

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Campus Innenstadt / Diabeteszentrum
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Professor Dr. med. M. Reincke



**Untersuchung der immunsuppressiven
Eigenschaften muriner mesenchymaler Stammzellen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Manuela Steinsdörfer

aus München

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Jochen Seißler

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Andreas Bauer
Priv. Doz. Dr. Peter Neth
Prof. Dr. Hans-Uwe Janka

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Diabetes mellitus	7
<i>1.1.1. Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus</i>	8
<i>1.1.2. Therapie des Typ 1 Diabetes mellitus</i>	9
1.2. Mesenchymale Stammzellen	11
<i>1.2.1. Charakterisierung der MSCs</i>	12
<i>1.2.2. Immunsuppression durch MSCs</i>	12
<i>1.2.2.1. Indolamin-2,3-dioxygenase</i>	13
<i>1.2.2.2. Transforming growth factor β</i>	14
<i>1.2.2.3. Prostaglandin E2</i>	15
<i>1.2.3. Experimentelle Anwendungsbereiche der MSCs</i>	16
2. Fragestellung	19
3. Material und Methoden	20
3.1. Material	20
<i>3.1.1. Geräte</i>	20
<i>3.1.2. Verbrauchsmaterial</i>	21
<i>3.1.3. Reagenzien</i>	21
<i>3.1.4. Kits</i>	24
<i>3.1.5. Antikörper</i>	24
<i>3.1.5.1. Magnetbeads zur Zellsortierung</i>	24
<i>3.1.5.2. Antikörper zur Durchflusszytometrie</i>	24
<i>3.1.5.3. Western-Blot-Antikörper</i>	25
<i>3.1.5.4. Antikörper für den Proliferationsassay</i>	25
<i>3.1.6. Puffer und Zellkulturmedien</i>	26
<i>3.1.6.1. Fertigpuffer</i>	26
<i>3.1.6.2. Laufpuffer zur Agarosegel-Elektrophorese</i>	26

3.1.6.3. Medien zur MSC-Isolierung	26
3.1.6.4. Erythrozyten-Lysepuffer	27
3.1.6.5. Medien zur Ausdifferenzierung	27
3.1.6.6. Medium zum Proliferationsassay	28
3.1.6.7. Versuchsmedium zur Kynureninbestimmung	28
3.1.6.8. Reagenzien zur Phosphatbestimmung	28
3.1.6.9. Western-Blot-Puffer	29
3.1.6.10. Zellkulturmedien	30
3.1.7. Western-Blot-Gele	31
3.1.8. Versuchstiere	31
3.2. Methoden	32
3.2.1. Isolierung der MSCs	32
3.2.2. Kultivierung der MSCs	33
3.2.3. Stimulation der MSCs	33
3.2.4. FACS-Analyse	33
3.2.5. Ausdifferenzierung der MSCs	36
3.2.5.1. Differenzierung in Adipozyten	36
3.2.5.2. Differenzierung in Osteoblasten	37
3.2.5.3. Differenzierung in Chondrozyten	37
3.2.6. RNA-Isolierung	38
3.2.7. cDNA-Synthese	39
3.2.8. RT-PCR	39
3.2.9. PCR	41
3.2.10. Western-Blot	43
3.2.10.1. Probengewinnung	43
3.2.10.2. SDS-Gelelektrophorese	44
3.2.10.3. Membrantransfer	44
3.2.10.4. Antikörperinkubation und Signalentwicklung	44
3.2.11. Untersuchung der Sekretionsprodukte der MSCs	45
3.2.11.1. Kynurenin	45
3.2.11.2. Zytokine und Wachstumsfaktoren	45

3.2.11.2.1. Hepatocyte growth factor - ELISA	46
3.2.11.2.2. Transforming growth factor β 1 - ELISA	47
3.2.11.3. <i>Prostaglandin E2</i>	47
3.2.11.4. <i>Phosphat</i>	48
3.2.11.5. <i>Adenosin</i>	49
3.2.12. Mitogen stimulierter Proliferationsassay	49
3.2.12.1. <i>Splenozytenpräparation</i>	50
3.2.12.2. <i>MSC-Präparation</i>	51
3.2.12.3. <i>Analyse der immunsuppressiven Eigenschaften der MSCs</i>	52
3.2.13. Statistische Analyse	52
4. Ergebnisse	53
4.1. Isolierung der mesenchymalen Stammzellen	53
4.2. Phänotypische Charakterisierung der mesenchymalen Stammzellen	54
4.2.1. <i>Oberflächenmarkerprofil</i>	54
4.2.2. <i>Differenzierungspotential</i>	55
4.3. Immunregulation der mesenchymalen Stammzellen durch Suppression der T-Zell-Proliferation	56
4.3.1. <i>Effekte löslicher Faktoren im Zellkulturüberstand der MSCs</i>	57
4.3.2. <i>Effekte direkter Zell-Zell-Interaktion mit fixierten Zellen</i>	58
4.3.3. <i>Effekte der Zell-Zell-Interaktion im Transwell-Experiment</i>	59
4.4. Analyse des Wirkmechanismus der Immunsuppression durch mesenchymale Stammzellen	60
4.4.1. <i>Indolamin-2,3-dioxygenase</i>	60
4.4.2. <i>Hepatocyte growth factor und Transforming growth factor β1</i>	62
4.4.3. <i>Prostaglandin E2</i>	65
4.5. Expression des Oberflächenmarkers CD39 und Produktion von Adenosin und Phosphat	67
4.5.1. <i>Expression der Oberflächenmarker CD73 und CD39</i>	68

<i>4.5.2. Indirekter Nachweis der Adenosinproduktion durch Messung der Phosphatproduktion</i>	68
<i>4.5.3. Direkter Nachweis der Adenosinproduktion</i>	69
<i>4.5.4. Blockierung der Signaltransduktion durch die Inhibition von CD73</i>	70
<i>4.5.5. Blockierung der Signaltransduktion durch die Inhibition des A2A-Rezeptors</i>	71
<i>4.5.6. Restitution der Inhibition durch die Inhibition des A2A-Rezeptors und der PGE2-Produktion</i>	72
5. Diskussion	74
5.1. Isolierung und Charakterisierung der mesenchymalen Stammzellen	74
5.2. Immunsuppressives Potenzial der mesenchymalen Stammzellen	75
5.3. Mechanismus der Immunregulation	76
5.4. Limitationen der Studie	80
6. Zusammenfassung	82
7. Anhang	83
7.1. Abbildungsverzeichnis	83
7.2. Tabellenverzeichnis	85
7.3. Abkürzungsverzeichnis	86
8. Literaturverzeichnis	89

1. Einleitung

1.1. Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist charakterisiert als eine Stoffwechselstörung mit dem Leitbefund einer chronischen Hyperglykämie. Ursächlich hierfür sind je nach Untergruppe eine gestörte Insulinsekretion und/oder eine verminderte Insulinsensitivität. Die nosologische Klassifikation des Diabetes mellitus nach der Amerikanischen Diabetes Gesellschaft (ADA) sieht eine Einteilung in Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 sowie in die Untergruppen ‚andere spezifische Diabetes-Typen‘ und Gestationsdiabetes vor [Kerner et al., 2011].

Definitionsgemäß ist die Diagnose des Diabetes mellitus durch den Nüchternblutglukosespiegel oder die Glukosekonzentrationen während eines oralen Glukosetoleranztestes zu stellen (Tab. 1).

		Plasmaglukose venös [mg/dl]		
		nüchtern	2h-oGTT	
NGT	Normale Glukosetoleranz	< 100	< 140	
IFG	Abnorme Nüchternglukose	100-125	-	
IGT	Gestörte Glukosetoleranz	< 126	und	140-199
DM	Diabetes mellitus	≥ 126	und/oder	≥ 200

Tabelle 1: Diagnostische Kriterien des Diabetes mellitus [nach Kerner et al., 2011]

In Deutschland sind derzeit circa sechs Millionen Patienten betroffen, wobei hierunter 300.000 einem Typ 1 Diabetes und 5,7 Millionen einem Typ 2 zuzuordnen sind [Bretzel et al., 2007]. Pathogenetisch handelt es sich beim Typ 1 Diabetes um einen autoimmunmedierten Prozess, bei dem es zu einer progredienten Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen mit absolutem Insulinmangel kommt. Genetische sowie Umweltfaktoren spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Der Typ 2 Diabetes hingegen basiert auf einer gestörten Insulinsekretion und/oder -resistenz. Als bestimmende Faktoren in der Entwicklung konnten Adipositas, Ernährungsfaktoren, höheres Lebensalter sowie mangelnde körperliche Aktivität aufgezeigt werden [Kerner et al., 2011]. Zusammenfassend ergeben sich die in Tabelle 2 dargestellten differentialdiagnostischen Kriterien für Typ 1 und Typ 2 Diabetes bei Diagnosestellung.

	Typ 1	Typ 2
Manifestationsalter	meist Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene	meist mittleres und höheres Erwachsenenalter
Auftreten/Beginn	akut bis subakut	meist schleichend
Symptome	häufig Polyurie, Polydipsie, Gewichtsverlust, Müdigkeit	häufig keine Beschwerden
Körpergewicht	meist normalgewichtig	meist übergewichtig
Ketoseneigung	ausgeprägt	fehlend oder nur gering
Insulinsekretion	vermindert bis fehlend	subnormal bis hoch, qualitativ immer gestört
Insulinresistenz	keine (oder nur gering)	oft ausgeprägt
Familiäre Häufung	gering	typisch
HLA-Assoziation	vorhanden	nicht vorhanden
Diabetesassoziierte Antikörper	ca. 90-95% bei Manifestation	fehlend
Stoffwechsel	labil	stabil
Ansprechen auf β -zytotrope Antidiabetika	meist fehlend	zunächst meist gut
Insulintherapie	erforderlich	meist erst nach jahrelangem Verlauf der Erkrankung mit Nachlassen der Insulinsekretion

Tabelle 2: Differentialdiagnostische Kriterien für Typ 1 und Typ 2 Diabetes bei Diagnosestellung [modifiziert nach Tillil et al., 1998]

1.1.1. Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus

Der Typ 1 Diabetes mellitus ist die Folge einer immunologischen Destruktion der insulinproduzierenden β -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas. Wie bei einer Vielzahl autoimmunologischer Erkrankungen ist auch bei dieser Erkrankung der genaue Auslöser unbekannt. Es wird eine multifaktorielle Genese mit Kombination aus Umweltfaktoren sowie individueller, genetischer Prädisposition diskutiert [Rabinovitch et al., 2007]. In Tiermodellen, wie der nonobese diabetic (NOD) Maus sowie der BioBreeding (BB) Ratte, welche beide spontan einen Diabetes mellitus entwickeln, der dem humanen Typ 1

Diabetes in vielerlei Hinsicht ähnelt [Chaparro et al., 2010], konnte gezeigt werden, dass sowohl Immunzellen (Makrophagen, dendritische Zellen, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten) als auch lösliche Faktoren an der autoimmunologischen Destruktion der Inselzellen beteiligt sind [Roep et al., 2011]. Zum Teil ist diese Entwicklung durch ein Ungleichgewicht der T-Helfer-Zellen, mit einem Überwiegen von T-Helfer-Zellen 1, welche IL-2 und INF γ sezernieren, und einem Defizit der regulatorischen Gegenspieler in Form von T-Helfer-Zellen 2 und regulatorischen T-Zellen, bedingt [Rabinovitch et al., 2007; Delovitch et al., 1997]. Durch noch ungeklärte Auslöser kommt es zunächst vornehmlich zu einer Infiltration von antigenpräsentierenden Zellen in die pankreatischen Inseln [Yoon et al., 1998], welche ursächlich für die Entwicklung zytotoxischer T-Zellen sind. Es konnte gezeigt werden, dass T-Zellen in einem Makrophagen-depletierten Setting nicht in zytotoxische Zellen differenzieren, wodurch die Destruktion der β -Zellen verhindert werden konnte [Jun et al., 1999]. In Folge der Einwanderung der Makrophagen kommt es zur Sekretion von Zytokinen (IL-12) sowie der Präsentation β -Zell-spezifischer Autoantigene über MHC Moleküle der Klasse II, wodurch es zu einer Aktivierung von CD4⁺ T-Helfer-Zellen kommt. Dies wird als der Ausgangsschritt in der Entwicklung des Typ 1 Diabetes gesehen [Yoon et al., 2001]. Die hierdurch stimulierten CD4⁺ Zellen wiederum sezernieren INF γ und IL-2, wodurch es zu einer Aktivierung noch ruhender Makrophagen sowie der Induktion der Migration CD8⁺ T-Zellen kommt. Zudem führt die Aktivierung der Makrophagen zur Sekretion freier β -Zell toxischer Radikale sowie weiterer Zytokine (IL-1 β , TNF- α), welche ebenfalls als β -Zell toxisch angesehen werden [Mandrup-Poulsen et al., 1987]. Bedingt durch die Präsentation β -Zell-spezifischer Peptide an MHC Molekülen der Klasse I kommt es in Verbindung mit den aktivierten CD4⁺ Zellen zu einer Stimulation zytotoxischer CD8⁺ Zellen. Diese wiederum führen zu einer Destruktion der β -Zellen durch die Sekretion von Perforin und Granzymen sowie der Apoptose-Induktion über den Fas-Liganden [Yoon et al., 2001]. Die Destruktion schreitet zunächst unbemerkt voran. Zu einer Manifestation der Erkrankung kommt es dann im Verlauf von Jahren, wenn mehr als 80%-90% der β -Zellen zerstört sind und damit eine Beeinträchtigung der Glukosehomöostase auftritt [Staeva-Vieira et al., 2007].

1.1.2. Therapie des Typ 1 Diabetes mellitus

Zur Behandlung des Diabetes mellitus stehen eine Reihe von Therapieoptionen zu Verfügung, welche individuell, abhängig von den Patientenanforderungen eingesetzt werden. Ein

wichtiges Kriterium in der Wahl der geeigneten Behandlungsoption stellt hierbei die Restfunktion der insulinproduzierenden β -Zellen und damit das Ausmaß des Insulinmangels (relativ oder absolut) dar. Im Folgenden soll nun ausschließlich auf die Inselzelltransplantationstherapie des Typ 1 Diabetes mellitus eingegangen werden.

Die Transplantation pankreatischen Gewebes als Pankreasorgantransplantat oder als isolierte Inselzellen stellt eine klinische Therapieoption in der Behandlung des Insulin-abhängigen Typ 1 Diabetes dar, welche nach heutigem Kenntnisstand als die einzige Möglichkeit der Heilung gilt. Die erfolgreiche Transplantation bietet hierbei eine Reihe von Vorteilen, hierunter das Erzielen einer Normoglykämie bei HbA1c-Werten im physiologischen Bereich, ohne das Risiko schwerer Hypoglykämien sowie die Unabhängigkeit von Insulininjektionen. Hierbei erscheinen beide Methoden gleich effektiv in der Vermeidung relevanter Hypoglykämieepisoden. Obwohl die Pankreasorgantransplantation in der Lage ist, eine zuverlässige Blutglukoseeinstellung über eine bestimmte Zeitperiode zu erzielen, ist sie dennoch mit einem erheblichen intra- und postoperativen Risiko für den Patienten, Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie und dem Risiko der Transplantatabstoßung behaftet. Hiergegen stellt die Inseltransplantation eine weniger invasive Alternative dar, die jedoch nicht immer in der Lage ist, eine enge Einstellung der Blutglukosekonzentration zu erzielen, welche für die Prävention diabetischer Sekundärschäden jedoch von essentieller Bedeutung ist [Meloche, 2007]. Frühe Bestrebungen einer alleinigen Inseltransplantation blieben weitgehend erfolglos, so dass bis 1991 kein insulinunabhängiges Überleben für mehr als ein Jahr erreicht werden konnte. Dies änderte sich mit der Einführung des Edmonton-Protokolls zur Immunsuppression. Durch die erfolgreiche Transplantation bei sieben vormals insulinabhängigen Patienten und der Stabilisierung der Blutglukosekonzentration unter der Glukokortikoid-freien Immunsuppression des Edmonton-Protokolls, erlangte die Methode allgemeine Akzeptanz [Shapiro et al., 2000]. Trotz der herausragenden Weiterentwicklung auf dem Gebiet der Inselzelltransplantation zeigen Langzeitstudien, dass nur in circa 10% der Fälle ein Insulin-unabhängiger Status über fünf Jahre erhalten werden kann [Ryan et al., 2005]. Zudem steht diese Form der Therapie aufgrund der verbleibenden Risiken von Eingriff und Immunsuppression sowie der geringen Anzahl an Organspenden nur einem geringen Teil der Insulin-abhängigen Patienten zur Verfügung. Weltweit werden deshalb große Anstrengungen unternommen, neue Möglichkeiten der β -Zell-Ersatztherapie zu entwickeln. Beispiele hierfür sind neue immunsuppressive Strategien sowie die Entwicklung Insulin-produzierender Zellen aus Stammzellen.

1.2. Mesenchymale Stammzellen

Charakterisiert wird die Population der Stammzellen durch ihre einzigartigen Eigenschaften in den Bereichen Regeneration und Differenzierung. Durch ihr hohes Selbsterneuerungspotential stehen sie auch in adulten Organismen einer Reihe von Erneuerungsfunktionen in ausgewählten Geweben zur Verfügung.

Im Knochenmark adulter Säuger wurden bisher zwei Subpopulationen beobachtet, hämatopoetische sowie mesenchymale Stammzellen (MSCs). MSCs, erstmals von der Arbeitsgruppe um Friedenstein als ‚colony forming fibroblasts‘ beschrieben [Friedenstein et al., 1976], werden derzeit vorrangig aus Knochenmark isoliert. Dort stellen sie mit 0,001-0,01% eine relativ kleine nicht-hämatopoetische, nicht-homogene Subpopulation an kernhaltigen Knochenmarkszellen [Pittenger et al., 1999]. Als eine Unterform der adulten Stammzellen sind sie in der Lage, unter spezifischen Stimuli in Zellen der mesodermalen Linie zu differenzieren, und dienen damit als Langzeitvorläufer für eine Vielzahl an nicht-hämatopoetischen Geweben wie Knorpel, Muskel und Knochen [Pittenger et al., 1999]. Die MSCs, welche auch als multipotente mesenchymale Stromazellen bezeichnet werden, werden in der Literatur als eine heterogene Zellpopulation mit den Eigenschaften der Plastikadhärenz, Fibroblasten-ähnlicher Morphologie, Koloniebildungspotential und der oben genannten Möglichkeit der Differenzierung beschrieben [Horwitz et al., 2005]. Neben dem Differenzierungspotential in Zellen der mesodermalen Linie wurde von einzelnen Arbeitsgruppen auch die Differenzierungsmöglichkeit in Zellen des Ektoderms [Kopen et al., 1999] sowie des Endoderms [Sato et al., 2005] nachgewiesen. Zudem weisen in vitro kultivierte MSCs die Fähigkeit auf, eine Immunreaktion sowohl in vitro als auch in vivo zu supprimieren [Abdi et al., 2008]. Bisher konnten diese Zellen aus einer Reihe von Spezies, hierunter Mensch, Ratte, Maus, Schwein und Pavian sowie aus einer Vielzahl anderer adulter Gewebe wie Fettgewebe [Zuk et al., 2001], Milz, Lunge und Skelettmuskulatur isoliert werden [da Silva Meirelles et al., 2006].

Aufgrund ihres regenerativen Potenzials stehen diese Zellen heute im Fokus der regenerativen Forschung. Aber auch aufgrund ihrer nachgewiesenen immunregulatorischen Eigenschaften stellen sie eine vielversprechende Zellpopulation für den Bereich der Transplantationsmedizin dar.

1.2.1. Charakterisierung der MSCs

Den mesenchymalen Stammzellen konnte bisher kein für sie spezifischer Oberflächenmarker zugewiesen werden. Daher basiert ihre Charakterisierung vornehmlich auf ihrem Differenzierungspotential und einem relativ variablen Markerprofil [Abdi et al., 2008].

Hierbei ist entscheidend, dass die Zellen keine Oberflächenmarker aufweisen, die auf die Zugehörigkeit zur hämatopoetischen (CD45, CD34) und endothelialen (CD31) Zellpopulation hinweisen (Tab. 3).

	CD 29	CD 31	CD 34	CD 44	CD45	CD 73	CD90.2	CD 105	CD 106	Sca-1
Baddoo et al., 2003	+	-	-	+	-				+	+
Breitbach et al., 2007				+	-	+		+	+	+
da Silva Meirelles et al., 2006	+	-	+/-	+	-		+/-			+/-
Delorme et al., 2006		-	-	+	-	+	+	+		
English et al., 2007			-	+	-				+	+
Sun et al., 2003	+	-	+/-	+	-			+		+

Tabelle 3: MSC-Markerprofile verschiedener Arbeitsgruppen: + positiv, - negativ, +/- variable Expression

Die weitere Charakterisierung der Zellen erfolgt über die Eigenschaften der Plastikadhärenz, die Fibroblasten-ähnliche Morphologie sowie das oben beschriebene Differenzierungspotenzial [Abdi et al., 2008].

1.2.2. Immunsuppression durch MSCs

Eine Reihe von Studien konnte zeigen, dass MSCs immunmodulierende Eigenschaften besitzen [Rasmusson, 2006] und so eine spezifische Rolle in der Toleranzinduktion von Transplantaten spielen könnten. Hierbei beeinflussen die MSCs die Funktion einer großen Spannbreite an Zellen, worunter sich T-Zellen, B-Zellen, natürliche Killer-Zellen und Antigen-präsentierende Zellen befinden [Nauta et al., 2007], und modulieren beispielsweise

die T-Zellantwort durch die Hemmung von proinflammatorischen Th17 Zellen [Ghannam et al., 2010] und die Aktivierung CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺-regulatorischer T-Zellen [Madec et al., 2009; Selmani et al., 2008; Gonzalez-Rey et al., 2010]. Hinweise zu ihrem immunregulatorischen Potenzial liefern sowohl Studien an humanen [di Nicola et al., 2002; Tse et al., 2003] als auch murinen [Djouad et al., 2003] MSCs, welche zeigen, dass die Zellen in der Lage sind die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen in vitro zu supprimieren. Diese Inhibition bezieht sich sowohl auf die T-Zell-Stimulation mit allogenen [le Blanc et al., 2007; Tse et al., 2003], als auch mitogenen Stimuli [di Nicola et al., 2002; Djouad et al., 2003] sowie die Stimulation durch die Applikation von CD3- und CD28-Antikörpern [Tse et al., 2003]. Hierbei scheint der Effekt unabhängig davon zu sein, ob die MSCs allogene oder autologe zu den Responder-T-Zellen eingesetzt werden [le Blanc et al., 2007; Krampera et al., 2003]. Zudem erbrachte eine Studie an Affen, dass die Applikation mesenchymaler Stammzellen in vivo lediglich die alloreaktive Immunantwort beeinflusst, ohne dabei die anderen immunologischen Reaktionen des Empfängers zu beeinflussen [Beggs et al., 2006]. Der hierfür verantwortliche Mechanismus konnte bisher noch nicht vollständig identifiziert werden und befindet sich derzeit noch in der Aufklärung. Eine Reihe von Studien pflichtet der Theorie bei, dass lösliche Faktoren in den Prozess der Immunregulation involviert sind. Ein Hauptaugenmerk liegt hierbei in der Erforschung von Faktoren wie Hepatocyte growth factor (HGF), Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) [Rasmusson et al., 2005; le Blanc et al., 2004 (1)], Nitric oxide (NO) [Sato et al., 2007] und Prostaglandin E2 (PGE₂) [Rasmusson et al., 2005, Aggarwal et al., 2005], sowie der Tryptophandegradation durch das Enzym Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) [Meisel et al., 2004].

1.2.2.1. Indolamin-2,3-dioxygenase

IDO stellt ein Enzym dar, welches den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Katabolismus der essentiellen Aminosäure Tryptophan zu Kynurenin außerhalb der Leber vermittelt [Mellor et al., 1999; Moffett et al., 2003]. Hierbei handelt es sich um ein intrazelluläres Enzym, dessen Expression durch proinflammatorische Zytokine, im Speziellen IFN γ , induziert werden kann [Taylor et al., 1991, Grohmann et al., 2002]. Obwohl IDO ein weitverbreitetes Enzym ist, ist es nicht allen Zellen möglich, aktives IDO zu synthetisieren, wozu eine posttranslationale Modifikation des zentralen Hämelements des Enzyms notwendig ist [Moffett et al., 2003]. Die Induktion des Enzyms führt zu einem speziellen lokalen Milieu,

welches durch einen Tryptophanmangel sowie die Anreicherung des Abbauproduktes Kynurenin gekennzeichnet ist. Es konnte gezeigt werden, dass die immunsuppressive Wirkung humaner mesenchymaler Stammzellen teilweise durch das Enzym Indolamin-2,3-dioxygenase vermittelt wird. Der Effekt der T-Zellsuppression beruht hierbei auf dem beschriebenen lokalen Tryptophan-depletierten Milieu [Meisel et al., 2004].

