) Zellen wie der Zygote, pluripotenten (lat. „zu vielem fähig“) Zellen wie den embryonalen Stammzelle und multipotenten (lat. „zu mehrerem fähig“) Zellen wie den mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks. Diese Unterscheidung dient in Deutschland als rationale Grundlage der Entscheidung, ob die Forschung mit einem bestimmten Zelltyp ethisch vertretbar oder verwerflich ist. Danach ist die Forschung mit totipotenten Zellen (ES-Zellen) nur unter strengen Auflagen straffrei, weil diese Zellen das Potenzial eines ganzen Menschen in sich tragen und damit unter den Embryonenschutz fallen. Es wird quasi die kleine Eichel mit der ausgewachsenen Eiche gleichgesetzt. Die Forschung mit multipotenten mesenchymalen Stammzellen gilt hier zu Lande als ethisch unbedenklich, weil aus diesen Zellen einzelne Gewebe

und Organe, aber kein ganzer Mensch hervorgehen können. Diese Vereinfachung verliert zunehmend an Trennschärfe, weil bereits Pluripotenz mesenchymaler Stammzellen nachgewiesen wurde^{6, 7} und die (Re)-differenzierung von embryonalen Stammzellen aus einer Eizelle ohne den Weg über eine Zygote gelang⁸.

Der Status einer Stammzelle hängt in jedem Fall stark von den Faktoren der jeweiligen Nische/Mikroumgebung ab, welche die Stammzellen schützen, ihre Eigenschaften erhalten und außerdem festlegen, wie schnell und in welcher Art und Weise (symmetrisch oder asymmetrisch) die Proliferation erfolgt⁹.

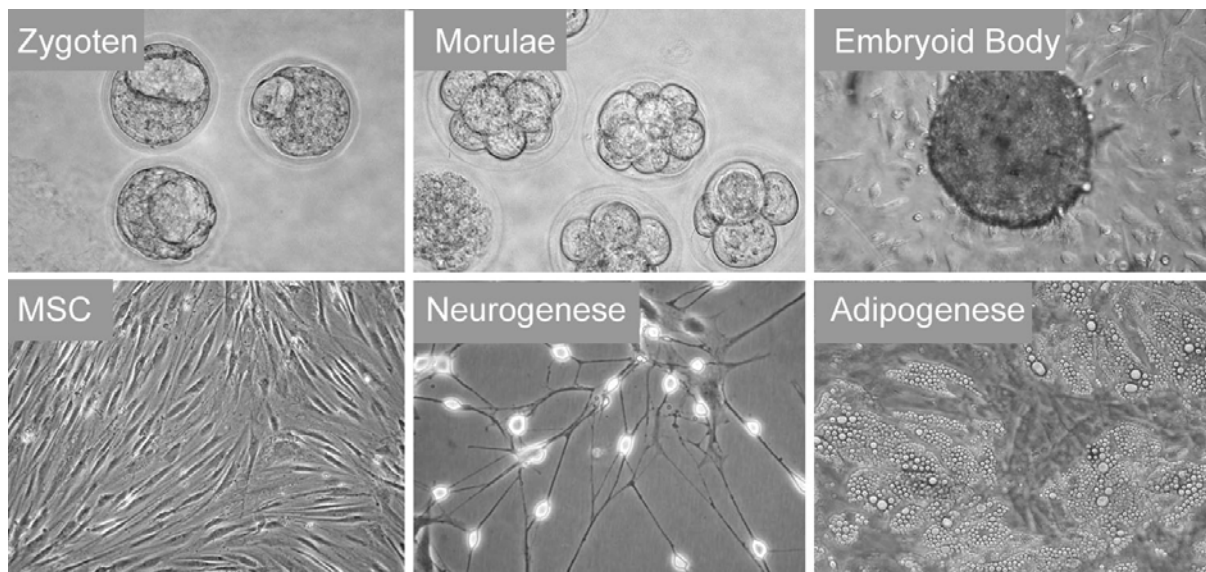


Abbildung 2: Differenzierungsstadien von Stammzellen. Zygoten bilden mehrzellige Aggregate wie *Morulae* und *Blastulae*, aus denen embryonale Stammzellen (ES-Zellen) isoliert werden. In der Gewebekultur differenzieren ES-Zellen über Embryokörperchen (*embryoid bodies*) in Zellen aller drei Keimblätter. Mesenchymale Stammzellen (MSCs) können ebenfalls mehrere Zelltypen hervorbringen, darunter neuronale Zellen und Adipozyten. Bildmaterial IZKF BIOMAT., RWTH Aachen.

1.1.2 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen werden als pluripotent bezeichnet, weil sich aus ihnen jede Art von Zellen oder Geweben bilden kann, mit Ausnahme der Plazenta.

Embryonale Stammzellen können auf dreierlei Weise gewonnen werden:

1. die Gewinnung von Zellen des Embryoblasten einer Blastozyste, welche im Rahmen einer *in-vitro*-Fertilisation anfällt¹⁰
2. die Gewinnung primordialer Keimzellen (Vorläufer von Ei- und Samenzellen) aus frühzeitig abgegangenen oder abgetriebenen Föten¹¹
3. der Zellkern einer Eizelle wird durch Kerntransfer gegen den Kern einer somatischen Zelle ausgetauscht und man bringt die Eizelle mittels eines elektrischen Impulses dazu, sich zu teilen; aus der entstehenden Blastozyste können die Zellen des Embryoblasten gewonnen werden^{12, 13}

Die Isolierung embryonaler Stammzellen ist ethisch umstritten und in Deutschland durch das Embryonenschutzgesetz (EschG vom 13.12.1990) verboten, da sowohl beim therapeutischen Klonen, als auch bei der Gewinnung von Stammzellen aus nicht implantierten "überzähligen" Embryonen von *in-vitro*-Fertilisationen, die verwendeten Embryonen zerstört werden (Bundesgesetzblatt 1990). Obwohl das im April 2002 verabschiedete Stammzellgesetz den Import, die Gewinnung und die Beforschung humaner, embryonaler Stammzellen verbietet, sind auf Antrag Ausnahmen möglich: Linien embryonaler Stammzellen sollen importiert werden dürfen, wenn sie vor dem Stichtag 1. Januar 2002 gewonnen wurden. Für besonders hohe Forschungsziele dürfen diese Zellen unter Aufsicht des Robert-Koch-Institutes importiert und straffrei beforscht werden.

Aufgrund ihrer hohen Telomeraseaktivität können sich embryonale Stammzellen unbegrenzt teilen. Sie können in Gewebetypen jedes Keimblattes differenzieren, so z. B. der Magen-Darm-Trakt (Endoderm), Knochen, Muskulatur, Herz, Nieren (Mesoderm), Haut, Augen und ZNS (Ektoderm). Darin liegt eine Gefahr, denn ES-Zellen können nach Transplantation auch unkontrolliert differenzieren und Teratome oder gar maligne Teratokarzinome bilden, welche aus Zelltypen aller drei Keimblätter bestehen ^{14, 15}. Daher müssen ES-Zellen vor der Implantation peinlich genau vordifferenziert und von den undifferenzierten Vorläuferzellen abgetrennt werden.

In einer speziellen Kultivierungstechnik, der *hanging drop culture*, bilden embryonale Stammzellen spontan sogenannte Embryokörperchen, *embryoid bodies* (EBs) aus, die Zelltypen aller drei Keimblätter beinhalten. Diese Technik wurde erstmals von Anna Wobus am ehemaligen DDR-Akademieinstitut in Gatersleben beschrieben ¹³ und bildet die Grundlage aller gängigen Differenzierungsprotokolle für ES-Zellen. Durch Zugabe bestimmter Wachstumsfaktoren kann die Differenzierung der EBs in eine bestimmte Richtung gelenkt werden, z. B. in die neuronale Linie ¹⁶. Dazu werden die Zellen vereinzelt und auf einer Schicht von Fütterzellen, den *feeder layer cells* kultiviert. Fütterzellen sind in der Regel somatische Zellen, z. B. Fibroblasten, die durch Gamma-Bestrahlung oder durch Behandlung mit Mitomycin C teilungsinaktiv geworden sind. Sie produzieren sowohl extrazelluläre Matrix als auch Zytokine, die embryonale Stammzellen zur Proliferation bzw. Differenzierung anregen ¹⁷.

1.1.3 Adulte Stammzellen

Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen ist die Gewinnung und Beforschung adulter Stammzellen nach gängiger Meinung ethisch unbedenklich, da sie aus dem erwachsenen Menschen gewonnen werden können. Im Falle einer Reimplantation bieten sie den theoretischen Vorteil, vollständig autologe Zellen darzustellen, so daß keine Immunsuppression erfolgen muß. Nachteilig ist die im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen verminderte Telomeraseaktivität, die dazu führt, daß die adulten Stammzellen nur begrenzt expandierbar sind. Die Proliferationsgeschwindigkeit adulter Stammzellen ist im Vergleich zu embryonalen Stammzellen ebenfalls deutlich herab gesetzt.

Für viele Gewebetypen sind spezifische Vorläuferzellen bekannt, die sich in ihrer jeweiligen Nische solange in einem Zellzyklusarrest befinden, bis ihre Mikroumgebung signalisiert, daß ein Nachschub an spezifisch differenzierten Zellen erforderlich ist. Daraufhin setzt die Zellteilung ein, wobei ein Ausgleich zwischen Selbsterneuerung und der Bildung von Tochterzellen für die Differenzierung stattfinden muß⁹. Als Beispiel für adulte Stammzellen werden im Folgenden die hämatopoetischen, die Nabelschnur- und die mesenchymalen Stammzellen beschrieben.

1.1.3.1 Hämatopoetische Stammzellen

Hämatopoetische (Blut bildende) Stammzellen sind eindeutig die am längsten und besten untersuchten Stammzellen. Da Blutzellen nur eine kurze Lebensdauer haben, müssen sie während des gesamten Lebens nachgebildet werden. Der Bildungsort der Blutzellen ist dabei nicht konstant. Erythrozyten und Leukozyten werden beim Fötus in Leber und Milz gebildet, beim Neugeborenen jedoch hauptsächlich im (roten) Knochenmark. Im adulten Organismus werden die Erythrozyten und Leukozyten im (roten) Knochenmark und die Lymphozyten in den lymphatischen Organen gebildet¹⁸. Die Existenz hämatopoetischer Stammzellen wurde bereits in den 1950-er Jahren durch Studien an lethal bestrahlten Mäusen experimentell nachgewiesen^{19, 20}. Das erste Modellsystem hämatopoetischer Stammzellen war die CFU-S, *colony-forming-unit-spleen*, welche eine hohe Proliferationsrate und die Fähigkeit aufwies, in Erythrozyten, Granulozyten und Megakaryozyten zu differenzieren^{21, 22}. Die Blutzellbildung wird durch Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert. So stimuliert der Granulozyten-Koloniestimulierende Faktor G-CSF die

Bildung von Granulozyten, während Erythropoetin die Erythropoese anregt. Die Blutbildungszellen einer Entwicklungslinie liegen nicht einzeln, sondern in Nestern zusammen und werden CFU (*colony forming unit*) genannt ¹⁸. Man versteht die molekulare Wirkung der Hämatopoese heute so gut, daß alle Blutzellen *in vitro* aus hämatopoetischen Stammzellen differenziert werden können.

Hämatopoetische Stammzellen können anhand ihrer Oberflächenmarker durch Zellsortierung nach Fluoreszenzmarkierung (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) oder durch Markierung mit magnetischen Partikeln (*magnetobeads*), isoliert werden. Sie exprimieren die Epitope CD34, Sca-1 und CD117 (c-kit) und besitzen keine Zelllinien-spezifischen Marker (*lineage negative*, lin-) ^{23, 24}. Zur Isolation hämatopoetischer Stammzellen wird zur Zeit auch das in seiner Funktion noch unbekannte Oberflächenantigen AC133 genutzt ²⁵.

1.1.3.2 Nabelschnur-Stammzellen

Nabelschnurblut entstammt dem fötalen Kreislauf und enthält sowohl hämatopoetische CD133-positive bzw. CD34-positive Stammzellen ²⁶ als auch (wenn auch in sehr geringer Zahl) somatische Stammzellen ²⁷. Nabelschnur-Stammzellen sind ontogenetisch primitiver als die klassischen adulten Stammzellen des Knochenmarks und ähneln in ihren Proliferations- und Differenzierungseigenschaften eher den embryonalen Stammzellen. Ihre Gewinnung ist ethisch unbedenklich und mit keinerlei Risiko für Mutter und Kind verbunden. Nabelschnur-Stammzellen exprimieren wesentliche Transplantationsantigene noch nicht, und können daher auch in nicht vollständig histokompatible Empfänger transplantiert werden, ohne eine Abstoßungsreaktion hervorzurufen ²⁸. Es wird propagiert, das Nabelschnurblut Neugeborener über Jahre hinweg zu lagern, um im Fall der Fälle ein autologes bzw. keine Abstoßungsreaktion hervorrufendes Transplantat zu haben. Firmen wie Vita34 in Leipzig oder die Cryo-Care GmbH in Köln bieten die Gewinnung und Konservierung von Nabelschnurblut als Serviceleistung an. Diese Praxis ist aber umstritten. Im Fall einer späteren hämatoonkologischen Erkrankung verbietet sich die autologe Spende, weil die auslösenden Mutationen evtl. schon im Nabelschnurblut vorliegen. Die Nabelschnurblut-Eigenspende etwa nach Bestrahlung von festen Tumoren wird vermutlich nicht ausreichen, weil die aus Nabelschnurblut gewinnbaren Transplantate derzeit nur für eine einzige Spende im Säuglingsalter reichen, nicht aber für einen kompletten Therapiezyklus von Jugendlichen oder

Erwachsenen. Die Expansion hämatopoetischer Stammzellen aus Nabelschnüren wäre theoretisch möglich, jedoch sind die zur Expansion benötigten Zytokinbehandlungen nicht klinisch zugelassen und scheinen auch das spätere "Anwachsen" des Transplantates ungünstig zu beeinflussen ²⁹. So beeinflussen Stromazellen, Zytokin-Zusätze zum Kulturmedium (z. B. Stammzellfaktor, Thrombopoietin) und Plazenta-konditioniertes Medium in hohem Maße die Quantität und, bezüglich ihres klonogenen Potentials, die Qualität dieser Stammzellen ^{2, 30}.

Prinzipiell ist die - für die Spender (Mutter und Neugeborenes) ja völlig risikofreie - Spende von Nabelschnurblut zu Gunsten einschlägiger Spenderbanken dennoch extrem sinnvoll, weil mehrere Spenden gepoolt und dann einem Empfänger verabreicht werden können. Diese Methode wird schon jetzt in der klinischen Routine ausgewählter Zentren, z. B. dem Institut für Zelltherapie der Universität Düsseldorf, erfolgreich angewandt. Aus Sicht der Forschung ist die Nabelschnurblut-Spende ebenfalls erwünscht, weil das Potenzial der enthaltenen somatischen Stammzellen noch nicht annähernd ausgelotet ist.

1.1.3.3 Mesenchymale Stammzellen

Beim Mesenchym handelt es sich um das embryonale Bindegewebe, welches das multipotente Muttergewebe von Binde- und Stützgewebe, glatter Muskulatur, sowie von Skelett- und Herzmuskulatur darstellt. Aus ihm entwickelt sich z. B. das System der serösen Häute, das Gefäßsystem einschließlich Herz, die Harn- und Geschlechtsorgane, sowie die Lunge, ausgenommen ihrer Epithelauskleidung, welche dem Ektoderm entstammt ³¹. Das Mesenchym bildet außerdem das rote und weiße Knochenmark, zwei Funktionszustände desselben Organs welches die zeitlebens teilungsbereiten Reticulumzellen beinhaltet. Aus diesen wiederum gehen die Blutbildungszellen und Fettzellen hervor ¹⁸. Mesenchymale Stammzellen wurden 1968 von Friedenstein und Mitarbeitern erstmals beschrieben ³¹. Dabei handelt es sich um adhärente, morphologisch den Fibroblasten ähnliche Zellen, die aus dem adulten Knochenmark isoliert werden können. Von den ebenfalls im Knochenmark befindlichen hämatopoetischen Stammzellen lassen sich die mesenchymalen Stammzellen (*mesenchymal stem cells*, MSC) aufgrund ihrer Adhärenz und der fehlenden Oberflächenmarker CD14, CD34 und CD45 unterscheiden. Einen MSC-spezifischen Marker oder ein definiertes Markermuster gibt es derzeit noch nicht. Es fehlen auch quantitative *in vitro* Methoden, die Menge an MSC in einer Zellpopulation zu definieren ³². MSC exprimieren CD51, CD54, CD73, CD105 und Oct-4 ³³. Ihre

Verdopplungszeit liegt bei 33 Stunden und sie haben *in vitro* ein großes, aber stark variierendes Expansionspotential³⁴⁻³⁶. Unter optimalen Bedingungen durchlaufen sie in ungefähr 10 Wochen bis zu 50 Populationsverdopplungen³⁷. Die Isolation der MSC ist nicht nur aus Knochenmark, sondern auch aus Fettgewebe³⁸ und Nabelschnüren³⁹ beschrieben. Dabei ist bis heute unklar, ob MSC in Geweben existieren, oder ob sie aus dem Knochenmark mobilisiert werden müssen³².

MSC dienen der Regeneration mesenchymaler Gewebe, wie z. B. Knochen, Knorpel, Muskel, Sehnen, Fettgewebe und Stroma und lassen sich auch *in vitro* in diese Zelltypen differenzieren. Die Kultivierung erfolgt in serumhaltigem Medium. Fünf bis sieben Tage nach der Isolation sind die ersten Kolonien zu erkennen. Eine spontane Differenzierung wird nicht beobachtet, ab Passage fünf tritt allerdings ein Verlust der Differenzierbarkeit ein³³.

Bei MSC handelt es sich um eine heterogene Population, die Unterschiede bezüglich ihrer Oberflächenepitope und ihrer Morphologie aufweist. Ein weiteres Indiz für die Heterogenität der MSC ist die Tatsache, daß ein Teil der Population altert und sich nicht mehr teilt. Ungefähr 90 % der MSC befinden sich in der G0- bzw. G1-Phase des Zellzyklus, was auf ein hohes Differenzierungspotential hinweist. Trotz ihres enormen Expansionspotentials *in vitro* bleiben der Karyotyp und die Telomeraseaktivität der MSC unverändert stabil. Ob MSC auch im Blut Erwachsener zirkulieren oder sich schon während der Embryonalentwicklung im Körper verteilen, wird zur Zeit erforscht. Charakteristika für eine optimale Nische sind noch nicht beschrieben^{33, 40}.

Humane MSC variieren nicht nur in ihrem Expansions- und Differenzierungspotential, sondern auch in ihrer Morphologie. So werden in der Literatur immer wieder zwei verschiedene morphologische Zelltypen unterschieden. Es sind spindelförmige Zellen, welche große Kolonien ausbilden und schnell proliferieren, und breite, abgeflachte Zellen, die kleine Kolonien ausbilden, deren Teilungsrate wesentlich geringer ist und die nicht konfluent werden, beschrieben. Die Koloniegröße spindelförmiger Zellen ist zwei bis drei mal größer als die breiterer Zellen. Da in höherer Passagenzahl die Menge an breiten Zellen zu Ungunsten der spindelförmigen Zellen zunimmt, wird diskutiert, ob die spindelförmigen Zellen in die breiten, abgeflachten Zellen übergehen. Es werden auch Zellen mit einer intermediären Morphologie beobachtet⁴¹.

Daneben wird ein dritter Phänotyp diskutiert. Hierbei handelt es sich um eine Population sehr kleiner runder Zellen (Durchmesser ca. 7 µm) mit hoher Teilungsrate und einem größeren Differenzierungspotential. Sie scheinen die frühesten Vorläufer der heterogenen Population zu sein. Ihre Oberflächenepitope unterscheiden sich teilweise von den spindelförmigen und abgeflachten mesenchymalen Stammzellen (Durchmesser zwischen 15 und 50 µm). So weisen die kleinen Zellen die Oberflächenepitope FLK-1, Transferrin-Rezeptor und Annexin II auf, welche den beiden anderen Zelltypen fehlen. Aber selbst innerhalb dieser Zellpopulation gibt es Unterschiede in der Expression von Oberflächenepitopen. Die Zellen sind also heterogen und nicht klonal, was die Interpretation der "Plastizität" erschwert. Nach wie vor ist unklar, ob die unterschiedlichen Zelltypen aus einem einzigen Vorläufertyp hervorgehen oder wirklich plastisch ist, oder ob MSC eine Mischung unterschiedlicher, prädeterminierter Progenitorzellen darstellen, die sich derzeit noch nicht trennen lassen.

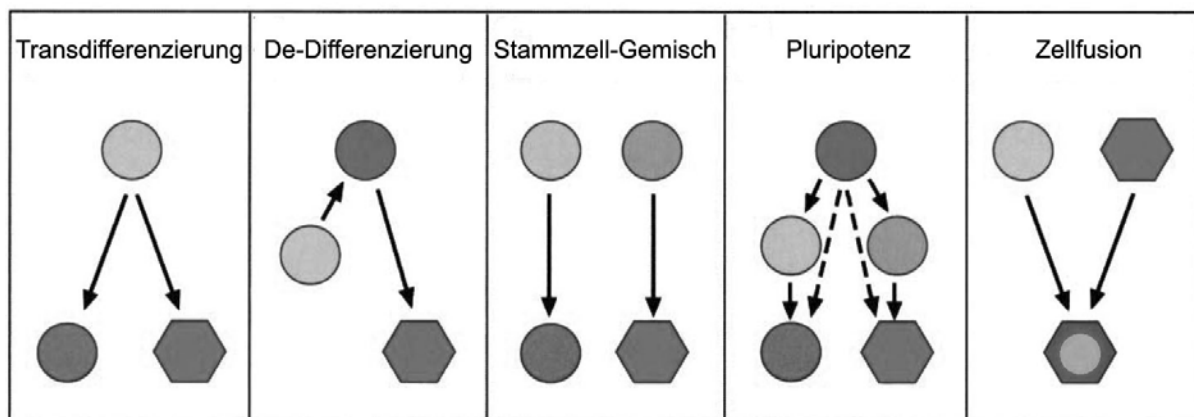


Abbildung 3: Alternativen zur Erklärungen von "Plastizität" und "Transdifferenzierung". Bei der echten Transdifferenzierung differenziert eine geweberesidente Progenitorzelle direkt oder über den Umweg der De-Differenzierung in Zellen eines nicht-verwandten Gewebetyps. Statt der für diesen Schritt nötigen "multipotenten" Progenitorzelle könnte auch ein Gemisch unipotenter Progenitorzellen vorliegen. Diese Möglichkeit kann man durch Versuche mit klonierten Zellen ausschließen. Eine wirklich pluripotente Zelle differenziert direkt oder über Zwischenstadien in verschiedene Zelltypen (unterschiedlicher Keimblätter). Diese Zellen werden über Zellmarker (Oberflächenantigene, Isoenzyme, chromosomale Marker) identifiziert. Eine Veränderung von Zellmarkern wird auch dann beobachtet, wenn verschiedene Zellen fusionieren, ohne daß eine wirkliche Transdifferenzierung stattgefunden hat. Daher muß man Zellfusion als Ursache der phänotypischen Differenzierung ausschließen.

Die "Plastizität" der MSC^{42, 43} besteht darin, daß sie sich in drei typischen Differenzierungswegen zu Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten differenzieren lassen, mittlerweile auch in Tenozyten, Stromazellen, Skelettmuskelzellen, längsgestreifte Muskelzellen, Herzmuskelzellen, Astrozyten und Oligodendrozyten. Das Differenzierungspotential beschränkt sich demnach nicht nur auf mesenchymales Gewebe, sondern ist keimblattüberschreitend. Da

mesenchymale Stammzellen heterogen sind, was durch die unterschiedliche Expression von Differenzierungsantigenen deutlich wird, ist das Differenzierungspotential der einzelnen Zellen auch unterschiedlich. Zum Beispiel lassen sich nur 30% der Populationen in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten differenzieren, während der Rest Osteoblasten und Chondrozyten bzw. nur Osteoblasten ausbilden kann. Versuche mit Einzell-Klonen aus MSC ergaben nie Klone, welche sich ausschließlich in Adipozyten und Osteoblasten oder Adipozyten und Chondrozyten differenzieren ließen, sondern immer in eine Mischung von Zelltypen^{44, 45}. Zu den Zelltypen, die sich bisher nicht aus MSC differenzieren ließen, gehören die Mesothelzellen. Dies bedeutet aber nicht, daß eine solche Differenzierung nicht möglich wäre, sondern nur, daß bis jetzt noch keine passenden Differenzierungsbedingungen bekannt wurden.

1.1.4 Stammzellnischen

Zum Erhalt ihres Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotenzials brauchen Stammzellen ihre spezifische Mikroumgebung, genannt Nische, bis sie ein Signal zur Teilung und/oder Migration empfangen. Diese Nischen existieren in den verschiedenen Organen während des gesamten Lebens und die Zahl der enthaltenen Stammzellen bleibt annähernd konstant. Außer den Stammzellen bilden benachbarte Zellen eine Mikroumgebung, welche durch die Sekretion spezifischer Faktoren und die Bildung von Extrazellulärmatrix die einzigartigen Eigenschaften der Stammzellen erhalten⁹. Ohne den Schutz der Nische beginnen die Stammzellen zu differenzieren. Injiziert man embryonale Mausstammzellen in eine Nacktmaus, so setzt die Differenzierung ein, wohingegen die gleichen Zellen in der inneren Zellmasse einer Blastozyste ihre Stammzeleigenschaften behalten. Dies bedeutet, daß die Kombination von Stammzellen und ihrer spezifischen Mikroumgebung extrem wichtig für die Fähigkeiten und das Potenzial von Stammzellen sind. Der Aufbau der jeweiligen Nischen ist sehr variabel und größtenteils unbekannt. Muskelstammzellen, auch Satellitenzellen genannt, befinden sich auf der gesamten Basallamina, welche die Muskelfaser ummantelt, während Stammzellen von Wechselorganen wie dem Darm, sich in einem bestimmten Organbereich aufhalten und von dort aus das Gewebe erneuern. Was genau die Stammzellen in ihrer Nische hält, ist größtenteils unerforscht, kann aber aus Modellsystemen, wie den Keimzellen von *Drosophila* hergeleitet werden. Der direkte physikalische Kontakt zwischen Stammzelle und benachbarter differenzierter Zelle ist demnach von größter

Bedeutung. Wenn sich die *Drosophila*-Keimzellen teilen, verbleibt diejenige Zelle, die in direktem Kontakt mit der Nachbarzelle steht, an ihrem Ort und bleibt eine Stammzelle, während diejenige Zelle, welche der Nachbarzelle abgewandt ist, differenziert. Ähnliches gilt für Stammzellen im Mausgehirn, im Haarfollikel, im Darm und auch für die hämatopoetischen Stammzellen, die im Knochenmark in direkter Nähe zu Stromazellen existieren⁹. Für *Drosophila*-Keimzellen ist bekannt, daß sich in der Extrazellulärmatrix des Nischenrands DE-Cadherin und *Armadillo* (β -Catenin in Vertebraten) ansammeln. Diese Moleküle bilden Zell-Verbindungen (*cellular junctions*) die für die Interaktion von Stammzellen und ihren direkten Nachbarzellen essenziell sind. Ein Verlust von DE-Cadherin oder *Armadillo* führt dazu, daß die Stammzellen ihre Nische verlassen⁴⁶.

1.1.5 Rekrutierung am Beispiel des HGF/c-met Systems

Die in ihren spezifischen Nischen „wartenden“ Stammzellen müssen durch Faktoren aus ihrem Ruhezyklus herausgelöst und in Richtung Defekt geleitet werden, damit sie ihre Funktion als Lieferant von neuen Zellen als Ersatz für Gewebeverluste oder durch Apoptose abgestorbene Zellen, ausüben können. Ein solcher Faktor scheint der Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF) zu sein⁴⁷.

Beim HGF, auch Hepatopoietin A oder *scatter factor* genannt, handelt es sich um ein pleiotropes Zytokin mit einer Größe von 82 kDa^{48, 49}. Es ist sowohl sequenz- als auch strukturhomolog zu Plasminogen (38%) und wird als inaktive einkettige Vorstufe sezerniert, welche durch eine Serinprotease (z. B. uPA und tPA) gespalten wird. Es entsteht ein Heterodimer, bestehend aus einer 463 As großen α - und einer 234 As großen β -Kette, welche durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind⁵⁰. HGF bindet an einen Tyrosinkinase Rezeptor, kodiert durch das met Onkoprotein (c-met, 145 kDa), welches durch Autophosphorylierung einen Signaltransduktionsweg anschaltet^{51, 52}. An der intrazellulären c-met-Domäne befinden sich verschiedene Andockstellen für signalübertragende Proteine wie GRB-2, SHC, STAT3 und GAB1. Die Bindung an Phospho-Tyrosinreste des Rezeptors erfolgt hauptsächlich über SH2-Domänen, welche über SOS den RAS-Signalweg aktivieren. Dieser hat zur Folge, daß HGF mito- und motogen auf verschiedene Zelltypen wirkt. Die multifunktionelle Andockstelle des c-met-C-Terminus unterscheidet sich von denjenigen anderer Tyrosinkinase-Rezeptoren, bei denen eine spezifische Phosphorylierung die aktive Andockstelle für ein ganz bestimmtes Adapterprotein

bestimmt. Die Multifunktionalität entspricht damit der vielseitigen Signalaktivierung die für das invasive Wachstum, das durch HGF-Rezeptoren eingeleitet wird, erforderlich ist. So spielt die PI3-Kinase eine wichtige Rolle für die die Mobilität stimulierende Wirkung der Zelle. Folgende Vorgänge können durch die Bindung von HGF an c-met induziert werden:

- Lösung der Zell-Zell-Bindungen und Reorganisation des Zytoskeletts.
- Die Zellen beginnen ihre Unabhängigkeit durch Wachstum und Formveränderung zu nutzen.
- Die disregulierende Wirkung der Aktivierung des HGF-Rezeptors führt zu einem extrazellulären Matrixabbau und Invasion der Zellen.

HGF ist ein Faktor, welche mito-, moto- und morphogen auf verschiedenste Zelltypen wirkt⁵³.

Da HGF außerdem in Wunden in erhöhter Konzentration vorliegt^{54, 55} und Angiogenese induzieren kann, handelt es sich um einen möglichen Mobilisierungs- und Rekrutierungsfaktor für Stammzellen, falls diese den HGF-Rezeptor c-met exprimieren.

1.1.6 Therapiemöglichkeiten mit Stammzellen

Es gibt prinzipiell zwei Möglichkeiten einer Stammzelltherapie: entweder werden die Zellen lokal implantiert, genau dort, wo ein Gewebedefekt vorliegt, oder sie werden systemisch injiziert. In beiden Fällen kann man mit völlig undifferenzierten oder vordifferenzierten Zellen arbeiten. Auch ist es möglich, die Zellen vor der Transplantation viral zu transfizieren, um einen Gendefekt auszuschalten. Des Weiteren können die Zellen entweder als Zellsuspension oder in einem dreidimensionalen Konstrukt auf einem Trägermaterial (*scaffold*) in den Organismus gebracht werden. Adulte Stammzellen eignen sich theoretisch besonders für eine Therapie, da mit autologem Material gearbeitet werden kann und es somit zu keinerlei Abstoßungsreaktion kommt.

1.1.6.1 Aktuelle Therapien mit hämatopoetischen Stammzellen

Bei den seit Jahrzehnten durchgeführten Therapien mit hämatopoetischen Stammzellen unterscheidet man zwischen der Transplantation von Knochenmark und der Transplantation von mobilisierten Stammzellen, welche aus dem peripheren Blut isoliert werden⁵⁶. Die Transplantation von Knochenmark-Spenden wird zunehmend ersetzt durch die Transfusion von Blut, das Stammzellen enthält. Die

Stammzellen im Blut werden durch eine vorherige Injektion der Spender mit G-CSF aus dessen Knochenmark mobilisiert. Der wesentliche Vorteil dieser Methode besteht darin, daß eine Blutspende weniger riskant und belastend ist, als eine Knochenmarkspende. So ist im internationalen Knochenmarkstransplantationsregister für die Jahre 1998 bis 2000 eine (autologe) Transplantationsrate mobilisierter hämatopoetischer Stammzellen von 80% bei Kindern und mehr als 90% bei Erwachsenen registriert worden. Bei allogenen Transplantationen nimmt die Zahl an G-CSF-mobilisierten Stammzellen gegenüber der direkten Knochenmarksspende ebenfalls zu. Im oben genannten Zeitraum wurden 20% der Transplantationen bei Kindern und mehr als 40% der Transplantationen bei Erwachsenen mit mobilisierten hämatopoetischen Stammzellen von Familienangehörigen durchgeführt ⁵⁷. Die Transplantation mobilisierter hämatopoetischer Stammzellen wird der Knochenmarksspende ohne G-CSF auch deswegen vorgezogen, weil die mobilisierten Stammzellen nachweislich schneller vom Körper angenommen werden und mehr Granulozyten und Thrombozyten produzieren ⁵⁸⁻⁶⁰.

Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen wird zwar hauptsächlich zur Therapie von Leukämien eingesetzt, aber heutzutage ist auch eine Therapie bei Autoimmunerkrankungen wie der systemischen Sklerose möglich. Weltweit haben ca. 650 Menschen mit schweren Autoimmunerkrankungen eine autologe hämatopoetische Stammzelltransplantation erhalten, davon mehr als 100 Patienten mit systemischer Sklerose. Ungefähr 70% der Patienten reagierten mit einer signifikanten Stabilisierung der Organfunktion, ca. 1/3 der Patienten erfuhr eine dauerhafte Remission, 8,5% der Patienten verstarben an dieser Behandlung ⁶¹.

1.1.6.2 Aktuelle Therapien mit Nabelschnur-Stammzellen

Stammzellen aus dem Nabelschnurblut wurden und werden bei Krebspatienten als Alternative zur Knochenmarksspende benutzt. Sie vermitteln den Aufbau des Immun- und Blutsystems nach kompletter Zerstörung des Knochenmarkes, etwa nach Chemotherapie und bei angeborenen Erkrankungen des blutbildenden Systems. Die Behandlungserfolge mit Nabelschnurblut sind denen von Knochenmarkstransplantationen vergleichbar oder besser. Weltweit wurden bisher bereits mehr als 3.500 Transplantationen mit Nabelschnurblut-Stammzellen durchgeführt (überwiegend als Fremdspende) und die Tendenz ist stark steigend ².

⁶². Neben Kindern werden zunehmend auch Erwachsene transplantiert. Für pädiatrische Patienten bietet die Transplantation von Blutstammzellen aus dem Nabelschnurblut seit einiger Zeit eine Alternative. 1988 führten E. Gluckman et al.²⁹ die erste erfolgreiche UCBT (*Umbilical Cord Blood Transplantation*) bei einem 6-jährigen Jungen mit Fanconi-Anämie durch. Körpereigenes *autologes* Nabelschnurblut hat den Vorteil, daß Abstoßungsreaktionen vollständig entfallen und ein rascher Wiederaufbau des Immunsystems möglich ist. 1995 und 2002 wurde bei 20 Kindern mit Hurlers Syndrom aber auch eine *allogene* Nabelschnurblut-Transfusion durchgeführt. Keines dieser Kinder erkrankte an der gefürchteten Transplantat-gegen-Empfänger-Abstoßung, der *graft versus host disease*. 17 der 20 Kinder überlebten mehr als 905 Tage nach der Transplantation, wobei die Symptome des Hurlers Syndroms vermindert wurden ²⁸. Nabelschnurblut-Transfusionen stellen demnach eine gute Alternative zur Knochenmarkstransplantation dar.

Doch nicht nur das Blut bildende System kann durch Nabelschnurblut-Transfusion rekonstituiert werden. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, daß nach einem Schlaganfall verabreichte CD34-positive Nabelschnurblut-Stammzellen zur Erneuerung kortikalen Gewebes durch Neurogenese und Angiogenese beitragen ⁶³.

1.1.6.3 Aktuelle Therapien mit mesenchymalen Stammzellen

Da die multipotenten MSC unter relativ geringem Aufwand aus Knochenmark zu isolieren sind, gibt es viele Ansätze für eine therapeutische Anwendung mit autologem Material ⁶⁴. Als Vorläufer mesenchymalen Gewebes lassen sich vor allem Therapiemöglichkeiten im Bereich der *Osteogenesis imperfecta* (bedingt durch eine genetische Störung, die die Proteinkette des Kollagens vom Typ I betrifft), Osteoporose, Osteoarthritis, Meniscektomie und Muskeldystrophie vorstellen. Erste Therapieansätze bei Kindern mit *Osteogenesis imperfecta* führen zu histologischen Veränderungen im Trabekularknochen, welche auf verbesserte Knochendichte hinweisen ^{40, 65}.

Des Weiteren kann für Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen ein tumorfreies, nicht hämatologisches, autologes Transplantat aus MSC gewonnen werden; bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie wurde bereits gezeigt, daß die MSC frei von Leukämie-typischen genetischen Veränderungen sind und somit ideale Quellen für die Differenzierung in hämatopoetische Vorläuferzellen darstellen. Die Differenzierung in diese Zellen ist bis jetzt allerdings noch nicht

gelingen ⁶⁶. Intravenös verabreichte MSC werden in einer Konzentration von 50×10^6 Zellen pro Patient gut toleriert und als sicher angesehen.

Ein Versuch an der Case Western University mit Brustkrebs-Patientinnen wurde mit hämatopoetischen Stammzellen und 10^6 mesenchymalen Stammzellen pro Kilogramm Körpergewicht durchgeführt. Im Tierversuch konnte nachgewiesen werden, daß humane MSC, welche direkt ins Gehirn von Ratten injiziert wurden (xenogene Transplantation), zu Gliazellen ausdifferenzierten. Der homologe Versuch, in dem murine MSC in das Gehirn von Mäusen injiziert wurden, führte zum selben Ergebnis ⁶⁷. Knochendefekte und Knorpeldefekte konnten im Tierversuch mit MSC in Kombination mit Füllmaterial (*scaffold*) regeneriert werden ^{68, 69}. Im Jahre 2003 injizierte Letizia Mazzini sieben Patienten mit amyotrophischer Lateralsklerose (ALS) MSC in das Rückenmark ⁷⁰. Im Tierversuch konnte mehrfach gezeigt werden, daß nach einem Herzinfarkt intravenös verabreichte MSC im Herz Angiogenese und Myogenese induzieren und so zu einer verbesserten Herzfunktion führen ^{71, 72}. Bereits im August 2001 wurden sechs Herzinfarkt-Patienten mit autologen MSC behandelt. Die Stammzellen wurden in der Düsseldorfer Uniklinik für Kardiologie in eine Arterie gespritzt und wurden so zum betroffenen Herzmuskel transportiert. Den Patienten ging es kurze Zeit später nach eigenen Angaben besser. Es kann jedoch nicht bewiesen werden, daß die Stammzellen tatsächlich in Kardiomyozyten differenzierten.

