

Aus dem Pathologischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Thomas Kirchner

**Charakterisierung von Adhäsions- und
Migrationsfaktoren auf mesenchymalen Stromazellen
unter dem Einfluss proinflammatorischer Bedingungen**

Dissertation

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



vorgelegt von
Kornelius Wiechmann
aus Hamburg

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Ralf Huss

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Volker Spindler
Priv. Doz. Dr. Dorit Nägler

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Markus Neubauer
Dr. rer. nat. Heike Wegmeyer

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

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juli 2015

Meiner Familie, die mir stets einen festen Rückhalt gab
und mich nach besten Kräften unterstützt hat

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Mesenchymale Stromazellen in der regenerativen Medizin	1
1.1.1	Stammzelltherapie	1
1.1.2	Mesenchymale Stromazellen (MSC).....	2
1.1.3	MSC-basierte Therapie.....	4
1.1.3.1	MSC-Gewinnung und Applikation	4
1.1.3.2	Wirkmechanismen	5
1.1.3.3	Potentielle klinische Einsatzgebiete.....	7
1.1.4	Zielfindung, Adhäsion und Migration von MSCs	9
1.1.5	Adhäsions- und migrationsvermittelnde Faktoren.....	10
1.1.5.1	Selektine	10
1.1.5.2	Chemokinrezeptoren.....	11
1.1.5.3	Integrine.....	13
1.1.6	Ektoenzyme	16
1.2	CD38.....	19
1.2.1	Struktur und Verteilung	19
1.2.2	Enzymatische Aktivität und Ca ²⁺ -Mobilisierung	21
1.2.3	Vermittelte Funktionen der CD38-Enzymaktivität	23
1.2.4	Rezeptorfunktion und Signaltransduktion	24
1.2.5	CD38 in chronischer lymphatischer Leukämie	25
1.3	MSCs unter proinflammatorischen Bedingungen.....	25
2	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	27
3	Material und Methoden	28
3.1	Material.....	28
3.1.1	Geräte	28
3.1.2	Verbrauchsmaterial	28
3.1.3	Chemikalien und Enzyme	29
3.1.4	Kits	30
3.1.5	Software	30
3.1.6	Desoxyribonukleinsäuren (DNA).....	30
3.1.6.1	Gensynthesen.....	30
3.1.6.2	Plasmide	31
3.1.6.3	Oligonukleotide (Primer).....	32
3.1.7	Puffer und Kulturmedien.....	33
3.1.8	Antikörper	34
3.1.9	Biologisches Material.....	35
3.1.9.1	Humane Primärzellen	35
3.2	Methoden.....	35
3.2.1	Methoden der Isolation und Kultivierung von MSCs.....	35
3.2.1.1	Isolation von MSCs aus dem Gewebe	35
3.2.1.2	Kultivierung von MSCs.....	36

3.2.1.3	Einfrieren und Auftauen	36
3.2.1.4	Stimulation von MSCs mit proinflammatorischen Zytokinen	37
3.2.2	Molekularbiologische Methoden	37
3.2.2.1	Restriktionsverdau	37
3.2.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	38
3.2.2.3	Alkalische Phosphatase-Reaktion	39
3.2.2.4	Ligation	39
3.2.2.5	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	39
3.2.2.6	Plasmidpräparation	40
3.2.2.7	Bestimmung der DNA-Konzentration	40
3.2.2.8	Kontrollverdau	40
3.2.2.9	DNA-Sequenzierung	41
3.2.2.10	Stabile Transduktion (Retrovirus)	41
3.2.3	mRNA-Expressionsanalyse	42
3.2.3.1	Realtime-PCR (qRT-PCR)	42
3.2.4	Methoden der Proteinexpressionsanalyse	45
3.2.4.1	Durchflusszytometrie (FACS)	45
3.2.4.2	Immunzytochemie	48
3.2.5	Analyse von CD38 vermittelten Funktionen in MSCs	49
3.2.5.1	Enzymaktivitätstest	49
3.2.5.2	Ca ²⁺ -Flux-Test	50
3.2.6	Analyse des Migrationsverhaltens von MSCs	52
3.2.6.1	Migrationstest	52
4	Ergebnisse	54
4.1	Expressionsprofilierung klassischer Adhäsions- und Migrationsfaktoren in MSCs	54
4.1.1	Charakterisierung von MSCs unter Normalbedingungen	54
4.1.1.1	Expression der Integrin-Untereinheiten	55
4.1.1.2	Expression der Chemokinrezeptoren	58
4.1.1.3	Expression weiterer Adhäsionsfaktoren	60
4.1.2	Charakterisierung von MSCs unter proinflammatorischen Bedingungen	60
4.1.2.1	Einfluss der Stimulation auf die Integrin-Untereinheiten	61
4.1.2.2	Einfluss der Stimulation auf die Chemokinrezeptoren	64
4.1.2.3	Einfluss der Stimulation auf weitere Adhäsionsfaktoren	65
4.2	Identifizierung und Charakterisierung neuer adhäsions- und migrationsvermittelnder Faktoren in MSCs	67
4.2.1	Genexpressionsanalyse zur Identifizierung durch Stimulation regulierter Faktoren	67
4.2.2	Analyse der Expression von CD38 in MSCs	71
4.2.2.1	mRNA-Expression	71
4.2.2.2	CD38-Proteinexpression	71
4.2.2.3	Abhängigkeit der CD38-Expression in MSCs von der Art des Stimulus	74
4.2.2.4	CD157-Expression	75
4.2.3	Überexpression rekombinanter CD38-Varianten in UC-MSCs	76
4.2.3.1	Expressionsanalyse	76
4.2.3.2	CD38-Enzymaktivität	77

4.2.4	Ca ²⁺ -Mobilisierung.....	81
4.2.4.1	Ca ²⁺ -Flux-Messungen in MSCs.....	81
4.2.4.2	Ca ²⁺ -Flux in CD38-transgenen UC-MSCs	86
4.2.5	Extrazelluläres Calcium und TRPM2-Expression.....	87
4.2.5.1	Ca ²⁺ -Flux in MSCs im Ca ²⁺ -freien Milieu.....	87
4.2.5.2	Nachweis des Ca ²⁺ -Kanals TRPM2.....	89
4.2.6	Potentielle Rolle von CD38 bei der Migration von MSCs	90
4.2.7	Expressionsanalyse weiterer Ektoenzyme in MSCs.....	91
4.2.7.1	mRNA-Expressionsanalyse	91
4.2.7.2	ATP-metabolisierende Enzyme (Nukleotidasen).....	92
4.2.7.3	Proteasen.....	93
4.2.7.4	Expression der Aminooxidase VAP-1 (AOC3).....	94
5	Diskussion.....	96
5.1	Expressionsprofilierung klassischer Adhäsions- und Migrationsfaktoren in MSCs.....	96
5.1.1	Integrine und Integrin-Liganden.....	96
5.1.2	Selektine und Chemokinrezeptoren.....	99
5.2	Die Rolle von CD38 und weiterer Ektoenzyme in MSCs.....	102
5.2.1	CD38-Expression in MSCs	102
5.2.2	CD38-Enzymaktivität und Ca ²⁺ -Mobilisierung.....	103
5.2.3	Einfluss von NAD ⁺ auf die Migration von MSCs	106
5.2.4	Potentielle Rollen weiterer Ektoenzyme in MSCs	109
6	Zusammenfassung und Ausblick	112
7	Literaturverzeichnis	115
8	Anhang	127
8.1	CD38-Gensynthesen	127
8.2	Plasmidkarten	129
8.3	RealTime ready Custom Panel	130
8.4	Expressionsprofilierung	148
8.5	Realtime-PCR.....	151
8.6	Kinetik	152
8.7	Enzymaktivität.....	155
8.8	Ca ²⁺ -Flux-Test	161
8.9	Migrationstest	168
8.10	Vergleich der CD38-Expression in Zellen unterschiedlicher Gewebe	171
8.11	Einfluss der Stimulation auf Morphologie und Migration von MSCs	172
9	Abkürzungsverzeichnis.....	175
	Danksagung	178
	Eidesstattliche Erklärung.....	179

