

Aus dem Anatomischen Institut  
(Geschäftsführender Vorstand: Professor Dr. Jobst Sievers)  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

# TUMORRISIKO DURCH TISSUE ENGINEERING

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von  
**IZZETTIN AKAY**  
aus Midyat

Kiel, 2009

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Kurz, Anatomisches Institut
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wiltfang, Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2009

Zum Druck genehmigt:

Kiel, den 11.09.2009

gez. Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi  
(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

*Meinen Eltern  
in Dankbarkeit gewidmet*

# INHALTSVERZEICHNIS

	<b>Seite</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Allgemeines.....	1
1.2 Übersicht der Stammzellen und Keimzellen.....	3
1.2.1 Embryonale Stammzellen (ESC).....	4
1.2.2 Embryonale Keimzellen (EGC).....	5
1.2.3 Adulte bzw. gewebespezifische Stammzellen.....	6
1.2.3.1 Hämatopoetische Stammzellen (HSC).....	7
1.2.3.2 Mesenchymale Stammzellen (MSC).....	7
1.3 Anwendung von MSC in der Orthopädie.....	9
1.4 Immunmodulatorische Fähigkeiten der MSC.....	10
1.5 Die Rolle des Immunsystems bei der Krebsbekämpfung, Krebs- Immunotherapie.....	13
1.6 Fragestellung.....	14
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
2.1 Chemikalien.....	15
2.2 Zellkultur.....	17
2.2.1 Zellkultur von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen...	17
2.2.1.1 Auftauen der in flüssigem Stickstoff gelagerten MSC...	17
2.2.1.2 Subkultivierung für Monolayer-Zellkultur.....	18
2.2.1.3 Vitalitätskontrolle und Zellzahlermittlung.....	19
2.2.1.4 Einfrieren von mesenchymalen Stammzellen.....	20

	<b>Seite</b>
2.2.2 Chondrogene Differenzierung von MSC.....	20
2.2.2.1 Chondrogene Differenzierung in Monolayer-Zellkultur.	21
2.2.2.2 Chondrogene Differenzierung in 3D-Alginat-Zellkultur.	21
2.2.2.3 Chondrogene Differenzierung in 3D-Hohe-Dichte-Zellkultur.....	22
2.2.3 Gewinnung von avitalen mesenchymalen Stammzellen durch Gefriertrocknung (Lyophilisation).....	22
2.2.4 Zellkultur von Melanomzellen.....	22
2.2.5 Isolierung und in-vitro-Expansion von Gelenkknorpelzellen.....	23
2.2.6 Eindeckeln von Monolayer-Kulturen für Lichtmikroskopie.....	23
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	24
2.3.1 RNA-Isolierung aus Zellen.....	24
2.3.2 RT-PCR (Synthese von cDNA).....	25
2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Amplifikation der cDNA).....	27
2.3.4 Gelelektrophorese (Analyse der PCR-Amplifikate).....	27
2.3.5 Real-time-PCR (Quantifizierung der cDNA).....	28
2.4 Zellmarkierung.....	30
2.4.1 Fluoreszenzmarkierung mit CM-Dil.....	30
2.4.2 Fluoreszenzmarkierung durch EGFP-Gen-Transduktion bei mesenchymalen Stammzellen.....	30
2.5 Versuchsdesign.....	32
2.5.1 Versuchstiere.....	32
2.5.2 Versuchsgruppen.....	33
2.5.3 Applikation von MSC und nativen Gelenkknorpelzellen.....	34
2.5.4 Inokulation von Melanomzellen.....	35
2.5.5 Untersuchung der Versuchstiere.....	35
2.5.6 Organentnahme.....	35
2.6 Histologische Methoden.....	37
2.6.1 Paraffineinbettung.....	37
2.6.2 HE-Färbung.....	37

	<b>Seite</b>
2.6.3 Mikroskopie.....	38
2.7 Statistik.....	38
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
3.1 Markierungs- und Differenzierungsversuche in vitro.....	39
3.1.1 Fluoreszenzmarkierung vitaler MSC.....	39
3.1.1.1 Cytochemische Fluoreszenzmarkierung von vitalen MSC mit Celltracker® CM-Dil C7000.....	39
3.1.1.2 Stabile Fluoreszenzmarkierung von vitalen MSC durch Transduktion mit dem EGFP-Gen.....	40
3.1.2 Differenzierungsversuche.....	42
3.1.3 Molekularbiologische Charakterisierung der isolierten nativen Gelenkknorpelzellen.....	44
3.1.4 Gewinnung von avitalen mesenchymalen Stammzellen.....	45
3.2 Ergebnisse der tierexperimentellen Versuche.....	46
3.2.1 Nachweis der hohen Malignität von B16 Melanomzellen bei syngener Inokulation.....	46
3.2.2 Hemmung des Tumorwachstums nach allogener Implantation...	47
3.2.3 Tumorwachstum nach subkutaner Koimplantation von B16 Melanomzellen und undifferenzierten MSC.....	49
3.2.3.1 Tumorwachstumsförderung durch undifferenzierte EGFP-transduzierte MSC.....	49
3.2.3.2 Tumorwachstum bei Koimplantation von B16 Melanomzellen und CM-Dil-fluoreszenzmarkierten undifferenzierten MSC.....	50
3.2.4 Reduktion der Tumorwachstumsförderung bei vorheriger kartilaginärer Differenzierung der MSC.....	51
3.2.5 Reduziertes Tumorwachstum bei Koimplantation mit avitalen, gefriergetrockneten undifferenzierten MSC.....	53

	<b>Seite</b>
3.2.6 Keine Tumorwachstumsstimulation nach Koimplantation mit in vitro vermehrten nativen Gelenkknorpelzellen.....	54
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>57</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>65</b>
<b>6. Summary.....</b>	<b>67</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>68</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>83</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>84</b>
<b>Poster und Vorträge.....</b>	<b>86</b>
<b>Erklärung.....</b>	<b>87</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ACH	adulte Chondrozyten
ACT	autologe Chondrozyten-Transplantation
bp	Basenpaare
CD14/CD34/CD45	Cluster of Differentiation (hämatopoetische Marker)
CD40/CD80/CD86	Cluster of Differentiation (immunogene Marker)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CM-Dil	Chlormethylbenzamido-Fluoreszenzfarbstoff
CY3	Cytochrom a3
DAB	Diaminobenzidin
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
d.h.	das heißt
dt.	deutsch
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetatessigsäure
EGC	embryonale Keimzellen (engl.: embryonal germ cells)
env-Proteine	envelope Proteine (Außenhülle komplexer Viren)
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EPO	Erythropoetin
ESC	embryonale Stammzellen (engl.: embryonal stem cells)
ESchG	Embryonenschutzgesetz
et al.	et alii (dt.: und andere)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FNX-ampho	Verpackungszelllinie für murine und humane Zellen



---

FNX-eco	Verpackungszelllinie für murine Zellen
g	Zentrifugalbeschleunigung
G-CSF	Granulozyten koloniestimulierender Faktor
GVHD	Graft versus Host Disease
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hanks' Buffering Salt Solution
HSC	hämatopoetische Stammzellen
HLA	Human Leucocyt Antigen (Histokompatibilitätsantigene)
i.e.	id est (dt.: das ist)
IRES	Internal Ribosome Entry Side
LTR	Long Terminal Repeat
M	molar
mABs	monoclonal Antibodies
MDB	Membrane Desalting Buffer
µl	Mikroliter
mM	millimolar
mg	Milligram
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MoMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	messenger (dt.: Boten-) Ribonukleinsäure
MSC	mesenchymale Stammzellen
NIH	National Institute of Health (USA)
OA	Osteoarthrose
OI	Osteogenesis imperfecta
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonukleosinsäure
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
SV40	viraler Promotor
Tab.	Tabelle

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

	<b>Seite</b>
<b>Abb. 1:</b> Erhöhtes Tumorrisiko als unerwünschte Wirkung bei Behandlung mit Immunsuppressiva.....	2
<b>Abb. 2:</b> Differenzierungspotential und Gewinnung von Stammzellen.....	3
<b>Abb. 3:</b> Das Maus-Tumormodell.....	12
<b>Abb. 4:</b> Struktur des retroviralen Vektors pBabePuro.....	31
<b>Abb. 5:</b> Übersicht der Versuchsgruppen.....	34
<b>Abb. 6:</b> Fluoreszenzmarkierung von vitalen mesenchymalen Stammzellen mit CM-Dil.....	40
<b>Abb. 7:</b> Kill-Curve zur Selektion der erfolgreich mit EGFP-Gen transduzierten mesenchymalen Stammzellen.....	41
<b>Abb. 8:</b> Fluoreszenzmarkierung von vitalen mesenchymalen Stammzellen durch Transduktion mit dem EGFP-Gen.....	41
<b>Abb. 9:</b> Stabilität der Fluoreszenzmarkierung bei kartilaginärer Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen.....	42
<b>Abb. 10:</b> Synthese extrazellulärer Matrixmoleküle nach chondrogener Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen.....	43
<b>Abb. 11:</b> Nachweis der Expression der Markergene für Kollagen Typ II und Aggrecan bei den isolierten nativen Gelenkknorpelzellen.....	44
<b>Abb. 12:</b> Morphologie der mesenchymalen Stammzellen und der nativen Gelenkknorpelzellen im Phasenkontrastbild.....	45
<b>Abb. 13:</b> Makroskopische Befunde vier Wochen nach syngener Melanomzellinokulation.....	47
<b>Abb. 14:</b> Exemplarischer Befund eines subkutanen Primärtumors in der Versuchsgruppe B16 <sub>ALLO</sub> /- vier Wochen nach Behandlung.....	48
<b>Abb. 15:</b> Makroskopischer und histologischer Befund eines subkutan lokalisierten Primärtumor in der Versuchsgruppe B16 <sub>ALLO</sub> /MSC <sub>EGFP</sub> vier Wochen nach Behandlung.....	50

	<b>Seite</b>
<b>Abb. 16:</b> Makroskopischer und histologischer Befund einer Bauchfellmetastase in der Versuchsgruppe B16 <sub>ALLO</sub> /MSC <sub>CM-DII</sub> vier Wochen nach Behandlung.....	51
<b>Abb. 17:</b> Makroskopischer und histologischer Befund eines Hauttumors in der Versuchsgruppe B16 <sub>ALLO</sub> /MSC-C <sub>EGFP</sub> vier Wochen nach Behandlung.....	52
<b>Abb. 18:</b> Makroskopischer und histologischer Befund einer Bauchfellmetastase des Melanoms in der Versuchsgruppe B16 <sub>ALLO</sub> /MSC-AV <sub>EGFP</sub> vier Wochen nach Behandlung.....	54
<b>Abb. 19:</b> Makroskopischer und histologischer Befund eines malignen Melanoms in der Versuchsgruppe B16 <sub>ALLO</sub> /C vier Wochen nach Behandlung.....	55
<b>Abb. 20:</b> Gesamtdarstellung der Tumorinzidenzen und -volumina.....	56
<b>Abb. 21:</b> Vergleich der Tumorinzidenzen mit vorherigen Studien.....	59
<b>Abb. 22:</b> Hinweis auf in-vivo-Zellfusion zwischen Melanomzellen und undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen.....	61

## TABELLENVERZEICHNIS

	<b>Seite</b>
<b>Tab. 1:</b> Zusammensetzung von Basismedium.....	18
<b>Tab. 2:</b> Zusammensetzung der Trypsin-EDTA-Lösung.....	19
<b>Tab. 3:</b> Zusammensetzung von Einfrier-Medium.....	20
<b>Tab. 4:</b> Zusammensetzung von Differenzierungsmedium.....	20
<b>Tab. 5:</b> DNase und Lysispuffer.....	24
<b>Tab. 6:</b> Übersicht der RT-PCR Primer.....	26
<b>Tab. 7:</b> Zusammensetzung von DNase-Verdau.....	26
<b>Tab. 8:</b> Zusammensetzung der Qiagen®One Step RT-PCR.....	27
<b>Tab. 9:</b> Übersicht der einzelnen Schritte der RT-PCR.....	27
<b>Tab. 10:</b> Zusammensetzung des Agarosegels.....	28
<b>Tab. 11:</b> Reaktionsansatz für eine real-time PCR.....	29
<b>Tab. 12:</b> Übersicht der eingesetzten TaqMan® Sonden.....	30
<b>Tab. 13:</b> Bevorzugte Fernmetastasen maligner Melanome.....	36
<b>Tab. 14:</b> Herstellung von 4%igem Paraformaldehyd.....	36
<b>Tab. 15:</b> Hoch signifikante Senkung des Primärtumorwachstums bei allogener statt syngener Melanomzell-Inokulation.....	48
<b>Tab. 16:</b> Signifikant erhöhtes Tumorwachstum nach subkutaner Koimplantation von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen....	49
<b>Tab. 17:</b> Kein signifikant erhöhtes Tumorwachstums nach subkutaner Koinjektion von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen bei Fluoreszenzmarkierung mit CM-Dil.....	51
<b>Tab. 18:</b> Signifikante Reduktion des Tumorwachstums durch kartilaginäre Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen vor Koinjektion.....	52
<b>Tab. 19:</b> Kein signifikant erhöhtes Tumorwachstum vier Wochen nach subkutaner Koinjektion von lyophilisierten avitalen mesenchymalen Stammzellen.....	53
<b>Tab. 20:</b> Keine Tumorwachstumsförderung nach Koinjektion von nativen Gelenkknorpelzellen.....	55

# 1. EINLEITUNG

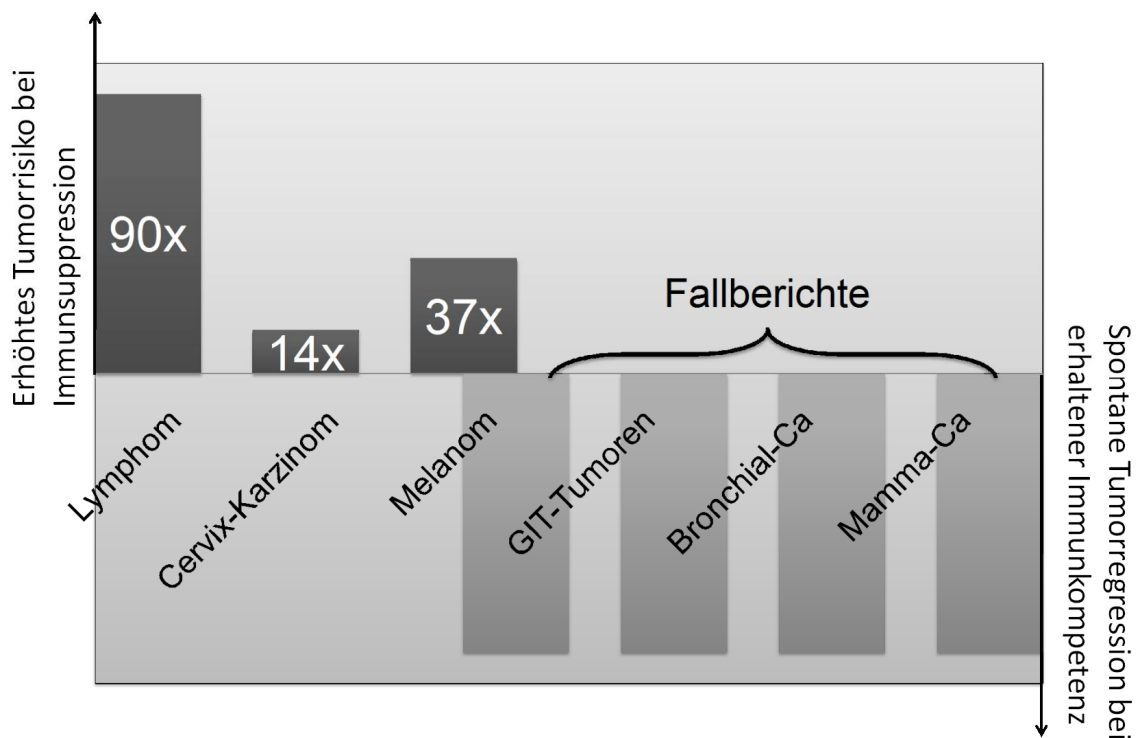
## 1.1 Allgemeines

Der moderne biotechnologische Forschungszweig des Tissue Engineering (Gewebsaufbau im Labor) erlaubt durch Einsatz von adulten Stammzellen neue Behandlungsmöglichkeiten bei Patienten mit degenerativen orthopädischen Erkrankungen, etwa im Knorpelbereich. Ehrgeizige Ziele des Tissue Engineering sind auch der Ersatz von Funktionseinheiten wie Herzklappen und die Transplantation von gezüchteter Haut, die sämtliche Funktionen ihres natürlichen Pedants erfüllt. Unter Verwendung patienteneigener multipotenter Zellen lassen sich biologische Implantate entwickeln, die die Gewebefunktionen defekter Organe aufrechterhalten, reparieren oder unterstützen (Le Blanc K, 2006; Le Blanc K und Pittenger M, 2005; Gao J und Caplan AI, 2003). Die erfolgreiche Suche nach solchen Zellen (vor allem adulten Stammzellen) mit hoher Plastizität ist in Deutschland nicht zuletzt den ethischen Bedenken gegen die Gewinnung und Verwendung des humanen embryonalen Gewebes und dem Embryonenschutzgesetz (ESchG vom 13.12.1990) zuzuschreiben. „Der Leitsatz muss sein, dass wir die Forschung mit adulten Stammzellen so vorantreiben, dass die Forschung mit embryonalen Stammzellen nicht mehr nötig ist.“ (Zitat von Bischof Wolfgang Huber, Vorsitzender des Rates der Evangelischen Kirche Deutschland, Nachrichtenagentur AP, 01.01.2008).

In Zukunft soll durch die Implantation biotechnologisch entwickelter Klappen, Gefäße und Herzmuskelgewebe die Behandlung der bislang nicht zufrieden stellend therapierbaren Herz- und Gefäßerkrankungen verbessert werden (Bartunek et al., 2006; Minguell JJ und Erices A, 2006; Gojo et al., 2003). Die regenerative Medizin wird auch zunehmend in der modernen Orthopädie und Unfallchirurgie etabliert (Arinzeh TL, 2005; Caplan AI, 2005; Landis WJ et al., 2005; Chen J et al., 2005; Oakes BW, 2004; Gao J und Caplan AI, 2003). Außer für Gewebeersatz haben sich dieselben Zellen aber auch als ein hervorragendes hochpotentes

Immunsuppressivum erwiesen (Le Blanc et al., 2004). Therapeutische Verwendung dieser Eigenschaft der adulten Stammzellen fand bereits in der Transplantationsmedizin zur Reduktion von graft-versus-host disease (GVHD) bei Knochenmarktransplantation sowie bei der Regulation von Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen statt (Svennilson J, 2005; Van Bekkum DW, 2003; El-Badri NS et al., 2004).

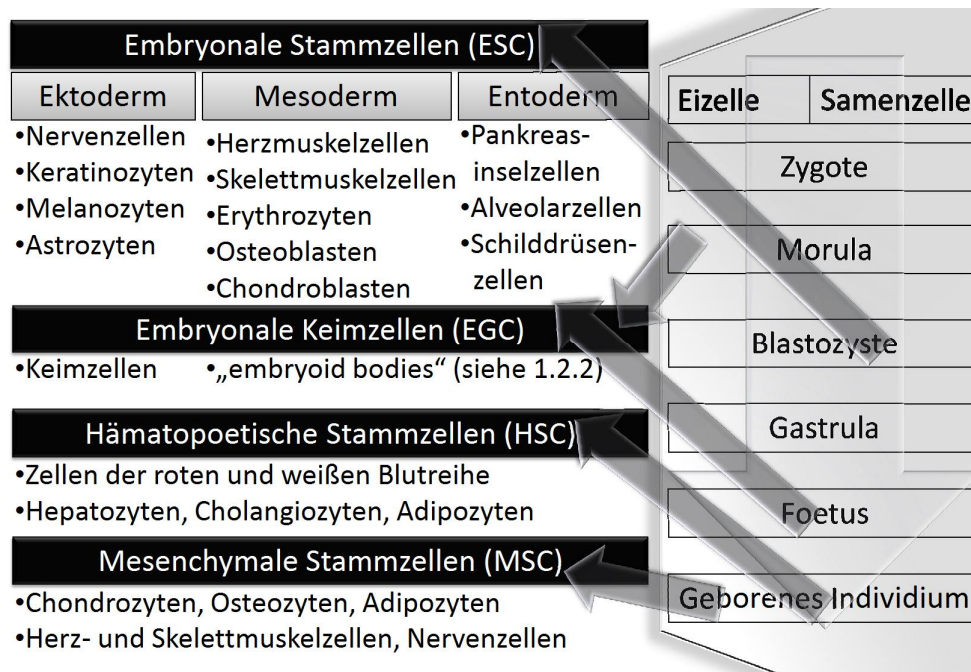
Die Entdeckung der immunmodulatorischen Eigenschaft der adulten Stammzellen zusammen mit der Rekapitulation des Immuntherapiekonzeptes bei der Krebsbehandlung wirft die Frage auf, ob die adulten Stammzellen somit auch das Wachstum von spontan entstehenden Tumoren fördern (**Abb. 1**). Ähnliches ist für die immunsuppressiven Antirheumatika bereits nachgewiesen (Fulchiero GJ Jr et al., 2007; Brown SL et al., 2002).



**Abb. 1: Erhöhtes Tumorrisiko als unerwünschte Wirkung bei Behandlung mit Immunsuppressiva.** Im linken Teil der Abbildung ist dargestellt das in der Literatur angegebene Tumorrisiko bei Immunsuppression. Das Tumorrisiko ist für Tumorentitäten wie Lymphom 90fach, Malignes Melanom 37fach und Cervix-Karzinom 14fach erhöht. Dem gegenübergestellt sind im rechten Teil der Abbildung die publizierten Fallberichte über spontane Tumorrégression bei intaktem Immunsystem von Patienten mit Malignem Melanom, Gastrointestinalen Tumoren, Bronchialkarzinom und Brustkrebs (siehe auch 1.5).

## 1.2 Übersicht der Stammzellen und Keimzellen

Man unterscheidet je nach Herkunft embryonale Stammzellen (ESC), embryonale Keimzellen (EGC) und gewebespezifische bzw. adulte Stammzellen. ESC werden aus undifferenzierten Zellen früher Embryonalstadien in Säugern gewonnen, EGC aus den Vorläufern von Keimzellen aus Embryonen oder frühen Föten und adulte Stammzellen aus den verschiedensten Geweben eines erwachsenen Organismus (Vanikar AV et al., 2007; Srivastava AS et al., 2006; Labosky et al., 1994; Matsui Y et al., 1992; Donovan PJ et al., 1986; Krampera et al., 2006; Peister A et al., 2003). Gemeinsames Merkmal aller Stammzellen ist ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Ausreifung in einzelne oder mehrere Zelltypen. Die entwicklungsbiologischen Potentiale sind in den embryonalen, fetalen und adulten Stammzellen in unterschiedlichem Maße ausgeprägt (**Abb. 2**).



**Abb. 2: Differenzierungspotential und Gewinnung von Stammzellen.** In den entwicklungsbiologischen Stadien (rechter Teil) lassen sich Stammzellen mit unterschiedlichem Differenzierungspotential gewinnen. Von der inneren Zellmasse der Blastozyste die pluripotenten ESC (embryonale Stammzellen), von der Morula bis frühem Fötus die pluripotenten EGC (embryonale Keimzellen), von erwachsenen Individuen aus dem Knochenmark und peripheren Blut die multipotenten HSC (hämatopoetische Stammzellen) sowie die multipotenten MSC (mesenchymale Stammzellen). Je nach Differenzierungskulturbedingungen konnte man diese Stammzellen zu den darunter aufgelisteten Zellen in vitro ausreifen lassen (linker Teil, Quelle: Stem cell tables 2007, NIH Stem cell Research).

### 1.2.1 Embryonale Stammzellen (ESC)

Die ESC werden über ihr entwicklungsbiologisches Potential definiert. Eine befruchtete Eizelle ist totipotent (lat.: „zu allem fähig“), weil aus ihr sich ein ganzer Organismus und embryonalseitige Anteile der Plazenta entwickeln können. Die Gewinnung der ESC findet etwa vier Tage nach Befruchtung der Eizelle im sogenannten Blastozystenstadium statt, die man sich als eine Hohlkugel aus 100-200 Zellen vorstellen kann. In Zellkultur durchgeführte Studien und Tierversuche lassen vermuten, dass die ESC bereits vor dem 4-Zellstadium ihre uneingeschränkte Entwicklungsfähigkeit verlieren. Menschliche ESC aus 8-Zellstadien weisen unterschiedliche Konzentrationsgefälle an Eiweißen auf und man hat bis heute mit ESC aus 16-Zellstadien von Kaninchen, Schaf und Schwein in keinem Fall entwicklungsfähige Embryonen gewinnen können (Beier HM, 2000). Aus diesen Gründen werden ESC als pluripotent (lat.: „zu vielem fähig“) definiert.

Unter Erhalt ihrer Pluripotenz können die ESC längerfristig in Kultur gehalten werden und sich je nach Kulturbedingung in unterschiedliche Körperzellen aller drei Keimblätter differenzieren. Eine spontane Ausreifung der ESC führt zu einem Gemisch aus verschiedenen Zelltypen, darunter auch kontrahierende Herzmuskelzellen, Hirnzellen, Fettzellen, Zellen des Immunsystems, Knorpelzellen und viele andere. Mit Hilfe von spezifischen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren kann eine Anreicherung eines einzelnen Zelltyps aus diesem Gemisch erreicht werden (Chen SS et al., 2003). Dies gilt auch als Grundvoraussetzung für die therapeutische Anwendung, da bei Verunreinigungen mit unreifen pluripotenten Vorstufen im Transplantat bereits Fremdgewebe und Mischtumoren mit hoher Malignität beschrieben wurden (Stevens LC, 1983).

Die therapeutische Anwendung von ESC bezieht sich auf Organe und Gewebe mit eingeschränktem oder gar fehlendem Regenerationsvermögen. In Tierexperimenten konnten bereits erste Ergebnisse bei der Behandlung von Diabetes mellitus, Herzinsuffizienz bei Zustand nach Herzinfarkt und Erkrankungen des Nervensystems wie Morbus Parkinson oder der Myelinmangelkrankung Pelizäus-Merzbacher-Syndrom erzielt werden (Kim D et al., 2003; Menard C et al., 2005; Kim JH et al., 2002; Brüstle O et al., 1999). Das letztere lässt auf einen analogen Therapieansatz



für die MS (Multiple Sklerose) hoffen (Croitoru-Lamoury J et al., 2006), auch wenn die Pathogenese nicht identisch ist.

Die Isolierung von menschlichen ESC wird ethisch kontrovers diskutiert und ist in Deutschland durch das Embryonenschutzgesetz verboten, da das menschliche Leben von seinem Beginn an, d.h. der abgeschlossenen Kernverschmelzung, unter dem Schutz der menschlichen Würde, des Lebens und der Gesundheit steht. Denn sowohl beim therapeutischen Klonen als auch bei der Gewinnung von ESC aus nicht implantierten Embryonen bei In-vitro-Fertilisation werden die verwendeten Embryonen zerstört. Dasselbe gilt für das Klonen durch Zellkerntransfer in entkernte menschliche Eizellen.

### **1.2.2 Embryonale Keimzellen (EGC)**

EGC der Maus verfügen in ähnlicher Weise wie ESC über ein hohes Proliferations- und Entwicklungspotential. Sie können während eines engen Entwicklungsfensters von Embryonen oder frühen Föten aus primordialen Keimzellen, den Vorläuferzellen von Ei- und Samenzellen gewonnen werden. In Gegenwart bestimmter Wachstumsfaktoren bilden sie komplexe dreidimensionale Zellaggregate aus so genannten embryoid-bodies (Embryokörperchen) mit Zelltypen aller drei Keimblätter. Über diese Zwischenstufe können sie wie die ESC eine Vielzahl verschiedener spezialisierter Zellen bilden. Allerdings werden Unterschiede im Entwicklungsvermögen der ESC und EGC vermutet. Es ist bekannt, dass der Mechanismus des Imprinting bei den primordialen Keimzellen aufgehoben ist (Kato Y et al., 1999). Hierbei handelt es sich um eine selektive Gen-Inaktivierung durch Methylierung der DNA. Auf diese Weise kann der Organismus die Aktivität dieser Gene steuern und gegenüber dem Zustand in einem Embryo herabsetzen. Bei Kerntransferversuchen der EGC in entkernten Eizellen wachsen die Embryos nur bis zur Hälfte der normalen Tragzeit heran und weisen Skelettanomalien auf.