Bei allen Therapieversuchen blieb letztlich unklar, ob die injizierten Zellen tatsächlich in den Zelltyp der Zielgewebe differenzierten (Transdifferenzierung), ob sie erfolgreich in das umgebende Gewebe integrierten und ob sie funktionell waren. Die humanen Studien mit MSC enthielten keine Negativ-Kontrollen. Daher ist unklar, ob die beobachteten Verbesserungen der klinischen Situation tatsächlich auf die injizierten MSC oder auf adjuvante immunologische bzw. auf Placebo-Effekte zurückzuführen sind. In Tierversuchen mussten die euphorischen Erstberichte über frappierende Fähigkeiten implantierter MSC, Organregeneration zu steuern, revidiert werden, nachdem teilweise haarsträubende methodische Unzulänglichkeiten bekannt wurden. Ein Teil der implantierten und angeblich "transdifferenzierten" Zellen war in den Zielgeweben nachweisbar, weil sie entweder mit Wirtszellen verschmolzen (Zellfusion) oder von gewebsständigen Phagozyten aufgefressen worden waren (Phagozytose). Die Latte für nachfolgende experimentelle Untersuchungen liegt nun deutlich höher, und die bekannt gewordenen falsch

positiven Ergebnisse müssen durch aufwändige Versuchsplanung und – durchführung ausgeschlossen werden. Heute sieht man in der unspezifischen Stimulation des Immunsystems die Hauptursache für die klinisch günstige Wirkung von MSC-Transplantaten nach Herzinfarkt. Das ist weit entfernt von der ursprünglichen Hoffnung auf "Organerneuerung durch Zellinjektion" und kommt der seit vielen Jahrzehnten bekannten "Frischzell-Therapie" bedenklich nahe. Gleichzeitig erwächst neue Hoffnung aus tierexperimentellen Untersuchungen mit sogenannten *unrestricted somatic stem cells* (USSC) aus Nabelschnurblut, die nach Transplantation in fötale Schafe in vielen Geweben eindeutig nachweisbar und in das Wirtsgewebe integriert waren ²⁷.

Alles in allem steht nach Meinung von Experten die "Regenerative Medizin", die nicht ausschließlich, aber wesentlich auf den neuesten Erkenntnissen der (Stamm-) Zellbiologie aufbaut, erst am Anfang ihrer Entwicklung. Auf diese Erkenntnis geht in Deutschland die Ausschreibung eines DFG-Forschungszentrums zum Thema "Regenerative Therapien" zurück, um dessen Einrichtung sich auch die RWTH Aachen gemeinsam mit Partnern der Universitäten Bonn, Köln und Düsseldorf beworben hat.

1.1.7 Immunmodulatorische Fähigkeiten von mesenchymalen Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen besitzen nachweislich immunmodulatorische Fähigkeiten, wobei das Wirkprinzip noch nicht geklärt ist. Fest steht, daß beispielsweise Transplantate eine geringere Abstoßungsreaktion hervorrufen, wenn zeitgleich mit der Transplantation mesenchymale Stammzellen intravenös verabreicht werden ⁷³. Mesenchymale Stammzellen exprimieren MHC Klasse 1, aber nicht MHC Klasse 2, CD40, CD80 und CD86. Dieser Phänotyp wird als nicht immunogen bezeichnet und läßt darauf schließen, daß mesenchymale Stammzellen die Immuntoleranz stärken ⁷⁴. T-Zellen können durch Kokultur mit mesenchymalen Stammzellen stimuliert werden, was auf die unabhängigen MHC-Expressionen der beiden Zelltypen zurückzuführen ist ^{75, 76}. Außerdem inhibieren MSC die Produktion von zytotoxischen Lymphozyten *in vitro* und sind selbst resistent gegen zytotoxische Lymphozyten und natürliche Killerzellen ⁷⁷. Die Expression von Toll-like-Rezeptoren, welche neben Immunglobulinen und den T-Zellrezeptoren als wichtige Immunrezeptoren bekannt sind, könnte ein Hinweis darauf sein, worauf die

immunmodulatorischen Fähigkeiten mesenchymaler Stammzellen beruhen. Deshalb werden diese Rezeptoren im Folgenden beschrieben.

1.1.8 Toll-like-Rezeptoren

Bei den Toll-like-Rezeptoren (TLR) handelt es sich um hoch konservierte Strukturen im Genom aller Eukaryonten, welche zunächst bei *Drosophila* entdeckt und beschrieben wurden. Dort spielt der Toll-Rezeptor eine Rolle in der Ontogenese, genauer in der Entwicklung der ventrodorsalen Achse. Im humanen System erkennen die 10 Mitglieder der Toll-like-Rezeptor (TLR) Familie mikrobielle Strukturen⁷⁸, Protozoen⁷⁹ oder virale doppelsträngige RNA⁸⁰ und gehören so zum System der angeborenen Immunität. Zusätzlich spielen sie eine Rolle in der adaptiven Immunität, indem einige Mitglieder eine Immunantwort auf eine mikrobielle Infektion hin induzieren können. Alle TLR aktivieren den MyD88- und somit auch den NF κ B-Signaltransduktionsweg, welcher in Inflammationsantworten, durch die verstärkte Expression von TNF- α , IL-1 und IL-6 von großer Bedeutung ist⁸¹. Die TLR besitzen intrazellulär eine Toll/Interleukin Rezeptor Domäne (TIR), die für die Homo- und Heterodimerisierung der TLR verantwortlich ist. Alle TLR nutzen ein Adapterprotein (MyD88), das sowohl eine TIR- als auch eine *death*-Domäne besitzt. Nach Bindung an einen Toll-like-Rezeptor bindet MyD88 durch homophilen *death*-Domäne-*death*-Domäne-Kontakt an Mitglieder der IL-1-Rezeptor assoziierten Kinasen (IRAK), welche wiederum mittels Phosphorylierung den Tumornekrosefaktor (TNF) Rezeptor-assoziierten-Faktor 6 (TRAF6) aktivieren. TRAF6 wiederum aktiviert die *Transforming-growth-factor- β* aktivierte Kinase TAK-1, welche zu den MAP Kinase Kinase Kinasen gehört. TAK-1 phosphoryliert daraufhin I κ B, welches sich dann von NF κ B löst und somit diesen Transkriptionsfaktor aktiviert. Dies führt zu einer Expression von TNF- α , IL-1 und IL-6. Neben diesem Signaltransduktionsweg, welcher von allen TLR aktiviert werden kann, können die einzelnen TLR verschiedene andere Signaltransduktionswege anschalten⁸².

Besonders gut ist der Toll-like-Rezeptor 4 untersucht, welcher mit Hilfe seines Korezeptors CD14 bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) bindet⁸³ und so eine Immunantwort auslöst. LPS ist ein Membranbestandteil von gramnegativen Bakterien und verursacht Fieber, inadäquate Gewebepfusionen und Sepsis⁸⁴. Es bindet an LBP, das Lipopolysaccharidbindeprotein, und dieser Komplex bindet wiederum an

CD14, welches zusammen mit TLR-4 den oben beschriebenen Signaltransduktionsweg auslöst ⁸⁵.

Das Vorhandensein von TLR-4 bei hMSC könnte somit ein Grund für die immunmodulatorischen Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen sein und eine Abstoßungsreaktion von Transplantaten geringer ausfallen oder die gefürchtete *graft-versus-host* Erkrankung ausbleiben lassen. Von entscheidender Bedeutung für die Integration von mit Stammzellen besiedelten Trägermaterialien (*Tissue Engineering*) ist die Geweberegeneration bzw. Wundheilung.

1.2 *Tissue Engineering*

Der Begriff *Tissue Engineering* (TE) wurde 1987 von der US-amerikanischen *National Science Foundation* (NSF) in Washington, DC, wie folgt definiert: "*Tissue Engineering* ist die Anwendung der Prinzipien und Methoden der Ingenieur- und Lebenswissenschaften für das grundlegende Verständnis der Wechselwirkung von Struktur und Funktion normalen und kranken Gewebes, sowie zur Entwicklung von biologischem Gewebe-Ersatz zur Rekonstruktion, dem Erhalt oder der Verbesserung der Gewebefunktionen".

Ziel des *Tissue Engineerings* ist es somit, die zum Erliegen gekommenen körpereigenen Regenerationsvorgänge zu aktivieren und wenn nötig, durch Gewebeimplantate zu ersetzen. Das Spektrum des *Tissue Engineerings* umfaßt alle im Körper befindlichen Gewebearten. Ab einer Dicke von 1 mm kann das artifizielle Gewebe nicht mehr durch Diffusion versorgt werden, sondern ist auf eine Gefäßversorgung angewiesen ⁸⁶. Häufig werden Zellen nicht frei, sondern nach Besiedlung fester Unterlagen (*scaffold*) transplantiert.

Besonders geeignete Materialien können auch zellfrei implantiert werden. Als Beispiel seien hier künstliche Hüftgelenke, Zahnprothesen und der Hautersatz genannt. Die Materialien sollten möglichst biokompatibel sein, also keine Abstoßungsreaktion hervorrufen und, in manchen Fällen, wie beim Weichgewebeersatz, degradierbar sein. Bei der Degradation sollten evtl. auftretende Abbauprodukte keine Entzündung hervorrufen.

Die Kombination von biokompatiblen, degradierbarem Material mit autologen Stammzellen, welche in die Zellen differenzieren, die im Transplantatbereich benötigt werden, stellt somit einen Idealfall des *Tissue Engineerings* dar. In jüngster Zeit kommen sogenannte Formgedächtnispolymere zum Einsatz, welche biokompatibel

und in einer definierten Zeitspanne degradierbar sind. Aufgrund ihres Formgedächtniseffektes bieten sie zusätzliche Möglichkeiten im Bereich der Mikrochirurgie, da sie von einer temporären, sehr komprimierten Form in eine permanente Form von größerem Volumen wechseln können.

1.2.1 Formgedächtnispolymere

Neben etablierten Biomaterialien werden ständig neue Materialien mit optimierten Eigenschaften entwickelt. Dazu gehört eine neue Generation von Materialien mit *shape memory effect*. Diese Formgedächtnispolymere zeichnen sich dadurch aus, daß sie durch einen externen Stimulus (wie z. B. Temperaturänderung) aus ihrer temporären Form in ihre ursprüngliche (permanente) Form wechseln können. Der Programmiervorgang (Deformation und Fixierung der temporären Form) und das Wiederherstellen der ursprünglichen Form nach einem bestimmten externen Stimulus ist reversibel und kann mehrmals wiederholt werden. Die Firma mnemoScience hat eine Reihe solcher Materialien unterschiedlicher Zusammensetzung hergestellt. Alle Materialien enthalten ein sog. Hartsegment und ein Weichsegment (Schaltsegment). Durch Kombination verschiedener Substanzen, wie beispielsweise L,L-Dilaktid, Diglykolid, ρ -Dioxanon, ϵ -Caprolakton und γ -Butyrolakton kann ein breites Eigenschaftsspektrum eingestellt werden. Die permanente Form ergibt sich durch das Aufschmelzen oberhalb der Temperatur des Hartsegmentes und anschließendes Abkühlen unterhalb der Temperatur des Hartsegmentes, aber oberhalb der Übergangstemperatur des Weichsegmentes. Das Polymer wird so in seine temporäre Form gebracht (Deformation), die durch Abkühlen unterhalb der Übergangstemperatur des Weichsegmentes fixiert werden kann. Der Programmiervorgang wird also folgendermaßen durchgeführt: wenn die Temperatur höher als die Übergangstemperatur des Schaltsegmentes liegt, ist das Polymer flexibel und kann deformiert werden. Diese temporäre Form wird durch das Abkühlen unterhalb der Übergangstemperatur fixiert. Bei erneuter Erwärmung stellt sich die permanente (ursprüngliche) Form wieder her.

In dieser Arbeit werden Formgedächtnispolymere verschiedener Zusammensetzung verwendet.

1.2.2 Funktionelle Kompatibilität und zelluläre Gewebekompatibilität

Für die Biokompatibilität eines Materials, welches im *Tissue Engineering* Einsatz findet, gibt es bisher keine präzisen Definitionen oder Meßmethoden. Meistens wird die Biokompatibilität anhand der Leistung und des (Langzeit-)Erfolgs des implantierten Materials in Bezug auf dessen Funktion oder Anwendung gemessen. Ein und dasselbe Material kann in unterschiedlichen Geweben als biokompatibel oder nicht biokompatibel bewertet werden ⁸⁷. Die Gewebereaktion ist vom Materialtyp, vom Ort der Applikation, von der Zeit, die das Material im Körper verbleibt und vom Alter und allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten abhängig. Folglich kann die Biokompatibilität eines Materials als sein Verhalten in Wechselwirkung mit seiner Umgebung angesehen werden. Es gibt drei Möglichkeiten, die Biokompatibilität eines Materials zu ermitteln und insgesamt sind alle drei Tests nötig, um eine abschließende Aussage über die Biokompatibilität eines Materials machen zu können:

- a) die Anwendung im Menschen. Klinische Untersuchungen haben den enormen Vorteil, daß sie genaue und für die Klinik relevante Ergebnisse liefern. Andererseits sind diese Tests jedoch teuer, zeitaufwändig und erst zu einem weit fortgeschrittenen Stadium des Materials zu verantworten.
- b) Tierversuche (*in vivo*). Diese haben den Vorteil, daß in einem intakten biologischen System gearbeitet wird. Die Ergebnisse sind jedoch nicht immer auf den Patienten übertragbar. Außerdem sind Tierversuche an relevanten Großtieren teuer und zum Teil ethisch umstritten. Bei Versuchen mit Kleinnagern (Mäusen) können durch Wahl geeigneter Stämme molekulare Mechanismen der Biokompatibilität erforscht werden.
- c) *ex vivo* bzw. *in-vitro* Versuche. Dabei werden die Materialien außerhalb des tierischen oder menschlichen Organismus in Kontakt mit *in vitro* kultivierten Zellen untersucht. Diese Tests haben den Nachteil, daß die Ergebnisse nicht immer auf den Patienten übertragbar sind. Sie sind jedoch schnell und reproduzierbar durchführbar und können zur Klärung der Wirkungsmechanismen, die einer Wechselwirkung zwischen Material und Gewebe zugrunde liegen, beitragen. Zellkulturversuche stellen meistens die erste Stufe bei der Charakterisierung der Biokompatibilität eines Materials dar.

In der vorliegenden Arbeit wird zur Bestimmung von Zytotoxizität bzw. Biokompatibilität eines Materials eine Maus L929-Fibroblastenzelllinie eingesetzt. Die

Fibroblasten stammen aus einer männlichen C3H/An Maus. Normalparameter wie Morphologie und Mitoseaktivität sind bekannt. Diese Zelllinie wird routinemäßig nach ISO 10993-5 für Zytotoxizitätstests eingesetzt, welche sich durch reproduzierbare Ergebnisse auszeichnen. Die Versuche zur Bestimmung der Parameter Morphologie und Vitalität werden sowohl im direkten Materialkontakt, als auch im indirekten Kontakt mit Extraktionsüberständen der Materialien durchgeführt. Der indirekte Test dient dem Nachweis von zytotoxischen Substanzen, welche aus dem Material diffundieren könnten.

1.2.3 Degradation

Neben den Materialien, welche für einen definierten Zeitraum unverändert im menschlichen Körper ihre Funktion ausüben sollen (z. B. Hüftgelenke), gibt es solche, welche mit der Zeit abgebaut werden sollen, möglichst ohne toxische Abbauprodukte zu erzeugen. In diesem Fall dient das Material nur als vorübergehender Träger (*scaffold*), um die darauf bzw. darin enthaltenen Zellen an einem definierten Ort zu platzieren. Abbaubare/degradierbare Materialien müssen Bindungen enthalten, welche unter physiologischen Bedingungen gespalten werden können. Der Abbau kann enzymatisch oder hydrolytisch erfolgen. Im optimalen Fall findet ein linearer Masseverlust mit gleichzeitigem Molekulargewichtsabbau statt. Bei den vielfach verwendeten Polylaktiden findet im Inneren von Formkörpern zunächst ein Molekulargewichtsabbau zu Milchsäuremonomeren und anschließend erst „Masseverlust“ durch Materialbruch statt und so entsteht, resultierend aus den sauren Abbauprodukten, ein starker Entzündungsreiz. Dadurch wird der wichtige Wundheilungsprozeß, der bei jeder Art von Gewebeersatz zur vollständigen Geweberegeneration nötig ist, behindert bzw. verlängert.

1.3 Wundheilung

1.3.1 Definitionen und Einteilungen

Unter einer Wunde versteht man eine Unterbrechung des Zusammenhangs von Körpergeweben mit oder ohne Substanzverlust, die durch mechanische Verletzung oder physikalisch bedingte Zellschädigung verursacht wird.

Man unterscheidet vier Entstehungsarten von Wunden ⁸⁸:

1. mechanische Wunden durch äußere Gewalteinwirkung
2. thermische Wunden durch Einwirken von Hitze oder Kälte

3. chemische Wunden durch Verätzung mit Säuren oder Laugen
4. strahlenbedingte Wunden durch Einwirkung aktinischer und ionisierender Strahlen

Die Einteilung einer Wunde kann auch anhand der Form erfolgen ⁸⁹:

1. offene Wunden mit begrenzter Zerstörung der Hautoberfläche (Schürfwunde)
2. offene Wunden mit gesamter Hautdurchtrennung (Perforation)
3. tiefe offene Wunden mit Beteiligung von Knochen und Organen
4. innere Wunden ohne offenen Hautdefekt

Sofort nach Eintritt der Verwundung beginnt die Wundheilung. Darunter versteht man den Verschußprozeß nach einer Gewebeschädigung durch Epithelregeneration. Dieser Vorgang wird mit der Vernarbung des Stützgewebes abgeschlossen. Man unterscheidet 3 Arten der Wundheilung: die primäre (*per primam intentionem*) Wundheilung, die Wundheilung unter dem Schorf und die sekundäre (*per secundam intentionem*) Wundheilung. Unter der primären Wundheilung versteht man eine Wundheilung ohne Verzögerung oder Komplikation. Hierbei müssen die Wundränder aneinander gefügt werden, so daß ein fester Wundverschuß gebildet werden kann. Dies trifft vor allem auf die chirurgisch mit Adaptationsnähten versorgten Wunden zu. Bei kleineren Hautdefekten wird die Wunde durch fibrinreichen Schorf abgedeckt, welcher die Austrocknung und weitere Infektion der Wunde verhindert. Es findet eine Reepithelialisierung statt, nach der sich der Wundschorf ablöst. Bei großen und/oder infizierten Wunden muß die Wunde offen mit Verbänden und Medikamenten versorgt werden. Ausgehend von Wundrand und Wundgrund bildet sich zunächst Granulationsgewebe, welches im weiteren Verlauf durch Narbengewebe ersetzt wird. Dieser Prozeß wird als sekundäre Wundheilung bezeichnet ⁹⁰.

Man unterscheidet vier Phasen der Wundheilung:

1. exsudative Phase
 2. resorptive Phase
 3. proliferative Phase
 4. reparative Phase
- } inflammatorische Phase

Je nach Art der Verletzung dauern diese Phasen unterschiedlich lang.

In der exsudativen Phase füllt sich die frische Wunde mit Wundsekret, bestehend aus Blut und Lymphe, welche aus verletzten Gefäßen und Gewebsspalten einfließen. Durch die Gerinnung des im Wundsekret enthaltenen Fibrinogens im

thrombokinasereichen Milieu, entsteht der sogenannte Wundschorf. In der daraufhin eintretenden resorptiven Phase wandern neutrophile Granulozyten in das Wundgebiet ein, welche die dort vorhandenen Erreger phagozytieren bzw. abtöten. Das Einwandern der neutrophilen Granulozyten hat das Einwandern von Monozyten und Lymphozyten zur Folge, welche auch Bakterien und Gewebereste phagozytieren können. Eine Aktivierung von Proteasen und die Exsudation von Plasma sind der Nährboden für das Einwandern von Fibroblasten. Die inflammatorische Phase ist damit beendet und die Wundheilung geht in die Phase der Proliferation über, welche sich durch die Bildung von Granulationsgewebe auszeichnet. Die nun ortsständigen Fibroblasten beginnen zu proliferieren. Durch diese Tätigkeit entsteht im Wundgebiet ein Sauerstoffmangel, der mit dem Auftreten von durch die Fibroblasten sezernierten Wachstumsfaktoren die Einsprossung von Kapillaren aus der näheren Umgebung zur Folge hat (Angiogenese). Außerdem differenziert ein Teil der Fibroblasten, durch das in dieser Phase der Wundheilung vorhandene TGF- β stimuliert, zu Myofibroblasten und es kommt zur Wundkontraktion. Dabei nähern sich die Wundränder einander an, so daß der erste provisorische Wundverschluß durch ein Fibrinkoagel nun auch räumlich geschlossen wird. Ist der Defekt durch Granulationsgewebe aufgefüllt, wird durch Fasersynthese und Bindegewebsneubildung das Narbengewebe gebildet, welches dem ehemaligen Defektgebiet die nötige mechanische Stabilität verleiht ⁹⁰.

In der Literatur wird die Beteiligung von Stammzellen in der Wundheilung schon lange diskutiert, allerdings gibt es bis heute dafür keine wissenschaftlich erwiesene Bestätigung. Außerdem stellt sich die Frage, ob und wie die Stammzellen in das bei der Wundheilung entstehende Fibrinkoagel einwandern können, oder ob dieses eine unüberwindbare Barriere darstellt und die Stammzellen nicht in das Zentrum der Wunde vordringen können. Um aktiv an der Geweberegeneration teilnehmen zu können, müßten die Stammzellen fibrinolytische Fähigkeiten besitzen und so das dichte Fibrinnetz auflösen können.

1.3.2 Gerinnungskaskade/Fibrinolyse

Bei der Fibrinolyse handelt es sich um die enzymatisch-proteolytische Auflösung von Fibringerinnseln im Organismus. Sie dient der Aufrechterhaltung des dynamisch-hämostatischen Gleichgewichts durch Neutralisierung der kontinuierlich ablaufenden Blutgerinnung und der Entfernung des Fibrins aus dem zur Blutstillung gebildeten Thrombus (Thrombolyse ⁸⁸).

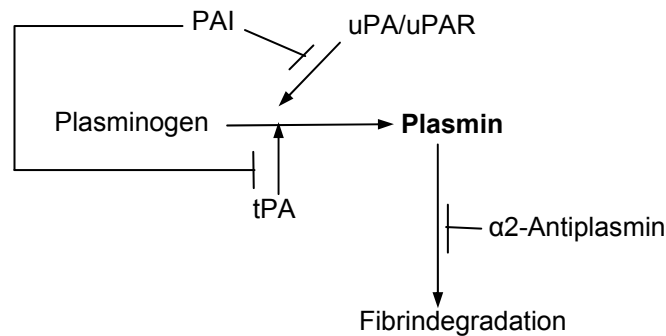


Abbildung 4: Schematische Darstellung der fibrinolytischen Kaskade

Wie in der schematischen Abbildung 4 dargestellt, wird durch die Aktivierung der Serinprotease Plasminogen, welche im Blut in ausreichender Menge vorhanden ist, der Abbau von Fibrin ermöglicht. Die Aktivierung wird durch proteolytische Spaltung mit Hilfe der Serinproteasen tPA (*tissue*-Plasminogen-Aktivator) und uPA (*urokinase*-Plasminogen-Aktivator) hervorgerufen⁹¹. TPA aktiviert Plasminogen hauptsächlich um Fibrin in Blutgerinnseln aufzulösen. UPA hingegen aktiviert Plasminogen zur Aktivierung von Matrixmetalloproteinase und kann so die Migration von Zellen erleichtern⁹², wie es für das metastatische System von Tumoren beschrieben ist⁹³. Die Aktivität von uPA wird durch Bindung an einen spezifischen Rezeptor verstärkt, so daß die Fibrinolyse in direkter Zellumgebung stattfindet, während das sezernierte tPA auch noch getrennt von Zellen zur Fibrindegradation führt. Die Proteasen uPA und tPA können durch Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAI) inhibiert werden⁹⁴. Auch das Plasmin selbst kann durch $\alpha 2$ -Antiplasmin an der Degradation des Fibrins gehindert werden⁹⁵. Der uPA-Rezeptor (uPAR) besitzt, wie auch PAI, eine Vitronektin-Bindungsstelle. Vitronektin ist eine Extrazellulärmatrix-Komponente. Die beiden Proteine konkurrieren somit um diese Bindungsstelle und beeinflussen so aktiv das Ablösen und Anheften von Zellen, welche den uPA-Rezeptor exprimieren⁹⁶. Bindet PAI an Vitronektin, so kann sich die Zelle ablösen und wandern, bindet der uPAR an Vitronektin verbleibt die Zellen an ihrem Ort. Plasmin und uPA können außerdem durch Abspaltung von Propeptiden aus latenten Matrixmetalloproteinasen (MMPs) aktive Matrixmetalloproteinasen generieren, welche am Abbau von Extrazellulärmatrix beteiligt sind. Dieser Vorgang kann wiederum durch sogenannte TIMP (*tissue inhibitor of metalloproteinases*) inhibiert werden⁹⁷. Die Gerinnungskaskade ist somit ein komplexer Mechanismus, der zum Abbau von

Fibrin und Extrazellulärmatrix führt und außerdem Angiogenese und Zellmigration auslösen kann⁹³.

Wenn Stammzellen an der Wundheilung beteiligt sein sollten, müssen sie tief in den Gewebedefekt eindringen können, bevor sie proliferieren und differenzieren. Die Sezernierung von Serinproteasen wie tPA und uPA und die Expression des uPAR wären hierfür unerlässlich. Die Expression dieser Komponenten der Blutgerinnung und/oder Fibrinolyse ist jedoch in Stammzellen bisher nicht beschrieben.

1.4 Ziele der Arbeit

Die Verwendung von mesenchymalen Stammzellen in der Geweberegeneration und im *Tissue Engineering* ist wünschenswert und realistisch. Der Einsatz von PGLA-Schäumen im Knochen- und von Kollagenschwämmen im Knorpelersatz sind bereits klinisch erprobt. Die Kombination mesenchymaler Stammzellen mit neuartigen sogenannten „intelligenten“ Biomaterialien ist neu und unerprobt. Jede einzelne Komponente braucht umfangreiche Kenntnis über die zellbiologischen und materialtechnischen Grundlagen. Die Kombination beider Komponenten wirft neue Fragen über Zelldifferenzierung, Zellmigration, Stoffwechselleistung und Materialstabilität, also über die gegenseitige Beeinflussung der Komponenten auf. Viele Fragen sind an Einzelkomponenten weder studierbar, noch vorhersehbar, sondern treten erst nach Kombination von Zellen und Material auf. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Kombination exemplarisch untersucht. Zum Einsatz kamen mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks und neuartige „intelligente“ Biomaterialien aus Formgedächtnispolymeren (*shape memory polymers*). Folgende Einzelziele wurden im Hinblick auf die Bedeutung der Stammzellen in der Geweberegeneration im Allgemeinen und ihren möglichen Einsatz mit Formgedächtnispolymeren im *Tissue Engineering* im Speziellen formuliert:

1. Stammzellen müssen nach einer Verletzung Signale erhalten, welche dazu führen, daß sie ihre Nische verlassen, im Blutkreislauf zirkulieren, dann adhären, in das betreffende Gewebe migrieren, dort proliferieren und schließlich differenzieren. Läßt sich ein Rekrutierungsfaktor identifizieren, der mesenchymale Stammzellen aus ihrer Nische lockt und zum Gewebedefekt leitet?
2. Zu Beginn der Wundheilung wird ein dichtes Fibrinnetz gebildet, das eine natürliche Barriere zur Verhinderung von Infektionen darstellt. Besitzen

mesenchymale Stammzellen fibrinolytische Fähigkeiten, die den Stammzellen das Eindringen tief in ein Wundgebiet erleichtern würden?

3. Behalten mesenchymale Stammzellen ihre multipotenten Eigenschaften, wenn sie auf ein biokompatibles Formgedächtnispolymer gebracht werden, oder kommt es zu einer spontanen Differenzierung?
4. Transplantate werden nachweislich weniger abgestoßen, wenn sie zusammen mit mesenchymalen Stammzellen in den Körper eingebracht werden. Was ruft diese immunmodulatorischen Fähigkeiten mesenchymaler Stammzellen hervor?

Um diese Fragen zu beantworten sollten mesenchymale Stammzellen zunächst durch Expressionsanalyse mit DNA-Microarrays charakterisiert und ihre multipotenten Eigenschaften durch gezielte Differenzierungen überprüft werden.

Als möglicher Rekrutierungsfaktor mesenchymaler Stammzellen sollte der Hepatozytenwachstumsfaktor untersucht werden, welcher mito- und motogene Effekte auf verschiedene Zelltypen ausübt und außerdem in Wunden in erhöhter Konzentration vorliegt.

Die eventuell vorhandenen fibrinolytischen Fähigkeiten sollten über die Expression spezifischer Enzyme der fibrinolytischen Kaskade nachgewiesen werden.

Intelligente Biomaterialien aus Formgedächtnispolymeren unterschiedlicher Zusammensetzung sollten auf Zellkompatibilität geprüft werden und auf den Polymeren, welche als bioverträglich eingestuft werden, sollen mesenchymale Stammzellen in Adipozyten und Osteoblasten differenziert werden.

Zur Untersuchung der immunmodulatorischen Fähigkeiten sollte überprüft werden, ob mesenchymale Stammzellen den Toll-like-Rezeptor 4 exprimieren.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Antikörper

2.1.1.1 Primärantikörper

anti-c-met, polyklonal, aus Kanninchen

Santa Cruz Biotechnology

Blockingpeptid gegen anti-c-met AK

Santa Cruz Biotechnology

anti-CD4, 14, 34, 49a, 49c, 49d

DAKO, Dänemark

anti-CD51, 54, 73, 105, 117

DAKO, Dänemark

(alle monoklonal, aus Maus)

2.1.1.2 Sekundärantikörper

AP-konjugiert, anti-Kanninchen

Roche, Mannheim

FITC-gekoppeltes Streptavidin

DAKO, Dänemark

FITC-gekoppelt, anti-Maus

DAKO, Dänemark

2.1.2 ELISA

HGF-ELISA

R&D Systems, Minneapolis

uPA-ELISA

american diagnostica, Greenwich, US

uPAR-ELISA

american diagnostica, Greenwich, US

tPA-ELISA

american diagnostica, Greenwich, US

TNF- α -ELISA (QunatiGlo)

R&D Systems, Minneapolis

2.1.3 Gebrauchsschemikalien

Acrylamid

Roth, Karlsruhe

Agarose „SeaKem LE agarose“

BioProducts, Maine, USA

Alizarin-Rot

Sigma, Steinheim

Amido Black 10 B

Sigma, Steinheim

APS

Serva, Heidelberg

BCIP/NBT-Tabletten

Sigma, Steinheim

Bromphenolblau

Serva, Heidelberg

BSA, 35%

Sigma, Steinheim

CaCl₂

Merck, Darmstadt

CASYTON

Schärfe System, Reutlingen

DMSO

Merck, Darmstadt

DTT	amersham Biosciences, UK, England
EDTA	Sigma, Steinheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
FDA	Sigma, Steinheim
Formaldehydlösung	Merck, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Hämacolor-Schnellfärbung	Merck, Darmstadt
Hämalaun	Sigma, Steinheim
IGEPAL (NP-40)	Sigma, Steinheim
<i>Insect Cell Lysis Buffer</i>	Pharmingen Intern., Hamburg
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ 1M	Sigma, Steinheim
Mountain-Medium	Sigma, Steinheim
Natriumazid	Sigma, Steinheim
<i>Oil red O</i>	Sigma, Steinheim
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS	GIBCO BRL, Schottland
Propidiumiodid	Sigma, Steinheim
SDS	Gibco BRL, Schottland
Stammzelltrypsin	CellSystems, St. Katharinen
Sudanschwarz	Sigma, Steinheim
TEMED	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim
Tris	Merck, Darmstadt
Tris-HCL	Merck, Darmstadt
Tris-NaOH	Merck, Darmstadt
Triton-X-100	Sigma, Steinheim
Trypsin/EDTA	CellSystems, St. Katharinen
VitroClud	Langenbrinck, Emmendingen

2.1.4 **Gebrauchslösungen**

Alizarin rot-Lösung

40 mM Alizarin rot in Aqua dest.

pH 4,1

Oil red O-Lösung

35 ml 0,2% (w/v) *Oil red O* in 100% Methanol

10 ml 1 N NaOH

Sudanschwarz-Lösung

0,1 g Sudanschwarz in 100 ml 70% Ethanol

2 Minuten aufkochen lassen

nach dem Abkühlen filtrieren

2.1.5 **Geräte**

Biofuge pico, Rotor #3325

Boyden-Kammern

Brutschrank (20% O₂, 5% CO₂, 37°C)

CASY 1

Digital Graphic Printer UP-D890

Eppendorfcentrifuge 5415C (Rotor: UE001)

FACSCalibur

Gel-Dokumentationseinheit

Gel-Kammer

LightCycler

Luminometer (MicroBeta TriLux)

Megafuge 1.0 (Rotor: BS4402/A)

Phasenkontrastmikroskop Axiovert 25

pH-Elektrode

Photometer

Power Supply

Reinraumwerkbank Hera Safe

Schüttler MTS4

SpectraMax 340

Heraeus / Kendro, Düsseldorf

NeuroProbe, Gaithersburg, UK

Heraeus / Kendro, Düsseldorf

Schärfe System, Reutlingen

Sony, Köln

Eppendorf, Köln

Becton Dickinson, Heidelberg

MWG Biotech AG, Ebersberg

Serva, Heidelberg

Roche, Mannheim

Perkin Elmer Wallac, Freiburg

Heraeus / Kendro, Düsseldorf

Zeiss, Jena

Knick, Reutlingen

Eppendorf, Köln

Gibco BRL, Schottland

Heraeus / Kendro, Düsseldorf

IKA-Werke, Staufen

Molecular Devices, München

Thermoblock DRI-BlockDB-2A	Techne, Burkhardtsdorf
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Tropfenkonturanalyse System DSA10	Krüss, Hamburg
Ultraschallgerät	B. Braun Biotech International, Melsungen
UV-Lampe	Roth, Karlsruhe
Vortex MS2 Minishaker	IKA-Werke, Staufen
Wasserbad	GFL, Burgwedel

2.1.6 Glaswaren

Deckgläser	Menzel-Gläser, Deutschland
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
Falcon Culture Slides (4 Kammern)	Becton Dickinson, Heidelberg
Glaskapillaren für LightCycler	Roche, Mannheim
Objektträger SuperFrost Plus	Menzel-Gläser, Deutschland
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim

2.1.7 Kits

BCA-Kit	Pierce Biotechnology, Rockford
ViaLight HS	BioWhittaker, Verviers, Belgien

2.1.8 Lösungsmittel

Ethanol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt

2.1.9 Molekularbiologische Chemikalien

10x Puffer + Magnesium	Roche, Mannheim
6 x Loading Dye Solution, 1 ml	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNAse I aus Rinderpankreas, 10000 Einh.	Roche, Mannheim
<i>First-Strand cDNA Synthesis Kit</i>	Amersham Pharmacia Biotech, UK, England
LightCycler-DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
Marker DNA 20 bp Leiter	Biozym, Hamburg
Marker DNA 100 bp Leiter, 0,1 µg/µl	GIBCO BRL, Schottland
METRA Osteocalcin EIA Kit	Quidel, San Diego, USA

PCR Nukleotid Mix (10 mM jedes dNTP)	Roche, Mannheim
Perfect Protein AP WP Marker	Novagen, Darmstadt
Polymerase-Puffer (10x)	Roche, Mannheim
RNEasy Kit	Qiagen, Hilden
Taq DNA Polymerase, 5 u/µl	Roche, Mannheim

2.1.10 Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert.

β-Aktin	5'-TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG C-3'
	5'-GCA CAG CTT CTC CTT AAT GTC ACG C-3'
c-met	5'-AGA AAT TCA TCA GGC TGT GAA GCG G-3'
	5'-TTC CTC CGA TCG CAC ACA TTT GTC G-3'
HGF	5'-GGT AAA GGA CGC AGC TAC AAG-3'
	5'-ATA ACT CTC CCC ATT GCA GGT-3'
uPA	5'-CAC GCA AGG GGA GAT GAA-3'
	5'-ACA GCA TTT TGG TGG TGA CTT-3'
uPAR	5'-TGG AGA TAG AGC CCC AGA TG-3'
	5'-TTA TCA CAG GCA GCC CTA GG-3'
tPA	5'-GGA AGT ACA GCT CAG AGT TCT GCA GCA CCC CTG C-3'
	5'-GAT GCG AAA CTG AGG CTG GCT GTA CTG TCT C-3'
PAI	5'-TCA TGG GCC AAG TGA TGG AAC-3'
	5'-CAT GCA CAC TGT TTC TGG GGA-3'
Plasminogen	5'-TTT GTC TCT GGA GTG AAA ATG C-3'
	5'-AGA CTG TAT GTT TGG GAA TGG G-3'
TLR-4	5'-AGC TCT GCC TTC ACT ACA GAG ACT TT-3'
	5'-ACA ATC ACC TTT CGG CTT TTA TG-3'
CD14	5'-CCG CTG TGT AGG AAA GAA GCT AA-3'
	5'-TGG TCG ATA AGT CTT CCG AAC CT-3'
ApoD	5'-CTC ACA GAG CCT GCC AAG C-3'
	5'-AGG GTT TCT TGC CAA GAT CC-3'
PIG12	5'-CCA GTA TTG CAG GAG CGA CC-3'
	5'-CCA GGA AGT GCA TCC AGG C-3'
ApoE	5'-GGG TCG CTT TTG GGA TTA CC-3'
	5'-TGT AGG CCT TCA ACT CCT TCA TG-3'
Kca4	5'-GAA CCC AGC CAG CAG TCC-3'
	5'-AAG CCA ACC CAC TCC AAG CC-3'
MAOA	5'-AGT ATC GCG GGC CAC ATG-3'
	5'-ACC AAA ACA CTA ACG CCA TAT TCA G-3'
KGF	5'-GAC ATG GAA TTC TTA TAT ATC CAG CTG TTA G-3'
	5'-CCT CAT AAA AAC AGT TCG TAG TAA GTT CAG-3'

Chitinase	5'-TCT TGA CTG CGG GCG TAT C-3'
	5'-AAA GGA CAG GAG GTT GAT GAA ATC-3'
DKFZ	5'-GAT GAG AAG ACC ATC CAG AG-3'
	5'-CAC GTC TGC CAG GAC ATT C-3'

2.1.11 Software

SOFTmax 1.2.0 für ELISA	Molecular Devices, München
CELLQuest 3.1 für FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
LightCycler	Roche, Mannheim
AnalySIS	Soft Imaging System GmbH, Münster
<i>Drop Shape Analysis</i>	Krüss, Hamburg

2.1.12 Verbrauchsmaterial

Einmal-Spritze 10 ml	BRAUN, Melsungen
Eppendorfreaktionsgefäße 0,5 + 1,5 + 2 ml	Eppendorf, Köln
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon Röhrchen (15 bzw. 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Gewebekulturflaschen (T75, T25)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Gewebekulturschale	Greiner bio-one, Frickenhausen
Kanüle 18g	Terumo, Michigan, USA
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nürnberg
Multiwell Kulturplatten	Becton Dickinson, Heidelberg
PDMS-Folie	Sylgard 184, Dow Corning, USA
Polycarbonatmembran, 8 µm Poren	Corning, Düsseldorf
<i>Power Supply</i>	<i>Serva, Heidelberg</i>
Probenbecher für CASY 1	Schärfe System, Reutlingen
PVDF-Membran	Bio-Rad, München
QiaShredder	Qiagen, Hilden
SDS-Gradientengel (4-12%)	NuPAGE, Karlsruhe
Skalpell zum Einmalgebrauch	PFM, Köln
Chromatographie-Papier	Whartman, Maidstone, UK

2.1.13 Zellen

L929-Fibroblastenzelllinie	Gibco, Schottland
Humane mesenchymale Stammzellen	Primärkulturen

2.1.14 Zellkulturmedien

2.1.14.1 Stammzellmedium

60% DMEM low Glukose	PAA, Cölbe
40% MCDB-201	Sigma, Steinheim
1 x ITS + BSA-Linolsäure	Sigma, Steinheim
1 nM Dexamethason	Sigma, Steinheim
100 µM Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma, Steinheim
40000 Einheiten Penicillin	PAA, Cölbe
40 mg Streptomycin	PAA, Cölbe
10 ng/ml EGF	Sigma, Steinheim
2% FKS (HyClone)	Perbio Science, Erembodegem-Aalst, Belgium

2.1.14.2 Adipozyten-Induktionsmedium

DMEM high Glukose	PAA, Cölbe
+ 1µM Dexamethason	Sigma, Steinheim
+ 0,2 µM Indomethacin	Biomol, Hamburg
+ 0,01 mg/ml Insulin	Sigma, Steinheim
+ 0,5 mM IBMX	Sigma, Steinheim
+ 10% FKS (HyClone)	Perbio Science, Erembodegem-Aalst, Belgium

2.1.14.3 Adipozyten-Erhaltungsmedium

DMEM high Glukose	PAA, Cölbe
+ 0,01 mg/ml Insulin	Sigma, Steinheim
+ 10% FKS (HyClone)	Perbio Science, Erembodegem-Aalst, Belgium

2.1.14.4 Osteoblasten-Induktionsmedium

DMEM low Glukose	PAA, Cölbe
100 nM Dexamethason	Sigma, Steinheim
10 mM Natrium-β-glycerophosphat	Sigma, Steinheim
0,05 mM Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma, Steinheim
10% FKS (HyClone)	Perbio Science, Erembodegem-Aalst, Belgium

2.1.14.5 L929-Kulturmedium

RPMI1640	PAA, Cölbe
5% NKS	Gibco BRL, Schottland
40000 Einheiten Penicillin	PAA, Cölbe
40 mg Streptomycin	PAA, Cölbe

2.1.15 Zytokine / Wachstumsfaktoren

bFGF	Strathmann Biotec, Hamburg
EGF	Sigma, Steinheim
HGF	Sigma, Steinheim
IL-1 β	Roche, Mannheim
Plasminogen	american diagnostica, Greenwich, USA
TGF- β	CellSystems, St. Katharinen

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 RT-PCR

Die Polymerasekettenreaktion dient der Amplifizierung eines spezifischen Genabschnitts. Soll es sich um den Nachweis auf RNA-Ebene handeln, wird die isolierte RNA zunächst mittels einer reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben, genannt cDNA (*copyDNA*), welche daraufhin in die PCR-Reaktion eingesetzt wird.