1 Einführung

1.1 Mesenchymale Stromazellen in der regenerativen Medizin

1.1.1 Stammzelltherapie

In den vergangenen Jahren haben Stammzellen im Kontext der regenerativen Medizin zunehmend an Bedeutung gewonnen und sie besitzen enormes Potential, um als neuartige Therapieform für die Behandlung von Krankheiten mit einem hohen medizinischen Bedarf eingesetzt zu werden (Huss 2010, Parekkadan & Milwid 2010). Stammzellen sind durch die Fähigkeit charakterisiert, Tochterzellen mit denselben biologischen Eigenschaften zu generieren und sich in spezialisierte Zellen auszudifferenzieren. Sie sind in allen Metazoen zu finden und lassen sich im Allgemeinen in embryonale und adulte Stammzellen einteilen, wobei sich die verschiedenen Stammzellen eines Organismus insbesondere hinsichtlich der Vielfalt an Zell- bzw. Gewebetypen, in die sie sich ausdifferenzieren können, unterscheiden. Einzig die befruchtete Oozyte und die Zellen bis zum 8-Zell-Stadium sind in der Lage einen vollständigen Organismus zu bilden. Sie werden als totipotente embryonale Stammzellen bezeichnet. Bei den Zellen der inneren Zellmasse der Blastozyste handelt es sich um pluripotente embryonale Stammzellen (ESC), die die Fähigkeit besitzen, sich in jeden Zelltyp der endodermalen, ektodermalen sowie mesodermalen Linie auszudifferenzieren und somit sämtliche Zellen des adulten Organismus hervorbringen können. Stammzellen des postnatalen Stadiums werden gemeinhin als adulte Stammzellen bezeichnet, die sich lediglich in gewebesverwandte Zellen differenzieren können und somit als multipotente Stammzellen betrachtet werden. Sie kommen in einer Vielzahl von Geweben vor und können zeitlebens neue spezialisierte Zellen generieren, um geschädigtes oder altes Gewebe zu ersetzen. So bilden multipotente hämatopoetische Stammzellen (HSC) die Vorläuferzellen des gesamten hämatopoetischen Systems, das sämtliche Zellen der lymphoiden sowie der myeloiden Reihe einschließt. Die Transplantation von Knochenmark zur Übertragung gesunder HSCs nach Chemo- oder Strahlentherapie im Zuge einer Krebserkrankung oder auch zur Behandlung verschiedener Leukämien bzw. Lymphome stellt ein klassisches Einsatzgebiet adulter Stammzellen als Therapieform dar.

Neben hämatopoetischen Stammzellen repräsentieren so genannte mesenchymale Stammzellen, die auch als mesenchymale Stromazellen (MSC) bezeichnet werden, einen weiteren adulten Stammzelltyp. Sie können in Zellen des mesodermalen Kompartiments ausdifferenzieren und man nimmt an, dass sie *in vivo* zur Regeneration des Stütz- und Bindegewebes, wie Knorpel-, Knochen- und Fettgewebe, aber auch zur Entwicklung anderer Zellen beitragen (Caplan 1994, Dazzi et al. 2006). Sie lassen sich unter anderem aus dem Knochenmark, aber auch aus anderen Geweben gewinnen, wobei ihre genaue anatomische

Lokalisation in den verschiedenen Geweben sowie ihre tatsächlichen biologischen Funktionen noch nicht im Detail bekannt sind und bisweilen kontrovers diskutiert werden (da Silva Meirelles et al. 2008).

Aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften geht man davon aus, dass auch exogene Stammzellen das Potential besitzen, erkranktes Gewebe wiederherzustellen und Verletzungen zu therapieren. Obwohl embryonale Stammzellen die außerordentliche Fähigkeit besitzen in eine Großzahl verschiedener Gewebe zu differenzieren und so insbesondere für den Einsatz in der Zellersatztherapie von Interesse wären, ist eine Verwendung der Zellen ethisch umstritten, da sie die Zerstörung humaner Embryonen erfordert. In diesem Zusammenhang gewinnen vor allem induziert pluripotente Stammzellen (iPS Zellen) zunehmend an Bedeutung. In ihrer Pionierarbeit konnten K. Takahashi und S. Yamanaka zeigen, dass sich unter Verwendung der vier Transkriptionsfaktoren *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* und *c-Myc* adulte Hautfibroblasten in pluripotente Zellen reprogrammieren lassen (Takahashi & Yamanaka 2006). iPS Zellen stellen eine vielversprechende Quelle therapeutischer Zellen dar, da sie zahlreiche Fähigkeiten von ESCs besitzen. Dennoch bestehen noch viele unbeantwortete Fragen, die insbesondere die genomische bzw. epigenomische Stabilität, aber auch die mitunter schwierige Kultivierung dieser Zellen betreffen (Baharvand et al. 2010, Martins-Taylor & Xu 2012). Mesenchymale Stammzellen aus adulten Organismen, für deren Einsatz zu Therapiezwecken wenig ethische Konfliktpunkte existieren, bieten den Vorteil, dass sie auf minimalinvasivem Wege aus dem Gewebe eines Spenders isoliert und unter Standardbedingungen kultiviert werden können. Für die Entwicklung wirkungsvoller Stammzelltherapiekonzepte ist es jedoch erforderlich, die Biologie von MSCs sowie ihre physiologischen Funktionen bestmöglich zu verstehen und darauf basierende Wirkmechanismen aufzuzeigen.

1.1.2 Mesenchymale Stromazellen (MSC)

Ende der 1960er Jahren wurde zum ersten Mal darüber berichtet, dass adhärente, multipotente Vorläuferzellen aus murinem Knochenmark aspirat isoliert werden können, die in Kultur als klonogene, spindelförmige, fibroblastenartige Zellen wachsen. Die Zelle, die den Ursprung einer Kolonie bildet, wurde als so genannte koloniebildende Einheiten-Fibroblast (*engl. Colony-forming unit-fibroblast* - CFU-F) definiert. Es wurde angenommen, dass die Zellen Vorläuferzellen für osteogenes sowie hämatopoetisches Gewebe darstellen und eine wichtige Rolle für die Hämatopoese spielen (Friedenstein et al. 1968). Später konnte gezeigt werden, dass sich Zellklone, die aus dem Knochenmark von Patienten mit myeloproliferativer Erkrankung isoliert wurden, *in vitro* in verschiedene Zellen der hämatopoetischen Nische sowie

zu HSC entwickeln können und über die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren die Viabilität, Proliferation und Differenzierung von HSCs regulieren (Singer et al. 1984). Basierend auf diesen Eigenschaften, ihrer heterogenen Morphologie und Funktion, sowie in Hinblick darauf, dass sie als Subtyp von Knochenmarkszellen potentiell am Aufbau von Knochen-, Knorpel sowie Fettgewebe beteiligt sind, wurden später die Begriffe Stromazellen bzw. mesenchymale Stammzellen (MSC) als Bezeichnung vorgeschlagen (Caplan 1991, Owen 1988). Ende der 1990er Jahre wurde für klonal expandierte MSCs aus dem Knochenmark demonstriert, dass sie *in vitro* in Zelltypen der mesodermalen Linie wie Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten differenzieren können (Pittenger et al. 1999). Eine so genannte Transdifferenzierung von MSCs in Zellen der ektodermalen oder der endodermalen Linie wie Neuronen, Lungen- oder Hautepithelzellen wurde zwar beschrieben, ist jedoch weiterhin umstritten (Phinney & Prockop 2007) (s. Abbildung 1).