Darüber, inwieweit aus menschlichen EGC hergestellte Spenderzellen nach Transplantation in Tiermodellen zur Geweberegeneration eingesetzt werden können, lässt sich momentan noch keine Aussage machen. Da EGC von HLA-inkompatiblen

Spendern stammen, werden ähnliche Schwierigkeiten wie bei ESC bezüglich der Transplantatabstoßung zu erwarten sein (Swijnenburg RJ et al., 2005).

### 1.2.3 Adulte bzw. gewebespezifische Stammzellen

Im Gegensatz zu ESC ist die Arbeit mit adulten Stammzellen nach gängiger Meinung ethisch unbedenklich, da sie aus erwachsenen Menschen gewonnen werden können. Als autologe Zellen bieten sie auch den Vorteil, dass nach einer Reimplantation auf die Immunsuppression, die sonst bei einer allogenen Implantation von ESC unumgänglich wäre, verzichtet werden kann. Nachteilig sind wegen der geringen Telomeraseaktivität die eingeschränkte Expandierbarkeit und die niedrigere Proliferationsgeschwindigkeit im Vergleich zu den ESC (Verfaillie CM et al., 2003).

Das Vermögen zur Selbsterneuerung von Zellen und Geweben ist in der Natur sehr unterschiedlich ausgeprägt. Bei Fröschen und einigen anderen Amphibien können ganze Gliedmaßen nach Amputation regeneriert werden. Bei Säugern ist diese extreme Zellplastizität verloren gegangen, weshalb man die adulten Stammzellen als multipotent (lat.: „zu mehrerem fähig“) bezeichnet (De Bari C et al., 2006). Sie können bei kleinen Verletzungen Teile ihrer Haut und Leber regenerieren. Darüber hinaus gibt es Gewebe und Organe mit hohem Zellumsatz wie Haut, Haare, Blut und Schleimhäute. Diese Organe enthalten Vorläuferzellen bzw. adulte Stammzellen mit dem Vermögen zur Selbsterneuerung (Bartsch G et al., 2005; Yu H et al., 2006; Ogawa M, 1993; Murrell W et al., 2005). Die adulten Stammzellen zeichnen sich auch durch die Fähigkeit zur Ausreifung in spezialisierte Zelltypen aus (**Abb. 2**). Bis heute sind schon mehr als 20 Haupttypen von adulten Stammzellen in Säugern entdeckt worden (Freitas CS und Dalmau SR, 2006). Diese sind sehr streng an ihre Mikroumgebung, die so genannte Stammzellnische, gebunden. Die adulten Stammzellen beginnen erst auf Signale aus der Mikroumgebung, den Zellzyklusarrest zu verlassen, sich zu vermehren und Vorläuferzellen für die Differenzierung an das entsprechende Gewebe abzugeben (Kolf CM et al., 2007). Als Beispiel für adulte Stammzellen werden im Folgenden die hämatopoetischen Stammzellen (HSC) und die mesenchymalen Stammzellen (MSC) beschrieben.

### **1.2.3.1 Hämatopoetische Stammzellen (HSC)**

HSC sind die am längsten und besten untersuchten adulten Stammzellen. Da Blutzellen nur eine kurze Lebensdauer haben, müssen sie während des ganzen Lebens nachgebildet werden. Die Blutzellbildung wird durch Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert. So stimuliert der G-CSF (granulozyte colony stimulating factor) die Bildung von Granulozyten, während EPO (Erythropoetin) die Bildung der roten Blutzellen anregt. Die Blutbildungszellen einer Entwicklungslinie liegen nicht einzeln, sondern in Nestern zusammen und werden CFU (colony forming unit) genannt (Mörike et al. 2001). Die molekularen Wirkungsmechanismen der Hämatopoese versteht man heute so gut, dass in vitro alle Blutzellen aus einer HSC differenziert werden können (Heike T und Nakahata T, 2004).

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 werden. Die Transplantation von Knochenmark-Spenden wird zunehmend ersetzt durch die Transfusion von Blut, das HSC enthält (Elfenbein et al., 2004; Arai et al., 2003). Sie werden hauptsächlich zur Therapie von Leukämien transplantiert. Mittlerweile kommen die HSC auch bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen, wie der systemischen Sklerose, zum Einsatz (Myllykangas-Luosujarvi R et al., 2000).

### **1.2.3.2 Mesenchymale Stammzellen (MSC)**

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. Das Mesenchym bildet außerdem das rote und weiße Knochenmark, welches die zeitlebens teilungsbereiten Retikulumzellen beinhaltet. Aus diesen wiederum gehen die Blutbildungszellen und Fettzellen hervor. MSC wurden 1968 von Friedenstein und Mitarbeitern erstmals beschrieben

(Friedenstein et al., 1968). Dabei handelt es sich um adhärenz, morphologisch den Fibroblasten ähnliche Zellen, die aus dem adulten Knochenmark isoliert werden können. Von den ebenfalls im Knochenmark befindlichen hämatopoetischen Stammzellen lassen sich die MSC aufgrund ihrer Adhärenz unterscheiden; immunhistochemisch besteht bis heute keine Möglichkeit zur direkten Charakterisierung. Vielmehr definieren sich MSC durch das Fehlen der hämatopoetischen Oberflächenmarker CD14, CD34 und CD45 (Peister A et al., 2004). 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 (Morishita T et al., 2006; Krampera M et al., 2006; Tuan RS, 2006; Stosich MS et al., 2007).

Da die multipotenten MSC unter relativ geringem Aufwand aus Knochenmark zu isolieren sind, gibt es viele Ansätze für eine therapeutische Anwendung mit autologem Material. Als ein wesentlicher Bereich gilt das Tissue Engineering, wobei erste klinische Studien bereits für kardiale (Wu KH et al., 2006) und hepatologische (Talens-Visconti R et al., 2006) Geweberegeneration am Menschen durchgeführt wurden. 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 (Zhao ZG et al., 2005). Auch konnte mehrfach gezeigt werden, dass nach einem Herzinfarkt intravenös verabreichte MSC im Herz Gefäß- und Muskelneubildung induzieren und so zu einer verbesserten Herzfunktion führen (Shake et al., 2002; Nagaya et al., 2004). Aktuell untersucht man die Verwendung von transduzierten MSC für verschiedene medizinische Indikationen (Min CK et al., 2007; van Damme A et al., 2006; Keilhoff G et al., 2006). Die Einsatzmöglichkeiten von MSC in der Orthopädie werden im folgenden Kapitel beschrieben.

### 1.3 Anwendung von MSC in der Orthopädie

Zur Behandlung von Defekten in mesenchymalem Gewebe werden derzeit zwei grundverschiedene Möglichkeiten der Stammzelltherapie untersucht: entweder werden die Zellen lokal implantiert, genau dort, wo ein Gewebedefekt vorliegt (De Kok IJ et al., 2005), oder sie werden systemisch injiziert, in Erwartung, dass sie sich von selbst am Gewebedefekt einfinden. In beiden Fällen werden sowohl undifferenzierte als auch vordifferenzierten Zellen verwendet (Wan C et al., 2006; Kitoh H et al., 2004; Wang Z et al., 2006; Gao J et al., 2001). In jedem Fall besteht bei adulten Stammzellen der Vorteil, dass mit autologem Material gearbeitet werden kann und es somit zu keiner Abstoßungsreaktion kommt.

Als Basis und Vorläufer der Stammzellbehandlung in der Orthopädie kann die Herstellung von Gelenkknorpel aus adulten Chondrozyten (ACH) gewertet werden. Vor rund 20 Jahren wurde erstmals an Menschen die autologe Implantation von ACH zur Reparatur von Gelenkknorpeldefekten eingesetzt (Brittberg et al., 1994). Dazu werden operativ ACH beim Betroffenen entnommen, diese in vitro vermehrt und anschließend retransplantiert. Eine Stammzellbehandlung mit undifferenzierten MSC wurde am Menschen erstmals 2002 durchgeführt (Wakitani et al., 2002). Dabei wurde allerdings die Bildung von Faserknorpel statt des gelenktypischen hyalinen Knorpels beobachtet. Begleitend wird die Knorpelzüchtung aus MSC und dedifferenzierten ACH derzeit in vitro und am Tiermodell weiterentwickelt (Miyanishi K et al., 2006; Hansen U et al., 2001; Kurz B et al., 2004; Kisiday J et al., 2002; Domm C et al., 2002; Sharma B et al., 2007).

Die ersten erfolgreichen Therapieansätze mit MSC wurden bei Kindern mit Osteogenesis imperfecta (OI) durchgeführt (Horwitz EM et al., 2001). Diese Erkrankung beruht auf einer genetischen Störung in der Proteinkette des Kollagen Typ I und ist bei Manifestation im Neugeborenenalter oft letal. Bei diesen Kindern führten die MSC zu histologischen Veränderungen im Trabekularknochen, welche auf eine verbesserte Knochendichte hinwiesen. So lassen sich mit Hilfe der MSC auch Therapiemöglichkeiten im Bereich der Osteoporose, Osteoarthrose, Menishektomie und Muskeldystrophie erhoffen. Eine verbesserte Knochenintegrität von zementfreien Endoprothesen bei vorgeschädigtem Implantatlager, die aufgrund

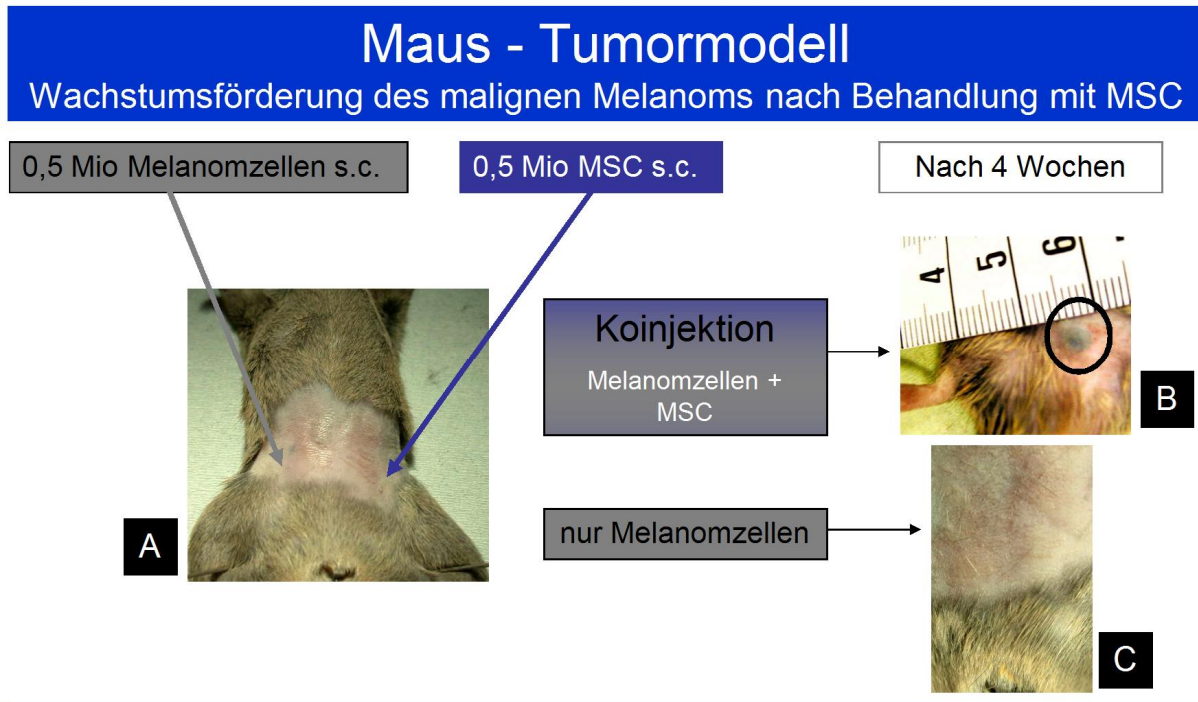
von biologischen und operationstechnischen Problemen bei jungen Patienten favorisiert werden, ist mit MSC ebenfalls denkbar, wie anhand von ersten Ex-vivo-Experimenten gezeigt wurde (Caro W et al., 2004).

## 1.4 Immunmodulatorische Fähigkeiten der MSC

Neben den viel beachteten Einsatzmöglichkeiten im Tissue Engineering besitzen MSC auch immunmodulatorische Fähigkeiten (Le Blanc K et al., 2003; Gotherstrom C et al., 2003). Das Wirkprinzip ist noch nicht vollständig geklärt. Diese Eigenschaft der MSC wird in der Transplantationsmedizin therapeutisch ausgenutzt. Man konnte zeigen, dass Transplantate eine geringere Abstoßungsreaktion hervorrufen, wenn zeitgleich mit der Transplantation auch MSC intravenös verabreicht werden (Bartholomew et al., 2002; Fändrich et al., 2004). MSC exprimieren MHC Klasse 1, aber nicht MHC Klasse 2, CD40, CD80 und CD86 (Tse et al., 2003). Dieser Phänotyp wird als nicht immunogen bezeichnet und lässt darauf schließen, dass MSC die Immuntoleranz stärken. T-Zellen können durch Kokultur mit MSC stimuliert werden, was auf die unabhängigen MHC-Expressionen der beiden Zelltypen zurückzuführen ist. Außerdem inhibieren MSC aus Knochenmark oder Fettgewebe die Produktion von zytotoxischen Lymphozyten in vitro und sind selbst resistent gegen zytotoxische Lymphozyten und natürliche Killerzellen. Dies wird vermittelt durch die Sekretion löslicher Faktoren (Di Nicola et al., 2002); nur eine Arbeit beschreibt den dafür erforderlichen Zellkontakt (Krampera et al., 2003). In vivo werden allogene MSC von immunkompetenten Empfängern nicht abgestoßen. Diese Tatsache lässt sich nicht allein auf die geringe Immunogenität der MSC zurückführen, die vergleichbar ist zu einigen embryonalen Stammzellen (Magliocca JF et al., 2006). Vielmehr induzieren MSC, ebenso wie bestimmte Gruppen von Makrophagen, eine Toleranz für allogene Transplantate (Villaron EM et al., 2004; Fändrich F et al., 2002). Dies führte neben der Gewebezüchtung zu einer weiteren klinischen Anwendung von MSC, nämlich systemische Gabe bei GVHD. Durch die Gabe von allogenen MSC konnte so die Transplantatabstoßung behandelt werden. Dies war effektiver erreichbar als mit medikamentösen Immunsuppressiva (Inoue S et al., 2006). Im Gegensatz zu den medikamentösen Immunsuppressiva oder einer kompletten Knochenmarkstransplantation bewirken MSC jedoch keine vollkommene

Immunsuppression. Vielmehr führen sie zu einem gemischten hämatopoetischen Chimärismus mit erhaltener Immunkompetenz des Empfängers (Wekerle und Sykes 1999).

In den immunsuppressiven Eigenschaften der MSC liegt allerdings auch eine potentielle unerwünschte Wirkung. So wurde im Tiermodell bereits nachgewiesen, dass die Transplantation von adulten MSC das Tumorrisiko beim Empfänger fördern kann (Djouad F et al., 2003). Eine direkte Kanzerogenität, wie sie bei ESC vermutet wird, ist von adulten MSC nicht bekannt. Spontan entstehende Tumoren konnten aber nach Transplantation von MSC nicht mehr abgewehrt werden. Dieser Nachweis gelang, indem immunkompetente Mäuse mit Melanomzellen beimpft wurden, die allein nicht zu Tumorwachstum führten. Erst eine parallele Gabe von MSC oder Immunsuppressiva führte zur Ausbildung eines Tumors (**Abb. 3**). Dieser Effekt bestand bei systemischer wie bei subkutaner Gabe von MSC. In vitro wurde bereits gezeigt, dass die immunregulatorischen Eigenschaften nicht vom Differenzierungsgrad der MSC abhängen (Le Blanc et al., 2003). Somit könnte ein generelles Tumorrisiko durch Tissue Engineering gegeben sein. Denn auch ACH und stimulierte Monozyten dedifferenzieren während der Zellzüchtung und nehmen dabei große Ähnlichkeit mit MSC an (Barbero et al., 2003). Selbst nach Differenzierung zu Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten bewirkten die MSC eine Hemmung der Lymphozytenproliferation. Daraus ergibt sich die Gefahr, dass aus MSC gezüchtetes Gewebe wie z.B. künstlicher Knorpel für den Empfänger ein Tumorrisiko darstellt. Dies hätte einen gravierenden Einfluss auf die Verwendbarkeit von MSC und anderen multipotenten Zellen im Tissue Engineering. Es ist durchaus denkbar, dass auch von Knorpeltransplantaten aus ACH eine Tumorgefahr ausgeht; denn bei der Vermehrung der ACH in vitro tritt eine Dedifferenzierung der Zellen ein (de la Fuente R et al., 2004). Die Knorpelzellen nehmen einen fibroblastischen Phänotyp an und erlangen multipotente Eigenschaften, die denen von MSC ähneln. Fragliche immunmodulatorische Eigenschaften dieser Zellen wurden bislang nicht untersucht. Die Interaktion zwischen Immunsystem und Tumorzellen wird im nachfolgenden Kapitel erläutert.



**Abb. 3: Das Maus – Tumormodell.** (A) Dargestellt ist die Behandlung eines Versuchstieres: Die subkutane Injektion bzw. Koinjektion der allogenetischen Melanomzellen (hier: B16 Melanomzellen) in die rechte Leistenregion und der mesenchymalen Stammzellen (hier: C3 MSC) in die linke Leistenregion. Auf der rechten Seite der Abbildung das Resultat nach 4 Wochen Versuchsdauer: (B) Bei gleichzeitiger Gabe von MSC und Melanomzellen entwickelt sich der schwarze Hautkrebs (im schwarzem Kreis). (C) Bei alleiniger Gabe von Melanomzellen bleibt das Tumorstadium aus.



## **1.5 Die Rolle des Immunsystems bei der Krebsbekämpfung, Krebs-Immunotherapie**

Die MSC greifen aufgrund ihrer immunmodulatorischen Fähigkeiten in ein sehr sensibles und lebenswichtiges System des menschlichen Organismus ein. Das Immunsystem wacht über Desintegrität und Malignität. Aus Tierversuchen weiß man, dass eine Immunsuppression das Krebsrisiko stark erhöht, nämlich für Lymphome 90fach, Hautkrebs 37fach und Gebärmutterhalskrebs 14fach (Blattmann JN und Greenberg PD, 2004). Daneben hat man bei intaktem Immunsystem eine spontane Regression bei Melanomen, Magen-Darm-Karzinomen, Lungen- und Brustkrebs beobachtet (Satzger I et al., 2006; Francis A et al., 1997; Cafferata MA et al., 2004; Horii R et al., 2005). Tumoren enthalten auch infiltrative Lymphozyten, was ebenfalls die aktive Rolle des Immunsystems bei der Krebsbekämpfung auszeichnet. Bekanntlich reicht manchmal dieser Schutz durch das Immunsystem nicht aus und gutartige wie bösartige Tumoren werden klinisch manifest (Perez de Castro I et al., 2007). Dies erklärt man sich mit den Tumor-Escape-Mechanismen der Krebszellen. Die Krebszellen verfügen über sehr viele Mechanismen, um sich dem Immunsystem zu entziehen. Dazu zählen physikalische Barrieren für Immunzellen, Herunterregulation der eigenen Immunogenität, Verhinderung einer entzündlichen Reaktion durch selbst produzierte lösliche Faktoren, Verlust von Target-Antigenen für Immunzellen, Überführung von Tumor-reaktiven T-Zellen in einen anergischen Zustand und deren Zerstörung sowie Induktion von regulatorischen Suppressor-T-Zellen (Marincola FM et al., 1997; Groh V et al., 2002; Gabrilovich DI et al., 1996; Engelhard VH et al., 2002). Diese Erkenntnisse über die Tumor-Escape-Mechanismen ermöglichen erst, das angeborene und erworbene Immunsystem so zu manipulieren, damit eine effektive Krebsbekämpfung möglich ist. In der Krebs-Immunotherapie werden monoklonale Antikörper (mABs) bereits erfolgreich eingesetzt (von Mehren M et al., 2003), Tumor-Antigene als Impfung (Timmerman JM et al., 2002) und selektierte natürliche sowie genetisch modifizierte T-Zellen erforscht (Brentjens RJ et al., 2003).

## 1.6 Fragestellung

Mit der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob ein Tumorrisiko von den üblicherweise beim Tissue Engineering verwendeten multipotenten MSC, von künstlich gezüchteten differenzierten Knorpelzellen oder sogar von originären Gelenkknorpelzellen ausgeht. Inwieweit sogar Zellbestandteile zuvor lyophilisierter MSC eine ähnliche Wirkung besitzen, wird in dieser Arbeit in gleicher Weise überprüft. Hierfür wird dasselbe Tiermodell verwendet, das zur Darstellung des Tumor-fördernden Potentials von MSC bereits etabliert worden ist (Djouad F et al., 2003). Neben der Volumenbestimmung des subkutan lokalisierten Primärtumors werden in dieser Arbeit auch die größeren Organe auf Melanometastasen, Einwanderung der subkutan applizierten MSC und anderen auffälligen Veränderungen hin untersucht (**Tab. 13**). Zur Optimierung der Fluoreszenzmarkierung der MSC wird zusätzlich zu dem bisher verwendeten zytochemischen Verfahren die stabile Zellmarkierung mit Hilfe eines retroviralen Vektors eingesetzt. Zielsetzung dieser Dissertation ist somit folgende Fragestellungen zu untersuchen:

1. Fördern undifferenzierte bzw. multipotente MSC das Tumorwachstum und die Metastasenbildung in vivo?
2. Fördern künstlich gezüchtete differenzierte Knorpelzellen das Tumorwachstum und die Metastasenbildung in vivo?
3. Lassen sich die Tumor-fördernden Effekte mit der gleichen Dosis von avitalen lyophilisierten MSC nachweisen?
4. Wandern die fluoreszenzmarkierten MSC oder künstlich gezüchteten differenzierten Knorpelzellen in die unmittelbare Umgebung des Primärtumors und dessen Metastasen?
5. Gelangen die fluoreszenzmarkierten MSC oder künstlich gezüchteten differenzierten Knorpelzellen auch in andere Organe als in den Tumor?
6. Fördern auch native, in vitro vermehrte Gelenkknorpelzellen das Tumorwachstum in diesem Tiermodell?
7. Welche Vor- und Nachteile hat die stabile Fluoreszenzmarkierung der MSC mit Hilfe des retroviralen Vektors pBabePuro (IRES-EGFP) im Vergleich zu der zytochemischen Fluoreszenzmarkierung mit CM-Dil (Invitrogen)?

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Aceton	Merck
Agarose	Roche
Alginat (Na-Salz)	BioChemika/Fluka
Amphotericin	Seromed
Aquatex	Merck
BaCl <sub>2</sub>	Sigma
CaCl <sub>2</sub>	Merck
CMDil	Invitrogen
DePeX®	Serva
Dexamethason	Sigma
DMEM high Glucose mit Glutamin	Sigma
DMSO	Sigma
EDTA	Fluka
Eosin	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Fluka
FKS-Gold	Seromed
FNX-eco	bezogen von PD Dr. Gray Nolan, Stanford University
Formalin	Merck
Glucose	Sigma
HCl	Merck
H <sub>2</sub> O bidest	Fluka
Immu-Mout	Merck
Isopropanol	Merck
Kaliumchrom-3-Sulfat	Merck

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
MDB (Membrane Desalting Buffer)	Merck
Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Merck
Meyer's Hämalun	Merck
MoMLV (Moloney Murine Leukemia Virus)	bezogen von Imperial Cancer Research Fund, London
Na-Cocadylsäure	Merck
Na-Citrat	Fluka
NaCl	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
NaOH	Merck
NucleoSpin® RNA II Kit	Macherey-Nagel
Paraffin (Paraplast)	Sherwood
pBabePuro	bezogen von Dr. F. M. Watt, Keratinocyte Laboratory, Imperial Cancer Research Fund, London
PBS	Seromed
Penicillin/Streptomycin	Seromed
Puromycin	Seromed
Pronase	Boehringer Mannheim
Qiagen QuantiTect® SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen
RNase	Sigma
Saccharose	Roth
TGF β <sub>1</sub> (transforming growth factor β <sub>1</sub> )	Sigma
Tris	Merck
Trypanblau	Sigma
Trypsin	Sigma
Vitamin C	Sigma
Xylol	Merck

## 2.2 Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendete murine MSC-Zelllinie C3H10T1/2 (C3 MSC) und Melanomzelllinie B16-BL6 (B16) wurden uns freundlicherweise von Frau Dr. Danièle Noël (INSERM U475, Montpellier, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Es wurden C3 MSC und B16 der Passagen 2 bis 4 bezogen.

Die murinen C3 MSC stammen aus Embryonen von Mäusen der Zuchtlinie C3H/He. Als Vorläuferzellen von Fibroblasten sind die adhärennten C3 MSC lang gestreckt und weisen in der Teilungsphase viele Pseudopodien auf. Die B16 Melanomzellen stammen aus Melanomen von Mäusen aus der Zuchtlinie C57BL/6. Sie besitzen eine epitheliale Zellmorphologie und die Fähigkeiten, Melaninpigment zu produzieren und hochgradig zu metastasieren.

### 2.2.1 Zellkultur von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen

Im Hinblick auf die Verwendung der Zellen als Injektionslösung soll an dieser Stelle nochmals auf hohe Sorgfalt bei Transport und Handling hingewiesen werden. Die notwendigen Handhabungen wurden stets an der sterilen Werkbank (Herasafe) durchgeführt, die zuvor mit 70%igem Ethanol gereinigt und für 15 Minuten vorgelaufen lassen worden war.

#### 2.2.1.1 Auftauen der in flüssigem Stickstoff gelagerten MSC

Das Kryo-Röhrchen (Sarstedt) wurde aus dem flüssigen Stickstoff genommen und direkt in ein 37 °C warmes Wasserbad gehalten. Unter vorsichtigen leichten Schwenkbewegungen wurde das Medium nach 20 bis 30 Sekunden flüssig. Anschließend wurden die Zellen sofort in einer Zelldichte von 25.000 Zellen pro cm<sup>2</sup> in T75-Kulturflaschen (Sarstedt) ausgesät und 18ml Basismedium (**Tab. 1**) dazugegeben. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-reguliert, Heraeus) bei 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 37 °C. Zweimal wöchentlich wurde das Medium gewechselt.

**Tab. 1: Zusammensetzung von Basismedium.**

Ansatz für 500 ml: 445 ml DMEM high Glucose mit Glutamin 50 ml FKS-Gold 5 ml Penicillin G (10000 U/ml), Streptomycin (10 mg/ml) und Amphotericin (25 µg/ml)  Lagerung: maximal 10 Tage bei 5 °C.
--

### 2.2.1.2 Subkultivierung für Monolayer-Zellkultur

Bei C3 MSC ist eine kartilaginäre Differenzierung bei zunehmender Konfluenz bekannt (M Gos et al. 2005). Dies erforderte je nach Dichte der ausgesäten C3 MSC mehrmals in der Woche eine mikroskopische Überprüfung. Bei einer Konfluenz von 70-80% wurden die Zellen subkultiviert.

Zur Vorbereitung wurden die Trypsin-EDTA-Lösung (**Tab. 2**), PBS und das Basismedium bei 37 °C im Wasserbad warm gestellt. Nach Abzug des Kulturmediums und einmaligen Spülen mit PBS wurden pro T75-Kulturflasche 6 ml Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben, so dass der Boden komplett bedeckt war. Auf der sterilen Werkbank wurde es für 3 Minuten stehen gelassen. Wenn nach dieser Einwirkungszeit noch keine Zellen abgelöst worden waren, wurde der Überstand bis auf einen dünnen Film auf den Zellen abgezogen und die Kulturflasche für 10 Minuten bei 37 °C in den Brutschrank gestellt. Nach Kontrolle unter dem Mikroskop wurden auch die letzten immer noch adhärenen Zellen durch ein leichtes Klopfen der Kulturflasche auf den Oberschenkel in Suspension gebracht. 10 ml Basismedium wurde auf eine T75-Kulturflasche zugegeben. Die Zellen wurden damit gespült und in ein 12 ml Sarstedt-Röhrchen (Sarstedt) überführt. Diese wurden für 5 Minuten bei 1000 U/min (=300g) und Raumtemperatur zentrifugiert (Megafuge, Heraeus). Die Pellets wurden in 1 ml Basismedium resuspendiert und mit der Trypanblau-Methode in der Neubauer-Zählkammer auf Vitalität überprüft und gezählt (siehe **2.2.1.3**). Zur Vermeidung einer cartilaginären Differenzierung bei hoher Konfluenz wurden die C3 MSC in der Regel alle 3 Tage im Verhältnis 1:10 subkultiviert. Die Zelldichte betrug zwischen 30-50 x 10<sup>3</sup> Zellen/cm<sup>2</sup>. Die T25-Kulturflaschen wurden mit 8 ml und die T75-Kulturflaschen mit 18

ml vorgewärmten Basismedium aufgefüllt. Die Zellen wurden stets bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 20% O<sub>2</sub> inkubiert.