Gesamt-RNA wird mit Hilfe der Guanidinium-Thiozyanat-Methode (Rneasy Kit, Qiagen, nach Herstellerangaben) isoliert und die Ausbeute photometrisch bestimmt.

Hierzu wird 1 μ l der RNA in 99 μ l RNase freies Wasser gegeben und dann die Absorption sowohl bei 260 als auch bei 280 nm Wellenlänge gemessen. Bei einer Absorption von 260 nm wird die Menge an Nukleinsäure bestimmt, bei 280 nm die Menge an Proteinen. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm zu 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der RNA. Eine Verunreinigung durch Proteine führt zu einem niedrigeren Quotienten. Hinreichend reine RNA liegt vor, wenn das Ergebnis zwischen 1,4 und 1,8 liegt. Um die Konzentration zu bestimmen, wird der Absorptionswert bei 260 nm mit dem Verdünnungsfaktor (hier 100) und dem Faktor 40 multipliziert. Als Ergebnis erhält man die RNA-Konzentration in μ g/ml.

Um evtl. noch vorhandene genomische DNA zu entfernen, wird an die RNA-Isolation ein DNA-Verdau angeschlossen. Hierzu wird pro 30 μ g RNA 1 μ l DNaseI (entspricht

20 bis 50 Einheiten) hinzugegeben und das Gemisch bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Die anschließende cDNA-Synthese erfolgt mittels des *first-strand cDNA synthesis kit* der Firma Amersham Pharmacia nach Herstellerangaben. 5 µg gesamt-RNA werden mittels FPLCpure muriner reverser Transkriptase umgeschrieben.

Für die Amplifizierung eines spezifischen Genabschnittes werden die folgenden Substanzen benötigt. Zwei spezifische Primer, dNTPs, Taq-Polymerase, 10x-Puffer, RNase-freies Wasser und die cDNA. Bei den Primern handelt es sich um DNA-Oligonukleotide, die eine komplementäre Sequenz zum 5'- bzw 3'-Ende des Zielgens aufweisen, wobei sich der eine Primer an das 3'-Ende des einen und der andere Primer an das 5'-Ende des anderen DNA-Einzelstranges anlagert. Danach wird dieser Genabschnitt amplifiziert. An die Primer kann die DNA-Polymerase binden, welche von dort aus mit der Zweitstrangsynthese beginnt. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine Polymerase, welche aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wird und hitzestabil ist. Die Polymerase benötigt als Kofaktor Mg^{2+} , welches im 10x-Puffer enthalten ist, um ihre gesamte Aktivität zu entfalten. Die Taq-Polymerase hat ihr Temperaturoptimum bei 72°C. Die dNTPs, bestehend aus den Purinnukleotiden dATP und dGTP, sowie aus den Pyrimidinnukleotiden dTTP und dCTP, werden als Bausteine für den Zweitstrang von der Polymerase an den entsprechenden Stellen eingefügt. Als Matritze dient die zuvor synthetisierte cDNA. Als Negativkontrolle wird die RT-PCR ohne cDNA durchgeführt. Die zu amplifizierenden Genabschnitte werden in der Regel so gewählt, daß sie im Genom durch ein Intron getrennt sind. So lassen sich Amplifikate der cDNA sicher von Amplifikaten genomischer DNA (die länger sind) unterscheiden. Ein typischer PCR-Ansatz sieht folgendermaßen aus:

- 5 µl 10x Puffer
- 0,5 µl Primer 3' (10pmol)
- 0,5 µl Primer 5' (10pmol)
- 1 µl dNTPs (Endkonzentration: 0,2 µM pro Nukleotid)
- 0,5 µl Taq-Polymerase (2,5 Einheiten)
- 1 µl cDNA
- 41,5 µl RNase-freies Wasser

Die Polymerasekettenreaktion setzt sich aus drei Schritten zusammen, welche dazu dienen, die doppelsträngig vorliegende DNA aufzutrennen (Denaturierung), die Anlagerung der Primer zu ermöglichen (Annealing) und die Zweitstrangsynthese

erfolgen zu lassen (Extension). Diese Schritte werden 35 mal wiederholt und zwar bei folgenden Temperaturen (der Deckel des Thermocyclers wird zuvor auf 95°C aufgeheizt):

Denaturierung:	95°C	1 Minute	} 35 Zyklen
Annealing:	X °C	1 Minute	
Extension:	72°C	1 Minute	
Finale Extension:	72°C	10 Minuten	

Die Annealing-Temperatur variiert je nach Primerzusammenstellung. Hierbei spielen sowohl die Menge an G – C –Paaren, als auch die Anfangs- und Endbasen der Primer eine Rolle. Im Folgenden sind die Annealing-Temperaturen [und Größen] für die jeweiligen spezifischen Produkte aufgeführt:

HGF:	54°C	[266 bp]
c-met:	60°C	[440 bp]
tPA:	69°C	[347 bp]
uPA:	54°C	[341 bp]
uPAR:	56°C	[152 bp]
PAI:	55°C	[662 bp]
Plasminogen:	54°C	[125 bp]
TLR4:	60°C	[94 bp]
CD14:	57°C	[75 bp]

Zur Größenbestimmung des PCR-Produktes werden jeweils zu 15 µl Produkt 5 µl *loading buffer* gegeben und das Gemisch dann in die Slots eines Agarosegels (2% Agarose in 1 x TBE Puffer aufkochen und in die Gelvorrichtung mit Kamm gießen und aushärten lassen) gegeben. Das Gel wird in ethidiumbromidhaltigem TBE-Puffer liegend, für ca. 50 Minuten an ein elektrisches Feld angeschlossen (100 mV). Nach der Größenaufftrennung können die entstandenen Banden im uv-Licht sichtbar gemacht werden. Als Größenkontrolle wird neben den Proben eine 100bp Leiter aufgetragen (5 µl in 20 µl Gesamtvolumen).

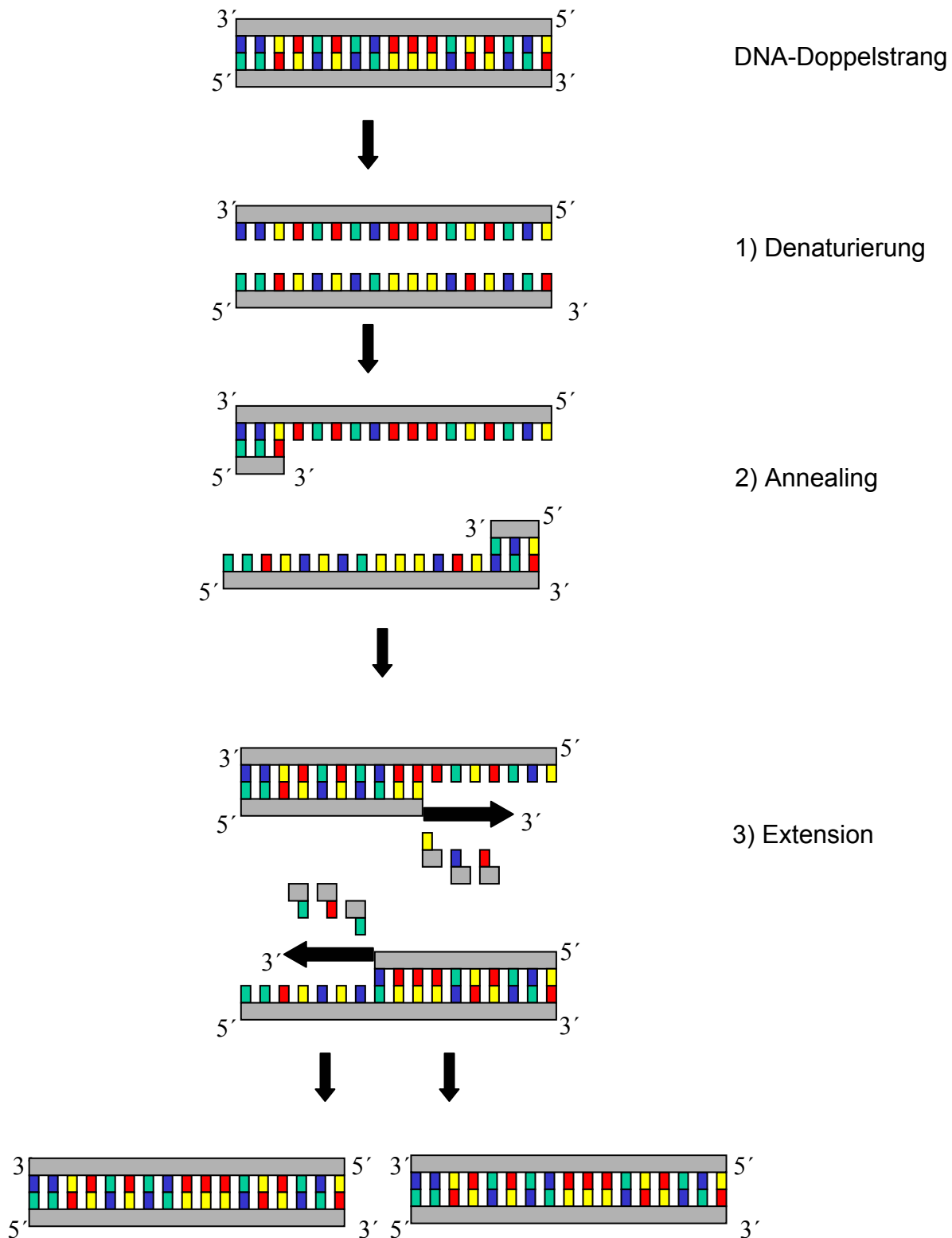


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Ablaufs der Polymerasekettenreaktion.

Die blauen und grünen Rechtecke symbolisieren Adenin und Thymin, die roten und gelben Cytosin und Guanin. Die grauen Balken stellen das Zuckerphosphatrückgrat der Desoxyribonukleinsäure dar. Die Neusynthese des jeweiligen Partnerstranges erfolgt von 5' nach 3'.

2.2.1.2 *Real-Time-PCR*

Der LightCycler kombiniert einen PCR-Thermocycler, eine Fluoreszenzdetektions-Einheit, sowie die Möglichkeit, die Ergebnisse online am Computer zu verfolgen. Für einen LightCycler-Reaktionsansatz benötigt man, im Gegensatz zur herkömmlichen PCR, SYBR Green, sowie spezielle Glaskapillaren. Das SYBR Green enthält neben der Polymerase und den dNTPs einen Farbstoff, der ausschließlich doppelsträngige DNA markiert. Ein typischer Reaktionsansatz sieht folgendermaßen aus:

- 2 µl SYBR Green (inklusive Polymerase, dNTPs und Puffer)
- 2,4 µl MgCl₂
- 0,5 µl Primer 3' (10 pmol)
- 0,5 µl Primer 5' (10 pmol)
- 12,6 µl H₂O
- 2 µl cDNA

Der Reaktionsansatz wird in eine Glaskapillare pipettiert und bei 3000 upm in einer Eppendorfzentrifuge 15 Sekunden abzentrifugiert. Daraufhin werden die Kapillaren in den Rotor des LightCyclers gestellt und die Reaktion gestartet. Folgende Temperaturänderungen werden durchlaufen:

- 95°C, 30 Sekunden
 - 95°C, 3 Sekunden, Denaturierung
 - 60°C, 5 Sekunden, Annealing
 - 72°C, 16 Sekunden, Extension
- } 40 Zyklen

Neben dem zu amplifizierenden Genabschnitt, für den die spezifischen Primer zugegeben werden, muß für jede eingesetzte cDNA auch eine β -Aktin PCR im LightCycler durchgeführt werden. Außerdem muß mit einer cDNA und den β -Aktin-Primern eine Standard-Kurve erstellt werden, wobei die cDNA einmal unverdünnt, einmal 1:10 verdünnt und einmal 1:100 verdünnt eingesetzt wird. Dies ist notwendig, um die Menge der eingesetzten cDNAs in Relation zueinander zu setzen, was eine relative Quantifizierung des gewünschten Produktes ermöglicht. Dazu wird der am Ende der Reaktion von der Software angegebene Wert der β -Aktin cDNA durch die unverdünnte Standard cDNA dividiert und der entstehende Faktor mit dem Wert der cDNA des gewünschten Genabschnittes multipliziert. Dies gilt nicht für gleiche cDNAs in unterschiedlichen Reaktionsansätzen.

Für jedes neue Primerpaar muß neben der Annealing-Temperatur auch die Meßtemperatur eingestellt werden. Bei Erreichen der Meßtemperatur wird die in

jedem Zyklus neu gebildete Menge an doppelsträngiger DNA quantifiziert. Da auch freie Primer hybridisieren, würde diese kurze doppelsträngige DNA zum Amplifikat dazugezählt. Deshalb muß eine Temperatur gewählt werden, bei der die Primer bereits wieder denaturieren, das Produkt aber noch stabil ist. Am Ende der Reaktion läßt sich die Gesamtmenge des Produktes ablesen, welche man jedoch noch in Bezug zur eingesetzten cDNA Menge setzen muß, bevor eine Aussage über die tatsächlich gebildete Menge zu machen ist. Eine Gelelektrophorese zur Größenbestimmung der Produkte ist im Anschluß der Reaktion noch möglich. Der Vorteil gegenüber einer herkömmlichen PCR liegt neben der Mengenabschätzung des Produktes in der kürzeren Reaktionszeit. Diese liegt bei einer LightCycler-Reaktion bei ca. 30 bis 60 Minuten, während eine herkömmliche PCR mehrere Stunden dauert.

Die folgende Tabelle zeigt die Annealing- bzw. Meßtemperaturen der in dieser Arbeit mittels quantitativer PCR nachgewiesenen spezifischen Genabschnitte:

Genabschnitt	Annealing-Temperatur	Meßtemperatur
uPA	54°C	86°C
uPAR	56°C	85°C
tPA	69°C	89°C
ApoD	60°C	85°C
PIG12	58°C	86°C
ApoE	55°C	87°C
Kca4	62°C	88°C
MAOA	55°C	81°C
KGF	55°C	81°C
Chitinase	55°C	81°C
DKFZ	60°C	88°C

2.2.1.3 Array-Technologie

Zur Charakterisierung des Expressionsmusters undifferenzierter und zu Osteoblasten und Adipozyten differenzierter mesenchymaler Stammzellen, wurde eine Array-Analyse durchgeführt. Hierzu wurde die RNA der jeweiligen Zellen zur weiteren Bearbeitung zur Verfügung gestellt. Die cRNA-Synthese wurde von Dr. Denecke (IZKF Biomat, RWTH Aachen) durchgeführt. Die fertige biotinylierte cRNA wurde dann am IZKF Münster auf einen Affymetrix-Chip, bzw. auf einen Amersham-

Chip (Fa. Amersham) gegeben und ausgewertet. Bei dem Affymetrix-Chip handelt es sich um den Chip HGU95Av2, auf den mehr als 10000 Oligonukleotide gespottet sind, bei dem Amersham-Chip handelt es sich um den Human UniSet 20K Bioarray mit ca. 20000 Genen. Für die Amersham-Chip-Analyse wurde nur cRNA von unstimulierten und zu Adipozyten differenzierten mesenchymalen Stammzellen eingesetzt.

Von jedem Gen sind 16 bis 20 unterschiedliche Oligonukleotide auf den Chip gespottet, wobei wiederum jedes Oligonukleotid zweifach auf dem Chip enthalten ist. Einmal in korrekter Basenfolge (*perfect match*), einmal mit einem Basenaustausch (*mismatch*). Das Signal, welches durch die Hybridisierung an die *mismatch* Probe entsteht, muß von dem Signal, welches durch die Hybridisierung an die *perfect match* Probe entsteht, abgezogen werden, um unspezifische Bindungen auszuschließen.

Das Expressionsmuster folgender Gene wurde ausgewertet und durch eine *Real-Time-PCR* bestätigt:

J02611 → Apolipoprotein D (ApoD)

AF010316 → Prostaglandin E Synthase (PIG12)

M12529 → Apolipoprotein E (ApoE)

AF022797 → *intermediate conductance Ca-activated K-channel* (KCa4)

M68840 → Monoaminoxidase A (MAOA)

S81661 → Keratinozytenwachstumsfaktor (KGF)

U58515 → Chitinase

AL050214 → Klon P586H212 DKFZ (DKFZ)

2.2.2 Physikalische Methoden

2.2.2.1 Kontaktwinkelmessung

Der Kontaktwinkel zwischen einer Flüssigkeit und einem Festkörper ist ein Maß für die energetischen Wechselwirkungen zwischen Festkörper und Flüssigkeit und dient der Bestimmung und Quantifizierung hydrophiler bzw. hydrophober Eigenschaften eines Festkörpers.

Zur Kontaktwinkelmessung, die im Fraunhofer Institut für Lasertechnik durchgeführt wird, wird über eine Kanüle ein Wassertropfen auf das Material aufgetropft und der Winkel zwischen der Tangente des Wassertropfens und der Materialoberfläche vermessen (Abb. 6).

Der Kontaktwinkel (σ) nimmt mit zunehmender Hydrophobie zu bzw. mit zunehmender Hydrophilie ab. Durch Vergleich mit hydrophilen bzw. hydrophoben Materialien können vergleichende Aussagen über die Oberflächeneigenschaften gemacht werden. Ein Kontaktwinkel von 80° ist als grenzwertig anzusehen.

Als hydrophobe Kontrolle dient eine PDMS-Folie, als hydrophile Kontrolle dient eine plasmabehandelte PDMS-Folie. Es werden jeweils vier Messungen pro Probenkörper durchgeführt.

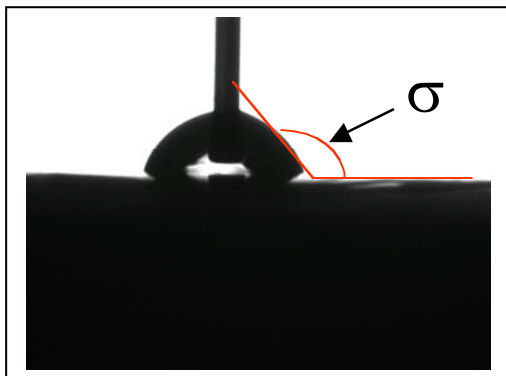


Abbildung 6: Beispiel eines Kontaktwinkels σ zwischen einer Festkörperoberfläche und einem Wassertropfen

2.2.3 Proteinchemische Methoden

2.2.3.1 Western Blot

Diese Methode ermöglicht den Nachweis eines spezifischen Proteins in einem Proteingemisch. Hierzu werden die Proteine zunächst der Größe nach aufgetrennt, dann auf eine Membran geblottet, mit einem spezifischen Antikörper inkubiert und schließlich detektiert.

Mesenchymale Stammzellen aus einer konfluent bewachsenen T25-Zellkulturflasche werden in 600 μl *insect cell lysis buffer* (PharMingen) aufgenommen und mit Hilfe einer Kanüle in einem Eppendorfreaktionsgefäß mit geschlossenem Deckel resuspendiert. Die Proteinmenge wird mittels des BCA-Kits der Firma Pierce nach Herstellerangaben bestimmt. 10 μg Protein werden auf einem 4 bis 12%-igen SDS-Gel aufgetragen und für 2,5 h bei 70 Volt nach ihrer Größe aufgetrennt. Als Laufpuffer dient Lämmli-Puffer. Eine auf Gelgröße zurechtgeschnittene PVDF-Membran wird für 10 Minuten in Methanol inkubiert und dann zusammen mit dem Gel und vier mal Whatman-Papier in folgenden Aufbau gebracht:

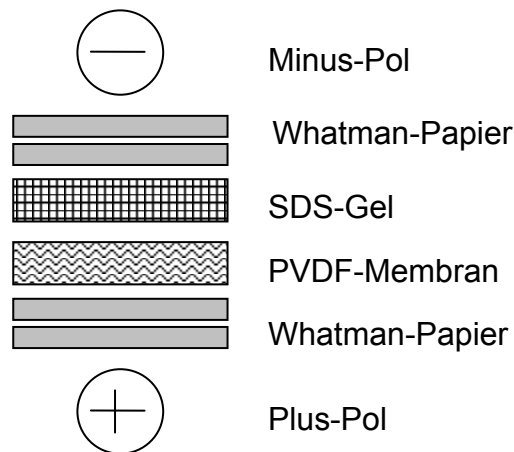


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Western-Blot-Aufbaus

Das Blotting der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgt bei 150 mA innerhalb einer Stunde. Die Proteine wandern in Richtung Plus-Pol, da sie von dem stark negativ geladenen SDS ummantelt sind. Die Membran wird dann über Nacht in Milchpulver bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Ein spezifischer Antikörper (polyklonal, aus Kaninchen) gegen das c-met Protein wird in einer Verdünnung von 1:200 zur Membran gegeben und diese dann für 90 Minuten bei Raumtemperatur geschwenkt. Eine einstündige Inkubation mit AP-konjugiertem Zweitantikörper (Verdünnung: 1:5000) folgt, ebenfalls bei Raumtemperatur. Durch Zugabe einer Sigma Fast 5-bromo,4-chloro,3-indolyl-Phosphat/Nitroblau-Tetrazolium Tablette (BCIP/NBT) wird der gebundene Antikörper sichtbar gemacht.

Als Negativkontrolle wird zeitgleich der gleiche Ansatz durchgeführt, allerdings wird der Primärantikörper über Nacht bei 4°C mit dem fünffachen Überschuss eines spezifischen Blockingspeptides in einem kleinen Volumen PBS vorinkubiert. Zur Größenbestimmung wird ein Standard neben den Proben mitgeführt (Perfect Protein AP WP Marker).

2.2.3.2 Zymographie

Wie der Western Blot bietet die Zymographie die Möglichkeit zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe; zusätzlich kann aber die Aktivität der aufgetrennten Proteine mittels eines Substrates nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Zymographie nach Park et al. durchgeführt⁹⁸.

Zunächst werden die Zellen in 20 µl Probenpuffer (5% SDS, 20% Glycerol, 0,0025% Bromphenolblau, 0,125 M Tris-HCl) aufgenommen und ultraschallbehandelt. Die

Proteinlysate werden dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Hierzu wird zunächst ein sogenanntes Sammelgel (s.u.) zwischen zwei abgedichtete, durch sogenannte Spacer getrennte, Glasplatten gegossen. Zwischen den zwei Platten polymerisiert die Lösung nun in einer vom TEMED ausgelösten und vom APS katalysierten Kettenreaktion. Danach gießt man das Trenngel über das Sammelgel und steckt in dieses einen Kamm hinein, der Platz für die Proteinproben im Sammelgel läßt. Die Lysate werden nach Erhärten des Trenngels aufgetragen und wandern für 40 bis 60 Minuten bei 20 mA (je Gel) in Richtung Plus-Pol. Lämmli-Puffer dient als Laufpuffer. Das Polyacrylamidgel wird daraufhin für 30 Minuten in 2,5% Triton-X-100 geschwenkt und dreimal mit destilliertem Wasser gespült. Es folgt eine 30-minütige Inkubation bei 39°C in PBS. Danach findet das Übertragen der aufgetrennten Proteine auf ein Casein-Agar-Gel statt. Dieses Gel wird folgendermaßen hergestellt: Zu 19 ml eines bei 55°C vorgewärmten Puffers aus 0,0013 M CaCl_2 , 0,1 M Glycin, 0,038 M Tris und 0,005 M Natriumazid werden 0,8 g Magermilchpulver (enthält Casein) gegeben. Diese 19 ml werden dann mit 19 ml 2% Agarose (55°C) gemischt und wieder aufgeteilt. Der einen Hälfte wird 1 ml Plasminogen (1000 µg/ml) zugefügt, der anderen 1 ml destilliertes Wasser. Beide Lösungen werden in eine Gelkammer gegossen und erstarren gelassen. Daraufhin wird für 12 bis 18 Stunden bei 39°C in einer feuchten Kammer auf je ein Casein-Agar-Gel ein SDS-Gel gelegt. Nach dem Blotten werden die Casein-Agar-Gele für 10 Minuten in 3% Essigsäure fixiert, unter Leitungswasser gespült und getrocknet. Danach werden sie für eine Minute in 0,1% Amido Black 10 B (in 25% Isopropanol und 10% Essigsäure in Wasser) geschwenkt. Wenn die Proteinlysate fibrinolytische Enzyme wie uPA oder tPA enthalten, werden diese das im Casein-Agar-Gel enthaltene Plasminogen zu Plasmin spalten und somit aktivieren. Das Plasmin wiederum baut sein Substrat Casein ab. Überall dort, wo Casein abgebaut wird, findet keine Anfärbung mittels Amido Black statt. Das Casein-Agar-Gel ohne Plasminogen dient der Detektion unspezifischer Banden.

Sammelgellösung (4,5%):

1,25 ml Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-Cl, 0,4% SDS, pH 6,8)

0,75 ml Acrylamid (30%)

3 ml Aqua bidest.

10 µl TEMED

50 µl APS (10%)

Trenngellösung (10%):

2,5 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris-Cl, 0,4% SDS, pH 8,8)

3,3 ml Acrylamid (30%)

4,2 ml Aqua bidest.

8 µl TEMED

50 µl APS (10%)

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Isolation und Kultivierung adulter humaner mesenchymaler Stammzellen

Die Isolation mesenchymaler Stammzellen erfolgt aus humanem Aspirat oder Spongiosa, welche bei einer Hüft-TEP-Operation anfallen. Mit Zustimmung der Patienten wird uns dieses Material von der Orthopädie des Aachener Klinikums zur Verfügung gestellt.

Die Isolation erfolgt im Wesentlichen durch einen Adhärenzschritt. Das Aspirat wird mit Stammzellmedium 1:2 verdünnt, gevortext und abzentrifugiert (500xg, 10 Minuten), während die Spongiosa solange mit Stammzellmedium mittels einer Kanüle durchgespült wird, bis sie nicht mehr rot, sondern weiß ist. Hierbei wird das zum Durchspülen genutzte Stammzellmedium gesammelt und abzentrifugiert (500xg, 10 Minuten). Die Zellpellets von Aspirat bzw. Spongiosa werden in 10 ml Stammzellmedium resuspendiert und in eine T75-Zellkulturflasche überführt. Nach 24 Stunden erfolgt ein Mediumwechsel, um die nicht adhärent gewordenen Zellen, vor allem die Erythrozyten, zu entfernen. Danach werden die Zellen alle drei bis vier Tage mit frischem Medium versorgt. Bei 80 bis 90% Konfluenz werden die Stammzellen mit 4 ml Stammzelltrypsin (CellSystems) abgelöst (8 bis 10 Minuten bei 37°C) und mit weiteren 6 ml Medium für 10 Minuten bei 500xg zentrifugiert. Die Zellen werden in soviel Medium resuspendiert, daß pro T75-Zellkulturflasche $3,75 \times 10^5$ Zellen ausgesät werden. Das entspricht einer Zellzahl von 5000 Zellen/cm², welches die optimale Zelldichte zur Proliferation darstellt.

2.2.4.2 Zellzahlbestimmung mittels CASY 1

Zur Bestimmung der Zellzahl wird nicht, wie allgemein üblich, eine Neubauer- oder Thomakammer, sondern ein elektronisches Meßgerät eingesetzt. Die Zellzahlbestimmung beruht auf dem Prinzip der Widerstandsmessung. Die Zellen werden in isotoner Elektrolytlösung suspendiert und durch eine Meßkapillare

definierter Geometrie gesaugt, an die über zwei Platinelektroden eine elektrische Spannung angelegt ist. Sobald eine Zelle in die Kapillare eindringt, entsteht ein elektrischer Impuls. Das Zellzählgerät CASY 1 kombiniert das Widerstandsmeßprinzip mit der Pulsflächenanalyse. Somit kann neben der Zellzahl auch die Größenverteilung der Zellen dargestellt werden. Dazu werden die von den Zellen verursachten Impulse nach ihrer Größe differenziert. Die Impulsfläche ist dem Zellvolumen proportional. Mit dieser Methode ist es möglich, zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden, da tote Zellen mit defekter Zellmembran kleiner dargestellt werden als vitale Zellen. Zur Durchführung der Zellzählung werden 10 ml CASYTON (Meßlösung) und 100 µl Zellsuspension in einem Probenbecher gemischt (1:100 Verdünnung) und unter die Meßkapillare gestellt. Die Messung wird ausgelöst und daraufhin können die Größenverteilung, sowie die Zellzahl pro Milliliter abgelesen werden.

2.2.4.3 Differenzierung adulter humaner mesenchymaler Stammzellen

Zur Bestätigung, daß es sich bei den isolierten Zellen um Stammzellen handelt, muß deren Multipotenz nachgewiesen werden. Hierzu bedient man sich der Protokolle nach Pittenger et al.³³. Die Zellen werden in Adipozyten und Osteoblasten differenziert.

Bei der Adipozyten-Differenzierung werden die Zellen in einer Dichte von 8×10^4 Zellen/cm² in Stammzellmedium ausgesät und ab dem nächsten Tag alle drei bis vier Tage abwechselnd in Adipozyten-Induktions- und Adipozyten-Erhaltungsmedium kultiviert. Nach 21 Tagen wird der Erfolg der Differenzierung anhand der Lipidvakuolenbildung mittels *Oil red O* Färbung nachgewiesen. Hierzu werden die Zellen zunächst für 30 Minuten in 50% eiskaltem Ethanol fixiert und daraufhin für 10 Minuten in *Oil red O* Lösung geschwenkt. Unter dem Mikroskop erscheinen die Lipidvakuolen rot. Bei der Färbung auf Formgedächtnispolymeren färbt sich das Material allerdings mittels *Oil red O* Lösung komplett rot an. Deshalb muß alternativ auf eine Sudanschwarz Färbung zurückgegriffen werden. Hierzu werden die Zellen 5 bis 10 Minuten in 4% Formalin fixiert, dann mit Wasser gespült und 3 Minuten in Sudanschwarz-Lösung inkubiert. Es folgt ein dreimaliger Waschvorgang mit Aqua dest. Nach 5 Sekunden Inkubation in 70% Ethanol werden die Zellen erneut zweimal mit Aqua dest. gespült. Unter dem Lichtmikroskop sind Lipidvakuolen blau-schwarz gefärbt.

Für die Osteoblasten-Differenzierung werden $3,1 \times 10^4$ Zellen/cm² ausgesät und ab dem nächsten Tag alle zwei bis drei Tage mit Osteoblasten-Induktions-Medium versorgt. Nach 16 Tagen wird die Bildung von Kalziumablagerungen mittels Alizarin rot Färbung nachgewiesen. Die Zellen werden für eine Stunde in 70% Ethanol fixiert, mit Aqua bidest gewaschen und für 10 Minuten in Alizarin rot Lösung (40 mM, pH 4,1) geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erscheinen die Kalziumablagerungen rot.

2.2.4.4 Scratch-Assay

Der Scratch-Assay ist ein *in vitro* Wundmodell, mit dem die chemokinetische Wirkung eines Faktors nachgewiesen werden kann.

Mesenchymale Stammzellen werden in 6-Well-Platten ausgesät (5000 Zellen/cm²). Bei Erreichen von Konfluenz wird mit Hilfe einer Pipettenspitze ein Kratzer durch den Durchmesser des Wells gezogen (34,5 mm) und HGF in den Konzentrationen 0, 25, 50 und 75 ng pro Milliliter Überstand hinzugegeben. Nach 24 h wird der „Wundverschluß“ photographisch dokumentiert. Zur Quantifizierung der Rekolonialisierung wird die Zellzahl in je vier Segmenten (320 µm x 320 µm) des „Kratzerbereichs“ bestimmt.

2.2.4.5 Boyden-Kammer-Assay

Mit Hilfe des Boyden-Kammer-Assays ist es möglich, zwischen der chemokinetischen und der chemotaktischen Wirkung eines Faktors zu unterscheiden.

Die Boyden-Kammer besteht aus zwei Kompartimenten, welche durch eine Polykarbonatmembran mit 8 µm großen Poren voneinander getrennt sind. Diese Porengröße ermöglicht nicht nur die Diffusion von gelösten Stoffen, sondern auch das aktive Hindurchwandern von Zellen.

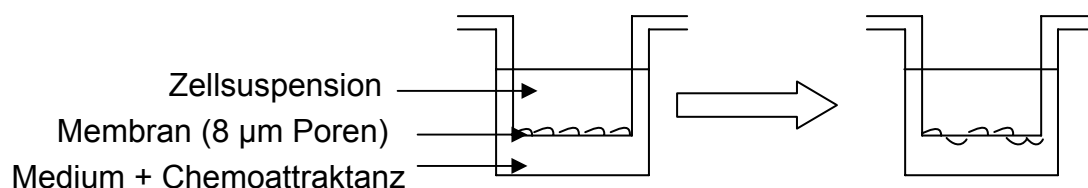


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Boyden-Kammer-Assays

Beide Kompartimente werden mit Medium, dem verschiedene Konzentrationen an HGF zugesetzt werden, gefüllt und 1×10^5 hMSC werden in das obere Kompartiment

gegeben. Die Boyden-Kammern werden für 16 h bei 37°C, 5% CO₂ und 20% O₂ inkubiert. Daraufhin werden die Membranen aus den Kammern entnommen und die Zellen auf der Oberseite mit einem Baumwolltuch abgewischt. Die restlichen Zellen werden mittels Hämacyolor-Schnellfärbung fixiert und gefärbt (jeweils eine Minute in Fixierlösung [Lösung 1], Färbereagenz rot [Lösung 2] und Färbereagenz blau [Lösung 3]). Die Membranen werden auf Objektträger gebracht und die Zellen in fünf verschiedenen Gesichtsfeldern ausgezählt. Jeder Ansatz wird zeitgleich dreifach bestimmt.

2.2.4.6 Proliferations-Assay

Auf einer 24-Well-Platte werden 3000 hMSC pro Well mit unterschiedlichen HGF-Konzentrationen (0, 25, 50 ng HGF/ml Medium) inkubiert. Die Proliferation wird mittels eines Luziferase-Detektionssystems (ViaLight HS, BioWhittaker) nach Herstellerangaben bestimmt. Luziferase ist der Katalysator für folgende Reaktion:



Das emittierte Licht wird mit einem Luminometer gemessen und ist linear zur vorhandenen ATP-Konzentration. Die Menge an ATP wiederum kann in Relation zur Zellzahl gesetzt werden. Der ATP-Gehalt der hMSC wird nach 1, 2, 3, 4 und 7 Tagen bestimmt. Das Medium wird nach der Messung an Tag 4 gewechselt. Als Positivkontrolle dienen Zellen welche in Medium mit 20% FKS kultiviert werden.

2.2.4.7 ELISA

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten *enzyme-linked-immunosorbent-assays* (ELISAs) handelt es sich um sogenannte quantitative Sandwich-ELISA, bei denen ein spezifischer monoklonaler Antikörper auf einer Mikrotiterplatte gebunden vorliegt (Abb. 9a). Die zu detektierende Substanz wird zur Standardkurvenerstellung und somit Quantifizierung mitgeliefert. Der Standard und die Proben werden in Dreifachansätzen in die Wells der Mikrotiterplatte gegeben und an dem gebundenen Antikörper immobilisiert (Abb. 9b). Nach mehrmaligem Waschen der Wells wird ein spezifischer Enzym-gekoppelter polyklonaler Antikörper (Abb. 9c), und nach erneutem Waschen eine Substratlösung hinzugefügt. Es erfolgt ein Farbumschlag, welcher proportional zu der zu detektierenden Substanz ist (Abb. 9d) und nach Zugabe einer Stopplösung im ELISA-Reader bei einer spezifischen Wellenlänge gemessen werden kann.