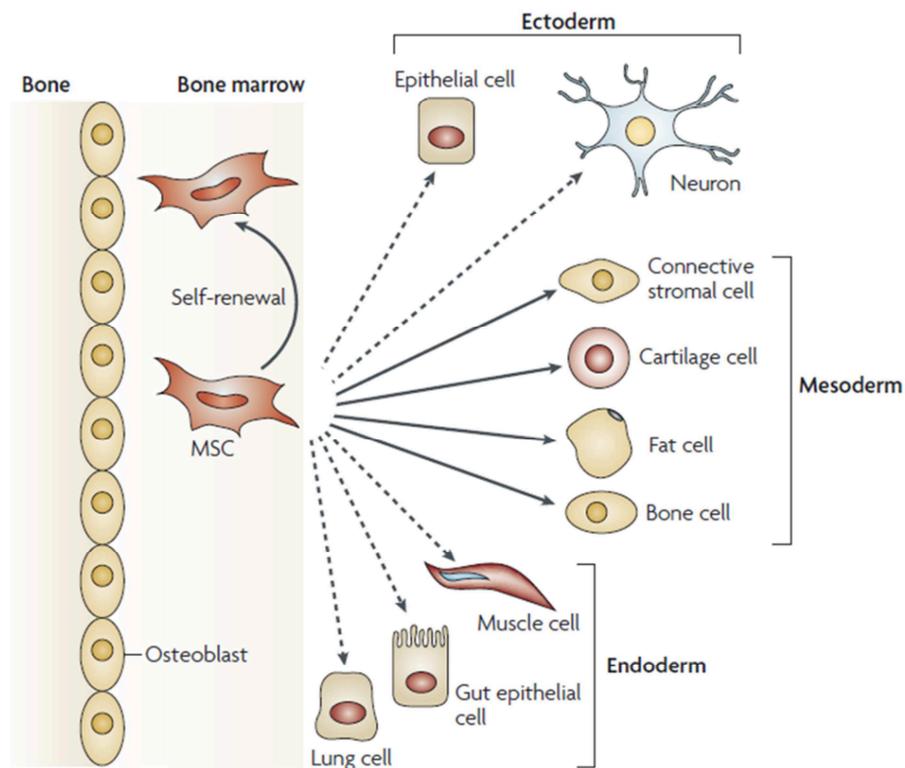


Abbildung 1: Selbsterneuerungs- (gebogener Pfeil) und Differenzierungspotential (gerade Pfeile) mesenchymaler Stamm- bzw. Stromazellen (MSCs) aus dem Knochenmark. Eine mögliche Transdifferenzierung ist durch Pfeile mit gestrichelter Linie gekennzeichnet. Diese ist jedoch umstritten. Uccelli et al., *Nat Rev Immunol.* 2008 Sep;8(9):726-36

MSCs aus dem Knochenmark repräsentieren den bislang am umfangreichsten untersuchten MSC-Typ. Als Bestandteil der hämatopoetischen Nische spielen sie unter anderem eine Schlüsselrolle in frühen Stadien der Hämatopoese, indem sie HSCs in einem ruhenden Zustand halten, bis diese durch einen geeigneten Stimulus differenzieren und in die Zirkulation gelangen (Uccelli et al. 2008, Dazzi et al. 2006). Insgesamt stellen MSCs jedoch eine vergleichsweise heterogene Untergruppe an Stromazellen dar, die neben dem Knochenmark bereits aus zahlreichen anderen Geweben und Organen wie dem Fettgewebe, Muskelgewebe, Gehirn, Leber, Niere, Lunge, Thymus, Pankreas, Milz, der Zahnpulpa und auch den Speicheldrüsen isoliert werden konnten (da Silva Meirelles et al. 2006). Überdies dienen auch Gewebe perinatalen Ursprungs wie Amnionmembran, Fruchtwasser, Nabelschnur und auch Nabelschnurblut als Quelle für MSCs. Die Existenz von MSCs in peripherem Blut ist hingegen umstritten und wird kontrovers diskutiert (Chong et al. 2012). Die Feststellung, dass MSCs eine hohe Ähnlichkeit zu den blutgefäßumgebenden Perizyten aufweisen, führten zu der Hypothese, dass die perivaskulären Regionen vieler Organe die eigentliche MSC-Nische *in vivo* darstellen (Crisan et al. 2008, da Silva Meirelles et al. 2008).

Angesichts des Fehlens spezifischer Marker wurden von der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie (ISCT) Minimalkriterien formuliert, um humane MSCs zu definieren (Dominici et al. 2006). So müssen MSCs unter anderem an Zellkulturplastik adhären können und die Fähigkeit besitzen *in vitro* in Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten zu differenzieren. Ferner müssen MSCs positiv für CD73 (Ecto-5'-Nucleotidase), CD90 (THY1) und CD105 (Endoglin), sowie negativ für die hämatopoetischen Marker CD11b oder CD14, CD19 oder CD79 α , CD34, CD45 und HLA-DR sein. Da bisher ein Nachweis fehlt, der das Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotential von MSCs *in vivo* belegt, wird anstelle des Begriffs „mesenchymale Stammzellen“ überwiegend die Bezeichnung „mesenchymale Stromazellen“ verwendet. Bianco et al. schlugen als Alternative die Bezeichnung „Skeletal MSCs“ vor, da MSCs nach Retransplantation *in vivo* das Potential zeigen Knochengewebe zu regenerieren (Bianco et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde die Bezeichnung MSC als Abkürzung für den Ausdruck mesenchymale Stromazellen verwendet.

1.1.3 MSC-basierte Therapie

1.1.3.1 MSC-Gewinnung und Applikation

MSCs repräsentieren einen Zelltyp mit enormem Potential im Bereich der Zelltherapie und der Gewebezüchtung (*engl.* Tissue engineering). Sie kommen in vielen verschiedenen Geweben vor und können zum Teil ohne größere Eingriffe aus diesen gewonnen werden (da

Silva Meirelles et al. 2006). Insbesondere Gewebe, wie Fett- oder perinatales Gewebe, zu dem unter anderem die Nabelschnur und die Amnionmembran zählen, die für gewöhnlich verworfen werden, stellen bedeutsame Quellen für MSCs dar, da kaum ethische Konfliktpunkte bestehen und bei ihrer Isolation eine Schädigung des Spenders weitestgehend vermieden wird (Wegmeyer et al. 2013). Darüber hinaus lassen sich MSCs unter Standardbedingungen kultivieren und zu hohen Zellmengen expandieren, so dass Zellen eines einzigen Spenders für eine Vielzahl an allogenen Transplantationsansätzen zur Verfügung gestellt werden können. In einigen Geweben wie z.B. im Fettgewebe ist die Zellzahl an MSCs so hoch, dass diese eine autologe Behandlung ermöglichen würden und direkt nach der Isolation und entsprechender Aufreinigung transplantiert werden könnten (Hicok & Hedrick 2011).