**Tab. 2: Zusammensetzung der Trypsin-EDTA-Lösung.**

	PBS
0,25% (w/v)	Trypsin
0,5 M	EDTA
Lagerung: bei -20 °C.	

### 2.2.1.3 Vitalitätskontrolle und Zellzahlermittlung

Die Zellzahl wurde mit der Zählkammermethode nach Neubauer und die Zellvitalität nach der Trypan-Blau-Methode bestimmt. Das Prinzip der Trypan-Blau-Methode zur Bestimmung der Vitalität beruht darauf, dass Trypan-Blau von vitalen Zellen nicht aufgenommen wird, geschädigte oder avitale Zellen von diesem Farbstoff aber tiefblau gefärbt werden.

20 µl der auszuzählenden Zellsuspension wurden mit 20 µl Trypan-Blau gemischt und mit einer Pipette in eine Neubauer Zählkammer (Assistent) eingebracht. Unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 25, Zeiss) wurde zur Vitalitätsbestimmung der relative Anteil der vitalen Zellen bestimmt. Um die Zellzahl in der Zellsuspension abschätzen zu können, wurden die vitalen Zellen in 4x16 Gruppenquadranten der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die erhaltene Mittelwert aus den 4 großen Quadranten wurde mit der Milliliteranzahl der Zellsuspension und dem Faktor  $2 \times 10^4$  multipliziert, um die vitale Gesamtzellzahl zu erhalten.

### 2.2.1.4 Einfrieren von mesenchymalen Stammzellen

Zum Einfrieren wurden die Pellets der Zellen in 1 ml Einfrier-Medium (**Tab. 3**) resuspendiert. Nachdem die Zahl der vitalen Zellen mit der Trypan-Blau-Methode ermittelt worden war, wurden diese in einer Konzentration zwischen  $1-3 \times 10^6$  Zellen/ml in Kryo-Röhrchen (Sarstedt) überführt. Zur schrittweisen Abkühlung wurden die Kryo-Röhrchen in einen Styropor-Kasten gestellt und für 2 Stunden bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  in dem Kühlschrank (Priveleg) aufbewahrt. Danach wurden sie zwischen 12-20 Stunden bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Gefrierschrank, Heraeus) und später dauerhaft in flüssigem Stickstoff gelagert.

**Tab. 3: Zusammensetzung von Einfrier-Medium.**

Ansatz für 11,1 ml:
10 ml Basismedium
1 ml DMSO (steril filtriert)
20 mg Glukose (steril filtriert)
100 $\mu\text{l}$ Penicillin G (10000 U/ml), Streptomycin (10 mg/ml) und Amphotericin (25 $\mu\text{g/ml}$ )

### 2.2.2 Chondrogene Differenzierung von MSC

Die Differenzierung von C3 MSC wurde nach den aktuellen Methoden des Tissue Engineering induziert, wie kürzlich von Kurz et al. beschrieben (Kurz et al., 2004; Hansen U et al., 2001). Dazu kamen unterschiedliche etablierte Kulturformen wie Monolayer-, Hohe-Dichte- und Alginat-Kultur zur Anwendung. Ein konstanter Faktor war der Einsatz vom Differenzierungsmedium (**Tab. 4**), das stets frisch angesetzt wurde. Als Kontrollproben dienten Monolayer-Kulturen mit Basismedium.

**Tab. 4: Zusammensetzung von Differenzierungsmedium.**

Ansatz für 10 ml:
10 ml Basismedium
1 $\mu\text{l}$ Dexamethason-Stammlösung (Endkonzentration: $0,1\text{ }\mu\text{M}$ )
2 Aliquots TGF- $\beta$ 1 je 50 $\mu\text{l}$ (Endkonzentration: 10 ng/ml)



### 2.2.2.1 Chondrogene Differenzierung in Monolayer-Zellkultur

Für diesen Differenzierungsversuch wurden 2 T25-Kulturflaschen mit je  $10^6$  Zellen ausgesät und bis zur Erreichung der vollständigen Konfluenz in beiden Fällen mit dem Basismedium gefüttert. Danach wurden die Zellen einer T25-Flasche über 10 Tage mit dem Differenzierungsmedium stimuliert, während die Zellen in der Kontroll-T25-Kulturflasche über dieselbe Zeit weiterhin das Basismedium erhielten. Zweimal in der Woche wurde das Medium gewechselt. Zwei Tage vor Ende des Differenzierungsversuchs wurde eine dritte Kontroll-T25-Kulturflasche mit undifferenzierten C3 MSC in einer Dichte von  $20 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät.

### 2.2.2.2 Chondrogene Differenzierung in 3D-Alginat-Zellkultur

Zur Vorbereitung wurden 40 ml CaCl<sub>2</sub>/Hepes-Lösung steril filtriert (Sarstedt-Filter) und in eine sterile Petrischale mit 5 cm Durchmesser gefüllt. Das Alginat (Endkonzentration: 1,2%) wird ebenfalls steril filtriert. Mit dem reinen Alginat wurden zunächst mit Hilfe einer 1-ml-Spritze 10 bis 20 Kugeln in die CaCl<sub>2</sub>/Hepes-Lösung zur Überprüfung der Gelierfähigkeit getropft und dann verworfen. In dieser Zeit wurden die Zellen für die Subkultivierung vorbereitet (siehe 2.2.1.2). Die Pellets wurden direkt im bei 37 °C vorgewärmten Alginat resuspendiert. Bei  $9 \times 10^6$  Zellen wurde 900 µl Alginat verwendet. Zur Resuspension wurde eine 1-ml-Spritze ohne Kanüle benutzt. Danach wurde die Suspension mit einer weitleumigen Kanüle blasenfrei komplett aufgezogen und diese mit einer Neigung von 45° in die CaCl<sub>2</sub>/Hepes-Lösung getropft. Für je 10 Kugeln wurde ein Einzel-12-Well mit 2 ml Basismedium vorbereitet. Insgesamt wurden 4 Einzel-12-Wells mit 40 Kugeln befüllt, davon 2 für die Differenzierung zu Knorpelzellen und 2 als Kontrolle. Unter dem Mikroskop wurde kontrolliert, ob die C3 MSC gleichmäßig in den Kugeln verteilt sind. Zwei Tage später erhielten 2 Einzel-12-Wells das Differenzierungsmedium und die beiden Kontroll-Einzel-12-Wells weiterhin das Basismedium. Zweimal in der Woche fand ein Mediumwechsel statt. Die Kugeln wurden beim Mediumwechsel umgebettet, um zu verhindern, dass Kokulturbedingungen durch die von den Kugeloberflächen sich abgelösten Zellen entstehen. Der Differenzierungsversuch ging über 10 Tage.

### 2.2.2.3 Chondrogene Differenzierung in 3D-Hohe-Dichte-Zellkultur

In diesem Differenzierungsversuch wurden 10 Eppendorf-Caps mit je  $750 \times 10^3$  Zellen auf 1 ml Basismedium befüllt, nachdem für die Gewährleistung des Gasaustausches die Deckel der Eppendorf-Caps mit einer heißen Nadel 2-3-mal perforiert worden waren. Nach 2 Tagen wurde das Medium gewechselt und die ersten 8 Eppendorf-Caps mit dem Differenzierungsmedium aufgefüllt, während die letzten beiden als Kontrolle verwendet wurden und hierfür das Basismedium genommen wurde. Zweimal in der Woche fand ein Mediumwechsel statt. Auch dieser Differenzierungsversuch vollzog sich über 10 Tage. Zwei Tage vor Ende wurde eine Kontroll-T25-Kulturflasche mit undifferenzierten C3 MSC in einer Dichte von  $20 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät.

### 2.2.3 Gewinnung von avitalen mesenchymalen Stammzellen durch Gefriertrocknung (Lyophilisation)

Zur Vorbereitung des Gefriertrocknungsvorgangs wurden insgesamt 4 Eppendorf-Caps mit je  $250 \times 10^3$  undifferenzierten C3 MSC auf 1ml Basismedium befüllt und 1 Tag unter Standardbedingungen wie unter **2.2.2.3** im Brutschrank gehalten. Am nächsten Tag wurden die Überstände in den Eppendorf-Caps abgezogen und die Pellets mit Aqua bidest umspült. Nach einem Zentrifugationsvorgang wurde die flüssige Phase nochmals abgezogen. Anschließend wurden die offenen Eppendorf-Caps mit den gereinigten Pellets für 4 Stunden in den Gefriertrockner gestellt. Die schneeweißen, gefriergetrockneten Pellets wurden in PBS gelöst. Für den Tierversuch wurde der Inhalt von 2 Eppendorf-Caps verwendet, während der Rest in 2 T-25-Kulturflaschen ausgesät wurde, um vitale Zellen auszuschließen.

### 2.2.4 Zellkultur von Melanomzellen

In Anlehnung an die oben beschriebenen Kulturbedingungen für die undifferenzierten C3 MSC erfolgte auch die Zellkultur von B16 Melanomzellen. So wurden sie ebenfalls mit dem gleichen Basismedium kultiviert (**Tab. 1**). Zur Erhaltung des Selbsterneuerungsvermögens sowie Verhinderung einer Differenzierung wurde auch bei den B16 Melanomzellen darauf geachtet, dass sie nicht über 80% konfluent

wurden. Daher wurden Kulturflaschen mit hoch konfluenten Zellkolonien und stark melaninproduzierenden Zellen verworfen.

### **2.2.5 Isolierung und in-vitro-Expansion von Gelenkknorpelzellen**

Für die Gewinnung von originären Gelenkknorpelzellen wurden 2 Mäuse (C3H/He), die ca. 3 Wochen alt waren, durch Dezerebration getötet. Die Tiere wurden mit 70%igem Alkohol gereinigt. Anschließend wurden die Kniegelenke entnommen und in Hank's special (Hank's buffering salt solution, 10000 U/ml Penicillin, 25 µg/ml Amphotericin) überführt. Die Feinpräparation der Kniegelenke wurde unter dem Binokular durchgeführt. Die Muskeln wurden mit Skalpell und Pinzette abgesetzt. Die Gelenkkapsel und der Bandapparat wurden entfernt. Die knorpeligen Epiphysen vom Femur und Tibia konnten mit Skalpell und Pinzette vom knöchernen Anteil abpräpariert, klein geschnitten und für 1 Stunde bei 37 °C in eine Hyaluronidase/Pronase-Mischung gegeben werden. Danach erfolgte eine dreimalige Spülung mit Antibiotika-haltigem Hank's Puffer, bevor Kollagenase hinzu gegeben und die Knorpelmasse darin für 6-7 Stunden bei 37 °C im Wasserbad mit angeschaltetem Rüttler inkubiert wurde. Später wurde die Suspension 10 Minuten bei 1000 U/min (= 300g) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und das Pellet in Basismedium (**Tab. 1**) resuspendiert. Die Lösung wurde mit einem sterilen Gazefilter (Porengröße 20µm, Fa. Hydrobios Kiel) in ein 15ml-Röhrchen gegeben. Anschließend wurde die Zellzahl ermittelt und die Knorpelzellen zur Vermehrung in einer geeigneten Dichte von  $25 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf 2 Einzel-4er-Wells ausgesät.

### **2.2.6 Eindeckeln von Monolayer-Kulturen für die Lichtmikroskopie**

Für spätere lichtmikroskopische Untersuchungen wurden Zellen über 2 Tage in einer Dichte von  $10^3$  pro Einzel-Well auf Deckgläsern in 6-Well-Platten kultiviert. Das Medium wurde abgezogen und das Deckglas 2mal mit PBS vorsichtig gewaschen. Der Objektträger wurde mit 70%igem Ethanol gereinigt, beschriftet und 1 Tropfen Immumout auf die Mitte des Objektträgers pipettiert. Das Deckglas musste mit Hilfe einer Präpariernadel und einer Uhrmacherpinzette aus dem Einzel-Well herausgeholt werden. Anschließend wurde es mit der Oberseite nach unten, so dass der Zellrasen

zwischen Objektträger und Deckglas platziert werden konnte, auf dem Objektträger zunächst auf eine Kante gestellt und dann in den Tropfen Immu-Mount fallen gelassen. Anschließend wurden die Präparate mikroskopiert (Axioskop, Zeiss).

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 RNA-Isolierung aus Zellen

Die Isolierung der RNA aus Zellen wurde mit dem NucleoSpin®RNA II Kit (Biorad) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurde die DNase und die Lysispuffer für die Proben im Eppendorf-Cap unter dem Abzug bereitgestellt (**Tab. 5**).

**Tab. 5: DNase und Lysispuffer.**

Ansatz für 3 Proben: <u>DNase-Reaction Mixture</u>	<u>Lysispuffer</u>
30 µl DNase	1050 µl RA1
270 µl RNX-Puffer	10,5 µl Mercaptoetanol

Bei Wells und Kulturflaschen wurde das Medium abgehoben und direkt 350 µl Lysispuffer oder bei mehr als  $5 \times 10^6$  Zellen die doppelte Menge auf die am Boden angewachsenen Zellen gegeben. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vom Boden abgekratzt, mit der Pipette gut mit dem Lysispuffer durchmischt und die Suspension in ein lila Schredder (Bestandteil des NucleoSpin®RNA II Kit, Fa. Biorad) überführt. Der lila Schredder wurde auf das Centrifugation tube gesteckt und für 1 Minute bei  $11 \times 10^3$  g zentrifugiert. Der lila Schredder wurde entfernt und verworfen. In das Centrifugation tube wurden 350 µl 70%iges Ethanol pipetiert und es solange durchmischt bis keine Schlieren mehr zusehen waren. Diese Flüssigkeit wurde in eine blaue Säule (Bestandteil des NucleoSpin®RNA II Kit, Fa. Biorad) überführt, diese auf eine neues Centrifugation tube aufgesteckt und diesmal für 30 Sekunden bei  $8 \times 10^3$  g zentrifugiert. Danach befand sich die RNA in der blauen Säule. 350 µl MDB („Membrane Desalting Buffer“) wurden hinzugeben, das Centrifugation tube erneuert

und es für 1 Minute bei  $11 \times 10^3$  g zentrifugiert. Das Centrifugation tube wurde ausgeschüttet und die nunmehr trockene blaue Säule erneut für 30 Sekunden bei  $11 \times 10^3$  g zentrifugiert. Dann folgten weitere Zentrifugationsschritte zur Reinigung und zum Auffangen der RNA. 95  $\mu$ l DNase wurden in die blaue Säule gegeben. Nach 15 Minuten wurden 200  $\mu$ l RA2-Puffer dazu gegeben und für 30 Sekunden bei  $8 \times 10^3$  g zentrifugiert. Danach wurde das Centrifugation tube gewechselt, 600  $\mu$ l RA3-Puffer hinzu gegeben und noch einmal für 30 Sekunden bei  $8 \times 10^3$  g zentrifugiert. Nun wurde das Centrifugation tube ausgeschüttet, 250  $\mu$ l RA3-Puffer dazu gegeben und für 2 Minuten bei  $11 \times 10^3$  g zentrifugiert. Die blaue Säule wurde aus dem Zentrifugation tube herausgenommen und in das beschriftete Collection tube gelegt. Im letzten Schritt wurden dann 30-60  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (RNase-frei) auf die blaue Säule gegeben, die gesamte Membran damit benetzt und für 1 Minute bei  $11 \times 10^3$  g zentrifugiert. Das Collection tube wurde dann bei -70 °C tief gefroren.

Zur Vorbereitung der RNA-Isolierung aus Zellen in 3D-Alginat-Kultur wurden 10 Alginatkugeln in einem Eppendorf-Cap über 5 Minuten mit dem EDTA-freien Auflösungspuffer aufgelöst und darauf für 6 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Die Pellets wurden direkt in 350  $\mu$ l Lysispuffer resuspendiert. Für die RNA-Isolierung wurden die Pellets aus der 3D-Hohe-Dichte-Kultur nach demselben Schema behandelt. Der nächste Schritt zur RNA-Isolierung knüpft folglich an den bereits oben beschriebenen Zentrifugationsschritt nach Zugabe des Lysispuffers an.

### 2.3.2 RT-PCR (Synthese von cDNA)

Für den qualitativen Nachweis der Genexpression relevanter Matrixmoleküle (Aggrecan und Kollagen Typ II) sowie des Enzyms GAPDH als „Housekeeping“-Gen bzw. Referenzgen zur Sicherstellung einer intakten und gleichgroßen Menge an RNA in den Proben wurde die RT-PCR durchgeführt. Die eingesetzten Primer-Sequenzen sind in der **Tab. 6** dargestellt. Die RT-PCR dient der in vitro Synthese von DNA, deren Basensequenz komplementär zu der isolierten mRNA (Boten- bzw. messenger RNA) ist. Die auf diese Weise synthetisch hergestellte DNA heißt komplementäre DNA (cDNA). Die RNA wird mit Hilfe von Super Script II Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese Methode lässt indirekt eine Aussage über den

Expressionszustand einzelner Gene zu, da die genetische Information der RNA genutzt wird, die letztendlich die Information für die Proteinsynthese enthält.

Die RT-PCR erfolgte mit Hilfe der Qiagen® One Step RT-PCR. Zuerst wurde ein DNase-Verdau nach Anleitung der Firma Promega durchgeführt, um DNA-Verunreinigungen zu entfernen. Die zu untersuchenden Proben wurden mit dem Reaktionsansatz für den DNase-Verdau behandelt (**Tab. 7**). Zu jeder Probe wurden 1 µl DNase 10 x Reaktionspuffer sowie 1 µl DNase dazugegeben und 30 Minuten bei 37 °C in einem Thermocycler inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase wurde 1 µl RQ1 DNase Stop Solution (20 mM EDTA, pH 8,0) zugesetzt und 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde für einen Reaktionsansatz zur Bestimmung eines einzelnen Zielgens 100-500 ng verdaute mRNA eingesetzt (**Tab. 8**). Die erhaltene cDNA wurde sofort für eine initiale Aktivierung der PCR weiterverwendet. Im folgenden Kapitel sind die Einzelschritte der RT-PCR in einer Übersicht dargestellt (**Tab. 9**).

**Tab. 6: Übersicht der RT-PCR Primer.**

Name	Primer-Sequenz (5' → 3')	Produkt	T <sub>anneal</sub>
Koll Typ II Sense	GATCTGCACTGAATGGCTGA	472 bp	62 °C
Koll Typ II Antisense	TCTGCCAGTTCAGGTCTCT		
Aggrecan Sense	AGGAGACCCAGACAGCAGAA	356 bp	64 °C
Aggrecan Antisense	ACAGTGACCCTGGAAGTTGG		
GAPDH Sense	ATTCCACCCATGGCAAATTC	252 bp	66 °C
GAPDH Antisense	TCTCGCTCCTGGAAGATGGT		

**Tab. 7: Zusammensetzung von DNase-Verdau.**

Reaktionsansatz für den DNase-Verdau: 1-8 µl RNA 1 µl RQ1 RNase-freie DNase 10 x Reaktionspuffer 1 µl RQ1 RNase-freie DNase auf 10 µl Endvolumen mit Nuklease-freier DNase
--

**Tab. 8: Zusammensetzung der Qiagen®One Step RT-PCR.**

Reaktionsansatz für RT-PCR:
10 µl 5 x Qiagen®One Step RT-PCR Buffer
2 µl dNTP Mix
10 µl 5 x Q-Solution
x µl (100 pmol) Primer (Sense)
x µl (100 pmol) Primer (Antisense)
2 µl Qiagen®One Step RT-PCR Enzyme Mix
100-500 ng verdaute RNA
auf 50 µl Endvolumen mit RNase-freies H <sub>2</sub> O

### 2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Amplifikation von cDNA)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion können die oben gewonnenen cDNA-Segmente vervielfältigt (amplifiziert) werden. Es handelt sich also um eine sehr empfindliche Nachweismethode, mit der sich kleinste Mengen an DNA vermehren und nachweisen lassen. 2 Oligonukleotide (Primer) mit einer bekannten komplementären Sequenz der nachzuweisenden DNA werden genau hinter dem Ende der zu amplifizierenden Sequenz positioniert. Zuerst werden die DNA-Stränge durch Erhitzen von einander getrennt (Denaturierung) und die im Überschuss zugegebenen Primer lagern sich an die zu amplifizierenden Bereiche. Durch Zugabe der thermostabilen DNA-Polymerase Taq1 und der 4 Desoxynucleosidtriphosphate wird das DNA-Segment selektiv repliziert. Dieser Vorgang wird 25-40mal wiederholt, so dass sich das DNA-Segment leicht isolieren lässt.

**Tab. 9: Übersicht der einzelnen Schritte der RT-PCR.**

Schritt	Dauer	Temperatur
Reverse Transkription	10 min	50 °C
Initiale Aktivierung	5 min	95 °C
Denaturierung	15 sec	95 °C
Annealing	30 sec	x °C (siehe <b>Tab. 8</b> )
Extension	1 min	72 °C
finale Extension (Anzahl der Zyklen: 40)	10 min	72 °C

### 2.3.4 Gelelektrophorese (Analyse der PCR-Amplifikate)

Die PCR-Amplifikate wurden in Bezug auf Größe und Vorkommen durch eine horizontale Agarosegelelektrophorese analysiert.

**Tab. 10: Zusammensetzung des Agarosegels.**

<u>1 x TAE-Puffer</u>	<u>DNA-Ladungspuffer</u>
40 mM Tris-Base	30% (v/v) Glycerin
20 mM Eisessig	0,25% (w/v) Bromphenolblau
1 mM EDTA (pH 8)	

Zu Beginn wurde Agarose mit 1 x TAE-Puffer zum Lösen in einer Mikrowelle aufgeköcht (**Tab. 10**). Nach dem Abkühlen auf 60 °C wurde das flüssige Gel in einen Gelgießstand (Fa. BioRad) gegossen. Nach Beseitigung der Blasen wurde ein 20-Slot-Kamm zur Ausbildung der Probenauftragstaschen eingesetzt, welcher nach dem Erstarren des Gels wieder entfernt wurde. Die Apparatur wurde in eine Laufkammer gesetzt, selbige mit DNA-Ladungspuffer befüllt. Zu je 10 µl Probe wurden 5 µl DNA-Ladungspuffer in die entstandenen Taschen aufgetragen und als Größenstandard für die entstandenen Banden wurden 5 µl eines Markers in eine Geltasche pipettiert. Anschließend wurde eine Elektrophorese bei 130 V gestartet. Die Laufzeit betrug 40 Minuten. Nach Beendigung des Laufvorgangs wurde das Gel aus der Gelkammer herausgenommen und in einem Ethidiumbromid-Bad (1 µg/ml) für 20 Minuten inkubiert. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Beleuchtung (UV-Transluminator), da sich Ethidiumbromid in die Nukleinsäuren-Banden interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert.

### 2.3.5 Real time RT-PCR (Quantifizierung der cDNA)

Die relative Quantifizierung der durch die kartilaginäre Differenzierung induzierten mRNA-Expression verschiedener Matrixmoleküle (Kollagen Typ II, Aggrecan, Sox9) erfolgte mit Hilfe einer real time RT-PCR unter Verwendung des TaqMan®-Systems



(Fa. Applied Biosystems). Die TaqMan® Sonde weist eine nichtfluoreszierende Farbstoffmarkierung am 3'-Ende (Quencher) und eine fluoreszierende Farbstoffmarkierung am 5'-Ende (Reporter) auf. Liegen Reporter- und Quencher-molekül in unmittelbarer Nähe, was bei intakter Sonde der Fall ist, so wird die Fluoreszenz des Reporters durch einen Fluoreszenz-Energietransfer unterdrückt. Während der PCR bindet die Sonde mit den Primern spezifisch an den Matrizen-Strang. Der DNA-Strang verlängert sich vom Vorwärtsprimer aus und läuft auf die Sonde zu. Die AmpliTaq Gold®DNA-Polymerase besitzt eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, wodurch das Reportermolekül von der Sonde gespalten wird und die Blockierung zum Matrizenstrang aufgehoben wird. Dadurch werden Reporter- und Quencher-moleküle räumlich voneinander getrennt und eine ansteigende Fluoreszenz induziert, welche direkt proportional zur parallel laufenden Anreicherung der amplifizierten PCR-Produkte ist. Mit der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase werden nur spezifisch gebundene Sonden gespalten; daher liegt der Vorteil bei der Verwendung der TaqMan® Sonden darin, dass es nur zu einem Fluoreszenzsignal kommen kann, wenn die Sonde sequenzspezifisch gebunden und die Zielsequenz amplifiziert worden ist. So werden keine unspezifischen Nebenprodukte der RT-PCR nachgewiesen.

Für die Durchführung der real time PCR wurden pro Reaktion 50 ng cDNA eingesetzt und für jedes gesuchte Zielgen der Reaktionsansatz in der **Tab. 11** verwendet. Als interner Standard wurden GAPDH und 18srRNA benutzt (**Tab. 12**). Die Auswertung und Darstellung der ermittelten Daten aus der real time RT-PCR erfolgten mit Hilfe eines Softwareprogramms (ABI Prism 7000 SDS v1.1).

**Tab. 11: Reaktionsansatz für eine real time RT-PCR.**

1 µl Target Mix (TaqMan® Sonde)
10 µl PCR Master Mix (TaqMan®Universal)
x ng Einzelstrang-cDNA (x = 50 ng)
x µl RNase-freies H <sub>2</sub> O
20 µl Endvolumen

**Tab. 12: Übersicht der eingesetzten TaqMan® Sonden** (Name, Nummer).

Kollagen Typ 2, Mm00491889_m1	Aggrecan, Mm00545794_m1
Sox9, Mm00448840_m1	18srRNA, Hs99999901_s1

## 2.4 Zellmarkierung

### 2.4.1 Fluoreszenzfärbung mit CM-Dil

Zur Herstellung einer konzentrierten und bis zu 6 Monate haltbaren Zellfarbstofflösung wurde 1 mg CM-Dil in 1 ml DMSO gelöst. 100 µl wurden dann zu 10 Chargen je 10 µl aliquottiert. Für eine gute Zellmarkierung musste die Farbstofflösung mit PBS auf 10 µg/5 ml verdünnt werden. Bei einer Zellsuspension mit  $10^7$  Zellen wurde 1 Charge benötigt. Das Röhrchen wurde in Alufolie gewickelt und so vor Lichtexposition geschützt. Das Medium wurde aus den Kulturflaschen abgezogen. Die Zellen wurden zweimal mit PBS vorsichtig gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA behandelt. Nach 2 Minuten wurde das Trypsin-EDTA bis auf einen dünnen Film abgezogen. Die Zellen wurden mit 10 ml PBS gespült und ein Sarstedt-Röhrchen überführt. Dann wurden die Zellsuspension für 3 Minuten bei 300 g zentrifugiert, das Pellet in PBS resuspendiert und mit der vorbereiteten Zellfarbstofflösung zunächst für 10 Minuten bei 37 °C und anschließend für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Es folgte danach eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 300 g, damit der nicht gebundene Farbstoff entfernt werden konnte. Die Zellen wurden hiernach erneut zweimal mit PBS gewaschen und bis zur Injektion bei 4 °C in PBS gelagert.

### 2.4.2 Fluoreszenzmarkierung durch EGFP-Gen-Transduktion bei mesenchymalen Stammzellen

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Professor R. Mentlein wurde die stabile Fluoreszenzmarkierung der Zellen mit dem retroviralen System durchgeführt. Bei dem hier verwendeten Retrovirus handelt es sich um den Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV). Der retrovirale Vektor pBabePuro-Derivat und eine

kompatible Verpackungs-Zelllinie bilden das retrovirale System. Die Verpackungs-Zelllinie kodiert auch für virale Strukturproteine und Virusenzyme, wobei die env-Proteine (Proteine der Außenhülle) den Wirtsbereich der rekombinanten Viren bestimmen. Die Verpackungs-Zelllinie FNX-eco kann nur murine Zellen befallen, während die FNX-ampho sowohl humane als auch murine befallen kann. Der retrovirale Vektor trägt keine viralen Gene, sondern das Virus-Verpackungssignal  $\psi$  und zwei virale Sequenzelemente (LTR, long terminal repeats), welche das Virusgenom flankieren. Im ersten Schritt wird die Verpackungszelllinie mit dem retroviralen Konstrukt transfiziert. Hierbei reichern sich im Überstand rekombinante infektiöse Viruspartikel an. Diese Viruspartikel können dann einmalig eine Wirtszelle infizieren und so Fremdgene, die nicht replikationskompetent sind, übertragen. Die transduzierte Zielzelle stellt keine infektiösen Partikel her. In den retroviralen Vektor pBabePuro wurde für Markierungsexperimente als Marker eine Variante des EGFP-Gens (enhanced green fluorescent protein) in Verbindung mit einem IRES-Element (internal ribosome entry site) kloniert. Außerdem enthält der retrovirale Vektor pBabePuro ein Gen, das die transduzierte Zielzelle gegen das Antibiotikum Puromycin resistent macht (**Abb. 4**). Zellen, die den Vektor tragen und somit EGFP exprimieren, fluoreszieren bei Anregung mit Licht der Wellenlänge  $\lambda=488$  grün und lassen sich mit dem FITC-Filter selektiv darstellen (**Abb. 8**).