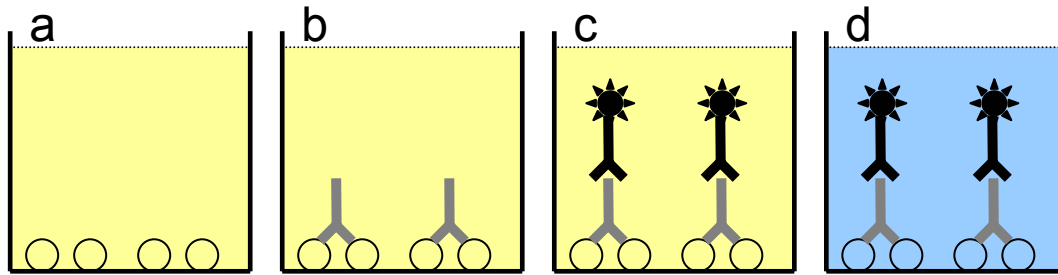


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines „Sandwich“-ELISAs

Für den tPA-, uPA- und uPAR-ELISA werden $1,5 \times 10^4$ hMSC pro Well und für den HGF-ELISA 2×10^4 hMSC pro Well in einer 96-Well-Platte ausgesät. Daraufhin erfolgt eine 24-stündige Inkubation mit TGF- β_3 , IL1- β und bFGF je in Konzentrationen von 10, 1 und 0,1 ng/ml Medium. Unstimulierte Stammzellen dienen als Kontrolle. Der Zellüberstand wird in kommerziell erhältliche Sandwich-ELISA der Firma R&D Systems (TNF- α -, HGF-ELISA) bzw. american diagnostica (tPA-, uPA- und uPAR-ELISA) nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.2.4.8 Immunhistochemie

Mesenchymale Stammzellen werden in 4-Kammer *chamber slides* ausgesät (5000 Zellen/cm²) und nachdem sie adhärent geworden sind für 30 Minuten in 0,5% Paraformaldehyd (in PBS) fixiert. Nach einem Waschschriff mit 0,5% BSA in PBS (PBSSA) werden unspezifische Bindungsstellen mit Blockier-Puffer (5% BSA in PBS) für 15 Minuten abgedeckt. Es folgt eine 45-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper (anti-c-met, polyklonal, aus Kanninchen), welcher 1:50 in PBSSA-NP40 (1:200 Verdünnung von NP40 in PBSSA) verdünnt eingesetzt wird. Daraufhin werden die Zellen dreimal mit PBSSA für 10 Minuten gewaschen, bevor der Sekundärantikörper (1:250 in PBSSA) für 30 Minuten bei Raumtemperatur hinzugegeben wird. Es folgt ein erneuter Waschschriff wie zuvor beschrieben. Danach werden die Zellen mit FITC-gekoppeltem Streptavidin in einer 1:250 Verdünnung für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Zuletzt werden die Zellen erneut dreimal gewaschen und dann mit (DAPI)-haltigem *mounting medium* eingedeckelt. Als Negativkontrolle wird der gleiche Ansatz mit einem, bei 4°C über Nacht mit einem spezifischen Blockingpeptid vorinkubierten, Primärantikörper durchgeführt.

2.2.4.9 FACS-Analyse

Die FACS-Analyse dient dazu, Oberflächenepitope auf Zellen nachzuweisen. Die Zellen werden mittels fluoreszierender Antikörper markiert und ein Laser detektiert die Anzahl an markierten Zellen pro Gesamtzellzahl. Zur Probe hinzugegebenes Propidiumiodid dient der Markierung toter Zellen.

Für eine FACS-Probe werden ca. $2,5 \times 10^5$ Zellen in einem Volumen von 100 µl in 1% BSA (in PBS) bei 4°C für 30 Minuten vorinkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Dann wird 1 µg Primärantikörper zur Zellsuspension gegeben und für weitere 60 Minuten bei 4°C inkubiert. Es folgt ein Waschschriff, indem die Zellen dreimal in 100 µl 0,1% BSA (in PBS) abzentrifugiert und resuspendiert werden. Die letzte Resuspendierung erfolgt in 1% BSA (in PBS). Die nun vorliegende Zellsuspension wird für 45 Minuten bei 4°C im Dunkeln mit dem Sekundärantikörper (1:20 Verdünnung) inkubiert. Der vorher beschriebene Waschschriff wird wiederholt und die Zellen werden in 100 µl PBS mit 1 µM Propidiumiodid resuspendiert. Als Negativkontrolle wird anstelle des Primärantikörpers ein speziesspezifisches Immunglobulin eingesetzt.

10000 Zellen werden mit Hilfe des FACSCalibur-Gerätes von Becton Dickinson mit der FACS-Calibur Software ausgewertet.

Als Primärantikörper werden monoklonale Antikörper aus der Maus gegen CD4, CD14, CD34, CD49a, CD49c, CD49d, CD51, CD54, CD73, CD105 und CD117 eingesetzt. Als Sekundärantikörper dient ein FITC-gekoppelter anti-Maus-Antikörper.

2.2.4.10 Zytotoxizitätstests

Zur Bestimmung von Zytotoxizität bzw. Biokompatibilität eines Materials wird eine Maus L929-Fibroblastenzelllinie eingesetzt. Die Fibroblasten stammen aus normalem areolarem und adipotischem Gewebe einer männlichen C3H/An Maus. Morphologie und Mitoseaktivität dieser Zelllinie sind bekannt. Sie wird routinemäßig nach ISO 10993-5 für Zytotoxizitätstests eingesetzt, welche sich durch reproduzierbare Ergebnisse auszeichnen. Die L929-Zellen sind kommerziell erhältlich und werden in RPMI-Medium, welches mit 5% natalem Kälberserum supplementiert ist, expandiert. Das Medium wird dreimal pro Woche gewechselt.

Die Versuche zur Bestimmung der Parameter Morphologie und Vitalität und Proliferation werden zum einen im direkten Materialkontakt, zum anderen im

indirekten Kontakt durchgeführt. Der indirekte Test dient dem Nachweis von zytotoxischen Substanzen, welche aus dem Material herausdiffundieren könnten.

Für den direkten Test werden die Probenkörper einzeln in 12 Well Mikrotiterplatten gelegt, mit den Zellen beschichtet ($1,8 \times 10^4$ Zellen/cm² [L929], 5×10^3 Zellen/cm² [hMSC]) und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre in RPMI-Medium mit 5% NKS kultiviert. Als Kontrollmaterial dient eine entsprechend große Glasronde.

Für den indirekten Kontakt wird das Material ohne Zellen zunächst mit dem Kulturmedium für 24 Stunden in Kontakt gebracht (1 mm² Materialoberfläche in 1 ml Medium). Dieses Medium wird anschließend für weitere 24 Stunden zu den Zellen gegeben.

Morphologie:

Unter dem Lichtmikroskop wird die Morphologie der L929-Zellen betrachtet. Als Kontrolle dienen jeweils L929-Zellen, welche auf Glasronden ausgesät wurden. Eine Anfärbung der Zellen mit Hämalaun erleichtert die Beurteilung der Zellmorphologie. Es werden sowohl das so genannte *Zellspreading* (Zellausbreitung) sowie die Adhäsion einer Zelle an das Material begutachtet.

Vitalität:

Nach der 24-stündigen Inkubation der Zellen im direkten bzw. indirekten Materialkontakt wird eine sogenannte *Live-death*-Färbung mit Fluoresceindiacetat und Propidiumiodid durchgeführt. Hierzu wird ein Tropfen FDA-PI-Lösung auf die Zellen gegeben (1,2 ml Ringer-Lösung, 20 µl FDA [0,1 µg FDA in 20 ml Aceton], 20 µl PI [0,01 µg PI in 20 ml PBS]). Das FDA wird in lebenden Zellen von Zellmembran-Enzym-Esterasen umgesetzt und erzeugt bei vorhandener Vitalität eine grün fluoreszierende Färbung. PI dagegen bindet an die DNA toter Zellen, deren Kerne dann rot erscheinen.

Die angefärbten Zellen werden digital fotografiert und mit Hilfe der AnalySis-Software quantifiziert. Dabei wird neben der Gesamtzellzahl und der Anzahl mitotischer Zellen die Fraktion an lebenden bzw. toten Zellen berücksichtigt. Es werden pro Probe vier Bilder à 1 mm² ausgewertet und der Mittelwert bestimmt.

Die Kontrollzellen sollten maximal 5% tote Zellen und zwischen 3 und 5% mitotisch aktive Zellen enthalten. Anderenfalls ist der Versuch nicht auswertbar.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung humaner mesenchymaler Stammzellen

3.1.1 Humane mesenchymale Stammzellen ließen sich in Adipozyten und Osteoblasten differenzieren

Zum Nachweis der Multipotenz der isolierten Zellen wurden sie nach definierten Protokollen zu Adipozyten und Osteoblasten differenziert. Nach 21 Tagen ließen sich mit Alizarin-rot Färbung die Kalziumablagerungen in der Extrazellulärmatrix der Osteoblasten (Abb. 10d) und mit *Oil red O* Färbung die Lipidvakuolen der entstandenen Adipozyten nachweisen (Abb.10h).

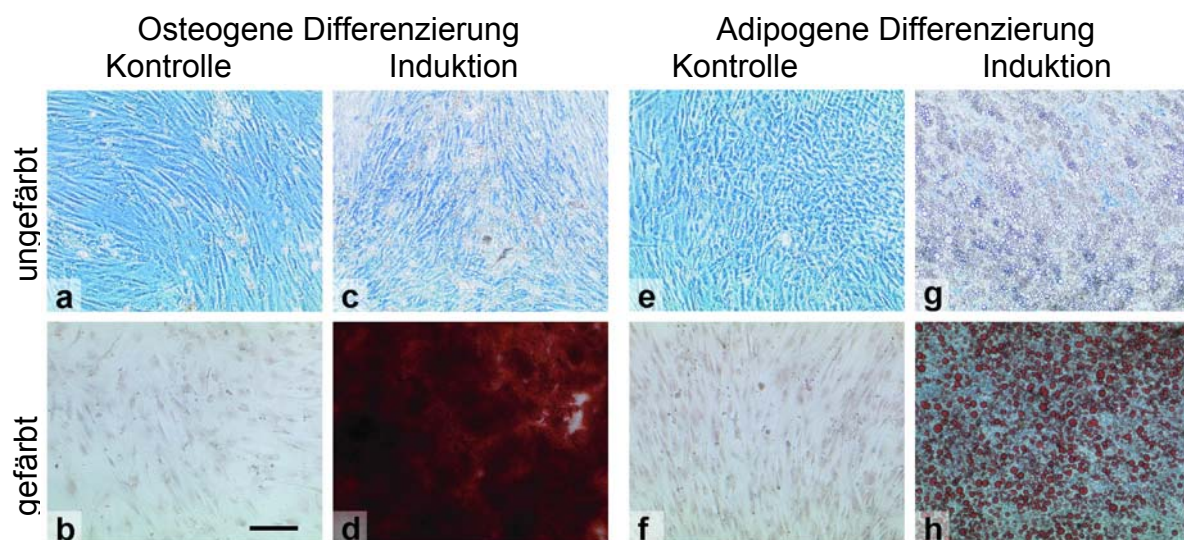


Abbildung 10: Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen zu Osteoblasten und Adipozyten. Nach dreiwöchiger Induktion zu Osteoblasten (c) und Adipozyten (g) ließen sich Kalzium-Ablagerungen der Osteoblasten mit Alizarin rot (d) und Lipidvakuolen der Adipozyten mit *Oil red O* (h) anfärben. Skala: 200 µm (b)

In einer aus dieser Arbeit entstandenen Veröffentlichung⁴⁷ wurden die isolierten Zellen außerdem in Richtung Chondrozyten differenziert. Die aus dem Knochenmark isolierten Zellen waren also multipotent. Zur weiteren Charakterisierung der Zellen wurden deren Oberflächenepitope in einer FACS-Analyse untersucht. Aufgrund des Fehlens eines spezifischen Markers für mesenchymale Stammzellen mußte ein Expressionsmuster untersucht werden. Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse der FACS-Analyse. Die hMSC exprimierten weder die hämatopoetischen Marker CD4, CD14 und CD34, noch die Integrine CD49a und CD49d und den Stammzellfaktorrezeptor CD117 (c-kit). Das Integrin CD49c, der Vitronektinrezeptor CD51 und das

interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 CD54 waren auf der Zelloberfläche nachweisbar. Endoglin (CD105; SH2) und die Ekto-5'-nukleotidase (CD73; SH3) wurden sehr stark exprimiert (Abb. 11). Dieses Expressionsmuster stimmt mit dem von Pittenger et al.³³ veröffentlichten Expressionsmuster multipotenter humaner mesenchymaler Stammzellen überein.

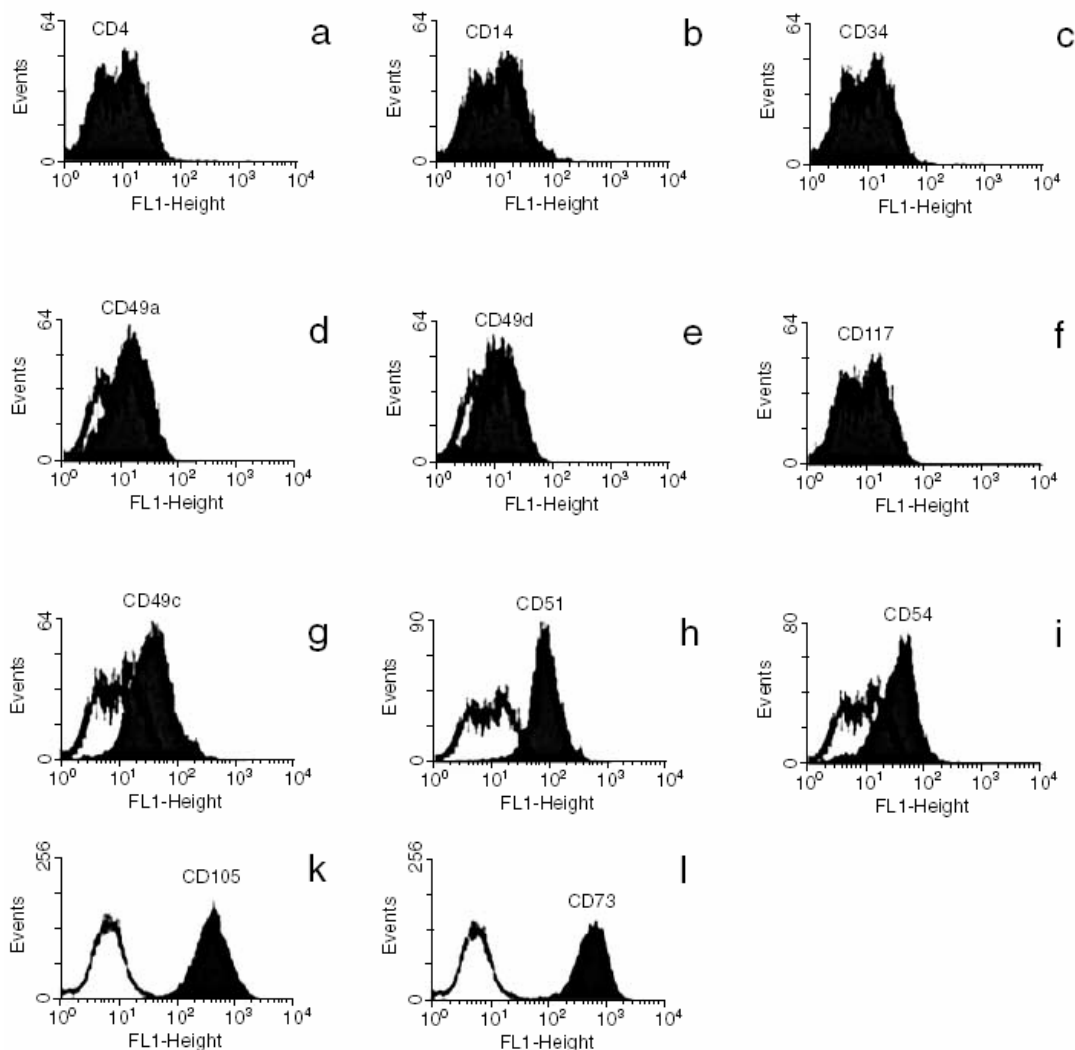


Abbildung 11: FACS-Analyse humaner mesenchymaler Stammzellen.

Die Charakterisierung der Oberflächenepitope ergab, daß die Zellen CD4 (a), CD14(b), CD34(c), CD49a (d), CD49d (e) und CD117 (f) nicht exprimierten, CD49c (g), CD51 (h) und CD54 (i) mäßig und CD105 (k) und CD73 (l) stark exprimierten.

Neben den spezifischen Färbenachweisen nach Differenzierung in Richtung Osteoblasten und Adipozyten und der Untersuchung der Oberflächenepitope wurde mittels DNA-Chip-Analyse eine Gensignatur von unstimulierten und differenzierten Stammzellen überprüft. Hierzu wurden unstimulierte, und zu Osteoblasten und Adipozyten differenzierte hMSC mittels Affymetrix-Chip untersucht. Von den mehr als 10.000 Genen wurden 7529 bei keiner der drei Zellpopulationen und 2244 in allen

drei Zellpopulationen exprimiert. 647 Gene hybridisierten nur mit cDNA von unstimulierten hMSC, 568 nur mit cDNA von Adipozyten und 536 nur mit cDNA von Osteoblasten. Weiterhin wurden 394 Gene von unstimulierten hMSC und Adipozyten gemeinsam exprimiert, 487 von unstimulierten hMSC und Osteoblasten und nur 220 gemeinsam von Adipozyten und Osteoblasten.

3.1.2 Expressionsanalysen humaner mesenchymaler Stammzellen mittels DNA-Chip-Technologie

Zunächst wurde eine Gensignatur ausgewählt, welche bekannte Gene von mesenchymalen Stammzellen, Adipozyten und Osteoblasten enthielt. Bei den ausgewählten Genen handelte es sich um Apolipoprotein D (ApoD), Prostaglandin E Synthase (PIG12), Apolipoprotein E (Apo E), *intermediate conductance Ca-activated K-channel* (Kca4), Monoaminoxidase A (MAOA), Keratinozytenwachstumsfaktor (KGF), Chitinase und um ein Gen mit bisher unbekannter Funktion (DKFZ). Die Expression dieser Gene wurde mittels DNA-Chips sowohl bei unstimulierten hMSC, als auch bei zu Adipozyten und zu Osteoblasten differenzierten hMSC untersucht. Hierzu wurden Chips der Firma Affymetrix und Amersham benutzt (siehe Methoden) und als Bestätigung jeweils eine *Real-Time*-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt. Das erwartete Expressionsmuster ist auf der rechten Seite abgebildet. Die Daten der Chip-Analysen und der quantitativen PCR stimmten weitgehend mit diesem Muster überein, obwohl die Höhe der Expressionen in den einzelnen Systemen teilweise unterschiedlich waren. Apolipoprotein D wurde stark in Osteoblasten exprimiert, PIG12 von unstimulierten hMSC und Adipozyten, während das Apolipoprotein E nur von Adipozyten exprimiert wurde. KCa4 wurde von unstimulierten hMSC und Osteoblasten exprimiert und die Monoaminoxidase A von Osteoblasten und Adipozyten. Der Keratinozytenwachstumsfaktor wiederum wurde hauptsächlich von unstimulierten hMSC exprimiert, war jedoch auch in Adipozyten nachweisbar. Die Chitinase wurde in unstimulierten hMSC und sehr stark in Adipozyten gebildet, während das in seiner Funktion unbekannte DKFZ von unstimulierten hMSC und Osteoblasten exprimiert wurde.

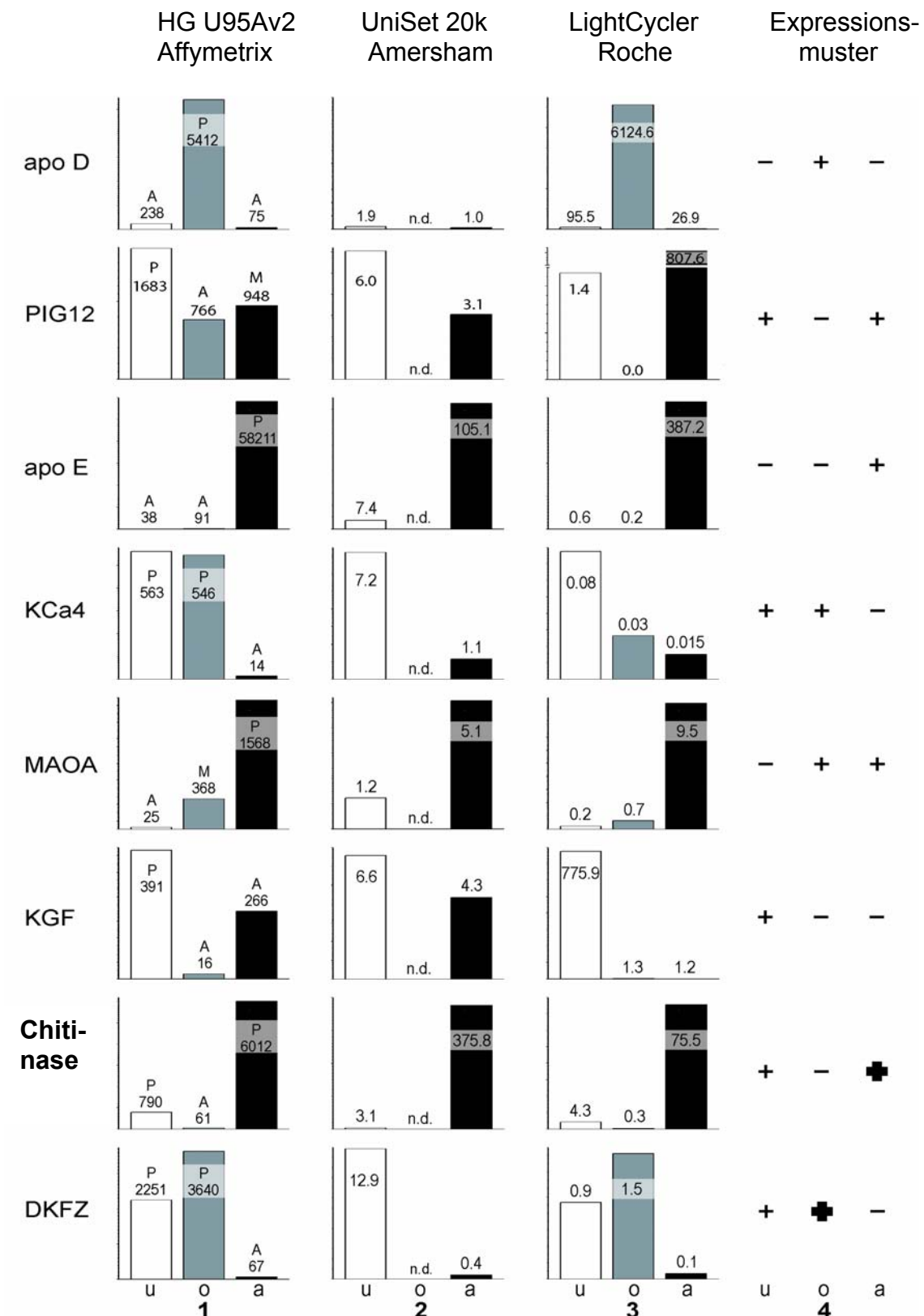


Abbildung 11: Genexpressionsmuster einer zuvor definierten Gensignatur (8 Gene) bei unstimulierten (u) und zu Osteoblasten (o) und Adipozyten (a) differenzierten hMSC. Das Expressionsmuster (4) der Zellpopulationen wurde mittels DNA-Chip von Affymetrix (1), Amersham (2) und Real-Time-PCR (3) überprüft. Die zu Osteoblasten differenzierten hMSC konnten bei der Amersham-Chip-Analyse nicht berücksichtigt werden (2, n.d.).

Da Chip-Analysen und *Real-Time*-PCR unterschiedlich sensitiv sind, sind die absoluten Mengen nicht zu vergleichen. Die Relationen der Expression in unstimulierten hMSC; Osteoblasten und Adipozyten waren jedoch sehr ähnlich. So war die Expression von DKFZ nach der Affymetrix-Analyse 1,6 mal höher als in unstimulierten hMSC. Die quantitative PCR führte zum gleichen Faktor. Die Expression von KCa4 war nach der Affymetrix-Methode in unstimulierten hMSC 1,03-fach erhöht gegenüber Osteoblasten.

Die *Real-Time*-PCR ergab eine Erhöhung von 2,66. Beide Methoden können also eingesetzt werden, um eine Gensignatur zu überprüfen.

Der Differenzierungsstatus humaner mesenchymaler Stammzellen in Richtung Osteoblasten und Adipozyten könnte demnach mittels dieser Gensignatur aus 8 Genen ermittelt werden. Eine Analyse von der gebildeten Extrazellulärmatrix bei Osteoblasten oder den typischen Lipidvakuolen bei Adipozyten sollte jedoch zusätzlich erfolgen (siehe Abb. 10).

Diese Ergebnisse bilden die Grundvoraussetzung für das Arbeiten mit humanen mesenchymalen Stammzellen und somit für alle folgenden Versuchsreihen. Ohne den Nachweis, daß es sich tatsächlich um multipotente Zellen handelt, wären die nun folgenden Ergebnisse nicht haltbar, da es sich z. B. auch um Osteoblasten aus dem Knochenmark handeln könnte.

3.2 Rekrutierung von hMSC am Beispiel des HGF/c-met Systems

Die Beteiligung mesenchymaler Stammzellen an der Geweberegeneration wird immer wieder diskutiert. Dabei stellt sich die Frage nach dem Faktor, der für die Rekrutierung der Stammzellen aus ihren Nischen zu dem Gewebedefekt verantwortlich ist. Da der Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF) in Wunden in erhöhter Konzentration vorliegt und er mito- und motogene Effekte auf verschiedenste Zelltypen ausübt, wurde HGF und dessen spezifischer Rezeptor c-met in hMSC untersucht.

3.2.1 hMSC exprimierten HGF und c-met auf RNA- und Protein-Ebene

Für die Detektion von HGF- und c-met-spezifischen Transkripten wurde eine RT-PCR durchgeführt.

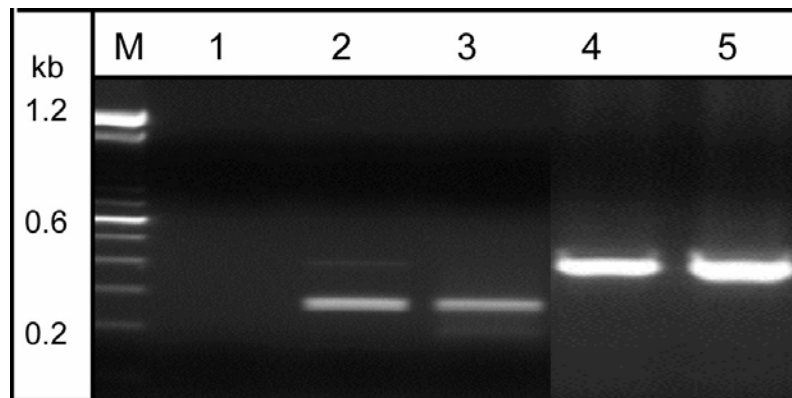


Abbildung 12: Humane MSC exprimierten HGF und den Rezeptor c-met auf RNA-Ebene. Amplikon des HGF-Gens (266 bp) und des c-met-Gens (400 bp); M) Marker (100-bp-Leiter); 1) Negativkontrolle (ohne cDNA); 2) hMSC-cDNA, HGF; 3) Leberzell-cDNA (Positivkontrolle), HGF; 4) hMSC-cDNA, c-met; 5) Mesothelzell-cDNA (Positivkontrolle), c-met

Humane mesenchymale Stammzellen exprimierten sowohl den Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF), als auch dessen spezifischen Rezeptor c-met auf RNA-Ebene (Abb. 12).

Die Detektion des Rezeptors auf Protein-Ebene durch Western-Blot Analyse wies eine 145 kDa große Bande nach, die das c-met Protein repräsentiert (Abb. 13). Durch Vorinkubation des spezifischen Antikörpers mit einem Blockierpeptid wurde die Intensität der Bande stark reduziert. Dies zeigt, daß es sich um eine spezifische Bindung des Antikörpers an das c-met Protein handelt.

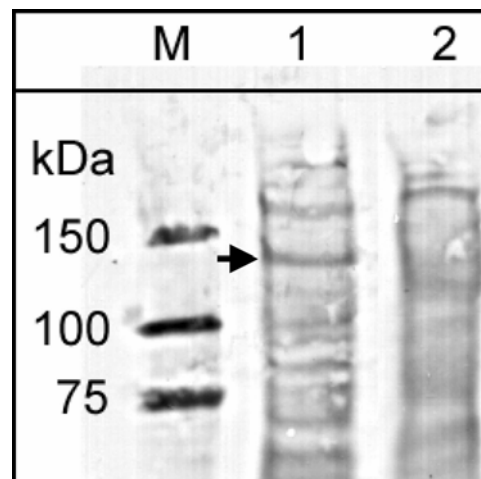


Abbildung 13: Detektion des Rezeptors c-met auf Proteinebene. Die Westernblot-Analyse von hMSC-Proteinlysaten mit einem c-met Antikörper zeigte eine Proteinbande von 145kDa Größe, welche den Rezeptor repräsentiert (Bahn 1, Pfeil). Eine vorherige Inkubation mit einem spezifischen c-met Antikörper Blockierpeptid verhinderte die Detektion der 145 kDa Bande (Bahn 2). M) Molekulargewichtsmarker

Die c-met Expression auf Proteinebene konnte durch eine immunhistochemische Färbung bestätigt werden.

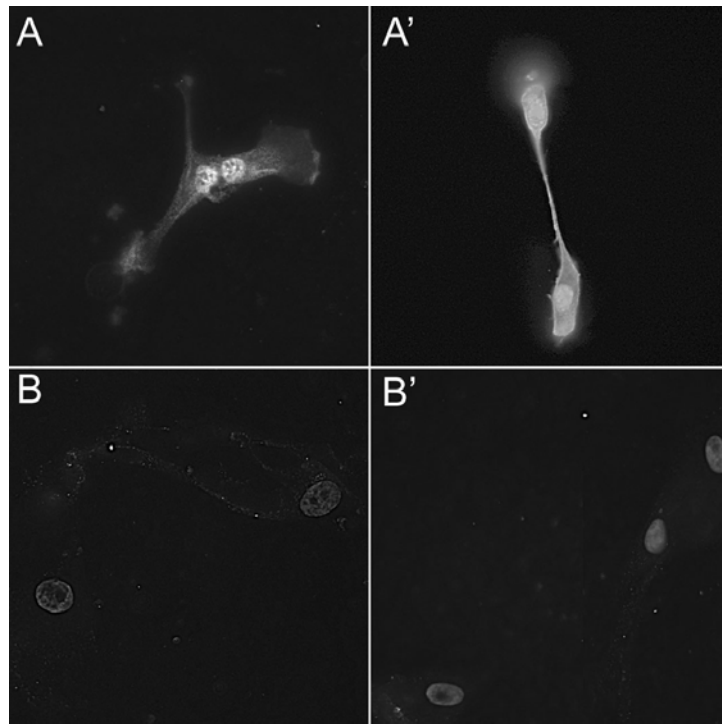


Abbildung 14: Der HGF-Rezeptor c-met ist auf der Zelloberfläche detektierbar.

In der Immunhistochemie sind die mesenchymalen Stammzellen mit einem spezifischen Antikörper gegen c-met inkubiert worden (A, A') bzw. mit dem gleichen Antikörper, welcher zuvor mit Blockierpeptid behandelt wurde (B, B'). Über 95% der Zellen zeigten ein positives Signal, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Diese Abbildung zeigt eine schwach positive (A) und eine stark positive (A') Zelle. Die Zellkerne sind mit DAPI gegengefärbt.

Abbildung 14 zeigt, daß humane mesenchymale Stammzellen ein positives Signal für c-met auf der Zelloberfläche trugen. Eine Vorinkubation des Antikörpers führte zum völligen Verlust des Signals, was die Spezifität des Antikörpers beweist. Die Intensität des Signals war zwar verschieden stark, allerdings lag keine lokale Anhäufung (*Clustering*) des Rezeptors vor (sogenannte *hot spots*). Er war relativ homogen über die Zelloberfläche verteilt. Mehr als 95% der Zellen exprimierten den c-met-Rezeptor in unterschiedlich starkem Ausmaß.

Die Expression von HGF auf Protein-Ebene wurde mittels ELISA ermittelt, wobei die Kulturüberstände von unstimulierten mesenchymalen Stammzellen und von mit Zytokinen stimulierten mesenchymalen Stammzellen untersucht wurden.

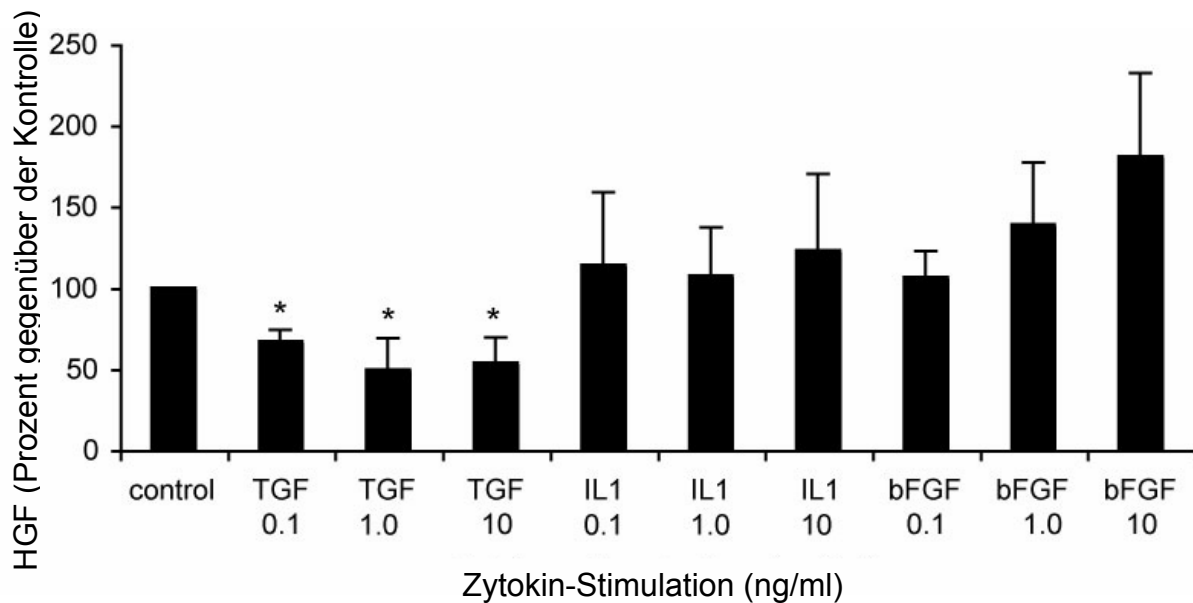


Abbildung 15: Die HGF-Expression in hMSC ist zytokinabhängig.

Humane mesenchymale Stammzellen wurden für 24 Stunden mit TGF- β , IL-1 β und bFGF in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Die HGF-Expression wurde mittels ELISA ermittelt. Diese Abbildung zeigt Mittelwerte von hMSC dreier Spender, jeweils in Doppelbestimmung. * $p < 0,05$

Die gemessene Menge an HGF bei 2×10^4 unstimulierten hMSC lag zwischen 770 und 2000 pg/ml und wies leichte spenderspezifische Unterschiede auf. Die Tendenz nach einer 24-stündigen Stimulation mit TGF- β , IL-1 β und bFGF war allerdings bei allen Spendern gleich. TGF- β senkte die HGF-Expression, während IL-1 β und bFGF keinen entscheidenden Einfluß auf die HGF-Expression ausübten. TGF- β führte in einer Konzentration von 0,1 ng/ml zu einer Verminderung von $33 \pm 7\%$. TGF- β -Konzentrationen von 1 und 10 ng/ml führten zu einer Herabregulation der HGF-Expression um $54 \pm 17\%$ bzw. $50 \pm 19\%$. Diese Herabregulation war in allen TGF- β -Konzentrationen signifikant. IL-1 β hatte in keiner Konzentration einen signifikanten Effekt auf die HGF-Expression. Auch bFGF führte in Konzentrationen von 0,1 und 1 ng/ml nicht zu einer signifikanten Änderung, obwohl eine Konzentration von 10 ng bFGF/ml Medium die HGF-Expression gegenüber den unstimulierten Zellen auf $180 \pm 51\%$ steigerte ($p = 0,11$).

3.2.2 HGF verstärkte die Migration humaner mesenchymaler Stammzellen

Nach der Detektion des HGF-Rezeptors auf hMSC wurde dieser mit Hilfe eines *in vitro* Wundmodels auf seine Funktion überprüft. Hierzu wurde mittels einer Pipettenspitze ein Kratzer definierter Größe in einen konfluenten hMSC-Monolayer

gesetzt und das daran anschließende Einwandern der Zellen in das zellfreie Areal nach 24 Stunden photographisch dokumentiert.

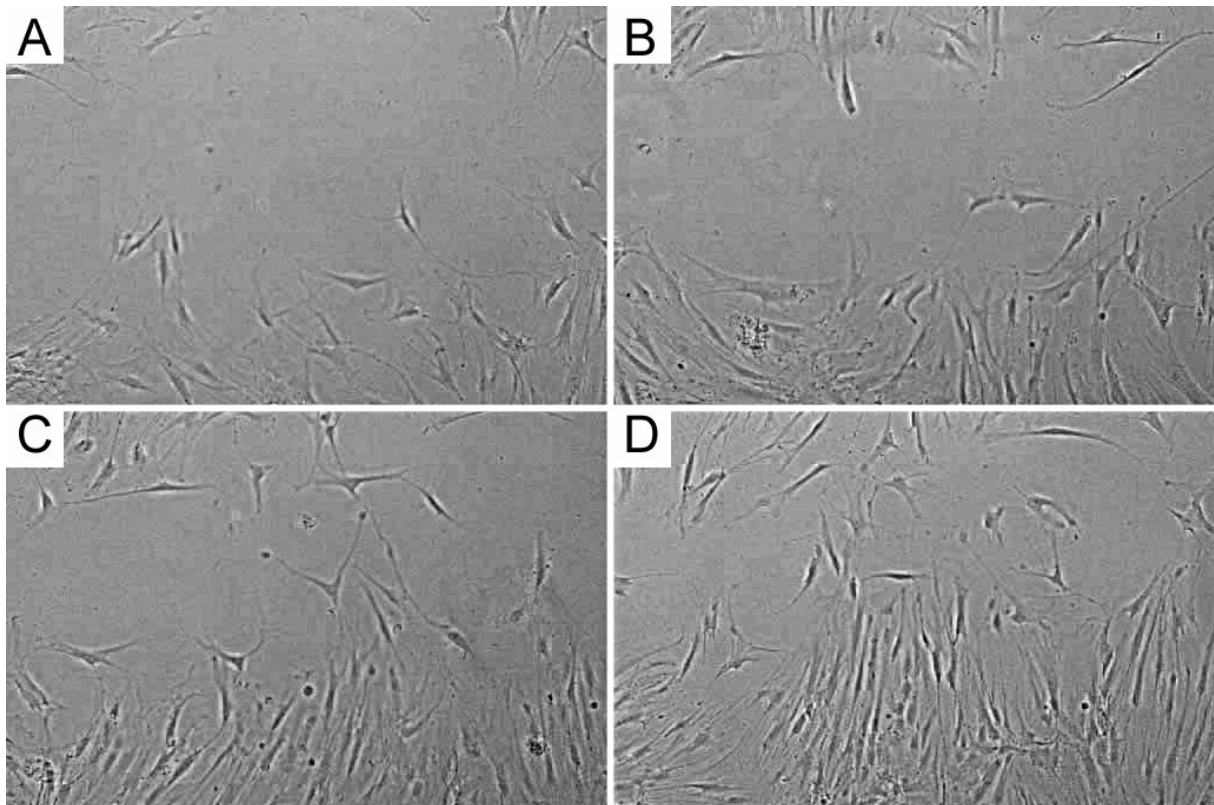


Abbildung 16: HGF stimulierte die Migration von mesenchymalen Stammzellen. Mittels einer Pipettenspitze wurde ein Kratzer in einen konfluenten hMSC Monolayer gesetzt („*in-vitro*-Wunde“) und 24 Stunden mit HGF stimuliert. A) 0 ng/ml; B) 25 ng/ml; C) 50 ng/ml; D) 75 ng/ml.