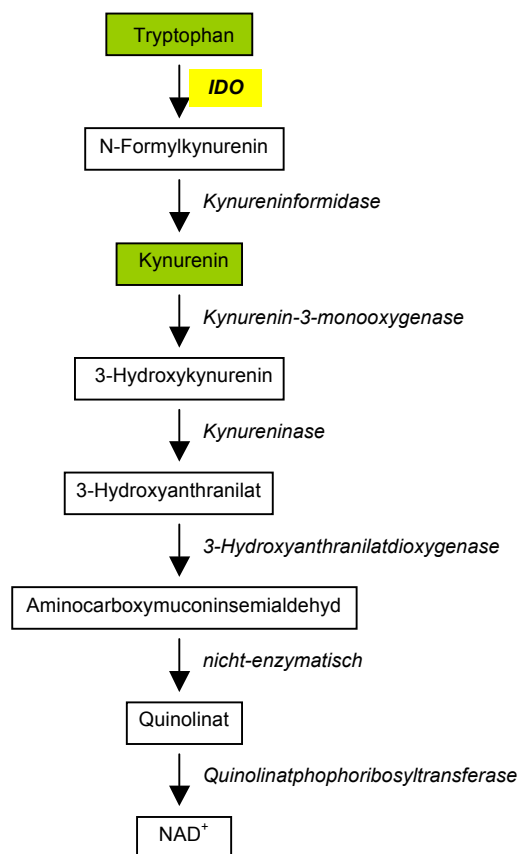


Abbildung 1: Schema des Tryptophanabbaus

1.2.2.2. Transforming growth factor β

TGF β ist ein Zytokin mit einer entscheidenden Rolle in der Suppression immunologischer Prozesse [Yoshimura et al., 2010]. So führt im Tiermodell eine vollkommene TGF β 1-Defizienz zu einer massiven autoimmunologischen Inflamationsreaktion mit Lymphozyteninfiltration in multiple Organe und dadurch bedingtem vorzeitigem Lebensende

[Kulkarni et al., 1993]. Dabei ist nahezu jede Zelle des Körpers in der Lage, TGF β zu produzieren [Taylor, 2009], wobei eine besonders hohe Expression in regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden kann [Nakamura et al., 2004]. TGF β führt unter anderem zur Inhibition der IL-2-Produktion, wodurch die Aktivierung und Proliferation immunologischer Effektorzellen (T- und B-Zellen) verhindert wird [Brabletz et al., 1993]. Zudem erfolgt die Regulation der Zellproliferation durch TGF β über die Kontrolle der Expression Zellzyklus-relevanter Regulatoren [Hannon et al., 1994]. Neben dem Einfluss auf die T- und B-Zellen kommt es durch TGF β auch zu einer Suppression antigenpräsentierender Zellen und natürlicher Killerzellen [Yoshimura et al., 2010].

1.2.2.3. Prostaglandin E₂

Prostaglandine stellen kleine Lipidmoleküle dar, die eine Vielzahl von Funktionen im Körper, hierunter die Nierenfunktion, die Thrombozytenaggregation, die Neurotransmitterfreisetzung sowie die Immunmodulation, regulieren [Goetzl et al., 1995; Phipps et al., 1991]. Die Prostaglandinsynthese beginnt als Reaktion auf inflammatorische Stimuli mit der Liberation von Arachidonsäure aus Membranlipiden durch die Phospholipase A₂. Im Anschluss wird Arachidonsäure durch die Enzyme COX-1 und COX-2 zu Prostaglandin H₂ umgewandelt. COX-1, welches der Homöostase dient, wird konstitutiv exprimiert, wohingegen COX-2 ein induzierbares Enzym ist, welches vorrangig an der Regulation von Entzündungsreaktionen beteiligt ist [Smith et al., 1994]. Die zellspezifische Prostaglandinsynthese wandelt PGH₂ in eine Reihe von Prostaglandinen um (Abb. 2). Hierunter stellt PGE₂ eines der meist erforschten Prostaglandine dar und zeigt vielfältige Effekte auf die Regulation und Aktivität von T-Zellen. Der inhibitorische Effekt auf die T-Zell-Proliferation konnte bereits nachgewiesen werden, der Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Mögliche Ansatzpunkte stellen hierbei die Inhibition der Polyaminsynthese [Ruggeri et al., 2000], der intrazellulären Calziumausschüttung [Choudhry et al., 1999 (2)] sowie der p59-Tyrosinkinaseaktivität [Choudry et al., 1999 (1)] dar. Weiter wurde eine verminderte IL-2-Sekretion und IFN γ -Bildung sowie eine erhöhte Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-10 durch T-Lymphozyten beobachtet [Hilkens et al., 1996].

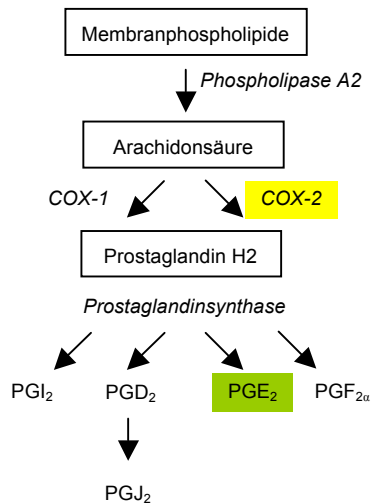


Abbildung 2: Darstellung des Prostaglandinsynthesewegs

1.2.3. Experimentelle Anwendungsbereiche der MSCs

Aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften haben MSCs ein weites Einsatzgebiet in ihrer potenziellen klinischen Verwendung. Hierzu zählen die Prävention und Therapie der akuten Graft-versus-host-Reaktion sowie der Transplantatabstoßung, die Geweberegeneration und die Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie dem M. Crohn [Duijvestein et al., 2010] und der Colitis ulcerosa [Hayashi et al., 2008].

Nach der intravenösen Applikation der MSCs kommt es zur Auswanderung in verschiedene Gewebe wie Leber, Lunge, Knochen und Niere [Gao et al., 2001]. Ein besonderes Merkmal dabei ist es, dass die MSCs zudem vornehmlich in entzündete Gewebe nach Gewebsdestruktion einwandern [Salem et al., 2010], was im Tiermodell nach Myokardinfarkt und cerebraler Ischämie gezeigt werden konnte [Shake et al., 2002; Wang et al., 2002].

Die graft-versus-host Reaktion stellt ein Problem nach der Transplantation hämatopoetischer Stammzellen dar, bei dem es zur Reaktion von Spenderlymphozyten gegen den Empfängerorganismus kommt. Initial wird eine immunsuppressive Therapie mit Steroiden durchgeführt. Kommt es jedoch zum Versagen dieser Therapie, ist die Prognose meist schlecht [McGuirk et al., 2011]. Durch die Applikation mesenchymaler Stammzellen konnte

in mehreren Studien eine Remission der Erkrankung erzielt werden [le Blanc et al., 2004 (2); Rigdén et al., 2006].

Im Rahmen der Gewebeerneuerung kommen MSCs auf verschiedene Weise zum Einsatz. Zum einen dienen sie dem direkten Zellersatz durch Differenzierung, zum anderen der Regulation inflammatorischer Prozesse aufgrund parakriner Effekte durch die Ausschüttung von Zytokinen.

So wurden die Zellen beispielsweise in der Therapie von Knochenerkrankungen wie der Osteogenesis imperfecta eingesetzt, bei der es aufgrund einer genetischen Störung zur Bildung eines defekten Typ I Kollagens kommt. Dies wiederum führt zu Osteopenie, multiplen Knochenbrüchen und schweren Knochendeformitäten. Es konnte gezeigt werden, dass die Transplantation von Knochenmark zum Anwachsen von Osteoblasten führte, wodurch die Ausbildung neuen kompakten Knochens, die Erhöhung der Knochendichte und die Reduktion der Knochenbruchfrequenz erreicht wurden [Horwitz et al., 1999; Horwitz et al., 2001].

Ein weiterer Einsatzbereich der MSCs stellt die Verwendung im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes dar, bei dem es zum Absterben von Kardiomyozyten durch Apoptose und Nekrose kommt [Kajstura et al., 1996]. Dies wiederum führt zu einer Hypertrophie der verbliebenen Kardiomyozyten sowie einem fibrotischen Umbau mit der Folge einer reduzierten Ventrikelcompliance mit Ventrikeldilatation sowie gegebenenfalls einer Herzinsuffizienz und einem Herzversagen [Braunwald et al., 1991]. Zur Prävention einer terminalen Herzinsuffizienz kommen MSCs in klinischen Studien im Sinne eines regenerativen Therapieansatzes zum Einsatz. Bereits verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass eine Differenzierung von MSCs in Kardiomyozyten in vitro möglich ist [Makino et al., 1999; Rouhi et al., 2013] und dass die Applikation von MSCs im Tiermodell nach einem Myokardinfarkt zu einem Anwachsen von MSCs und einer signifikanten Verbesserung der Ventrikelkontraktilität und Reduktion der Infarktgröße [Shake et al., 2002] sowie der Apoptoserate [Jiang et al., 2009; Zhao et al., 2012] führt. Inwieweit dies wirklich direkt durch eine Differenzierung der MSCs in Kardiomyozyten oder indirekt über die Freisetzung von kardioprotektiven und angiogenesefördernden Faktoren bzw. die Aktivierung residenter Progenitorzellen vermittelt wird, wird momentan in der Literatur noch kontrovers diskutiert.

Weitere Einsatzbereiche in der Geweberegeneration sind die Reparatur knorpeliger Läsion im Gelenk nach Implantation von MSCs [Wakitani et al., 1994] sowie die Regeneration von Sehnen [Young et al., 1998], Nierenparenchym [Herrera et al., 2004], Muskulatur [de Bari et al., 2003] und die Behandlung chronischer Hautwunden [Badiavas et al., 2003]. MSCs

wurden zudem erfolgreich für die Besiedlung von biodegradablen Herzklappen mit autologen Zellen beim Affen eingesetzt [Weber et al., 2011]. Daneben haben sich aussichtsreiche Ergebnisse bei der Verwendung von MSCs in der Behandlung neuronaler Läsionen ergeben. Studien zeigten, dass die Applikation von MSCs die Regeneration nach cerebralem Infarkt oder traumatischer Hirnläsion verbessert [Chopp et al., 2002].

Ein weiterer Schwerpunkt besteht in der Erforschung der Einsetzbarkeit der MSCs in der Diabetestherapie. Hierzu wurden den NOD-Mäusen in der prädiabetischen Phase unter anderem allogene MSCs intravenös appliziert, wodurch die Entwicklung eines Diabetes mellitus signifikant reduziert werden konnte [Fiorina et al., 2009; Madec et al., 2009]. Dieser Effekt zeigte sich deutlich weniger bei der Verwendung autologer MSCs [Fiorina et al., 2009]. Ebenso konnte durch die intravenöse Applikation allogener MSCs in der Phase der Diabetesmanifestation bei NOD-Mäusen eine Blutzuckernormalisierung erreicht und über einen gewissen Zeitraum aufrechterhalten werden [Fiorina et al., 2009; Jurewicz et al., 2010]. Aktuell wird in verschiedenen klinischen Phase I/II Studien untersucht, ob allogene oder autologe humane MSCs die Autoimmunreaktion bei Diabetesmanifestation supprimieren können und ob dies die Betazellmasse über längere Zeit erhalten kann (Übersicht siehe ClinicalTrials.Gov:<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=mesenchymal+stem+cells%3B+diabetes>).

2. Fragestellung

Trotz intensiver Suche zur Prävention der Entwicklung eines Typ 1 Diabetes mellitus steht momentan keine Therapie zur Verfügung, mit der die Entwicklung der Erkrankung verhindert werden kann.

Aufgrund ihrer ausgeprägten immunmodulatorischen Eigenschaften stellen mesenchymale Stammzellen einen neuen Ansatz dar, die Autoimmunreaktion in der prädiabetischen Phase oder Diabetesmanifestation günstig zu beeinflussen. In einigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Subpopulationen mesenchymaler Stammzellen, isoliert aus dem Knochenmark adulter Säugetiere, immunsuppressives Potenzial aufweisen. Bisher konnte nur ein Teil der hier zugrundeliegenden Mechanismen identifiziert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es,

- 1) multipotente mesenchymale Stammzellen der Maus zu isolieren und in der Zellkultur zu expandieren
- 2) die immunmodulierende Wirkung der Zellen in einem in vitro Modell zu charakterisieren
- 3) nachzuweisen, welche Mechanismen der Immunmodulation zugrunde liegen.

Die Ergebnisse sollen in Zukunft der Entwicklung eines Modells zur Toleranzinduktion bei Typ 1 Diabetes mellitus dienen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Analysenwaage Kern 770	Kern & Sohn, Karlsruhe, Deutschland
BD FACS Calibur	BDBiosciences, Heidelberg, Deutschland
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland
BioPhotometer 6131	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Brutschrank APT.LINE CB	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Brutschrank Heracell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Elektrophoresekammer	BioRad, München, Deutschland
ELISA-Schüttler: Titramax 101	Heidolph, Schwabach, Deutschland
FilterMate Harvester	Perkin-Elmer, Rodgau, Deutschland
Geldokumentationssystem	Intas, Göttingen, Deutschland
Heizblock	Grant, Berlin, Deutschland
IKAMAG Magnetrührer	IKA, Staufen, Deutschland
Light-Cycler	Roche, Mannheim, Deutschland
Mikroskop Fluovert	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Mini-Zentrifuge Spectrafuge	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Multiplate-ELISA-Reader	Tecan, Crailsheim, Deutschland
pH-Meter	inoLab, Weilheim, Deutschland
Pipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten (2 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson, Limburg, Deutschland
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Präzisionswaage Kern 770	Kern & Sohn, Karlsruhe, Deutschland
Thermocycler: GeneAmp PCR System	PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
TopCount beta counter	Perkin-Elmer, Rodgau, Deutschland
Vortex-Schüttler	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad WNB 7-45	Memmert, Schwabach, Deutschland
Western-Blot-Kammer	BioRad, München, Deutschland
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3.1.2. Verbrauchsmaterial

Biosphere® Filter Tips (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Tubes 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS-Röhrchen, Rundbodenröhrchen 5ml	BD, Heidelberg, Deutschland
Hybond-P PVDF-Membran	GE Healthcare, München, Deutschland
Light Cycler Capillaries	Roche, Mannheim, Deutschland
MACS® Separation Columns	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Microlance Kanülen 27G	BD, Heidelberg, Deutschland
Mikrotiterplatten (6/12/24/48 well)	Corning, München, Deutschland
PCR-Tubes (0,2 ml) 8er Kette	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Brand, Wertheim, Deutschland
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritze (2 ml, 5 ml, 10 ml)	BD, Heidelberg, Deutschland
Sterilfilter (0,22 µm)	Millipore, Billerica, USA
Stripette (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Corning, München, Deutschland
UniFilter®-96, GF/C®	PerkinElmer, Rodgau, Deutschland
Zellkulturflaschen 25 cm ²	Corning, München, Deutschland
Zellschaber (cell scraper)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellsieb 70 µm	BD, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Corning, München, Deutschland

3.1.3. Reagenzien

Acrylamid	BioRad, München, Deutschland
Agarose	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
Alcian Blau	Sigma, München, Deutschland
Ammoniumchlorid	Sigma, München, Deutschland
Ammoniummolybdat	Sigma, München, Deutschland
APCP	Sigma, München, Deutschland
APS	BioRad, München, Deutschland
Ascorbinsäure	Sigma, München, Deutschland
ATP	Sigma, München, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma, München, Deutschland

BSA	Serva, Heidelberg, Deutschland
Complete, Mini Tabletten	Complete, Mini Tabletten
Concavalin A	Sigma, München, Deutschland
Dexamethason	Sigma, München, Deutschland
Dimethylamino-Benzaldehyd / Ehrlich's Reagenz	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
DNA-Ladder (100 bp)	Promega, Mannheim, Deutschland
dNTP-Mix (5 mM)	Qiagen, Hilden, Deutschland
EDTA	Sigma, München, Deutschland
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
fetales Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd (36,5%)	Sigma, München, Deutschland
Glukose	Sigma, München, Deutschland
Glycerol	Sigma, München, Deutschland
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
H ³ -Thymidin	GE Healthcare, München, Deutschland
Hepes	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
hPDGF-BB	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
hTGF β 1	PeproTech, Hamburg, Deutschland
IDO (Maus)	Alexis/Axxora, Lörrach, Deutschland
IFN γ	PeproTech, Hamburg, Deutschland
Igepal	Sigma, München, Deutschland
Indomethacin	Sigma, München, Deutschland
Insulin	Sigma, München, Deutschland
Isobutylmethylxanthin	Sigma, München, Deutschland
Isofluran	Abbott, Illinois, USA
Isopropanol	Sigma, München, Deutschland
Kaliumchlorid	Sigma, München, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma, München, Deutschland
Kalziumchlorid	Sigma, München, Deutschland
L-Kynurenin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt, Deutschland

Malachit green base	Sigma, München, Deutschland
mEGF	Tebu-Bio, Offenbach, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mitomycin C	Sigma, München, Deutschland
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma, München, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma, München, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumthiosulfat	Sigma, München, Deutschland
NBT/ BCIP Ready-to-use Tablets	Roche, Mannheim, Deutschland
Oil Red	Sigma, München, Deutschland
Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Polyvinylalkohol	Sigma, München, Deutschland
Pyrogallol	Sigma, München, Deutschland
Salzsäure (0,1 mM)	Merck, Darmstadt, Deutschland
SCH58261	Sigma, München, Deutschland
SDS	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Silbernitrat	Sigma, München, Deutschland
Steptavidin	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Szintillationsflüssigkeit	PerkinElmer, Rodgau, Deutschland
TEMED	BioRad, München, Deutschland
Tetramisole	Sigma, München, Deutschland
TNF α	Preprotech, Hamburg, Deutschland
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
TRIS	Sigma, München, Deutschland
Trypsin-EDTA (10x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tryptophan	Sigma, München, Deutschland
Tween 20	Sigma, München, Deutschland
β -Glycerolphosphat	Sigma, München, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

3.1.4. Kits

HGF-ELISA	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
High Pure RNA Isolation Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I	Roche, Mannheim, Deutschland
Omniscript™ RT Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
PCR-Kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase	Promega, Mannheim, Deutschland
PGE2-Immunoassay	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
TGFβ1-ELISA	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland

3.1.5. Antikörper*3.1.5.1. Magnetbeads zur Zellsortierung*

CD90 (Thy1.2) Microbeads, mouse	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland
CD45 Microbeads, mouse	Miltenyi Bergisch-Gladbach, Deutschland

*3.1.5.2. Antikörper zur Durchflusszytometrie**Antikörper:*

FITC-CD117	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
FITC-CD133	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
FITC-CD29	BioLegend, Eching, Deutschland
FITC-CD44	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
FITC-CD45	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
FITC-CD62L	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
FITC-VCAM	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
FC-Block (Maus)	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
PE-CD104b	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
PE-CD105	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
PE-CD31	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
PE-CD34	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
PE-CD39	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
PE-CD73	eBioscience, Frankfurt, Deutschland

PE-CD90.2	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
PE-Flk1	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
PE-ICAM (CD54)	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
PE-Sca1	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
<i>Isotypenkontrollen:</i>	
FITC-HamsterIgG	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
FITC-RatIgG1	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
FITC-RatIgG2a	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
PE-RatIgG2a	eBioscience, Frankfurt, Deutschland

3.1.5.3. Western-Blot-Antikörper

Anti-mIDO; clone: mIDO-48	Biolegend, Eching, Deutschland
Goat-anti-rat-IGG-AKP; clone: Poly4054	Biolegend, Eching, Deutschland

3.1.5.4. Antikörper für den Proliferationsassay

<i>Antikörper:</i>	
Anti-HGF-Rezeptor-AK (goat, polyklonal)	GeneTex/Biozol, Eching, Deutschland
Anti-TGF β 1-AK (mouse, monoclonal)	Abcam, Cambridge, Unites Kingdom
<i>Isotypenkontrollen:</i>	
IgG (goat)	Abcam, Cambridge, Unites Kingdom
IgG1 (mouse, kappa, monoclonal)	Abcam, Cambridge, Unites Kingdom

3.1.6. Puffer und Zellkulturmedien

3.1.6.1. Fertigpuffer

Phosphate Buffered Saline	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Red Blood Cell Lysing Buffer	Sigma, München, Deutschland

3.1.6.2. Laufpuffer für Agarosegel-Elektrophorese

<i>50x TAE-Puffer</i>	
Aqua dest.	
Eisessig	5,7%
TRIS	2 M
EDTA	63,6 mM

3.1.6.3. Medien zur MSC-Isolierung

<i>Isolierungsmedium</i>	
DMEM low Glucose (1,0 g/l)	
FCS	10%
P/S	1%
Hepes	3,7 mg/ml

<i>Kulturmedium (DMEM⁺)</i>	
DMEM low Glucose (1,0 g/l)	
FCS	10%
P/S	1%
Hepes	3,7 mg/ml
mEGF	10 ng/ml
hPDGF-BB	1 ng/ml

3.1.6.4. Erythrozyten-Lysepuffer

Aqua dest.	
NH ₄ Cl	150 mM
KHCO ₃	10 mM
EDTA	0,1 mM
	pH 7,2
Steril-filtriert mit Millipore-Filtereinheit, Lagerung bei -20°C	

*3.1.6.5. Medien zur Ausdifferenzierung**Differenzierungsmedium für Adipozyten*

DMEM high Glucose (4,5 g/l)	
FCS	10%
P/S	1%
Dexamethason	1 µM
Indomethacin	200 µM
Insulin	10 µg/ml
Isobutylmethylxanthin	0,1 mg/ml

Differenzierungsmedium für Osteoblasten

DMEM low Glucose (1,0 g/l)	
FCS	10%
P/S	1%
Dexamethason	0,1 µM
Ascorbinsäure	0,3 mM
β-Glycerolphosphat	10 mM

Differenzierungsmedium für Chondrozyten

AlphaMEM	
FCS	1%
P/S	1%
Insulin	6,25 µg/ml
Ascorbinsäure	50 nM
hTGFβ1	10 ng/ml

3.1.6.6. Medium zum Proliferationsassay

Basal Iscove	
FCS	10%
P/S	1%
β-Mercaptoethanol	50 µM

3.1.6.7. Versuchsmedium zur Kynureninbestimmung

DMEM low Glucose (1,0 g/l)	
FCS	10%
P/S	1%
Hepes	3,7 mg/ml
L-Tryptophan	100 µg/ml

3.1.6.8. Reagenzien zur Phosphatbestimmung

Inkubationspuffer zur Phosphatbestimmung

Hepes pH 7,5	20 mM
Glukose	10 mM
KCl	5 mM
NaCl	120 mM
CaCl ₂	2 mM
Tetramisole	5 mM

Malachit-Grün-Reagens

Aqua dest	
Malachit green base	0,027%
Polyvinylalkohol	0,39%
Ammoniummolybdat in 6M HCl	0,95%

*3.1.6.9. Western-Blot-Puffer**Blockierungspuffer*

TBST

Magermilchpulver 5%

5x Laufpuffer

Aqua dest.

10%iges SDS 5%

Glycin 1,92 M

TRIS 0,5 M

RIPA-Puffer

PBS

Igepal 1%

Natriumdeoxycholat 0,5%

10%iges SDS 0,1%

5x Sammelgelpuffer

Aqua dest

10%iges SDS 5%

TRIS 0,3 M

pH 6,7

5x SDS-Puffer

10%iges SDS 50%

Glycerol 25%

Aqua dest. 15%

TRIS-HCl pH 6,8 10%

Bromphenolblau 0,1%

 β -Mercaptoethanol 0,01%

10x TBS

Aqua dest

TRIS 0,2 M

NaCl 1,37 M

pH 7,6

TBST

Aqua dest

10x TBS 10%

Tween 20 0,1%

Transferpuffer

Aqua dest.

Methanol 20%

NaHCO₃ 20 mMNa₂CO₃ 3 mM

2,5x Trenngelpuffer

Aqua dest

10%iges SDS 2,5%

TRIS 1,875 M

pH 8,9

3.1.6.10. Zellkulturmedien

Alpha-MEM	Sigma, München, Deutschland
Basal Iscove	Biochrom, Berlin, Deutschland
DMEM high Glucose (4,5 g/l)	Sigma, München, Deutschland
DMEM low Glucose (1,0 g/l)	Sigma, München, Deutschland
RPMI 1640	Gibco, Darmstadt, Deutschland

3.1.7. Western-Blot-Gele

Sammelgel

Aqua dest	
Sammelgelpuffer	20%
Acrylamid (30%)	17%
APS (10%)	0,9%
TEMED	0,1%

Trenngel

Aqua dest	
2,5x Trenngelpuffer	40%
Acrylamid (30%)	33%
APS (10%)	0,22%
TEMED	0,09%

3.1.8. Versuchstiere

Balb/c, männlich, 5-16 Wochen	Harlan-Winkelmann, Borchen, Deutschland
C57Bl/6, männlich, 5-16 Wochen	Harlan-Winkelmann, Borchen, Deutschland

3.2. Methoden

3.2.1. Isolierung der MSCs

Zur Gewinnung der MSCs wurde eine Modifikation der Isolierungsprotokolle von L. da Silva Meirelles und P. Tropel zur MSC-Isolierung aus Knochenmark gewählt [da Silva Meirelles et al., 2003; Tropel et al., 2004]. Die Mäuse der Linie Balb/c wurden vor Entnahme der Knochen mittels inhalativem Isofluran narkotisiert und über eine cervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden beidseits sowohl Femur als auch Tibia entnommen. Die Knochen wurden mechanisch von umliegenden Strukturen befreit und die Knochenmarkshöhle durch Abtrennen der endständigen Knochenfragmente eröffnet. Die Zellen wurden durch Ausspülen der Knochenmarkshöhle mit Isolierungspuffer (PBS + 2% FCS) gewonnen. Nach einem einmaligen Zentrifugievorgang mit 160 x g über 8 min wurde das Zellpellet in 1 ml hypotonem Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 4 min bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch die Lyse der Erythrozyten bewirkt wurde. Anschließend wurde die Zelllösung zweimal in Isolierungspuffer gewaschen und verbleibende grobe Partikel mittels eines Zellsiebes (70 µm) entfernt. Die Zellen wurden im Anschluss in einer Dichte von $1,4 \times 10^6/\text{cm}^2$ in Wachstumsfaktor-freiem Medium (Isolierungsmedium) ausgesät. Nach vier Tagen wurde eine erstmalige Selektion nach Adhärenz durch sanftes Waschen mit steriler PBS-Lösung durchgeführt. An Tag 7 wurden die CD45+ Zellen mittels magnetischer Sortierung depletiert. Die CD45- Zellen wurden darauf in einer Zelldichte von 8.000 Zellen/ cm^2 in Kulturmedium ausgesät.