Neben der Zellart ist je nach Indikation ebenfalls die Wahl weiterer Parameter wie Applikationszeitpunkt, Zelldosis und Häufigkeit an Applikationen von entscheidender Bedeutung, um einen bestmöglichen therapeutischen Effekt zu erzielen (Omori et al. 2008). Darüber hinaus spielt auch der Applikationsweg, über den MSCs in den Empfängerorganismus transplantiert werden, eine wichtige Rolle, um mit minimalinvasivem Einsatz maximale Wirksamkeit zu erreichen. Über intravenöse Injektion (IV) erfolgt in der Regel eine systemische Applikation von MSCs, während durch eine lokale Applikation, wie etwa einer intramuskulären oder intrathekalen Injektion die Zellen direkt ins geschädigte Gewebe transplantiert werden (Karp & Leng Teo 2009). Eine lokale Applikation bietet die Möglichkeit, dass Zellen zunächst in hoher Konzentration ins geschädigte Gewebe eingebracht werden können, führt jedoch aufgrund unzureichender Nähr- und Sauerstoffversorgung häufig zu einem schnellen Absterben der Zellen, ohne dass diese einen signifikanten Heilungsprozess vermitteln können (Muschler et al. 2004). Darüber hinaus stellt sie in vielen Fällen, insbesondere bei Organschädigungen, einen unter Umständen klinisch komplizierten und mitunter hochinvasiven Eingriff dar. Demgegenüber liegt der erhebliche Vorteil einer systemischen Infusion darin, dass sich anhand standardisierter Applikationsprotokolle definierte Zellmengen zu gewünschten Zeitpunkten in den Empfängerorganismus injizieren lassen, ohne diesen im nennenswerten Ausmaß zu schädigen.

1.1.3.2 Wirkmechanismen

Die natürliche Funktion von MSCs, innerhalb der hämatopoetischen Nische die Entwicklung hämatopoetischer Zellen zu regulieren, ist durch ausgeprägte interzelluläre Wechselwirkungen gekennzeichnet, die über die Ausschüttung löslicher Faktoren sowie direkte Zell-Zell-Kontakte vermittelt werden und deren molekulare Mechanismen die Grundlage potentieller therapeutischer Effekte von MSCs bilden. So wird diskutiert, dass ähnlich den Prozessen, die

bei Entzündungsreaktionen ablaufen und zur Akkumulation von Leukozyten in Entzündungsregionen führen, auch systemisch injizierte MSCs durch die Aktivierung bestimmter Zielfindungs- bzw. Rekrutierungsmechanismen mit geschädigtem Gewebe interagieren. Während dieser unter dem Begriff „Homing“ zusammengefassten Prozesse spielen insbesondere interzelluläre Wechselwirkungen von MSCs mit den Zellen des vaskulären Endothels und des umliegenden Gewebes eine wichtige Rolle, indem sie eine komplexe Abfolge von Chemotaxis-, Adhäsions- sowie Migrationsvorgängen kontrollieren. Obwohl verschiedene *in vivo* Studien zeigen, dass sich exogene MSCs nach systemischer Injektion überwiegend im feinen Kapillarsystem der Lunge verfangen, konnte jedoch beobachtet werden, dass ein geringer Anteil der Zellen in geschädigten Geweben kolokalisiert und das Potential besitzt in ischämisches oder entzündetes Gewebe einzuwandern (Chamberlain et al. 2007, Prockop 2009). So wurden als Reaktion auf die Gewebeschädigung in murinen Herzinfarkt- bzw. Lungenfibrosemodellen mehr MSCs nach intravenöser Injektion in den entsprechenden Organen nachgewiesen als in den korrespondierenden Kontrollen (Barbash et al. 2003, Ortiz et al. 2007). Es wird kontrovers diskutiert, ob der Austritt von MSCs aus der Zirkulation auf passivem Weg erfolgt oder dabei aktive Zielfindungs- bzw. Rekrutierungsmechanismen zugrunde liegen, die eine Adhäsion ans Endothel und eine Migration ins umliegende Gewebe ermöglichen (Karp & Leng Teo 2009). Ferner gibt es Hinweise darauf, dass ein therapeutischer Effekt injizierter MSCs weniger durch die ins Gewebe eingewanderten Zellen vermittelt wird, sondern womöglich die in der Lunge gefangenen MSCs über die Ausschüttung löslicher Faktoren wie TSG-6 in den Blutstrom zu einer Reparatur distaler Organe und Gewebe beitragen oder immunmodulatorische Funktionen ausüben (Lee et al. 2009b). Auf das Adhäsionsverhalten sowie die Migrationseigenschaften von MSCs wird in Abschnitt 1.1.4 genauer eingegangen.

Hinsichtlich der regenerativen Eigenschaften von MSCs wird verstärkt die These vertreten, dass diese weniger über das Ersetzen endogener Zellen des geschädigten Gewebes oder ihre Differenzierung in gewebsspezifische Zellen, sondern in erster Linie über die Freisetzung parakriner Faktoren wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine vermittelt werden. Dies schließt insbesondere Prozesse wie die Induktion endogener Reparaturmechanismen durch die Aktivierung von Stamm- bzw. Vorläuferzellen, die Unterdrückung von Apoptoseprozessen geschädigter Zellen, die Förderung der Angiogenese sowie die Restrukturierung der extrazellulären Matrix ein (Meirelles Lda et al. 2009, Keating 2012, Ranganath et al. 2012).

Neben einem erhöhten Potential von MSCs die Regeneration geschädigten Gewebes zu unterstützen, gibt es starke Hinweise darauf, dass MSCs auch immunmodulatorische Eigenschaften besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass MSCs mit nahezu allen Zellen des Immunsystems interagieren und die Verschiebung von einem proinflammatorischen zu einem

antiinflammatorischen Profil vermitteln. Dabei wirken MSCs auf der einen Seite über die Ausschüttung löslicher Faktoren, zu denen in erster Linie Prostaglandin E2 (PGE2) und Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), lösliches HLA-G5 (sHLA-G5) oder auch TGF- β 1, HGF, Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und Hämoxxygenase-1 (HO1) sowie Interleukine, wie IL-6 und IL-10 zählen (Uccelli et al. 2008). Sie vermindern die Proliferation und Toxizität natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) und inhibieren die Proliferation und Zytokinsekretion verschiedener T-Zellen. So reduzieren sie die von CD4⁺ T-Zellen (T-Helferzellen) vermittelte Unterstützung der B-Zellen, hemmen die Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen (zytotoxische T-Zellen) und induzieren die Proliferation regulatorischer T-Zellen. Darüber hinaus unterdrücken sie die Differenzierung von Monozyten in dendritische Zellen und vermindern die TNF- α -Produktion reifer dendritischer Zellen sowie deren Rückwandlung in einen unreifen Zustand (Uccelli et al. 2008).

Auf der anderen Seite spielen zusätzlich zu den löslichen Faktoren interzelluläre Interaktionen über Oberflächenmoleküle ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Vermittlung antiinflammatorischer Effekte durch MSCs. Zu diesen zählen vor allem die Bindung von Jagged-1 an Notch, die Aktivierung intrazellulärer PD-1 Signalwege (*engl.* Programmed cell death protein-1) durch die Liganden PD-L1 und PD-L2 sowie die Interaktion der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 mit ihren jeweiligen Integrinrezeptoren α 4 β 1 (VLA-4) und α L β 2 (LFA-1) (Salem & Thiernemann 2010). Viele der Faktoren, die die immunmodulatorischen Effekte von MSCs vermitteln, werden nicht konstitutiv gebildet, sondern zum Teil erst nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α oder IFN- γ von den Zellen exprimiert (Crop et al. 2010).