Im konfluenten Bereich befanden sich 150 hMSC/mm^2 . Der *in vitro* Wundbereich war zellfrei. Die Rekolonialisierung dieses zellfreien Areals verlief schneller unter Zugabe von HGF. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig. In der Kontrolle (ohne HGF, Abb. 16A) war nach 24 Stunden im Kratzerbereich nur $1,07 \text{ Zellen/mm}^2$ zu detektieren. Bei 25 und 50 ng/ml HGF befanden sich hingegen 1,6 bzw. 3,2 Zellen/mm^2 im zuvor zellfreien Areal (Abb. 16B, C). Der Zusatz von 75 ng/ml bewirkte sogar eine 8-fache Migrationssteigerung auf $8,8 \text{ Zellen/mm}^2$ (Abb. 16D).

Somit war ein promigratorischer Effekt von HGF für humane mesenchymale Stammzellen erwiesen. Ob es sich dabei jedoch nur um einen chemokinetischen, oder sogar um einen chemotaktischen Effekt handelte, d. h. ob es sich um eine ungerichtete oder eine gerichtete Migration handelte, war mit diesem *scratch assay* nicht zu ermitteln.

3.2.3 HGF wirkte chemotaktisch auf humane mesenchymale Stammzellen

Der Boyden-Kammer-Versuch, bei dem zwei Kompartimente durch eine poröse Membran voneinander getrennt sind und die Zellen von dem oberen Kompartiment bei Vorhandensein eines Chemoattraktanz im unteren Kompartiment durch die Membran migrieren, dient dem Nachweis gerichteter Migration.

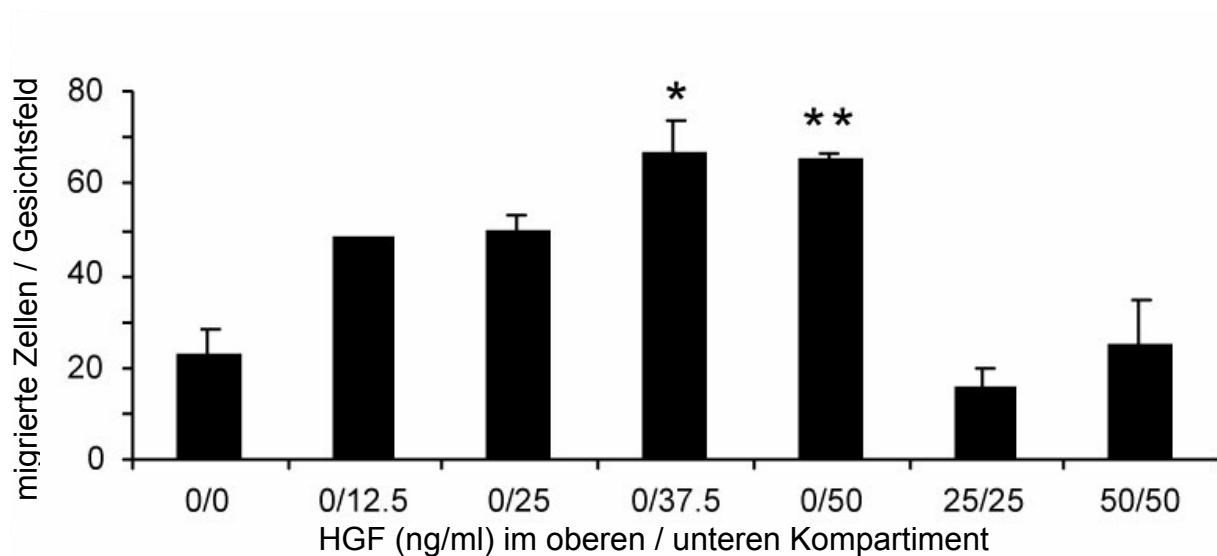


Abbildung 17: HGF wirkte chemotaktisch auf hMSC.

Die Stammzellen wurden in dem oberen Kompartiment einer Boyden-Kammer ausgesät und HGF wurde in das untere bzw. in das untere und das obere Kompartiment hinzugefügt (ng/ml Medium). Die Boyden-Kammern wurden 16 Stunden bei 37°C inkubiert. * $p < 0,005$; ** $p \leq 0,001$

Nach 16 Stunden war im Gegensatz zum Kontrollansatz (ohne HGF) ein mehr als dreifacher Anstieg an migrierten Zellen bei einem Zusatz von 37,5 ng/ml bzw. 50 ng/ml detektiert (Abb. 17). Wenn jedoch in beiden Kompartimenten ein Konzentrationsausgleich vorlag, fiel die Migrationsrate wieder auf die basale Migration (ohne HGF) zurück. Dies ist ein eindeutiger Hinweis auf eine gerichtete, also chemotaktische Migration in Richtung HGF.

3.2.4 HGF inhibierte die Proliferation humaner mesenchymaler Stammzellen

Der im *scratch assay* und Boyden-Kammer-Versuch detektierte promigratorische Effekt könnte theoretisch ein indirekter Effekt sein, welcher auf verstärkte Proliferation als Antwort auf die HGF-Stimulation zurückzuführen ist. Deshalb wurde

die Proliferation humaner mesenchymaler Stammzellen mit und ohne HGF-Stimulation untersucht.

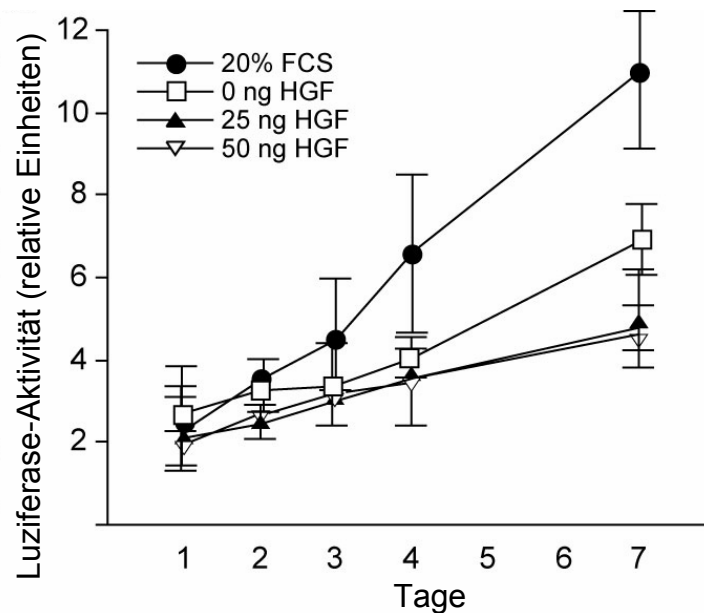


Abbildung 18: HGF inhibiert die Proliferation humaner mesenchymaler Stammzellen.

Der ATP-Gehalt wurde als Maß für die Proliferation der Stammzellen in Abhängigkeit von 0, 25 und 50 ng HGF/ml Medium nach 1, 2, 3, 4 und 7 Tagen ermittelt. Als Positivkontrolle diente Medium mit 20% FKS, während das Stammzellkulturmedium nur 2% FKS beinhaltete. Diese Abbildung zeigt die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, jeweils in Doppelbestimmung.

In Abbildung 18 sind die relativen Luziferaseaktivitäten, welche in Korrelation zur Zellzahl stehen, über einen Zeitverlauf von 7 Tagen dargestellt. Als Positivkontrolle dienten Zellen, welche in Medium mit 20% FKS kultiviert wurden. Diese Kontrolle war notwendig, um auszuschließen, daß sich die Zellen bereits am Proliferationsmaximum befanden, so daß eine Steigerung der Proliferation durch HGF-Stimulation nicht mehr zu detektieren gewesen wäre.

Die Abbildung 18 zeigt, daß die Stammzellen ohne HGF-Stimulation in ihrem Kulturmedium (mit 2% FKS) langsamer proliferierten, als die Zellen der Positivkontrolle. Ein Proliferationsanstieg durch HGF-Stimulation war also prinzipiell möglich. Eine Stimulation mit 25 bzw. 50 ng/ml HGF verminderte allerdings die Proliferationsrate auf $72 \pm 21\%$ bzw. $65 \pm 18\%$ im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Der zuvor beschriebene HGF-vermittelte promigratorische Effekt war demnach nicht auf verstärkte Proliferation zurückzuführen, sondern auf Chemotaxis.

Die hier dargestellten *in vitro* Ergebnisse zeigen, daß HGF ein chemotaktischer Faktor für mesenchymale Stammzellen ist. Die mesenchymalen Stammzellen sollten theoretisch aus ihrer Nische mittels HGF rekrutiert werden können, und so zum Defekt geleitet werden können. Dort würden sie allerdings eine natürliche Barriere, ein Fibrinnetz, vorfinden. Dieses entsteht sofort nach Verwundung im Rahmen der Wundheilungsprozesse. Sollten die hMSC tatsächlich an der Geweberegeneration beteiligt sein, müssten sie die Fähigkeit besitzen, dieses Fibringerüst zu durchbrechen.

3.3 Fibrinolytische Fähigkeiten humaner mesenchymaler Stammzellen

Humane mesenchymale Stammzellen können zu einem Gewebedefekt migrieren. Dort finden sie aber häufig ein dichtes Fibrinnetz vor, welches im Zuge der Wundheilung entsteht. Wenn die hMSC an der Regeneration zu Grunde gegangenen Gewebes beteiligt sein sollen, müssten sie das Fibrinnetz spalten, um tiefer in den Defekt vorzudringen. Deshalb wurden die Enzyme der Fibrinolyse in hMSC untersucht.

In Abbildung 19 sind wesentliche Komponenten des Fibrinolyse-Systems schematisch dargestellt. Die Ergebnisse von Expressionsanalysen mittels RT-PCR sind an den jeweiligen Positionen als Bilder eingefügt.

3.3.1 Humane mesenchymale Stammzellen exprimierten Enzyme der Fibrinkaskade auf RNA-Ebene

Aus Abbildung 19 wird ersichtlich, daß hMSC Schlüsselkomponenten der Fibrinolyse exprimierten. Dabei handelte es sich um den *tissue*-Plasminogen-Aktivator (tPA), den Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA), dessen Rezeptor (uPAR) und den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI). Die Expression von PAI ist für viele Zelltypen beschrieben. Die Serinproteasen uPA und tPA sind allerdings spezifisch für wenige Zelltypen und ihre Expression in Stammzellen wurde bisher nicht beschrieben. Plasminogen wurde nicht von hMSC exprimiert, liegt aber im Plasma in ausreichender Menge vor, um überall im Körper als Initiator für die Fibrinolyse zu dienen.

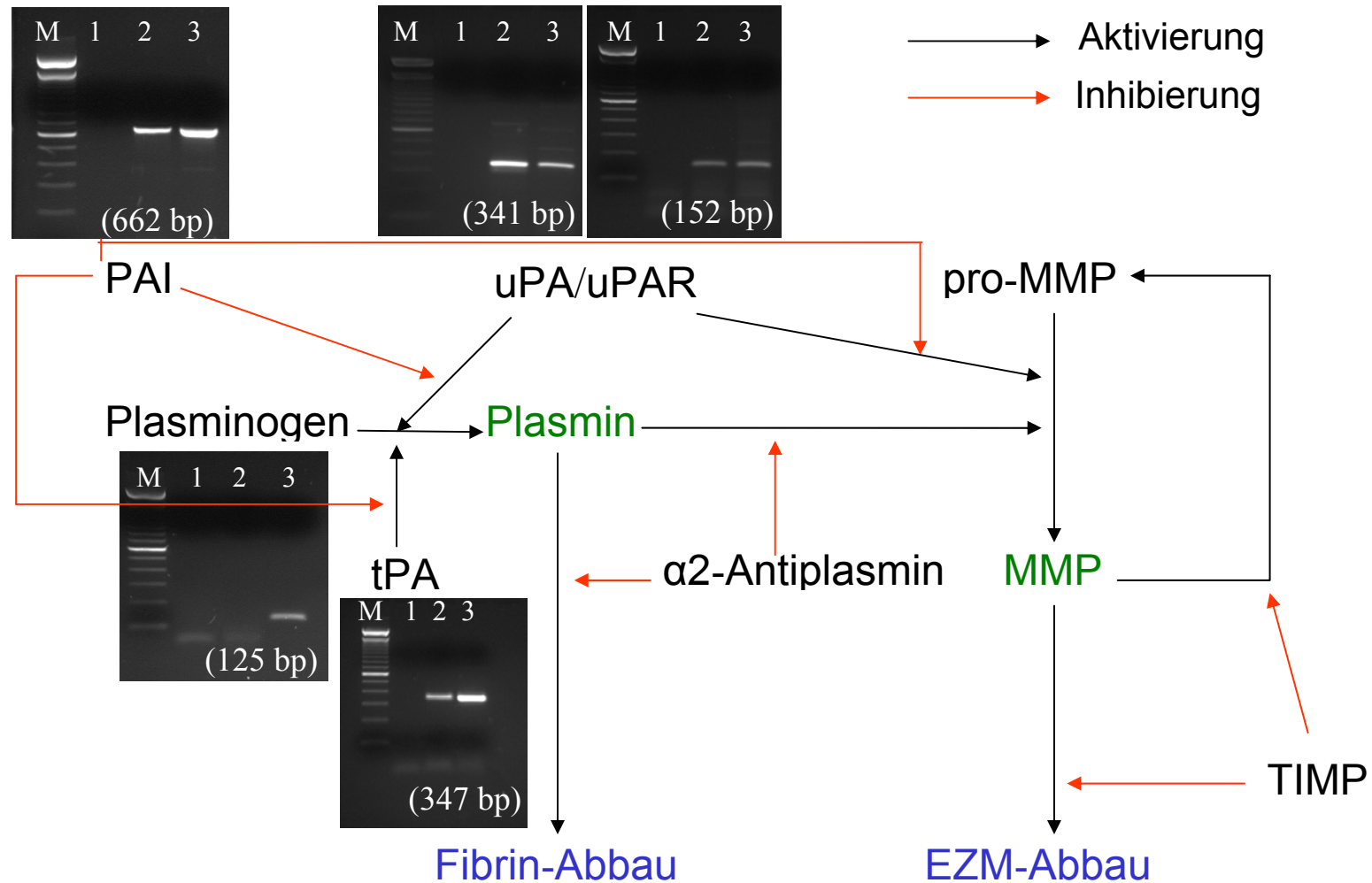


Abbildung 19: Schemazeichnung der fibrinolytischen Kaskade.

Die fibrinolytischen Enzyme haben z. T. aktivierende, z. T. inhibierende Wirkungen auf die Fibrinkaskade, welche zum Abbau von Fibrin und Extrazellulärmatrix führt. In die Schemazeichnung sind Gelfotos von RT-PCRs integriert, welche das Expressionsmuster humaner mesenchymaler Stammzellen in Bezug auf die Enzyme der fibrinolytischen Kaskade darstellen. M) Marker (100-bp-Leiter); 1) Negativkontrolle (ohne cDNA); 2) hMSC-cDNA; 3) Positivkontrolle (HOMC-cDNA)

Die Expression der fibrinolytischen Enzyme unterlag teilweise einer Regulation durch Zytokine, die in der Wundheilung eine Rolle spielen. Es wurde die Wirkung von IL-1 β (Akutphase), bFGF (Proliferationsphase) und TGF- β (Regenerationsphase) auf die Expression fibrinolytischer Enzyme untersucht. Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, wurde die tPA-Expression auf RNA-Ebene durch eine bFGF-Stimulation (10 ng/ml, 24 h) um mehr als das 5-fache erhöht ($p=0,0009$), während die uPA-Expression auf RNA-Ebene nach 24-stündiger Stimulation mit TGF- β (10 ng/ml) um das 2,5-fache anstieg ($p=0,23$). IL-1 hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Expression fibrinolytischer Enzyme in hMSC.

3.3.2 Humane mesenchymale Stammzellen exprimierten Enzyme der Fibrinkaskade auf Protein-Ebene

Die Enzyme der fibrinolytischen Kaskade waren nicht nur auf RNA-, sondern auch auf Protein-Ebene nachweisbar. TPA, uPA und uPAR konnten aus Überständen von unstimulierten und mit Zytokinen stimulierten hMSC detektiert werden. Abbildung 21 bestätigte die Aussagen der *Real-Time*-PCR Ergebnisse aus Abbildung 20. bFGF steigerte die tPA-Expression ($p=0,19$), während TGF- β die uPA-Expression verstärkte ($p=0,3$). Auch auf Protein-Ebene hatte IL-1 β keinen signifikanten Einfluß auf die Expression der fibrinolytischen Enzyme. Die Standardabweichungen der ELISA-Daten (Abb. 21) waren wesentlich größer als die der *Real-Time*-PCR Ergebnisse, da bei dem ELISA nicht relative, sondern absolute Mengen gemessen wurden und große Spenderunterschiede mit erfaßt wurden. Die Tendenzen nach einer Zytokinstimulation waren allerdings immer gleich.

Der Nachweis, daß hMSC die fibrinolytischen Enzyme tPA, uPA und uPAR auf RNA- und Protein-Ebene exprimierten bedeutet noch nicht, daß die Proteine auch aktiv waren. Aus diesem Grund wurde ein funktioneller Assay durchgeführt, bei dem überprüft wurde, ob die gebildeten Proteine tatsächlich Plasminogen aktivieren können.

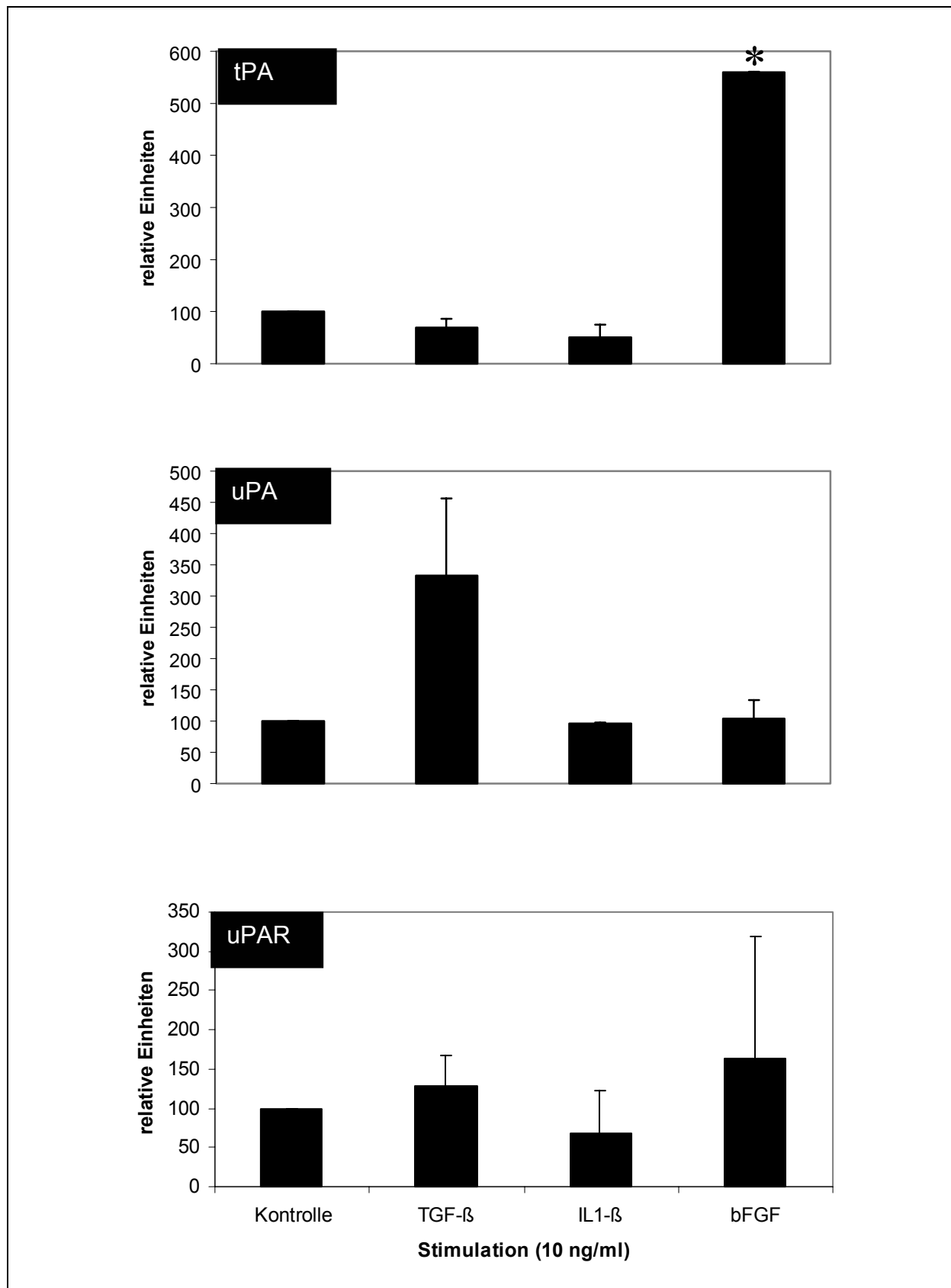


Abbildung 20: Enzyme der fibrinolytischen Kaskade sind zytokinreguliert. *Real-Time* PCR mit cDNA aus unstimulierten hMSC und aus hMSC, die mit jeweils 10 ng/ml TGF- β , IL-1 β und bFGF stimuliert wurden. Die Abbildung zeigt gemittelte und normierte Werte aus drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$

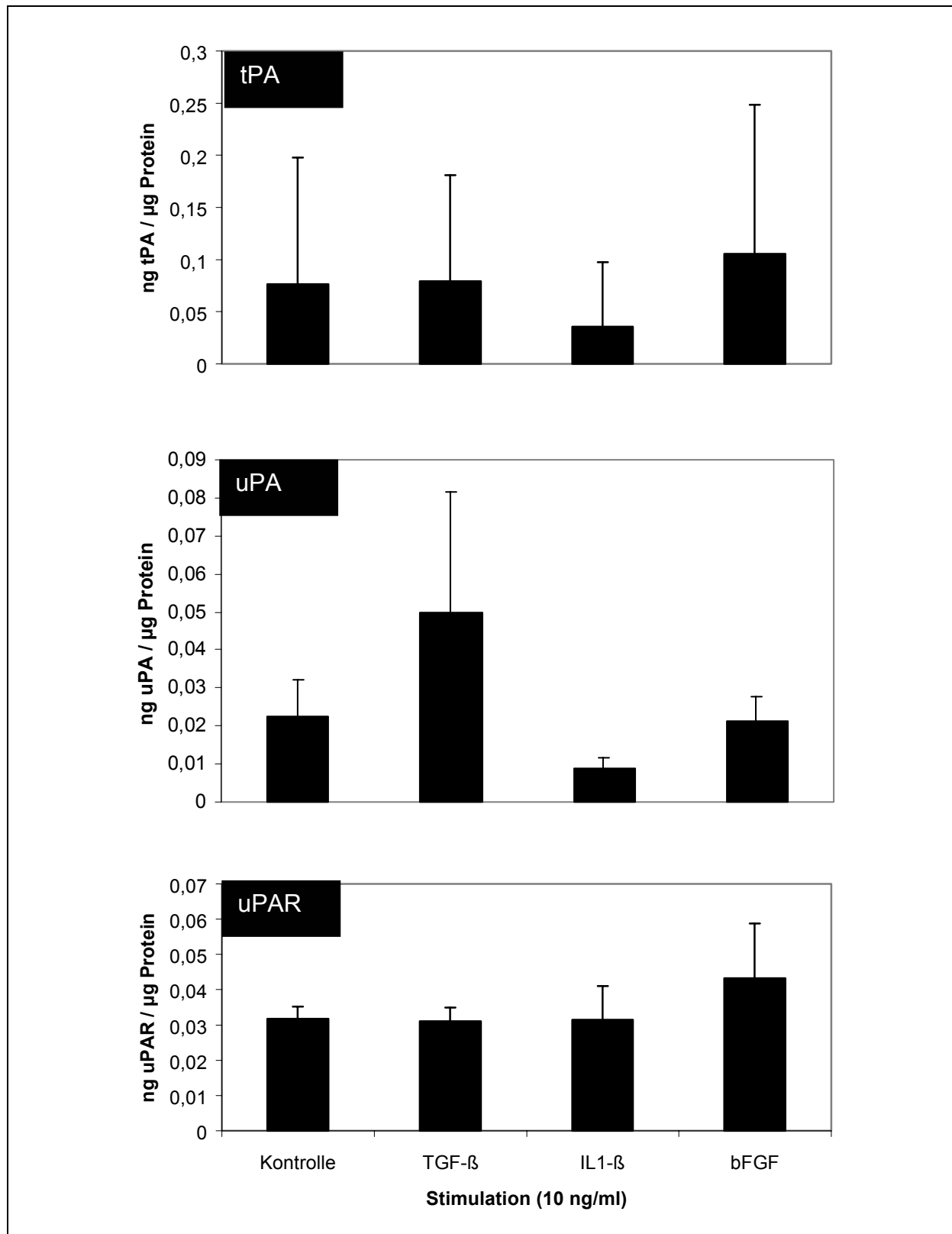


Abbildung 21: Enzyme der fibrinolytischen Kaskade sind zytokinreguliert. ELISA mit Überständen von unstimulierten hMSC und von hMSC, die mit jeweils 10 ng/ml TGF- β , IL-1 β und bFGF stimuliert wurden. Die Abbildung zeigt gemittelte Werte aus drei unabhängigen Experimenten.

3.3.3 Die fibrinolytischen Enzyme uPA und tPA kamen als aktive Proteine in humanen mesenchymalen Stammzellen vor

Die Aktivität der im ELISA nachgewiesenen Enzyme wurde mittels eines Zymogramms nachgewiesen. Die Proteinlysate wurden gelelektrophoretisch nach Größe aufgetrennt und dann auf ein Gel geblottet, welches Plasminogen und als Substrat Casein enthielt. Bei Vorhandensein von fibrinolytisch aktiven Enzymen in den Proteinlysaten wird das Plasminogen in seine aktive Form Plasmin gespalten und kann Casein verdauen. An diesen Stellen konnte das Gel dann nicht mehr von Amido schwarz angefärbt werden. In Abbildung 22 erkennt man aufgehellte Banden, dort wo Casein degradiert wurde. Die kontrastreichen runden Muster stammen von Luftblasen im Gel, die unglücklicherweise das Bandenmuster teilweise verdecken.

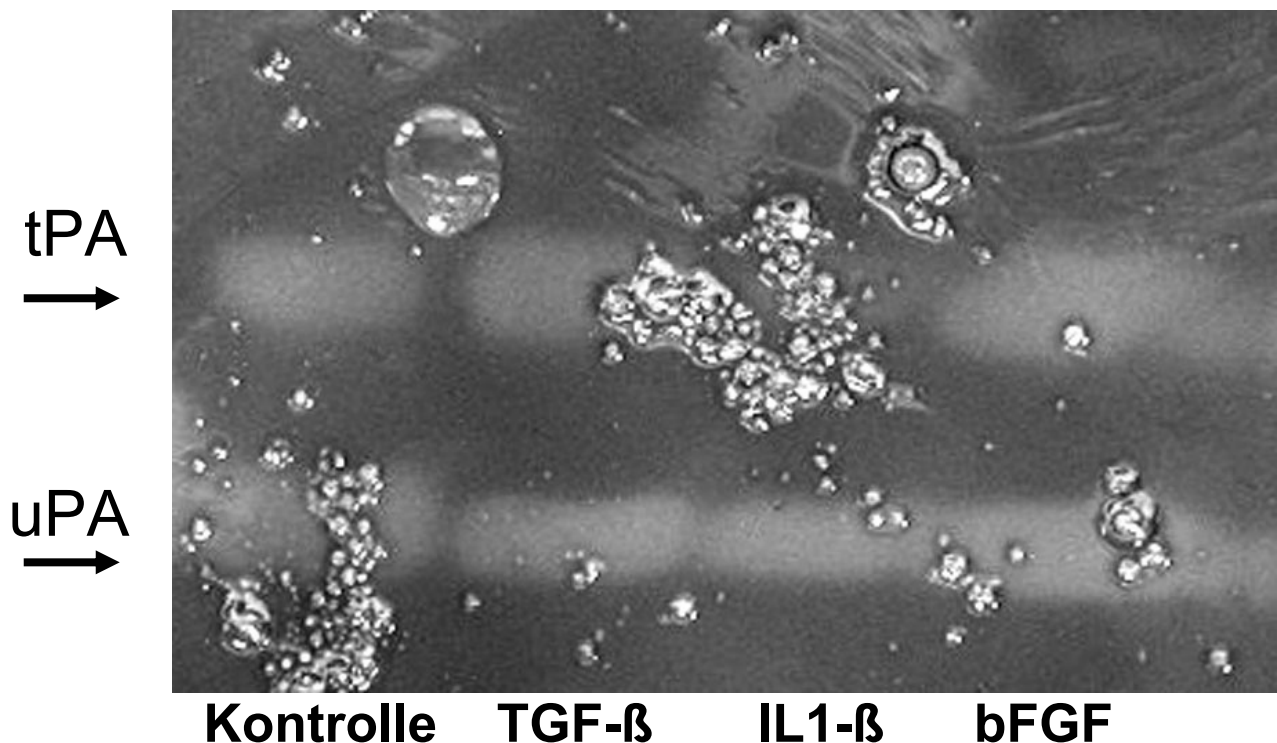


Abbildung 22: uPA und tPA lagen in hMSC in ihrer aktiven Form vor.

Die Proteinlysate wurden nach Größe aufgetrennt und auf ein Caseinagargel geblottet, welches Plasminogen enthält. Überall dort, wo fibrinolytisch aktive Enzyme vorhanden waren, wurde Plasminogen aktiviert und Casein abgebaut. Proteinlysate unstimulierter und mit Zytokinen stimulierter (jeweils 10 ng/ml) mesenchymaler Stammzellen enthielten Enzyme, welche Plasminogen aktivierten und der Größe nach zu urteilen tPA und uPA entsprachen.

Bei den beiden Banden handelte es sich der Größe nach um tPA (70 kDa) und uPA (31-54 kDa). Obwohl die Luftblasen, die beim Transfer des aufgetrennten Proteinlysates von einem Gel auf das andere entstanden, die Banden teilweise verdeckten, waren sowohl bei den Proteinlysaten der unstimulierten, als auch bei den Proteinlysaten der stimulierten Zellen zwei Banden zu detektieren. Somit lagen uPA und tPA in ihrer aktiven Form in hMSC vor.

Demnach können mesenchymale Stammzellen das Fibringerüst in einer Wunde abbauen und mit Hilfe des uPA-Rezeptors und PAI die Adhäsion und Migration beeinflussen.

Diesen *in vitro* Ergebnissen nach zu urteilen können mesenchymale Stammzellen nicht nur in Richtung Defekt migrieren, sondern besitzen auch die Fähigkeit das dort existierende Fibringerüst abzubauen. Eine Beteiligung mesenchymaler Stammzellen an der Geweberegeneration ist demnach möglich. Sie könnten in den Defekt eindringen, dort proliferieren und differenzieren. Doch stellt sich die Frage, ob das Differenzierungspotenzial auch bestehen bleibt, wenn sie durch *Tissue Engineering* mit einem Trägermaterials direkt in die Wunde eingebracht werden, oder ob das Material die Stammzeleigenschaften hemmt? Diese Fragestellung wird im nächsten Abschnitt behandelt.

3.4 Zytokompatibilität und Differenzierbarkeit humaner mesenchymaler Stammzellen auf Formgedächtnismaterialien

Materialien, welche im Bereich des *Tissue Engineerings* in Kombination mit mesenchymalen Stammzellen als Trägermaterial (*scaffold*) dienen sollen, müssen für die hMSC zytokompatibel sein und sollten deren Differenzierungspotenzial nicht negativ beeinflussen. Um die Bioverträglichkeit der hier erstmals getesteten Formgedächtnispolymere zu untersuchen, wurden diese zunächst in Anlehnung an die europäische Norm EN ISO 10993-5 (Biologische Beurteilung von Medizinprodukten – Prüfungen auf *in vitro*-Zytotoxizität) untersucht. Es wurden alle in der nachstehenden Tabelle aufgeführten Materialien mit der L929-Maus-Fibroblastenzelllinie auf Zytokompatibilität/Zytotoxizität überprüft.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Formgedächtnisbasismaterialien

Material	Zusammensetzung	Charge
1	PCL-10k-co-PPDL-2k (60/40)	460TP02
2	PU-PPDL-3k (100)	623ZB03
3	P-DL-LA-6k-co-PPDL-3k (50/50)	922ZB02
4	PCL-10k-co-PPDL-3k-co-PEG-8k (50/40/10)	661ZB03
5	PPDL-3k-co-PCL-10k-co-PEG-8k (40/55/05)	662ZB03
6	PPDL-3k-co-PCL-10k-co-PEG-2k (40/50/10)	663ZB03
7	PCL-10k-co-PPDL-3k (50/50)	619ZB02
8	PCL-10k-co-PPDL-3k (60/40)	272TP02
9	PCL-10k-co-PPDL-3k (60/40)	276EH02
10	PU-PCL-10k (100)	620ZB02
11	PCL-4k-co-PPDL-3k (60/40)	482TP02
12	PCL-2k-co-PPDL-3k (60/40)	908TP02
13	PCL-2k-co-PPDL-3k (50/50)	1450ZB04
14	PCL-2k-co-PPDL-3k (60/40)	1451ZB04
15	PCL-2k-co-PPDL-3k (70/30)	1452ZB04
16	PCL-2k-co-OXD-3k (60/40)	1104TP02
17	PCL-10k-DMA-Netzwerk	277TP02

Zum Einsatz kamen insgesamt 17 Polymere (Tab. 1). Die 17 Polymere setzen sich aus verschiedenen Monomeren in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen zusammen. Bei den Monomeren handelt es sich um Polycaprolakton (PCL), Polypentadecanolid (PPDL), Polyethylenglykol (PEG), Polyurethan (PU), N,N-Dimethylacrylamid (DMA) und Oxadiazol-Derivat (OXD).

Die Zusammensetzung trägt entscheidend zu den Formgedächtniseigenschaften des Materials bei. Es ist beispielsweise möglich, den Zeitraum, den das Material benötigt, um von der temporären in die permanente Form zu wechseln, mit Hilfe des Mischungsverhältnisses zu variieren.

3.4.1 Die Formgedächtnismaterialien unterschieden sich in ihren hydrophilen/hydrophoben Eigenschaften

Die Oberflächeneigenschaften eines Materials tragen entscheidend dazu bei, ob ein Material zellverträglich ist oder nicht. Hydrophile bzw. hydrophobe Eigenschaften beeinflussen das Adhärenzverhalten der Zellen auf dem Material.

Zur Bestimmung der Hydrophilie der Polymere wurde am Institut für Lasertechnik der RWTH Aachen eine Kontaktwinkelmessung durchgeführt.

Tabelle 2: Kontaktwinkel σ der Basismaterialien

Die Materialien lassen sich in hydrophob und hydrophil einteilen. Einige befanden sich in einem grenzwertigen Bereich zwischen hydrophob und hydrophil. Als Kontrollen dienten PDMS-Folien. Die unbehandelte PDMS-Folie war hydrophob (*), die plasmabehandelte hydrophil (**).

Material	Kontaktwinkel (°)	hydrophob	hydrophil	grenzwertig
1	74,3±0,63		X	
2	80,25±2,20			X
3	78,65±1,41			X
4	37,75±6,74		X	
5	Nicht meßbar!		X	
6	43,10±26,24		X	
7	72,66±4,47		X	
8	79,23±1,63			X
9	75,83±2,02		X	
10	77,15±0,44		X	
11	72,21±2,75		X	
12	Nicht meßbar!			
13	101,92±1,94	X		
14	97,88±3,72	X		
15	94,45±3,86	X		
16	79,68±5,41			X
17	75,9±1,29		X	
PDMS*	118,80±8,80	X		
PDMS**	54,00±15,10		X	

Je größer der Kontaktwinkel, desto hydrophober ist das Material. Die Zusammensetzung der Polymere hatte einen entscheidenden Einfluß auf die Hydrophilie. So bewirkte beispielsweise die Komponente PEG, daß das Material hydrophiler wurde (vergleiche Material 1 und 4). Die Kontaktwinkel der Materialien 5 und 12 waren nicht messbar (Tab. 2); Aufgrund der Form des Wassertropfens konnten die Materialien jedoch als extrem hydrophil eingestuft werden (Abb. 23).

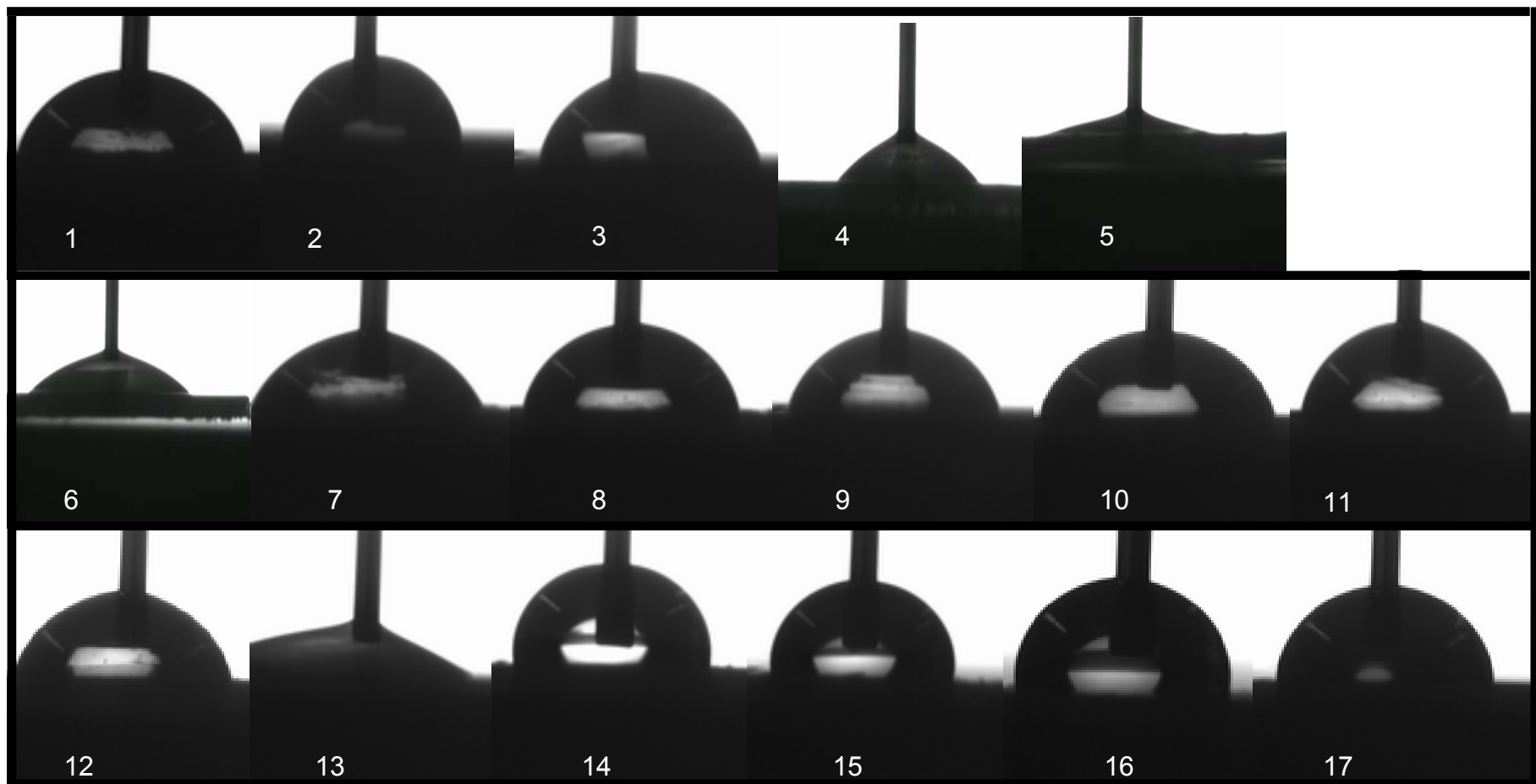


Abbildung 23: Kontaktwinkelmessung der Formgedächtnispolymere 1 bis 17.
Hydrophobe Materialien lassen den Wassertropfen kugelig erscheinen, hydrophile abgeflacht.