Die Sortierung erfolgte mittels der Magnetic Cell Separation (MACS) der Firma Miltenyi, einem Verfahren zur Trennung eines Zellgemisches durch an Magnetpartikel gebundene Antikörper (MicroBeads). Hierzu werden die Zellen mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert, wodurch diese spezifisch an den gewünschten Oberflächenmarker binden. Beim Durchfluss des Zellgemisches durch eine Säule, die in ein starkes permanentes Magnetfeld eingebracht wurde, werden die mit den MicroBeads markierten Zellen zurückgehalten. Der Durchfluss enthält hierdurch nur unmarkierte Zellen, so dass aus dem ursprünglichen Zellgemisch die markierte Zellpopulation entfernt wurde.

Die Sortierung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Die Zellen wurden durch die Zugabe von Trypsin über 5 min im Inkubator von der Kulturplatte gelöst und zweimalig mit MACS-Puffer (PBS + 10% FCS) gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen gezählt und in $90 \mu\text{l}/10^7$ Zellen MACS-Puffer und $10 \mu\text{l}/10^7$ Zellen CD45-MicroBeads aufgenommen und für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschvorgang wurde das Zellpellet in 3 ml MACS-Puffer resuspendiert. Nachdem die Säule in das Magnetfeld eingebracht und mit 3 ml MACS-Puffer vorgespült wurde, konnte sie mit der Zellsuspension beladen werden. Die markierten Zellen, welche im System haften blieben, wurden verworfen. Im Gegensatz dazu wurden die unmarkierten CD45-negativen Zellen, welche das System ungehindert passierten, nach einem einmaligen Waschschrift in entsprechender Konzentration (siehe oben) ausgesät und weiterkultiviert.

3.2.2. Kultivierung der MSCs

Für die folgenden Versuche wurden die nach Punkt 3.2.1., Isolierung der MSCs, gewonnenen Zellen verwendet. Diese wurden in 25 cm^2 -Zellkulturflaschen in 5 ml Kulturmedium im Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Einmal wöchentlich wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:25 in neue Kulturflaschen umgesetzt.

3.2.3. Stimulation der MSCs

Die Zellen wurden für die weiteren Untersuchungen in einer Konzentration von 3×10^4 Zellen/well in einer 6-well-Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ (100 U/ml) \pm $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml) über 48 Stunden.

3.2.4. FACS-Analyse

Die Durchflusszytometrie stellt eine etablierte Methode zur Charakterisierung der Zellen hinsichtlich ihrer Größe und Granularität dar. Weiter können zur Analyse bestimmter Oberflächenmarker fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen Oberflächenproteine der CD-Klassifizierung verwendet werden. Hierbei wird nach exakter Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes durch einen Laserstrahl die zugeführte Energie in Form von Photonen

emittiert, die durch den Photodetektor registriert werden. Die emittierten Photonen sind dabei proportional zur Menge an gebundenem Antikörper/Zelle. In dieser Arbeit wurden die Farbstoffe FITC und PE verwendet. Die FACS-Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt.

- Zellen aus einer 25 cm²-Kulturflasche mit 5 ml EDTA (1 %) über 5 min bei 37°C ablösen
- Reaktion mit FACS-Puffer (PBS + 1% FCS) abstoppen und zentrifugieren (490 x g, 5 min)
- Aufteilen der Zellen auf FACS-Röhrchen zu 400.000 Zellen/Röhrchen
- Blockierung der unspezifischen F_c-Bindungsstellen durch Inkubation der Zellen für 15 min mit einer 1%igen F_c-Block-Lösung (CD16/CD32) im Verhältnis 1:1 bei 4°C
- Inkubation der Zellen mit jeweils einem FITC-markierten AK und einem PE-markierten AK in einer Endkonzentration von 1% für 30 min lichtgeschützt bei 4°C
- Zentrifugation der Proben für 5 min bei 490 x g und anschließendes Verwerfen des Überstandes
- Aufnehmen des Pellets in 250 µl FACS-Puffer und Zugabe von 250 µl Formalinlösung (4%). Inkubation der Probe abgedunkelt für 20 min bei Raumtemperatur.
- Entfernung des Formalins durch zweimaliges Waschen mit 1 ml FACS-Puffer.
- Aufnahme des Pellets in 300 µl FACS-Puffer und abgedunkelte Lagerung bei 4°C bis zur Messung

Es wurde eine Reihe verschiedener Oberflächenmarker untersucht (Tab. 4). Die FACS-Analyse erfolgte mit dem FACS Calibur Gerät der Firma BD Biosciences. Die erfassten Rohdaten wurden per Computer mit der Software WinMDI Version 2.9 ausgewertet (©Joseph Trotter).

Marker	Alternativbezeichnung	Vorkommen	Funktion
CD29	Integrin β 1	Leukozyten, Fibroblasten, Endothel, Epithel	Adhäsion, VCAM-Rezeptor
CD31	PECAM-1	Leukozyten, Endothel	Adhäsion, Signaltransduktion
CD34	Mucosialin	Stammzellen, Endothel	Adhäsion, Ligand für CD62L

CD39	E-NTPD	Lymphozyten, Monozyten, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen	Ectonucleosid-triphosphat-diphosphohydrolase
CD44	Pgp-1	Leukozyten	Adhäsion, Lymphozytenhoming
CD45	LCA	Leukozyten, erythrozytäre Vorläufer	Tyrosinphosphatase, Leukozytenaktivierung
CD54	ICAM	Lymphozyten, Monozyten, Endothel	Adhäsion, T-Zell-Kostimulation
CD62L	L-Selektin	Leukozyten	Adhäsion, Lymphozytenhoming
CD73	Nt5e	Regulatorische T-Zellen, Knochenmarkszellen	Ecto-5-Nucleotidase, Adhäsion, T-Zell-Kostimulation
CD90.2	Thy-1	Thymozyten, Neurone, T-Zellen, hämatopoetische Zellen	Hämatopoetische sowie neuronale Differenzierung, T-Zell-Aktivierung
CD105	Endoglin	Endothel, Makrophagen, Knochenmarkszellen	Adhäsion, TGF β -Rezeptor, Angiogenese
CD106	VCAM	Endothel	Zelladhäsion (Leukozyten) an vaskulärem Endothel
CD117	c-kit	Hämatopoetische Stamm- und -vorläuferzellen	SCF-Rezeptor
CD133	Prominin-1	Hämatopoetische Vorläuferzellen	Unbekannt
CD140b	PDGF-Rezeptor β	Fibroblasten, glatte Muskulatur, Glia, Chondrozyten	Signaltransduktion, PDGF-Rezeptor
CD309	Flk	Endothel	VEGF-Bindung
Sca-1	Ly6A/E	Multipotente hämatopoetische Stammzellen	T- und B-Zell-Aktivierung

Tabelle 4: Untersuchte Oberflächenmoleküle auf den MSCs

3.2.5. Ausdifferenzierung der MSCs

Um das Differenzierungspotential der mesenchymalen Stammzellen und damit ihre Multipotenz nachzuweisen, wurden die Zellen sowohl in Adipozyten, Osteoblasten als auch Chondrozyten differenziert.

3.2.5.1. Differenzierung in Adipozyten

Die Zellen wurden in einer Dichte von 7.500 Zellen/cm² in einer 12-well-Platte ausgesät und für vier Tage in ihrem regulären Kulturmedium im Inkubator kultiviert.

Anschließend wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen für zehn Tage mit Differenzierungsmedium für Adipozyten bedeckt. Während diesem Zeitraum wurde alle vier Tage ein Mediumwechsel vorgenommen. Um den Erfolg der Differenzierung darzustellen, wurden die Zellen mit der für Lipidvakuolen spezifischen Oil Red O Färbung behandelt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Medium entfernen und Zellen 1x mit kaltem PBS waschen
- Zellen in Formalinlösung (10%) in PBS für 5 min bei RT inkubieren und anschließend Formalin durch Waschen entfernen
- Wiederholung der Fixierung mit Formalinlösung (10%) in PBS für 60 min bei RT
- Vorbereitung der Oil Red O Gebrauchslösung:
3 Teile Oil Red O Stammlösung (0,5%) im Verhältnis 3:2 mit destilliertem Wasser mischen, für 20 min bei Raumtemperatur inkubieren und anschließend durch einen Sterilfilter (0,22 µm) filtrieren
- Formalin von den wells entfernen und 1x mit Isopropanol (60%) in destilliertem Wasser waschen
- Isopropanol entfernen und wells trocknen lassen
- Oil Red O Gebrauchslösung zugeben und 120 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Oil Red O Lösung entfernen und 2x mit destilliertem Wasser waschen
- Isopropanol (60%) in die wells geben und für 30 sec unter leichtem Schütteln inkubieren
- 3x mit destilliertem Wasser waschen
- Fotodokumentation

3.2.5.2. Differenzierung in Osteoblasten

Die Zellen wurden in einer Dichte von 7.000 Zellen/cm² in einer 12-well-Platte ausgesät und für vier Tage in ihrem regulären Kulturmedium im Inkubator kultiviert, so dass die Zellen eine Konfluenz von 75% erreichten.

Anschließend wurde das Differenzierungsmedium für Osteoblasten zugegeben und die Zellen über 18 Tage kultiviert, wobei zweimal pro Woche ein Mediumwechsel vorgenommen wurde. Zum Nachweis der Differenzierung wurde die Von-Kossa-Färbung nach nachfolgendem Protokoll verwendet. Die Färbemethode dient dem Nachweis von Kalziumablagerungen bzw. Kalziumsalzen in der Zelle. Hierbei wird in einer Austauschreaktion das Zellkalzium durch die in der Färbung enthaltenen Silberionen ersetzt. Anschließend können diese durch die reduzierende Behandlung mit UV-Licht als schwarze Ablagerungen sichtbar gemacht werden.

- Medium entfernen und Zellen 1x in PBS waschen
- Zellen in Formalinlösung (10%) in PBS für 15 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 3 x gründlich mit destilliertem Wasser waschen
- 5%iges Silbernitrat in destilliertem Wasser zugeben und für 30 min bei Raumtemperatur unter UV-Licht inkubieren
- 3 x mit destilliertem Wasser waschen
- Pyrogallol (1%) in destilliertem Wasser zugeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Pyrogallol entfernen und 1x mit Natriumthiosulfat (5%) waschen
- 2 x mit destilliertem Wasser waschen
- Dokumentation der Färbung

3.2.5.3. Differenzierung in Chondrozyten

Zur Ausdifferenzierung der MSCs in Chondrozyten wurden die Zellen aus einer 25 cm²-Kulturflasche gewonnen und eine konzentrierte Zellsuspension mit 8 x 10⁶ Zellen/ml hergestellt. Hiervon wurden 10 µl als Tropfen in die Mitte eines wells einer 12-well-Platte pipettiert und die Zellen für drei Stunden im Inkubator kultiviert. Anschließend konnte das well mit Differenzierungsmedium für Chondrozyten überschichtet und die Zellen für 14 Tage im Differenzierungsmedium kultiviert werden, wobei zweimal pro Woche ein Mediumwechsel vorgenommen wurde. Zum Nachweis der Differenzierung wurde die Alcian-Blau-Färbung nach nachfolgendem Protokoll verwendet.

- Medium entfernen und Zellen 1x in PBS waschen
- Zellen in Formalinlösung (4%) in PBS für 15 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 3x gründlich mit PBS waschen
- Inkubation für 60 min mit 1%igem Alcian-Blau in 0,1M HCl bei Raumtemperatur
- 3x mit 0,1M HCl waschen
- Dokumentation der Färbung

3.2.6. RNA-Isolierung

Die RNA für die Zellcharakterisierung mittels PCR wurde aus Zellen eines konfluenten wells einer 6-well-Platte gewonnen. Die Extraktion erfolgte mittels des High Pure RNA Isolation Kits von Roche®. Hierzu wurde das well einmalig mit PBS gewaschen und die Zellen mit 0,4 ml Lyse- und Bindungspuffer bedeckt, wodurch die Lyse der Zellmembranen sowie die Inaktivierung der RNasen bewirkt wurde. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und die gelöste Suspension in 200 µl PBS überführt. Die Probe wurde daraufhin auf ‚High Pure Filter Tubes‘ pipettiert und 15 sec bei 8.000 x g zentrifugiert, wodurch eine Bindung der Nukleinsäuren an die Glasfasern des Filters erreicht werden konnte. Das Zentrifugat wurde verworfen. Kontaminierende genomische DNA wurde durch einen DNase-Verdau mit 90 µl DNase Incubation Buffer und 10 µl DNase I für 15 min bei Raumtemperatur entfernt. Anschließend wurden drei Waschschrte zur Aufreinigung der RNA durchgeführt, wodurch zelluläre Verunreinigungen, Salze und Proteine entfernt wurden. Letztlich wurde die RNA in 50 µl des Elutionspuffers eluiert.

Die Konzentration der isolierten RNA wurde anschließend durch Messung der optischen Dichte (OD) mit einem Photometer (Eppendorf) bestimmt. Die RNA wurde hierzu 1:14 in Elutionspuffer verdünnt und die OD bei 260 nm und 280 nm nach Kalibrierung des Photometers mit Elutionspuffer gemessen.

Die so gewonnene RNA konnte sofort verwendet oder bei -80°C gelagert werden.

3.2.7. cDNA-Synthese

Die gewonnene RNA wurde anschließend in einer reversen Transkriptase-Reaktion zur Synthese komplementärer DNA (cDNA) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen enzymatisch katalysierten Prozess, bei dem ein RNA-Template durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase in eine komplementäre DNA transkribiert wird.

Für die Reaktion wurde das Omniscript RT Kit von Qiagen verwendet. Alle verwendeten Reagenzien wurden auf Eis aufgetaut und verarbeitet. Das Volumen der eingesetzten RNA richtete sich nach der zuvor ermittelten Konzentration. Es wurde jeweils 1 µg RNA umgeschrieben. Die Reaktion wurde entsprechend folgender Tabelle (Tab. 5) angesetzt.

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration in der Reaktion
Master-Mix		
10 x RT-Puffer	2,0 µl	1x
dNTP-Mix	2,0 µl	0,5 mM pro dNTP
Oligo-(dT)-Primer	2,0 µl	1 µM
RNase-Inhibitor	1,0 µl	10 Units
Omniscript Reverse Transkriptase	1,0 µl	4 Units
RNase-freies Wasser	Variabel	-
Template-RNA		
Template-RNA	Variabel	1 µg
Gesamtvolumen	20,0 µl	-

Tabelle 5: Reaktionsansatz der reversen Transkription

Der Reaktionsansatz wurde im Heizblock für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend konnte die so synthetisierte cDNA sofort verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

3.2.8. RT-PCR

Die RT-PCR stellt eine Methode dar, welche auf dem Prinzip der herkömmlichen DNA-Amplifikation mittels PCR basiert und die der Quantifizierung spezifischer DNA-Fragmente dient. Diese wird durch eine kontinuierliche Messung eines Fluoreszenzsignals bewerkstelligt, das während der PCR proportional zur Menge des Amplifikationsproduktes ansteigt. Das

Reaktionsgemisch enthält neben denaturierter DNA und spezifischer Primer einen Fluoreszenzfarbstoff, der zunächst in einem ungebundenen Zustand vorliegt, in welchem er nur eine zu vernachlässigende Grundfluoreszenz aufweist. Nach dem Annealingprozess des Primers ist es einigen Farbstoffmolekülen möglich, an den Doppelstrang zu binden. Die Anzahl der gebundenen Moleküle steigt im Laufe der Elongation weiter an, wodurch es zu einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals kommt, welches bei kontinuierlicher Messung in Echtzeit beobachtet werden kann. Während des folgenden Denaturierungsschrittes im nächsten Zyklus kommt es zur Ablösung der gebundenen Farbstoffmoleküle und das Fluoreszenzsignal nimmt zeitweilig ab. Die Fluoreszenzmessung am Ende jedes Elongationsschrittes bei einer Fluoreszenzintensität von 530 nm fungiert demnach als Maß für die Anzahl der amplifizierten DNA-Fragmente.

In dieser Arbeit wurde die Methode der RT-PCR zur Quantifizierung des β -Aktin Gehalts der cDNA-Proben verwendet, um eine Normierung des cDNA-Templates für die PCR-Reaktion zu erreichen. Die für die Quantifizierung der cDNA-Proben benötigte Standardkurve wurde durch serielle Verdünnung des Standards generiert, wobei vier Verdünnungen von 1×10^4 - 1×10^7 Aktinkopien verwendet wurden. Des Weiteren wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde entsprechend Tabelle 6 in gekühlte Light-Cycler Kapillaren der Firma Roche® pipettiert und die DNA nach nachfolgendem Temperaturprofil (Tab. 7) amplifiziert, wobei die Schritte 2-4 in 40 Zyklen wiederholt wurden.

Komponente	Probenreaktionsvolumen	Standardreaktionsvolumen
Master-Mix		
Wasser	10,0 μ l	7,0 μ l
5'-Primer	2,0 μ l	2,0 μ l
3'-Primer	2,0 μ l	2,0 μ l
Master-Mix	4,0 μ l	4,0 μ l
Template		
cDNA / Standard	2,0 μ l	5,0 μ l
Gesamtvolumen	20,0 μl	20,0 μl

Tabelle 6: PCR-Mix der RT-PCR

		Dauer [sec]	Temperatur [°C]
1)	Vorinkubation	120	95
2)	Denaturierung der DNA	10	95
3)	Annealing der Primer	2	68
4)	Extension	25	72

Tabelle 7: Temperaturprofil der RT-PCR

Es wurden β -Aktinprimer folgender Sequenzen verwendet:

5'- ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA -3'

3'- GCC ACA GGA TTC CAT ACC CA -5'

3.2.9. PCR

Im Anschluss an die Quantifizierung des β -Aktingehalts wurden spezifische Fragmente der gewonnenen cDNA in einer Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Hierzu wurde das PCR-Kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase von Promega verwendet.

Der Mastermix (Tab. 8) wurde auf Eis in geeignete PCR-Tubes vorpipettiert und anschließend deionisiertes Wasser und das cDNA-Template hinzugegeben.

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration in der Reaktion
Master-Mix		
5x Green Flexi Go Taq Flexi Buffer	5,0 μ l	1x
MgCl ₂	1,0 / 2,0 / 3,0 μ l	1,5 / 2 / 3 mM
dNTP-Mix	0,5 μ l	je 0,2 mM
5'-Primer	0,25 μ l	0,50 μ M
3'-Primer	0,25 μ l	0,50 μ M
Taq-Polymerase	0,125 μ l	1.25 u
Deionisiertes Wasser	Variabel	
Template		
Template-cDNA	Variabel	
Gesamtvolumen	25 μl	

Tabelle 8: Master-Mix der Polymerase-Kettenreaktion (Promega)

Die Menge an eingesetztem Template wurde anhand des zuvor mittels der RT-PCR ermittelten Akttingehalts auf 500.000 Aktinkopien normiert. Die optimale Menge an $MgCl_2$, welche der Reaktion zugesetzt wurde, richtete sich nach dem verwendeten Primer (Tab. 9) und wurde in Vorversuchen mittels PCR ermittelt. Die cDNA wurde im Thermocycler nach folgendem Temperaturprofil (Tab. 10) amplifiziert, wobei die Schritte 2-4 in 35 Zyklen wiederholt wurden.

cDNA-Fragment	Primersequenz (A: 5'-Primer, B: 3'-Primer)	Produktlänge [Bp]	Annealingtemperatur [°C]	$MgCl_2$ [mM]
β-Aktin	A: ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA B: GCC ACA GGA TTC CAT ACC CA	342	58	2,0
IDO	A: GTA CAT CAC CAT GGC GAT TG B: GCT TTC GTC AAG TCT TCA TTG	741	55	3,0
COX-2	A: TTT GTT GAG TCA TTC ACC AGA CAG AT B: CAG TAT TGA GGA GAA CAG ATG GGA TT	371	58	1,0

Tabelle 9: Verwendete Primersequenzen der PCR-Primer

		Dauer [sec]	Temperatur [°C]
1)	Aktivierung der DNA Polymerase	120	95
2)	Denaturierung der DNA	30	95
3)	Annealing der Primer	30	(primerspezifisch)
4)	Extension	60	72
5)	Abschließende Extension	300	72

Tabelle 10: Temperaturprofil für die Amplifikation spezifischer cDNA-Fragmente

Anschließend wurden die mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente über eine Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Diese molekularbiologische Methode dient der Auftrennung der DNA in einem elektrischen Feld, bei dem die DNA durch ihre negative Ladung zur positiv geladenen Anode wandert. Aufgrund der unterschiedlichen größenabhängigen Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente kommt es dabei zu einer Auftrennung. Zur Detektion der DNA-Banden wird der Farbstoff Ethidiumbromid, welcher zwischen die Basen der DNA interkaliert und bei UV-Licht visualisiert werden kann, in einer Endkonzentration von 1 µg/ml in das 2%ige Agarosegel eingearbeitet. Es wurden je 20 µl des PCR-Produkts sowie ein Molekulargewichtsmarker (100 bp DNA Ladder) zur Bestimmung der Fragmentlänge der amplifizierten DNA auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1 x

TAE-Puffer. Die Elektrophorese erfolgte bei 110 Volt (constant voltage) für 45 min in einem System der Firma Bio-Rad. Die durch Fluoreszenz unter UV-Licht detektierten Banden der amplifizierten DNA wurden mittels eines Geldokumentations-Systems (Intas) photographisch festgehalten.

3.2.10. Western-Blot

Der Western-Blot dient dazu, einzelne Proteine eines Proteingemisches mit Hilfe einer Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. Anschließend können die auf eine Membran transferierten Proteinbanden über Antikörper identifiziert werden. Hierbei binden spezifische Primärantikörper an der entsprechenden Proteinbande auf der Membran. Mit Hilfe eines enzymatisch markierten Sekundärantikörpers kann anschließend nach Zugabe des passenden Substrats die Proteinbande visualisiert werden.

In dieser Arbeit wurde mittels dieser Methode die Expression von IDO auf Proteinebene untersucht.

3.2.10.1. Probengewinnung

Die Zellen wurden entsprechend Punkt 3.2.3., Stimulation der MSCs, vorbereitet und behandelt. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von Trypsin über 5 min im Inkubator von der Kulturplatte gelöst und zweimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte bei 283 x g über 8 min bei 4°C. Das Zellpellet wurde darauf in 400 µl RIPA-Puffer, der unmittelbar vor der Verwendung mit einer Tablette Proteinaseinhibitor (complete, Mini) / 10 ml versetzt worden war, aufgenommen und über 45 min unter Schütteln auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt über 10 min bei 11.000 x g und 4°C wurde der Überstand abgenommen. Die Proben wurden sofort verwendet oder bei -20°C gelagert.

In Vorbereitung für die Elektrophorese wurden die Proben 1:5 mit 5x SDS-Puffer versetzt und anschließend bei 99°C über 5 min denaturiert. Die Positivkontrolle in Form von 2 µg rekombinantem IDO-Protein wurde mit RIPA-Puffer verdünnt, um ein äquivalentes Probenvolumen zu erhalten und ebenfalls mit 5x SDS-Puffer versetzt und denaturiert.

3.2.10.2. SDS-Gelelektrophorese

Um das Polyacrylamidgel zu fertigen, wurden zunächst zwei Glasplatten mit Hilfe von speziellen Abstandshaltern zu einer Gießmatrize montiert. Anschließend wurde das 10%ige Trenngel zwischen die Platten gegossen, und nach circa 45 min wurde das auspolymerisierte Gel mit dem Sammelgel überschichtet. Unmittelbar nach dem Gießen wurde ein 10-zähliger Kamm in das Sammelgel eingebracht, wodurch die Taschen des Gels geformt wurden. In diese wurden im Anschluss an die Aushärtung des Gels jeweils 30 µl der vorbereiteten Proben aufgetragen. Auf jedem Gel wurden zusätzlich ein Proteingrößenmarker sowie die Positivkontrolle (0,25 µg rekombinantes mouse-IDO) mitgeführt. Das Gel wurde anschließend in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingebracht und die Proteine bei 80 V über 90 min elektrophoretisch getrennt.

3.2.10.3. Membrantransfer

Nach Beendigung der Elektrophorese konnte das Polyacrylamidgel auf eine zuvor mit Methanol aktivierte PVDF-Membran aufgebracht werden. Umgeben von mit Transferpuffer getränktem Filterpapier und -flies wurde der Membran/Gel-Komplex in die Blotkammer eingespannt. Diese wurde mit Transferpuffer gefüllt und eine Spannung von 150 mA über 90 min angelegt, um die Proteine aus dem Gel auf die Membran zu transferieren.

3.2.10.4. Antikörperinkubation und Signalentwicklung

Im Anschluss an den Transfer wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit Blockierungspuffer über eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler blockiert. Die Inkubation des Primärantikörpers (anti-mIDO) fand in einer Verdünnung von 1:1000 in 1% Magermilch in TBST über Nacht bei 4°C statt. Daraufhin wurde die Membran dreimal über 5 min in TBST gewaschen, bevor der Sekundärantikörper (goat anti-rat-IgG-AKP) in einer Verdünnung von 1:500 in 1% Magermilch in TBST über eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach weiteren drei Waschschritten mit TBST über 5 min wurde das Färbereagenz (1 Tablette NBT/BCIP / 10 ml destilliertes Wasser) aufgebracht und für 4-5 min inkubiert. Abschließend wurde die Membran zweimalig mit destilliertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet.

3.2.11. Untersuchung der Sekretionsprodukte der MSCs

Die Untersuchung der Zellkulturüberstände erfolgte über verschiedene photometrische Messungen, bei denen jeweils die Extinktionen der Proben mittels eines ELISA-Readers gemessen und verrechnet wurden.