**Abb. 4: Struktur des retroviralen Vektors pBabePuro.** Die Transkription von RNA und cDNA, die für ein internal ribosome entry side (IRES) bzw. für EGFP (enhanced green fluorescent protein) kodieren, wird von 5'-LTR (long terminal repeat) angetrieben. Bei der Translation wird EGFP produziert. Die Expression des Puromycin-Resistenz-Gens wird durch den viralen Promoter (SV40) stimuliert. Das virale Genom wird am 3'- und 5'-Ende mit LTR flankiert.

Zur Vorbereitung der stabilen Fluoreszenzmarkierung mit Hilfe eines retroviralen Vektors wurde zunächst eine Kill-Curve bei der Behandlung mit Puromycin für die MSC erstellt (**Abb. 6**). So konnte die Zeitdauer der vollständigen Selektion der transduzierten Zellen durch die Puromycin-Behandlung ermittelt werden. Für eine Zellzahl von  $8 \times 10^3$  wurden 4 ml von dem Überstand mit rekombinanten infektiösen

Viruspartikeln für die Transduktion benötigt. 2 Tage nach der Transduktion begann die Selektion, indem beim Mediumwechsel 300 µl/ml Puromycin hinzugegeben wurden. Alle 2 Tage wurde das Medium gewechselt. Darauf folgte nach einer Subkultivierung die manuelle Selektion mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops mit FITC-Filter (Axioskop, Zeiss). Zellkolonien mit einer sehr guten Fluoreszenz wurden mit einem wasserfesten Stift auf der Kulturflasche markiert. Die Kulturflasche wurde unter sterilen Bedingungen mit einem glühenden Skalpell vorsichtig geöffnet. Die markierte Zellkolonie wurde mit einem Tropfen Trypsin-EDTA vom Untergrund abgelöst und direkt in ein Einzel-6-Well mit 2 ml Basismedium gegeben. Zuletzt wurden die erfolgreich selektierten C3 MSC zur Vermehrung subkultiviert, stets auf Fluoreszenz kontrolliert und für weitere Verwendung eingefroren.

## **2.5 Versuchsdesign**

### **2.5.1 Versuchstiere**

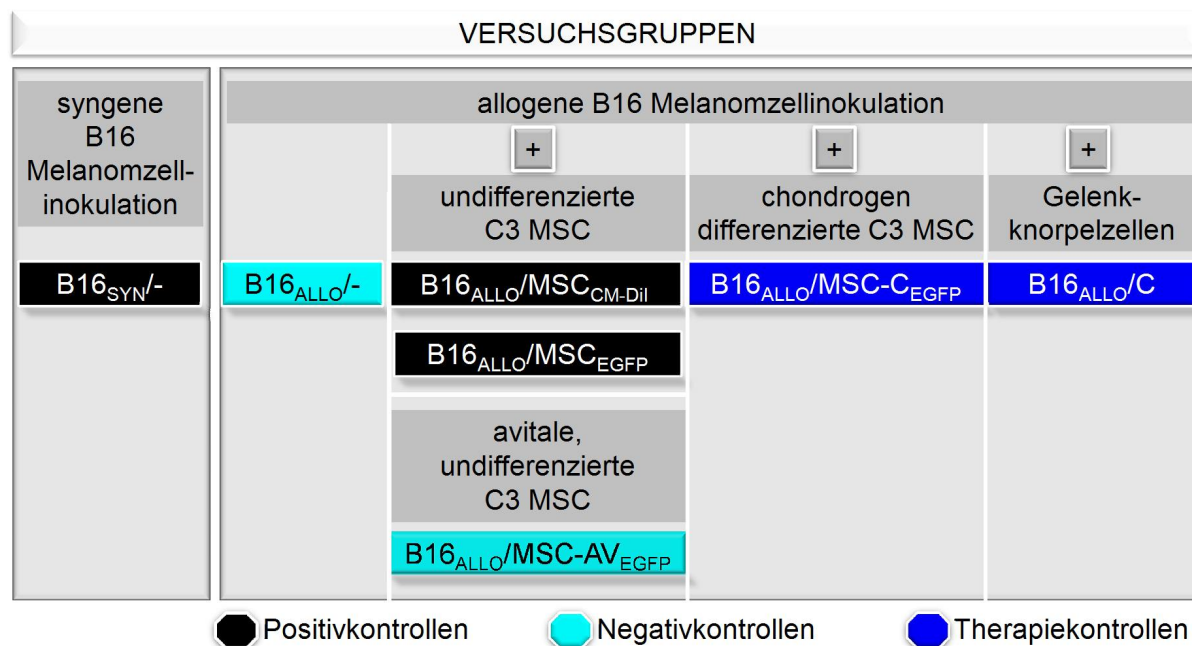
Nach Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens gemäß §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 25.05.1998 (BGBl. IS. 1105) wurde mit dem Bescheid vom 26.08.2005 durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein die Genehmigung erteilt, im Rahmen des Versuchsvorhaben „Tumorrisiko durch Tissue Engineering“ zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Acht bis zwölf Wochen alte Mäuse wurden für das Tiermodell benutzt. Es wurden die Mausstämme C3H/He (H-2<sup>k</sup> Haplotyp) und C57BL/6 (H-2<sup>b</sup> Haplotyp) eingesetzt. Die Mäuse stammen aus der Zucht der zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Bis zum Versuchende wurden sie in der Tierhaltung des Vorklinikums der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel im Victor-Hensen Haus gehalten.

## 2.5.2 Versuchsgruppen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 45 Tiere eingesetzt. Die Tiere wurden von der zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums in die Tierhaltung des Vorklinikums der medizinischen Fakultät transportiert und zunächst 3-5 Tage akklimatisiert. Es wurden je 2-5 Tiere derselben Versuchsgruppe in einem Käfig gehalten. Die in diesem Versuch verwendeten Tiere wurden mit einer Nummer eindeutig gekennzeichnet.

Insgesamt wurden 7 Versuchsgruppen à 5 Tiere gebildet (**Abb. 5**). Als Basis diente eine syngene Positivkontrolle (B16<sub>SYN</sub><sup>-/-</sup>), bei der die Melanomzellen aus C57BL/6-Mäusen in syngene C57BL/6-Mäuse appliziert wurden. Für die allogenen Positiv- und Therapiekontrollen wurden die gleichen Melanomzellen aus C57BL/6-Mäusen in genetisch ungleichartige d.h. allogene C3H/He-Mäuse injiziert und begleitend zusätzlich C3 MSC gegeben. Für die Positivkontrolle wurden 5 C57BL/6-Mäusen aus der ersten Versuchsgruppe B16<sub>SYN</sub><sup>-/-</sup> je  $5 \times 10^5$  B16 Melanomzellen subkutan gespritzt. Aufgrund der fehlenden Immunogenität der genetisch identischen B16 Melanomzellen in den C57BL/6-Mäusen war es zu erwarten, dass der Tumor ungehindert wachsen und metastasieren würde. Als Negativkontrolle wurden 5 C3H/He-Mäuse (B16<sub>ALLO</sub><sup>-/-</sup>) eingesetzt, welche die gleiche Menge der B16 Melanomzellen subkutan erhielten. Bei den restlichen Versuchsgruppen wurden den allogenen Tieren neben 0,5 Mio B16 Melanomzellen begleitend 0,5 Mio undifferenzierte C3 MSC (B16<sub>ALLO</sub>/MSC<sub>CM-Dil</sub> mit CM-Dil markierten MSC, B16<sub>ALLO</sub>/MSC<sub>EGFP</sub> mit EGFP-Gen retroviral transduzierten MSC), cartilaginär differenzierte C3 MSC (B16<sub>ALLO</sub>/MSC-C<sub>EGFP</sub>), originäre Geleknorpelzellen (B16<sub>ALLO</sub>/C) und avitale, gefriergetrocknete MSC (B16<sub>ALLO</sub>/MSC-AV<sub>EGFP</sub>) subkutan gespritzt. Pro Woche wurden die Tiere 2mal auf Allgemeinzustand, Körperhaltung hin untersucht und die frei rasierte Injektionsstelle von B16 Melanomzellen genau inspiziert und palpiert. Die Versuchsdauer war auf 4 Wochen festgelegt worden.



**Abb. 5: Übersicht der Versuchsgruppen.** Dargestellt sind die einzelnen Versuchsgruppen in vertikaler Anordnung je nach syngener (B16<sub>SYN</sub>) oder allogener (B16<sub>ALLO</sub>) B16 Melanomzellinokulation und Art der Koinjektion von mesenchymalen Stammzellen (hier: C3 MSC), angegeben nach dem Schrägstrich im Versuchsgruppennamen. Differenzierungsgrad der MSC: MSC<sub>CM-Dil</sub>, MSC<sub>EGFP</sub> = undifferenzierte MSC fluoreszenzmarkiert mit CM-Dil bzw. EGFP, MSC-C<sub>EGFP</sub> = chondrogen differenzierte MSC. Vitalität der MSC: MSC-AV<sub>EGFP</sub> = avitale undifferenzierte MSC. C = native Gelenknorpelzellen. Farblich voneinander abgegrenzt sind die Positivkontrollen (schwarz), Negativkontrollen (türkis) und Therapiekontrollen (blau).

### 2.5.3 Applikation von MSC und nativen Knorpelzellen

Die eingefrorenen Zellen wurden aufgetaut und mit einer Zelldichte von  $10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> in Kulturflaschen ausgesät. Sie wurden für 2-3 Tage kultiviert und erst danach für die Injektion vorbereitet. Die Zellen wurden ähnlich wie bei einer Subkultivierung behandelt, gezählt und auf Vitalität sowie ggf. Fluoreszenz kontrolliert. Die Pellets waren zuvor in genau der Menge PBS resuspendiert worden, so dass eine Zellkonzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen pro 100  $\mu$ l PBS-Lösung erreicht wurde. Anschließend wurden pro Tier 100  $\mu$ l mit einer sterilen Kanüle auf 1-ml-Spritzen aufgezogen. Innerhalb von 30 Minuten nach Vorbereitung wurden die Spritzen den Tieren subkutan gegeben (**Abb. 3**). Hierbei war keine medikamentöse Betäubung notwendig. Mit Hilfe der freundlichen Assistenz der Tierpfleger, die die Tiere durch einen Griff am Nackenfell fixierten, konnten die Spritzen subkutan appliziert werden.

### 2.5.4 Inokulation von Melanomzellen

Prinzipiell wurden die B16 Melanomzellen in der gleichen Weise wie unter **2.6.3** für die Injektion vorbereitet. Die Injektionsdosis betrug auch hierbei  $5 \times 10^5$  Zellen, die in 100  $\mu\text{l}$  PBS gelöst waren. Anders als bei der subkutanen Applikation von mesenchymalen Stammzellen wurde die Injektionsstelle für die B16-Melanomzell-Inokulation vorher mit einem Rasierapparat rasiert, damit ein frühzeitiges Erkennen des Tumorwachstums in der Untersuchung der Versuchstiere gewährt war. Danach wurden die Zellen an dieser Stelle subkutan gegeben (**Abb. 3**).

### 2.5.5 Untersuchung der Tiere

Im Vordergrund der Untersuchung stand nicht nur die Palpation der Tumorgroße sondern auch die Erkennung des Tumorleidens sowie der Tumorschmerzen nach den Kriterien der FELASA Empfehlungen. Insgesamt wurden die Tiere 2mal in der Woche untersucht. Zunächst wurde beobachtet, ob allgemeine Zeichen für Schmerzen bei den Tieren festzustellen waren. Diese äußern sich im Allgemeinverhalten (Reaktion), als klinische Symptome (gesträubtes Haarkleid, Atmung, Muskeltonus), in der Bewegung (Hinken, Lahmheit), in der Körperhaltung (geneigter Kopf) und Abnahme des Körpergewichts. Die Tiere wurden ohne Betäubung mit einem Griff am Nackenfell mit dem Daumen und Zeigefinger festgehalten. Hielt man sie für etwa 1 Minute in der steilen Kopftieflage, waren sie dann für die Untersuchungszeit ruhig gestellt. So konnte man die Injektionsstelle von B16 Melanomzellen inspizieren und palpieren.

### 2.5.6 Organentnahme

Für einen Überblick bezüglich der Primärtumoren und der Metastasen wurden von jedem Versuchstier insgesamt 10 Gewebeproben entnommen (**Tab. 13**). Dazu wurden die Tiere tierschutzgerecht mit einer  $\text{CO}_2$ -Überdosis getötet. Postmortal wurde die Injektionsstelle der B16 Melanomzellen erneut mit einer Rasierklinge rasiert. Makroskopisch sichtbare Tumoren an der Haut und anderen Organen wurden fotografisch dokumentiert und für die Ermittlung ihrer Volumina vermessen. Je nach Form des Tumors wurde entweder die Formel zur Berechnung des Volumens einer

Kugel ( $V_K = 4/3 \times \pi \times r^3$ ;  $V_K$  = Kugelvolumen,  $r$  = Radius) oder eines Zylinders ( $V_Z = h \times \pi \times r^2$ ;  $V_Z$  = Zylindervolumen,  $h$  = Höhe,  $r$  = Radius) verwendet. Polymorphe Tumoren wurden so zerlegt, dass ihre Volumina mit dieser Methode annähernd berechnet werden konnten.

**Tab. 13: Bevorzugte Fernmetastasen maligner Melanome der Häufigkeit nach aufgelistet.<sup>(\*)</sup>**

1. Haut	5. Leber	9. Darm
2. Unterhaut	6. Gehirn	10. Magen
3. Lymphknoten	7. Skelettsystem	11. Milz
4. Lunge	8. Bauchfell	12. Niere

<sup>(\*)</sup>Quelle: Dermatologische Onkologie (Springer, Berlin Heidelberg New York 1997)

Die Sektion erfolgte mit einem medianen Schnitt der Bauchwand vom Schambein bis zum Brustbein mit Hilfe eines Einwegskalpells. Die Bauchwand wurde vorsichtig nach lateral frei präpariert. Der Schnitt wurde dann kranial bis zur Kehle erweitert. Das Bauchfell wurde mit einer Schere eröffnet, der Darm nach Veränderungen inspiziert und zur Seite verlagert. Der Magen, die Leber, Milz und Nieren wurden ebenfalls inspiziert und für die histologische Untersuchung in Paraformaldehyd fixiert. So wurden auch die Lunge und das Herz auf Veränderungen inspiziert. Danach wurde der Gehirnschädel eröffnet, das Gehirn auf Metastasen untersucht und in Paraformaldehyd fixiert. Zum Schluss wurde der Oberschenkelknochen von der Muskulatur befreit und ein etwa 1 cm langes Stück mit der Schere abgetrennt und für die Knochenmarkuntersuchung in Paraformaldehyd fixiert. Einige Stunden vor der Organentnahme wurden 20-ml-Rollrandgläser mit frisch angesetztem Paraformaldehyd (**Tab. 14**) befüllt und von innen mit einem Streifen Pappe beschriftet.

**Tab. 14: Herstellung von 4%igem Paraformaldehyd.**

<p>Ansatz für 500 ml: 24 g Paraformaldehyd werden in  500 ml PBS gelöst, auf 65 °C erwärmt, mit  0,1 % 1 N NaOH geklärt und anschließend filtriert.</p>
---



## 2.6 Histologische Methoden

### 2.6.1. Paraffineinbettung

Zum Schutz des Fluoreszenzmarkers wurden die Präparate vor längerer Lichtexposition geschützt. Die in Paraformaldehyd fixierten Präparate wurden in Einbettkörbe überführt und nach einer 2-stündigen fließenden Wässerung und Spülung in einer aufsteigenden Alkoholreihe über 70%, 90%, 96% und schließlich 100% mit Methylbenzoat inkubiert. Die Knochenpräparate wurden zunächst in 20%iger EDTA entkalkt und nach 2 Wochen röntgenologisch auf eine vollständige Entkalkung untersucht. Die anschließende Paraplasteinbettung verlief über 3 Durchgänge mit jeweils frischem Paraplast, wobei zuletzt das Paraplast mit den Präparaten in Formen gegossen und im Vakuum bewahrt wurde, um es bei 20 °C aushärten zu lassen. Mit dem Mikrotom (Leica RM 2165) wurden rechteckige Paraffinschnitte angefertigt und auf einem chromalaunbeschichteten und mit Aqua dest benetzten Objektträger aufgezogen. Die Schnitte hatten eine Stärke von weniger als 7 µm. Es wurden pro Präparat 2 Schnitte für die mikroskopische Untersuchung angefertigt: 1 Leerschnitt ohne Färbung und 1 HE-Schnitt.

### 2.6.2 HE-Färbung

Die bei 37 °C über die Nacht getrockneten Paraffinschnitte wurden zunächst insgesamt 3mal über 5 Minuten mit Xylol entparaffiniert und danach über eine absteigende Alkoholreihe von 100% über 96%, 90%, 80%, 70% und 50% für je 4 Minuten in Aqua dest überführt. Die Färbung erfolgte für 7 Minuten in Mayer's-Hämalaun (Merck) und durch eine anschließende kurze Spülung mit Aqua dest. für 5 Minuten wurden die HE-Schnitte unter fließendem Wasser gebläut. Nach einem weiteren kurzen Spülgang folgte die Behandlung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe in genau entgegengesetzter Reihenfolge. Die Objektträger wurden jeweils für 5 Minuten in einer aufsteigenden Xylolreihe belassen, bevor mit DePeX® (Serva) eingedeckelt wurde.

### **2.6.3 Mikroskopie**

Für die konventionelle Lichtmikroskopie vitaler Zellen wurde ein Inversmikroskop (Axiovert 25, Zeiss) mit Plan Neofluar 10x, 20x und 40x Objektiven verwendet. Das Mikroskop war für die Fluoreszenz mit Filtereinheiten für rote Fluoreszenz (CY3), für grüne Fluoreszenz (FITC) ausgerüstet. Zur Mikrophotographie wurde eine am Mikroskop installierte Digitalkamera (Canon), die über das Notebook gesteuert wurde, benutzt. Die digitalen Aufnahmen wurden als JPEG-Dateien auf dem Notebook gespeichert.

Die histologischen Schnitte wurden an einem Mikroskop (Axioskop, Zeiss) untersucht. Dieses Mikroskop war mit Plan Neofluar 2x, 10x, 20x, 40x und 63x Objektiven, Filtereinheiten für rote Fluoreszenz (CY3) und für grüne Fluoreszenz (FITC) sowie einer Digitalkamera ausgerüstet. Die Digitalkamera wurde über einen Rechner gesteuert. Auch diese digitalen Aufnahmen wurden als JPEG-Dateien auf einem Speicherstick gespeichert.

## **2.7 Statistik**

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden als absoluter Wert, Mittelwert und Standardabweichung vom Mittelwert angegeben. Für die statistische Auswertung wurde der Student's t-Test mit Hilfe des Excel-basierten Softwareprogramms „XLSTAT 2008“ angewendet. Der t-Test wurde 2-seitig bei ungleicher Varianz durchgeführt. Die Zuverlässigkeit einer Aussage wurde als signifikant angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  war.

## 3. ERGEBNISSE

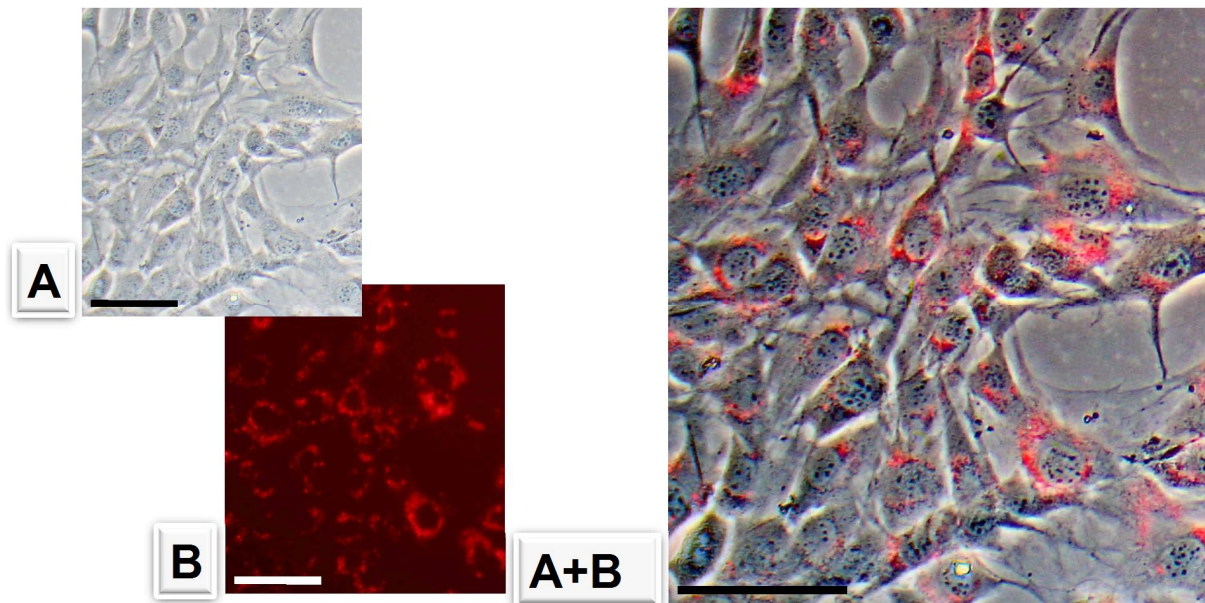
### 3.1 Markierungs- und Differenzierungsversuche in vitro

#### 3.1.1 Fluoreszenzmarkierung vitaler MSC

Um die verwendeten Stammzellen im Mausmodell verfolgen zu können, wurden sie vor der Applikation in vitro markiert. Hierbei wurden zwei Methoden der Fluoreszenzmarkierung vitaler Zellen mit grundverschiedenen Mechanismen eingesetzt. Zum einen wurde CellTracker® CM-Dil C7000 verwendet, der durch seine thiol-reaktiven Chloromethyl-Substituenten an zytoplasmatische Proteine stabil bindet (Produktinformation der Fa. Invitrogen). Zum anderen wurden die mesenchymalen Stammzellen mit dem retroviralen Vektor, der ein Gen für EGFP (enhanced green fluorescent protein) überträgt, transduziert. Die Ergebnisse der in vitro durchgeführten Zellmarkierung werden nachfolgend dargestellt.

##### 3.1.1.1 Zytochemische Fluoreszenzmarkierung mit CellTracker® CM-Dil C7000

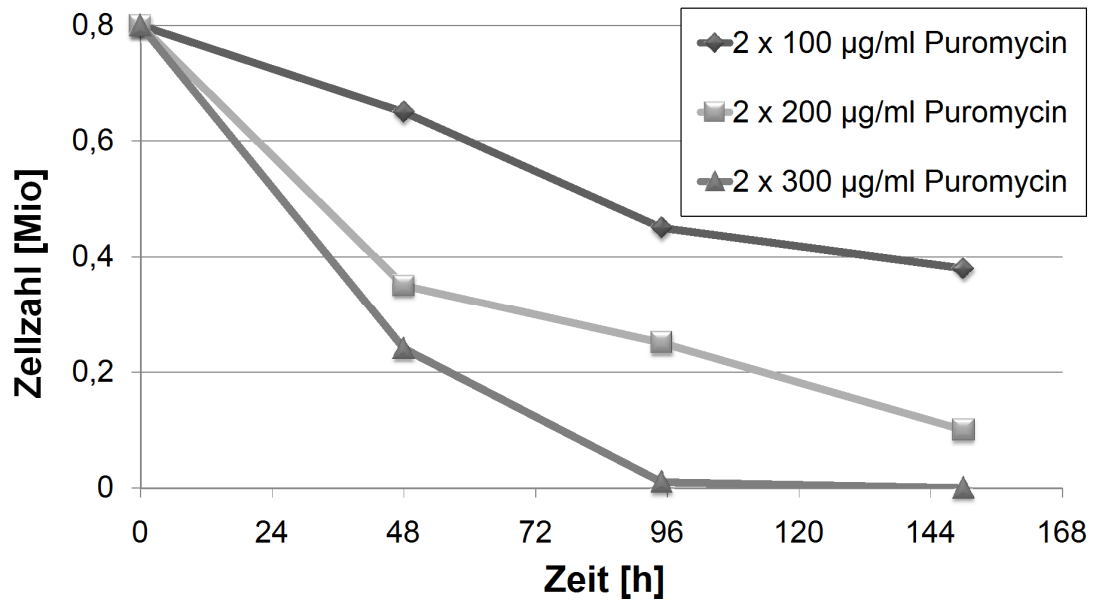
Die mesenchymalen Stammzellen wurden erfolgreich mit dem CellTracker® CM-Dil markiert. Die markierten Zellen konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem Fluoreszenzfilter für CY3 ( $\lambda = 570 \text{ nm}$ ) detektiert werden. Bei dieser Wellenlänge fluoresziert der Farbstoff im Zytoplasma rot (**Abb. 6**). Die Intensität der Fluoreszenz wurde über 8 Wochen kontrolliert. Eine nennenswerte Intensitätsminderung fiel nicht auf.



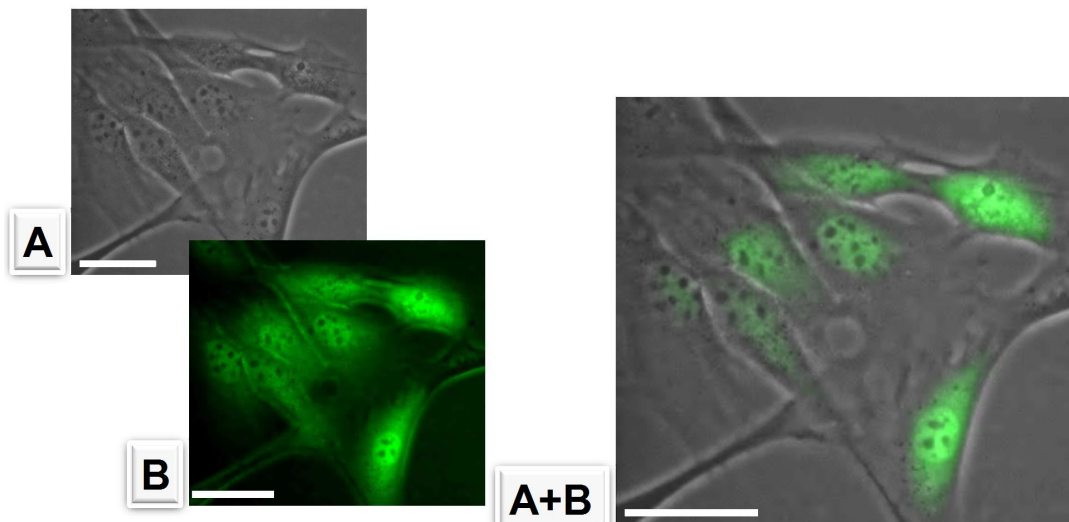
**Abb. 6: Fluoreszenzmarkierung von vitalen mesenchymalen Stammzellen mit CM-Dil.** Nach 3 Tagen Subkultur der erfolgreich markierten Zellkolonien (siehe 2.4.1, Balken: 50  $\mu\text{m}$ ). Dargestellt sind links in der Abbildung die Einzelaufnahmen: (A) Phasenkontrastaufnahme der in vitro markierten MSC mit regelrechter Zellmorphologie. (B) Fluoreszenzaufnahme dieser Zellen mit punktförmigen hellroten fluoreszierenden Stellen im Zytoplasma unter Aussparung des Zellkerns. (A+B) Bei Überlagerung beider Aufnahmen wird die Lokalisation des Fluoreszenzfarbstoffs noch deutlicher.