3.4.2 Die Formgedächtnismaterialien unterschieden sich in ihrer Zytokompatibilität/Zytotoxizität

Als Kontrolle für die Biokompatibilitätstests mit L929-Mausfibroblasten im direkten und indirekten Materialkontakt dienten inerte Glasronden für die Zellkultur.

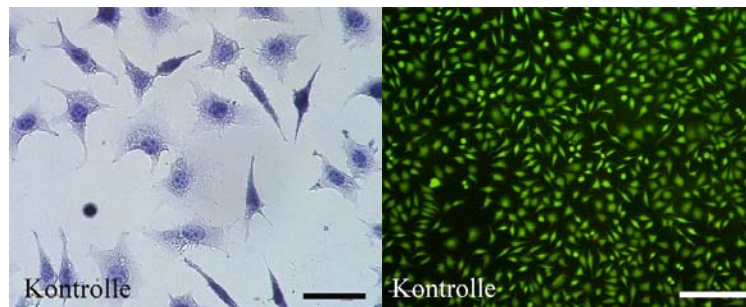


Abbildung 24: Hämalanfärbung (links, Skala 50 µm) und Vitalfärbung (rechts, Skala: 200 µm) der Kontrollzellen auf Glasronden.

In den Kontrollansätzen zeigten die L929-Zellen auf Glasronden in einer Hämalanfärbung (Abb. 24) eine charakteristische Fibroblasten-Morphologie mit deutlichen Fortsätzen. Es zeigte sich eine scharfe Abgrenzung von Zellkern zu Zytoplasma, eine unauffällige Kern-Plasma-Relation, eine deutliche Abgrenzung des Zytoplasmas durch die Zellmembran und keine ungewöhnliche Vakuolisierung oder Einschlüsse.

Die Vitalfärbung (Abb. 24, grüne Fluoreszenz) zeigte, daß die Zellen vital waren und einen homogenen Zellrasen ausbildeten. Die Anzahl toter Zellen (rote Zellen) lag deutlich unter 5%. Die Mitoserate lag zwischen 3 bis 5%.

Im Folgenden sind die Hämalan- und Vitalfärbungen der Biokompatibilitätstests aller 17 Materialien im direkten Kontakt mit L929-Mausfibroblasten dargestellt.

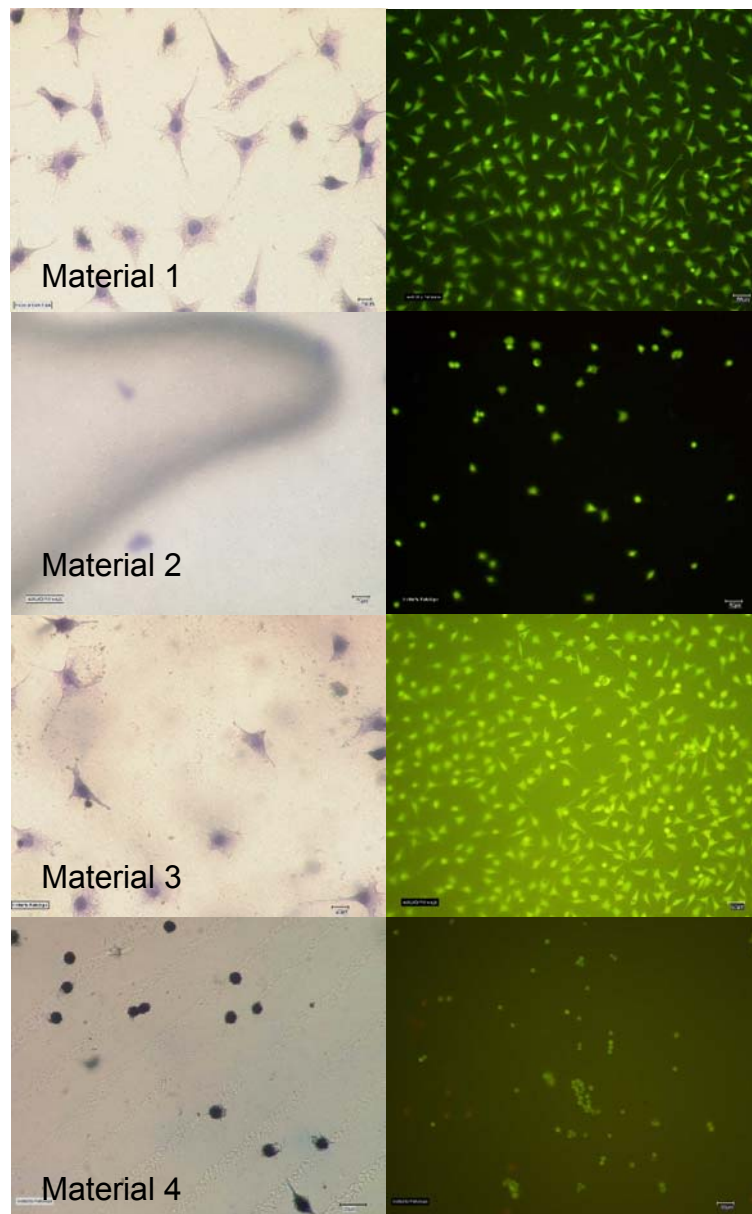


Abbildung 25: Hämalaunfärbung (links) und Vitalfärbung (rechts) und im direkten Test mit den Materialien 1 bis 4.

Die L929-Zellen waren auf Material 1 und 3 adhären, gut gespreitet und vital. Auf Material 2 waren die L929-Zellen jedoch nur schwach adhären, abgekugelt, aber vital. Der direkte Test mit Material 4 führte zu schwach adhären, abgekugelten (verklumpten) und teilweise toten Zellen.

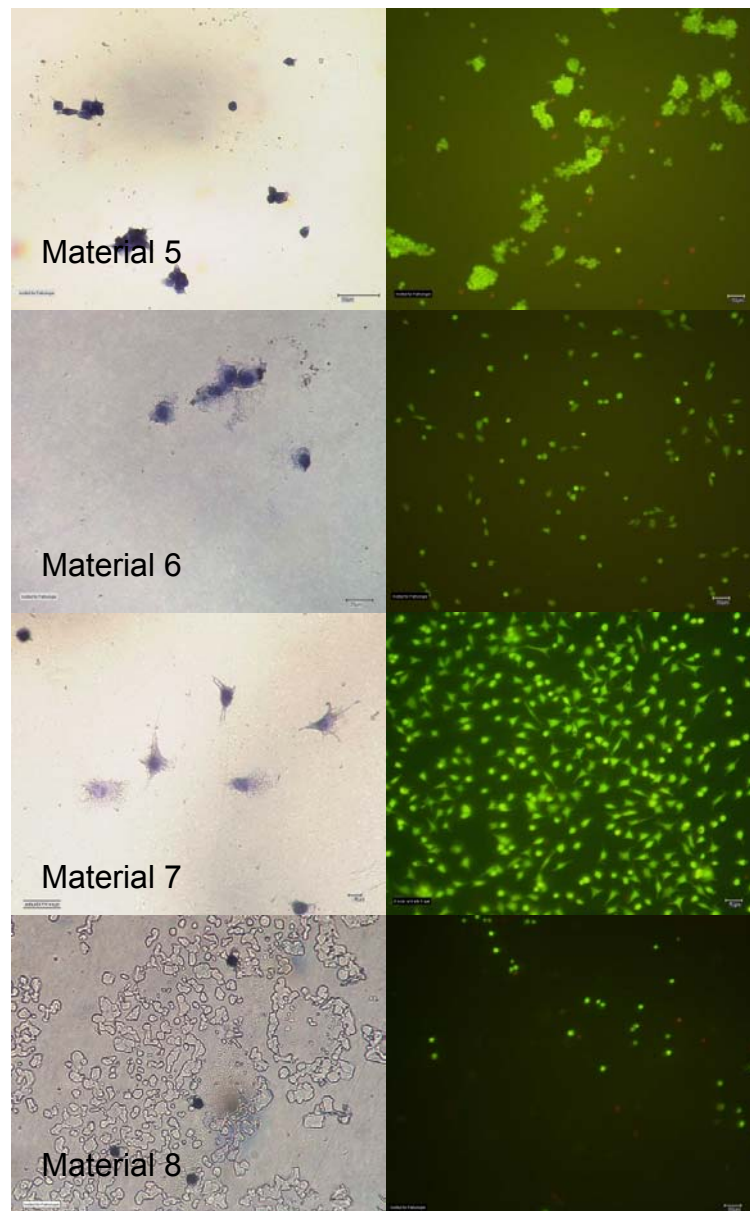


Abbildung 26: Hämalaunfärbung (links) und Vitalfärbung (rechts) im direkten Test mit den Materialien 5 bis 8.

Die L929-Fibroblasten waren auf Material 5 nur schwach adhären, abgekugelt und lagen in Clustern vor (verklumpt). Auf Material 6 und 8 waren die Zellen ebenfalls schwach adhären und größtenteils abgekugelt. Es kam jedoch nicht zur Clusterbildung. Die L929-Zellen waren auf Material 7, ähnlich dem Material 1 und 3 adhären, gut gespreitet und vital.

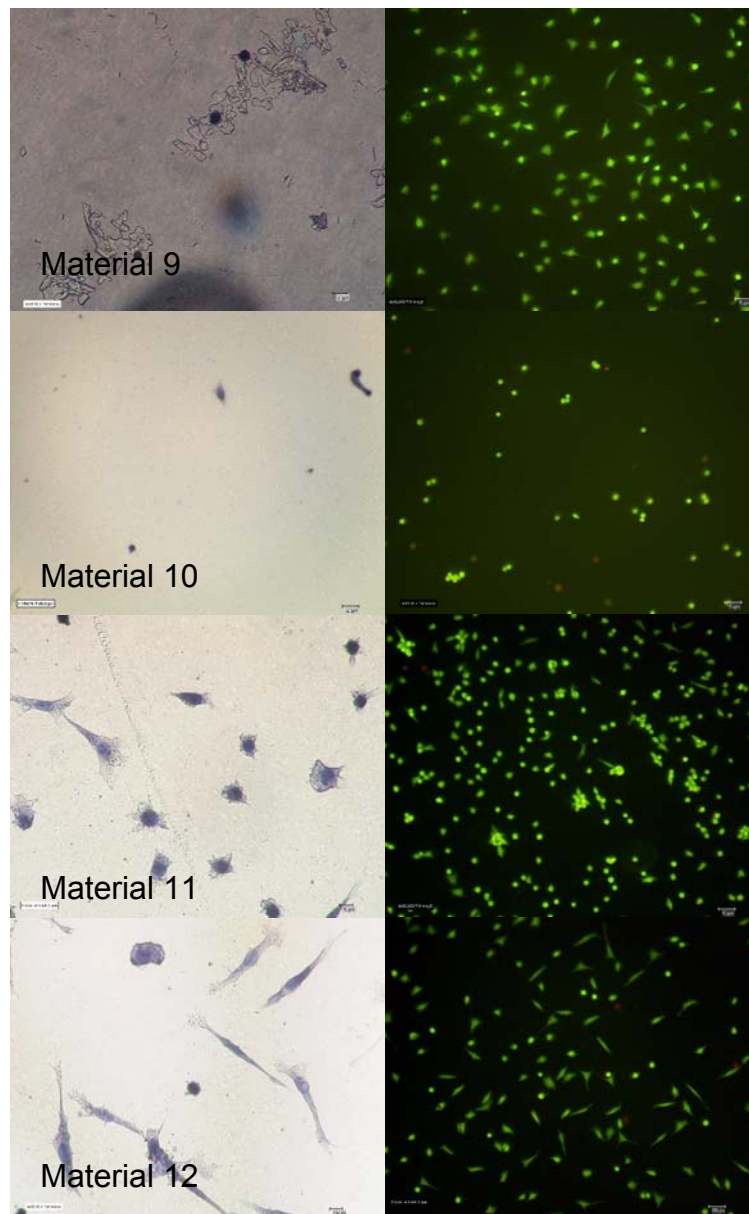


Abbildung 27: Hämalaunfärbung (links) und Vitalfärbung (rechts) im direkten Test mit den Materialien 9 bis 12.

Die Materialien 9, 11 und 12 zeigten im direkten Test adhärente, vitale, jedoch teilweise abgekugelte Zellen. Auf Material 11 lagen die Zellen außerdem teilweise in Clustern vor. Morphologisch waren die L929-Mauszellen auf Material 12 untypisch spindelförmig gespreitet. Auf Material 10 waren die L929-Zellen abgekugelt, nur teilweise vital und in sehr geringer Dichte vorhanden.

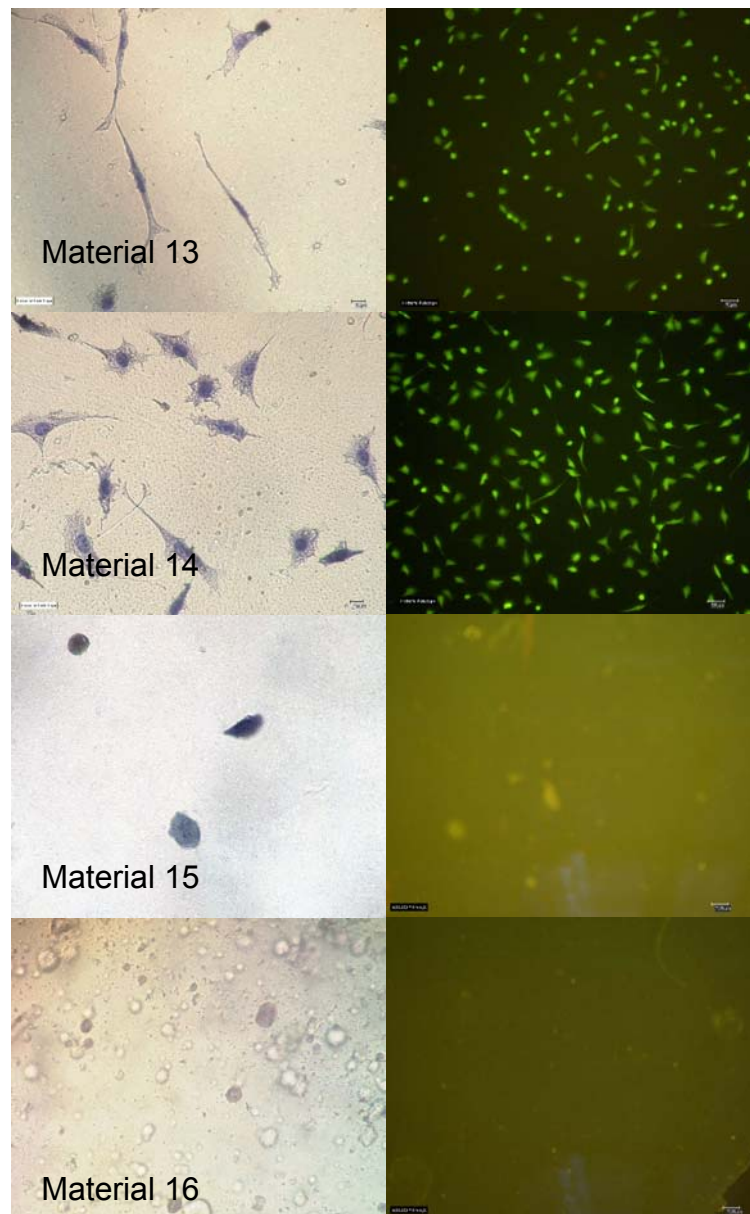


Abbildung 28: Hämalaunfärbung (links) und Vitalfärbung (rechts) im direkten Test mit den Materialien 13 bis 16.

Auf den Materialien 13 und 14 waren die Zellen adhärent, dicht verteilt und vital. Die Zellen auf Material 13 waren allerdings untypisch spindelförmig gespreitet.

Die Materialien 15 und 16 führten zu abgekugelten Zellen in sehr geringer Dichte und Vitalität.

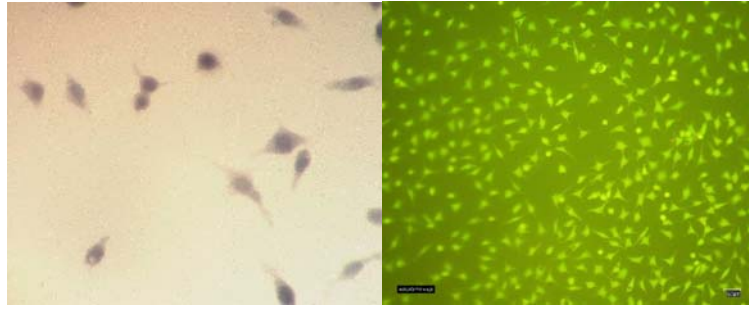


Abbildung 29: Hämalaunfärbung (links) und Vitalfärbung (rechts) im direkten Test mit Material 17.

Material 17 bewirkte, ähnlich wie die Materialien 1, 3 und 7 eine hohe Zelldichte, sowie adhärente und vitale Zellen, die gut gespreitet sind.

Die 17 Formgedächtnispolymere unterschieden sich im direkten Test mit L929-Mausfibroblasten in ihrer Zytokompatibilität (Abb. 25-29). Abbildung 30 und Tabelle 3 fassen die Ergebnisse des direkten Tests zusammen.

Für den indirekten Biokompatibilitätstest wurden die Materialien zuvor 24 Stunden mit Medium extrahiert und die Extrakte wurden dann zu den L929-Zellen auf Glasronden gegeben. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen (Abb. 24) gab es keine signifikanten Unterschiede, bis auf das Materialextrakt 9. Abbildung 31 fasst die Ergebnisse des indirekten Tests zusammen.

Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse des Zytokompatibilitätstests mit L929-Fibroblasten aller 17 Basismaterialien. Um als zellkompatibel eingestuft zu werden, sollte ein Material im direkten Test maximal 5% tote Zellen und zwischen 3 und 5% Mitosen hervorrufen.

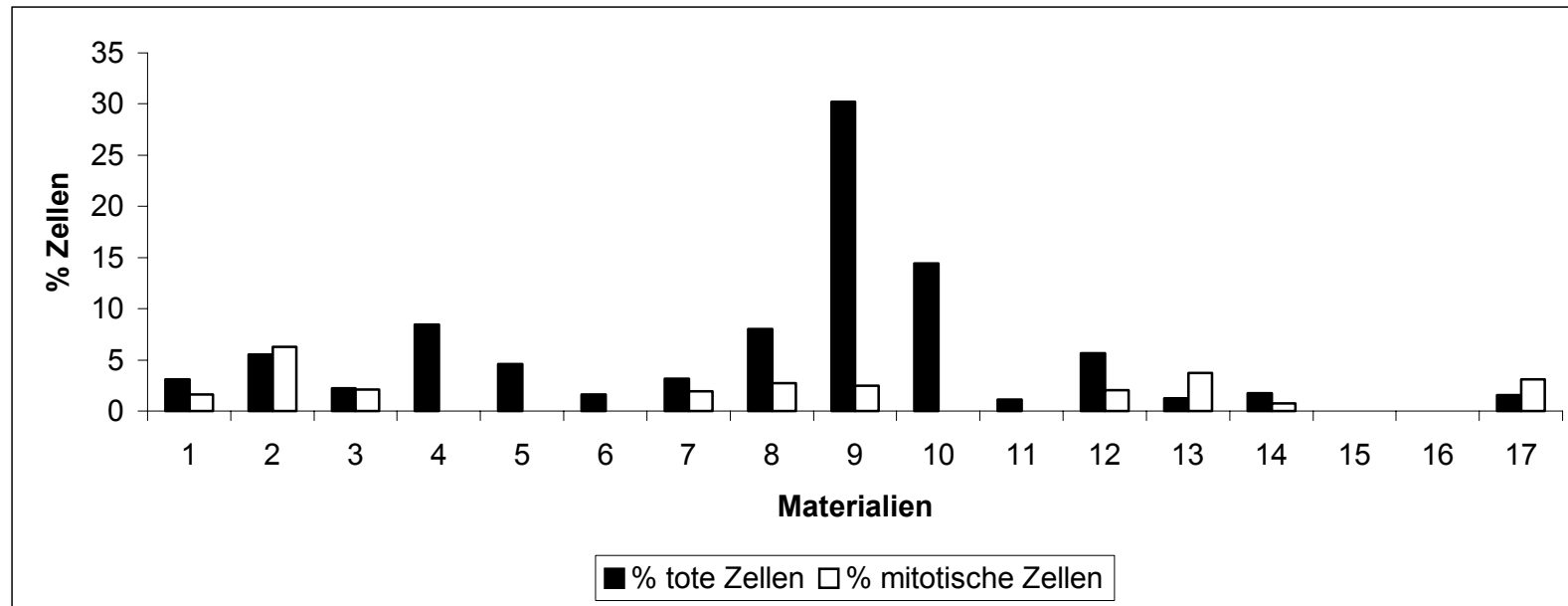


Abbildung 30: Zytokompatibilität/Zellverträglichkeitn von Formgedächtnispolymere im direkten Test. Die L929-Zellen sollten nicht mehr als 5% tote Zellen und 3 bis 5% Mitosen aufweisen. Dann gilt ein Material als biokompatibel. In einigen Fällen konnte die Zahl an Mitosen aufgrund von Clusterbildung oder Abkugeln der Zellen nicht bestimmt werden.

Bei einigen Materialien konnte die Zahl an Mitosen nicht bestimmt werden, da die L929-Zellen entweder abgekugelt, oder in Clustern vorlagen. Die typischen Mitosefiguren, bei denen zwei Zellen direkt nebeneinander liegen und genau spiegelbildlich aussehen, waren in diesen Fällen nicht sichtbar (siehe Abb. 30, Material 5, 6, 10, 11, 15 und 16).

Abbildung 31 zeigt die Ergebnisse des indirekten Zytokompatibilitätstests mit L929-Fibroblasten aller 17 Basismaterialien. Um als zellkompatibel eingestuft zu werden, sollte ein Materialextrakt im indirekten Test maximal 5% tote Zellen und zwischen 3 und 5% Mitosen hervorrufen.

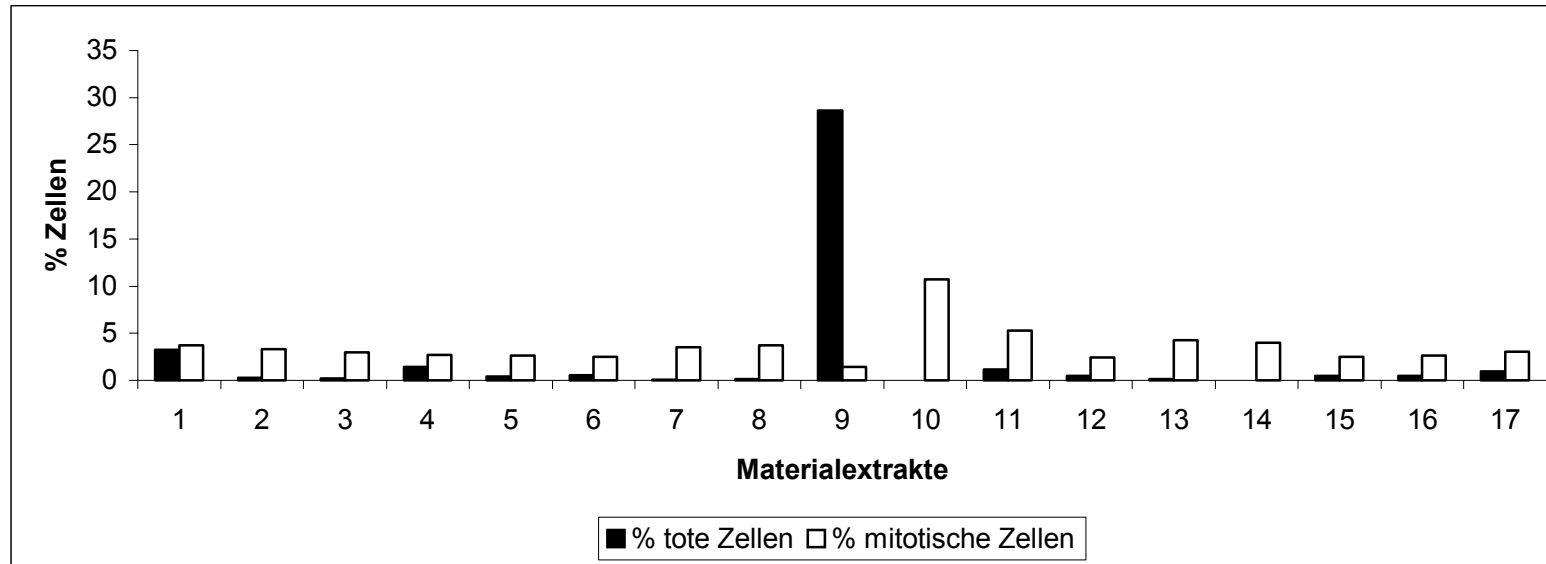


Abbildung 31: Die Formgedächtnispolymere unterschieden sich kaum in ihrer Zellverträglichkeit im indirekten Test. Die L929-Zellen sollten nicht mehr als 5% tote Zellen und 3 bis 5% Mitosen aufweisen.

Im indirekten Test zeigen 16 von 17 Basismaterialien eine gute Bioverträglichkeit. Nur bei Materialextrakt 9 lag die Anzahl der toten Zellen bei ca. 30%. Es ist davon auszugehen, daß aus diesem Material Substanzen austraten, welche zytotoxisch sind.

Da im indirekten Test bis auf Materialextrakt 9 alle Proben mit den Kontrollen übereinstimmten, sind in der folgenden Ergebniszusammenfassung nur die direkten Tests berücksichtigt.

Tabelle 3: Zusammenfassung der Zytokompatibilitätstests (direkter Test) Die 17 Formgedächtnispolymere erzielten im direkten Test mit L929-Mausfibroblasten unterschiedliche Ergebnisse. Neben Variationen in der Morphologie, gab es große Unterschiede im Adhärenzverhalten und der Vitalität. Diese Unterschiede waren nicht nur auf die hydrophilen/hydrophoben Eigenschaften der Materialien zurückzuführen, sondern sind vor allem bedingt durch die Materialzusammensetzung

Material	Zusammensetzung	vital	adhärent	Morphologie	Hydrophilie
1	PCL-10k-co-PPDL-2k (60/40)	+++	+++	= Kontrolle	hydrophil
2	PU-PPDL-3k (100)	+++	+	abgekugelt	grenzwertig
3	P-DL-LA-6k-co-PPDL-3k (50/50)	+++	+++	= Kontrolle	grenzwertig
4	PCL-10k-co-PPDL-3k-co-PEG-8k (50/40/10)	+	+	abgekugelt	hydrophil
5	PPDL-3k-co-PCL-10k-co-PEG-8k (40/55/05)	+	+	Clusterbildung	hydrophil
6	PPDL-3k-co-PCL-10k-co-PEG-2k (40/50/10)	+++	+	abgekugelt	hydrophil
7	PCL-10k-co-PPDL-3k (50/50)	+++	++	= Kontrolle	hydrophil
8	PCL-10k-co-PPDL-3k (60/40)	+	+	abgekugelt	grenzwertig
9	PCL-10k-co-PPDL-3k (60/40)	++	+	abgekugelt	hydrophil
10	PU-PCL-10k (100)	+	+	abgekugelt	hydrophil
11	PCL-4k-co-PPDL-3k (60/40)	+++	++	z. T abgekugelt	hydrophil
12	PCL-2k-co-PPDL-3k (60/40)	+++	+++	spindelförmig	hydrophil
13	PCL-2k-co-PPDL-3k (50/50)	+++	+++	spindelförmig	hydrophob
14	PCL-2k-co-PPDL-3k (60/40)	+++	+++	= Kontrolle	hydrophob
15	PCL-2k-co-PPDL-3k (70/30)	+	+	abgekugelt	hydrophob
16	PCL-2k-co-OXD-3k (60/40)	+	+	abgekugelt	grenzwertig
17	PCL-10k-DMA-Netzwerk	+++	+++	= Kontrolle	hydrophil

Die auf Zytokompatibilität/Zytotoxizität untersuchten Basismaterialien sind nach den Ergebnissen im direkten (Abb. 30 und Tab. 3) und im indirekten Test (Abb.31) wie folgt einzuteilen:

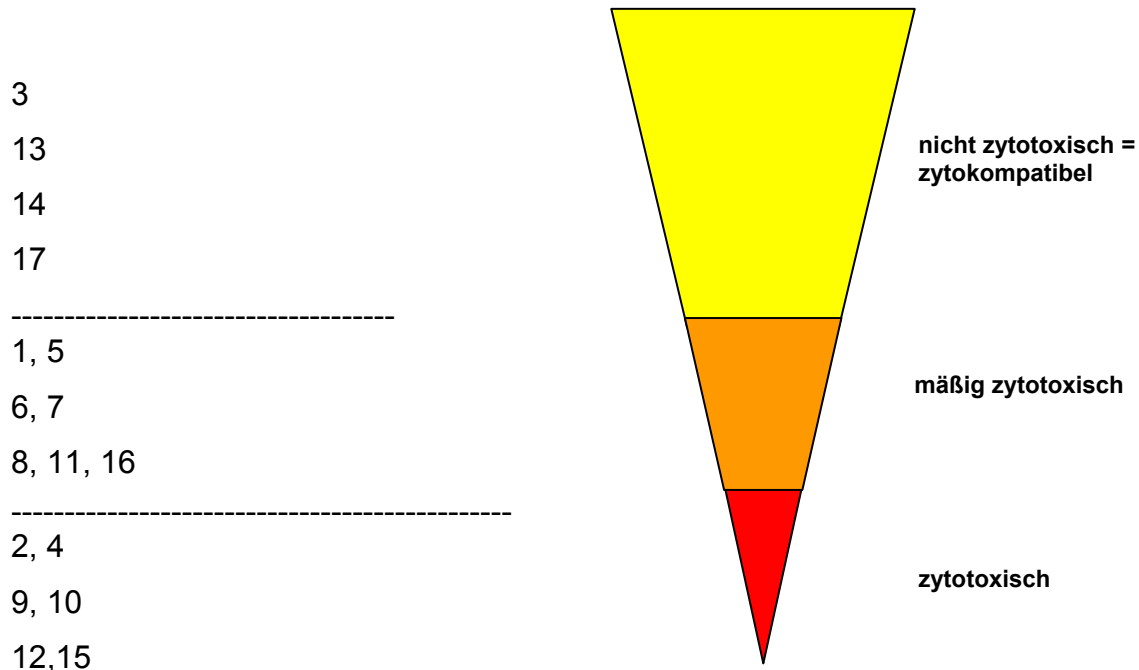


Abbildung 32: Die Formgedächtnispolymere unterschieden sich in ihrer Zytokompatibilität. Von den 17 Materialien erwiesen sich vier als zytokompatibel, sieben als mäßig zytotoxisch und sechs als zytotoxisch.

3.4.3 Zytokompatibilitätstests mit humanen mesenchymalen Stammzellen

Drei der Materialien, welche sich im Biokompatibilitätstest mit L929-Mausfibroblasten als zytokompatibel erwiesen, wurden mit humanen mesenchymalen Stammzellen erneut auf ihre Verträglichkeit hin untersucht. Dabei handelte es sich um die Materialien 3 [P-DL-LA-6k-co-PPDL-3k (50/50)], 13 [PCL-2k-co-PPDL-3k (50/50)] und 17 [PCL-10k-DMA-Netzwerk]. Untersucht werden sollte neben der Zytokompatibilität auch der Einfluß der Materialien auf das Differenzierungspotenzial.

3.4.4 Zytokompatibilitätstests der Materialien 3, 13 und 17 mit humanen mesenchymalen Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen zeigten im direkten Test auf den Formgedächtnispolymeren 3, 13 und 17 eine normale Morphologie. Die Zellen waren gut adhärent und vital (Abb. 33).

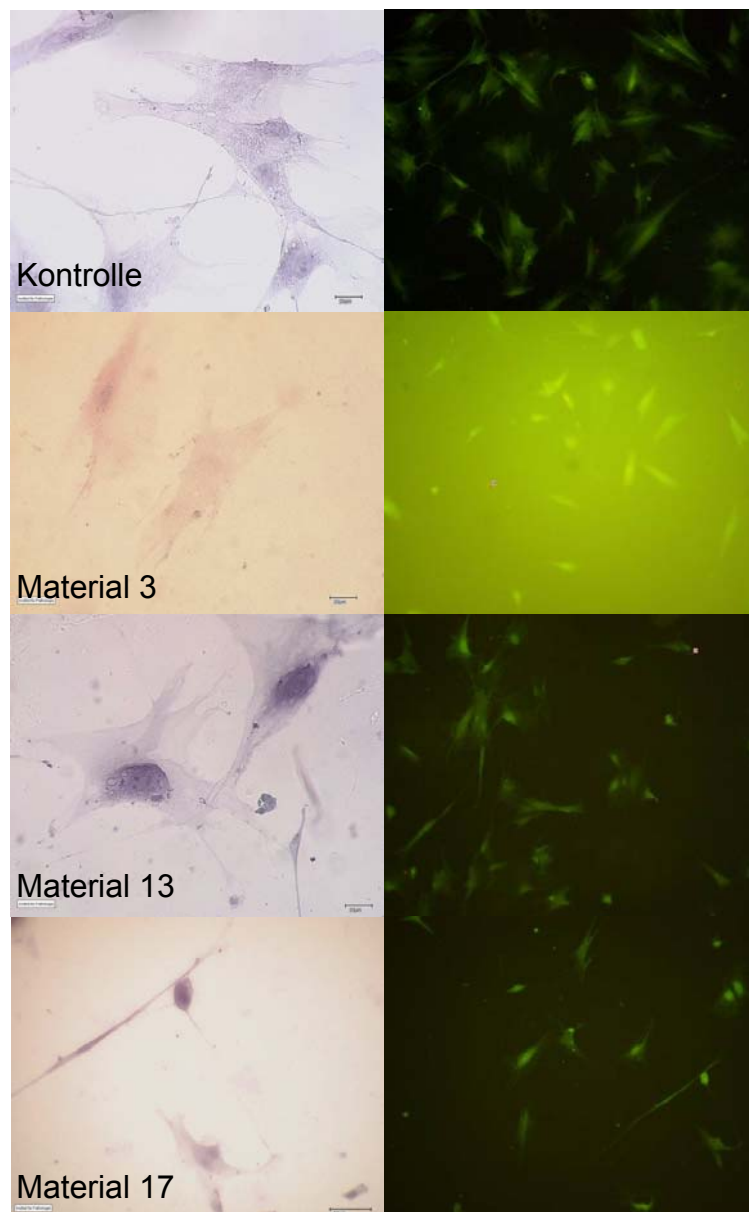


Abbildung 33: Zytokompatibilitätstest mit hMSC in direktem Kontakt zu Material 3, 13 und 17. Hämalaunfärbung (links) und Vitalfärbung (rechts). Material 3 zeigte Autofluoreszenz und war daher schlechter photographierbar.

Die Materialien waren somit zytoverträglich für hMSC, was durch den indirekten Test mit Materialextrakten bestätigt wurde. Es traten keine zytotoxischen Substanzen aus

den Materialien aus (Abb. 34). Die Adhärenz auf Glas war durchweg stärker ausgeprägt als bei direkter Besiedlung.

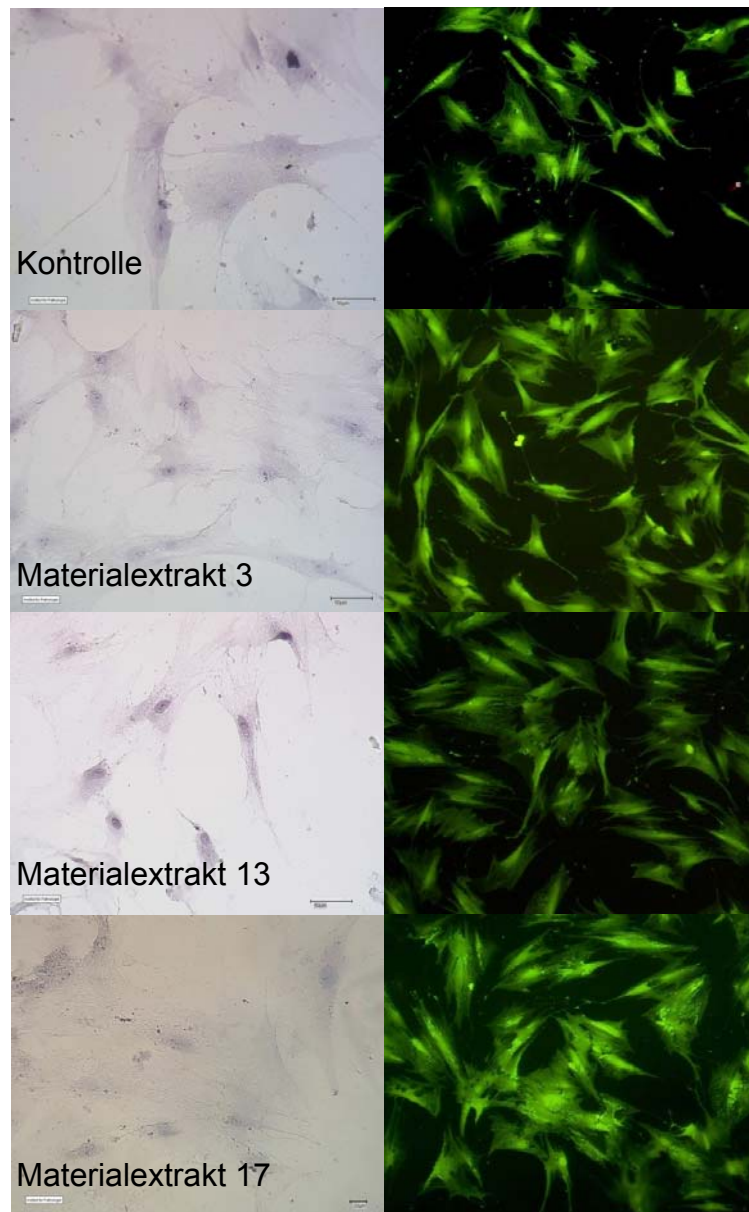


Abbildung 34: Indirekter Zytokompatibilitätstest mit hMSC mit Extrakten von Material 3, 13 und 17. Hämalaunfärbung (links) und Vitalfärbung (rechts).