1.1.3.3 Potentielle klinische Einsatzgebiete

MSCs wurden bereits in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien im Kontext verschiedener Indikationen appliziert, die von Muskel- und Knochenregeneration, Wundheilung, neurologischen sowie hämatologischen Schädigungen, Autoimmun- und Entzündungserkrankungen, Gewebs- oder Organtransplantationen, fortschreitender Organversagen sowie zahlreichen Fibrosearten bis hin zur Behandlung verschiedener Krebserkrankungen reichen (Mimeault et al. 2007, Salem & Thiernemann 2010, Wang et al. 2012). Obwohl die pathologischen Pfade, die den diversen Krankheiten zugrunde liegen äußerst heterogen sind, existieren grundlegende Prozesse wie Entzündungsreaktionen, Gewebeschädigung und auch der Verlust von Gefäßzellen, die ein potentielles Ziel der MSC-Therapie darstellen. Die für MSCs diskutierten Wirkmechanismen, wie Zielfindungs- und Rekrutierungsprozesse, Geweberegeneration und Immunmodulation (s. Abschnitt 1.1.3.2), die

den denkbaren therapeutischen Effekten von MSCs zugrunde liegen, konnten anhand verschiedener *in vivo* Modelle veranschaulicht werden. So wurden in Ratten mit ischämischem Reperfusionsschaden (IRI), einem Krankheitsmodell für akute Nierenschädigung (AKI), MSCs nach intraarterieller Applikation in den Gefäßen der Nieren nachgewiesen, reduzierte Konzentrationen proinflammatorischer Mediatoren sowie erhöhte Konzentrationen antiinflammatorischer Faktoren detektiert und eine verbesserte Nierenfunktion beobachtet (Lange et al. 2005, Togel et al. 2005). Weitere Studien an ähnlichen Modellen zeigten die Vermittlung antiapoptotischer Effekte sowie die Induktion der Proliferation endogener Nierenzellen, die auf von MSCs ausgeschüttete Faktoren, wie IGF oder VEGF zurückgeführt wurden (Imberti et al. 2007, Togel et al. 2009).

Parallel zur steigenden Anzahl an Studien in präklinischen Modellen ist zur Erprobung MSC-basierter Therapieansätze ebenfalls eine deutliche Zunahme klinischer Studien zu verzeichnen, die sich in unterschiedlichen Testphasen befinden oder bereits abgeschlossen sind (www.clinicaltrials.gov). Dabei kommen die Zellen in einem breiten Spektrum von Krankheitsbildern zum Einsatz und konnten bereits vielversprechende Resultate liefern (Wang et al. 2012). So führte in Patienten mit akutem Herzinfarkt die Applikation autologer MSCs aus dem Knochenmark über intrakoronare Injektion zu verbesserten klinischen Resultaten (Chen et al. 2006). Ein therapeutisches Potential konnte ebenfalls durch den Einsatz von MSCs aus dem Knochenmark in Patienten mit akuter GvHD (*engl.* Graft-versus-host disease) nach allogener Transplantation hämatopoetischer Stammzellen gezeigt werden (Le Blanc et al. 2008). Auch eine Anwendung von Knochenmarks-MSCs bei Patienten mit erhöhter Anfälligkeit für eine akute, postoperative Nierenschädigung (AKI), die durch Reperfusionsschäden hervorgerufen werden kann, wurde getestet (Togel & Westenfelder 2010). Trotz der vielversprechenden Resultate konnte bisher kein eindeutiger Beweis erbracht werden, dass MSCs tatsächlich eine therapeutische Wirksamkeit besitzen oder *in vivo* in einen gewebsspezifischen Zelltyp, wie etwa Kardiomyozyten oder tubuläre Epithelzellen differenzieren. Dies könnte auch dem Umstand geschuldet sein, dass bislang keine größeren Langzeitstudien mit entsprechend hoher Patientenzahlen existieren. Ebenso muss hinsichtlich der Sicherheit eine gute Verträglichkeit der Zellapplikation aufgezeigt sowie das Auftreten massiver Nebenwirkungen ausgeschlossen werden können (Salem & Thiemermann 2010). Ferner ist es erforderlich neben der Standardisierung von Isolations- und Kultivierungsmethoden sowie der Applikationsrouten die Biologie der MSCs bestmöglich zu verstehen und ihre molekularen Wirkmechanismen im Detail aufzuklären, um MSCs als wirkungsvolle Zelltherapieform zu etablieren.

1.1.4 Zielfindung, Adhäsion und Migration von MSCs

Für die Anwendung von mesenchymalen Stromazellen als therapeutisches Werkzeug stellt die Art des Applikationsweges einen wichtigen Aspekt dar, um einen bestmöglichen therapeutischen Effekt zu erzielen. So bietet insbesondere die systemische Infusion der Zellen, beispielsweise mittels intravenöser Injektion, den enormen Vorteil diese über einen minimalinvasiven Weg in den Organismus zu bringen, so dass die Zellen potentiell über das Blutgefäßsystem ins Zielgewebe gelangen können. Bislang stellt jedoch die Schwierigkeit, die Zellen mit hoher Effizienz zum Zielgewebe zu bringen, eine erhebliche Barriere für die wirkungsvolle Anwendung der MSC-Therapie dar, da die meisten der systemisch injizierten Zellen innerhalb weniger Minuten aus der Blutzirkulation verschwinden und sich im feinen Kapillarnetzwerk der Lunge verfangen (vgl. 1.1.3.2). Die Aufklärung der komplexen molekularen Mechanismen, die potentiellen Zielfindungs- und Rekrutierungsprozessen von MSCs zugrunde liegen und unter anderem Zelladhäsion und Migration in geschädigte Gewebe vermitteln, ist somit von entscheidender Bedeutung und stellt den Ansatzpunkt der vorliegenden Arbeit dar. Bei der Charakterisierung von MSCs hinsichtlich der Identifizierung von adhäsions- und migrationsvermittelnden Faktoren hat man sich insbesondere an den Mechanismen, die der Leukozyten-Adhäsionskaskade, einer Abfolge exakt abgestimmter Adhäsionsschritte zur Anhaftung der Leukozyten an vaskuläres Endothel, zugrunde liegen, orientiert (s. Abbildung 2).