3.2.11.1. Kynurenin

Die Analyse des Tryptophankataboliten Kynurenin wurde verwendet, um die Aktivität des Enzyms Indolamin-2,3-dioxygenase nachzuweisen. Hierzu wurden die MSCs in einer Dichte von 3×10^4 Zellen/well in eine 96-well-Flachbodenplatte ausgesät. Die Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 200 µl Versuchsmedium zur Kynureninbestimmung unstimuliert oder stimuliert mit IFN γ (100 U/ml) \pm TNF α (10 µg/ml) über 72 Stunden im Inkubator kultiviert. Anschließend wurden 160 µl des Überstandes in eine 96-well-Rundbodenplatte überführt und 10 µl 30%ige Trichloressigsäure/well zugegeben. Die Proben wurden über 30 min bei 50°C inkubiert, um das N-Formyl-Kynurenin zu Kynurenin zu hydrolysieren. 100 µl des Gemisches wurden in eine 96-well-Flachbodenplatte überführt und 100 µl 1,2%iges (Dimethylamino)-Benzaldehyd (Ehrlich's Reagenz) in Eisessig zugefügt. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur konnte die Extinktion bei 492 nm mittels eines Multiplate-ELISA-Readers gemessen werden. Die Konzentration des Kynurenins wurde anschließend unter Zuhilfenahme einer L-Kynureninstandardkurve errechnet [Däubener et al., 1994].

Die Messung des Kynurenins wurde freundlicherweise von Frau Kathrin Heseler, Arbeitsgruppe Däubener, Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, durchgeführt.

3.2.11.2. Zytokine und Wachstumsfaktoren

Lösliche Faktoren in den Zellkulturüberständen der MSC/Lymphozyten-Kokultur wurden mittels ELISA-Kits der Firma R&D zum Nachweis von HGF und TGF β 1 untersucht. Der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren auf der Basis einer enzymatischen Färbereaktion. Bei den hier verwendeten Kits handelte es sich um sogenannte Sandwich-ELISA. Bei dieser Technik kommen zwei Antikörper, welche beide spezifisch an das zu untersuchende Antigen binden,

zum Einsatz. Hierbei wird der erste Antikörper (*coating*-Antikörper) an eine 96-well-Mikrotiterplatte gebunden. Anschließend kann das in der Probe enthaltene Antigen an die in der Platte fixierten Antikörper binden. Der mit Biotin markierte Detektions- (*detection*)-Antikörper seinerseits bindet ebenfalls an das Antigen, wodurch ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. Anschließend kann mittels an Streptavidin gebundene Meerrettichperoxidase (HRP) ein zugegebenes chromogenes Substrat umgesetzt werden, so dass ein Farbumschlag entsteht. Im Anschluss daran kann die Farbintensität in einen ELISA-Reader gemessen und die Antigenkonzentration der Probe durch eine mitgeführte Standardkurve quantifiziert werden.

Die verwendeten Proben wurden aus einer MSC-Lymphozyten-Kokultur gewonnen. Hierzu wurden die Zellen entsprechend den Punkten 3.2.12.1., Splenozytenpräparation, und 3.2.12.2., MCS-Präparation, vorbereitet. Anschließend wurden 3×10^4 MSCs (unstimuliert oder vorstimuliert) alleine oder zusammen mit 3×10^4 Lymphozyten in einer 48-well-Platte in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml Medium zum Proliferationsassay kultiviert. Die Überstände wurden nach 60 Stunden abgenommen und für die weiteren Versuche verwendet. Die Assays wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt und ausgewertet. Die Konzentrationen von HGF und TGF β 1 wurden aus Doppelwertbestimmungen ermittelt.

3.2.11.2.1. Hepatocyte growth factor - ELISA

Zunächst wurde eine 96-well-Mikrotiterplatte über Nacht mit dem coating-Antikörper in einer Konzentration von 0,8 μ g/ml beschichtet. Anschließend wurden die wells mehrmals mit Waschpuffer (PBS + 0,05% Tween20) gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen mit 1% BSA in PBS über eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem ELISA-Schüttler (400 rpm) blockiert. Sämtliche im Folgenden als Inkubation bezeichneten Reaktionsschritte fanden, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur auf dem ELISA-Schüttler mit 400 rpm statt und endeten mit einem Waschschrift. Im Anschluss wurden jeweils 100 μ l der Probe beziehungsweise des jeweiligen Standards über zwei Stunden inkubiert. Als Standard wurde eine lineare Verdünnungsreihe (1:2) von rekombinantem HGF ausgehend von 1000 pg/ml bis 15,625 pg/ml erstellt. Der Detektionsantikörper wurde in einer Konzentration von 200 ng/ml aufgebracht und für zwei Stunden inkubiert. Daraufhin wurde das mit Peroxidase markierte Streptavidin den wells zugegeben und für weitere 20 min lichtgeschützt inkubiert. Im Anschluss wurde die Substratlösung mit 100 μ l/well aufgebracht und für 15 min inkubiert. Ohne einen zwischengeschalteten Waschschrift wurde die Enzymreaktion mit 50 μ l/well

Stopplösung beendet und die Platte innerhalb von 30 min mittels eines ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Korrekturwellenlänge von 620 nm ausgelesen.

3.2.11.2.2. Transforming growth factor β 1 - ELISA

Zunächst wurde eine 96-well-Mikrotiterplatte über Nacht mit dem coating-Antikörper in einer Konzentration von 4,0 μ g/ml beschichtet. Anschließend wurden die wells mehrmals mit Waschpuffer (PBS + 0,05% Tween20) gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen mit 0,5% Tween20 in PBS über eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem ELISA-Schüttler (400 rpm) blockiert. Sämtliche im Folgenden als Inkubation bezeichneten Reaktionsschritte fanden, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur auf dem ELISA-Schüttler mit 400 rpm statt und endeten mit einem Waschschrift. Während des Blockierungsvorganges wurden die Proben zunächst aktiviert, indem jeweils 0,5 ml der Probe für 10 min bei Raumtemperatur mit 0,1 ml 1 N HCl versetzt wurden. Im Folgenden wurden die Proben durch Zugabe von 0,1 ml 1,2 N NaOH/0,5 M Hepes neutralisiert. Anschließend wurden jeweils 100 μ l der Probe beziehungsweise des jeweiligen Standards über zwei Stunden inkubiert. Als Standard wurde eine lineare Verdünnungsreihe (1:2) von rekombinantem TGF β 1, ausgehend von 1000 pg/ml bis 15,625 pg/ml, erstellt. Der Detektionsantikörper wurde in einer Konzentration von 200 ng/ml aufgebracht und für zwei Stunden inkubiert. Daraufhin wurde das mit Peroxidase markierte Streptavidin den wells zugegeben und für weitere 20 min lichtgeschützt inkubiert. Im Anschluss wurde die Substratlösung mit 100 μ l/well aufgebracht und für 15 min inkubiert. Ohne einen zwischengeschalteten Waschschrift wurde die Enzymreaktion mit 50 μ l/well Stopplösung beendet und die Platte innerhalb von 30 min mittels eines ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Korrekturwellenlänge von 620 nm ausgelesen.

3.2.11.3. Prostaglandin E_2

Die quantitative Bestimmung der Prostaglandin E_2 -Konzentration in den Zellkulturüberständen wurde mittels eines kompetitiven PGE₂-Immunoassays der Firma R&D durchgeführt. Dieser Assay bedient sich eines monoklonalen Antikörpers gegen PGE₂, der in kompetitiver Weise sowohl PGE₂ der Probe als auch mit Peroxidase-markiertes PGE₂ des Assays bindet. Hierauf kommt es mit Hilfe des Fc-Teils des monoklonalen Antikörpers zu einer Bindung an die mit goat-anti-mouse Antikörpern beschichtete Platte. Nach viermaligem

Waschen kann mit Hilfe der zugegebenen Substratlösung die gebundene Enzymaktivität mittels Farbumschlag bestimmt werden. Die Farbentwicklung kann darauf über die Absorption bei 450 nm gemessen werden. Hierbei ist die Farbentwicklung invers proportional der PGE₂-Konzentration der Probe.

Die verwendeten Proben wurden analog der Probengewinnung unter Punkt 3.2.11.2., Zytokine und Wachstumsfaktoren, gewonnen und unmittelbar verarbeitet. Der Assay wurde entsprechend den Herstellerangaben zur ‚regular sensitivity assay option‘ durchgeführt und ausgewertet. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe (1:2) von PGE₂ ausgehend von 2500 pg/ml bis zu 39 pg/ml verwendet. Jeweils 100 µl der Probe beziehungsweise des jeweiligen Standards wurden mit 50 µl Primärantikörper sowie 50 µl konjugiertem PGE₂ über zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem ELISA-Schüttler inkubiert (400 rpm). Anschließend wurde nach viermaligem Waschen 200 µl Substratlösung zugegeben und weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Inkubationsschritt erfolgte jedoch lichtgeschützt auf der Arbeitsplatte. Die Enzymreaktion wurde hierauf mit 50 µl Stopplösung beendet und die OD mittels eines Tecan Multiplate Readers bei einer Wellenlänge von 450 nm innerhalb von 30 min gemessen.

3.2.11.4. Phosphat

Zur indirekten Bestimmung der Phosphataseaktivität der NTPDase 1 (CD39) sowie der Ecto-5-Nucleotidase (CD73) wurde die Phosphatkonzentration bestimmt. Der Assay wurde in Anlehnung an eine von Wu et al., 2006 beschriebene Methode durchgeführt.

Die Zellen wurden in einer 24-well-Platte ausplattiert und stimuliert mit IFN γ (100 U/ml) \pm TNF α (10 ng/ml) oder unstimuliert bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Anschließend wurden die Zellen nach einem dreimaligen Waschvorgang in Inkubationspuffer zur Phosphatbestimmung mit 200 µl Inkubationspuffer versetzt. Nach Zugabe von 1 mM ATP wurde der Ansatz für 20 min bei 37°C inkubiert. Dem Inkubationsschritt folgend wurden 100 µl Überstand/well gewonnen und in ein Eppendorfröhrchen überführt. Die Reaktion wurde unverzüglich auf Eis gestellt und durch die Zugabe von 200 µl 7,5%iger Trichloressigsäure/Probe gestoppt. Jeweils 20 µl der Probe wurden auf eine 96-well-Platte überführt, mit 60 µl destilliertem Wasser und 200 µl Malachit-Grün-Reagens versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe von KH₂PO₄ mitgeführt. Die OD wurde zeitnah mittels eines Tecan Multiplate Readers bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen.

3.2.11.5. Adenosin

Die Analyse der Adenosinkonzentration in den Zellkulturüberständen erfolgte mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Hierbei handelt es sich um ein chromatographisches Trennverfahren, das neben der Trennung von Stoffen auch deren Identifikation und Quantifizierung dient.

Hierzu wurde eine variable Anzahl an MSCs (5×10^4 bzw. 10×10^4 Zellen) für 45 min mit 50 μ M ATP in Inkubationspuffer zur Phosphatbestimmung bei 37°C inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen, unter N₂ evaporiert, in 200 μ l deionisiertem Wasser resuspendiert und mittels HPLC analysiert [Sattler et al., 2011].

Die Probenpräparation wurde freundlicherweise von Frau Dr. Christine Sattler, Medizinische Klinik Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität, München, durchgeführt. Die Messung der Proben übernahm Frau Elke Fischer, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

3.2.12. Mitogen stimulierter Proliferationsassay

In der Lymphozytenreaktion wurde der Einfluss der MSCs auf die Proliferation CD90.2-positiver T-Lymphozyten, welche mittels Conavalin A (ConA) zur Teilung stimuliert wurden, untersucht. Hierbei fungierte ConA, welches dem Assay 24 Stunden nach Beginn in einer Endkonzentration von 5 μ g/ml zugegeben wurde, als starkes unspezifisches Mitogen. Die Proliferationsrate der stimulierten T-Lymphozyten wurde im Anschluss durch die Zugabe radioaktiv markierten ³H-Thymidins nachgewiesen. Beabsichtigt wird hierbei der Einbau des markierten Thymidins in das Erbmateriel der sich teilenden Zellen, wobei die anschließend nachweisbare Radioaktivität direkt proportional der Zellproliferation ist. Hierfür wurde 1 mCi steriles ³H-Thymidin/well verwendet, welches 96 Stunden nach Versuchsbeginn zugegeben wurde. Die radioaktiv markierten Zellen wurden nach 18 Stunden mittels einer Unterdruck-Saugvorrichtung, welche die Zellen auf einen Filter (UniFilter®-96, GF/C®, PerkinElmer) übertrug, geerntet („geharvestet“). Hierzu wurde nach nachfolgendem Protokoll vorgegangen: Zunächst wurde das System mit destilliertem Wasser gründlich vorgespült. Anschließend konnte die 96-well-Platte mit den radioaktiv markierten Zellen in das Gerät eingelegt und die Zellen auf den Filter übertragen werden. Hierbei wurde das nicht eingebaute ³H-Thymidin mittels eines fünfmaligen Waschvorgangs entfernt. Anschließend wurde die Filterplatte über

zehn Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und der Plattenboden mit einer Folie abgeklebt, um ein Versickern der nachfolgend zugegebenen Szintillationsflüssigkeit zu verhindern. Diese wurde nach dem Trocknungsvorgang auf die wells pipettiert (20 µl Szintillationsflüssigkeit/well) und die Filteroberfläche mit einer durchsichtigen Klebefolie verschlossen. Die so bearbeitete Filterplatte konnte anschließend im Kühlschrank bis zur Messung mit dem β -Counter gelagert werden.

Die Messung der Zellproliferation erfolgte an einem β -Counter der Firma PerkinElmer. Dieser ist in der Lage, von der Szintillationsflüssigkeit emittierte Lichtblitze, welche durch das Auftreffen der ionisierenden β -Strahlung des Tritiums (^3H) ausgelöst werden, zu detektieren.

In Vorversuchen wurden die optimalen Bedingungen hinsichtlich Medium, Zelldichte und Splenozyten/MSC-Verhältnis ermittelt. Für alle folgenden Versuche wurde ein Verhältnis von 1:1 gewählt, wobei die Zellen in einem Gesamtvolumen von 160 µl Medium zum Proliferationsassay in einer Dichte von $0,5 \times 10^5$ Zellen/well in einer 96-well-Rundbodenplatte ausgesät und kultiviert wurden.

3.2.12.1. Splenozytenpräparation

Für den Proliferationsassay wurden die Milzen aus Mäusen der Linie C57Bl/6 nach vorheriger inhalativer Isoflurannarkose und cervikaler Dislokation gewonnen.

Die Milz wurde mechanisch mittels eines Stempels einer 2 ml Spritze auf einem 70 µm Zellsieb zerkleinert und die Zellen mit Puffer (PBS + 10% FCS) ausgespült. Die so gewonnenen Zellen wurden bei 4°C und $310 \times g$ über 8 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 2 ml des Red Blood Cell Lysis Buffer von Sigma resuspendiert und die Erythrozyten über 4 min bei Raumtemperatur lysiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden etwaige grobe Verschmutzungen durch ein frisches Zellsieb entfernt und die Zellen nach dem Oberflächenmarker CD90.2 sortiert.

Die Markierung der Zellen mit den entsprechenden Beads fand analog der unter 3.2.1 beschriebenen Methode statt. In diesem Fall erfolgte jedoch eine Positivselektion, indem die CD90.2-negativen Zellen depletiert und die markierten Zellen für den weiteren Versuch verwendet wurden. Um diese Zellen zu gewinnen, wurde die Säule nach dem Sortiervorgang aus dem Magnetfeld entfernt und auf ein 15 ml-Falkon platziert. Anschließend konnten die

markierten Zellen mit 5 ml Puffer ausgespült und nach einmaligem Zentrifugieren in Medium aufgenommen und gezählt werden.

3.2.12.2. MSC-Präparation

Für die Lymphozytenreaktionen wurden mesenchymale Stammzellen der Passagen 25-55 verwendet. Die Zellen wurden in 25 cm²-Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von ca. 80% kultiviert. 48 Stunden vor dem Versuch erfolgte die Stimulation der Zellen nach folgendem Schema:

Bezeichnung	+ IFN γ	+ TNF α
	Endkonzentration: 100 U/ml	Endkonzentration: 10 ng/ml
Basal	-	-
MSC + IFN γ	+	-
MSC + IFN γ + TNF α	+	+

Tabelle 11: MSC-Stimulierung zur Verwendung im Proliferationsassay

Am Versuchstag wurden die Zellen einmal sanft mit PBS gewaschen und anschließend über zwei Stunden mit 50 μ g/ml Mitomycin C in RPMI-Medium im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA über zwei Minuten von den Kulturflaschen abgenommen und zweimal mit PBS + 10 % FCS gewaschen.

Mitomycin C interkaliert hierbei zwischen die DNA-Doppelstränge der Zelle, wodurch diese kovalent miteinander verbunden werden. In der Folge führt dies dazu, dass die DNA-Stränge nicht mehr voneinander dissoziieren können, wodurch die zur Zellteilung nötige Replikation unmöglich wird. Die Zelle wird hierdurch teilungsunfähig.

Die Notwendigkeit vitaler Zellen für die Genese des suppressiven Effektes wurde mittels fixierter Zellen untersucht. Hierzu wurden die MSCs von einer 25 cm²-Kulturflasche abtrypsinisiert und zweimal in PBS + 10% FCS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 20 min bei 4°C mit Formalinlösung (2%) in PBS + 10% FCS fixiert. Nach wiederholtem Waschen konnten die Zellen ausplattiert werden.

3.2.12.3. Analyse der immunsuppressiven Eigenschaften der MSCs

Zur weiteren Charakterisierung des immunsuppressiven Wirkmechanismus der mesenchymalen Stammzellen wurden in verschiedenen Ansätzen neben dem Basisversuch blockierende Substanzen zugegeben. Diese wurden gemeinsam mit den Zellen den wells zugefügt.

Substanz	Endkonzentration	Effekt
Anti-TGF β 1-AK	10 μ g/ml	Bindung von freiem TGF β 1
IgG1 (mouse)	10 μ g/ml	Isotypenkontrolle des Anti-TGF β 1-AK
Anti-HGF-Rezeptor-AK	1 μ g/ml	Blockierung des HGF-Rezeptors
IgG (goat)	1 μ g/ml	Isotypenkontrolle des Anti-HGF-Rezeptor-AK
APCP	100 μ M	Inhibition der Enzymaktivität von CD73
Indomethacin	20 μ M	Hemmung der Cyclooxygenase
SCH58261	25 μ M	Antagonist des A2A-Adenosin-Rezeptors

Tabelle 12: Inhibitoren und Antikörper im Proliferationsassay

3.2.13. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung wurde mit dem Computerprogramm Prism 3,0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Die angegebenen Werte wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels t-Tests untersucht. Unterschiede mit einem p-Wert $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Isolierung der mesenchymalen Stammzellen

Zunächst wurden die mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark 5-16 Wochen alter Balb/c-Mäuse isoliert. Hierzu wurde die Knochenmarkshöhle gespült und die in der Zellsuspension enthaltenen Erythrozyten mit hypotonem Puffer lysiert. Das anschließend ausgesäte Zellgemisch (Abb. 3A) wurde nach vier Tagen erstmalig nach der Eigenschaft der Plastikadhärenz selektiert. Hierdurch wurden ausschließlich die adhärenenten Zellen weiterkultiviert (Abb. 3B). Die an Tag 7 durchgeführte Depletion CD45-positiver Zellen führte zu einer homogenen adhärenenten Zellpopulation, die sich durch ihre spindelförmigen Ausläufer auszeichnete (Abb. 3C). Im Folgenden konnten die Zellen weiterkultiviert werden und erreichten nach circa 40 Tagen erstmalig eine vollständige Konfluenz in der Kulturflasche.

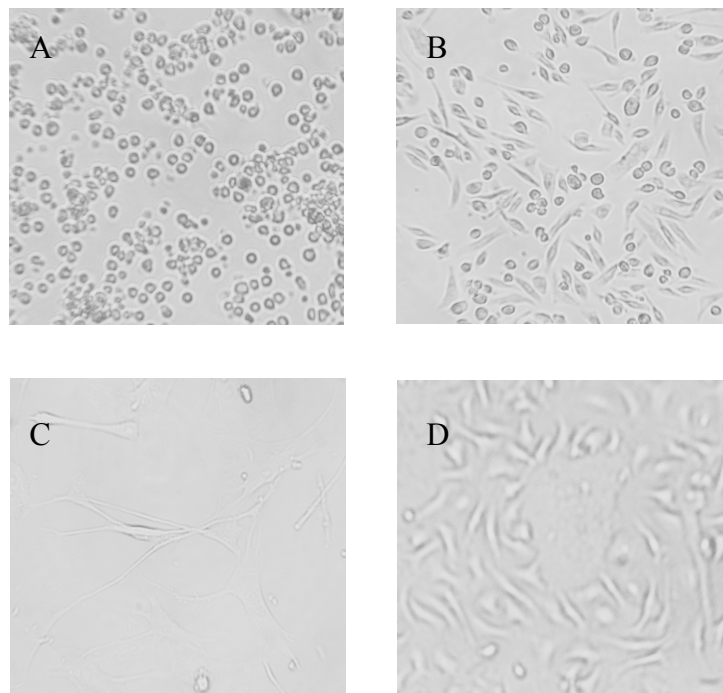


Abbildung 3: Fotografische Dokumentation der MSCs nach Isolierung an Tag 0 (A), 4 (B), 8 (C) und 34 (D).

4.2. Phänotypische Charakterisierung der mesenchymalen Stammzellen

Die Charakterisierung der so aus dem Knochenmark der Maus gewonnenen Zellen erfolgte mittels der Analyse des Oberflächenmarkerprofils sowie des Differenzierungspotentials.

4.2.1. Oberflächenmarkerprofil

Den mesenchymalen Stammzellen konnte bisher kein für sie spezifischer Oberflächenmarker zugewiesen werden, weshalb ihre Charakterisierung vornehmlich auf einem relativ variablen Markerprofil basiert. In der Durchflusszytometrie wurde nachgewiesen, dass die isolierten Zellen positiv für die MSC-assoziierten Marker CD29, CD44, CD73, CD105, CD140b sowie Sca-1 und VCAM und negativ für CD62L, CD117, CD133, Flk1 sowie ICAM waren (Abb. 4). Durch den fehlenden Nachweis der Expression der Oberflächenmarker CD31, CD34 sowie CD45 konnte eine Kontamination mit endothelialen Zellen (CD31), hämatopoetischen Stammzellen (CD34) und Leukozyten (CD45) ausgeschlossen werden.

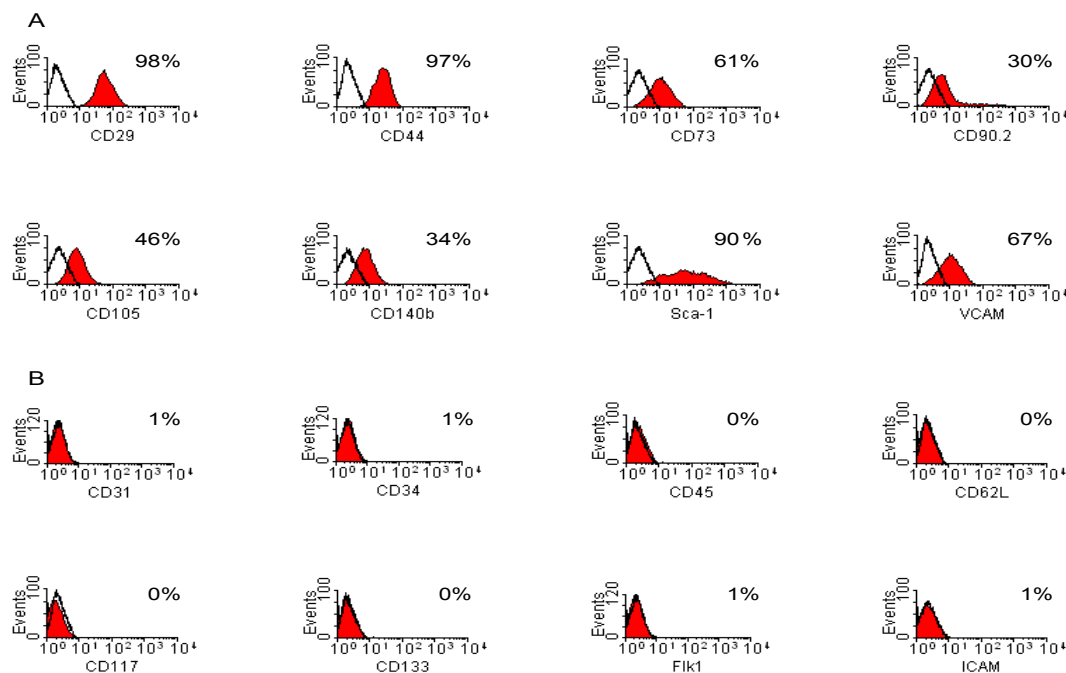


Abbildung 4: FACS-Färbung: Repräsentative Histogramme zur Expression von Oberflächenmarkern auf den MSCs (n = 5); rote Fläche = Färbung mit dem spezifischen Antikörper, weiße Fläche = Färbung mit der Isotypen-Kontrolle; A) Balb/c-MSCs exprimierten MSC-assoziierte Marker: CD29, CD44, CD73, CD90.2, CD105, CD140b, Sca-1 und VCAM, B) CD31, CD34, CD45, CD62L, CD117, CD133, Flk1 sowie ICAM wurden von den MSCs nicht exprimiert.

4.2.2. Differenzierungspotential

Nach einem 14-tägigen Ansatz konnte die Differenzierung der MSCs zu Adipozyten durch die Lipid-spezifische Oil Red O Färbung nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich eine Rotfärbung der in den Adipozyten befindlichen Fettvakuolen. Die Kontrollzellen hingegen konnten nicht angefärbt werden (Abb. 5).