Die bereits im Test mit L929-Mausfibroblasten als zytoverträglich bewerteten Materialien sind demnach grundsätzlich als Trägermaterial für mesenchymale Stammzellen geeignet. Allerdings könnten die Materialien selbst die Differenzierbarkeit der Stammzellen beeinflussen. Einerseits könnte das Differenzierungspotenzial erniedrigt werden oder völlig unterdrückt werden, andererseits könnten die Materialien eine spontane Differenzierung der hMSC

induzieren. Deshalb wurden hMSC auf den Materialien 3, 13 und 17 zu Osteoblasten und Adipozyten differenziert.

Da eine Färbung mit *Oil red O* das gesamte Material anfärbte, wurde abweichend vom Standardprotokoll eine Färbung mit Sudan schwarz zur Detektion der Lipidvakuolen eingesetzt.

Aufgrund der Dicke des Materials konnte keine lichtmikroskopische Untersuchung erfolgen. Bei den in Abbildung 35 dargestellten Fotos handelt es sich um makroskopische Aufnahmen.

Die mesenchymalen Stammzellen ließen sich auf den Materialien 3, 13 und 17 zu Osteoblasten (Abb. 35 f-h) und zu Adipozyten (Abb. 35 n-p) differenzieren. Das Ausmaß der Differenzierung entsprach in allen Fällen den Kontrollen auf Glas (Abb. 35 e, m). Die Materialien selbst induzierten keine spontane Differenzierung zu Osteoblasten (Abb. 35 b-d) oder Adipozyten (Abb. 35 n-p)

Demnach verminderten die Materialien das Differenzierungspotenzial der Stammzellen nicht und induzierten keine spontane Differenzierung in Osteoblasten und Adipozyten. Eine Schlußfolgerung auf andere Differenzierungswege kann jedoch nicht gezogen werden.

Die hier dargestellten Ergebnisse zur Zytokompatibilität von Formgedächtnispolymeren auf humane mesenchymale Stammzellen zeigen, daß *Tissue Engineering* mit hMSC und *shape memory* Biomaterialien prinzipiell möglich ist. Die Differenzierbarkeit der Stammzellen in Osteoblasten und Adipozyten wurde von den Materialien nicht beeinflusst. Man kann also vermuten, daß die Stammzellen erst vor Ort mit Hilfe der Mikroumgebung in die Zellen differenzieren, die im Defektbereich benötigt werden.

Der Vorteil von einem Gewebeersatz mit mesenchymalen Stammzellen ist, daß mit autologen Zellen gearbeitet wird und so keine Abstoßungsreaktion des Transplantates erwartet wird. Aber auch bei einem nicht autologen Transplantat mit hMSC wird die Abstoßungsreaktion geringer ausfallen, als bei einem anderen nicht autologen Zelltyp. Welche Mechanismen dazu führen, dass hMSC eine geringere Abstoßungsreaktion des Empfängers hervorrufen als andere Zellen ist bisher nicht geklärt. Möglicherweise liegt diese Tatsache jedoch im Vorhandensein von Immunrezeptoren, wie dem TLR 4, begründet.

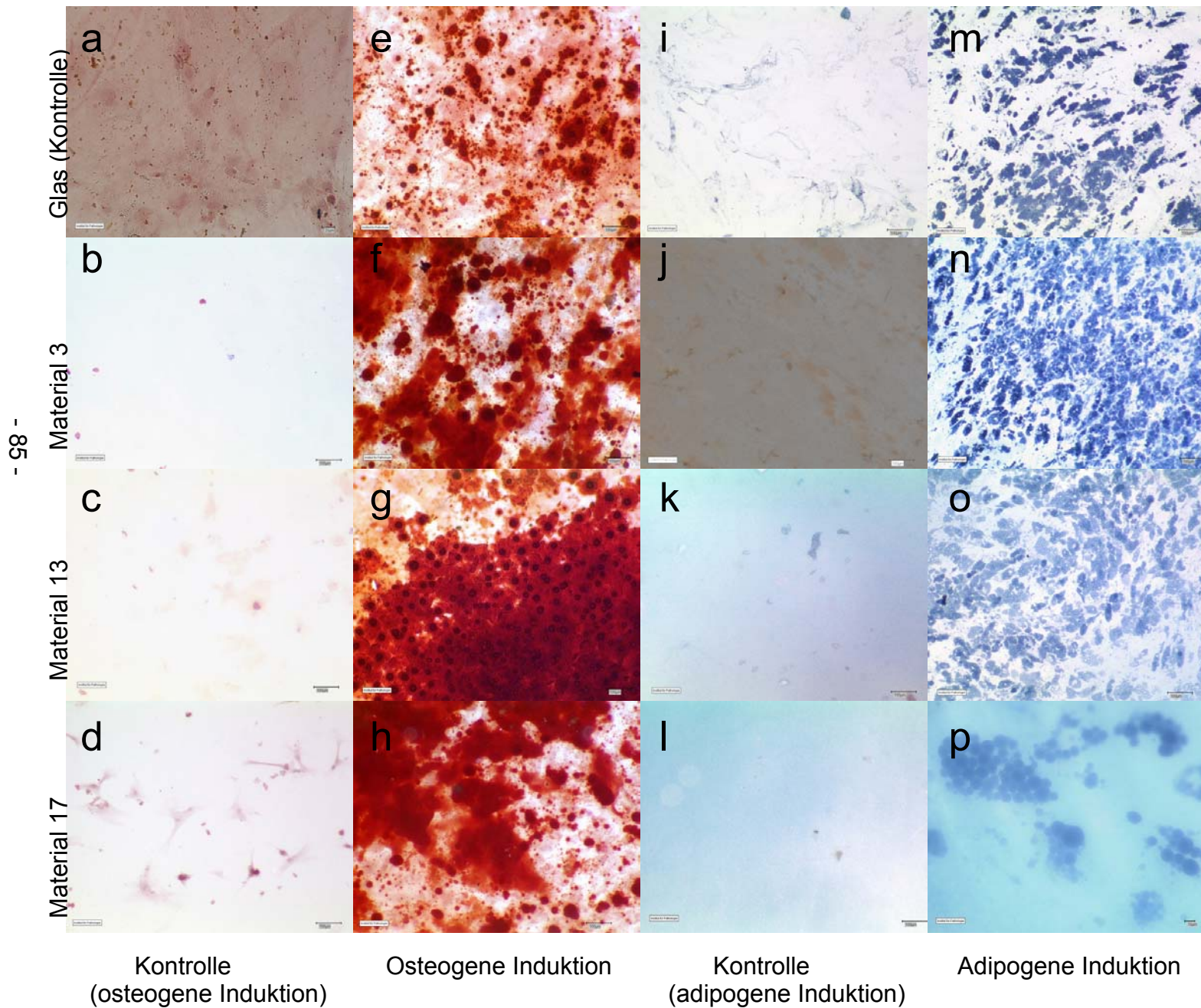


Abbildung 35: Differenzierbarkeit von hMSC auf Formgedächtnispolymere. Mesenchymale Stammzellen wurden auf den Materialien 3, 13 und 17 zu Osteoblasten (e-h) und Adipozyten (m-p) differenziert. Zur Bestätigung der Differenzierbarkeit wurden Zellen desselben Spenders auf Glas differenziert (e, m). Als Negativkontrolle wurden hMSC unter den entsprechenden Differenzierungsbedingungen mit Stammzellmedium kultiviert (a-d und i-l). Kalziumablagerungen der Osteoblasten (e-h) ließen sich mit Alizarin rot anfärben und Lipidvakuolen der Adipozyten (m-p) wurden mittels Sudan schwarz sichtbar. In den Kontrollen der Osteoblasten sind keine Kalziumablagerungen (a-d) und in denen der Adipozyten keine Lipidvakuolen (m-p) entstanden.

3.5 Immunmodulatorische Fähigkeiten humaner mesenchymaler Stammzellen

3.5.1 Humane mesenchymale Stammzellen exprimierten TLR-4, jedoch nicht dessen Korezeptor CD14 auf RNA-Ebene

Zellen erkennen über den Toll-like-Rezeptors 4 (TLR-4) und dessen Korezeptor CD14 Membranbestandteile von Bakterien (LPS). Das Vorhandensein von TLR-4 und CD14 könnte Aufschlüsse über die immunmodulatorischen Fähigkeiten mesenchymaler Stammzellen geben, für die es zwar ausreichend Anhaltspunkte gibt, jedoch keine Beweise.

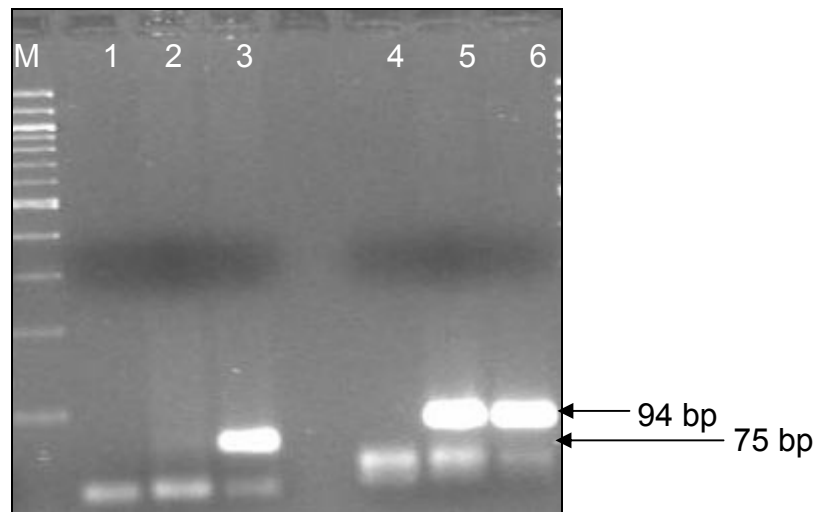


Abbildung 36: hMSC exprimierten TLR-4, aber kein CD14 auf RNA-Ebene.

Die Expression des TLR-4 (95 bp) ließ sich auf RNA-Ebene nachweisen (Spur 5), während CD14 (75 bp) nicht exprimiert wurde (Spur 2). Als Positivkontrolle dienten mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC). M) Marker (20 bp Leiter); 1) Negativkontrolle CD14 (ohne cDNA), 2) hMSC-cDNA, CD14; 3) PBMC-cDNA, CD14; 4) Negativkontrolle TLR-4 (ohne cDNA); 5) hMSC-cDNA, TLR-4; 6) PBMC-cDNA, TLR-4

Der Toll-like-Rezeptor 4 war auf RNA-Ebene sowohl in hMSC, als auch in PBMC-Zellen nachweisbar (Abb. 36 Spur 5, 6). Sein Korezeptor, CD14, der für die Bindung an LPS benötigt wird, war in hMSC, im Gegensatz zur Positivkontrolle (PBMC) allerdings auf RNA-Ebene nicht nachweisbar (Abb. 36 Spur 2, 3). Falls hMSC auf LPS reagieren, muß also ein alternativer Signalweg von den hMSC eingeschlagen werden, oder CD14 würde erst nach Stimulation mit LPS exprimiert. Diese Möglichkeit konnte allerdings ausgeschlossen werden. Eine RT-PCR zeigte, daß auch nach Stimulation mit LPS (6 h, 200 ng/ml) kein CD14-Transkript nachweisbar war (Abb. 37).

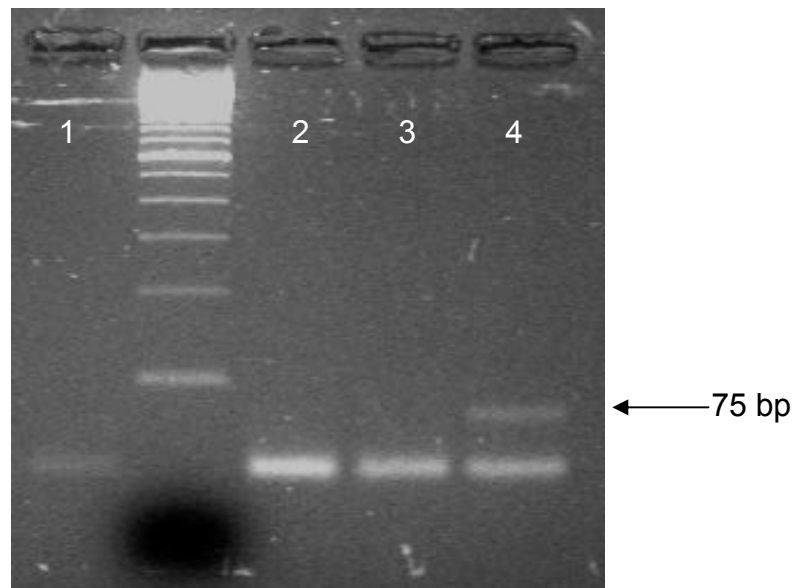


Abbildung 37: hMSC exprimierten CD14 nicht nach LPS-Stimulation

Eine Expression von CD14 ließ sich weder bei unstimulierten hMSC (Spur 2), noch bei hMSC, welche für 6 Stunden mit LPS (200 ng/ml) stimuliert wurden, nachweisen (Spur 3). 1) Negativkontrolle (ohne cDNA), 2) hMSC-cDNA, 3) hMSC-cDNA nach LPS-Stimulation 4) Positivkontrolle (PBMC-cDNA); Marker = 100 bp Leiter

3.5.2 Humane mesenchymale Stammzellen exprimierten den Toll-like-Rezeptor 4 auf Protein-Ebene nach LPS-Stimulation

Das Vorhandensein von TLR-4 auf Protein-Ebene wurde mittels immunhistochemischer Färbung analysiert.

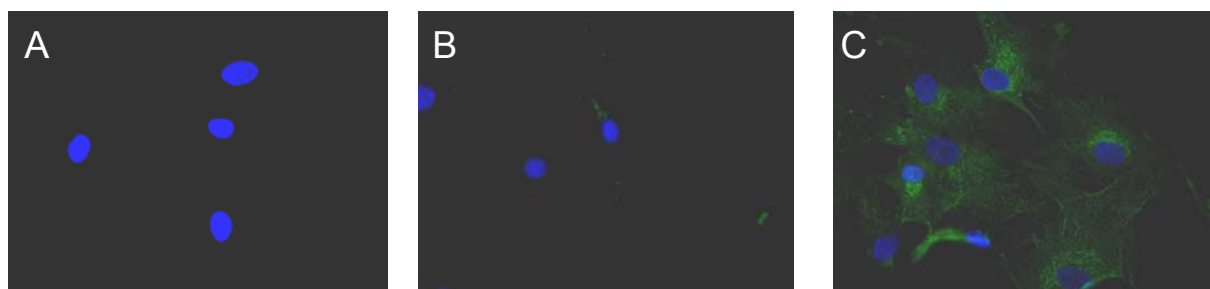


Abbildung 38: TLR-4 wurde nach LPS-Stimulation auf hMSC exprimiert.

Immunhistochemische Färbung mit einem spezifischen Antikörper gegen den Toll-like-Rezeptor 4. Der sekundäre Antikörper war FITC-gekoppelt und ließ den TLR-4 somit unter dem Fluoreszenzmikroskop grün erscheinen. A) Negativkontrolle (ohne 1. Antikörper); B) hMSC unstimuliert; C) hMSC nach LPS-Stimulation (200 ng/ml, 6 h).

Abbildung 38 zeigt deutlich, daß TLR-4 auf der Oberfläche unstimulierter mesenchymaler Stammzellen nur sehr schwach exprimiert wurde (B). Eine 6-stündige Stimulation mit LPS (200 ng/ml) führte zu einer deutlichen Steigerung der Expression von TLR-4 auf der Zellmembran (C). Der Toll-like-Rezeptor 4 konnte also sowohl auf RNA-Ebene, als auch auf Protein-Ebene (nur nach LPS-Stimulation)

nachgewiesen werden. Ob dieser Rezeptor auf hMSC auch funktionell war, wurde mit einem ELISA überprüft. Da TLR 4 den NF- κ B Signaltransduktionsweg aktiviert, müssten die Stammzellen mit einer erhöhten TNF- α -Sekretion auf Stimulation mit LPS antworten. Da der Rezeptor erst nach 6-stündiger LPS-Stimulation auf Protein-Ebene nachweisbar war, wurden die Zellen für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an LPS stimuliert und dann die sekretierte Menge an TNF- α gemessen (Abb. 39). Die Kontrollzellen (ohne LPS) wiesen eine basale Expression von TNF- α auf (ca. 11 pg/ml). Konzentrationen von 50 und 100 ng LPS / ml Medium hatten keinen signifikanten Einfluß. Eine Stimulation von 250 ng/ml führte allerdings zu einer mehr als 10-fachen Steigerung.

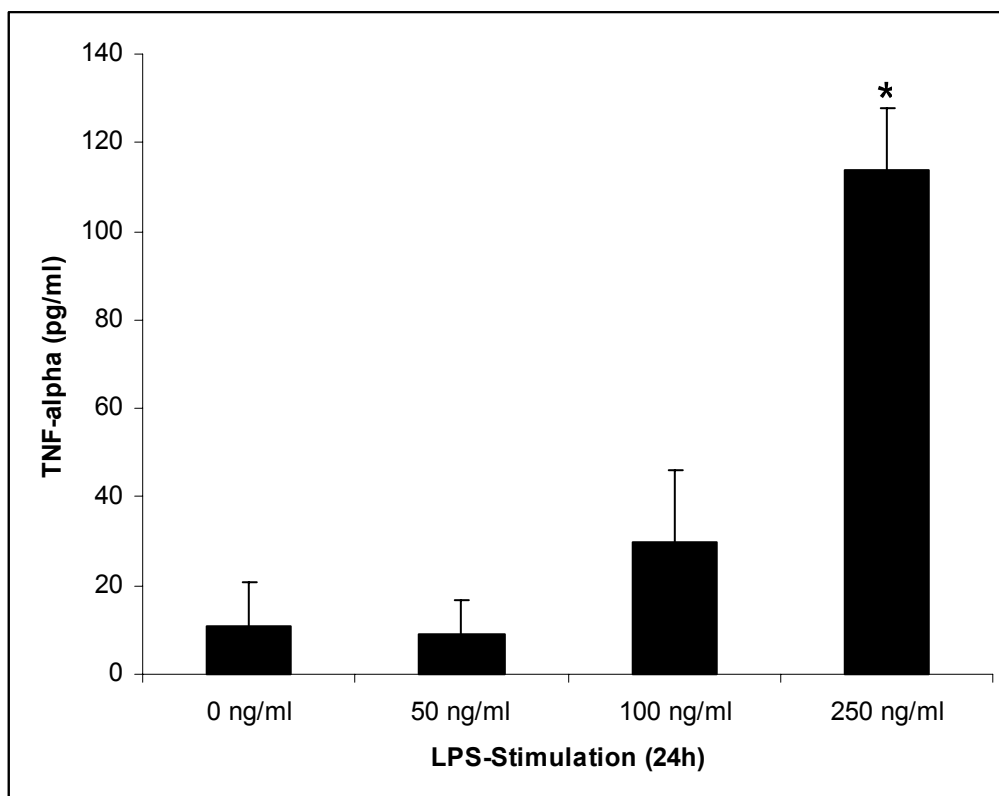


Abbildung 39: hMSC sekretierten TNF- α nach LPS-Stimulation

Mesenchymale Stammzellen wurden 24 Stunden mit LPS (0, 50, 100 und 250 ng/ml) stimuliert. Auf Protein-Ebene ist eine erhöhte TNF- α -Sekretion als Antwort auf die LPS-Stimulation nachweisbar. * $p < 0,01$

Die hier nachgewiesene erhöhte TNF- α -Sekretion nach LPS-Stimulation könnte allerdings auch unabhängig vom TLR 4 sein. Eine Wiederholung dieses Versuchs unter Zugabe von neutralisierenden Antikörpern gegen TLR 4 würde zeigen, ob die TNF- α -Sekretion tatsächlich auf der Aktivierung des Toll-like-Rezeptors 4 beruht.

Außerdem sollte die Sekretion weiterer Zytokine, wie beispielsweise IL-1 oder IL-6 untersucht werden.

4. Diskussion

4.1 Charakterisierung humaner mesenchymaler Stammzellen

Für humane mesenchymale Stammzellen gibt es bis heute keine spezifischen Markergene. Eine funktionelle Charakterisierung durch einen Multipotenznachweis der Zellen ist deshalb unerlässlich. Die Multipotenz der aus dem Knochenmark isolierten Zellen wurde in dieser Arbeit über die Differenzierung in Osteoblasten und Adipozyten nach Protokollen von Pittenger et al.³³ nachgewiesen (Abb. 10). Die Differenzierung in Chondrozyten konnte ebenfalls gezeigt werden⁴⁷. Neben der Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften wurde eine Charakterisierung der Oberflächenepitope durchgeführt. Auch diese Ergebnisse entsprachen den Daten von Pittenger et al. Zur Überprüfung der Differenzierung von hMSC in Richtung Adipozyten und Osteoblasten wurde außerdem eine zuvor festgelegte Gensignatur mittels DNA-Chips und *Real-Time*-PCR untersucht. Der Einsatz von Gensignatur-Untersuchungen wird heutzutage genutzt, um z. B. den weiteren Verlauf einer Krebserkrankung vorherzusagen und somit eine effektive Therapiemöglichkeit auszuwählen. So unterscheidet man beim Brustkrebs zwischen Signaturen, welche eine gute Überlebensrate vorhersagen und solchen, welche auf einen aggressiveren Verlauf schließen lassen^{99, 100}. Auch zur Klassifizierung einer Krebsart ist eine Gensignatur einsetzbar. So können mit einer Signatur bestehend aus 50 Genen die akute myeloide Leukämie (AML) von der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) unterschieden werden¹⁰¹.

Auch in der Stammzellforschung werden Untersuchungen zu Gensignaturen eingesetzt. So wurden humane embryonale Stammzellen verschiedener Spender miteinander verglichen¹⁰² oder das Differenzierungspotenzial humaner Stammzellen anhand von Stammzellmarkergenen eingeschätzt¹⁰³. Häufig werden auch die Expressionsmuster der Stammzellen nach Stimulation mit Zytokinen untersucht¹⁰⁴. In dieser Arbeit sollten die Chip-Analysen dazu dienen, den bereits durch spezifische Färbetechniken nachgewiesenen Differenzierungsstatus der Stammzellen zu bestätigen. Die dafür ausgewählte Gensignatur von 8 Genen erwies sich als sinnvoll, da die Expressionsmuster den zuvor vermuteten Ergebnissen entsprach (Abb. 12). Es wurden Gene ausgewählt, von denen bekannt ist, daß sie in unstimulierten

hMSC, Osteoblasten und/oder Adipozyten exprimiert werden. Dabei handelte es sich um Apolipoprotein D (ApoD), Prostaglandin E Synthase (PIG12), Apolipoprotein E (Apo E), *intermediate conductance Ca-activated K-channel* (Kca4), Monoaminoxidase A (MAOA), Keratinozytenwachstumsfaktor (KGF), Chitinase und um ein Gen mit bisher unbekannter Funktion (DKFZ). Von diesen 8 Genen sollte jeweils eins nur in hMSC (KGF), nur in Osteoblasten (ApoD) oder nur in Adipozyten (ApoE) exprimiert werden. Die Ergebnisse zeigen, daß das Apolipoprotein D nur in Osteoblasten, und das Apolipoprotein E nur in Adipozyten exprimiert wurden. KGF sollte nur von den unstimulierten hMSC exprimiert werden. Es war allerdings auch eine Expression in Adipozyten nachweisbar. Die übrigen 5 Gene sollten von jeweils zwei der drei Zellpopulationen exprimiert werden. PIG12 ist ein mikrosomales Enzym, eine Prostaglandin E Synthase, welche in unstimulierten hMSC und Adipozyten exprimiert werden sollte. Die Affymetrix-Chip-Analyse zeigt jedoch auch eine Expression für Osteoblasten. Ein solches Phänomen ist dadurch zu erklären, daß es sich um eine sehr sensitive Methode handelt und bereits wenige, spontan zu Adipozyten differenzierte hMSC in der Osteoblastenprobe ein solches Signal auslösen könnten.

Die in dieser Arbeit durchgeführte funktionelle und molekularbiologische Charakterisierung zeigte, daß es sich bei den aus humanem Knochenmark isolierten Zellen um mesenchymale Stammzellen handelte. Diese Zellen konnten somit für die Untersuchungen zur Bedeutung mesenchymaler Stammzellen in der Geweberegeneration und im *Tissue Engineering* eingesetzt werden.

4.2. HGF/c-met System bei humanen mesenchymalen Stammzellen

Adulte pluripotente Stammzellen befinden sich in den verschiedensten humanen Geweben. So können sie z. B. aus Haut¹⁰⁵ und Fettgewebe¹⁰⁶ isoliert werden. In Tierversuchen mit Affen konnte gezeigt werden, daß Stammzellen, welche durch Infusion eingebracht werden, in den Gastrointestinaltrakt, die Lunge, die Leber, den Thymus und die Haut einwandern¹⁰⁷.

Die Anzahl von Stammzellen in den meisten Geweben ist relativ gering, was zu der Hypothese führt, daß in verletztem Gewebe Stoffe produziert werden, welche die Stammzellen anlocken und zum Einwandern, sowie zur Differenzierung veranlassen¹⁰⁸. Dies führt zu der Frage, welche Signale wichtig für die Stammzellmobilisierung und –rekrutierung sind. Der Hepatozytenwachstumsfaktor ist bekannt dafür, daß er die

Zellmigration, das Zerstreuen von Zellen (*scatter factor*) und die Proliferation verschiedenster Zelltypen bewirkt. Außerdem ist HGF beteiligt an der Organogenese und Morphogenese vieler Gewebe und Organe, sowie an der Regeneration, Tumordinvasion und Metastasierung ¹⁰⁹. Im Knochenmark ist HGF ein wichtiger hämatopoetischer Regulator ^{110, 111}. Die Synthese und die Ausschüttung von HGF-Vorläufern könnte Teil eines autokrinen Mechanismus zur Mobilisierung von Stammzellen sein. Prä-HGF kann durch proteolytische Spaltung – z. B. durch Serinproteasen wie uPA und tPA – aktiviert werden. Die Serinproteasen uPA und tPA werden, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, von hMSC sezerniert (Abb. 19-22). Die Stammzellen haben somit die Möglichkeit selbst HGF-Vorläufer zu aktivieren und weiter zu migrieren.

Geweberegeneration und Wundheilung werden durch lösliche Mediatoren, welche von den inflammatorischen Zellen ausgeschüttet werden, reguliert. Deshalb wurde der Effekt von bFGF, IL-1 β und TGF- β auf die HGF-Produktion untersucht. TGF- β , welches das Wachstum von Epithelzellen hemmt, verminderte die HGF-Expression. Dieser Effekt wurde nicht durch TGF- β -induziertes Absterben der Stammzellen hervorgerufen. Im Gegensatz dazu hatten bFGF, welches Angiogenese induziert ¹¹² und IL-1 β , ein proinflammatorisches Zytokin, keinen signifikanten Einfluß auf die HGF-Expression. Dies konnte mittels ELISA gezeigt werden (Abb. 15). Wie in den Versuchen zum fibrinolytischen System gezeigt werden konnte, verstärkte bFGF jedoch die Expression von tPA in mesenchymalen Stammzellen (Abb. 20), welches wiederum HGF aktiviert. Demzufolge ist die Synthese von aktivem HGF durch die Mikroumgebung reguliert, abhängig von Gewebeverletzungen oder Entzündungen. Aktivierte Monozyten und Makrophagen, welche sich in verletzten Regionen ansammeln, produzieren ebenfalls HGF ¹¹³.

Ein Anstieg der HGF-Konzentrationen in verletztem Gewebe ist mehrfach beschrieben ¹¹⁴⁻¹¹⁶. Nach einer partiellen Hepatektomie in der Ratte ist sogar die HGF-Konzentration im Blut erhöht ¹¹⁷. So kann der lokale und systemische Anstieg von HGF nach einer Verwundung ein Hinweis darauf sein, daß HGF als Chemoattraktanz Stammzellen mobilisiert und zum Gewebsdefekt leitet.

In dieser Arbeit konnte HGF erstmals als Regulator für die Migration und die Proliferation humaner mesenchymaler Stammzellen identifiziert werden. Die Expression von HGF und seinem Rezeptor c-met in humanen mesenchymalen Stammzellen ist demnach *in vitro* erwiesen (Abb. 12-15). Die Migration von hMSC

wird durch HGF gesteigert, was in einem Boyden-Kammer-Assay als chemotaktischer Effekt nachgewiesen werden konnte (Abb. 17), während die Proliferation durch HGF inhibiert wurde (Abb. 18). Außerdem hat HGF die Rekolonialisierung eines zellfreien Areals in einem *in vitro* Wundmodell beschleunigt (Abb. 16). Da ohne HGF-Stimulation das zellfreie Areal unbesiedelt blieb, konnte ausgeschlossen werden, daß die Migration auf einen taktilen Reiz, ausgelöst von der Zellkulturschale, zurückzuführen war.

Die Expression von HGF und c-met wurde von Takai und Mitarbeitern ¹¹⁸ bereits für Knochenmarks-Stromazellen beschrieben. Diese Zellpopulation wurde allerdings unzureichend charakterisiert. Knochenmarksstromazellen werden häufig als *Feeder*-Zellen für hämatopoetische Zellen genutzt. Abhängig von verschiedenen Isolations- und Kultivierungsprotokollen sind diese Zellen wesentlich inhomogener als die in dieser Arbeit verwendeten hMSC. Es ist daher möglich und wahrscheinlich, daß sich in der Knochenmarks-Stromazellpopulation hMSC befanden, welche die Quelle des nachgewiesenen HGF für die Hämatopoiese im Kokultursystem sein könnten. Diese Schlußfolgerung wird dadurch bekräftigt, daß die in dieser Arbeit verwendeten hMSC ähnliche Mengen an HGF sezernieren, wie die von Takai beschriebenen *Feeder*-Zellen. Außerdem zeigten weder diese *Feeder*-Zellen, noch die hier verwendeten hMSC verstärkte Proliferation als Antwort auf HGF, obwohl die meisten Zellen, welche mit Migration auf HGF reagieren, auch verstärkt proliferieren.

Die von hMSC sezernierte Menge an HGF (0,7 bis 2 ng/ml) ist höher als die normale HGF-Serumkonzentration (0,24 bis 0,33 ng/ml ¹¹⁹). Wie bereits erwähnt kann die Serumkonzentration im Blut nach einer Verwundung jedoch ansteigen ¹¹⁷. Somit könnte ein Ansteigen der HGF-Serumkonzentration hMSC aus dem Knochenmark oder aus anderen Geweben mobilisieren, um in verletztes Gewebe einzuwandern. Ist die HGF-Konzentration im Serum jedoch geringer als die durch den autokrinen Mechanismus der Stammzellen sekretierte Menge an HGF, resistieren die hMSC weiterhin in ihrer Nische. Eine erhöhte HGF-Serumkonzentration rekrutiert die Stammzellen und vermindert gleichzeitig die Proliferation der hMSC. Die lokale Mikroumgebung bewirkt dann eine Differenzierung der hMSC zu den Zellen, die im Gewebe benötigt werden, wie es auch für die Embryonalentwicklung beschrieben ist. Den hier gezeigten *ex vivo* Versuchen zufolge, kann der Hepatozytenwachstumsfaktor möglicherweise die Mobilisierung und Rekrutierung von hMSC *in vivo* bewirken und auch allogene hMSC, welche systemisch verabreicht werden, zum

Defekt hin leiten. Die Beobachtung, daß traumatisierte Rattenhirnextrakte die Expression von HGF in hMSC verstärken, stützt ebenfalls die These, daß HGF ein wichtiger Faktor für Gewebsregeneration durch (transplantierte oder autologe) hMSC ist. Verletztes Gewebe aktiviert demnach den autokrinen HGF-Mechanismus in hMSC und führt dazu, daß die Zellen verstärkt auf den Defekt zuwandern.

Die aktive Beteiligung von hMSC an regenerativen Vorgängen im Gewebe nach Verletzung oder Transplantation kann allerdings nur erfolgen, wenn die Stammzellen das Fibrinnetz, das im Rahmen der Wundheilungsprozesse gebildet wird, auflockern können.

4.3 Fibrinolytische Eigenschaften humaner mesenchymaler Stammzellen

Fibrinolyse ist die Umkehrung der Blutgerinnung. Die Gerinnung, „Hämostase“, ist ein wesentlicher Schutzmechanismus gegen Blutverluste nach Verletzung. Das im Blutplasma vorhandene Fibrinogen wird mit Hilfe von Thrombin in unlösliches Fibrin umgewandelt. Daran sind insgesamt ca. 30 sogenannte Gerinnungsfaktoren beteiligt. Die durch die katalytische Wirkung des Thrombins entstehenden Fibrinmonomere werden durch Autopolymerisierung zu netzbildenden Fibrinfäden stabilisiert und die Blutung wird gestillt. Bei der Auflösung der Blutgerinnsel dienen die Enzyme der Fibrinkaskade dazu, das entstehende Fibringerüst aufzulösen, wenn es seine Funktion erfüllt hat. Hierbei spielen vor allem die Serinproteasen uPA und tPA eine Rolle.

Enzyme des fibrinolytischen Systems werden u. a. von Mesothelzellen ¹²⁰, Endothelzellen ¹²¹ und Synovialfibroblasten ¹²² sezerniert. Thrombozyten hingegen exprimieren PAI-1, welches uPA und tPA inhibiert ¹²³. Es handelt sich bei der Fibrinolyse um ein hoch sensibles System, dessen Gleichgewicht einen entscheidenden Einfluß auf die Wundheilung ausübt.

In dieser Arbeit konnte die Expression von uPA, uPAR, tPA und PAI in humanen mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden.

Der uPA-Rezeptor wird in verschiedenen Zellen, wie Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen exprimiert und diese Expression wird beispielsweise nach einer bakteriellen Infektion als Antwort auf Entzündungszytokine wie TNF- α , Interferon- γ oder Interleukin-1 und -2 heraufreguliert ¹²⁴. In dieser Arbeit wurde der

Einfluß verschiedener Zytokine, welche in der Wundheilung eine Rolle spielen (TGF- β , IL1- β und bFGF), untersucht. Zwar fand nach Stimulation in der Expression des uPAR keine signifikante Änderung statt, jedoch gibt es Expressionssteigerungen von tPA und uPA. Die uPA-Expression wurde durch eine TGF- β -Stimulation (10 ng/ml, 24h) signifikant auf RNA-Ebene um das 3,3-fache (Abb. 20), auf Protein-Ebene um das 2,2-fache erhöht (Abb. 21). Bei tPA hingegen fand auf RNA-Ebene nach bFGF-Stimulation (10 ng/ml, 24h) eine Steigerung um das 5,6-fache statt (Abb. 20), auf Protein-Ebene war keine signifikante Änderung meßbar (Abb. 21). Die Standardabweichungen waren bei den Proteinwerten generell größer als bei den *Real-Time*-PCR-Ergebnissen, da bei der *Real-Time*-PCR keine absoluten, sondern nur relative Werte gemessen wurden. Bei den absoluten Werten (Protein-Ebene) gab es große, spenderspezifische Unterschiede. Die Tendenz nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen war allerdings dieselbe, wie auf RNA-Ebene. IL1- β ist ein Zytokin, welches in der Akutphase der Wundheilung auftritt. Dieses Zytokin hatte keine regulatorische Wirkung auf die Expression von uPA, uPAR und tPA. Da die Stammzellen nach Verletzung zunächst noch rekrutiert werden müssen, ist zu dieser Phase der Wundheilung noch keine Aktivierung der fibrinolytischen Enzyme nötig. bFGF tritt in der Proliferationsphase und TGF- β in der Regenerationsphase der Wundheilung auf. Die Erhöhung der Expression von tPA nach bFGF-Stimulation und von uPA nach TGF- β -Stimulation deuten darauf hin, daß die Stammzellen erst zu einem späteren Zeitpunkt des Wundheilungsprozesses an der Geweberegeneration teilnehmen und dann ihre fibrinolytischen Fähigkeiten benötigen. bFGF und TGF- β ermöglichen den Stammzellen also während der Proliferations- und Regenerationsphase das Fibrinnetz aufzulösen.

Die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin stellt den Kernpunkt der fibrinolytischen Kaskade dar. Die dafür verantwortlichen Serinproteasen tPA und uPA können bei Fehlen der einen Protease die Funktion der anderen übernehmen, ohne das es zu Funktionsstörungen kommt. Dies konnte mehrfach im Tiermodell gezeigt werden. Treten bei uPA/tPA-*knockout*-Mäusen starke thrombotische Erkrankungen auf (ähnlich den Plasminogen-*knockout*-Mäusen), so stellt man keine diesbezügliche Veränderung bei uPA-*knockout*- oder tPA-*knockout*-Mäusen fest¹²⁵. Die Expression beider Serinproteasen in hMSC deutet darauf hin, daß sie Fibrin degradieren und so tief in das Wundgebiet eindringen können.

Die Enzyme der fibrinolytischen Kaskade (uPA, tPA, PAI) spielen nicht nur eine Rolle bei der Degradation von Fibrin und EZM-Komponenten, sondern können auch die Anheftung und Ablösung von Zellen regulieren und somit migrationsfördernd oder – hemmend wirken. So hat der uPAR Bindestellen für Vitronektin, Integrine und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ¹²⁶. PAI gehört zur Familie der Serpine (Serinproteaseinhibitoren) und kann nicht nur die Serinproteasen uPA und tPA inhibieren, sondern auch an Vitronektin, Heparin und Fibrin binden. PAI hemmt sowohl freies, als auch an seinen Rezeptor gebundenes uPA und hemmt dadurch die Internalisierung des uPA/uPAR-Komplexes ¹²⁷. Der uPA-Rezeptor bindet ebenfalls an Vitronektin (eine EZM-Komponente). Die Bindungsaffinität wird erhöht, wenn uPA an uPAR gebunden vorliegt. PAI und uPAR binden an die N-terminale Domäne von Vitronektin, wobei PAI eine 30-fach höhere Affinität aufweist. So kann PAI die Bindung von uPAR an Vitronektin unterbinden und es kommt zum Ablösen der Zellen von der Extrazellulärmatrix. Dieses Wechselspiel von *Attachment* und *Detachment* führt zur Migration von Zellen und wird häufig bei der Metastasierung von Krebszellen beschrieben ^{128, 129}. So ist eine hohe uPA- und PAI-Konzentration im Tumorextrakt von Mamma- und Ovarialkarzinompatientinnen korreliert mit einer schlechten Prognose. Das heißt es gibt kürzere rezidivfreie Intervalle und eine kürzere Gesamtüberlebensrate ¹³⁰. Der uPA-Rezeptor ist möglicherweise sogar ein Onkogen, da eine Überexpression zu beschleunigtem Zellwachstum (Proliferation) führt ¹³¹.

Das uPA/uPAR-System ist insofern wichtig bei der Beurteilung von Krebs, da es nicht nur bei der Invasion von Krebszellen in benachbartes Gewebe, sondern auch bei der Entstehung von Fernmetastasen beteiligt ist. Neben der Expression in Krebszellen ist dieses System auch für Stromazellen beschrieben.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene Expression von PAI, uPA und uPAR bei hMSC gibt somit unter anderem Hinweise darauf, auf welchem Mechanismus die Migrationsfähigkeit der mesenchymalen Stammzellen beruht. Da Prä-HGF von Serinproteasen wie uPA und tPA durch proteolytische Spaltung aktiviert wird ¹²⁴, ist das uPA/uPAR-System indirekt auch an gerichteter Migration beteiligt.