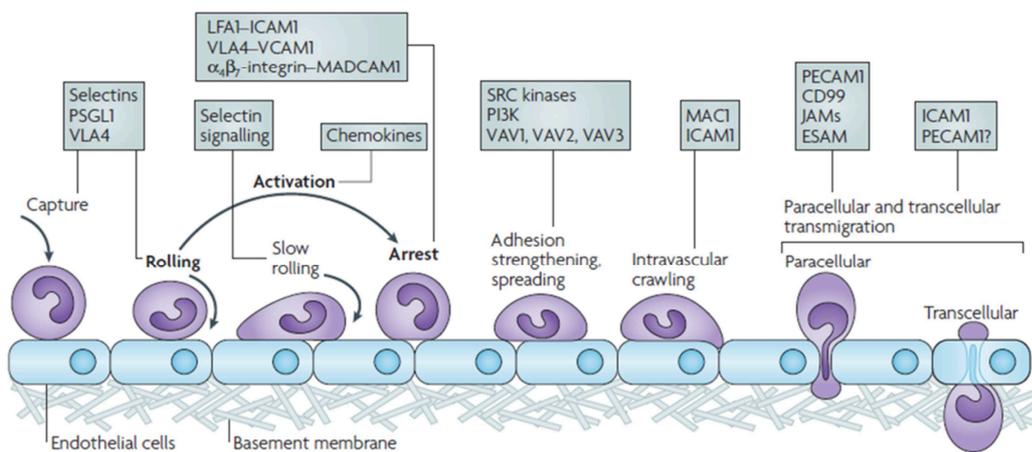


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Leukozyten-Adhäsionskaskade. Unter Beteiligung vieler Faktoren, die unter anderem Selektine, Chemokinrezeptoren und Integrine einschließen, wird ein Rollen, die feste Adhäsion und die Transmigration der Leukozyten ins geschädigte Gewebe vermittelt. *Ley et al., Nat Rev Immunol. 2007 Sep;7(9):678-89*

Leukozyten zirkulieren permanent zwischen dem Blutsystem und lymphatischen Organen. Sie können jedoch schnell in Entzündungsregionen akkumulieren, sobald sie ins Gefäßsystem eines entsprechenden Gewebes gelangen. Dabei kommt es zunächst zu einer initialen Anbindung und anschließend zu einem Rollen der Zellen auf dem Endothel, das in erster Linie durch eine schwache Wechselwirkung von Selektinen und den korrespondierenden Liganden induziert wird und ein Abbremsen der Zellen bewirkt. Durch aktivierte Endothelzellen oder Zellen des umliegenden Gewebes freigesetzte Chemokine werden von Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche von Leukozyten gebunden und führen zu einer Aktivierung intrazellulärer Signalwege, die wiederum eine schnelle Aktivierung bestimmter Integrine und anderer Adhäsionsmoleküle hervorrufen. Durch eine erhöhte Integrinaffinität wird eine starke Adhäsion sowie ein Ausspreizen der Leukozyten auf dem Endothel vermittelt. Anschließend gelangen die Zellen über para- oder transzelluläre Transmigration aus dem Blutstrom ins geschädigte Gewebe (Ley et al. 2007, Schmidt et al. 2013).

1.1.5 Adhäsions- und migrationsvermittelnde Faktoren

1.1.5.1 Selektine

Selektine spielen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Adhäsionsprozessen, da sie durch Interaktion mit ihren Liganden ein Rollen (*engl.* „Rolling“) von im Blutstrom zirkulierenden Immunzellen auf vaskulären Endothelzellen induzieren. Die Familie der Selektine besteht aus drei Faktoren, zu denen das L-Selektin (L für Leukozyt), das E-Selektin (E für Endothelzelle) sowie das P-Selektin (P für Thrombozyt - *engl.* Platelet) zählen. Selektine werden ausschließlich von Zellen des hämatopoetischen Systems und Endothelzellen exprimiert. Die Molekülstruktur ihrer Liganden ist maßgeblich durch das Vorhandensein spezifischer Glykan-Modifikationen gekennzeichnet (Sackstein 2005). L-Selektin wird von allen myeloiden Zellen und von T-Lymphozyten exprimiert. Je nach Expression der Liganden bindet es selektiv an bestimmte Arten von Endothelzellen. Zu den Liganden zählen unter anderem GlyCAM-1 (*engl.* Glycosylation dependent cell adhesion molecule-1), ein Proteoglykan auf der Oberfläche hochendothelialer Venolen (HEV) der Lymphknoten, sowie MadCAM-1 (*engl.* Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule-1), das auf HEVs der Mucosa und Endothelzellen entzündeter Gewebe exprimiert wird. Ferner wird über die Bindung an das stark glykosylierte CD34, welches ebenfalls von vaskulären Endothelzellen gebildet wird, insbesondere die Migration von T-Zellen in Lymphknoten vermittelt (Rosen 2004). E-Selektin wird auf Endothelzellen der meisten Organe nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen exprimiert und findet sich darüber hinaus in den

Mikrogefäßen der Haut. P-Selektin wird grundsätzlich von aktivierten Thrombozyten und von Endothelzellen der Lunge gebildet. Ähnlich wie bei E-Selektin ist die Expression von P-Selektin ebenfalls auf aktivierten Endothelzellen der meisten Organe hochreguliert. Einer der wichtigsten Liganden für P- und E-Selektin ist PSGL-1 (P-Selektin Glycoproteinligand-1), das auf myeloiden Zellen sowie aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird und insbesondere durch Modifikationen an O-Glykanen mit dem Tetrasaccharid Sialyl-Lewis^X (SLe^X) gekennzeichnet ist. Mit einer deutlich geringeren Affinität wird PSGL-1 außerdem von L-Selektin gebunden.

Die Art der Wechselwirkung der Selektine mit ihren Liganden, die durch eine hohe on-off-Frequenz gekennzeichnet ist (Alon et al. 1995) und so den speziellen Mechanismus des Rollens vermittelt, lässt sich nicht ohne Weiteres auf MSCs übertragen, da sich weder Selektine noch ihre Liganden auf MSCs nachweisen lassen (Brooke et al. 2008, Sackstein et al. 2008). Dennoch weisen Studien daraufhin, dass mögliche, aktiv induzierte Rollmechanismen auch bei MSCs existieren. So konnte durch den Einsatz blockierender Antikörper ein von P-Selektin abhängiges Rollen von MSCs auf HUVECs unter Flussbedingungen beobachtet werden (Ruster et al. 2006). Um die „Homing“-Fähigkeiten von MSCs zu verstärken, wurde in weiteren Ansätzen die Strategie verfolgt, die Zelloberfläche von MSCs dahingehend zu verändern, dass ein stabiles, von Selektin abhängiges Rollen der Zellen induziert wird. Über chemische Modifikation der Zelloberfläche von MSCs durch die Konjugation mit Sialyl-Lewis^X-Tetrasacchariden oder über enzymatische Modifikation durch den Einsatz der α -1,3-Fucosyltransferasen, die eine speziellen Änderung der Glykanstruktur des Hyaluronsäurerezeptors CD44 (α -2,3-Sialyl Modifikation) katalysieren, konnten die Rolleigenschaften von MSCs und deren Potential ins Knochenmark einzuwandern deutlich verbessert werden (Sackstein et al. 2008, Sarkar et al. 2011).