### 3.1.1.2 Stabile Fluoreszenzmarkierung von vitalen MSC durch retrovirale Transduktion mit dem EGFP-Gen

Die mesenchymalen Stammzellen konnten erfolgreich mit dem retroviralen Vektor pBabePuro in vitro transduziert werden. Den Zellen wurde mit dem EGFP-Gen auch ein Puromycin-Resistenz-Gen weitergegeben. Mit dem Antibiotikum Puromycin wurden die nicht-transduzierten Zellen abgetötet. Anhand einer Kill-Curve wurde die Zeitdauer der Selektion der transduzierten MSC bei einer effektiven Dosis von 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  als eine 2malige Einzeldosis von 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bestimmt. Diese betrug etwa 96 Stunden (**Abb. 7**). Durch eine weitere manuelle Selektion (siehe 2.4.2) konnten die sehr gut fluoreszierenden Zellkolonien (**Abb. 8**) zur Subkultivierung und Vermehrung separiert werden.



**Abb. 7: Kill-Curve zur Selektion der erfolgreich mit EGFP-Gen transduzierten mesenchymalen Stammzellen.** Gekoppelt an EGFP-Gen wurde ein Puromycin-Resistenz-Gen transduziert. Eine Dosis von 2 x 300 µg/ml des Antibiotikums Puromycin bewirkte bei den nicht-transduzierten mesenchymalen Stammzellen eine vollständige Abtötung dieser Zellen nach ca. 96 Stunden Inkubation. Mit dieser Dosis konnten die transduzierten mesenchymalen Stammzellen für den Tierversuch selektiert werden.

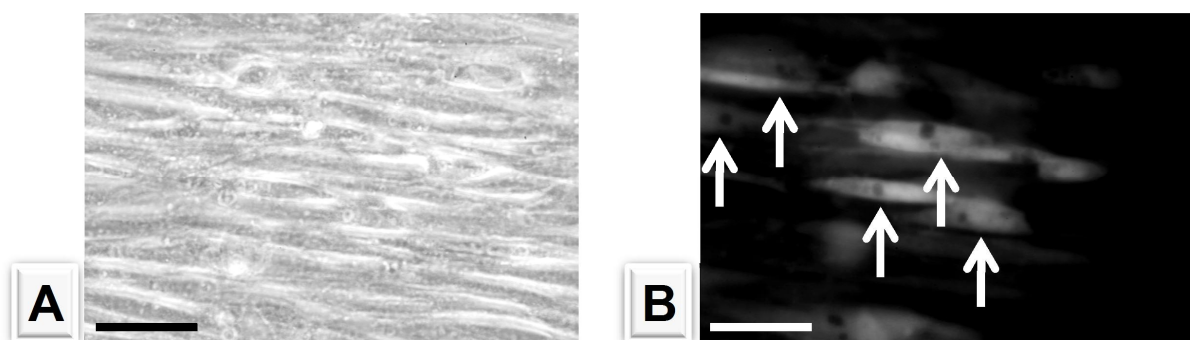


**Abb. 8: Fluoreszenzmarkierung von vitalen mesenchymalen Stammzellen durch Transduktion mit dem EGFP-Gen** (Balken: 20 µm). Dargestellt sind die erfolgreich markierten und selektierten MSC, die sich unter Weitergabe des EGFP-Gens mit Produktion des unter Betrachtung mit dem FITC-Filter grün fluoreszierenden Proteins vermehren. Die Einzelaufnahmen links in der Abbildung: (A) Phasenkontrastaufnahme der in vitro transduzierten MSC mit regelrechter Zellmorphologie. (B) In der Fluoreszenzaufnahme leuchten diese Zellen mit starker Intensität grün auf. Die Überlagerung beider Aufnahmen (A+B) zeigt eine diffuse intrazelluläre Verteilung des EGFP.

### 3.1.2 Differenzierungsversuche

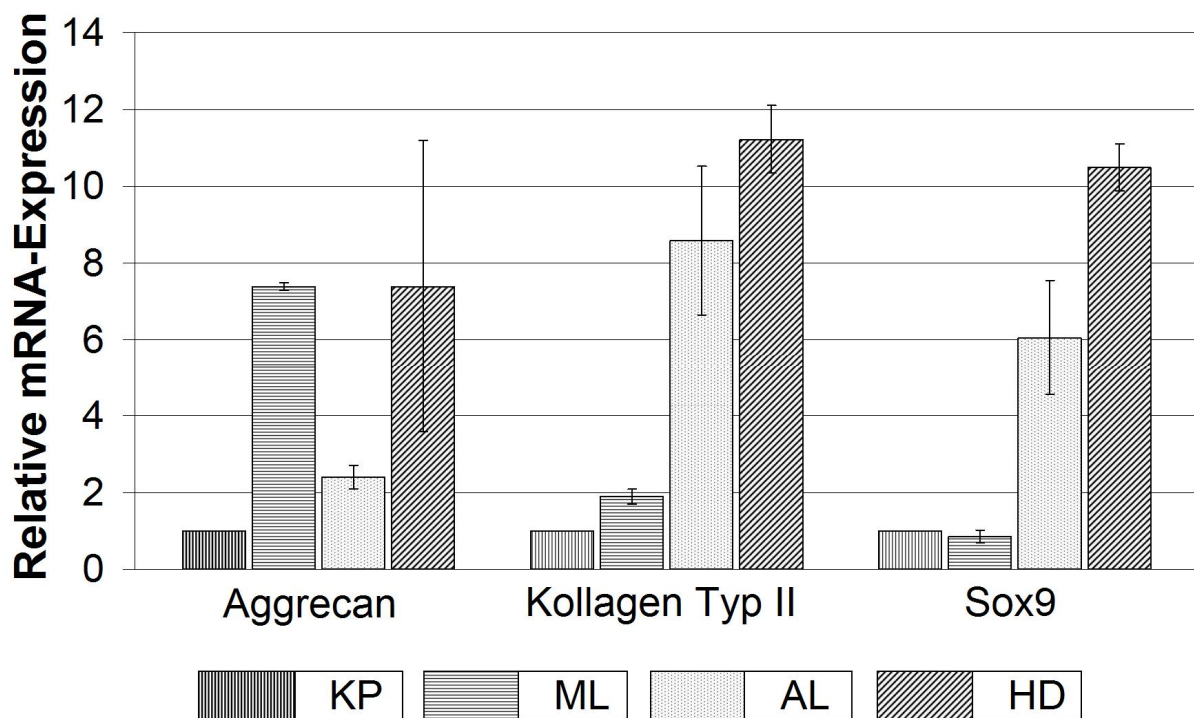
Zur Auswahl einer geeigneten Differenzierungskulturmethode für die in dieser Arbeit verwendeten MSC wurden zunächst die drei für eine Knorpelzelldifferenzierung etablierten Methoden der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen verglichen. Im Nachfolgenden sind die Ergebnisse dieser Monolayer-, Alginat- und Hohe-Dichte-Zellkultur aufgeführt. Für den Tierversuch wurden aufgrund des signifikant höheren molekularbiologischen Nachweises der kartilaginären Differenzierung die Zellen aus der Hohe-Dichte-Zellkultur (siehe **3.1.2.3**) genommen.

Die MSC wurden in der Monolayer-Zellkultur über 10 Tage mit dem Differenzierungsmedium (**Tab. 4**) zu kartilaginärer Differenzierung stimuliert. In dieser Zeit wurde die Stabilität der Fluoreszenzmarkierung kontrolliert. Nach Ablauf des Differenzierungsversuches wurde mit Hilfe der real time RT-PCR die Expression der kartilaginären Markergene Kollagen Typ II, Aggrecan und Sox9 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der MSC mit dem Differenzierungsmedium die EGFP-Genexpression nicht beeinträchtigte und somit die Fluoreszenzmarkierung in ihrer Intensität stabil blieb (**Abb. 9**). Die relative Quantifizierung der Expression der kartilaginären Markergene für Kollagen Typ II (12fache Erhöhung), Aggrecan (6fache Erhöhung) und Sox9 (8fache Erhöhung) ergab einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu einer Kontrollprobe mit undifferenzierten MSC (**Abb. 10**).



**Abb. 9: Stabilität der Fluoreszenzmarkierung bei kartilaginärer Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen** (Balken: 100  $\mu\text{m}$ ). (A) Phasenkontrastaufnahme und (B) zugehörige Fluoreszenzaufnahme nach 6 Tagen Stimulation. Dargestellt ist die Intensität der Fluoreszenzmarkierung bzw. indirekt die EGFP-Genexpression (Pfeile in B).

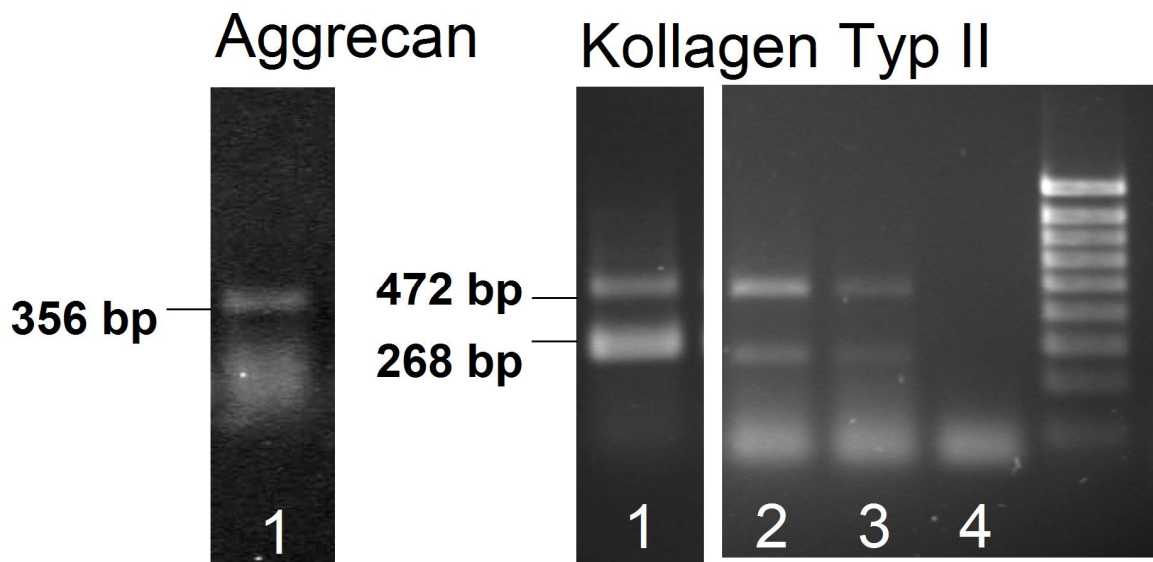
Die Alginat- und Hohe-Dichte-Zellkultur wurden parallel angefangen, so dass am Ende der kartilaginären Stimulation nach 10 Tagen ein direkter Vergleich der Zellen aus beiden Zellkulturen mittels real time RT-PCR möglich war. Die relative Quantifizierung der Expression der kartilaginären Markergene ist in der **Abb. 10** dargestellt. Die Ergebnisse aus dem direkten Vergleich der Alginat- und Hohe-Dichte-Zellkultur sowie unter Berücksichtigung der Ergebnisse bei der Monolayer-Zellkultur zeigen eine relativ bessere Differenzierung der MSC zu knorpelähnlichen Zellen in der Hohe-Dichte-Zellkultur. Die chondrogen differenzierten MSC aus der Hohe-Dichte-Zellkultur besitzen ähnliche molekularbiologische Eigenschaften wie die originären Gelenkknorpelzellen (**Abb. 11**). Auch bei diesen Zellkulturmethoden konnte die Stabilität der durch Transduktion erzielten Fluoreszenzmarkierung im Anschluss an den Differenzierungsversuch nachgewiesen werden.



**Abb. 10: Synthese extrazellulärer Matrixmoleküle nach chondrogener Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen.** Die relative Quantifizierung der Expression knorpeltypischer Markergene mittels real time RT-PCR zeigt eine Überlegenheit der Differenzierungsbedingungen in der Hohe-Dichte-Zellkultur (HD) im Vergleich zur Kontrollprobe (KP), Monolayer-Zellkultur (ML) und Alginat-Zellkultur (AL). Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3, unabhängige Experimente).

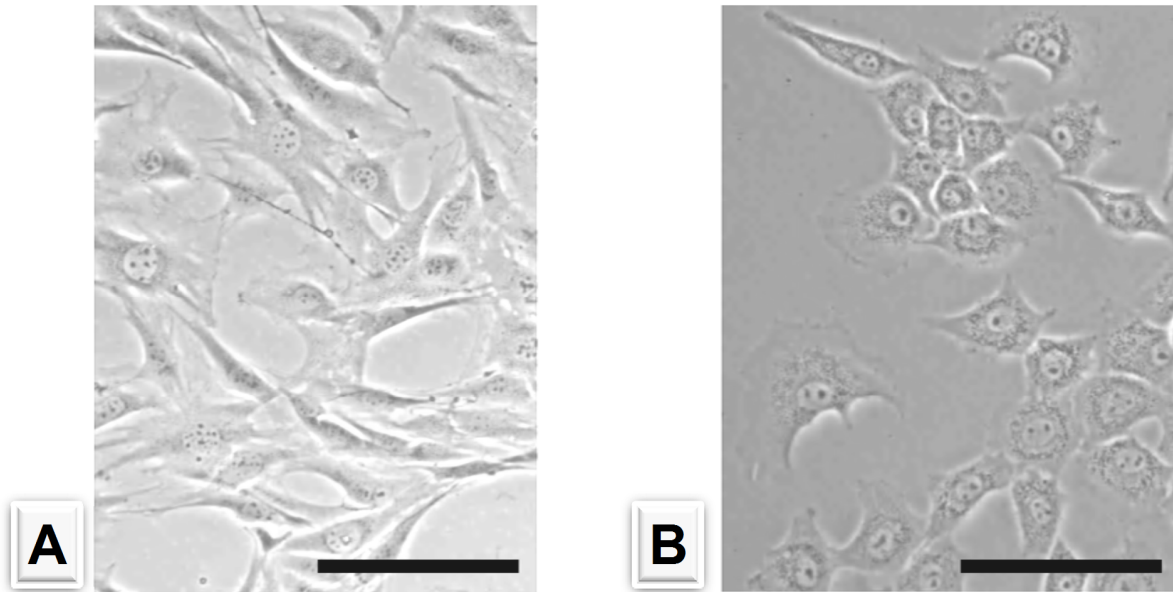
### 3.1.3 Molekularbiologische Charakterisierung der isolierten Gelenkknorpelzellen

Die aus den unverknöcherten Epiphysenanteilen isolierten und in vitro vermehrten Gelenkknorpelzellen wurden mittels RT-PCR auf ihre kartilaginäre Eigenschaft hin untersucht. Mit dem Nachweis der Expression der Markergene für Kollagen Typ II und Aggrecan (**Abb. 11**) konnte ihre knorpelzelltypische Funktionalität gezeigt werden. Dennoch wiesen sie trotz dieses Syntheseverhaltens morphologische Ähnlichkeiten mit den MSC auf (**Abb. 12**). Die isolierten Gelenkknorpelzellen waren kleiner und wiesen eine langsamere Proliferation als die MSC auf (nicht gezeigt).



**Abb. 11: Nachweis der Expression der Markergene für Kollagen Typ II und Aggrecan bei den isolierten nativen Gelenkknorpelzellen** (Probe 1: native Gelenkknorpelzellen, Probe 2 und 3: chondrogen differenzierte MSC, Probe 4: Kontrollprobe mit undifferenzierten MSC). Die Abbildung zeigt für Kollagen Typ II eine ähnliche Bandenintensität bei nativen Gelenkknorpelzellen und differenzierten MSC. Aggrecan (356 Basenpaare) und Kollagen Typ II (268 und 472 Basenpaare).





**Abb. 12: Morphologie der MSC (A) und der nativen Gelenkknorpelzellen (B) im Phasenkontrastbild (Balken: 100  $\mu\text{m}$ ). Die Gelenkknorpelzellen sind kleiner und haben weniger lange Fortsätze als die undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen.**

### 3.1.4 Gewinnung von avitalen mesenchymalen Stammzellen

Um die Bedeutung der Vitalität der Stammzellen bei den unten aufgeführten Versuchen im Mausmodell zu zeigen, sollten in einigen Versuchen die Zellen vor Applikation abgetötet werden. Zum Ausschluss vitaler MSC wurden die durch Lyophilisation abgetöteten Zellen über 4 Wochen in Kultur gehalten und auf Vitalität und Proliferation hin kontrolliert. Bei dieser Methode zur Gewinnung von avitalen Zellen konnten nach der Behandlung *in vitro* keine Vitalitätszeichen der Zellen wie Mediumverbrauch (i.e. Farbumschlag des Mediums), Proliferation und Intaktheit der Zellmembran (Trypan-Blau-Test, siehe auch **2.2.1.3**) nachgewiesen werden.

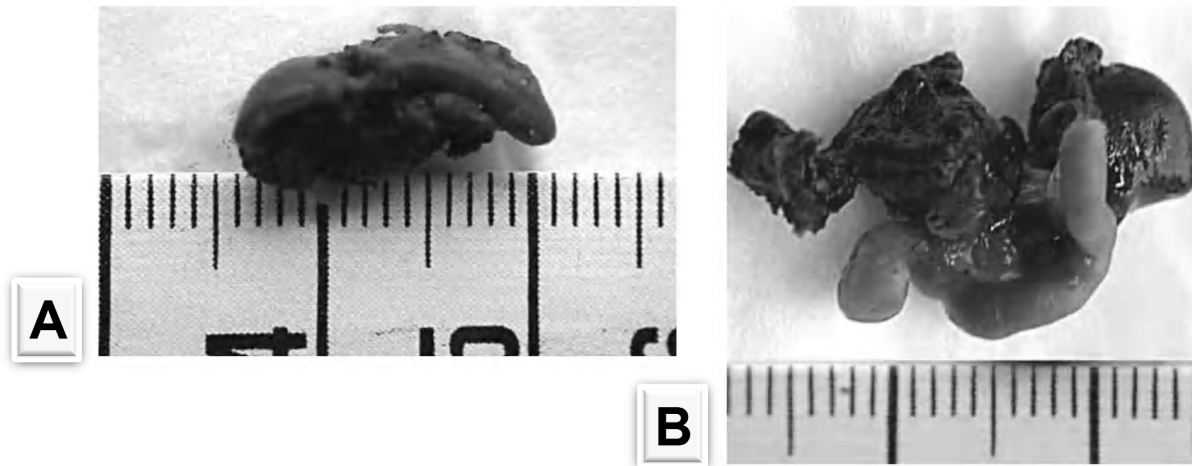
## 3.2 Ergebnisse der tierexperimentellen Versuche

Im Folgenden werden die verschiedenen Versuchsgruppen einzeln erläutert. Die Ergebnisse setzen sich zusammen aus den erhobenen Befunden im Verlauf des Tierversuches durch die Untersuchungen der Tiere, den makroskopischen Sektionsbefunden und den histologischen Ergebnissen.

### 3.2.1 Nachweis der hohen Malignität von B16 Melanomzellen bei syngener Inokulation

Zum Nachweis der hohen Malignität der Melanomzellen wurden syngenen C57BL/6 Mäusen aus der Versuchsgruppe B16<sub>SYN</sub>/- je 0,5 Mio Melanomzellen als eine Einzelinjektion subkutan in die rechte Leistenregion appliziert. Bereits nach 10 Tagen konnten linsengroße, nicht verschiebliche schwarze Hauttumoren getastet werden. Ab Tag 14 zeigten die Tiere ein verändertes Verhalten und Defizite in ihrer Aktivität (nicht gezeigt, siehe auch Seite 35) bei wachsendem Hauttumor. Nach 23 Tagen mussten die Tiere wegen des stark reduzierten Allgemeinzustandes und des Tumorleidens zur Organentnahme getötet werden. Hierbei zeigte sich eine massive Fernmetastasierung des subkutan angewachsenen Malignen Melanoms bei einem durchschnittlichen Primärtumorvolumen von ca. 137  $\mu$ l.

Es ist bekannt, dass die Melanomzellen einen hohen Malignitätsgrad aufweisen, d.h. sehr schnell wachsen und stark metastasieren (Nakamura et al., 2002). Während das Metastasierungsrisiko bei Breslow-Dicken von <1,5 mm unter 10% liegt, steigt dies bei fortgeschrittenen Tumoren (>4 mm) auf bis zu 70%. Die Breslow-Dicken-Angaben beziehen sich auf das menschliche Melanom. Die Metastasierung erfolgt sowohl über Blut und Lymphe als auch über natürliche Kavitäten. Aus diesem Grund wurde beschlossen, in dieser Arbeit nicht nur den Primärtumor zu untersuchen sondern auch nach Metastasen in den großen Organen zu suchen (**Tab. 13**, siehe Seite 35). Exemplarische Befunde der Sektion sind in der **Abb. 13** dargestellt. Alle 5 Tiere aus dieser Gruppe wiesen multiple Organmetastasen auf bei relativ kleinvolumigen subkutan gelegenen Primärtumoren (**Abb. 20**).



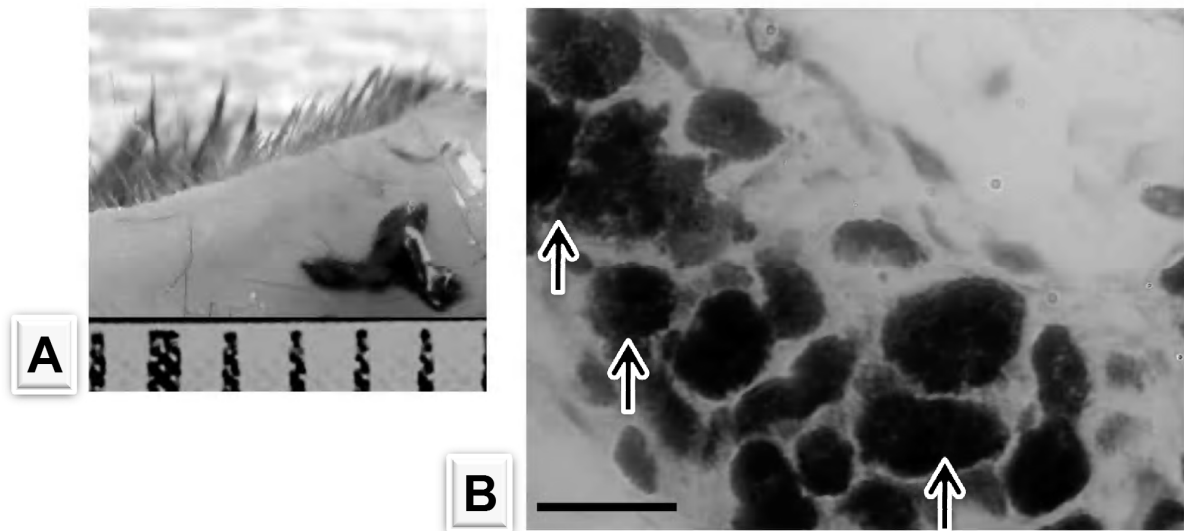
**Abb. 13: Makroskopische Befunde vier Wochen nach syngener Melanomzellinokulation.** Darm- und Milzmetastasen in der Versuchsgruppe B16<sub>SYN</sub><sup>-</sup> (Abstand der Teilstriche = 1 mm; Abkürzungen: B16<sub>SYN</sub> = syngene bzw. autologe B16-Melanomzellinokulation, <sup>-</sup> = ohne Koinjektion von mesenchymalen Stammzellen). (A) Die Milz weist eine große schwarze Tumormasse am Hilum auf. (B) Tumorbefall des großen Netzes und des Darmes mit hämorrhagischen Veränderungen des Netzes.

### 3.2.2 Hemmung des Tumorwachstums nach allogener Melanomzellinokulation

Die Tiere aus der Versuchsgruppe B16<sub>ALLO</sub><sup>-</sup> stammten aus der Zuchtlinie C3H/He und waren somit allogenen hinsichtlich der subkutanen Melanomzelleninokulation. Nach Ablauf der vorgesehenen Versuchsdauer von 4 Wochen erfolgte die Organentnahme; diese ergab, dass weder makroskopisch noch mikroskopisch Metastasen nachgewiesen werden konnten. Das Primärtumorwachstum war in diesen Tieren signifikant niedriger als in den syngenen C57BL/6 Mäusen (p-Wert < 0,0001; siehe auch **Tab. 15**). Bei 2 von 5 Tieren wurden kleine fadenförmige Primärtumoren mit einem maximalen Volumen von 30  $\mu$ l entdeckt (**Abb. 14**). Dieses Tumolvolumen wurde bei den nachfolgenden Versuchsgruppen als Kontrollwert für eine Tumorwachstumsförderung bedingt durch die in **1.4** dargestellten immunmodulatorischen Fähigkeiten der mesenchymalen Stammzellen herangezogen.

**Tab. 15: Hoch signifikante Senkung des Primärtumorwachstums bei allogener statt syngener Melanomzellinokulation** (Abkürzungen: B16<sub>ALLO</sub> = allogene bzw. B16<sub>SYN</sub> = syngene B16-Melanomzellinokulation):

t-Test für 2 unabhängige Stichproben / zweiseitiger Test (gerundete Werte)						
Versuchsgruppe	N	Min. [ $\mu$ l]	Max. [ $\mu$ l]	Mittelwert [ $\mu$ l]	SD [ $\mu$ l]	p-Wert ( $\alpha=0,05$ )
B16 <sub>SYN</sub> /-	5	96	178	137	33	<b>&lt;0,0001</b>
B16 <sub>ALLO</sub> /-	5	0	30	8	13	
H <sub>A</sub> : Die Differenz zwischen den Mittelwerten ist signifikant verschieden von 0.						



**Abb. 14: Exemplarischer Befund eines subkutanen Primärtumors in der Versuchsgruppe B16<sub>ALLO</sub>/-** vier Wochen nach Behandlung (Abkürzungen: B16<sub>ALLO</sub> = allogene B16-Melanomzellinokulation, /- = ohne Koinjektion von mesenchymalen Stammzellen). (A) Der subkutan lokalisierte Tumor erscheint dunkelschwarz (Abstand der Teilstriche = 1 mm). (B) Im HE-Schnitt zeigen die Melanomzellen einen relativ hohen Melaningehalt im Zytoplasma auf (Pfeile, Balken: 20  $\mu$ m).

### 3.2.3 Tumorwachstum nach subkutaner Koimplantation von B16 Melanomzellen und undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen

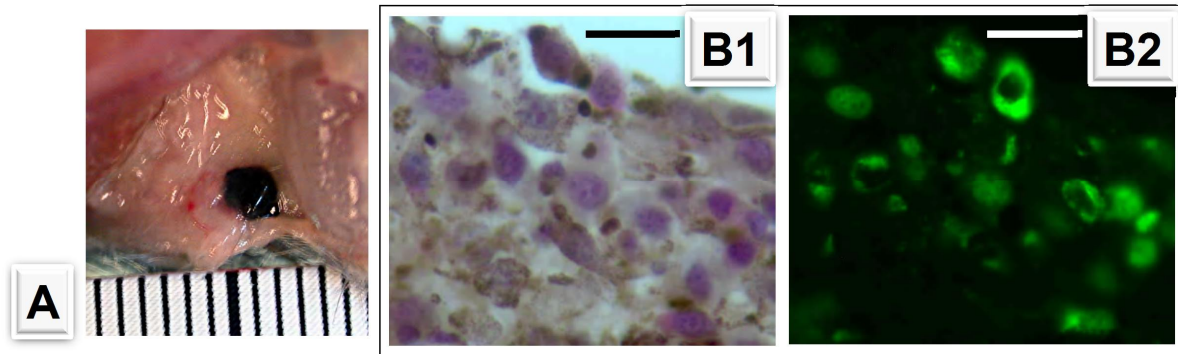
Der Einfluss der parallel zu den Melanomzellen in einem Abstand von etwa 3 cm in die kontralaterale Leiste applizierten MSC wird mit den folgenden Versuchsgruppen erfasst. Hierfür wurden Primärtumorwachstum, Ausbildung von Fernmetastasen, ihre berechneten Volumina und Einwanderung von subkutan injizierten MSC ins Tumorgewebe herangezogen. Für das Letztere wurden zum einen MSC, die mit einem üblichen Fluoreszenzfarbstoff (CM-Dil, siehe 2.4.1) und zum anderen auch solche mit einer moderneren und eventuell besseren molekularbiologischen Methode (Transduktion mit pBabePuro, siehe 2.4.2) markiert worden waren, verwendet.