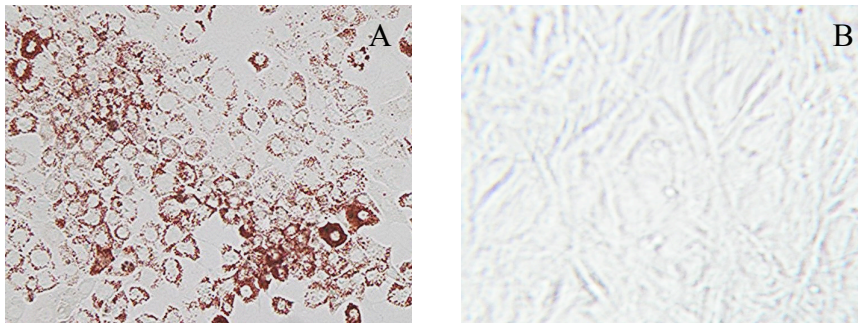


Abbildung 5: Oil Red O Färbung der zu Adipozyten differenzierten MSCs (A) sowie Kontrolle der Färbung (B).

Der Erfolg der MSC-Differenzierung zu Osteoblasten wurde mittels der Von-Kossa-Färbung gezeigt. Im Gegensatz zu den Kontrollen ließen sich in den differenzierten Zellen intrazelluläre Kalziumablagerungen nachweisen, welche in Form einer Schwarzfärbung sichtbar gemacht wurden (Abb. 6).

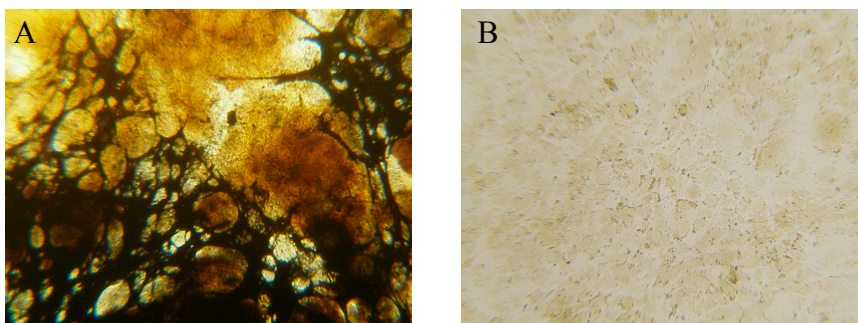


Abbildung 6: Von-Kossa-Färbung der zu Osteoblasten differenzierten MSCs (A) sowie Kontrolle der Färbung (B).

Das chondrogene Differenzierungspotential wurde in einem weiteren Ansatz überprüft. Hierzu wurden die Zellen über 14 Tage unter dem Zusatz spezifischer Faktoren kultiviert. Die

Bestätigung des Differenzierungserfolges erfolgte mittels der Alcianblau-Färbung, welche zu einer Blaufärbung der extrazellulären Proteoglykane der Knorpelmatrix führte. Die Färbung der Kontrolle hingegen verlief negativ (Abb. 7).

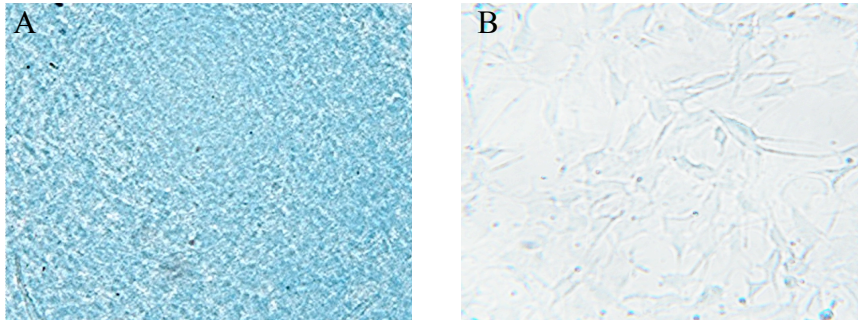


Abbildung 7: Alcianblau-Färbung der zu Chondrozyten differenzierten MSCs (A) sowie Kontrolle der Färbung (B).

4.3. Immunregulation der mesenchymalen Stammzellen durch Suppression der T-Zell-Proliferation

Die mesenchymalen Stammzellen wurden zunächst in einem Proliferationsassay in Hinblick auf ihre immunmodulierende Wirkung untersucht. Hierzu wurden die aus einer C57Bl/6-Maus isolierten T-Zellen über das unspezifische Mitogen ConA in einer Endkonzentration von 5 µg/ml zur Proliferation angeregt und dem Versuchsansatz unstimulierte oder mit IFN γ (100 U/ml) \pm TNF α (10 ng/ml) über 48 Stunden vorstimulierte MSCs hinzugefügt. Als Maß für die Proliferation wurde die Inkorporation von ^3H -Thymidin in counts/min (cpm) gemessen.

Es zeigte sich eine basale T-Zell-Proliferation nach Stimulation mit ConA von $40.510 \pm 377,7$ cpm. Durch die Zugabe von unstimulierten allogenen MSCs in einem Verhältnis von 1:1 wurde die Proliferation signifikant ($p < 0,0001$) auf 18.860 ± 1332 cpm supprimiert. Die Vorstimulation der MSCs mit IFN γ + TNF α über 48 Stunden führte im Gegensatz zur Vorstimulation mit IFN γ ($18.340 \pm 924,3$ cpm) zu einer etwas stärkeren Suppression auf 13.830 ± 6674 cpm. Dieser Unterschied erwies sich jedoch als nicht signifikant. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten MSCs ein ausgeprägtes

immunmodulatorisches Potential besitzen, welches jedoch unabhängig von der Art der Vorstimulation auftritt (Abb. 8).

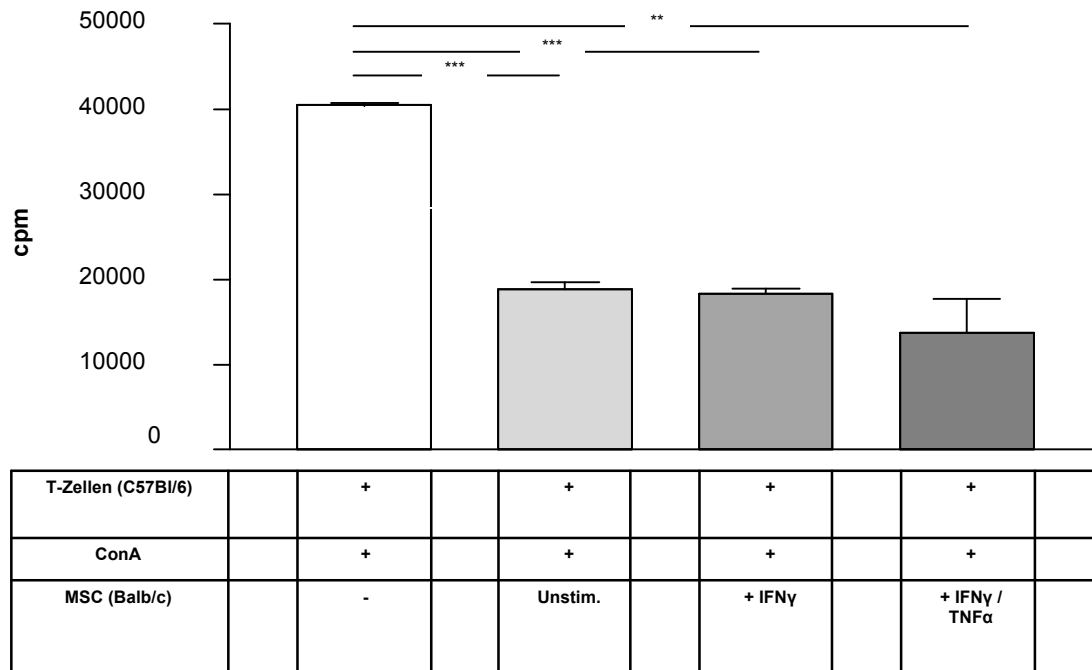


Abbildung 8: Lymphozytenproliferation im mitogen stimulierten Proliferationsansatz: Mesenchymale Stammzellen aus Balb/c-Mäusen suppressierten die Proliferation von mit ConA stimulierten T-Lymphozyten aus C57Bl/6-Mäusen signifikant um bis zu 66%. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Suppressionspotential vorstimulierter und unstimulierter MSCs nachgewiesen werden. (*) $p < 0,0001$; (**) $p < 0,005$; $n = 3$).**

4.3.1. Effekte löslicher Faktoren im Zellkulturüberstand der MSCs

Zur Identifizierung des zugrundeliegenden Mechanismus wurde zunächst die Wirkung löslicher Faktoren im Zellkulturüberstand der MSCs untersucht. Hierzu wurden die Zellen über 48 Stunden mit $\text{IFN}\gamma \pm \text{TNF}\alpha$ stimuliert oder unstimuliert kultiviert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium gewonnen und den mit ConA stimulierten T-Zellen zugegeben. Die basale T-Zell-Proliferation wurde $100 \pm 24,6 \%$ gleichgesetzt. Durch den Zusatz des Kulturüberstandes wurde die T-Zell-Proliferation nicht merklich beeinflusst (MSCs unstimuliert: $136,5 \pm 40,4 \%$; MSCs + $\text{IFN}\gamma$: $113,7 \pm 30,6 \%$; MSCs + $\text{IFN}\gamma$ + $\text{TNF}\alpha$: $120,6 \pm 26,0 \%$) (Abb. 9). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Somit wurde gezeigt, dass der Zellkulturüberstand alleine keinen

suppressiven Effekt bewirkt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die suppressiven Faktoren nicht konstitutiv sezerniert werden, sondern dass eine Sekretion erst im Rahmen einer dynamischen Zell-Zell-Interaktion zwischen den MSCs und den T-Zellen stattfinden kann bzw. ein Zell-Zell-Kontakt zwischen den MSCs und den T-Zellen notwendig ist.

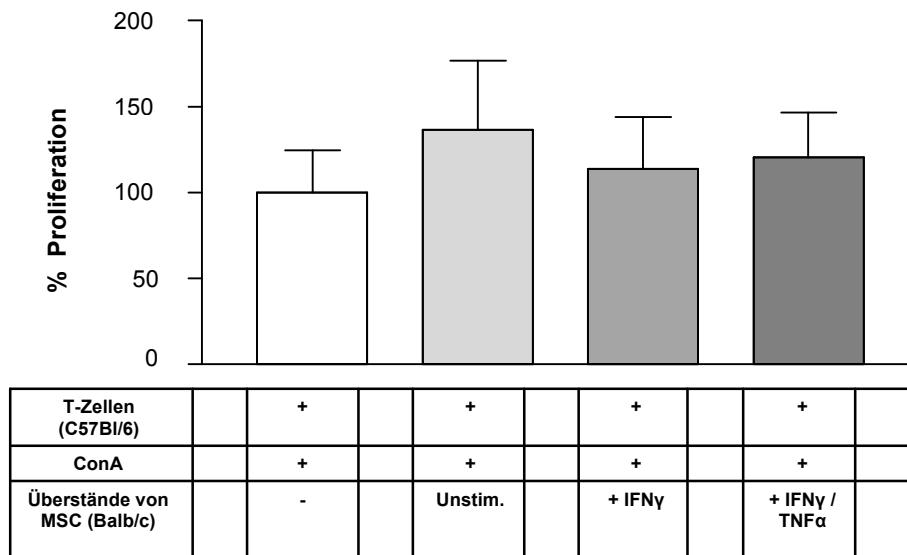


Abbildung 9: Lymphozytenproliferation im mitogen stimulierten Proliferationsansatz: Zellkulturüberstände der MSCs aus Balb/c-Mäusen führten zu keiner Suppression der Proliferation von mit ConA stimulierten T-Lymphozyten aus C57BL/6-Mäusen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der T-Zellproliferation zwischen den unterschiedlichen Versuchsgruppen. ($p > 0,05$; $n = 4$).

4.3.2. Effekte direkter Zell-Zell-Interaktion mit fixierten Zellen

Zur Ermittlung der Rolle des Zellkontaktes wurde der Proliferationsassay mit Formalin-fixierten MSCs durchgeführt. Hierzu wurden die MSCs in einem Zwischenschritt mit Formalin fixiert, um die Oberflächenmarker zu konservieren und die Zellen metabolisch zu inaktivieren. Die basale Proliferation wurde $100 \pm 19,0$ % gleichgesetzt. Es zeigte sich kein suppressiver Effekt bei der Verwendung der fixierten Zellen (MSCs unstimuliert: $156,1 \pm 37,1$ %; MSCs + IFN γ : $116,5 \pm 33,0$ %; MSCs + IFN γ + TNF α : $104,9 \pm 34,6$ %). Zudem konnte zwischen den einzelnen Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Hierdurch wurde gezeigt, dass der direkte Zellkontakt alleine nicht zu

einer Suppression der T-Zell-Proliferation führt, sondern metabolisch aktive MSCs für den suppressiven Effekt notwendig sind (Abb. 10).

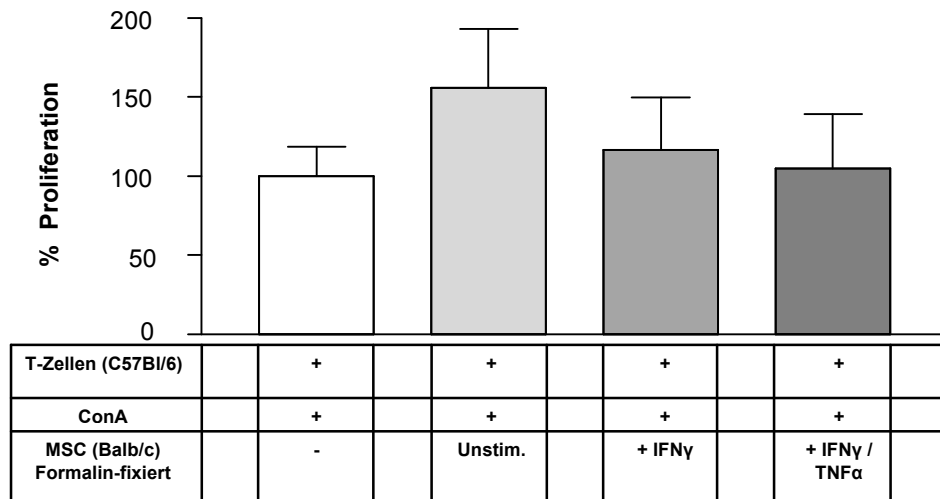


Abbildung 10: Lymphozytenproliferation im mitogen stimulierten Proliferationsansatz: Fixierte MSCs aus Balb/c-Mäusen führten zu keiner Suppression der Proliferation von mit ConA stimulierten T-Lymphozyten aus C57BL/6-Mäusen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der T-Zellproliferation zwischen den unterschiedlichen Versuchsgruppen. ($p > 0,05$; $n = 5$).

4.3.3. Effekte der Zell-Zell-Interaktion im Transwell-Experiment

Wie in den vorherigen Versuchen gezeigt werden konnte, sind metabolisch aktive Zellen sowie eine dynamische Zellinteraktion für den suppressiven Effekt verantwortlich. Um nun die Notwendigkeit des direkten Zellkontakts metabolisch aktiver Zellen zu untersuchen, wurden die T-Lymphozyten und MSCs in einem Transwellexperiment separiert. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied der basalen Proliferation ($100 \pm 5,8$ %) gegenüber den Versuchsansätzen unter MSC-Einfluss (MSCs unstimuliert: $12,3 \pm 4,4$ %; MSCs + IFN γ : $5,4 \pm 0,7$ %; MSCs + IFN γ + TNF α : $28,8 \pm 21,9$ %). Es konnte somit nachgewiesen werden, dass eine signifikante Suppression der mit ConA zur Proliferation angeregten T-Lymphozyten erreicht werden konnte, ohne dass ein direkter Zellkontakt notwendig war (Abb. 11).

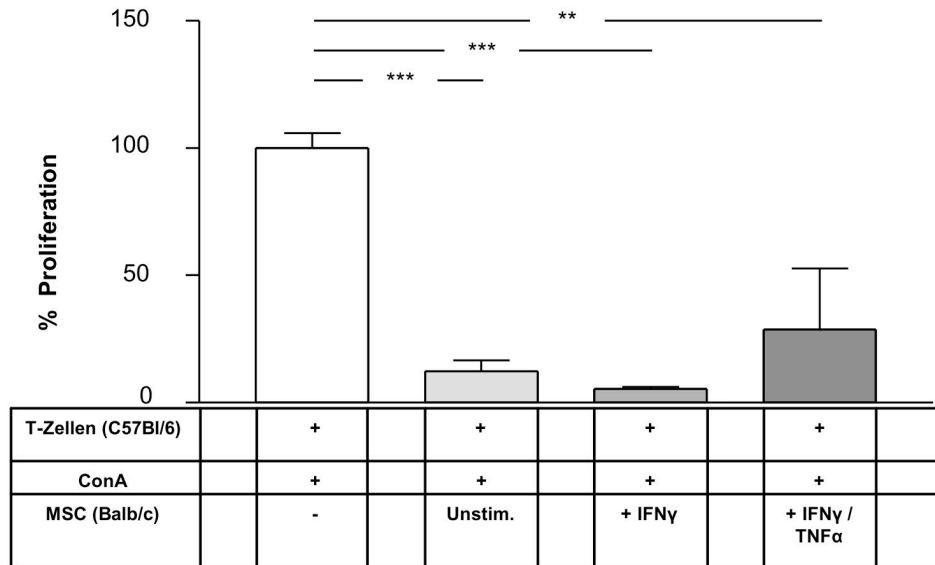


Abbildung 11: Lymphozytenproliferation im mitogen stimulierten Proliferationsansatz: Mesenchymale Stammzellen aus Balb/c-Mäusen suppressierten die Proliferation von mit ConA stimulierten T-Lymphozyten aus C57Bl/6-Mäusen signifikant trotz der Separierung der Zellen in einem Transwellexperiment. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Suppressionspotenzial von mit IFN γ \pm TNF α vorstimulierten und unstimulierten MSCs nachgewiesen werden. (*) $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$; $n = 3$ für unstimulierte Zellen und mit IFN γ vorstimulierte Zellen, $n = 2$ für mit IFN γ + TNF α vorstimulierte Zellen).**

4.4. Analyse des Wirkmechanismus der Immunsuppression durch mesenchymale Stammzellen

Einige publizierte Studien zeigten bereits, dass die immunmodulierende Wirkung mesenchymaler Stammzellen zumindest teilweise durch die Expression des Enzyms IDO sowie die Sekretion löslicher Faktoren wie TGF β 1, HGF und PGE2 zu erklären ist.

4.4.1. Indolamin-2,3-dioxygenase

Die Expression des Enzyms Indolamin-2,3-dioxygenase wurde mittels einer PCR-Untersuchung überprüft. Hierbei zeigte sich, dass die MSCs dieses Enzym basal nicht exprimierten. Die Expression konnte jedoch nach Stimulation der MSCs mit IFN γ \pm TNF α über 48 Stunden induziert werden (Abb. 12).

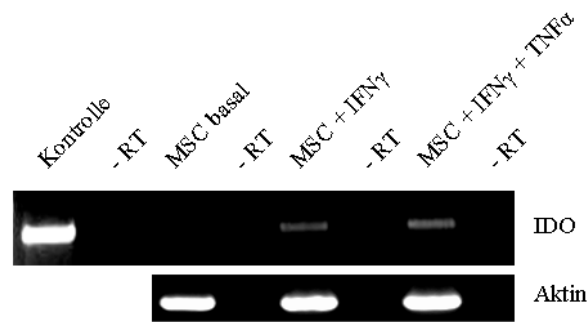


Abbildung 12: PCR-Nachweis von IDO und des zur Normierung verwendeten Aktins: Basal zeigte sich keine Expression von IDO, während sie jedoch nach 48-stündiger Stimulation mit IFN γ oder IFN γ + TNF α induziert werden konnte. Die Reaktionsansätze wurden auf einem 2%igen Agarosegel durch Elektrophorese aufgetrennt. (n = 4).

Weiter wurden das Vorhandensein von IDO auf Proteinebene sowie die Funktionalität mittels der Messung von Kynurenin, welches im Rahmen des Tryptophanabbaus durch IDO anfällt, überprüft. Es konnte weder in der Western-Blot-Untersuchung ein Hinweis für die Expression auf Proteinebene gefunden werden (Abb. 13), noch konnte in der Kynureninmessung die Funktionalität nachgewiesen werden (Abb. 14).

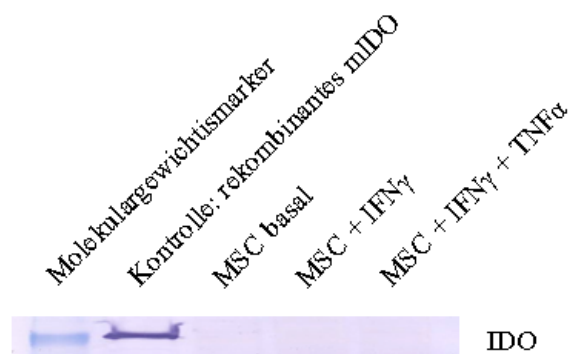


Abbildung 13: Western-Blot-Nachweis von IDO in MSCs: Es konnte weder in den stimulierten noch den unstimulierten MSCs IDO auf Proteinebene nachgewiesen werden. Dargestellt ist ein repräsentatives Bild von drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

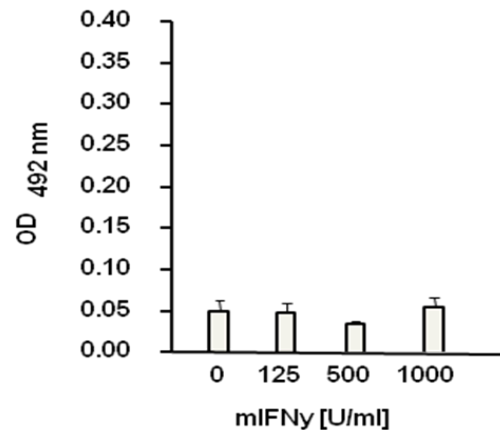


Abbildung 14: Nachweis von Kynurenin: Es konnte unabhängig von der Zugabe von IFN γ kein Kynurenin im Zellkulturüberstand der MSCs nachgewiesen werden. (n = 3).

4.4.2. Hepatocyte growth factor und Transforming growth factor β 1

Die Konzentrationen der löslichen Faktoren HGF und TGF β 1 wurden in den Zellkulturüberständen der MSC/Lymphozyten-Kokultur gemessen. Hierzu wurden die aus Mäusen der Linie Balb/c gewonnenen MSCs mit oder ohne T-Lymphozyten aus C57BL/6-Mäusen über 60 Stunden kultiviert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand gewonnen und untersucht.

Es zeigte sich eine in allen Reaktionsansätzen nachweisbare niedrige HGF-Konzentration. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der basalen HGF-Sekretion der MSCs abhängig von der Art der Vorstimulation festgestellt werden. Die Sekretion wurde durch die Kokultur der MSCs mit mitogen stimulierten Lymphozyten lediglich geringfügig und nicht signifikant gesteigert (Abb. 15A). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Untersuchung der TGF β 1-Sekretion. Es konnte nachgewiesen werden, dass die MSCs bereits basal TGF β 1 sezernierten und dass diese Sekretion unabhängig von der Art der Vorstimulation der MSCs war. Durch die Kokultur mit C57Bl/6 T-Zellen und ConA stieg die durch die MSCs sezernierte TGF β 1-Konzentration nicht an (Abb. 15B).

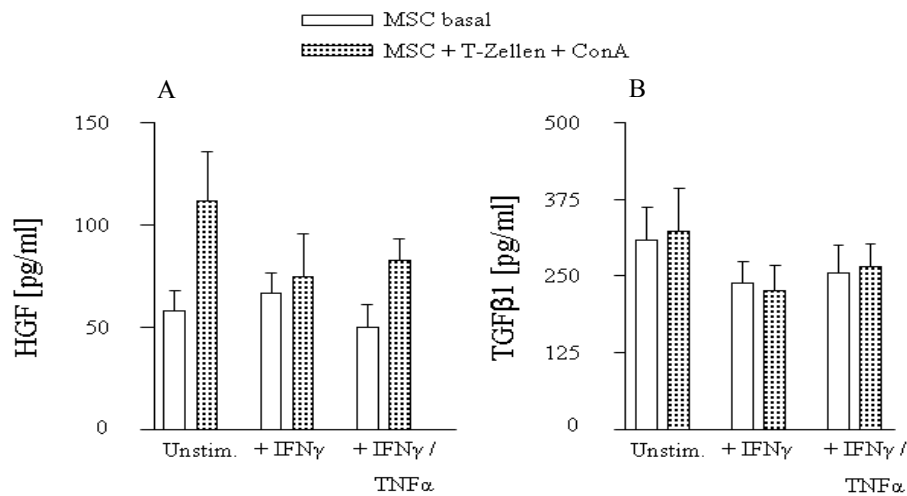


Abbildung 15: HGF- und TGFβ1-Sekretion: A) Balb/c-MSCs sezernierten niedrige Mengen an HGF. Die Sekretionsprofile waren mäßig höher nach der Kokultur mit C57BL/6 T-Zellen und ConA, jedoch ohne signifikanten Unterschied. ($p > 0,05$; $n = 7$). B) Balb/c-MSCs sezernierten äquivalent TGFβ1 unabhängig von der Art der Vorstimulation. Die Sekretion unterschied sich nicht signifikant von der in der Kokultur mit C57BL/6 T-Zellen und ConA. ($p > 0,05$; $n = 6$).