1.1.5.2 Chemokinrezeptoren

Die an der Oberflächenmembran von Zellen gebundenen Chemokinrezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Sie vermitteln durch Binden ihrer Liganden, den Chemokinen, die Aktivierung intrazellulärer Signalwege, die wiederum zur Aktivierung weiterer Faktoren und einer zielgerichteten Zellbewegung (Chemotaxis) entlang des Chemokingradienten führen. Sie steuern spezifisch die Adhäsion und Migration bestimmter Zellen in Organe und Gewebe, übernehmen so wichtige Funktionen bei Entwicklungs- sowie Geweberegenerationsprozessen und spielen darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Leukozytenadhäsion an vaskuläres Endothel. Entsprechend der Molekülstruktur ihrer korrespondierenden Liganden werden die Chemokinrezeptoren entweder der Familie der CC-

oder der CXC-Chemokinrezeptoren zugeordnet (Horuk 2001). Aus dem breiten Spektrum an Chemokinrezeptoren stellen CXCR4, CCR2 und CCR7 die Faktoren dar, deren Funktion in MSCs bislang am intensivsten untersucht wurde (Sordi et al. 2005, Wu & Zhao 2012). Der Chemokinrezeptor CXCR4 ist ein wichtiger Vertreter aus der Familie der CXC-Rezeptoren. Er wird von verschiedenen Zelltypen exprimiert und ist an der Regulation diverser physiologischer Prozesse beteiligt. CXCR4^{-/-}-Mäuse zeigen einen letalen Phänotyp und sind durch eine fehlerhafte Organo- und Angiogenese während der Embryonalentwicklung gekennzeichnet (Tachibana et al. 1998). Im adulten Organismus wird CXCR4 in hohem Maße von Stamm- bzw. Vorläuferzellen des Immunsystems exprimiert und übernimmt dort mitunter wichtige Funktionen während der Hämatopoese (Zou et al. 1998). Das Chemokin CXCL12, das auch als SDF-1 (*engl.* Stromal cell-derived factor 1) bezeichnet wird, ist der bislang einzige bekannte Ligand von CXCR4. SDF-1 wird insbesondere von Stromazellen des Knochenmarks produziert, aber auch in Stroma- und Endothelzellen anderer Organe gebildet und darüber hinaus verstärkt unter ischämischen Bedingungen sowie aus geschädigtem Gewebe freigesetzt (Ratajczak et al. 2006). Die Bindung von SDF-1 durch CXCR4 führt zur Aktivierung von PI3K/Akt- und MAPK-Signalwegen sowie zur Induktion IP3-abhängiger Ca²⁺-Signale, die eine Änderung der Genexpression, Reorganisation des Zytoskeletts, Steigerung der Integrinaffinität und Zellmigration bewirken (Domanska et al. 2013). Durch die, über die CXCR4/SDF-1-Achse vermittelten Prozesse wird insbesondere die Verankerung und Rekrutierung hämatopoetischer Vorläuferzellenzellen im Knochenmark reguliert (Lapidot et al. 2005). Darüber hinaus spielen sie auch eine wichtige Rolle bei der Migration von Immunzellen in Entzündungsregionen (Ratajczak et al. 2006).

Der Chemokinrezeptor CCR2, der ebenfalls für die Migration von Immunzellen verantwortlich ist, wird in erster Linie von Monozyten, T-Gedächtniszellen und dendritischen Zellen exprimiert (Horuk 2001). Im Gegensatz zu CXCR4, das lediglich SDF-1 erkennt, bindet CCR2 mehrere Chemokine, darunter CCL2 (MCP-1), CCL8 (MCP-2), CCL7 (MCP-3) und CCL13 (MCP-4). Über die Bindung von MCP-1, das insbesondere durch die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen auf Endothelzellen, Epithelzellen sowie Fibroblasten geschädigter Gewebe gebildet wird, stellt die CCR2/MCP-1-Achse einen der wichtigsten Mechanismen für die Rekrutierung von Monozyten in Entzündungsregionen dar (Deshmane et al. 2009). Für die Migration von Immunzellen in sekundäre lymphatische Organe, wie den Lymphknoten, spielt der Chemokinrezeptor CCR7 eine wichtige Rolle. Durch die Bindung der Chemokine CCL19 und CCL21 werden verschiedene Subpopulationen von T-Zellen über hochendotheliale Venolen und dendritische Zellen über afferente lymphatische Gefäße in die Lymphknoten rekrutiert (Forster et al. 2008).

Aufgrund seiner Schlüsselrolle für die Rekrutierung hämatopoetischer Vorläuferzellen ist von allen Chemokinrezeptoren die Funktion von CXCR4 im Kontext der Migration von MSCs bislang am umfangreichsten analysiert worden. Obwohl in zahlreichen *in vitro* Studien gezeigt werden konnte, dass über die CXCR4/SDF-1-Achse die Migration von MSCs vermittelt werden kann (Wynn et al., 2004 und Sordi et al., 2005), ist die Rolle von CXCR4 in MSCs indes umstritten, da unter anderem stark divergierende Angaben bezüglich der mRNA- und Rezeptorexpression existieren (Sordi et al. 2005, Brooke et al. 2008, Wu & Zhao 2012). Es gibt Hinweise darauf, dass die CXCR4-Expression an der Zelloberfläche von MSCs nach der Isolation aus dem Gewebe im Laufe der Kultivierung schnell abnimmt, jedoch weiterhin intrazellulär lokalisiertes CXCR4 nachweisbar ist, das durch bestimmte Stimuli an die Zelloberfläche gebracht werden kann (Shi et al. 2007, Jones et al. 2012). In weiterführenden *in vivo* Studien konnte nach systemischer Applikation CXCR4-überexprimierender MSCs in einem Rattenmodellen mit ischämischem Myokardium eine gesteigerte Anzahl an migrierten Zellen im geschädigten Gewebe und eine verbesserte Regeneration des linken Ventrikels beobachtet (Cheng et al. 2008) und in einem Rattenmodell mit ischämischen Hirninfarkt eine gesteigerte angiogene sowie neuroprotektive Wirkung aufgezeigt werden (Yu et al., 2011).

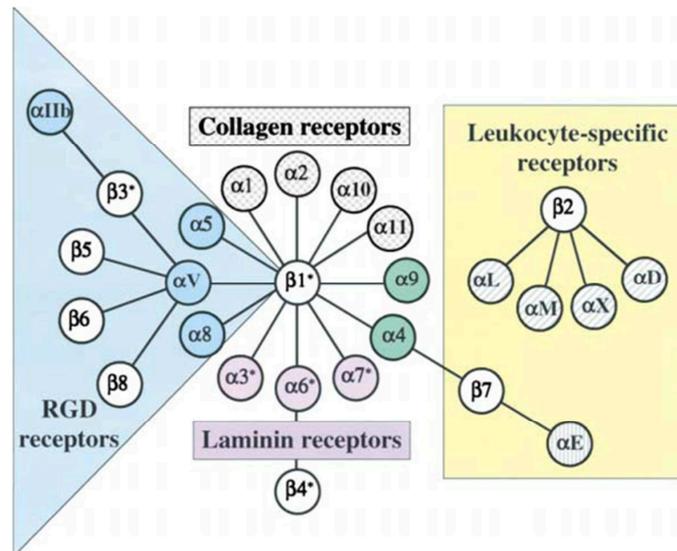
Neben CXCR4 wurde ebenfalls die Expression und Funktion weiterer Chemokinrezeptoren in MSCs untersucht (Brooke et al. 2008). Obwohl einige Studien zeigen, dass CCR2 auf MSCs nicht exprimiert wird (Fox et al. 2007), konnte eine andere Arbeitsgruppe in murinen wie auch in humanen MSCs CCR2-Expression nachweisen (Chamberlain et al. 2008). In weiteren Studien konnte eine Abhängigkeit muriner BM-MSCs von MCP-1 beobachtet werden. So zeigten CCR2-positive MSCs aus murinem Knochenmark sowohl *in vitro* eine verstärkte Migration in MCP-1-positiven Gehirnextrakten aus Ratten mit Hirnläsion als auch eine erhöhte Tendenz nach Injektion in MCP-1^{+/+}-Mäuse im Herzgewebe zu lokalisieren (Wang et al. 2002, Belema-Bedada et al. 2008). Demgegenüber ist die Expression von CCR7 auf humanen MSCs beschrieben und seine Funktion in Teilen untersucht. Migrationsstudien zeigten, dass CCR7-positive MSCs sich entlang eines CCL19/CCL21-Gradienten bewegen und deuten somit darauf hin, dass über CCR7 potentiell eine Rekrutierung von MSCs in lymphatische Organe vermittelt werden kann (Sordi et al. 2005, Von Lutichau et al. 2005).