#### 3.2.3.1 Tumorwachstumsförderung durch undifferenzierte EGFP-transduzierte MSC

Zum Nachweis einer Tumorwachstumsförderung durch vitale, undifferenzierte MSC wurden im Sinne einer autologen MSC-Implantation Tieren aus der Versuchsgruppe B16<sub>ALLO</sub>/MSC<sub>EGFP</sub> zusätzlich zu der subkutanen Melanomzelleninokulation in die rechte Leistenregion als Koinjektion EGFP-transduzierte MSC (siehe 2.5.3-4) in der gleichen Zellzahl in die linke Leistenregion subkutan gegeben. Bereits nach 14 Tagen war bei 3 von 5 Tieren ein linsen- bis reiskorngroßer schwarzer Tumor palpabel (**Abb. 15**). Das Primärtumorwachstum war somit durch die gleichzeitige Gabe von vitalen, undifferenzierten MSC gegenüber der Negativ-Kontrollgruppe (B16<sub>ALLO</sub>/-) signifikant erhöht (p-Wert = 0,024; siehe auch **Tab. 16**). Ebenso wurden Fernmetastasen bei 4 von 5 Tieren festgestellt. Das durchschnittliche Primärtumorvolumen betrug 174  $\mu$ l.

**Tab. 16: Signifikant erhöhtes Tumorwachstum nach subkutaner Koinjektion von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen** (Abkürzungen: B16<sub>ALLO</sub> = allogene B16-Melanomzellenapplikation, MSC<sub>EGFP</sub> = Koinjektion von EGFP-transduzierten mesenchymalen Stammzellen):

t-Test für 2 unabhängige Stichproben / zweiseitiger Test (gerundete Werte)						
Versuchsgruppe	n	Min. [ $\mu$ l]	Max. [ $\mu$ l]	Mittelwert [ $\mu$ l]	SD [ $\mu$ l]	p-Wert ( $\alpha=0,05$ )
<b>B16<sub>ALLO</sub>/MSC<sub>EGFP</sub></b>	5	60	250	160	76	<b>0,01</b>
<b>B16<sub>ALLO</sub>/-</b>	5	0	30	8	13	
H <sub>A</sub> : Die Differenz zwischen den Mittelwerten ist signifikant verschieden von 0.						



**Abb. 15: Makroskopischer und histologischer Befund eines subkutan lokalisierten Primärtumors in der Versuchsgruppe B16<sub>ALLO</sub>/MSC<sub>EGFP</sub> vier Wochen nach Behandlung** (Abkürzungen: B16<sub>ALLO</sub> = allogene B16-Melanomzellenapplikation, MSC<sub>EGFP</sub> = Koinjektion von EGFP-transduzierten mesenchymalen Stammzellen). (A) Der subkutan lokalisierte Primärtumor erscheint dunkelschwarz und makroskopisch abgekapselt. (B1) Im HE-Schnitt des isolierten Primärtumors imponieren die Melanomzellen mit braunem Melaninpigment. Dazwischen liegen die mesenchymalen Stammzellen mit dunkelblauen Zellkernen, die von zartrotem Zytoplasma umgeben sind. (B2) Diese Zellen erweisen sich nach Betrachtung der Fluoreszenzdarstellung als die *in vitro* markierten und den Tieren subkutan applizierten MSC, die entsprechend von der Injektionsstelle auf die kontralaterale Seite zum Tumor gewandert sein müssen. (Balken: 20  $\mu$ m)

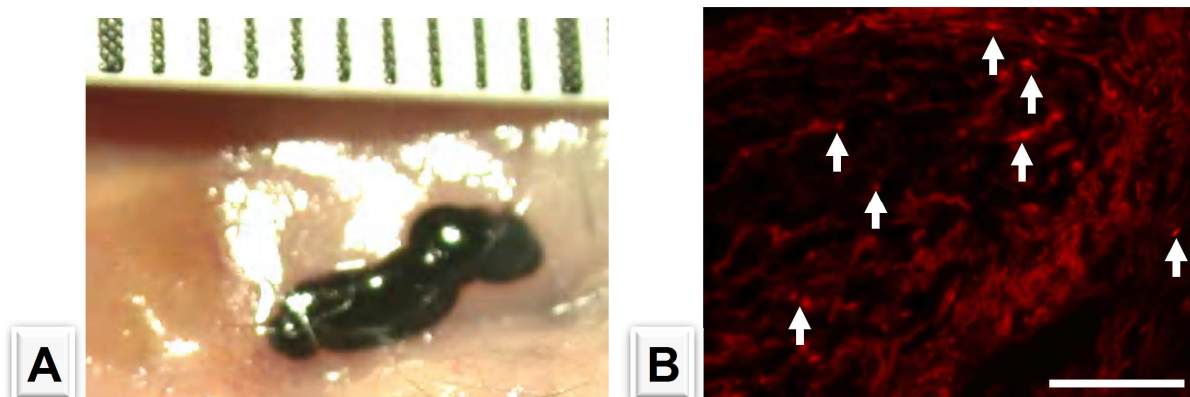
### 3.2.3.2 Tumorwachstum bei Koimplantation von B16 Melanomzellen und CM-Dil-fluoreszenzmarkierten undifferenzierten MSC

Die Tiere aus der Versuchsgruppe B16<sub>ALLO</sub>/MSC<sub>CY3</sub> wurden mit einer Koinjektion von je 0,5 Mio Melanomzellen und wie unter **2.4.1** mittels CM-Dil fluoreszenzmarkierten undifferenzierten MSC behandelt. Bei der Untersuchung der Tiere wurden in 2 von 4 Fällen Hautekzeme im Bereich der subkutanen Injektionsstelle der zytochemisch fluoreszenzmarkierten MSC beobachtet. Die Hautekzeme wurden nicht behandelt, um den Versuchsablauf nicht zu beeinflussen und heilten spontan innerhalb von etwa 2 Wochen mit Verkrustung und Schuppung ab. Nach 3 Wochen konnte bei 2 von 4 Tieren ein linsengroßer Hauttumor getastet werden. In der anschließenden Sektion wiesen diese Tiere bei einem durchschnittlichen Primärtumorvolumen von 42  $\mu$ l multiple Bauchfellmetastasen auf. Das Tumorwachstum war jedoch nicht signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p$ -Wert = 0,275, **Tab. 17**). Die histologische Untersuchung der entnommenen Organe mit positivem Tumorbefund zeigte eine Abwanderung der fluoreszenzmarkierten MSC in den Tumor (**Abb. 16**). In den anderen untersuchten Organen konnten fluoreszenzmikroskopisch keine MSC detektiert werden.

**Tab. 17: Kein signifikant erhöhtes Tumorwachstum nach subkutaner Koinjektion von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen bei Fluoreszenzmarkierung mit CM-Dil im Vergleich zur Kontrolle** (Abkürzungen: B16<sub>ALLO</sub> = allogene B16-Melanomzellenapplikation, MSC<sub>CM-Dil</sub> = Koinjektion von CM-Dil-markierten mesenchymalen Stammzellen):

t-Test für 2 unabhängige Stichproben / zweiseitiger Test (gerundete Werte)						
Versuchsgruppe	n	Min. [ $\mu$ l]	Max. [ $\mu$ l]	Mittelwert [ $\mu$ l]	SD [ $\mu$ l]	p-Wert ( $\alpha=0,05$ )
B16 <sub>ALLO</sub> /MSC <sub>CM-Dil</sub>	4	0	96	41	49	<b>0,275</b>
B16 <sub>ALLO</sub> /-	5	0	30	8	13	

H<sub>0</sub>: Die Differenz zwischen den Mittelwerten ist nicht signifikant verschieden von 0.



**Abb. 16: Makroskopischer und histologischer Befund einer Bauchfellmetastase in der Versuchsgruppe B16<sub>ALLO</sub>/MSC<sub>CM-Dil</sub> vier Wochen nach Behandlung** (Abkürzungen: B16<sub>ALLO</sub> = allogene B16-Melanomzellenapplikation, MSC<sub>CM-Dil</sub> = Koinjektion von CM-Dil-markierten MSC). (A) Der peritoneal lokalisierte Tumor erscheint dunkelschwarz. (B) Im Tumor und in den Tumorrandbereichen konnten die in vitro mittels CM-Dil fluoreszenzmarkierten mesenchymale Stammzellen als hellrot fluoreszierende Zellen (Pfeile) detektiert werden. (Balken: 25  $\mu$ m)

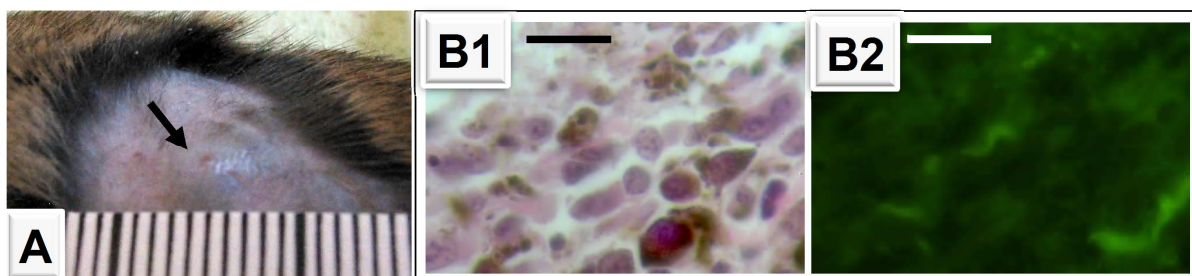
### 3.2.4 Reduktion der Tumorwachstumsförderung bei vorheriger kartilaginärer Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen

Die Tiere aus der Versuchsgruppe B16<sub>ALLO</sub>/MSC-C<sub>EGFP</sub> wurden wie unter 3.2.3 beschrieben behandelt, ausgenommen vom Unterschied der vorherigen kartilaginären Differenzierung der MSC und nachfolgendem molekularbiologischem Nachweis der gesteigerten Expression der knorpeltypischen Markergene Aggrecan (8fach), Kollagen Typ II (11fach) und Sox9 (10fach, siehe auch Seite 44). Es konnte mit dieser Versuchsgruppe gezeigt werden, dass eine kartilaginäre Differenzierung der MSC das

durch die Stammzellen induzierte Tumorstadium signifikant reduziert (p-Wert = 0,022; siehe auch **Tab. 18**). Ein subkutan lokalisierter linsengroßer Tumor war bei 2 von 5 Tieren nach 14 Tagen palpabel. Bei der Sektion wurden auch bei den übrigen 3 Tieren auf die Haut beschränkte kleine punkt- bis fadenförmige schwarze Tumoren mit einem durchschnittlichen Volumen von ca. 56  $\mu\text{l}$  gefunden (**Abb. 17**). Fernmetastasen konnten weder makroskopisch noch mikroskopisch nachgewiesen werden (**Abb. 20**). Unter dem Fluoreszenzmikroskop gab es keinen Anhalt für in den Hauttumor eingewanderte MSC, was einen Verlust der Migrationsfähigkeit der Stammzellen durch die Differenzierung vermuten lässt (**Abb. 17/B2**).

**Tab. 18: Signifikante Reduktion des Tumorstadiums durch kartilaginäre Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen vor Koinjektion im Vergleich zu einer Koinjektion von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen** (Abkürzungen: B16<sub>ALLO</sub> = allogene B16-Melanomzellenapplikation, MSC<sub>EGFP</sub> = Koinjektion von EGFP-transduzierten mesenchymalen Stammzellen, MSC-C<sub>EGFP</sub> = zusätzliche kartilaginäre Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen):

t-Test für zwei unabhängige Stichproben / zweiseitiger Test (gerundete Werte)						
Versuchsgruppe	n	Min. [ $\mu\text{l}$ ]	Max. [ $\mu\text{l}$ ]	Mittelwert [ $\mu\text{l}$ ]	SD [ $\mu\text{l}$ ]	p-Wert ( $\alpha=0,05$ )
B16 <sub>ALLO</sub> /MSC <sub>EGFP</sub>	5	60	250	160	77	<b>0,022</b>
B16 <sub>ALLO</sub> /MSC-C <sub>EGFP</sub>	5	30	105	56	30	
H <sub>A</sub> : Die Differenz zwischen den Mittelwerten ist signifikant verschieden von 0.						



**Abb. 17: Makroskopischer und histologischer Befund eines Hauttumors in der Versuchsgruppe B16<sub>ALLO</sub>/MSC-C<sub>EGFP</sub> vier Wochen nach Behandlung** (Abstand der Teilstriche: 1 mm, Balken: 20  $\mu\text{m}$ , Abkürzungen: B16<sub>ALLO</sub> = allogene B16-Melanomzellenapplikation, MSC-C<sub>EGFP</sub> = Koinjektion von kartilaginär differenzierten und EGFP-transduzierten MSC). (A) Der Primärtumor schimmert schwach dunkelschwarz durch die Haut. (B1) Im HE-Schnitt imponieren die Melanomzellen mit braunem Melaninpigment. (B2) In der Fluoreszenzdarstellung kein Hinweis auf Einwanderung von in vitro durch EGFP-Gen-Transduktion markierten und subkutan applizierten MSC in das Tumorgewebe.

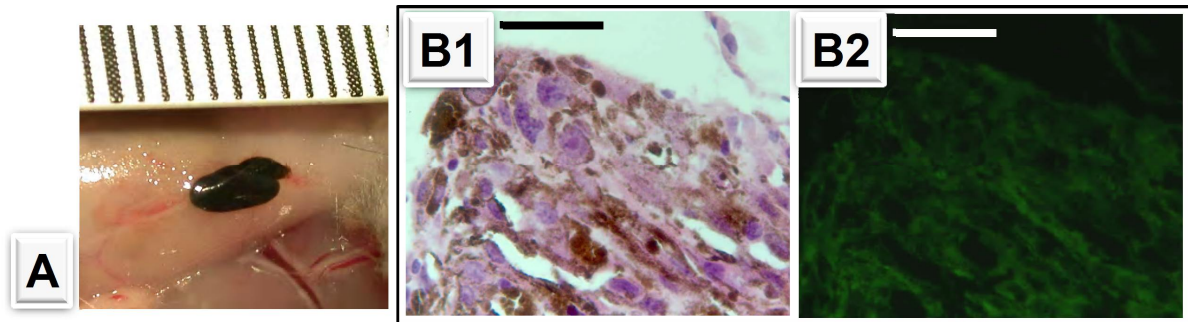


### 3.2.5 Reduziertes Tumorwachstum bei Koimplantation mit avitalen, gefriergetrockneten undifferenzierten MSC

In den bereits erläuterten Positiv-Kontrollgruppen B16<sub>ALLO</sub>/MSC<sub>EGFP</sub> und B16<sub>ALLO</sub>/MSC<sub>CM-DII</sub> wurde eine Migration der undifferenzierten MSC sowohl zu den Primärtumoren als auch Fernmetastasen in den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der histologischen Präparate beobachtet (**Abb. 15** und **Abb. 16**). Zur Ausschaltung der Migrationsfähigkeit der MSC und des damit verbundenen Einflusses auf Tumorwachstum durch Zell-Zell-Kontakt und Zellfusion, die bei in vitro Untersuchungen beschrieben worden sind (Krampera et al., 2003; da Silva Meirelles L et al., 2006), wurden im Folgenden avitale, gefriergetrocknete MSC bei der Versuchsgruppe B16<sub>ALLO</sub>/MSC-AV<sub>EGFP</sub> eingesetzt. Nach der Behandlung der Tiere (siehe **2.2.3.2**) wurden über die gesamte Versuchsdauer keine Hauttumoren getastet. Erst in der Sektion wurde in 3 von 5 Fällen ein linsen- bis reiskorngroßer schwarzer Primärtumor gefunden (**Abb. 18**). Bei der weiteren Organentnahme konnte bei einem Tier eine Fernmetastase am linken Ureter und bei einem zweiten Tier Milz- und Lungenmetastasen entdeckt werden (**Abb. 20**). Die histologische Untersuchung der Primärtumoren, der Metastasen und der restlichen entnommenen Organe ergab keinen Hinweis auf eingewanderte fluoreszenzmarkierte MSC. Das Fehlen von markierten Stammzellen im Bereich des Tumors deutet demnach darauf hin, dass lösliche Faktoren der avitalen mesenchymalen Stammzellen ausreichen, um das Tumorwachstum zu beeinflussen.

**Tab. 19: Kein signifikant erhöhtes Tumorwachstum vier Wochen nach subkutaner Koinjektion von lyophilisierten avitalen mesenchymalen Stammzellen im Vergleich zur Kontrolle ohne Koinjektion** (Abkürzungen: B16<sub>ALLO</sub> = allogene B16-Melanomzellenapplikation, MSC-AV<sub>EGFP</sub> = Koinjektion von avitalen und EGFP-transduzierten mesenchymalen Stammzellen):

t-Test für zwei unabhängige Stichproben / zweiseitiger Test (gerundete Werte)						
Versuchsgruppe	n	Min. [ $\mu$ l]	Max. [ $\mu$ l]	Mittelwert [ $\mu$ l]	SD [ $\mu$ l]	p-Wert ( $\alpha=0,05$ )
B16 <sub>ALLO</sub> /MSC-AV <sub>EGFP</sub>	5	0	74	24	31	<b>0,316</b>
B16 <sub>ALLO</sub> /-	5	0	30	8	13	
H <sub>0</sub> : Die Differenz zwischen den Mittelwerten ist nicht signifikant verschieden von 0.						



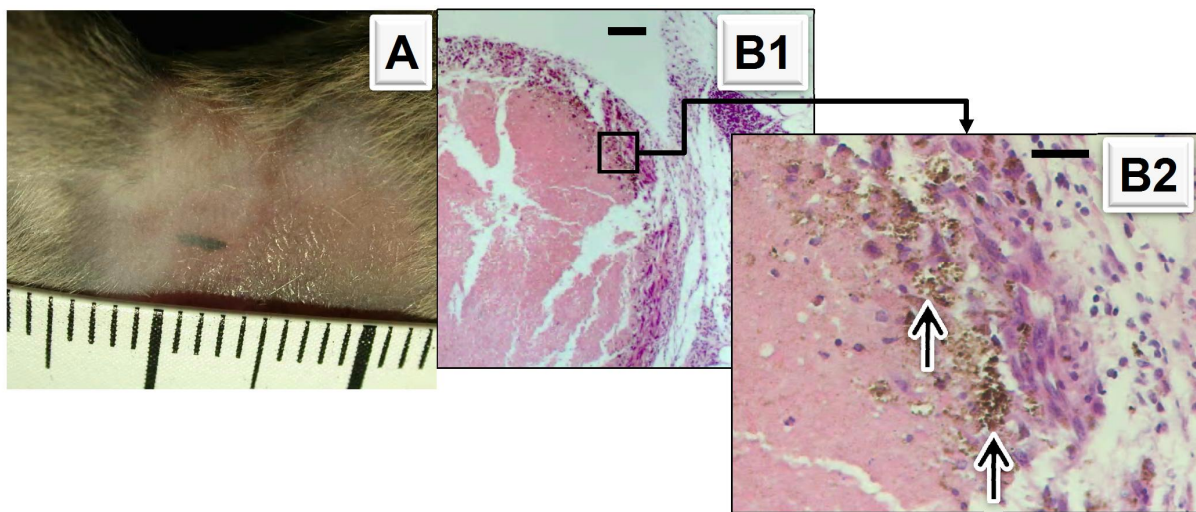
**Abb. 18: Makroskopischer und histologischer Befund eines am Bauchfell lokalisierten Melanoms in der B16<sub>ALLO</sub>/MSC-AV<sub>EGFP</sub> vier Wochen nach Behandlung** (Abstand der Teilstriche: 1 mm, Balken: 25  $\mu$ m, Abkürzungen: MSC-AV<sub>EGFP</sub> = Koinjektion von avitalen und EGFP-transduzierten mesenchymalen Stammzellen, B16<sub>ALLO</sub> = allogene B16-Melanomzellinokulation). (A) Das dunkelschwarze Melanom ohne Satellitenmetastasen. (B1) Im HE-Schnitt imponieren die Melanomzellen mit braunem Melaninpigment. (B2) In der Fluoreszenzdarstellung sind keine durch Transduktion markierte MSC im Bereich des Tumorgewebes detektierbar.

### 3.2.6 Keine Tumorwachstumsstimulation nach Koimplantation von *in vitro* vermehrten nativen Gelenkknorpelzellen

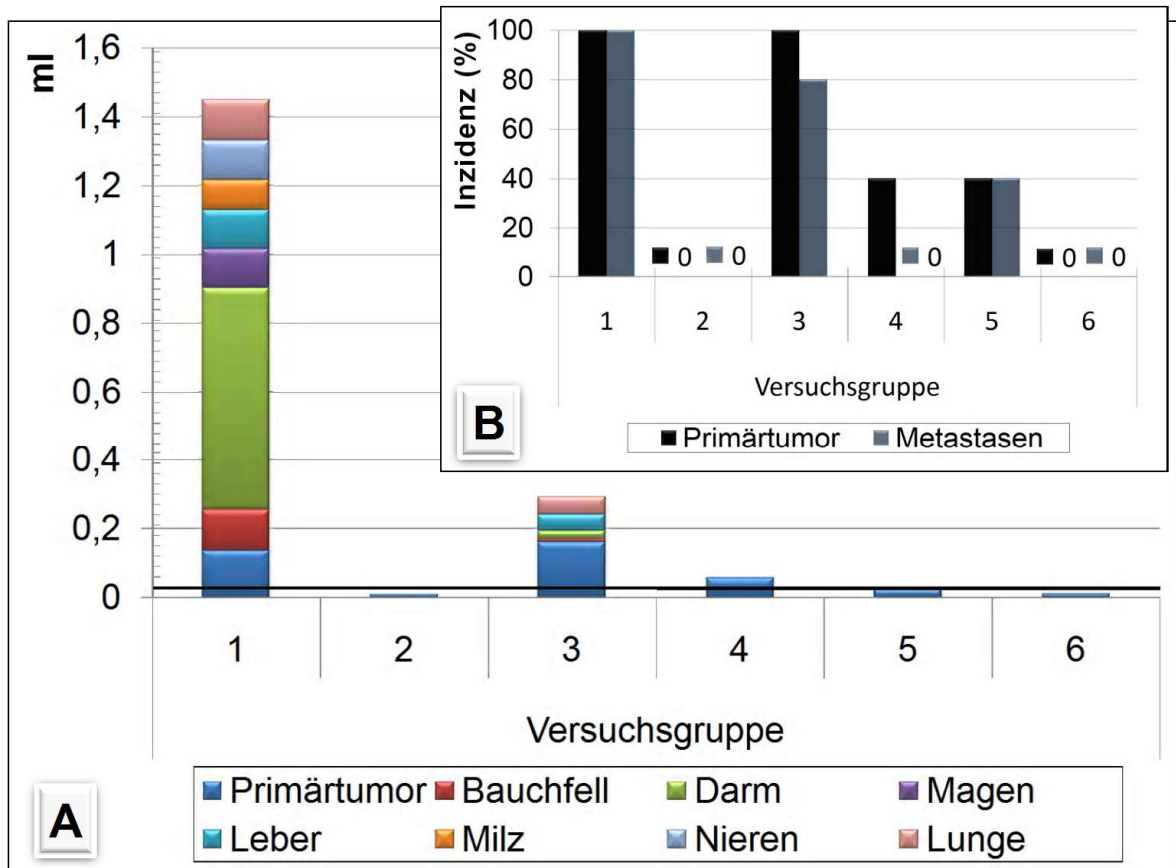
Nachdem in der vorherigen Gruppe unter **3.2.4** ein Rest von Tumorwachstumsförderung bei kartilaginär differenzierten MSC nachgewiesen worden war, erfolgte die Behandlung der Tiere aus der Versuchsgruppe B16<sub>ALLO</sub>/C mit nativen differenzierten Gelenkknorpelzellen. Diesen Tieren wurden allogen 0,5 Mio Melanomzellen in die rechte Leistenregion und 0,5 Mio Gelenkknorpelzellen in die linke Leistenregion als Koinjektion subkutan appliziert. Bei der Untersuchung dieser Tiere wurden über die Versuchsdauer von 4 Wochen keine Tumoren getastet. Die Tiere zeigten auch keine Auffälligkeiten im Verhalten, Allgemein- und Ernährungszustand. In der Sektion fielen bei 3 von 5 Tieren punkt- bis fadenförmige subkutane Tumoren mit einem durchschnittlichen Volumen von 10  $\mu$ l auf (**Abb. 19**). Keines der Primärtumorvolumina überschritt das maximale Tumolvolumen in der Negativ-Kontrollgruppe (B16<sub>ALLO</sub>/-) und damit den Kontrollwert der Tumorwachstumsförderung (**Abb. 20**).

**Tab. 20: Keine Tumorwachstumsförderung nach subkutaner Koinjektion von nativen Gelenkknorpelzellen im Vergleich zur Kontrolle** (Abkürzungen: B16<sub>ALLO</sub> = allogene B16-Melanomzellinokulation, C = Koinjektion von nativen Gelenkknorpelzellen):

t-Test für zwei unabhängige Stichproben / zweiseitiger Test (gerundete Werte)						
Versuchsgruppe	n	Min. [ $\mu$ l]	Max. [ $\mu$ l]	Mittelwert [ $\mu$ l]	SD [ $\mu$ l]	p-Wert ( $\alpha=0,05$ )
B16 <sub>ALLO</sub> /C	5	0	22	9	10	<b>0,486</b>
B16 <sub>ALLO</sub> /-	5	0	30	8	13	
H <sub>0</sub> : Die Differenz zwischen den Mittelwerten ist nicht signifikant verschieden von 0.						



**Abb. 19: Makroskopischer und histologischer Befund eines Malignen Melanoms in der Versuchsgruppe B16<sub>ALLO</sub>/C vier Wochen nach Behandlung** (Abkürzungen: B16<sub>ALLO</sub> = allogene Applikation von B16-Melanomzellen, C = Koinjektion von nativen Gelenkknorpelzellen; Balken: 20  $\mu$ m). (A) Der fadenförmige Tumor erscheint dunkelschwarz durch die Epidermis (Abstand der Teilstriche = 1 mm). (B1) Im HE-Schnitt erscheint ein abgekapselter Melanomtumor mit zentraler Nekrose. (B2) Melanomzellen mit relativ hohem Melaningehalt im Zytoplasma infiltrieren benachbarte Strukturen (Pfeile).



**Abb. 20: Gesamtdarstellung der Tumorinzidenzen und –volumina.** (Versuchsgruppen: 1 = B16<sub>SYN</sub><sup>-/-</sup>, 2 = B16<sub>ALLO</sub><sup>-/-</sup>, 3 = B16<sub>ALLO</sub>/MSC<sub>EGFP</sub>, 4 = B16<sub>ALLO</sub>/MSC-C<sub>EGFP</sub>, 5 = B16<sub>ALLO</sub>/MSC-AV<sub>EGFP</sub>, 6 = B16<sub>ALLO</sub>/C; schwarzer Balken in A: Kontrollwert für stimuliertes Tumorwachstum > 30  $\mu$ l, Primärtumor: subkutaner Melanom).

(A) Mit Ausnahme der Versuchsgruppe, die zusätzlich zu den allogenen Melanomzellen mit nativen Chondrozyten ähnlich wie bei einer autologen Chondrozytentransplantation behandelt wurde (i.e. Versuchsgruppe 6), zeigte sich bei Anwendung von undifferenzierten und chondrogen differenzierten sowie avitalen mesenchymalen Stammzellen (MSC) ein stimuliertes Tumorwachstum (i.e. Versuchsgruppen 3, 4 und 5). Die chondrogene Differenzierung der MSC bewirkte eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums ( $p$ -Wert = 0,022). (B) Bei subkutaner Applikation von chondrogen differenzierten MSC (i.e. 4) waren bei gleicher Tumorinzidenz (40%) anders als nach Gabe von avitalen MSC (i.e. Versuchsgruppe 5) keine Fernmetastasen entstanden.