MSC (Balb/c)	T-Zellen	HGF-Konzentration	TGFβ1-Konzentration
unstimuliert		58,2 ± 9,7	307,9 ± 54,5
unstimuliert	+	111,8 ± 23,7	322,4 ± 71,5
vorstimuliert mit IFNγ		66,4 ± 10,2	238,5 ± 35,0
vorstimuliert mit IFNγ	+	74,7 ± 21,0	226,4 ± 40,9
vorstimuliert mit IFNγ + TNFα		49,6 ± 11,6	254,5 ± 45,0
vorstimuliert mit IFNγ + TNFα	+	82,5 ± 10,6	265,0 ± 36,7

Tabelle 13: HGF- und TGFβ1-Konzentration [pg/ml] im Zellkulturüberstand basal und nach Kokultur mit T-Zellen abhängig von der Art der Vorstimulation der MSCs.

Die Blockierung des HGF-Rezeptors (Abb. 16A) sowie die Bindung von freiem TGFβ1 (Abb. 16B) durch spezifische Antikörper führten im Proliferationsansatz zu keiner Restitution der Proliferation.

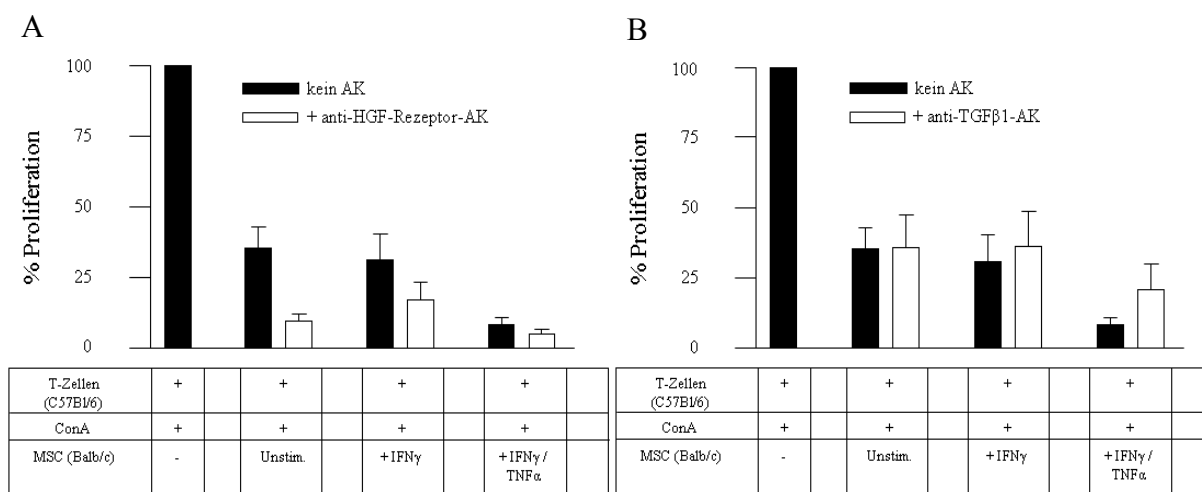


Abbildung 16: Lymphozytenproliferation im mitogen stimulierten Proliferationsansatz: Die Zugabe eines monoklonalen HGF-Rezeptor-Antikörpers (A, Tabelle 14) sowie eines monoklonalen TGFβ1-Antikörpers (B, Tabelle 15) zum Proliferationsassay führte nicht zu einer Wiederherstellung der basalen Proliferation. ($p > 0,05$; $n = 4$).

MSC (Balb/c)	anti-HGF-R-AK	% Proliferation	% Inhibition
		100	0
unstimuliert		$35,4 \pm 7,6$	$64,7 \pm 7,6$
unstimuliert	+	$9,5 \pm 2,5$	$90,5 \pm 2,5$
vorstimuliert mit IFN γ		$31,1 \pm 9,4$	$68,9 \pm 9,4$
vorstimuliert mit IFN γ	+	$17,0 \pm 6,5$	$83,1 \pm 6,5$
vorstimuliert mit IFN γ + TNF α		$8,1 \pm 2,8$	$91,9 \pm 2,8$
vorstimuliert mit IFN γ + TNF α	+	$5,1 \pm 1,7$	$94,9 \pm 1,7$

Tabelle 14: Proliferationsrate der mit ConA stimulierten und mit MSCs kokultivierten T-Zellen in Prozent bezogen auf die basale Proliferation nach Stimulation mit ConA \pm der Zugabe eines HGF-Rezeptor-Antikörpers (HGF-R-AK).

MSC (Balb/c)	anti-TGFβ1-AK	% Proliferation	% Inhibition
		100	0
unstimuliert		$35,4 \pm 7,6$	$64,6 \pm 7,6$
unstimuliert	+	$35,9 \pm 11,6$	$64,1 \pm 11,6$
vorstimuliert mit IFN γ		$31,1 \pm 9,4$	$68,9 \pm 9,4$
vorstimuliert mit IFN γ	+	$36,3 \pm 12,7$	$63,7 \pm 12,7$
vorstimuliert mit IFN γ + TNF α		$8,1 \pm 2,8$	$91,9 \pm 2,8$
vorstimuliert mit IFN γ + TNF α	+	$21,1 \pm 8,8$	$78,9 \pm 8,8$

Tabelle 15: Proliferationsrate der mit ConA stimulierten und mit MSCs kokultivierten T-Zellen in Prozent bezogen auf die basale Proliferation nach Stimulation mit ConA \pm der Zugabe eines TGFβ1-Antikörpers.

In der Zusammenschau ergab sich kein signifikanter Hinweis auf den Einfluss von IDO, HGF und TGF β 1 auf die T-Zell-Proliferation.

4.4.3. Prostaglandin E2

Das induzierbare Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2), welches die Bildung von Prostaglandin E2 katalysiert, wurde in den MSCs konstitutiv sowohl in unstimulierten als auch in stimulierten Zellen auf mRNA-Ebene exprimiert (Abb. 17).

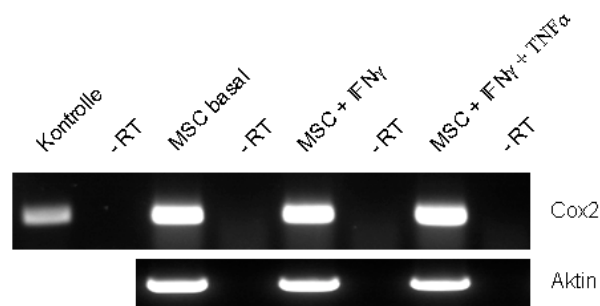


Abbildung 17: Expression des Enzyms COX-2: COX-2 wurde von MSCs der Linie Balb/c konstitutiv exprimiert. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den unstimulierten und über 48 Stunden mit IFN γ oder IFN γ + TNF α stimulierten Zellen. Repräsentatives PCR-Bild aus 5 unabhängigen Experimenten.

Die Analyse der Zellkulturüberstände zeigte, dass die MSCs sowohl basal als auch in Kokultur mit stimulierten T-Zellen PGE2 produzierten. Dabei lag die PGE2-Konzentration in den Kokulturen etwas höher als bei den MSCs alleine, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen nachgewiesen werden. Weiter zeigten die vorstimulierten MSCs in der Kokultur gegenüber den unstimulierten eine nicht signifikant höhere PGE2-Sekretion (Abb. 18, Tab. 16).

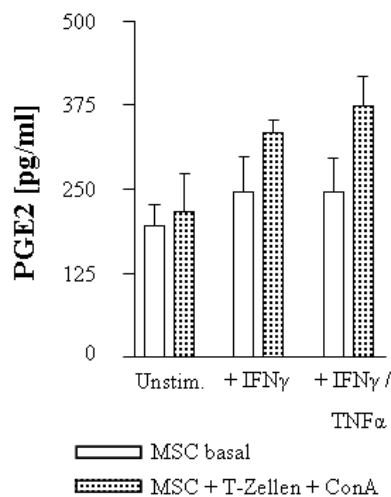


Abbildung 18: PGE2-Sekretion: Balb/c-MSCs sezernierten niedrige Mengen an PGE2. Die Sekretionsprofile der Kokultur mit C57BL/6 T-Zellen und ConA waren geringfügig höher, jedoch ohne signifikanten Unterschied zur basalen Konzentration. ($p > 0,05$; $n = 6$).

	T-Zellen	PGE2-Konzentration
unstimuliert		194,7 \pm 32,0
unstimuliert	+	216,7 \pm 57,3
vorstimuliert mit IFN γ		246,8 \pm 51,0
vorstimuliert mit IFN γ	+	334,4 \pm 19,3
vorstimuliert mit IFN γ + TNF α		246,6 \pm 49,5
vorstimuliert mit IFN γ + TNF α	+	374,3 \pm 44,1

Tabelle 16: PGE2-Konzentration [pg/ml] basal und nach Kokultur mit T-Zellen abhängig von der Art der Vorstimulation der MSCs.

Im Proliferationsansatz führte die Zugabe des COX-Inhibitors Indomethacin zu einer partiellen Wiederherstellung der Proliferation. Die basale Proliferation der mit ConA stimulierten T-Zellen wurde 100 Prozent gleichgesetzt und konnte durch die Zugabe der MSCs um bis zu 75 % inhibiert werden. Durch die Zugabe von Indomethacin wurde die Inhibition partiell aufgehoben. Dieser Effekt zeigte sich unabhängig von der Art der Vorstimulation der MSCs (Abb. 19, Tab. 17).

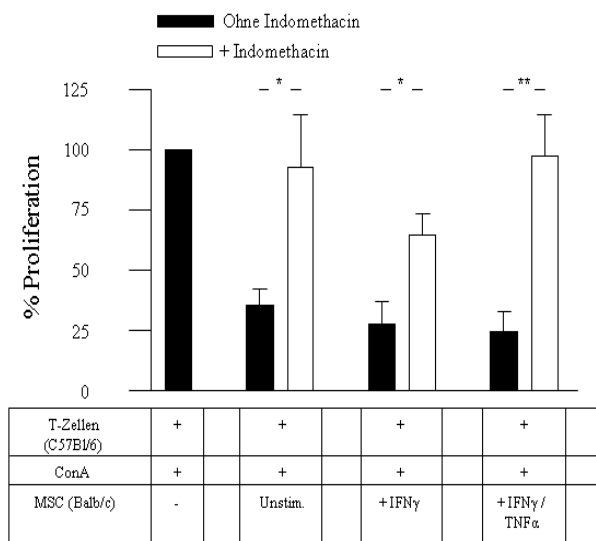


Abbildung 19: Proliferationsansatz mit Indomethacin: Die Zugabe von Indomethacin zum Proliferationsassay führte zu einer Wiederherstellung der basalen Proliferation. (* p < 0,05; ** p < 0,01; n = 4).

MSC (Balb/c)	INDO	% Proliferation	% Inhibition
		100	0
unstimuliert		35,7 ± 6,6	64,3 ± 6,6
unstimuliert	+	92,9 ± 21,4	7,1 ± 21,4
vorstimuliert mit IFN γ		27,8 ± 9,3	72,2 ± 9,3
vorstimuliert mit IFN γ	+	64,5 ± 9,3	35,5 ± 9,3
vorstimuliert mit IFN γ + TNF α		24,6 ± 8,1	75,4 ± 8,1
vorstimuliert mit IFN γ + TNF α	+	97,3 ± 17,3	2,7 ± 17,3

Tabelle 17: Proliferationsrate der mit ConA stimulierten und mit MSCs kokultivierten T-Zellen in Prozent bezogen auf die basale Proliferation nach Stimulation mit ConA ± der Zugabe von Indomethacin.

4.5. Expression des Oberflächenmarkers CD39 und Produktion von Adenosin und Phosphat

Die Bildung von extrazellulärem Adenosin, welche durch Hypoxie und Inflammation bedingt ist, ist zum Teil durch die zwei sequenziellen Enzyme CD39 und CD73 verursacht. Dabei führt CD39 (Ecto-ATP-diphosphorylase) zunächst zum Abbau von ATP und ADP zu 5'-AMP. Im Anschluss daran führt die Ecto-5-Nucleotidase CD73 zum Umbau von 5'-AMP zu Adenosin. Die Signalübertragung des Adenosins erfolgt über den A2A-Rezeptor, der durch T-Zellen exprimiert wird.

4.5.1. Expression der Oberflächenmarker CD73 und CD39

In der FACS-Analyse konnte sowohl die Expression von CD73 als auch von CD39 auf der Oberfläche der MSCs nachgewiesen werden.

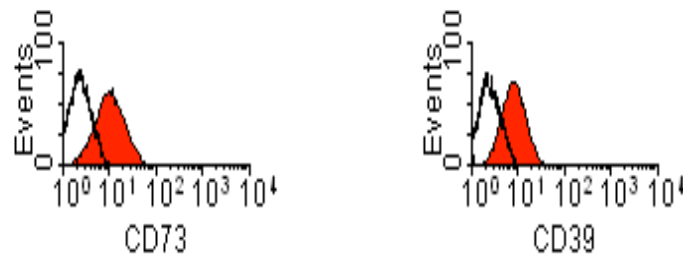


Abbildung 20: FACS-Färbung: Repräsentative Histogramme zur Expression der Oberflächenmarker CD73 und CD39 auf den MSCs (n = 4); rote Fläche = Färbung mit dem spezifischen Antikörper, weiße Fläche = Färbung mit der Isotypen-Kontrolle. Die Balb/c-MSCs exprimierten CD73 und CD39 auf ihrer Oberfläche.

4.5.2. Indirekter Nachweis der Adenosinproduktion durch Messung der Phosphatproduktion

Es konnte gezeigt werden, dass die MSCs basal nur eine geringe Menge an Phosphat produzierten, wobei die Zugabe von ATP zu einem signifikanten Anstieg der Phosphatkonzentration führte. Hingegen lag die Phosphatkonzentration der mit Formalin fixierten Zellen in zwei Gruppen signifikant unter der Konzentration der unfixierten Zellen, so dass auch hier von der Notwendigkeit metabolisch aktiver Zellen auszugehen ist. Hierdurch wurde nachgewiesen, dass die MSCs aufgrund ihrer Oberflächenmoleküle in der Lage sind, Phosphat aus ATP abzuspalten (Abb. 21, Tab. 18).

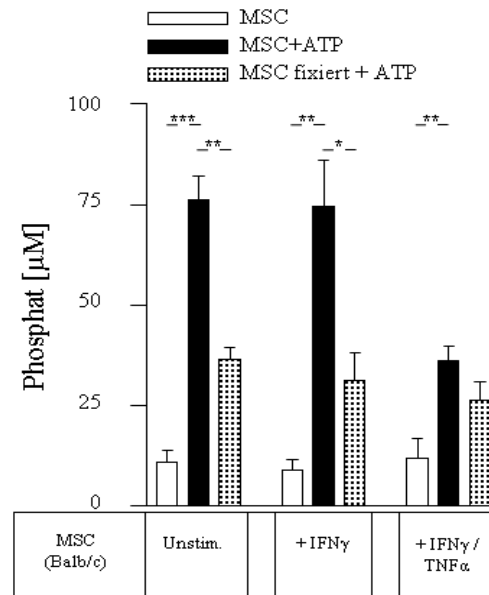


Abbildung 21: Phosphatproduktion: Balb/c-MSCs sezernierten niedrige Mengen an Phosphat. Das Sekretionsprofil war unabhängig von der Vorstimulation. Durch die Zugabe von ATP kam es in allen Gruppen zu einer deutlichen Zunahme der Phosphatfreisetzung. Dabei zeigten die fixierten Zellen meist eine signifikant geringere Phosphatproduktion. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ $n = 4$).**

MSC (Balb/c)		ATP	Phosphat-Konzentration
unstimuliert			$11,0 \pm 3,1$
unstimuliert		+	$76,1 \pm 6,0$
unstimuliert	fixiert	+	$36,7 \pm 3,0$
vorstimuliert mit IFN γ			$8,9 \pm 2,8$
vorstimuliert mit IFN γ		+	$74,5 \pm 11,5$
vorstimuliert mit IFN γ	fixiert	+	$31,3 \pm 6,9$
vorstimuliert mit IFN γ + TNF α			$12,1 \pm 4,7$
vorstimuliert mit IFN γ + TNF α		+	$36,0 \pm 3,9$
vorstimuliert mit IFN γ + TNF α	fixiert	+	$26,4 \pm 4,8$

Tabelle 18: Phosphatkonzentration [µM] basal und nach Zugabe von ATP in Abhängigkeit von der Vorstimulation und Fixierung der Zellen.

4.5.3. Direkter Nachweis der Adenosinproduktion

In der HPLC-Messung konnte die Produktion von Adenosin durch die mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden. Basal wurde durch die Zellen kaum Adenosin generiert. Nach der Zugabe von ATP konnte Adenosin nachgewiesen werden. Die zu detektierende Menge stieg mit der Anzahl der verwendeten MSCs.

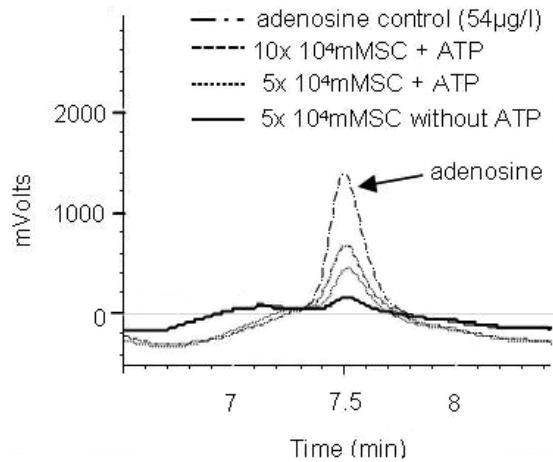


Abbildung 22: HPLC-Messung von Adenosin: Durch die Zugabe von ATP zu den MSCs zeigte sich eine Zunahme des Adenosinsignals. Die Menge des produzierten Adenosins korrelierte mit der Menge der verwendeten MSCs.

4.5.4. Blockierung der Signaltransduktion durch die Inhibition von CD73

Die Inhibition der Enzymaktivität von CD73 durch den Inhibitor APCP führte nicht zu einer Wiederherstellung der basalen Proliferation. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Suppression der T-Zell-Proliferation mit oder ohne Zugabe des Inhibitors (Abb. 23, Tab. 19).

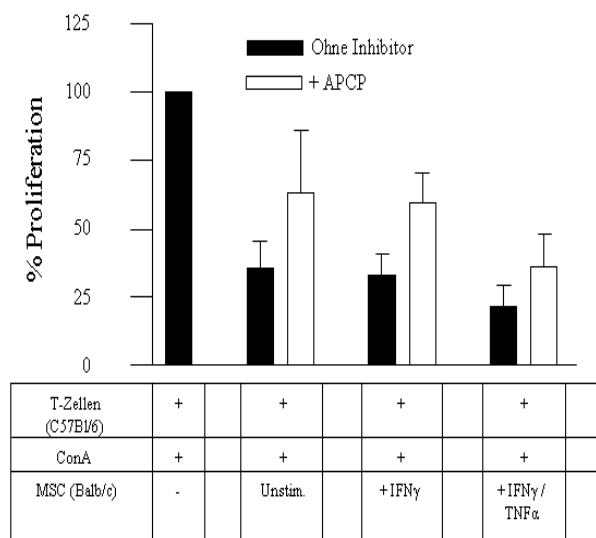


Abbildung 23: Proliferationsansatz mit APCP: Die Zugabe von APCP zum Proliferationsassay führte nicht zu einer Wiederherstellung der basalen Proliferation. ($p > 0,05$; $n = 4$).

MSC (Balb/c)	APCP	% Proliferation	% Inhibition
		100	0
unstimuliert		36,0 ± 9,3	64,0 ± 9,3
unstimuliert	+	63,3 ± 23,0	36,7 ± 23,0
vorstimuliert mit IFN γ		31,3 ± 5,8	68,7 ± 5,8
vorstimuliert mit IFN γ	+	59,4 ± 11,0	40,6 ± 11,0
vorstimuliert mit IFN γ + TNF α		21,6 ± 8,0	78,4 ± 8,0
vorstimuliert mit IFN γ + TNF α	+	36,2 ± 12,0	63,8 ± 12,0

Tabelle 19: Proliferationsrate der mit ConA stimulierten und mit MSCs kokultivierten T-Zellen in Prozent bezogen auf die basale Proliferation nach Stimulation mit ConA \pm der Zugabe von APCP.

4.5.5. Blockierung der Signaltransduktion durch die Inhibition des A2A-Rezeptors

Die Verwendung von SCH58261, einem A2A-Rezeptor-Antagonisten, führte zu einer partiellen Inhibition der Suppression und damit signifikant höheren T-Zell-Proliferationsrate. Eine vollständige Remission der Proliferation konnte durch den Inhibitor jedoch nicht erzielt werden (Abb. 22, Tab. 20).

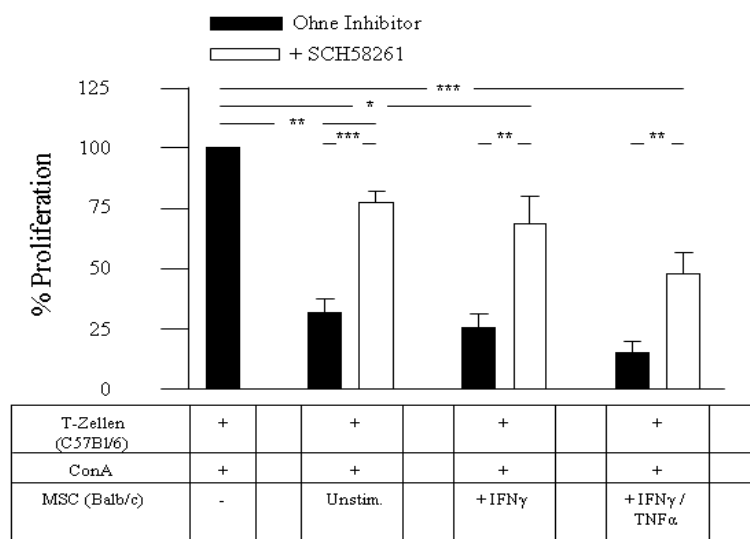


Abbildung 24: Proliferationsansatz mit SCH58261: Die Zugabe von SCH58261 zum Proliferationsassay führte partiell zu einer Wiederherstellung der basalen Proliferation. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ $n = 8$).

MSC (Balb/c)	SCH58261	% Proliferation	% Inhibition
		100	0
unstimuliert		31,6 ± 5,7	68,4 ± 5,7
unstimuliert	+	77,2 ± 4,9	22,8 ± 4,9
vorstimuliert mit IFN γ		25,2 ± 6,0	74,8 ± 6,0
vorstimuliert mit IFN γ	+	68,4 ± 11,4	31,6 ± 11,4
vorstimuliert mit IFN γ + TNF α		15,0 ± 4,6	85,0 ± 4,6
vorstimuliert mit IFN γ + TNF α	+	47,7 ± 9,0	52,3 ± 9,0

Tabelle 20: Proliferationsrate der mit ConA stimulierten und mit MSCs kokultivierten T-Zellen in Prozent bezogen auf die basale Proliferation nach Stimulation mit ConA \pm der Zugabe von SCH58261.

4.5.6. Restitution der Inhibition durch die Inhibition des A2A-Rezeptors und der PGE2-Produktion

Da sich lediglich eine partielle Restitution bei der Blockierung der PGE2-Sekretion und des Adenosinrezeptors zeigte, wurden die Inhibitoren INDO und SCH58261 in einem gemeinsamen Reaktionsansatz verwendet. Es zeigte sich die vollständige Restitution der Inhibition der T-Zell-Proliferation durch die mesenchymalen Stammzellen (Abb. 25, Tab. 21).

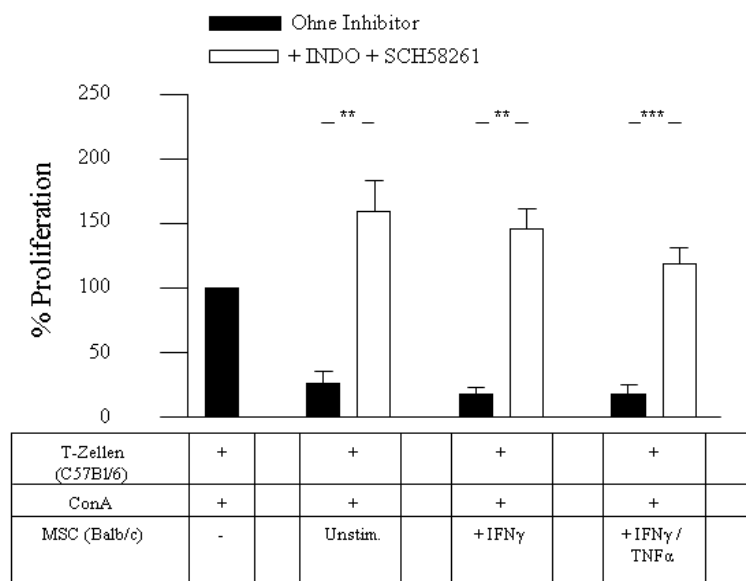


Abbildung 25: Proliferationsansatz mit SCH58261 + INDO: Die Zugabe von SCH58261 und INDO zum Proliferationsassay führte zu einer Wiederherstellung der basalen Proliferation. (** p < 0,01; *** p < 0,001 n = 5).

MSC (Balb/c)	SCH58261 + INDO	% Proliferation	% Inhibition
		100	0
unstimuliert		26,8 ± 8,7	73,2 ± 8,7
unstimuliert	+	158,9 ± 24,6	- 58,9 ± 24,6
vorstimuliert mit IFN γ		17,6 ± 5,5	82,4 ± 5,5
vorstimuliert mit IFN γ	+	145,5 ± 16,3	- 45,5 ± 16,3
vorstimuliert mit IFN γ + TNF α		17,9 ± 7,1	82,1 ± 7,1
vorstimuliert mit IFN γ + TNF α	+	118,5 ± 12,7	- 18,5 ± 12,7

Tabelle 21: Proliferationsrate der mit ConA stimulierten und mit MSCs kokultivierten T-Zellen in Prozent bezogen auf die basale Proliferation nach Stimulation mit ConA \pm der Zugabe von SCH58261 und Indomethacin.