Neben den fibrinolytischen Fähigkeiten und der Beteiligung an Adhäsion, Proliferation und Migration ist das uPA/uPAR-System auch beteiligt am System der angeborenen und erworbenen Immunität. Sowohl uPA, als auch der uPAR werden in verschiedenen Zellen hämatopoetischen Ursprungs exprimiert. Bei schweren

Infektionen findet eine Heraufregulation der beiden Moleküle statt ¹³². Im Gewebe befindliches uPA verstärkt die Aktivierung von Neutrophilen ¹³³. Weiterhin erhöht uPA die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Mediatoren wie IL1- β und aktiviert die MMP-Vorläufer ¹³⁴. In uPA-defizienten Mäusen ist das Rekrutment von Neutrophilen und Makrophagen gestört ¹³⁵. Der uPAR moduliert außerdem die Adhäsion und Migration von mononukleären Zellen ¹³⁴. Die Migration von Lymphozyten ist ebenfalls bei Abwesenheit des uPA-Rezeptors reduziert ¹³⁶. Diese Beteiligungen des uPA/uPAR-Systems am immunologischen Geschehen könnte ein Hinweis darauf sein, warum mesenchymalen Stammzellen häufig immunmodulatorische Fähigkeiten nachgesagt werden, obwohl dafür bis heute kein molekularer Mechanismus beschrieben ist.

Eine weitere Möglichkeit für den Grund der immunmodulatorischen Fähigkeiten könnte die Expression von Immunrezeptoren, wie den Toll-like-Rezeptoren sein.

4.4 Immunmodulatorische Fähigkeiten humaner mesenchymaler Stammzellen

Toll-like-Rezeptoren (TLR) sind hoch konservierte Schlüsselproteine, die es Säugern erlauben, Mikroben zu detektieren. Ursprünglich in *Drosophila* entdeckt und charakterisiert, sind heute 10 verschiedene TLR im Menschen bekannt. Dabei handelt es sich um breitspezifische Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*), die häufig repetitive Muster und Makromoleküle bakterieller Zellwandkomponenten, viraler Capsidproteine oder viraler RNA erkennen. Neben den Immunglobulinen und den T-Zell-Rezeptoren sind die TLR die wichtigsten Immunrezeptoren von allen ⁷⁸. 1998 wurde der TLR-4 als der LPS-Rezeptor identifiziert. LPS (Lipopolysaccharid) ist ein Hauptbestandteil der Zellmembran Gram-negativer Bakterien. Heute weiß man, daß TLR-4 nicht alleine zur Erkennung von LPS befähigt ist. Das eigentliche LPS-bindende Protein ist CD14, welches entweder über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) an der Zellmembran verankert vorliegt (mCD14), oder als lösliche Form existiert (sCD14). Mit Hilfe des Lipopolysaccharid-Binde-Proteins (LPB) kann LPS an CD14 gebunden werden. Diesem fehlt jedoch eine cytoplasmatische Domäne zur Aktivierung einer Signalkaskade. Diese Rolle übernimmt TLR-4. Zum Erkennen von Lipopolysacchariden sind somit LPB, CD14 (löslich oder membrangebunden) und TLR-4 nötig. Dieser Komplex aktiviert neben anderen Signalwegen hauptsächlich den NF- κ B abhängigen Signalweg, der typisch für viele Entzündungsreaktionen ist.

Daraufhin kommt es zur Sezernierung von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8¹³⁷. TNF- α wird von Zellen des Immunsystems gebildet und ist essenziell für eine effektive Immunreaktion.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß humane mesenchymale Stammzellen den Toll-like-Rezeptor 4 auf RNA- und auf Protein-Ebene exprimieren (Abb. 36,38). CD14 wird, wie allgemein bekannt ist und hier auf RNA-Ebene bestätigt wurde, nicht exprimiert. Eine LPS-Stimulation führte auch nicht zur Expression von CD14 (Abb. 37). Trotzdem reagierten die hMSC auf LPS-Stimulation mit einer verstärkten Bildung von TNF- α (Abb. 39). Somit muß die LPS-Erkennung, gesetzt den Fall, daß keine Verunreinigung mit proinflammatorischen Zellen vorliegt, auf TLR-4 beruhen. Als Ko-Rezeptor kann sCD14 (*soluble* CD14) dienen, wie es auch für Endothelzellen, welche TLR-4, jedoch nicht CD14 exprimieren, beschrieben ist¹³⁸.

Die hier nachgewiesene funktionelle Expression von TLR-4 in hMSC kann teilweise eine Erklärung für die immunmodulatorischen Fähigkeiten mesenchymaler Stammzellen bieten, da eine Aktivierung von NF- κ B zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine führt und so das Immunsystem aktiviert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern die These, daß hMSC aktiv an der Geweberegeneration beteiligt sind. Sie können in Richtung Defekt migrieren und das dort befindliche Fibrinnetz auflockern. Bei Transplantationen (bei denen notwendigerweise immer eine Wunde entsteht) verringern zusätzlich injizierte hMSC die Abstoßungsreaktion. Dies könnte durch eine Aktivierung des Immunsystems mit Hilfe von sekretierten Zytokinen (z. B. TNF- α) hervorgerufen werden, welche als Antwort auf eine TLR 4-Stimulation exprimiert werden. Eine Untersuchung zur Sekretion von IL-10 und TGF- β steht noch aus.

Wie aber verhalten sich hMSC, wenn sie Teil eines Transplantates sind? Hat das Trägermaterial einen Einfluß auf das Differenzierungspotenzial oder bleiben die Stammzeleigenschaften erhalten?

4.5 Tissue Engineering mit humanen mesenchymalen Stammzellen

Stammzellen sind für künstlichen Gewebeersatz von großer potenzieller Bedeutung, weil sie autolog gewonnen werden können und ein hohes Differenzierungspotenzial aufweisen. Verschiedenste Materialien, natürliche und synthetische, kommen für einen solchen Ansatz in Betracht. Diese Materialien dürfen in keinem Fall zytotoxisch auf die Zellen wirken und sollten ihr Differenzierungspotenzial nicht negativ

beeinträchtigen. Optimal wäre ein nicht zytotoxisches Material, welches die Zellen durch seine biochemischen Eigenschaften dazu anregt, in die Zellen zu differenzieren, die im Transplantatbereich benötigt werden.

Zur Zeit werden in vielen Arbeitsgruppen weltweit Materialien in Kombination mit mesenchymalen Stammzellen untersucht, um einen künstlichen Gewebeersatz herzustellen. Zu solchen Materialien gehören beispielsweise das Fibrin, welches den hMSC gute Adhärenz- und Proliferationsmöglichkeiten bietet und degradierbar ist ¹³⁹, das Chitosan, welches neben guten Adhärenz- und Proliferationsraten *in vivo* eine Chondrozytendifferenzierung (im Kaninchen) anregt ¹⁴⁰ und Kalzium-Metaphosphat, das für die hMSC biokompatibel ist und eine osteogene Differenzierung einleitet ¹⁴¹. Neben diesen „natürlichen“ bio-inspirierten Materialien werden auch synthetische Materialien in Kombination mit mesenchymalen Stammzellen untersucht. Hierzu gehört z. B. das poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyhexanoat), kurz PHBHHx, an das die Zellen gut adhären, proliferieren und in Osteoblasten differenzieren ¹⁴². Auch Polyurethan erweist sich als biokompatibel und proliferationsfördernd für mesenchymale Stammzellen ¹⁴³.

Die Zahl an zur Verfügung stehenden Materialien ist enorm und die Materialien dienen nicht nur als Trägermaterial für Zellen oder als einfaches Implantat, sondern werden teilweise so modifiziert, daß sie z. B. als Träger für Medikamente (*drug delivery*) dienen ¹⁴⁴. Der Zeitraum, in dem das Medikament den Träger verlässt kann zudem kontrolliert werden. So kann z. B. Heparin, das an einen Mikrochip gekoppelt ist, innerhalb von 142 Tagen in vier Schüben (Einzeldosen) in den Körper entlassen werden ¹⁴⁵. Auch biodegradierbare Polymere (z. B. PLGA) können Träger für Medikamente sein, die nach unterschiedlichen Zeitpunkten in den Körper freigesetzt werden. Hierzu wird die das Mischungsverhältnis von Milchsäure und Glykolsäure im Kopolymer so variiert, daß man die Degradationszeit vorherbestimmen kann. Durch eine Kombination mehrerer Polymerschichten unterschiedlicher Zusammensetzung kann dann der genaue Zeitpunkt für jeden Medikamenten-„Schub“ festgelegt werden ¹⁴⁶.

Mit Hilfe der Array-Technologie können heutzutage ganze Material-Chips hergestellt werden, die ein *high-throuput screening* zur Testung von Interaktionen zwischen Zellen und mehreren 100 oder sogar 1000 verschiedenen Materialien gleichzeitig zulassen ¹⁴⁷. So kann in relativ kurzer Zeit eine Polymermischung herausgefunden werden, die die gewünschten Eigenschaften besitzt. Mit diesen Biomaterial-Chips ist

es außerdem möglich, für Stammzellen differenzierungsfördernde oder –hemmende Materialien zu finden. Diese Anwendung wurde erstmals 2004 von Langer und Mitarbeitern durchgeführt, die die Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen auf einem solchen Polymer-Chip untersucht haben ^{147, 148}.

In jüngster Zeit werden immer aufwändigere Materialien hergestellt, welche verbesserte Biokompatibilität, sowie eingebaute Eigenschaften und Empfindlichkeiten (*smart biomaterials*) versprechen ¹⁴⁹. So gibt es heutzutage beispielsweise Materialien, welche bei Raumtemperatur flüssig sind und aushärten, wenn sie einen spezifischen externen Stimulus erhalten. Dies kann ein Temperaturunterschied oder sogar Licht sein ¹⁵⁰.

In dieser Arbeit sollten degradierbare Formgedächtnispolymere der Firma MnemoScience ¹⁵¹ auf ihre Zytokompatibilität/Zytotoxizität gegenüber humanen mesenchymalen Stammzellen untersucht werden und die Differenzierbarkeit der Zellen auf den Materialien in Richtung Adipozyten und Osteoblasten überprüft werden. Die Materialien reagieren auf einen externen Stimulus (z. B. Temperatur- oder pH-Wert-Änderungen) mit einer Formveränderung. Sie wechseln von einer temporären in eine permanente Form. Dies ist vor allem im Rahmen mikrochirurgischer Eingriffe interessant, da die temporäre Form sehr komprimiert vorliegen kann, während die permanente Form mehr Raum für sich beanspruchen kann. Mit den hier durchgeführten Versuchen wurden wesentliche Parameter der Zell-Materialinteraktion, Adhäsion, Proliferation und Differenzierung auf diesen Materialien erstmals untersucht. Von 17 Formgedächtnispolymeren wurden drei ausgewählt, die im standardisierten Test (nach ISO-Norm) mit L929-Mausfibroblasten nicht zytotoxisch waren. Diese drei Materialien wurden dann mit hMSC erneut auf Zytotoxizität untersucht und auf Differenzierbarkeit überprüft. Alle drei Materialien erwiesen sich als zytokompatibel für hMSC (Abb. 33,34), ließen eine gerichtete Differenzierung zu Osteoblasten und Adipozyten zu und induzierten keine spontanen Differenzierungen (Abb. 35). Laut den hier dargestellten Ergebnissen kommt ein Konstrukt aus hMSC und Formgedächtnispolymeren durchaus für einen *Tissue Engineering* Ansatz in Frage.

5. Zusammenfassung

Die hier vorgestellte Arbeit beschreibt exemplarisch den möglichen Einsatz humaner mesenchymaler Stammzellen in Geweberegenerations- und *Tissue Engineering*-Vorgängen. Die in der Einleitung formulierten Fragestellungen konnten nach ausreichender Charakterisierung der isolierten Zellen weitestgehend beantwortet werden.

1. Als chemotaktischer Faktor für hMSC konnte der Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF) identifiziert werden. *In vitro* migrierten die hMSC aktiv in Richtung HGF, während die Proliferation unterdrückt wurde.
2. Humane mesenchymale Stammzellen exprimierten *in vitro* die fibrinolytischen Enzyme tPA, uPA und uPAR. Das bei der Wundheilung entstehende Fibrinnetz stellt demnach keine unüberwindbare Barriere für die Stammzellen dar.
3. Die drei ausgewählten Formgedächtnispolymere sind zytokompatibel für hMSC und haben keinen negativen Einfluß auf die Differenzierbarkeit in Richtung Osteoblasten und Adipozyten.
4. Humane MSC exprimierten den TLR 4 und reagierten nach LPS-Stimulation mit einer verstärkten TNF- α -Expression.

Die aus dieser Arbeit entstandenen Daten stützen die These, daß mesenchymale Stammzellen an der Geweberegeneration beteiligt sind. Es handelt sich allerdings ausschließlich um *ex vivo* Experimente. Die bisher erzielten Ergebnisse rechtfertigen in jedem Fall weitergehende Untersuchungen im Tierexperiment. Die Vorauswahl sinnvoller Material/Zell-Kombinationen ist erfolgt und die nötigen Methoden sind erfolgreich etabliert. Als nächstes sollte die Integration eines Konstruktes aus hMSC und Formgedächtnispolymeren im Tiermodell untersucht werden. Hierzu könnten undifferenzierte und vordifferenzierte Stammzellen genutzt werden. Zur Bestätigung von HGF als Mobilisierungs- und Rekrutierungsfaktor *in vivo* könnte untersucht werden, ob intravenös verabreichte MSC in einer HGF-*knockout*-Maus zu einem Defekt migrieren oder ob der Defekt, im Vergleich zur Wildtypmaus, weniger mit Stammzellen besiedelt wird. Ob die Expression von uPA/uPAR und tPA *in vivo* tatsächlich zum Abbau eines Fibringerinnsels genutzt wird, könnte überprüft werden,

indem man zum einen unveränderte hMSC in ein Tier mit erzeugter Wunde injiziert, zum anderen hMSC, bei denen die Gene für uPA, uPAR und/oder tPA ausgeschaltet sind. Sollten in den Tieren mit genetisch veränderten hMSC weniger Stammzellen im Wundgebiet zu finden sein, wären die fibrinolytischen Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen eindeutig nachgewiesen.

6. Literaturverzeichnis

1. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*. Jun 29 2001;105(7):829-841.
2. Wagner J, Verfaillie C. Ex vivo expansion of umbilical cord blood hematopoietic stem and progenitor cells. *Experimental Hematology*. 2004;32:409-413.
3. Hochedlinger K, Rideout WM, Kyba M, Daley GQ, Blelloch R, Jaenisch R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells and the potential for cell therapy. *Hematol J*. 2004;5 Suppl 3:S114-117.
4. Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell*. Sep 3 2004;118(5):635-648.
5. Yamashita YM, Jones DL, Fuller MT. Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science*. Sep 12 2003;301(5639):1547-1550.
6. Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol*. Nov 2002;12(11):502-508.
7. Verfaillie CM, Schwartz R, Reyes M, Jiang Y. Unexpected potential of adult stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. May 2003;996:231-234.
8. Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*. May 23 2003;300(5623):1251-1256.
9. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*. Mar 19 2004;116(6):769-778.
10. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 15 1995;92(17):7844-7848.
11. Shambloot MJ, Axelman J, Wang S, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 10 1998;95(23):13726-13731.
12. Rathjen PD, Lake J, Whyatt LM, Bettess MD, Rathjen J. Properties and uses of embryonic stem cells: prospects for application to human biology and gene therapy. *Reprod Fertil Dev*. 1998;10(1):31-47.
13. Wobus AM, Holzhausen H, Jakel P, Schoneich J. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res*. May 1984;152(1):212-219.
14. Andrews PW. Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article. *Apmis*. Jan 1998;106(1):158-167; discussion 167-158.
15. Kleinsmith LJ, Pierce GB, Jr. Multipotentiality Of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Res*. Oct 1964;24:1544-1551.
16. Schuldiner M, Eiges R, Eden A, et al. Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *Brain Res*. Sep 21 2001;913(2):201-205.

17. Rossant J. Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem Cells*. 2001;19(6):477-482.
18. Mörike KD, Betz E, Mergenthaler W. *Biologie des Menschen*. Vol 15. Heidelberg: Quelle und Meyer Verlag; 2001.
19. Ford CE, Hamerton JL, Barnes DW, Loutit JF. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*. Mar 10 1956;177(4506):452-454.
20. Nowell PC, Cole LJ, Habermeyer JG, Roan PL. Growth and continued function of rat marrow cells in x-radiated mice. *Cancer Res*. Mar 1956;16(3):258-261.
21. Lewis JP, Trobaugh FEJ. Hematopoietic stem cells. *Nature*. 1964;204:589-590.
22. Curry JL, Trentin JJ, Wolf N. Hemopoietic spleen colony studies. II. Erythropoiesis. *J Exp Med*. Apr 1 1967;125(4):703-720.
23. Krause DS, Ito T, Fackler MJ, et al. Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*. Aug 1 1994;84(3):691-701.
24. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. Jul 1 1988;241(4861):58-62.
25. Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, et al. Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. May 2003;996:141-151.
26. Bonanno G, Perillo A, Rutella S, et al. Clinical isolation and functional characterization of cord blood CD133+ hematopoietic progenitor cells. *Transfusion*. Jul 2004;44(7):1087-1097.
27. Kogler G, Sensken S, Airey JA, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med*. Jul 19 2004;200(2):123-135.
28. Staba SL, Escolar ML, Poe M, et al. Cord-blood transplants from unrelated donors in patients with Hurler's syndrome. *N Engl J Med*. May 6 2004;350(19):1960-1969.
29. Gluckman E. Ex vivo expansion of cord blood cells. *Exp Hematol*. May 2004;32(5):410-412.
30. Chivu M, Diaconu CC, Bleotu C, Alexiu I, Brasoveanu L, Cernescu C. The comparison of different protocols for expansion of umbilical-cord blood hematopoietic stem cells. *J Cell Mol Med*. Apr-Jun 2004;8(2):223-231.
31. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. Mar 1968;6(2):230-247.
32. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol*. May 2004;32(5):414-425.
33. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. Apr 2 1999;284(5411):143-147.
34. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*. Feb 1997;64(2):278-294.
35. Phinney DG, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N, Prockop DJ. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem*. Dec 1 1999;75(3):424-436.

36. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.* Oct 1999;181(1):67-73.
37. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. 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.* Jul 3 2001;98(14):7841-7845.
38. Park SR, Oreffo RO, Triffitt JT. Interconversion potential of cloned human marrow adipocytes in vitro. *Bone.* Jun 1999;24(6):549-554.
39. Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells.* 2004;22(4):625-634.
40. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Minireview Mesenchymal Stem Cells. *Society for Experimental Biology and Medicine.* 2001;226(6):507-520.
41. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol.* Nov 1999;107(2):275-281.
42. Harris MT, Butler DL, Boivin GP, Florer JB, Schantz EJ, Wenstrup RJ. Mesenchymal stem cells used for rabbit tendon repair can form ectopic bone and express alkaline phosphatase activity in constructs. *J Orthop Res.* Sep 2004;22(5):998-1003.
43. Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells.* 2004;22(4):487-500.
44. Hicok KC, Thomas T, Gori F, Rickard DJ, Spelsberg TC, Riggs BL. Development and characterization of conditionally immortalized osteoblast precursor cell lines from human bone marrow stroma. *J Bone Miner Res.* Feb 1998;13(2):205-217.
45. Dennis JE, Caplan AI. Analysis of the developmental potential of conditionally immortal marrow-derived mesenchymal progenitor cells isolated from the H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Connect Tissue Res.* 1996;35(1-4):93-99.
46. Song X, Zhu CH, Doan C, Xie T. Germline stem cells anchored by adherens junctions in the *Drosophila* ovary niches. *Science.* Jun 7 2002;296(5574):1855-1857.
47. Neuss S, Becher E, Woltje M, Tietze L, Jahnen-Dechent W. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. *Stem Cells.* 2004;22(3):405-414.
48. Nakamura T, Teramoto H, Ichihara A. Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 1986;83(17):6489-6493.
49. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun.* Aug 16 1984;122(3):1450-1459.
50. Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, et al. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature.* Nov 23 1989;342(6248):440-443.
51. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, et al. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science.* Feb 15 1991;251(4995):802-804.
52. Zhu H, Naujokas MA, Park M. Receptor chimeras indicate that the met tyrosine kinase mediates the motility and morphogenic responses of hepatocyte growth/scatter factor. *Cell Growth Differ.* Apr 1994;5(4):359-366.

53. Zarnegar R, Michalopoulos GK. The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J Cell Biol.* Jun 1995;129(5):1177-1180.
54. Shiota G, Okano J, Umeki K, Kawasaki H, Kawamoto T, Nakamura T. Serum hepatocyte growth factor in acute hepatic failure in comparison with acute hepatitis. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* Aug 1994;85(2):157-162.
55. Shiota G, Okano J, Kawasaki H, Kawamoto T, Nakamura T. Serum hepatocyte growth factor levels in liver diseases: clinical implications. *Hepatology.* Jan 1995;21(1):106-112.
56. Arai S, Klingemann HG. Hematopoietic stem cell transplantation: bone marrow vs. mobilized peripheral blood. *Arch Med Res.* Nov-Dec 2003;34(6):545-553.
57. Elfenbein GJ, Sackstein R. Primed marrow for autologous and allogeneic transplantation: a review comparing primed marrow to mobilized blood and steady-state marrow. *Exp Hematol.* Apr 2004;32(4):327-339.
58. Korbiling M, Przepiorka D, Huh YO, et al. Allogeneic blood stem cell transplantation for refractory leukemia and lymphoma: potential advantage of blood over marrow allografts. *Blood.* Mar 15 1995;85(6):1659-1665.
59. Vigorito AC, Azevedo WM, Marques JF, et al. A randomised, prospective comparison of allogeneic bone marrow and peripheral blood progenitor cell transplantation in the treatment of haematological malignancies. *Bone Marrow Transplant.* Dec 1998;22(12):1145-1151.
60. Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM, et al. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood.* Jun 15 2000;95(12):3702-3709.
61. Tyndall A, Matucci-Cerinic M. Haematopoietic stem cell transplantation for the treatment of systemic sclerosis and other autoimmune disorders. *Expert Opin Biol Ther.* Oct 2003;3(7):1041-1049.
62. Grewal SS, Kahn JP, MacMillan ML, Ramsay NK, Wagner JE. Successful hematopoietic stem cell transplantation for Fanconi anemia from an unaffected HLA-genotype-identical sibling selected using preimplantation genetic diagnosis. *Blood.* Feb 1 2004;103(3):1147-1151.
63. Peterson DA. Umbilical cord blood cells and brain stroke injury: bringing in fresh blood to address an old problem. *J Clin Invest.* Aug 2004;114(3):312-314.
64. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature.* Nov 1 2001;414(6859):118-121.
65. Karlson P, Doenecke D, Koolman J. Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Vol 14. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 1994.
66. Minguell JJ, Conget P, Erices A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res.* Aug 2000;33(8):881-887.
67. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.* Aug 2000;28(8):875-884.
68. Mankani MH, Kuznetsov SA, Fowler B, Kingman A, Robey PG. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: effect of carrier particle size and shape. *Biotechnol Bioeng.* Jan 5 2001;72(1):96-107.
69. Fuchs JR, Hannouche D, Terada S, Vacanti JP, Fauza DO. Fetal tracheal augmentation with cartilage engineered from bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Pediatr Surg.* Jun 2003;38(6):984-987.

70. Silani V, Cova L, Corbo M, Ciammola A, Polli E. Stem-cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. Jul 10 2004;364(9429):200-202.
71. Nagaya N, Fujii T, Iwase T, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jul 29 2004.
72. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg*. Jun 2002;73(6):1919-1925; discussion 1926.
73. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. Jan 2002;30(1):42-48.
74. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. Feb 15 2003;75(3):389-397.
75. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. Oct 2003;31(10):890-896.
76. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. May 15 2002;99(10):3838-3843.
77. Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. 2003;5(6):485-489.
78. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol*. Feb 2004;40(12):845-859.
79. Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol*. Jul 1 2001;167(1):416-423.
80. Hoebe K, Du X, Georgel P, et al. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature*. Aug 14 2003;424(6950):743-748.
81. Beutler B. Sepsis begins at the interface of pathogen and host. *Biochem Soc Trans*. Nov 2001;29(Pt 6):853-859.
82. Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science*. Jun 6 2003;300(5625):1524-1525.
83. Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. Dec 11 1998;282(5396):2085-2088.
84. O'Brien AD, Rosenstreich DL, Scher I, Campbell GH, MacDermott RP, Formal SB. Genetic control of susceptibility to *Salmonella typhimurium* in mice: role of the LPS gene. *J Immunol*. Jan 1980;124(1):20-24.
85. Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol*. Jun 2002;23(6):301-304.
86. Minuth WW, Strehl R, Schumacher K. Von der Zellkultur zum Tissue engineering. Vol 1. Auflage. Berlin: Pabst Science Publishers; 2002.
87. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. *Biomaterials Science*. London: Academic Press; 1996.
88. Pschyrembel. *Klinisches Wörterbuch*. Vol 259: Gruyter; 2002.
89. Fischer B. *Wundfibel*. Norderstedt: Johnson & Johnson; 2004.
90. Riede UN, Schaefer HE. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Vol 4. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1995.

91. Vassalli JD, Sappino AP, Belin D. The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest.* Oct 1991;88(4):1067-1072.
92. Waltz DA, Sailor LZ, Chapman HA. Cytokines induce urokinase-dependent adhesion of human myeloid cells. A regulatory role for plasminogen activator inhibitors. *J Clin Invest.* Apr 1993;91(4):1541-1552.
93. Sillaber C, Baghestanian M, Bevec D, et al. The mast cell as site of tissue-type plasminogen activator expression and fibrinolysis. *J Immunol.* Jan 15 1999;162(2):1032-1041.
94. Kucharewicz I, Kowal K, Buczek W, Bodzenta-Lukaszyk A. The plasmin system in airway remodeling. *Thromb Res.* 2003;112(1-2):1-7.
95. Levi M, Roem D, Kamp AM, de Boer JP, Hack CE, ten Cate JW. Assessment of the relative contribution of different protease inhibitors to the inhibition of plasmin in vivo. *Thromb Haemost.* Feb 1 1993;69(2):141-146.
96. Wei Y, Lukashev M, Simon DI, et al. Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science.* Sep 13 1996;273(5281):1551-1555.
97. Cho SH, Tam SW, Demissie-Sanders S, Filler SA, Oh CK. Production of plasminogen activator inhibitor-1 by human mast cells and its possible role in asthma. *J Immunol.* Sep 15 2000;165(6):3154-3161.
98. Park KW, Choi SH, Song XX, Funahashi H, Niwa K. Production of plasminogen activators (PAs) in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation in vitro: effects of epidermal growth factor on production of PAs in oocytes and cumulus cells. *Biol Reprod.* Jul 1999;61(1):298-304.
99. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med.* Dec 19 2002;347(25):1999-2009.
100. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* Jan 31 2002;415(6871):530-536.
101. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science.* Oct 15 1999;286(5439):531-537.
102. Abeyta MJ, Clark AT, Rodriguez RT, Bodnar MS, Pera RA, Firpo MT. Unique gene expression signatures of independently-derived human embryonic stem cell lines. *Hum Mol Genet.* Mar 15 2004;13(6):601-608.
103. Tanaka TS, Kunath T, Kimber WL, et al. Gene expression profiling of embryo-derived stem cells reveals candidate genes associated with pluripotency and lineage specificity. *Genome Res.* Dec 2002;12(12):1921-1928.
104. Bruno L, Hoffmann R, McBlane F, et al. Molecular signatures of self-renewal, differentiation, and lineage choice in multipotential hemopoietic progenitor cells in vitro. *Mol Cell Biol.* Jan 2004;24(2):741-756.
105. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol.* Sep 2001;3(9):778-784.
106. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* Apr 2001;7(2):211-228.
107. Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood.* Apr 15 2003;101(8):2999-3001.
108. Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell.* May 4 2001;105(3):369-377.

109. Matsumoto K, Date K, Ohmichi H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor in lung morphogenesis and tumor invasion: role as a mediator in epithelium-mesenchyme and tumor-stroma interactions. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1996;38 Suppl:S42-47.
110. Kmiecik TE, Keller JR, Rosen E, Vande Woude GF. Hepatocyte growth factor is a synergistic factor for the growth of hematopoietic progenitor cells. *Blood*. Nov 15 1992;80(10):2454-2457.
111. Nishino T, Hisha H, Nishino N, Adachi M, Ikehara S. Hepatocyte growth factor as a hematopoietic regulator. *Blood*. Jun 1 1995;85(11):3093-3100.
112. Chesnoy S, Lee PY, Huang L. Intradermal injection of transforming growth factor-beta1 gene enhances wound healing in genetically diabetic mice. *Pharm Res*. Mar 2003;20(3):345-350.
113. Beilmann M, Odenthal M, Jung W, Vande Woude GF, Dienes HP, Schirmacher P. Neoexpression of the c-met/hepatocyte growth factor-scatter factor receptor gene in activated monocytes. *Blood*. Dec 1 1997;90(11):4450-4458.
114. Cowin AJ, Kallincos N, Hatzirodos N, et al. Hepatocyte growth factor and macrophage-stimulating protein are upregulated during excisional wound repair in rats. *Cell Tissue Res*. Nov 2001;306(2):239-250.
115. Wilson SE, Chen L, Mohan RR, Liang Q, Liu J. Expression of HGF, KGF, EGF and receptor messenger RNAs following corneal epithelial wounding. *Exp Eye Res*. Apr 1999;68(4):377-397.
116. Yoshida S, Yamaguchi Y, Itami S, et al. Neutralization of hepatocyte growth factor leads to retarded cutaneous wound healing associated with decreased neovascularization and granulation tissue formation. *J Invest Dermatol*. Feb 2003;120(2):335-343.
117. Pediaditakis P, Lopez-Talavera JC, Petersen B, Monga SP, Michalopoulos GK. The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat. *Hepatology*. Oct 2001;34(4 Pt 1):688-693.
118. Takai K, Hara J, Matsumoto K, et al. Hepatocyte growth factor is constitutively produced by human bone marrow stromal cells and indirectly promotes hematopoiesis. *Blood*. Mar 1 1997;89(5):1560-1565.
119. Soeki T, Tamura Y, Shinohara H, Sakabe K, Onose Y, Fukuda N. Serum hepatocyte growth factor predicts ventricular remodeling following myocardial infarction. *Circ J*. Nov 2002;66(11):1003-1007.
120. Tietze L, Elbrecht A, Schauerte C, et al. Modulation of pro- and antifibrinolytic properties of human peritoneal mesothelial cells by transforming growth factor beta1 (TGF-beta1), tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin 1beta (IL-1beta). *Thromb Haemost*. Feb 1998;79(2):362-370.
121. Marx N, Bourcier T, Sukhova GK, Libby P, Plutzky J. PPARgamma activation in human endothelial cells increases plasminogen activator inhibitor type-1 expression: PPARgamma as a potential mediator in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Mar 1999;19(3):546-551.
122. Nonaka T, Kikuchi H, Ikeda T, Okamoto Y, Hamanishi C, Tanaka S. Hyaluronic acid inhibits the expression of u-PA, PAI-1, and u-PAR in human synovial fibroblasts of osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. Apr 2000;27(4):997-1004.
123. Brogren H, Karlsson L, Andersson M, Wang L, Erlinge D, Jern S. Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor-1. *Blood*. Aug 17 2004.

124. Mondino A, Blasi F. uPA and uPAR in fibrinolysis, immunity and pathology. *Trends Immunol.* Aug 2004;25(8):450-455.
125. Bugge TH, Flick MJ, Danton MJ, et al. Urokinase-type plasminogen activator is effective in fibrin clearance in the absence of its receptor or tissue-type plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 11 1996;93(12):5899-5904.
126. Wei Y, Eble JA, Wang Z, Kreidberg JA, Chapman HA. Urokinase receptors promote beta1 integrin function through interactions with integrin alpha3beta1. *Mol Biol Cell.* Oct 2001;12(10):2975-2986.
127. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer.* Jul 3 1997;72(1):1-22.
128. Deng G, Curriden SA, Wang S, Rosenberg S, Loskutoff DJ. Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release? *J Cell Biol.* Sep 1996;134(6):1563-1571.
129. Waltz DA, Natkin LR, Fujita RM, Wei Y, Chapman HA. Plasmin and plasminogen activator inhibitor type 1 promote cellular motility by regulating the interaction between the urokinase receptor and vitronectin. *J Clin Invest.* Jul 1 1997;100(1):58-67.
130. Foekens JA, Schmitt M, van Putten WL, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer. *J Clin Oncol.* Aug 1994;12(8):1648-1658.
131. Zhou HM, Nichols A, Meda P, Vassalli JD. Urokinase-type plasminogen activator and its receptor synergize to promote pathogenic proteolysis. *Embo J.* Sep 1 2000;19(17):4817-4826.
132. Blasi F. Molecular mechanisms of protease-mediated tumor invasiveness. *J Surg Oncol Suppl.* 1993;3:21-23.
133. Abraham E, Gyetko MR, Kuhn K, et al. Urokinase-type plasminogen activator potentiates lipopolysaccharide-induced neutrophil activation. *J Immunol.* Jun 1 2003;170(11):5644-5651.
134. Blasi F. The urokinase receptor. A cell surface, regulated chemokine. *Apmis.* Jan 1999;107(1):96-101.
135. Gyetko MR, Chen GH, McDonald RA, et al. Urokinase is required for the pulmonary inflammatory response to *Cryptococcus neoformans*. A murine transgenic model. *J Clin Invest.* Apr 15 1996;97(8):1818-1826.
136. Gyetko MR, Sud S, Sonstein J, Polak T, Sud A, Curtis JL. Antigen-driven lymphocyte recruitment to the lung is diminished in the absence of urokinase-type plasminogen activator (uPA) receptor, but is independent of uPA. *J Immunol.* Nov 15 2001;167(10):5539-5542.
137. Fernandes A, Silva RF, Falcao AS, Brito MA, Brites D. Cytokine production, glutamate release and cell death in rat cultured astrocytes treated with unconjugated bilirubin and LPS. *J Neuroimmunol.* Aug 2004;153(1-2):64-75.
138. Pugin J, Schurer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 1 1993;90(7):2744-2748.
139. Bensaid W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials.* Jun 2003;24(14):2497-2502.
140. Cho JH, Kim SH, Park KD, et al. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using a thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide)

- and water-soluble chitosan copolymer. *Biomaterials*. Nov 2004;25(26):5743-5751.
141. Park EK, Lee YE, Choi JY, et al. Cellular biocompatibility and stimulatory effects of calcium metaphosphate on osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived stromal cells. *Biomaterials*. Aug 2004;25(17):3403-3411.
 142. Yang M, Zhu S, Chen Y, et al. Studies on bone marrow stromal cells affinity of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Biomaterials*. Mar-Apr 2004;25(7-8):1365-1373.
 143. Ganta SR, Piesco NP, Long P, et al. Vascularization and tissue infiltration of a biodegradable polyurethane matrix. *J Biomed Mater Res*. Feb 1 2003;64A(2):242-248.
 144. Langer R. Drug delivery. Drugs on target. *Science*. Jul 6 2001;293(5527):58-59.
 145. Richards Grayson AC, Choi IS, Tyler BM, et al. Multi-pulse drug delivery from a resorbable polymeric microchip device. *Nat Mater*. Nov 2003;2(11):767-772.
 146. West JL. Drug delivery: pulsed polymers. *Nat Mater*. Nov 2003;2(11):709-710.
 147. Anderson DG, Levenberg S, Langer R. Nanoliter-scale synthesis of arrayed biomaterials and application to human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. Jul 2004;22(7):863-866.
 148. Hubbell JA. Biomaterials science and high-throughput screening. *Nat Biotechnol*. Jul 2004;22(7):828-829.
 149. Anderson DG, Burdick JA, Langer R. Materials science. Smart biomaterials. *Science*. Sep 24 2004;305(5692):1923-1924.
 150. Anseth KS, Shastri VR, Langer R. Photopolymerizable degradable polyanhydrides with osteocompatibility. *Nat Biotechnol*. Feb 1999;17(2):156-159.
 151. Lendlein A, Langer R. Biodegradable, elastic shape-memory polymers for potential biomedical applications. *Science*. May 31 2002;296(5573):1673-1676.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Sabine Neuß-Stein, geb. Neuß
Geburtsdatum: 30.07.1976
Geburtsort: Düren
Anschrift: Oppenhoffallee 75
52066 Aachen
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

1983 – 1987 Katholische Grundschule, Dürwiß
1987 – 1996 Bischöfliche Liebfrauenschule, Eschweiler
Abschluß: Abitur

Universität:

10/96 – 01/02	RWTH Aachen:	Biologie-Studium
	Abschluß:	Diplom Biologin
	Schwerpunkte:	Mikrobiologie, Molekularbiologie, Biotechnologie
	Diplomarbeit:	Isolation, Kultivierung und Differenzierungsanalyse humaner mesenchymaler Stammzellen des Knochenmarks
11/99 – 03/02	Uniklinikum Aachen, Institut für Pathologie:	studentische Hilfskraft
seit 04/02	Uniklinikum Aachen, Institut für Pathologie/ ZKF Biomat:	
	Promotion:	Untersuchungen zur Bedeutung mesenchymaler Stammzellen in der Geweberegeneration

Danksagung

Herrn Prof. Jannen-Dechent möchte ich für die Übernahme des Gutachtens, sowie für die unkomplizierte und sehr gute Betreuung meiner Promotion danken.

Frau Prof. Knüchel-Clarke danke ich für die Aufnahme in ihr Forschungsteam und für die stets motivierende und positive Unterstützung meiner Arbeit.

Bei Herrn Prof. Wolf möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Herrn Prof. Tietze danke ich für die Ausarbeitung des interessanten Themas.

Bei Frau Dr. Becher möchte ich mich für die gute Betreuung zu Beginn meiner Promotion und für die Unterstützung bei der Erstellung des HGF/c-met-Manuskriptes bedanken.

Herrn Dr. von Bülow danke ich für die gute Kooperation im Rahmen der TLR 4 Experimente.

Herrn Dr. Denecke danke ich für die Herstellung der cRNA und die Ausarbeitung der Chip-Experiment-Daten.

Bei Dr. Perez-Bouza möchte ich mich für eine allgemein gute Zusammenarbeit und viele hilfreiche Fachgespräche bedanken.

Bei Frau Rosewick bedanke ich mich sehr für die große Hilfe in der Zellkultur und bei den Zytotoxizitätstests.

Frau Palm danke ich für die hervorragende Einarbeitung in die Zytotoxizitätstests.

Frau Stainforth danke ich für die Unterstützung bei den Differenzierungsversuchen auf Formgedächtnispolymeren.

Der Firma mnemoScience GmbH, Übach-Palenberg, danke ich für die Bereitstellung der Formgedächtnispolymere im Rahmen des „Serosa-Patch-Projektes“.

Dem Ärzteteam der orthopädischen Klinik bin ich für die Bereitstellung von humanem Aspirat und Spongiosa zu Dank verpflichtet, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Allen Mitarbeitern der Forschungslabore (Institut für Pathologie und IZKF Biomat) möchte ich für die stets angenehme, gutgelaunte und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre danken.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Mann, die mich in jeder Phase meiner Promotion von ganzem Herzen unterstützt haben!