## 4. DISKUSSION

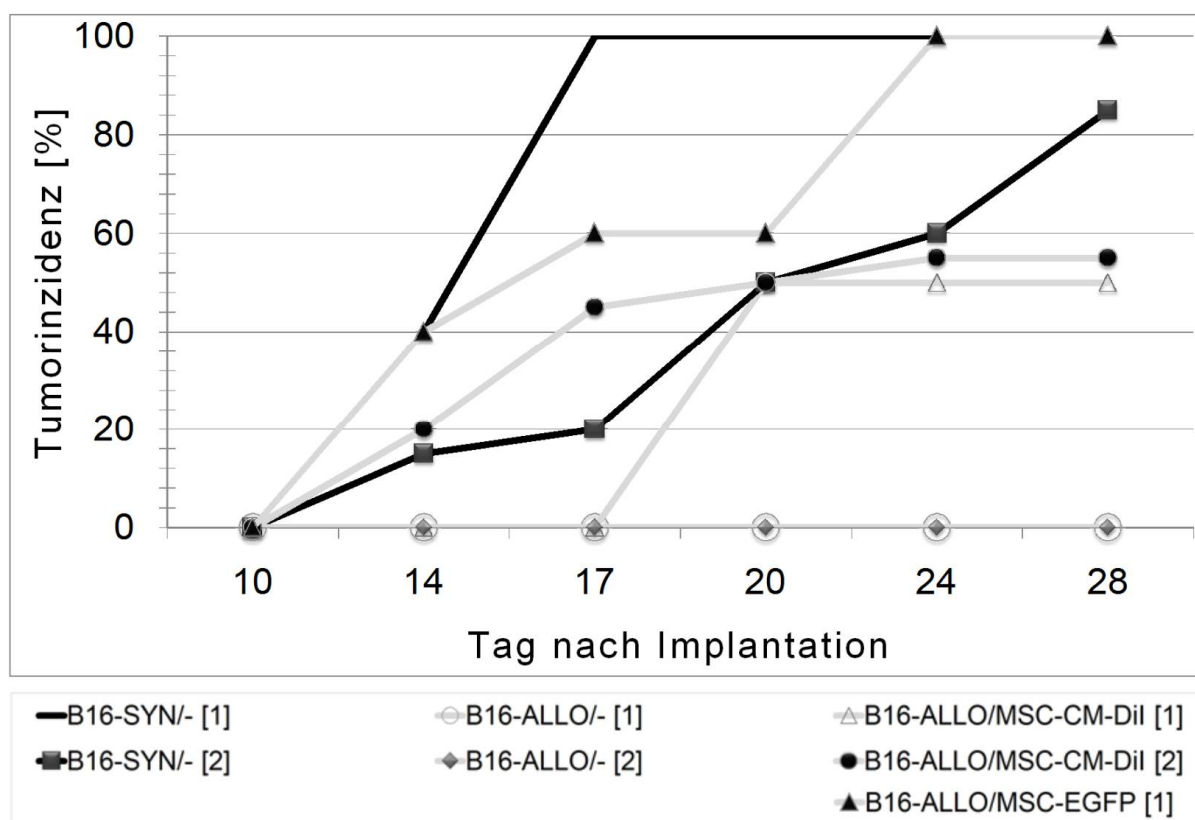
Mesenchymale Stammzellen (MSC) werden aufgrund der relativ einfachen Gewinnung und in-vitro-Expansion für mögliche therapeutische Anwendungen intensiv erforscht und bereits in klinischen Studien vielfältig eingesetzt, nicht nur in der regenerativen Medizin sondern auch in anderen Bereichen wie bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen. Zum einen stellen MSC aufgrund ihrer hohen Differenzierungskapazität für Tissue Engineering eine wichtige Alternative zu embryonalen Stammzellen dar (Morishita T et al., 2006; Krampera M et al., 2006; Tuan RS, 2006; Stosich MS et al., 2007), zum anderen zeichnen sie sich durch ihre immunmodulatorische Wirkung als ein nebenwirkungsarmes sowie potentes Arzneimittel aus. Die genauen Wirkmechanismen der immunmodulatorischen Eigenschaft von MSC sind noch weitgehend unbekannt. Ersten klinischen Studien nach profitieren viele Patienten von einer Anwendung der MSC bei Therapie von Autoimmunerkrankungen sowie Transplantatabstoßungsreaktionen (Villaron EM et al., 2004; Fändrich F et al., 2002; Inoue S et al., 2006; Wekerle und Sykes 1999). Gerade die letzere Eigenschaft wird als eine potentielle Gefahr für Wachstum und Manifestation von latenten Tumoren auch bei Patienten, die mit Transplantaten aus dem Tissue Engineering behandelt werden, diskutiert (Aguilar S et al., 2007; Djouad F et al., 2003; Rubio D et al., 2005; Tolar J et al., 2007). Bei gezielter Immunsuppression toleriert man dieses Risiko zugunsten der Organerhaltung. Im Tissue Engineering werden MSC, die ohnehin vom Patienten stammen und nach autologer Reimplantation in Form eines bioartifiziellen Gewebes keine Abstoßungsreaktion hervorrufen, in erster Linie für reparative bzw. rekonstruktive Zwecke eingesetzt.

Während bei Anwendung von undifferenzierten MSC bei Patienten mit einer Autoimmunerkrankung wie Rheumatoiden Arthritis (RA) die Immunmodulation erwünscht ist, muss dieselbige für differenzierte MSC in Form von in vitro gezüchtetem Transplantatmaterial als eine unerwünschte Wirkung gelten. Im Tierexperiment wurde kürzlich nachgewiesen, dass undifferenzierte MSC das

Tumorwachstum fördern (Djouad F et al., 2003). Das intakte Immunsystem besitzt eine Schlüsselfunktion für die Bekämpfung von entarteten Zellen im Körper (Satzger I et al., 2006; Francis A et al., 1997; Cafferata MA et al., 2004; Horii R et al., 2005). Somit birgt quasi jede Herunterregulation des Immunsystems die Gefahr für ein ungehemmtes Wachstum von latenten Tumoren. Aus diesem Grund bleibt die therapeutische Anwendung von MSC noch limitiert, bis die tumorfördernde Eigenschaft der MSC in vivo verstanden und eine langandauernde Sicherheit bei klinischer MSC-Applikation nachgewiesen worden ist. In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem gleichen Tiermodell untersucht, ob in vitro gezüchtete Knorpelzellen aus MSC oder in vitro vermehrte native Gelenkknorpelzellen wie MSC das Tumorwachstum fördern.

Das Melanom-Tiermodell, bei dem eine subkutane Einzelinjektion von 0,5 Mio Melanomzellen den latenten Tumor im Körper simuliert, konnte in dieser Arbeit anhand der Reproduzierbarkeit von den bisher durchgeführten Versuchsgruppen als verlässlich bestätigt werden (**Abb. 21**). In einem ähnlichen Tiermodell wurde eine tumorfördernde Eigenschaft sowohl von fetalen als auch von adulten MSC nachgewiesen (Zhu W et al., 2006). Hierbei wurden F6 Pankreaskarzinom- und SW480 Kolonkarzinomzellen an Stelle von B16 Melanomzellen, die in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden, verwendet. Zusammen betrachtet lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die stimulatorischen Effekte von MSC auf Tumorwachstum unabhängig der histogenetischen Herkunft der Tumorzellen sind. Eine stark aggressive und hoch metastasierende Eigenschaft der in diesem Tiermodell eingesetzten Melanomzellen ist in der Literatur beschrieben (Nakamura et al., 2002). Trotz ihrer hohen Malignität wurde wiederum in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der gleichen Versuchsgruppe vom Kooperationspartner in Bordeaux (Frau Dr. Danièle Noël, INSERM U475, Montpellier, Frankreich) bei einer allogenen Melanomzellinokulation, d.h. Melanomzellen sind körperfremd und können vom intakten Immunsystem als solche erkannt und zerstört werden, die Tumorinzidenz 0% palpatorisch nachgewiesen. Hingegen betrug bei einer syngenen Melanomzellinokulation, d.h. Melanomzellen sind körpereigen und werden vom Immunsystem nicht bekämpft, die Tumorinzidenz 100% palpatorisch bereits nach 3 Wochen. Anders als bei Djouad et al. (2003) und Zhu W et al. (2006) wurde in der vorliegenden Arbeit für eine genauere Beurteilung des Wachstumsverhaltens vom

subkutan lokalisierten Primärtumor eine Volumenbestimmung des Primärtumors und dessen Fernmetastasen vorgenommen. Folglich konnte man bezogen auf den Primärtumor einen Kontrollwert (30 $\mu$ l) für Tumorwachstumsförderung definieren, ausgehend von der allogenen Negativkontrolle. Tumorumfängen unterhalb des Kontrollwerts können für ein Ausbleiben der tumorfördernden Eigenschaft der eingesetzten Zellen sprechen. Hinweisend auf eine stärkere Immunsuppression mit konsekutiver Tumorwachstumsförderung ist auch die Zahl der entdeckten Fernmetastasen. Die subkutan gesetzten Melanomzellen streuten überwiegend in Darm, Milz, Lunge und Nieren. Dies lässt vermuten, dass die Melanomzellen zum größten Teil lymphogen metastasierten. Ein ähnliches Metastasierungsmuster wurde bereits von Nakamura et al. (2002) beschrieben.



**Abb. 21: Vergleich der Tumorinzidenzen mit vorherigen Studien** (Quellen: [1] vorliegende Arbeit, [2] Djouad et al., 2003; Abkürzungen: B16-SYN und -ALLO= syngene bzw. allogene Melanomzellinokulation; MSC-CM-Dil und MSC-EGFP = subkutane Koinjektion von MSC fluoreszenzmarkiert mit CM-Dil- bzw. EGFP). Es sind keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Tumorinzidenzen festzustellen.

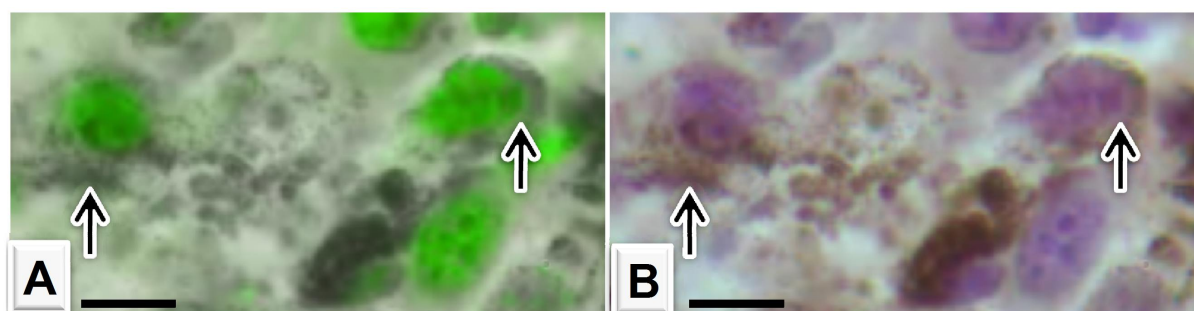
Die Tumorinzidenzen bei gleicher Behandlung der Versuchstiere unterscheidet sich kaum von den bereits durch Djouad et al. (2003) erhaltenen Ergebnissen. Lediglich die in dieser Arbeit vorgenommene stabile retrovirale Fluoreszenzmarkierung (B16<sub>ALLO</sub>/MSC<sub>EGFP</sub>) zeigte eine erhöhte Tumorinzidenz (100%) gegenüber 55% bei zytochemischer Markierung mit CM-Dil (B16<sub>ALLO</sub>/MSC<sub>CM-Dil</sub>).

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit spiegeln die im Tierexperiment nachgewiesene ca. 200fach stärkere Wirkung von undifferenzierten MSC im Vergleich zu dem Immunsuppressivum Cyclosporin A wider (Le Blanc et al., 2004). Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Tiermodell hinreichend für die Untersuchung einer Tumorstromaförderung geeignet war, konnten die undifferenzierten MSC daraufhin näher untersucht werden. Hierbei wurde zugleich festgestellt, dass die für Fluoreszenzmarkierung retroviral transduzierten MSC etwas stärker als die zytochemisch fluoreszenzmarkierten MSC das Tumorstromaförderung fördern (siehe **3.2.3.1**). In der Literatur bisher nicht beschriebene Hauterkzeme (Inzidenz = 50%) im Bereich der Injektionsstelle der zytochemisch mit CM-Dil fluoreszenzmarkierten MSC können mitunter für den Unterschied zwischen den beiden vom Differenzierungsgrad her gleichen MSC verantwortlich sein. Die retrovirale Fluoreszenzmarkierung der MSC kann zwar neben den zahlreichen Vorteilen wie stabilere Markierung und bessere Fluoreszenzmikroskopierbarkeit auch Nachteile wie veränderte Genexpression und Kontamination mit viralen Partikeln beinhalten; sie wurde aber als effektiver eingestuft, weil sie stabil und in den histologisch aufbereiteten Schnitten besser detektierbar war, keine erkennbare Änderung der Zellmorphologie und –proliferation verursachte und keine entzündliche Reaktionen auf die subkutane Injektion der damit markierten MSC beobachtet wurde.

Die MSC weisen ein charakteristisches Migrationsverhalten auf sowohl nach systemischer als auch subkutaner Applikation (Gao J et al., 2001; Djouad et al. 2003). Sie wandern vor allem zu Geweben mit hohem Zellumsatz (i.e. Schleimhäute, Knochenmark und Tumoren). Die subkutan applizierten undifferenzierten MSC wurden in großer Zahl in der unmittelbaren Umgebung und innerhalb des Primärtumors und dessen Fernmetastasen fluoreszenzmikroskopisch detektiert (**Abb. 16**). Djouad et al. (2003) entdeckten die mit CMDil fluoreszenzmarkierten



undifferenzierten MSC als einen Saum am Tumorrand. Die histologischen und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit hingegen ergaben, dass die undifferenzierten MSC nicht nur am Tumorrand sondern auch zwischen den Melanomzellen innerhalb des Tumors zu liegen kommen. Man konnte zugleich auch Hinweise auf eine Zellfusion zwischen MSC und den Melaninpigment-haltigen Melanomzellen erkennen (**Abb. 22**).



**Abb. 22: Hinweis auf Zellfusion zwischen Melanomzellen und undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen in vivo.** Subkutaner Primärtumor (Balken = 20  $\mu\text{m}$ ).

(A) Fluoreszenzmikroskopische Detektion von MSC. (B) Im HE-Schnitt lassen sich dieselben MSC als Melaninpigment-haltige Zellen darstellen (Pfeile).

Eine Tumorzell-Stammzellfusion wurde bereits mehrfach beobachtet und ist Gegenstand aktueller Krebsforschung (da Silva Meirelles L et al., 2006; Kallifatidis G et al., 2008). So können sich MSC zukünftig eventuell als Vehikel eignen, die retroviral so manipuliert sind, dass sie antineoplastische Zytokine wie TNF $\alpha$  und Interleukin-12 direkt in Tumoren produzieren und das Tumorstadium so reduzieren (Elzaouk L et al., 2006).

Die histologische Untersuchung größerer Organe wie Knochenmark, Gehirn, Lunge, Darm etc. (**Tab. 13**) ergab in der vorliegenden Arbeit bei eingeschränkten Untersuchungsverhältnissen wegen Autofluoreszenz keinen Nachweis von fluoreszenzmarkierten MSC in diesen Organen. Daher ist es anzunehmen, dass bei subkutaner Injektion die undifferenzierten MSC größtenteils den kürzeren und direkten Weg zu den ebenfalls in einer Distanz von ca. 3 cm subkutan inokulierten Melanomzellen genommen haben.

Außer einer direkten zellvermittelten Immunmodulation durch MSC kommen hierfür auch lösliche Faktoren in Frage, die von den MSC parakrin abgegeben werden (Krampera et al., 2003). Durch in vitro Experimente konnte man nachweisen, dass eine Hemmung der Proliferation von Immunzellen auch ohne Zellkontakt möglich war (Di Nicola et al., 2002). Inwieweit die Migration der MSC in den Tumor für das erhöhte Tumorstadium notwendig sein könnte, wurde in der vorliegenden Arbeit mit Applikation von gefriergetrockneten avitalen MSC untersucht. Hierbei war eine nicht signifikante Tumorstadiumsförderung nachweisbar, die als eine Wirkung durch lösliche Faktoren im Lyophilisat anzunehmen ist (**Abb. 21**). Die verminderte Tumorstadiumsförderung durch avitale MSC könnte auch auf eine geringere Konzentration entsprechender löslicher Faktoren zurückgeführt werden, da im Vergleich dazu bei der Injektion von vitalen MSC die Zellen weiterhin über die Versuchsdauer von vier Wochen stark proliferieren. Die genauen Mechanismen der Immunmodulation auf zellulärer und parakriner Ebene werden derzeit von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht (Rasmussen I et al., 2007; Xu G et al., 2007).

Für die regenerative Medizin finden die undifferenzierten MSC im Zelllabor Verwendung, so dass im Idealfall transplantierte Patienten ein Gewebe bzw. Organ aus gut differenzierten MSC erhalten. Diese Situation konnte mit in vitro gezüchteten Knorpelzellen, die aus zuvor fluoreszenzmarkierten MSC stammen, simuliert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beinhalten zum einen kleinere Primärtumorstadiummoleküle ohne Fernmetastasierung und zum anderen kein Nachweis von fluoreszierenden MSC-Chondrozyten weder innerhalb noch im Umfeld des Primärtumors. Die Gesamtheit dieser Erkenntnisse kann bedeuten, dass das Migrationsverhalten und die Tumorstadiumsförderung stark an den Differenzierungsgrad der MSC gebunden ist. Insgesamt war die Tumorstadiumsförderung durch in vitro gezüchteten Knorpelzellen (MSC-C) nicht signifikant erhöht, ähnlich wie für gefriergetrocknete avitale MSC. Weshalb auch in diesem Fall lösliche Faktoren, die trotz der guten Differenzierung immer noch von den MSC-C gebildet werden könnten, in Frage kommen. Untersuchungen zur Genexpression von MSC unterschiedlichen Differenzierungsgrades wiesen eine Instabilität bei in-vitro-Kultivierungen nach (Miura M et al., 2006). Desweiteren kann auch die Umgebung der MSC-C einen entscheidenden Einfluss auf Integrität und

Stabilität der subkutan implantierten MSC-C ausüben. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten dieses Phänomen der Präkonditionierung von MSC durch die Mikroumgebung bzw. „Stammzellnische“ beobachten (Mazhari R et al., 2007; Gregory CA et al., 2006). Aus diesem Grund könnten weitere Tierversuche mit einem modifizierten Maus-Tumormodell, bei dem die MSC-C intraartikulär gegeben würden, entscheidende Ergebnisse liefern.

Die Autologe Chondrozyten-Transplantation (ACT) befindet sich bereits seit Jahrzehnten in klinischer Anwendung (Brittberg et al., 1994). Hierbei werden die Transplantate aus patienteneigenen Gelenkknorpelzellen gewonnen und nach in-vitro-Expansion mit sehr viel Erfolg zur Behebung von Gelenkknorpeldefekten implantiert. Von einigen Arbeitsgruppen war eine in-vitro-Dedifferenzierung der nativen Gelenkknorpelzellen beschrieben (Kurz B et al., 2004; Kisiday J et al., 2002; Domm C et al., 2002); danach könnten sie MSC-ähnliche Eigenschaften annehmen. Im Maus-Tumormodell konnte die gleiche Situation wie bei einer ACT simuliert werden, mit Ausnahme der subkutanen Gabe der Gelenkknorpelzellen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass von den im Rahmen der ACT gewonnen Transplantaten zur Behandlung von Gelenkknorpeldefekten keine nachweisbare Tumorstufungsförderung ausgeht. So wiesen Langzeitstudien zum postoperativen Verlauf nach ACT-Behandlung auf andere Komplikationen als eine erhöhte Inzidenz von Tumorerkrankungen hin (Brittberg et al., 1994). Die gefürchteten Komplikationen wie Transplantatverlust, mechanische Instabilität und chronische Schmerzen können inzwischen durch die schrittweise Modifikation der ACT in den meisten Fällen vermieden werden. Die Quote guter und sehr guter klinischer Ergebnisse liegt nach 2 bis 10 Jahren bei 90%. Nur in einem Punkt wird die ACT möglicherweise der Transplantation von MSC-Produkten unterlegen sein: Für die ACT muss man in einer ersten OP dem Patienten gesunden Knorpel entnehmen, wobei man zugleich eine iatrogene Läsion setzt. Die MSC hingegen ließen sich aus dem peripheren Blut gewinnen, in vitro zu Knorpelzellen züchten und später in einen Gelenkknorpeldefekt implantieren. Die Ergebnisse der ersten veröffentlichten prospektiven Kohortenstudien hierzu sind sehr erfolgsversprechend (Peterson L et al., 2000/2002; Browne JE et al., 2005; Knudsen G et al., 2007).

Die adulten MSC sind momentan ein beliebtes Forschungsobjekt in der Biotechnologie im Dienste der Gesundheit. In Zukunft könnte man sich vorstellen, dass die immunmodulatorische Funktion der MSC durch die bereits oben erwähnte retrovirale Manipulation gänzlich unterbunden werden kann. Die Tendenz geht auch dahin, die hochspezifische Affinität der MSC zu Tumorzellen für eine mögliche Immunokrebstherapie auszunutzen. Wobei die MSC als Vehikel für antineoplastische Faktoren dienen. Dann würde man auch erhoffen, durch eine ähnliche retrovirale Transduktion die MSC vor Anwendung im Tissue Engineering prophylaktisch mit antitumorösen Chemokinen auszustatten. Auf diese Weise würde man, falls die Immunsuppression unerwünscht ist und die MSC für reparative Zwecke eingesetzt werden, den Patienten die Angst vor erhöhtem Krebsrisiko minimieren.

Ein erhöhtes Tumorrisiko durch Tissue Engineering konnte mit der vorliegenden Arbeit anhand des Maus-Tumormodells nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse aus diesen Tierexperimenten zeigen, dass im Gegensatz zu undifferenzierten MSC bei Anwendung von MSC-Chondrozyten, die durch Tissue Engineering gewonnen werden können, kein signifikant erhöhtes Risiko für Wachstumsförderung und Manifestation von latenten Tumoren zu erwarten ist. Bei therapeutischer Anwendung von undifferenzierten MSC zu immunmodulatorischen Zwecken in der Transplantationsmedizin und Rheumatologie sollten jedoch die Patienten über das erhöhte Risiko einer möglichen Manifestation von latenten Tumoren aufgeklärt werden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Gewebezüchtung aus mesenchymalen Stammzellen (MSC) wird im Rahmen des Tissue Engineering auf breiter Front entwickelt. Erste Verfahren befinden sich bereits in der klinischen Anwendung. Die Vermutung über ein begleitendes Tumorrisiko für die Patienten stand lange im Raum und konnte nun erstmals für undifferenzierte MSC von zwei Arbeitsgruppen aus Frankreich und Japan im Tierversuch bestätigt werden. Diese unerwünschte Wirkung wurde auf die immunsuppressiven Effekte der MSC, die in vitro gezeigt werden konnten, zurückgeführt.

Mit der vorliegenden Arbeit wurden die Tumorrisiken durch das Tissue Engineering mit MSC sowie bei Anwendung von nativen Knorpelzellen, welche im Rahmen einer Autologen Chondrozyten Transplantation (ACT) eingesetzt werden, im gleichen Tiermodell weiter untersucht. Im ersten Schritt wurden das Melanom-Tiermodell und eine stabile Fluoreszenzmarkierung der vitalen MSC durch Enhanced-Green-Fluorescent-Protein(EGFP)-Gen-Transduktion im Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel etabliert. Bei dem Melanom-Tiermodell werden autologe MSC bzw. Knorpelzellen und homologe Melanomzellen als subkutane Koinjektion in die kontralateralen Leisten der Maus (Abstand: ca. 3 cm) appliziert. Nach einer Versuchsdauer von vier Wochen werden Anzahl und Volumina des subkutan gesetzten Primärtumors und seiner Fernmetastasen bestimmt, um eine Tumorstadiumsförderung durch die parallele Gabe von MSC bzw. Knorpelzellen zu messen. Die Fluoreszenzmarkierung durch retrovirale EGFP-Gen-Transduktion zeigte über die Versuchsdauer von vier Wochen eine hervorragende Detektierbarkeit der markierten MSC in den histologischen Schnitten und wurde daher für weitere Untersuchungen genutzt. Eine potentielle Änderung des Syntheseverhaltens der transduzierten MSC wurde in Kauf genommen, da die vergleichend durchgeführte zytochemische Fluoreszenzmarkierung mit CM-Dil neben der Problematik der Autofluoreszenz auch eine lokale Entzündung im Bereich der Injektionsstelle hervorrief. Mit dem Melanom-Tiermodell konnte nach Bestimmung von Anzahl und Volumina der subkutanen Primärtumoren und ihrer Fernmetastasen gezeigt werden,

dass undifferenzierte MSC das Tumorwachstum signifikant positiv beeinflussen ( $p$ -Wert = 0,01) und die Ergebnisse der oben erwähnten Arbeitsgruppen bestätigt werden. Nach einer vorherigen kartilaginären Differenzierung der MSC (Kultivierung in 3-dimensionalen Kultursystemen unter Zusatz von Wachstumsfaktoren) wurde die Tumorwachstumsförderung durch diese Zellen signifikant reduziert ( $p$ -Wert = 0,022). Eine Zell-Migration der MSC zu den gefundenen Tumoren und Fernmetastasen konnte lediglich für die undifferenzierten MSC gezeigt werden. Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden in größerer Dichte innerhalb und am Tumorrand detektiert. Eine weitere Abwanderung dieser Zellen in andere Organe, die vom Tumor nicht befallen waren, war nicht zu entdecken. Durch die Anwendung von avitalen, gefriergetrockneten und undifferenzierten MSC wurde nachgewiesen, dass bei vollständiger Unterbindung der Migrationsfähigkeit nur noch eine nicht signifikante ( $p$ -Wert = 0,316) Reststimulation des Tumorwachstums existiert; diese könnte auf lösliche Faktoren im Lyophilisat zurückgeführt werden. Ein Zell-Zell-Kontakt zwischen MSC und Tumorzellen scheint somit für die Tumorwachstumsförderung wichtig zu sein.

Seit mehr als 20 Jahren werden Patienten mit isolierten Gelenknorpeldefekten im Rahmen einer ACT behandelt. Dazu wird dem Patienten eine Knorpelprobe entnommen und im Labor die Knorpelzellen herausgelöst, vermehrt und später der Gelenknorpeldefekt mit der Knorpelzellmasse repariert. Im Melanom-Tiermodell wurden daher auch native Knorpelzellen, die in ähnlicher Weise wie für eine ACT gewonnen wurden, auf Beeinflussung des Tumorwachstums hin untersucht. Von den nativen Knorpelzellen ging jedoch keine signifikante Tumorwachstumsförderung aus ( $p$ -Wert = 0,486).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass die tumorfördernden Effekte der MSC an ihren Differenzierungsgrad gekoppelt sind. Somit sollten die Differenzierungsprozesse der MSC im Sinne des Tissue Engineering intensiv erforscht werden, um ein funktionales und nicht immunsupprimierendes Gewebe züchten und eine gute Patientensicherheit gewährleisten zu können. Von differenzierten Zellen, wie die Knorpelzellen der ACT, scheint kein entsprechendes Gefahrenpotential auszugehen.

## 6. SUMMARY

Treatment of articular cartilage defects is still a major problem due to the very limited healing capacity of this tissue. Implantation of autologous chondrocytes (AC) is a very promising option, but problems with cell harvesting and dedifferentiation or the donor age limit the outcome of this treatment. Therefore, mesenchymal stem cells (MSC) gain much interest because of their simple isolation and multipotential differentiation capacity along with their significant immunosuppressive properties. The latter could promote good engraftment of implanted cells, but might also introduce tumor manifestation as described for immunosuppressants. Therefore, this study investigates the influence of undifferentiated and chondrogenically differentiated MSC as well as AC on tumor growth and metastasis formation in a murine melanoma model. 5 mice/group were treated with coinjection of allogeneic melanoma cells and either syngeneic MSC (C3H10T1/2, transduced with enhanced green fluorescent protein gene for cell tracking) or AC at a distance of about 3 cm into the contra lateral groins, and evaluated macroscopically and histologically after four weeks. Undifferentiated MSC migrated to the tumor site and induced strong tumor growth and metastasis formation. If avital MSC were injected, there still was an insignificant tumor growth promotion with reduced metastasis formation (although no MSC were detectable at the tumor site). Chondrogenically differentiated MSC did also not migrate and had a significantly lower impact on tumor incidence, growth and metastasis formation. AC had no measurable influence on the melanoma cells. Our data suggest that differentiation of MSC reduces MSC-dependent promotion of latent tumors after application. This is supported by the fact that native AC do not introduce any increased risk for tumor promotion. The question of how far MSC should be differentiated prior to clinical application needs to be addressed in further studies.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

**Aguilar S, Nye E, Chan J, Loebinger M, Spencer-Dene B, Fisk N, Stamp G, Bonnet D, Janes SM.** Murine but not human mesenchymal stem cells generate osteosarcoma-like lesions in the lung. *Stem Cells*. 2007 Jun;25(6):1586-94.

**Arai S, Klingemann HG.** Hematopoietic stem cell transplantation: bone marrow vs. mobilized peripheral blood. *Arch Med Res*. 2003 Nov-Dec;34(6):545-53.