5. Diskussion

Mesenchymale Stammzellen sind nicht-hämatopoetische Zellen mit einem hohen immunregulatorischen Potenzial, das bedingt ist durch die Sekretion löslicher Faktoren und die Expression von Oberflächenmolekülen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass murine MSCs, isoliert aus dem Knochenmark 5-16 Wochen alter Balb/c-Mäuse, die Ektonukleotidasen CD39 und CD73 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Diese Enzyme spielen eine entscheidende Rolle in der Bildung von Adenosin, welches eine starke immunmodulierende und inhibierende Wirkung auf proinflammatorische CD3-positive T-Lymphozyten und antigenpräsentierende Zellen (APCs) ausübt. Dieser Mechanismus wurde bereits als wichtiger Bestandteil in der immunmodulatorischen Aktivität CD4+/CD25+/Foxp3+-regulatorischer T-Zellen identifiziert [Borsellino et al., 2007; Deaglio et al., 2007] und konnte nun erstmals auch bei murinen MSCs nachgewiesen werden.

5.1. Isolierung und Charakterisierung der mesenchymalen Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen sind multipotente Zellen, die aus dem Knochenmark adulter Säugetiere isoliert werden können. Hier treten sie als eine kleine inhomogene Subpopulation an nicht-hämatopoetischen Zellen auf. Besonders ihre Heterogenität und das Fehlen eines definierenden Oberflächenmarkers stellt eine Herausforderung an die Isolierung der Zellen dar. Demnach müssen die Zellen eine Reihe von Kriterien erfüllen, um als mesenchymale Stammzellen identifiziert werden zu können. Hierzu zählen das Differenzierungspotenzial, mit der Kapazität in Knochen, Fett und Knorpel zu differenzieren [Pittenger et al., 1999], die Plastikadhärenz sowie die Abwesenheit endothelialer und hämatopoetischer Oberflächenmarker [Abdi et al., 2008].

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden aus dem Knochenmark 5-16 Wochen alter männlicher Balb/c-Mäuse isoliert und nach ihrer Plastikadhärenz sowie dem Fehlen von CD45 selektiert. Es ist gelungen, eine hochreine MSC-Population zu kultivieren und zu expandieren, die charakteristische Oberflächenmarker muriner MSCs exprimiert. Die Kombination der Marker CD29, CD73, CD90, CD105, CD140b, Sca-1, bei Negativität für CD31, CD34 und CD45, stimmt sehr gut mit Daten aus der Literatur für primär aus dem

Knochenmark isolierte mesenchymale Stammzellen überein [Sivasubramaniyan et al., 2012]. Einige weitere in der Literatur beschriebene Marker werden kontrovers diskutiert. Hierbei ist es entscheidend darauf hinzuweisen, dass das Oberflächenmarkermuster stark vom Primärgewebe abhängig ist, aus dem die Zellen isoliert wurden. Mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe tragen beispielsweise CD34, Zellen aus der Plazenta dagegen sind positiv für SSEA-4. Beide Marker werden jedoch von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark nicht exprimiert. Bei der Interpretation der Daten sind zudem die deutlichen speziesabhängigen Unterschiede zu berücksichtigen [Ren et al., 2009; Meisel et al., 2011]. Aufgrund dieser Variabilität wurde neben der Charakterisierung mittels Oberflächenmolekülen die Multipotenz der Zellen über die Differenzierung in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten nachgewiesen.

5.2. Immunsuppressives Potenzial der mesenchymalen Stammzellen

In zahlreichen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass MSCs die Lymphozytenproliferation, welche durch Alloantigene in einer Lymphozytenkokultur induziert wurde, supprimieren können [Tse et al., 2003; le Blanc et al., 2003]. Ebenso zeigen sie dieses suppressive Potenzial bei der Stimulation der T-Lymphozyten mit Mitogenen wie beispielsweise Phytohämagglutinin [le Blanc et al., 2003; di Nicola et al., 2002; le Blanc et al., 2004 (1)], Concanavalin A [le Blanc et al., 2003; Djoud et al., 2003] und Tuberkulin [Maitra et al., 2004] sowie durch die Applikation von CD3- und CD28-Antikörpern [Tse et al., 2003; Krampera et al., 2003]. Hierbei scheint es nicht von Bedeutung zu sein, ob die MSCs autolog oder allogene zu den Responderzellen eingesetzt werden [le Blanc et al., 2007; Krampera et al., 2003; di Nicola et al., 2002]. Zudem ist bekannt, dass die Suppression dosisabhängig und lediglich bedingt abhängig davon ist, ob die Zellen der Lymphozytenkokultur bereits zu Beginn oder im Verlauf zugegeben werden [Klyushenenkova et al., 2005].

Auch die in dieser Arbeit verwendeten MSCs zeigten starke immunregulatorische Eigenschaften, indem sie die Proliferation mitogen stimulierter, allogener T-Zellen signifikant supprimierten. Der Effekt war, wie auch bei anderen Arbeitsgruppen, stets unabhängig von einer Vorstimulation mit $\text{IFN}\gamma \pm \text{TNF}\alpha$ [Klyushenenkova et al., 2005]. Anhand von zuvor durchgeführten Vorversuchen wurden in den vorliegenden Experimenten das klassische

Mitogen Concavalin A und ein optimales Verhältnis der MSCs zu den T-Lymphozyten (1:1) eingesetzt, um die Charakteristika der MSCs zu untersuchen. Hierbei zeigte sich, dass die Suppression der T-Zellproliferation von einer dynamischen Zell-Zell-Interaktion abhing. Dies konnte dadurch bestätigt werden, dass der Kulturüberstand der MSCs alleine, sowie die Kokultur mit Formalin fixierten MSCs zu keiner Suppression der T-Zell-Proliferation führten. Dagegen fand sich eine Hemmung der T-Zellaktivierung im Transwellexperiment, in dem die MSCs mit den T-Lymphozyten lediglich über eine für lösliche Faktoren permeable Trennung in Kontakt standen. Daher ist unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse davon auszugehen, dass nicht der direkte Zellkontakt zur Immunsuppression führt, sondern lösliche Faktoren notwendig sind, die den Effekt vermitteln.

Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls zeigten, dass MSCs im Transwellexperiment T-Zellen supprimierten [Tse et al., 2003; Klyushenenkova et al., 2005; di Nicola et al., 2002] und unter Verwendung des Kulturüberstands der MSCs alleine kein suppressiver Effekt erzielt werden konnte [Maitra et al., 2004]. Dies könnte darauf hindeuten, dass entweder eine dynamische Zell-Zell-Interaktion über lösliche Faktoren notwendig ist oder aber die Sekretionsprodukte in der Zellkultur sehr kurzlebig sind und damit fortwährend nachproduziert werden müssen.

Bedingt durch die Eigenschaft der Immunsuppression stellen MSCs eine vielversprechende Zellpopulation für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen, beziehungsweise für die Entwicklung neuer lokaler oder systemischer Toleranzinduktion nach Transplantation, dar. Entscheidend hierfür ist es, dass es gelingt, die immunologischen und zellbiologischen Eigenschaften der verschiedenen MSCs besser als bisher zu verstehen. Neben der Isolierung von hochreinen MSC-Präparationen ist es wichtig darzulegen, wie und unter welchen Bedingungen MSCs spezifische Subpopulationen von Immunzellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems modulieren oder supprimieren.

5.3. Mechanismus der Immunregulation

Vorangehende Studien führten den immunsuppressiven Effekt der MSCs auf mehrere Mechanismen zurück. Hierunter die Sekretion antiinflammatorischer Zytokine wie HGF und TGF β [Rasmusson et al., 2005; le Blanc et al. 2004 (1)], die Bildung von PGE2 [Rasmusson

et al., 2005; Aggarwal et al., 2005] und die Expression von IDO [Meisel et al., 2004; English et al., 2007].

Die Rolle der einzelnen Faktoren wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So konnte die Arbeitsgruppe um Di Nicola eine Inhibition der Suppression durch die Zugabe neutralisierender Antikörpern gegen TGF β und HGF erzielen. Zudem zeigten sie eine Inhibition der T-Zell-Proliferation durch die Zugabe von rekombinantem TGF β und HGF [di Nicola et al., 2002]. Der immunregulatorische Effekt von TGF β wird dabei unter anderem auf die Hemmung der IL-2-Produktion und die damit verbundene fehlende Aktivierung und Proliferation immunologischer Effektorzellen (T- und B-Zellen) [Brabletz et al., 1993] sowie die Kontrolle der Expression Zellzyklus relevanter Regulatoren [Hannon et al., 1994] und die Suppression antigenpräsentierender Zellen und natürlicher Killerzellen [Yoshimura et al., 2010] zurückgeführt. Der Wirkmechanismus von HGF dagegen ist noch nicht hinreichend geklärt. Einer Studie von Yamaura et al. zufolge führt HGF zur Steigerung der Expression von TGF β und IL-10 [Yamaura et al., 2004]. Zudem kommt es zu einer verminderten Anzahl an inflammatorischen Zellen mit einer Reduktion der Konzentrationen von IL-2, IFN γ und IL-12 [Benkhoucha et al. 2010].

In der vorliegenden Arbeit konnte klar gezeigt werden, dass HGF und TGF β für die Suppression der mitogen stimulierten Proliferation durch murine MSCs im Zellkulturversuch keine Rolle spielten, da durch die Verwendung von entsprechenden blockierenden (Rezeptor)Antikörpern keine Restitution der Immunsuppression bewirkt werden konnte. Zudem wurde keine signifikant vermehrte Sekretion von TGF β und HGF in der Kokultur nachgewiesen. Auch andere Arbeitsgruppen konnten keinen signifikanten Effekt von TGF β und HGF auf die mitogen stimulierte T-Lymphozytenproliferation nachweisen [Tse et al., 2003; le Blanc et al., 2004 (1)].

Die Synthese von PGE₂ wird durch die Enzyme COX-1 und COX-2 vermittelt. MSCs exprimieren beide Enzyme konstitutiv, woraus eine konstitutive Produktion von PGE₂ resultiert [Aggarwal et al., 2005]. Auch in dieser Arbeit zeigte sich, dass die isolierten MSCs sowohl basal als auch in der Kokultur mit stimulierten T-Zellen PGE₂ produzieren. Dabei lag die PGE₂-Konzentration in den Kokulturen etwas höher als in der MSC-Monokultur. Jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen nachgewiesen werden. Da im Proliferationsansatz die Zugabe des COX-Inhibitors Indomethacin zu einer partiellen Wiederherstellung der Proliferation führte, muss davon ausgegangen werden, dass

PGE2 zumindest einen Teileffekt in der Immunsuppression bewirkt. Der inhibitorische Effekt auf die T-Zell-Proliferation konnte bereits in anderen Studien nachgewiesen werden [Rasmusson et al., 2005; Aggarwal et al., 2005], wobei der Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist. Mögliche Ansatzpunkte stellen hierbei die Inhibition der Polyaminsynthese [Ruggeri et al., 2000], der intrazellulären Calziumausschüttung [Choudhry et al., 1999 (2)] sowie der p59-Tyrosinkinaseaktivität [Choudhry et al., 1999 (1)] dar. Weiter wurde eine PGE2-vermittelte verminderte IL-2-Sekretion und IFN γ -Bildung sowie eine erhöhte Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-10 durch T-Lymphozyten beobachtet [Hilkens et al., 1996].

Einen weiteren Mechanismus in der immunmodulierenden Wirkung von MSCs stellt die Induktion von IDO, einem Enzym des Tryptophanabbaus, dar [Meisel et al., 2004; English et al., 2007]. In zahlreichen Studien wurde bereits nachgewiesen, dass die Expression von IDO, über einen lokalen Tryptophanmangel, sehr stark immunsuppressiv wirkt. Dieser Mechanismus spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Induktion von Immuntoleranz in der Schwangerschaft, bei Infektionen und Autoimmunerkrankungen.

Die hier verwendeten MSCs exprimierten IDO lediglich auf mRNA-Ebene nach Stimulation mit IFN γ \pm TNF α . Eine Expression auf Proteinebene konnte jedoch weder in den Western-Blot-Untersuchungen, noch über den Nachweis des Tryptophanabbauprodukts Kynurenin, gezeigt werden. Somit ist davon auszugehen, dass die hier verwendeten Zellen nicht in der Lage sind, funktionelles IDO zu exprimieren und Tryptophan abzubauen. Nachdem es in unserer Arbeitsgruppe gelang, unter gleichen Kulturbedingungen humane MSCs zu isolieren, die eine hohe Expression funktionell wirksamen IDOs zeigten (Daten nicht dargestellt), ist davon auszugehen, dass die fehlende IDO-Expression auf grundlegende, spezieabhängige Unterschiede zurückzuführen ist. Diese Hypothese wurde inzwischen durch die Publikationen mehrerer Arbeitsgruppen belegt. Murinen MSCs fehlt hiernach die Eigenschaft IDO zu exprimieren. Nach Stimulation mit Lipopolysacchariden oder proinflammatorischen Zytokinen wird bei murinen MSCs das induzierbare Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) aktiviert und Stickstoffmonoxid (NO) produziert [Ren et al., 2009]. Bei humanen MSCs entsteht unter den gleichen Bedingungen IDO und kein NO. Weitere Studien konnten nachweisen, dass bei murinen MSCs die Inhibition der Aktivität von antigenpräsentierenden Zellen und T-Lymphozyten [Ren et al., 2009] und die antimikrobielle Aktivität teilweise auf NO zurückzuführen sind [Meisel et al., 2011].

Nachdem die in den vorliegenden Versuchen beobachteten immunsuppressiven Effekte der MSCs nur teilweise auf die bisher bekannten Mechanismen zurückzuführen waren, wurde nach weiteren Möglichkeiten zur Erklärung der Hemmung der Lymphozytenproliferation gesucht. Die Expression der Ektonukleotidase CD73 war bei MSCs seit langem bekannt und wird als typischer Marker verwendet [Sivasubramaniyan et al., 2012]. Aus der Literatur war ebenfalls bekannt, dass regulatorische T-Zellen (Tregs) eine andere Ektonukleotidase, CD39, auf der Zelloberfläche exprimieren. In den Jahren 2006/2007 wurde von drei Arbeitsgruppen die Koexpression von CD39 und CD73 auf regulatorischen T-Zellen berichtet, die eine wichtige Rolle für die Funktion dieser Zellen einnimmt [Kobie et al., 2006; Borsellino et al., 2007; Deaglio et al., 2007]. Die Bildung von extrazellulärem Adenosin wird primär durch diese beiden Enzyme einer Enzymkaskade vermittelt. Dabei führt CD39 (Ecto-ATP-diphosphorylase) zunächst zum Abbau von ATP und ADP zu 5'-AMP [Deaglio et al., 2007]. Im Anschluss daran führt die Ecto-5-Nucleotidase CD73 zum Umbau von 5'-AMP zu Adenosin [Kobie et al., 2006, Eltzschig et al., 2003]. Unter physiologischen Bedingungen ist die extrazelluläre Adenosinkonzentration relativ niedrig, hingegen führt eine durch Gewebsdestruktion und Hypoxie hervorgerufene Inflammation zu einem deutlichen Anstieg. Diese Reaktion wird als Gegenreaktion angesehen, um eine weitere Gewebsdestruktion durch Inhibition der Inflammationsreaktion einzudämmen [Zarek et al., 2008]. Eine Reihe von Studien konnten nachweisen, dass die Adenosinproduktion der regulatorischen T-Zellen eine große Bedeutung für die Kontrolle von inflammatorischen Prozessen, wie beispielsweise bei entzündlichen Darmerkrankungen oder bei der Entstehung der multiplen Sklerose, hat [Fletcher et al., 2009; Ernst et al., 2010].

Die immunregulierenden Effekte des Adenosins werden dabei über vier verschiedene Rezeptoren vermittelt, wobei T-Lymphozyten bevorzugt den hochaffinen A2A-Rezeptor und APCs den A2A- und/oder den A2B-Rezeptor exprimieren [Thiel et al., 2003]. Hierbei kommt es bei APCs durch die Bindung des Adenosins an den korrespondierenden Rezeptor zu einer verminderten Zytokinproduktion (z.B. IL-12, TNF α) um bis zu 80-90% und bei aktivierten T-Lymphozyten zu einer verminderten Freisetzung von IL-2, TNF α und IFN γ um bis zu 90% [Ernst et al., 2010]. Beide Mechanismen können zu einer Inhibition der T-Zell-Proliferation in vitro und in vivo führen [Erdmann et al., 2005; Lappas et al., 2005].

Unter Berücksichtigung der oben genannten Befunde stellte sich die Frage, ob auch MSCs die Eigenschaft besitzen, zusätzlich zu CD73 auch CD39 zu exprimieren. Über durchflusszytometrische Analysen konnte erstmals der klare Nachweis einer Koexpression

beider Ektonukleotidasen geführt werden. Der funktionelle Nachweis der Enzymaktivität wurde durch den ATP-Verbrauch bei gleichzeitigem Anstieg der Phosphatkonzentration und durch die direkte Messung des Endprodukts Adenosin mittels HPLC geführt. In Blockierungsstudien mit spezifischen Blockern des A2A-Rezeptors und des Prostaglandinweges gelang es nachzuweisen, dass die Hemmung der mitogen stimulierten T-Lymphozytenproliferation durch murine MSCs teilweise auf PGE2 und teilweise auf die Adenosinproduktion zurückzuführen ist. Damit konnte in der vorliegenden Studie ein gänzlich neuer Mechanismus identifiziert werden, der von grundlegender Bedeutung für die Funktion muriner MSCs ist.

5.4 Limitationen der Studie

Der Fokus der vorliegenden Studie wurde für die Analyse der immunmodulierenden Eigenschaften der MSCs auf in vitro Experimente gelegt. Untersucht wurden murine MSCs aus dem Knochenmark, so dass unter Berücksichtigung der bekannten phänotypischen Unterschiede zwischen MSCs aus Knochenmark, Fettgewebe, Plazenta, Nabelschnurblut und anderen Organen [Sivasubramaniyan et al., 2012] betont werden muss, dass keine generellen Aussagen über die Bedeutung des CD39/CD73-Enzymsystems bei MSCs anderen Ursprungs getroffen werden können. Dies trifft insbesondere auch für MSCs anderer Spezies inklusive der humanen MSCs zu. Bei Tregs wurde die Produktion von Adenosin als wichtiger Immunmodulator sowohl bei humanen als auch bei murinen CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺ T-Zellen nachgewiesen [Ernst et al., 2010]. Da jedoch bei humanen und murinen MSCs auf verschiedenen Ebenen deutliche Unterschiede in der Regulation der immunmodulierenden Eigenschaften beschrieben wurden [Ren et al., 2009], sind vergleichende durchflusszytometrische Messungen erforderlich, um die Frage zu klären, ob auch humane MSCs CD39 und CD73 exprimieren und Adenosin generieren können.

In den vorliegenden Experimenten wurde ausschließlich der Einfluss der MSCs auf die mitogen aktivierte Proliferation von Lymphozyten untersucht. Die Wirkung der MSCs auf die Aktivierung einer antigenspezifischen oder alloreaktiven Immunreaktion bleibt deshalb unklar. Da der Effekt von Adenosin über den Adenosinrezeptor und die nachfolgende Suppression der Zytokinsekretion vermittelt wird, ist zu vermuten, dass die MSCs auch deutliche immunsuppressive Effekte auf diese Immunreaktionen aufweisen. Diese Hypothese muss jedoch zunächst in nachfolgenden Experimenten bestätigt werden.

Die vorliegenden Untersuchungen können zudem keine Aussagen über die (patho)physiologische Rolle der CD39+/CD73+-MSCs liefern. Es ist nicht ganz auszuschließen, dass die Expression von CD39 auf MSCs durch die Kultivierung über mehrere Passagen induziert wurde und daher bei frisch isolierten murinen MSCs nicht nachweisbar ist. Inwieweit die CD39+/CD73+-MSCs für die Therapie von Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise des Typ 1 Diabetes oder für die Toleranzinduktion bei Transplantationen, geeignet sind, muss in tierexperimentellen oder klinischen Phase I/II Studien weiter untersucht werden.

6. Zusammenfassung

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) besitzen eine Vielzahl einzigartiger Eigenschaften, hierunter ihr Differenzierungs- und immunregulatorisches Potenzial, die sie sehr interessant für die biomedizinische Forschung machen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, welche Mechanismen der immunmodulierenden Wirkung der MSCs zugrunde liegen.

Zu diesem Zweck wurden mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark von 5-16 Wochen alten Balb/c-Mäusen isoliert und in der Zellkultur expandiert. Das Oberflächenmarkerprofil der Zellen wurde durch Durchflusszytometrie (FACS) charakterisiert und die Expression potenziell immunsuppressiver Faktoren durch ELISA, Reverse Transkriptase-PCR beziehungsweise Western-Blot bestimmt. Für die Untersuchung der MSC-vermittelten Immunmodulation wurde ein Proliferationsassay etabliert, in dem Lymphozyten aus C57Bl/6-Mäusen durch das Mitogen ConA stimuliert und mit den murinen MSCs kokultiviert wurden. Durch die Zugabe spezifischer Inhibitoren gegen TGF β , die Prostaglandin E₂-Synthese (Indomethacin), den HGF-Rezeptor und den Adenosinrezeptor (SCH58261) wurde die Vermittlung der immunmodulierenden Effekte durch die MSCs untersucht.

In der Studie konnte eine reine Population muriner MSCs mit charakteristischen Oberflächenmarkern (CD29, CD73, CD90, CD105, CD140b, Sca-1) expandiert werden, die in vitro starke immunsuppressive Effekte im Proliferationsassay aufwies. Die Untersuchungen potenzieller Effektormoleküle zeigten, dass bei den murinen MSCs TGF β , HGF und das Enzym IDO keine entscheidende Rolle spielten und von den bekannten Mechanismen vor allem die Produktion von PGE₂ die Lymphozytenproliferation hemmte. Als wichtigstes Ergebnis kann der Nachweis, dass die murinen MSCs die Ektonukleotidasen CD39 und CD73 koexprimieren, die extrazelluläres ATP über 5'-AMP in das extrem stark immunsuppressiv wirkende Adenosin konvertieren können, angesehen werden.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals die Expression von CD39 auf murinen MSCs beschrieben. Die Koexpression von CD39/CD73 auf den MSCs und die daraus folgende Produktion von Adenosin stellt einen neuen Ansatz dar, um die Funktion der MSCs besser zu verstehen. Die CD39⁺/CD73⁺-MSCs sind demnach eine vielversprechende Zellpopulation für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen und für die Entwicklung neuer lokaler oder systemischer Therapien zur Toleranzinduktion nach Transplantation. Das therapeutische Potenzial dieser MSC-Subpopulation muss jedoch zunächst noch in nachfolgenden tierexperimentellen Studien untersucht werden.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schema des Tryptophanabbaus	14
Abbildung 2:	Darstellung des Prostaglandinsynthesewegs	16
Abbildung 3:	Fotographische Dokumentation der MSCs nach Isolierung an Tag 0 (A), 4 (B), 8 (C) und 34 (D).	53
Abbildung 4:	FACS-Färbung: Repräsentative Histogramme zur Expression von Oberflächenmarkern auf den MSCs (n = 5); rote Fläche = Färbung mit dem spezifischen Antikörper, weiße Fläche = Färbung mit der Isotypen-Kontrolle; A) Balb/c-MSCs exprimierten MSC-assoziierte Marker: CD29, CD44, CD73, CD90.2, CD105, CD104b, Sca-1 und VCAM, B) CD31, CD34, CD45, CD62L, CD117, CD133, Flk1 sowie ICAM wurden von den MSCs nicht exprimiert.	54
Abbildung 5:	Oil Red O Färbung der zu Adipozyten differenzierten MSCs (A) sowie Kontrolle der Färbung (B).	55
Abbildung 6:	Von-Kossa-Färbung der zu Osteoblasten differenzierten MSCs (A) sowie Kontrolle der Färbung (B).	55
Abbildung 7:	Alcianblau-Färbung der zu Chondrozyten differenzierten MSCs (A) sowie Kontrolle der Färbung (B).	56
Abbildung 8:	Lymphozytenproliferation im mitogen stimulierten Proliferationsansatz: Mesenchymale Stammzellen aus Balb/c-Mäusen supprimierten die Proliferation von mit ConA stimulierten T-Lymphozyten aus C57BL/6-Mäusen signifikant um bis zu 66%. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Suppressionspotential vorstimulierter und unstimulierter MSCs nachgewiesen werden. (*** p < 0,0001; ** p < 0,005; n = 3).	57
Abbildung 9:	Lymphozytenproliferation im mitogen stimulierten Proliferationsansatz: Zellkulturüberstände der MSCs aus Balb/c-Mäusen führten zu keiner Suppression der Proliferation von mit ConA stimulierten T-Lymphozyten aus C57BL/6-Mäusen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der T-Zellproliferation zwischen den unterschiedlichen Versuchsgruppen. (p > 0,05; n = 4).	58
Abbildung 10:	Lymphozytenproliferation im mitogen stimulierten Proliferationsansatz: Fixierte MSCs aus Balb/c-Mäusen führten zu keiner Suppression der Proliferation von mit ConA stimulierten T-Lymphozyten aus C57BL/6-Mäusen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der T-Zellproliferation zwischen den unterschiedlichen Versuchsgruppen. (p > 0,05; n = 5).	59
Abbildung 11:	Lymphozytenproliferation im mitogen stimulierten Proliferationsansatz: Mesenchymale Stammzellen aus Balb/c-Mäusen supprimierten die Proliferation von mit ConA stimulierten T-Lymphozyten aus C57BL/6-Mäusen signifikant trotz der Separierung der Zellen in einem Transwellexperiment. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Suppressionspotenzial von mit IFN γ \pm TNF α vorstimulierten und unstimulierten MSCs nachgewiesen werden. (*** p < 0,0001; ** p < 0,001; n = 3 für unstimulierte Zellen und mit IFN γ vorstimulierte Zellen, n = 2 für mit IFN γ + TNF α vorstimulierte Zellen).	60
Abbildung 12:	PCR-Nachweis von IDO und des zur Normierung verwendeten Aktins: Basal zeigte sich keine Expression von IDO, während sie jedoch nach 48-stündiger Stimulation mit IFN γ oder IFN γ + TNF α induziert werden konnte. Die Reaktionsansätze wurden auf einem 2%igen Agarosegel durch Elektrophorese aufgetrennt. (n = 4).	61