**Arinze TL, Tran T, Mcalary J, Daculsi G.** A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. *Biomaterials*. 2005 Jun;26(17):3631-8.

**Barbero A, Ploegert S, Heberer M, Martin I.** Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2003 May;48(5):1315-25.

**Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R.** Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002 Jan;30(1):42-8.

**Bartsch G, Yoo JJ, De Coppi P, Siddiqui MM, Schuch G, Pohl HG, Fuhr J, Perin L, Soker S, Atala A.** Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors. *Stem Cells Dev*. 2005 Jun;14(3):337-48.

**Bartunek J, Croissant JD, Wijns W, Gofflot S, de Lavareille A, Vanderheyden M, Kaluzhny Y, Mazouz N, Willemsen P, Penicka M, Mathieu M, Homsy C, De Bruyne B, McEntee K, Lee IW, Heyndrickx GR.** Pretreatment of adult bone marrow mesenchymal stem cells with cardiomyogenic growth factors and repair of the



chronically infarcted myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Feb;292(2):H1095-104.

**Beier HM.** Zum Sinn des Klonens: Die Erkenntnisse über natürliche und experimentelle Totipotenz ebnet den Weg für neue Perspektiven in der Transplantationsmedizin. *Nova Acta Leopoldina NF* 83, 318, 37-54.

**Blattman JN, Greenberg PD.** Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science.* 2004 Jul 9;305(5681):200-5.

**Brentjens RJ, Latouche JB, Santos E, Marti F, Gong MC, Lyddane C, King PD, Larson S, Weiss M, Rivière I, Sadelain M.** Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med.* 2003 Mar;9(3):279-86.

**Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L.** Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1994 Oct 6;331(14):889-95.

**Brown SL, Greene MH, Gershon SK, Edwards ET, Braun MM.** Tumor necrosis factor antagonist therapy and lymphoma development: twenty-six cases reported to the Food and Drug Administration. *Arthritis Rheum.* 2002 Dec;46(12):3151-8.

**Browne JE, Anderson AF, Arciero R, Mandelbaum B, Moseley JB Jr, Micheli LJ, Fu F, Erggelet C.** Clinical outcome of autologous chondrocyte implantation at 5 years in US subjects. *Clin Orthop Relat Res.* 2005 Jul;(436):237-45.

**Brüstle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, McKay RD.** Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science.* 1999 Jul 30;285(5428):754-6.

**Cafferata MA, Chiaramondia M, Monetti F, Ardizzoni A.** Complete spontaneous remission of non-small-cell lung cancer: a case report. *Lung Cancer.* 2004 Aug;45(2):263-6.

**Caplan AI.** Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng.* 2005 Jul-Aug;11(7-8):1198-211.

**Chen J, Wang C, Lü S, Wu J, Guo X, Duan C, Dong L, Song Y, Zhang J, Jing D, Wu L, Ding J, Li D.** In vivo chondrogenesis of adult bone-marrow-derived autologous mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res.* 2005 Mar;319(3):429-38.

**Chen SS, Revoltella RP, Papini S, Michelini M, Fitzgerald W, Zimmerberg J, Margolis L.** Multilineage differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells in three-dimensional culture systems. *Stem Cells.* 2003;21(3):281-95.

**Croitoru-Lamoury J, Williams KR, Lamoury FM, Veas LA, Ajami B, Taylor RM, Brew BJ.** Neural transplantation of human MSC and NT2 cells in the twitcher mouse model. *Cytotherapy.* 2006;8(5):445-58.

**da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB.** Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006 Jun 1;119(Pt 11):2204-13.

**De Bari C, Dell'Accio F, Vanlauwe J, Eyckmans J, Khan IM, Archer CW, Jones EA, McGonagle D, Mitsiadis TA, Pitzalis C, Luyten FP.** Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum.* 2006 Apr;54(4):1209-21.

**De Kok IJ, Drapeau SJ, Young R, Cooper LF.** Evaluation of mesenchymal stem cells following implantation in alveolar sockets: a canine safety study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005 Jul-Aug;20(4):511-8.

**de la Fuente R, Abad JL, García-Castro J, Fernández-Miguel G, Petriz J, Rubio D, Vicario-Abejón C, Guillén P, González MA, Bernad A.** Dedifferentiated adult articular chondrocytes: a population of human multipotent primitive cells. *Exp Cell Res.* 2004 Jul 15;297(2):313-28.

**Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM.** Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3838-43.

**Djouad F, Pience P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noël D, Jorgensen C.** Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*. 2003 Nov 15;102(10):3837-44.

**Domm C, Schünke M, Christesen K, Kurz B.** Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate culture under low oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002 Jan;10(1):13-22.

**Donovan PJ, Stott D, Cairns LA, Heasman J, Wylie CC.** Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell*. 1986 Mar 28;44(6):831-8.

**El-Badri NS, Maheshwari A, Sanberg PR.** Mesenchymal stem cells in autoimmune disease. *Stem Cells Dev*. 2004 Oct;13(5):463-72.

**Elfenbein GJ, Sackstein R, Oblon DJ.** Do G-CSF mobilized, peripheral blood-derived stem cells from healthy, HLA-identical donors really engraft more rapidly than do G-CSF primed, bone marrow-derived stem cells? No! *Blood Cells Mol Dis*. 2004 Jan-Feb;32(1):106-11.

**Elzaouk L, Moelling K, Pavlovic J.** Anti-tumor activity of mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse melanoma model. *Exp Dermatol*. 2006 Nov;15(11):865-74.

**Engelhard VH, Bullock TN, Colella TA, Sheasley SL, Mullins DW.** Antigens derived from melanocyte differentiation proteins: self-tolerance, autoimmunity, and use for cancer immunotherapy. *Immunol Rev*. 2002 Oct;188:136-46.

**ESchG vom 13.12.1990.** Gesetz zum Schutz von Embryonen (Embryonenschutzgesetz - ESchG). Geltung ab 01.01.1991. G. v. 13.12.1990 BGBl. I S. 2746; zuletzt geändert durch Artikel 22 G. v. 23.10.2001 BGBl. I S. 2702.

**Fändrich F, Lin X, Chai GX, Schulze M, Ganten D, Bader M, Holle J, Huang DS, Parwaresch R, Zavazava N, Binas B.** Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. *Nat Med.* 2002 Feb;8(2):171-8.

**Fändrich F, Ruhnke M, Dresske B, Kremer B.** Tolerance-inducing strategies in transplantation surgery-current status and perspectives. *Langenbecks Arch Surg.* 2004 Feb;389(1):60-6.

**Francis A, Temple JG, Hallissey MT.** Spontaneous resolution of histologically proven liver metastases from colorectal cancer. *Br J Surg.* 1997 Jun;84(6):818.

**Freitas CS, Dalmau SR.** Multiple sources of non-embryonic multipotent stem cells: processed lipoaspirates and dermis as promising alternatives to bone-marrow-derived cell therapies. *Cell Tissue Res.* 2006 Sep;325(3):403-11.

**Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP.** Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968 Mar;6(2):230-47.

**Fulchiero GJ Jr, Salvaggio H, Drabick JJ, Staveley-O'Carroll K, Billingsley EM, Marks JG, Helm KF.** Eruptive latent metastatic melanomas after initiation of antitumor necrosis factor therapies. *J Am Acad Dermatol.* 2007 May;56(5 Suppl):S65-7.

**Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP.** Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med.* 1996 Oct;2(10):1096-103. Erratum in: *Nat Med* 1996 Nov;2(11):1267.

**Gao J und Caplan AI.** Mesenchymal stem cells and tissue engineering for orthopaedic surgery. *Chir Organi Mov* 2003 Jul-Sep;88(3):305-16.

**Gao J, Dennis JE, Solchaga LA, Awadallah AS, Goldberg VM, Caplan AI.** Tissue-engineered fabrication of an osteochondral composite graft using rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* 2001 Aug;7(4):363-71.

**Götherström C, Ringdén O, Westgren M, Tammik C, Le Blanc K.** Immunomodulatory effects of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant.* 2003 Aug;32(3):265-72. Erratum in: *Bone Marrow Transplant.* 2004 Jun;33(11):1167.

**Gojo S, Gojo N, Takeda Y, Mori T, Abe H, Kyo S, Hata J, Umezawa A.** In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* 2003 Aug 1;288(1):51-9.

**Gos M, Miloszezewska J, Swoboda P, Trembacz H, Skierski J, Janik P.** Cellular quiescence induced by contact inhibition or serum withdrawal in C3H10T1/2 cells. *Cell Prolif.* 2005 Apr;38(2):107-16.

**Groh V, Wu J, Yee C, Spies T.** Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature.* 2002 Oct 17;419(6908):734-8.

**Gregory CA, Reyes E, Whitney MJ, Spees JL.** Enhanced engraftment of mesenchymal stem cells in a cutaneous wound model by culture in allogenic species-specific serum and administration in fibrin constructs. *Stem Cells.* 2006 Oct;24(10):2232-43.

**Hansen U, Schünke M, Domm C, Ioannidis N, Hassenpflug J, Gehrke T, Kurz B.** Combination of reduced oxygen tension and intermittent hydrostatic pressure: a useful tool in articular cartilage tissue engineering. *J Biomech.* 2001 Jul;34(7):941-9.

**Heike T, Nakahata T.** Stem cell plasticity in the hematopoietic system. *Int J Hematol.* 2004 Jan;79(1):7-14.

**Horii R, Akiyama F, Kasumi F, Koike M, Sakamoto G.** Spontaneous "healing" of breast cancer. *Breast Cancer*. 2005;12(2):140-4.

**Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD, McCarville ME, Orchard PJ, Pyeritz RE, Brenner MK.** Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood*. 2001 Mar 1;97(5):1227-31.

**Inoue S, Popp FC, Koehl GE, Piso P, Schlitt HJ, Geissler EK, Dahlke MH.** Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. *Transplantation*. 2006 Jun 15;81(11):1589-95.

**Kallifatidis G, Beckermann BM, Groth A, Schubert M, Apel A, Khamidjanov A, Ryschich E, Wenger T, Wagner W, Diehlmann A, Saffrich R, Krause U, Eckstein V, Mattern J, Chai M, Schütz G, Ho AD, Gebhard MM, Büchler MW, Friess H, Büchler P, Herr I.** Improved lentiviral transduction of human mesenchymal stem cells for therapeutic intervention in pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther*. 2008 Jan 18;[Epub ahead of print].

**Kato Y, Rideout WM 3rd, Hilton K, Barton SC, Tsunoda Y, Surani MA.** Developmental potential of mouse primordial germ cells. *Development*. 1999 May;126(9):1823-32.

**Keilhoff G, Gohl A, Stang F, Wolf G, Fansa H.** Peripheral nerve tissue engineering: autologous Schwann cells vs. transdifferentiated mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*. 2006 Jun;12(6):1451-65.

**Kim D, Gu Y, Ishii M, Fujimiya M, Qi M, Nakamura N, Yoshikawa T, Sumi S, Inoue K.** In vivo functioning and transplantable mature pancreatic islet-like cell clusters differentiated from embryonic stem cell. *Pancreas*. 2003 Aug;27(2):e34-41.

**Kim JH, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sánchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R.** Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*. 2002 Jul 4;418(6893):50-6.

**Kisiday J, Jin M, Kurz B, Hung H, Semino C, Zhang S, Grodzinsky AJ.** Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jul 23;99(15):9996-10001.

**Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Mitsuyama H, Nakamura H, Katoh M, Ishiguro N.** Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis--a preliminary result of three cases. *Bone.* 2004 Oct;35(4):892-8.

**Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, Grøntvedt T, Isaksen V, Ludvigsen TC, Roberts S, Solheim E, Strand T, Johansen O.** A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. *J Bone Joint Surg Am.* 2007 Oct;89(10):2105-12.

**Kolf CM, Cho E, Tuan RS.** Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(1):204.

**Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F.** Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood.* 2003 May 1;101(9):3722-9.

**Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M.** Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone.* 2006 Oct;39(4):678-83.

**Kurz B, Domm C, Jin M, Sellickau R, Schünke M.** Tissue engineering of articular cartilage under the influence of collagen I/III membranes and low oxygen tension. *Tissue Eng.* 2004 Jul-Aug;10(7-8):1277-86.

**Labosky PA, Barlow DP, Hogan BL.** Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines. *Development.* 1994 Nov;120(11):3197-204.

**Landis WJ, Jacquet R, Hillyer J, Zhang J, Siperko L, Chubinskaya S, Asamura S, Isogai N.** The potential of tissue engineering in orthopedics. *Orthop Clin North Am.* 2005 Jan;36(1):97-104.

**Le Blanc K.** Mesenchymal stromal cells: Tissue repair and immune modulation. *Cytotherapy* 2006;8(6):559-61.

**Le Blanc K, Pittenger M.** Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy* 2005;7(1):36-45.

**Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O.** Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 2004 May 1;363(9419):1439-41.

**Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringdén O.** Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol.* 2003 Jan;57(1):11-20.

**Magliocca JF, Held IK, Odorico JS.** Undifferentiated murine embryonic stem cells cannot induce portal tolerance but may possess immune privilege secondary to reduced major histocompatibility complex antigen expression. *Stem Cells Dev.* 2006 Oct;15(5):707-17.

**Marincola FM.** The multiple ways to tumor tolerance. *J Immunother* (1997). 1997 May;20(3):178-9.

**Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL.** Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell.* 1992 Sep 4;70(5):841-7.

**Mazhari R, Hare JM.** Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007 Feb;4 Suppl 1:S21-6.

**Ménard C, Hagège AA, Agbulut O, Barro M, Morichetti MC, Brasselet C, Bel A, Messas E, Bissery A, Bruneval P, Desnos M, Pucéat M, Menasché P.**



Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet*. 2005 Sep 17-23;366(9490):1005-12

**Min CK, Kim BG, Park G, Cho B, Oh IH.** IL-10-transduced bone marrow mesenchymal stem cells can attenuate the severity of acute graft-versus-host disease after experimental allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2007 May;39(10):637-45.

**Minguell JJ und Erices A.** Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006 Jan;231(1):39-49.

**Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V, Seo BM, Sonoyama W, Zheng JJ, Baker CC, Chen W, Ried T, Shi S.** Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells*. 2006 Apr;24(4):1095-103.

**Miyanishi K, Trindade MC, Lindsey DP, Beaupré GS, Carter DR, Goodman SB, Schurman DJ, Smith RL.** Effects of hydrostatic pressure and transforming growth factor-beta 3 on adult human mesenchymal stem cell chondrogenesis in vitro. *Tissue Eng*. 2006 Jun;12(6):1419-28.

**Mörke KD, Betz E, Mergenthaler W.** *Biologie des Menschen*. Vol 15. Heidelberg: Quelle und Meyer Verlag; 2001.

**Morishita T, Honoki K, Ohgushi H, Kotobuki N, Matsushima A, Takakura Y.** Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors: three cases of cultured bone grafts derived from patients' mesenchymal stem cells. *Artif Organs*. 2006 Feb;30(2):115-8.

**Murrell W, Féron F, Wetzig A, Cameron N, Splatt K, Bellette B, Bianco J, Perry C, Lee G, Mackay-Sim A.** Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Dev Dyn*. 2005 Jun;233(2):496-515.

**Mylykangas-Luosujärvi R, Jantunen E, Kaipainen-Seppänen O, Mahlamäki E, Nousiainen T.** Autologous peripheral blood stem cell transplantation in a patient with severe mixed connective tissue disease. *Scand J Rheumatol*. 2000;29(5):326-7.

**Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, Yamagishi M, Mori H, Kangawa K, Kitamura S.** Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 Dec;287(6):H2670-6.

**Nakamura K, Yoshikawa N, Yamaguchi Y, Kagota S, Shinozuka K, Kunitomo M.** Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sci.* 2002 Jan 4;70(7):791-8.

**Oakes BW.** Orthopaedic tissue engineering: from laboratory to the clinic. *Med J Aust.* 2004 Mar 1;180(5 Suppl):S35-8.

**Ogawa M.** Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood.* 1993 Jun 1;81(11):2844-53.

**Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ.** Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood.* 2004 Mar 1;103(5):1662-8.

**Pérez de Castro I, de Cárcer G, Malumbres M.** A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy. *Carcinogenesis.* 2007 May;28(5):899-912.

**Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindahl A.** Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med.* 2002 Jan-Feb;30(1):2-12.

**Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjögren-Jansson E, Lindahl A.** Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res.* 2000 May;(374):212-34.

**Rasmusson I, Le Blanc K, Sundberg B, Ringdén O.** Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand J Immunol.* 2007 Apr;65(4):336-43.

**Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A.** Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.* 2005 Apr 15;65(8):3035-9. Erratum in: *Cancer Res.* 2005 Jun 1;65(11):4969.

**Satzger I, Schenck F, Kapp A, Gutzmer R.** Spontaneous regression of melanoma with distant metastases - report of a patient with brain metastases. *Eur J Dermatol.* 2006 Jul-Aug;16(4):454-5.

**Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ.** Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg.* 2002 Jun;73(6):1919-25; discussion 1926.

**Sharma B, Williams CG, Khan M, Manson P, Elisseeff JH.** In vivo chondrogenesis of mesenchymal stem cells in a photopolymerized hydrogel. *Plast Reconstr Surg.* 2007 Jan;119(1):112-20.

**Srivastava AS, Shenouda S, Mishra R, Carrier E.** Transplanted embryonic stem cells successfully survive, proliferate, and migrate to damaged regions of the mouse brain. *Stem Cells.* 2006 Jul;24(7):1689-94.

**Stem cell tables 2007, NIH Stem cell Research.** In *Stem Cell Information.* Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2007. Available at <<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/2001report>>

**Stevens LC.** The origin and development of testicular, ovarian, and embryo-derived teratomas. In: *Teratocarcinoma Stem Cells.* Silver, L.M., Martin, G.R., and Strickland, S. (Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp.23-36.

**Stosich MS, Bastian B, Marion NW, Clark PA, Reilly G, Mao JJ.** Vascularized adipose tissue grafts from human mesenchymal stem cells with bioactive cues and microchannel conduits. *Tissue Eng.* 2007 Dec;13(12):2881-90.

**Svennilson J.** Novel approaches in GVHD therapy. *Bone Marrow Transplant.* 2005 Mar;35 Suppl 1:S65-7.

**Swijnenburg RJ, Tanaka M, Vogel H, Baker J, Kofidis T, Gunawan F, Lebl DR, Caffarelli AD, de Bruin JL, Fedoseyeva EV, Robbins RC.** Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium. *Circulation.* 2005 Aug 30;112(9 Suppl):I166-72.

**Taléns-Visconti R, Bonora A, Jover R, Mirabet V, Carbonell F, Castell JV, Gómez-Lechón MJ.** Human mesenchymal stem cells from adipose tissue: Differentiation into hepatic lineage. *Toxicol In Vitro.* 2007 Mar;21(2):324-9.

**Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, Hsu FJ, Benike C, Hao ZM, Taidi B, Rajapaksa R, Caspar CB, Okada CY, van Beckhoven A, Liles TM, Engleman EG, Levy R.** Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood.* 2002 Mar 1;99(5):1517-26.

**Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ, Panoskaltsis Mortari A, McElmurry RT, Bell S, Xia L, Zhou N, Riddle M, Schroeder TM, Westendorf JJ, Mclvor RS, Hogendoorn PC, Szuhai K, Oseth L, Hirsch B, Yant SR, Kay MA, Peister A, Prockop DJ, Fibbe WE, Blazar BR.** Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2007 Feb;25(2):371-9.

**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.* 2003 Feb 15;75(3):389-97.

**Tuan RS.** Stemming cartilage degeneration: adult mesenchymal stem cells as a cell source for articular cartilage tissue engineering. *Arthritis Rheum.* 2006 Oct;54(10):3075-8.

**Van Bekkum DW.** Experimental basis for the treatment of autoimmune diseases with autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2003 Aug;32 Suppl 1:S37-9.

**Van Damme A, Thorrez L, Ma L, Vandeburgh H, Eyckmans J, Dell'Accio F, De Bari C, Luyten F, Lillcrap D, Collen D, VandenDriessche T, Chuah MK.** Efficient lentiviral transduction and improved engraftment of human bone marrow mesenchymal cells. *Stem Cells.* 2006 Apr;24(4):896-907.

**Vanikar AV, Mishra VV, Firoz A, Shah VR, Dave SD, Patel RD, Kanodia KV, Patel JV, Patel CN, Trivedi HL.** Successful generation of donor specific hematopoietic stem cell lines from co-cultured bone marrow with human embryonic stem cell line: a new methodology. *Transplant Proc.* 2007 Apr;39(3):658-61.

**Verfaillie CM, Schwartz R, Reyes M, Jiang Y.** Unexpected potential of adult stem cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 May;996:231-4.

**Villaron EM, Almeida J, López-Holgado N, Alcoceba M, Sánchez-Abarca LI, Sanchez-Guijo FM, Alberca M, Pérez-Simon JA, San Miguel JF, Del Cañizo MC.** Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2004 Dec;89(12):1421-7.

**von Mehren M, Adams GP, Weiner LM.** Monoclonal antibody therapy for cancer. *Annu Rev Med.* 2003;54:343-69.

**Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M.** Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002 Mar;10(3):199-206.

**Wan C, He Q, Li G.** Allogenic peripheral blood derived mesenchymal stem cells (MSCs) enhance bone regeneration in rabbit ulna critical-sized bone defect model. *J Orthop Res.* 2006 Apr;24(4):610-8.

**Wang Z, Goh J, Das De S, Ge Z, Ouyang H, Chong JS, Low SL, Lee EH.** Efficacy of bone marrow-derived stem cells in strengthening osteoporotic bone in a rabbit model. *Tissue Eng.* 2006 Jul;12(7):1753-61.

**Wekerle T, Sykes M.** Mixed chimerism as an approach for the induction of transplantation tolerance. *Transplantation.* 1999 Aug 27;68(4):459-67.

**Wu KH, Liu YL, Zhou B, Han ZC.** Cellular therapy and myocardial tissue engineering: the role of adult stem and progenitor cells. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006 Nov;30(5):770-81.

**Xu G, Zhang Y, Zhang L, Ren G, Shi Y.** The role of IL-6 in inhibition of lymphocyte apoptosis by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Sep 28;361(3):745-50.

**Yu H, Fang D, Kumar SM, Li L, Nguyen TK, Acs G, Herlyn M, Xu X.** Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *Am J Pathol.* 2006 Jun;168(6):1879-88.

**Zhao ZG, Tang XQ, Li J, Shi MX, Zou P.** [Isolation and identification of chronic myelogenous leukemia bone marrow mesenchymal stem cells and their functional characteristics]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2005 Aug 3;85(29):2054-7. Chinese.

**Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, Hu J, Cao W, Han C, Chen Y.** Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol.* 2006 Jun;80(3):267-74.

**zur Nieden NI, Cormier JT, Rancourt DE, Kallos MS.** Embryonic stem cells remain highly pluripotent following long term expansion as aggregates in suspension bioreactors. *J Biotechnol.* 2007 May 1;129(3):421-32.

## DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich recht herzlich bei dem Schöpfer der Idee für meine Doktorarbeit, **Herrn Dr. med. Andreas Helfenstein**, Facharzt für Orthopädie und Unfallchirurgie, bedanken. Ihm verdanke ich auch den reibungslosen Ablauf der Tierexperimente, ebenso die Korrektur einiger Teile des Manuskripts. Zu großen Dank bin ich im gleichen Maße verpflichtet bei **Herrn Professor Dr. rer. nat. Bodo Kurz** für seine ständige Betreuung und seine exzellenten Ratschläge. Die Zusammenarbeit mit beiden machte mir viel Spass, was mich immer wieder zu großem Einsatz motivierte.

Weiterhin möchte ich den großartigen medizinisch-technischen Assistenten des anatomischen Institutes der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel für ihre Hilfe im Labor danken. An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank an **Frau Rita Kirsch**, **Frau Marion Lorenzen** und **Herrn Frank Lichte** aus der Arbeitsgruppe von **Herrn Professor Dr. med. Dr. rar. nat. Michael Schünke**.

Für die nette Unterstützung bei der Fluoreszenzmarkierung der mesenchymalen Stammzellen bin ich **Herrn Dr. rer. nat. Daniel Oxmann** aus der Arbeitsgruppe von **Herrn Professor Rolf Mentlein** sehr dankbar.

Bei **Herrn Oberarzt Dr. med. Peter Niehoff** aus der Klinik für Strahlentherapie des UK-SH Campus Kiel möchte ich mich für seine prompte Hilfe beim Versuch zur Gewinnung von avitalen Zellen bedanken. Dem Tierschutzbeauftragten der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Herrn **Professor Dr. Ingo C. Reetz** danke ich für die sehr wichtigen Ratschläge für die Behandlung und Untersuchung der Versuchstiere. Den Tierpflegern aus dem Victor-Hensen Haus gilt großer Dank für ihre freundliche Assistenz bei der Behandlung der Versuchstiere.

In der Forschung gilt der Satz „Viele Köche verderben den Brei.“ selbstverständlich nicht. In diesem Sinne, besten Dank an alle Mitstreiter!

## LEBENS LAUF

### *Persönliche Angaben*

---

Name:	Akay
Vorname:	Izzettin
Geburtsdatum:	01.06.1978
Geburtsort:	Midyat
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Religion:	yezidisch
Familienstand:	ledig

### *Schule*

---

12/1985 – 07/1986	Grundschule, Schloßschule Bevern/Niedersachsen
08/1986 – 07/1989	Grundschule, Delligsen/Niedersachsen
08/1989 – 06/1991	Orientierungsstufe, Duingen/Niedersachsen
08/1991 – 06/1993	Gymnasium, Alfeld/Leine
08/1993 – 06/1998	Gymnasium, Goetheschule Einbeck/Niedersachsen

### *Tätigkeiten bis zum Studium*

---

06/1998 – 10/1998	Pflegedienstpraktikum, Krankenhaus Einbeck
10/1998 – 09/1999	Vereidigter Dolmetscher am Landgericht Göttingen
09/1999 – 10/2000	Zivildienst, Krankenhaus Einbeck
10/2000 – 04/2001	Vereidigter Dolmetscher am Landgericht Göttingen



---

**Studium der Zahnheilkunde an der Georg-August-Universität zu Göttingen**


---

04/2001 – 04/2002	Zahnmedizin
02/2002	naturwissenschaftliche Vorprüfung

**Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**


---

10/2002 – 10/2004	vorklinischer Abschnitt
08/2004	ärztliche Vorprüfung
10/2004 – 10/2008	klinischer Abschnitt
davon 08/2007 – 08/2008	Praktisches Jahr
voraussichtlich 10/2008	Zweites Staatsexamen und Approbation als Arzt

**Tätigkeiten neben dem Studium**


---

2005	Beginn der Promotion im anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Michael Schünke
04/2006 – 12/2006	OP-Assistent in der Abteilung für Allgemein- und Unfallchirurgie des Städtischen Krankenhauses Kiel

## POSTER UND VORTRÄGE

### *Poster*

---

Orthopedic Research Society (ORS) Annual Meeting, San Diego (USA)

Chondrogenical differentiation of mesenchymal stem cells reduces immunosuppressive effects of these cells in a murine tumor model. Helfenstein A, **Akay I**, Hassenpflug J, Schünke M, Kurz Bodo (2007).

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, Berlin

Objektive Bestimmung von Pelottendruck und Compliance bei der Korsettbehandlung von adoleszenten idiopathischen Skoliosen. Helfenstein A, **Akay I**, Hahne J.-H., Vogiatzis M, Wiese K, Hassenpflug J (2007).

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, Berlin

Immunsuppression durch mesenchymale Stammzellen bei der Knorpelzüchtung. **Akay I**, Helfenstein A, Hassenpflug J, Schünke M, Kurz B (2007).

Orthopedic Research Society (ORS) Annual Meeting, San Francisco (USA)

In contrast to mesenchymal stem cells native articular chondrocytes do not exhibit immunosuppressive effects. **Akay I**, Helfenstein A, Hassenpflug J, Schünke M, Kurz Bodo (2008).

### *Vorträge*

---

Colloquium des anatomischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität

Immunsuppression durch mesenchymale Stammzellen. **Akay I**, Helfenstein A, Kurz Bodo (2006).

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, Berlin

Immunsuppression durch mesenchymale Stammzellen bei der Knorpelzüchtung. **Akay I**, Helfenstein A, Hassenpflug J, Schünke M, Kurz B (2007).

## ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation – abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meine akademischen Betreuer – nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden.

Die Dissertation wurde bisher weder ganz noch in Auszügen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Der Zulassung von Zuhörerinnen und Zuhörern bei der mündlichen Prüfung wird nicht widersprochen.

Kiel, den 02.09.2008

.....  
(Izzettin Akay)