Abbildung 13:	Western-Blot-Nachweis von IDO in MSCs: Es konnte weder in den stimulierten noch den unstimulierten MSCs IDO auf Proteinebene nachgewiesen werden. Dargestellt ist ein repräsentatives Bild von drei unabhängig durchgeführten Versuchen.	61
Abbildung 14:	Nachweis von Kynurenin: Es konnte unabhängig von der Zugabe von IFN γ kein Kynurenin im Zellkulturüberstand der MSCs nachgewiesen werden. (n = 3).	62
Abbildung 15:	HGF- und TGF β 1-Sekretion: A) Balb/c-MSCs sezernierten niedrige Mengen an HGF. Die Sekretionsprofile waren mäßig höher nach der Kokultur mit C57BL/6 T-Zellen und ConA, jedoch ohne signifikanten Unterschied. (p > 0,05; n = 7). B) Balb/c-MSCs sezernierten äquivalent TGF β 1 unabhängig von der Art der Vorstimulation. Die Sekretion unterschied sich nicht signifikant von der in der Kokultur mit C57BL/6 T-Zellen und ConA. (p > 0,05; n = 6).	63
Abbildung 16:	Lymphozytenproliferation im mitogen stimulierten Proliferationsansatz: Die Zugabe eines monoklonalen HGF-Rezeptor-Antikörpers (A, Tabelle 14) sowie eines monoklonalen TGF β 1-Antikörpers (B, Tabelle 15) zum Proliferationsassay führte nicht zu einer Wiederherstellung der basalen Proliferation. (p > 0,05; n = 4).	64
Abbildung 17:	Expression des Enzyms COX-2: COX-2 wurde von MSCs der Linie Balb/c konstitutiv exprimiert. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den unstimulierten und über 48 Stunden mit IFN γ oder IFN γ + TNF α stimulierten Zellen. Repräsentatives PCR-Bild aus 5 unabhängigen Experimenten.	65
Abbildung 18:	PGE2-Sekretion: Balb/c-MSCs sezernierten niedrige Mengen an PGE2. Die Sekretionsprofile der Kokultur mit C57BL/6 T-Zellen und ConA waren geringfügig höher, jedoch ohne signifikanten Unterschied zur basalen Konzentration. (p > 0,05; n = 6).	66
Abbildung 19:	Proliferationsansatz mit Indomethacin: Die Zugabe von Indomethacin zum Proliferationsassay führte zu einer Wiederherstellung der basalen Proliferation. (* p < 0,05; ** p < 0,01; n = 4).	67
Abbildung 20:	FACS-Färbung: Repräsentative Histogramme zur Expression der Oberflächenmarker CD73 und CD39 auf den MSCs (n = 4); rote Fläche = Färbung mit dem spezifischen Antikörper, weiße Fläche = Färbung mit der Isotypen-Kontrolle. Die Balb/c-MSCs exprimierten CD73 und CD39 auf ihrer Oberfläche.	68
Abbildung 21:	Phosphatproduktion: Balb/c-MSCs sezernierten niedrige Mengen an Phosphat. Das Sekretionsprofil war unabhängig von der Vorstimulation. Durch die Zugabe von ATP kam es in allen Gruppen zu einer deutlichen Zunahme der Phosphatfreisetzung. Dabei zeigten die fixierten Zellen meist eine signifikant geringere Phosphatproduktion. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 n = 4).	69
Abbildung 22:	HPLC-Messung von Adenosin: Durch die Zugabe von ATP zu den MSCs zeigte sich eine Zunahme des Adenosinsignals. Die Menge des produzierten Adenosins korrelierte mit der Menge der verwendeten MSCs.	70
Abbildung 23:	Proliferationsansatz mit APCP: Die Zugabe von APCP zum Proliferationsassay führte nicht zu einer Wiederherstellung der basalen Proliferation. (p > 0,05; n = 4).	70
Abbildung 24:	Proliferationsansatz mit SCH58261: Die Zugabe von SCH58261 zum Proliferationsassay führte partiell zu einer Wiederherstellung der basalen Proliferation. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 n = 8).	71
Abbildung 25:	Proliferationsansatz mit SCH58261 + INDO: Die Zugabe von SCH58261 und INDO zum Proliferationsassay führte zu einer Wiederherstellung der basalen Proliferation. (** p < 0,01; *** p < 0,001 n = 5).	72

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Diagnostische Kriterien des Diabetes mellitus [nach Kerner et al., 2011]	7
Tabelle 2:	Differentialdiagnostische Kriterien für Typ 1 und Typ 2 Diabetes bei Diagnosestellung [modifiziert nach Tillil et al., 1998]	8
Tabelle 3:	MSC-Markerprofile verschiedener Arbeitsgruppen: + positiv, - negativ, +/- variable Expression	12
Tabelle 4:	Untersuchte Oberflächenmoleküle auf den MSCs	34
Tabelle 5:	Reaktionsansatz der reversen Transkription	39
Tabelle 6:	PCR-Mix der RT-PCR	40
Tabelle 7:	Temperaturprofil der RT-PCR	41
Tabelle 8:	Master-Mix der Polymerase-Kettenreaktion (Promega)	41
Tabelle 9:	Verwendete Primersequenzen der PCR-Primer	42
Tabelle 10:	Temperaturprofil für die Amplifikation spezifischer cDNA-Fragmente	42
Tabelle 11:	MSC-Stimulierung zur Verwendung im Proliferationsassay	51
Tabelle 12:	Inhibitoren und Antikörper im Proliferationsassay	52
Tabelle 13:	HGF- und TGFβ1-Konzentration [pg/ml] im Zellkulturüberstand basal und nach Kokultur mit T-Zellen abhängig von der Art der Vorstimulation der MSCs.	63
Tabelle 14:	Proliferationsrate der mit ConA stimulierten und mit MSCs kokultivierten T-Zellen in Prozent bezogen auf die basale Proliferation nach Stimulation mit ConA ± der Zugabe eines HGF-Rezeptor-Antikörpers (HGF-R-AK).	64
Tabelle 15:	Proliferationsrate der mit ConA stimulierten und mit MSCs kokultivierten T-Zellen in Prozent bezogen auf die basale Proliferation nach Stimulation mit ConA ± der Zugabe eines TGFβ1-Antikörpers.	64
Tabelle 16:	PGE2-Konzentration [pg/ml] basal und nach Kokultur mit T-Zellen abhängig von der Art der Vorstimulation der MSCs.	66
Tabelle 17:	Proliferationsrate der mit ConA stimulierten und mit MSCs kokultivierten T-Zellen in Prozent bezogen auf die basale Proliferation nach Stimulation mit ConA ± der Zugabe von Indomethacin.	67
Tabelle 18:	Phosphatkonzentration [μM] basal und nach Zugabe von ATP in Abhängigkeit von der Vorstimulation und Fixierung der Zellen.	69
Tabelle 19:	Proliferationsrate der mit ConA stimulierten und mit MSCs kokultivierten T-Zellen in Prozent bezogen auf die basale Proliferation nach Stimulation mit ConA ± der Zugabe von APCP.	71
Tabelle 20:	Proliferationsrate der mit ConA stimulierten und mit MSCs kokultivierten T-Zellen in Prozent bezogen auf die basale Proliferation nach Stimulation mit ConA ± der Zugabe von SCH58261.	72
Tabelle 21:	Proliferationsrate der mit ConA stimulierten und mit MSCs kokultivierten T-Zellen in Prozent bezogen auf die basale Proliferation nach Stimulation mit ConA ± der Zugabe von SCH58261 und Indomethacin.	73

7.3. Abkürzungsverzeichnis

ADA	Amerikanische Diabetes Gesellschaft
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Antigenpräsentierende Zellen
APCP	Adenosine-5'-(α,β -methylene)diphosphat
APS (10%)	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BB	BioBreeding Ratte
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
CO ₂	Kohlendioxid
ConA	Concavalin A
COX	Cyclooxygenase
CPM	Counts Per Minute
DM	Diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetales Kälberserum
HbA1c	Glykohämoglobin
HCl	Salzsäure
HGF	Hepatocyte Growth Factor
hPDGF-BB	Human Platelet Derived Growth Factor - BB
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
hTGF β 1	Human Transforming Growth Factor β 1
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
IFG	Abnorme Nüchtern glukose

IFN γ	Interferon γ
IGT	Gestörte Glukosetoleranz
IL	Interleukin
INDO	Indomethacin
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
MACS	Magnetic Cell Separation
mEGF	Murin Endothelial Growth Factor
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	Messenger RNA
MSC	Mesenchymale Stammzellen
N ₂	Stickstoff
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NGT	Normale Glukosetoleranz
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	Nonobese Diabetic Mouse
OD	Optische Dichte
oGTT	Oraler Glukosetoleranztest
P/S	Penicillin / Streptomycin
PBMC	Mononukleäre Zelle des peripheren Blutes
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PG	Prostaglandin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Real Time-Polymerase-Kettenreaktion
SCF	Stem Cell Factor

SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF β	Transforming Growth Factor β
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
Treg	Regulatorische T-Zellen
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
Tween20	Polysorbat 20
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

8. Literaturverzeichnis

Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH.: Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes*. 7(7):1759-67, 2008

Aggarwal S, Pittenger MF.: Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 105(4):1815-22, 2005

Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC, Phinney DG.: Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem*. 89(6):1235-49, 2003

Badiavas EV, Falanga V.: Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells. *Arch Dermatol*. 139(4):510-6, 2003

Beggs KJ, Lyubimov A, Borneman JN, Bartholomew A, Moseley A, Dodds R, Archambault MP, Smith AK, McIntosh KR.: Immunologic consequences of multiple, high-dose administration of allogeneic mesenchymal stem cells to baboons. *Cell Transplant*. 15(8-9):711-21, 2006

Benkhoucha M, Santiago-Raber ML, Schneider G, Chofflon M, Funakoshi H, Nakamura T, Lalive PH.: Hepatocyte growth factor inhibits CNS autoimmunity by inducing tolerogenic dendritic cells and CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(14):6424-9, 2010

Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Höpner S, Centonze D, Bernardi G, Dell'Acqua ML, Rossini PM, Battistini L, Röttschke O, Falk K.: Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 110(4):1225-32, 2007

Brabletz T, Pfeuffer I, Schorr E, Siebelt F, Wirth T, Serfling E.: Transforming growth factor beta and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site. *Mol Cell Biol*. 13(2):1155-62, 1993

Braunwald E, Pfeffer MA.: Ventricular enlargement and remodeling following acute myocardial infarction: mechanisms and management. *Am J Cardiol*. 68(14):1D-6D, 1991

Breitbach M, Bostani T, Roell W, Xia Y, Dewald O, Nygren JM, Fries JW, Tiemann K, Bohlen H, Hescheler J, Welz A, Bloch W, Jacobsen SE, Fleischmann BK.: Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood*. 110(4):1362-9, 2007

Bretzel RG, Jahr H, Eckhard M, Martin I, Winter D, Brendel MD: Islet cell transplantation today. *Langenbecks Arch Surg*. 392(3):239-53, 2007

Chaparro RJ, Diloranzo TP.: An update on the use of NOD mice to study autoimmune (Type 1) diabetes. *Expert Rev Clin Immunol*. 6(6):939-55, 2010

Chopp M, Li Y.: Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol*. 1(2):92-100, 2002

- Choudhry MA, Ahmed Z, Sayeed MM.:** PGE(2)-mediated inhibition of T cell p59(fyn) is independent of cAMP. *Am J Physiol.* 277(2 Pt 1):C302-9, 1999
- Choudhry MA, Hockberger PE, Sayeed MM.:** PGE2 suppresses mitogen-induced Ca²⁺ mobilization in T cells. *Am J Physiol.* 277(6 Pt 2):R1741-8, 1999
- Da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB.:** Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.*, 119(Pt 11):2204-13, 2006
- Däubener W, Wanagat N, Pilz K, Seghrouchni S, Fischer HG, Hadding U.:** A new, simple, bioassay for human IFN-gamma. *J Immunol Methods.* 168(1):39-47, 1994
- De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, Luyten FP.:** Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol.* 160(6):909-18, 2003
- Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC.:** Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 204(6):1257-65, 2007
- Delorme B, Chateauvieux S, Charbord P.:** The concept of mesenchymal stem cells. *Regen Med.* 1(4):497-509, 2006
- Delovitch TL, Singh B.:** The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity.* 7(6):727-38, 1997
- 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.* 99(10):3838-43, 2002
- Djouad F, Plence 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.* 102(10):3837-44, 2003
- Duijvestein M, Vos AC, Roelofs H, Wildenberg ME, Wendrich BB, Verspaget HW, Kooy-Winkelaar EM, Koning F, Zwaginga JJ, Fidder HH, Verhaar AP, Fibbe WE, van den Brink GR, Hommes DW.:** Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut.* 59(12):1662-9, 2010
- Eltzschig HK, Ibla JC, Furuta GT, Leonard MO, Jacobson KA, Enjyoji K, Robson SC, Colgan SP.:** Coordinated Adenine Nucleotide Phosphohydrolysis and Nucleoside Signaling in Posthypoxic Endothelium: Role of Ectonucleotidases and Adenosine A_{2B} Receptors, *J Exp Med.* 1; 198(5): 783–796, 2003
- English K, Barry FP, Field-Corbett CP, Mahon BP.:** IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol Lett.* 110(2):91-100, 2007

- Erdmann AA, Gao ZG, Jung U, Foley J, Borenstein T, Jacobson KA, Fowler DH.:** Activation of Th1 and Tc1 cell adenosine A2A receptors directly inhibits IL-2 secretion in vitro and IL-2-driven expansion in vivo. *Blood.* 105(12):4707-14, 2005
- Ernst PB, Garrison JC, Thompson LF.:** Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. *J Immunol.* 185(4):1993-8, 2010
- Fiorina P, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La Rosa S, Selig M, Godwin J, Law K, Placidi C, Smith RN, Capella C, Rodig S, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH, Abdi R.:** Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *J Immunol.* 183(2):993-1004, 2009
- Fletcher JM, Loneragan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, O'Farrelly C, Tubridy N, Mills KH.:** CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol.* 183(11):7602-10, 2009
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN.:** Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 4(5):267-74, 1976
- Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI.:** The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs.* 169(1):12-20, 2001
- Ghannam S, Pène J, Torcy-Moquet G, Jorgensen C, Yssel H.:** Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J Immunol.* 185(1):302-12, 2010
- Goetzl EJ, An S, Smith WL.:** Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. *FASEB J.* 9(11):1051-8, 1995
- Gonzalez-Rey E, Gonzalez MA, Varela N, O'Valle F, Hernandez-Cortes P, Rico L, Büscher D, Delgado M.:** Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. 69(1):241-8, 2010
- Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC, Puccetti P.:** CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol.* 3(11):1097-101, 2002
- Hannon GJ, Beach D.:** p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature.* 371(6494):257-61, 1994
- Hayashi Y, Tsuji S, Tsujii M, Nishida T, Ishii S, Iijima H, Nakamura T, Eguchi H, Miyoshi E, Hayashi N, Kawano S.:** Topical implantation of mesenchymal stem cells has beneficial effects on healing of experimental colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 326(2):523-31, 2008
- Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Fonsato V, Romanazzi GM, Camussi G.:** Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med.* 14(6):1035-41, 2004

Hilkens CM, Snijders A, Snijdwint FG, Wierenga EA, Kapsenberg ML.: Modulation of T-cell cytokine secretion by accessory cell-derived products. *Eur Respir J Suppl.* 22:90s-94s, 1996

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; International Society for Cellular Therapy.: Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 7(5):393-5, 2005

Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK.: Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* 5(3):309-13, 1999

Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL et al.: Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood.* 97: 1227–31, 2001

Jiang CY, Gui C, He AN, Hu XY, Chen J, Jiang Y, Wang JA.: Optimal time for mesenchymal stem cell transplantation in rats with myocardial infarction. *J Zhejiang Univ Sci B.* 9(8):630-7, 2009

Jun HS, Yoon CS, Zbytnuik L, van Rooijen N, Yoon JW.: The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med.* 189(2):347-58, 1999

Jurewicz M, Yang S, Augello A, Godwin JG, Moore RF, Azzi J, Fiorina P, Atkinson M, Sayegh MH, Abdi R.: Congenic mesenchymal stem cell therapy reverses hyperglycemia in experimental type 1 diabetes. *Diabetes.* 59(12):3139-47, 2010

Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P.: Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest.* 74(1):86-107, 1996

Kerner W, Brückel J: Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Diabetologie und Stoffwechsel.* S2, 105-110, 2011

Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW, Deans RJ, McIntosh KR.: T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci.* 12(1):47-57, 2005

Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ, Mosmann TR.: T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol.* 177(10):6780-6, 2006

Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG.: Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(19):10711-6, 1999

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.* 101(9):3722-9, 2003

Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S.: Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(2):770-4, 1993

Lappas CM, Rieger JM, Linden J.: A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4+ T cells. *J Immunol.* 174(2):1073-80, 2005

Le Blanc K, Rasmusson I, Götherström C, Seidel C, Sundberg B, Sundin M, Rosendahl K, Tammik C, Ringdén O.: Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol*. 60(3):307-15, 2004

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*. 363(9419):1439-41, 2004

Le Blanc K, Ringdén O.: Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med*. 262(5):509-25, 2007

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*. 57(1):11-20, 2003

Madec AM, Mallone R, Afonso G, Abou Mrad E, Mesnier A, Eljaafari A, Thivolet C.: Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. *Diabetologia*. 52(7):1391-9, 2009

Maitra B, Szekely E, Gjini K, Laughlin MJ, Dennis J, Haynesworth SE, Koç ON.: Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant*. 33(6):597-604, 2004

Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S.: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 103(5):697-705, 1999

Mandrup-Poulsen T, Bendtzen K, Dinarello CA, Nerup J.: Human tumor necrosis factor potentiates human interleukin 1-mediated rat pancreatic beta-cell cytotoxicity. *J Immunol*. 139(12):4077-82, 1987

McGuirk JP, Weiss ML.: Promising cellular therapeutics for prevention or management of graft-versus-host disease (a review). *Placenta*. 32 Suppl 4:S304-10, 2011

Meirelles L da S, Nardi NB.: Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol*. 123(4):702-11, 2003

Meisel R, Brockers S, Heseler K, Degistirici O, Bülle H, Woite C, Stuhlsatz S, Schwippert W, Jäger M, Sorg R, Henschler R, Seissler J, Dilloo D, Däubener W.: Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Leukemia*. 25(4):648-54, 2011

- Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D.:** Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 103(12):4619-21, 2004
- Mellor AL, Munn DH.:** Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation?. *Immunol Today*. 20(10):469-73, 1999
- Meloche RM.:** Transplantation for the treatment of type 1 diabetes. *World J Gastroenterol*. 13(47):6347-55, 2007
- Moffett JR, Namboodiri MA.:** Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol*. 1(4):247-65, 2003
- Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N, Nawata H, Strober W.:** TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol*. 172(2):834-42, 2004
- Nauta AJ, Fibbe WE.:** Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 110(10):3499-506, 2007
- Phipps RP, Stein SH, Roper RL.:** A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol Today*. 12(10):349-52, 1991
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR.:** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284(5411):143-7, 1999
- Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL.:** Roles of cytokines in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes. *Cell Biochem Biophys*. 48(2-3):159-63, 2007
- Rasmusson I, Ringdén O, Sundberg B, Le Blanc K.:** Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res*. 305(1):33-41, 2005
- Rasmusson I.:** Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*. 312(12):2169-79, 2006
- Ren G, Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, L'huillie A, Zhang J, Lu Y, Roberts AI, Ji W, Zhang H, Rabson AB, Shi Y.:** Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells*. 27(8):1954-62, 2009
- Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lönner H, Marschall HU, Dlugosz A, Szakos A, Hassan Z, Omazic B, Aschan J, Barkholt L, Le Blanc K.:** Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. 81(10):1390-7, 2006
- Roep BO, Peakman M.:** Diabetogenic T lymphocytes in human Type 1 diabetes. *Curr Opin Immunol*. 23(6):746-53, 2011

Rouhi L, Kajbafzadeh AM, Modaresi M, Shariati M, Hamrahi D.: Autologous serum enhances cardiomyocyte differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in the presence of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 49(4):287-94, 2013

Ruggeri P, Nicocia G, Venza I, Venza M, Valenti A, Teti D.: Polyamine metabolism in prostaglandin E2-treated human T lymphocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 22(1):117-29, 2000

Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, Lakey JR, Shapiro AM.: Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes.* 54(7):2060-9, 2005

Salem HK, Thiemermann C.: Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells.* 28(3):585-96, 2010

Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K.: Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood.* 109(1):228-34, 2007

Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, Kobune M, Sato T, Miyanishi K, Takayama T, Takahashi M, Takimoto R, Iyama S, Matsunaga T, Ohtani S, Matsuura A, Hamada H, Niitsu Y.: Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood.* 106(2):756–63, 2005

Sattler C, Steinsdoerfer M, Offers M, Fischer E, Schierl R, Heseler K, Däubener W, Seissler J.: Inhibition of T-cell proliferation by murine multipotent mesenchymal stromal cells is mediated by CD39 expression and adenosine generation. *Cell Transplant.* 20(8):1221-30, 2011

Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F.: Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells.* 26(1):212-22, 2008

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.* 73(6):1919-25; discussion 1926, 2002

Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV.: Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med.* 343(4):230-8, 2000

Sivasubramaniyan K, Lehnen D, Ghazanfari R, Sobiesiak M, Harichandan A, Mortha E, Petkova N, Grimm S, Cerabona F, de Zwart P, Abele H, Aicher WK, Faul C, Kanz L, Bühring HJ.: Phenotypic and functional heterogeneity of human bone marrow- and amnion-derived MSC subsets. *Ann N Y Acad Sci.* 1266:94-106, 2012

Smith WL, Meade EA, DeWitt DL.: Interactions of PGH synthase isozymes-1 and -2 with NSAIDs. *Ann N Y Acad Sci.* 15;744:50-7, 1994

Staeva-Vieira T, Peakman M, von Herrath M.: Translational mini-review series on type 1 diabetes: Immune-based therapeutic approaches for type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol.* 148(1):17-31, 2007

Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang PH, Mao N.: Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. *Stem Cells.* 21(5):527-35, 2003

Taylor AW.: Review of the activation of TGF-beta in immunity. *J Leukoc Biol.* 85(1):29-33, 2009

Taylor MW, Feng GS.: Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J.* 5(14):3003-4, 1991

Thiel M, Caldwell CC, Sitkovsky MV.: The critical role of adenosine A2A receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes Infect.:* 5(6):515-26, 2003

Tillil H, Nick O, Köbberling J.: Modern diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Z Arztl Fortbild Qualitatssich.* 92(7):456-66, 1998

Tropel P, Noël D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F.: Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res.* 295(2):395-406, 2004

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.* 75(3):389-97, 2003

Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM.: Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 76(4):579-92, 1994

Wang L, Li Y, Chen X, Chen J, Gautam SC, Xu Y, Chopp M.: MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Hematology.* 7(2):113-7, 2002

Weber B, Scherman J, Emmert MY, Gruenenfelder J, Verbeek R, Bracher M, Black M, Kortsmit J, Franz T, Schoenauer R, Baumgartner L, Brokopp C, Agarkova I, Wolint P, Zund G, Falk V, Zilla P, Hoerstrup SP.: Injectable living marrow stromal cell-based autologous tissue engineered heart valves: first experiences with a one-step intervention in primates. *Eur Heart J.* 32(22):2830-40, 2011

Wu Y, Sun X, Kaczmarek E, Dwyer KM, Bianchi E, Usheva A, Robson SC.: RanBPM associates with CD39 and modulates ecto-nucleotidase activity. *Biochem J.* 396(1):23-30, 2006

- Yamaura K, Ito K, Tsukioka K, Wada Y, Makiuchi A, Sakaguchi M, Akashima T, Fujimori M, Sawa Y, Morishita R, Matsumoto K, Nakamura T, Suzuki J, Amano J, Isobe M.:** Suppression of acute and chronic rejection by hepatocyte growth factor in a murine model of cardiac transplantation: induction of tolerance and prevention of cardiac allograft vasculopathy. *Circulation*. 110(12):1650-7, 2004
- Yoon JW, Jun HS, Santamaria P.:** Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. *Autoimmunity*. 27(2):109-22, 1998
- Yoon JW, Jun HS.:** Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci*. 928:200-11, 2001
- Yoshimura A, Wakabayashi Y, Mori T.:** Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. *J Biochem*. 147(6):781-92, 2010
- Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ.:** Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res*. 16(4):406-13, 1998
- Zarek PE, Huang CT, Lutz ER, Kowalski J, Horton MR, Linden J, Drake CG, Powell JD.:** A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood*. 111(1):251-9, 2008
- Zhao Y, Li T, Wei X, Bianchi G, Hu J, Sanchez PG, Xu K, Zhang P, Pittenger MF, Wu ZJ, Griffith BP.:** Mesenchymal stem cell transplantation improves regional cardiac remodeling following ovine infarction. *Stem Cells Transl Med*. 1(9):685-95, 2012
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH.:** Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 7(2):211-28, 2001

Eidesstattliche Versicherung

Steinsdörfer Manuela

Hiermit erkläre ich an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Untersuchung der immunsuppressiven Eigenschaften muriner mesenchymaler Stammzellen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 15.07.2013

Manuela Steinsdörfer