1.1.5.3 Integrine

Integrine sind Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die die Adhäsion an Proteine der extrazellulären Matrix, wie beispielsweise Kollagen oder Fibronectin vermitteln und darüber hinaus eine zentrale Rolle bei der Bildung von Zell-Zell-Verbindungen spielen. Gleichzeitig sind Integrine als Transmembranproteine mit Teilen des Zytoskeletts assoziiert und aktivieren

darüber hinaus zahlreiche intrazelluläre Signalwege. Sie spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei Entwicklungs- und Geweberegenerationsprozessen, Immunantworten, der Homöostase und der Leukozytenadhäsion (Hynes 2002). Integrine sind Heterodimere, die jeweils aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut sind. In Wirbeltieren besteht die Familie der Integrine aus 18 α -Untereinheiten und acht β -Untereinheiten, die insgesamt 24 bisher bekannte Heterodimere bilden können (Takada et al. 2007) (s. Abbildung 3).

Abbildung 3: Die Integrinrezeptor-Familie: Acht β -Untereinheiten können mit 18 α -Untereinheiten insgesamt 24 verschiedene Integrine bilden. Diese werden je nach evolutionärem Verwandtschaftsgrad (gefärbte Untereinheiten), Ligandenspezifität und zellspezifischer Expression in unterschiedliche Unterfamilien eingeteilt. Hynes, *Cell*. 2002 Sep 20;110(6):673-87



Die extrazelluläre Region der α -Untereinheit besteht aus einem so genannten β -Propeller, der mit einer Thigh-, einer Calf-1- sowie einer Calf-2-Domäne verbunden ist, die zusammen eine Art Beinstruktur bilden und den Integrin-Kopf stützen (s. Abbildung 4). Der extrazelluläre Teil der β -Untereinheit besteht aus einer PSI-Domäne, einer Hybrid-Domäne, einer β I-Domäne sowie vier cysteinreichen epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-Elementen. Die Ligandenbindung erfolgt in der Regel zwischen dem β -Propeller bzw. der α I-Domäne der α -Untereinheit und der β I-Domäne der β -Untereinheit, wobei die α -Untereinheit die Ligandenspezifität bestimmt. Diese ist dabei durch die Erkennung spezifischer Aminosäuresequenzen innerhalb der Liganden charakterisiert. So binden alle α V-Integrine Liganden, die ein RGD-Tripeptid (Arginin, Glycin, Aspartat) tragen. Die Interaktion der Integrine mit zahlreichen zyttoplasmatischen Bindungspartnern erfolgt in erster Linie über den intrazellulären Teil der β -Untereinheiten (Legate & Fassler 2009). Integrine können durch die Bindung an Bestandteile der extrazellulären Matrix und an Adhäsionsmoleküle benachbarter Zellen sowohl eine mechanische Verankerung der Zellen in ihrer Umgebung vermitteln als auch extrazelluläre mechanische Reize als chemische Signale ins Zellinnere übertragen („outside-in“ Signaltransduktion). Gleichzeitig kann durch intrazelluläre Signale eine

Konformationsänderung der extrazellulären Domäne induziert und so die Affinität der Integrine für extrazelluläre Liganden reguliert werden („inside-out“ Signaltransduktion). Die Modulation des Aktivitätszustandes und der damit verbundenen Affinität der Integrine ist durch präzise Mechanismen gesteuert, die die Bildung und Auflösung von Multiproteinkomplexen um die zyttoplasmatischen Abschnitte der Integrine erfordert.

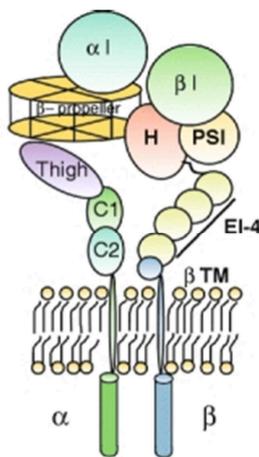


Abbildung 4: Darstellung der Domänen-Anordnung eines αI-Domänen tragenden Integrins. *Barczyk et al., Cell Tissue Res. 2010 Jan; 339(1):269-80*

Bei der Übertragung intrazellulärer Signale zur Aktivierung und damit der Erhöhung der Affinität von Integrinen gegenüber ihren Liganden nimmt Talin eine Schlüsselrolle ein (Calderwood 2004). Über eine FERM-Domäne bindet es an das erste NxxY-Motiv in einem membrandistalen Bereich auf dem intrazellulären Teil der β-Untereinheit, die von einer schwächeren Wechselwirkung mit einer membranproximalen Bindungsstelle unterstützt wird (Wegener et al. 2007). Neben Talin spielen Kindline eine wichtige Rolle bei der Regulation der Integrinaffinität. Sie besitzen ebenfalls eine FERM-Domäne, über die sie mit dem zweiten NxxY-Motiv der β-Untereinheit in Wechselwirkung treten. Zur Familie der Kindline zählen das Kindlin-1, das in erster Linie auf Epithelzellen wie Keratinozyten oder Darmepithelzellen exprimiert wird, das Kindlin-2, das ubiquitär gebildet wird und Kindlin-3, dessen

Expression auf Zellen des hämatopoetischen Systems beschränkt ist und insbesondere die Aktivität von β2-Integrinen reguliert (Moser et al. 2009). Zur Übertragung von extrazellulären Signalen ins Zellinnere kommt es nach Bindung der Liganden und durch die nachfolgende Ausbildung von Multiproteinkomplexen am zyttoplasmatischen Abschnitt der Integrine. Diese vermitteln eine Verbindung zum Aktin-Zytoskelett und die Aktivierung intrazellulärer Signalwege. Dabei spielt insbesondere die Bindung und Aktivierung von Kinasen eine wichtige Rolle, indem diese durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkung und die Phosphorylierung nachgeschalteter Faktoren Signale für Wachstum, Proliferation und Zellbewegung weiterleiten. Zu ihnen zählen FAK (*engl.* Focal adhesion kinase), SFKs (*engl.* Src-family kinases) sowie ILK (*engl.* Integrin-linked kinase), dessen Kinaseaktivität allerdings umstritten ist (Wickstrom et al. 2010). Neben Kinasen bestehen die Multiproteinkomplexe aus weiteren essentiellen Faktoren, die vorwiegend gerüstbildende Funktionen übernehmen. So enthält Paxillin mehrere Protein-Protein-Interaktionsmodule, über die es unter anderem Kinasen wie FAK und ILK bindet, aber auch mit Aktin-bindenden Faktoren wie Parvin und Vinculin in Wechselwirkung tritt und so eine Verbindung zum Zytoskelett vermittelt (Harburger & Calderwood 2009). Zusammen mit den intrazellulären Multiproteinkomplexen sind Integrine häufig in größeren

Clustern, den „Focal adhesions“ organisiert, die insbesondere bei migrierenden Zellen sehr dynamischen Auf- und Abbauprozessen unterliegen. Alle an der Rekrutierung und Zusammenlagerung der Proteinkomplexe beteiligten Proteine, die zur Formierung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionen führen und die Übertragung von Signalen durch Integrine vermitteln, werden in ihrer Gesamtheit als „Adhäsom“ bezeichnet (Schiller & Fassler 2013).

Während der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen und der Transmigration ins umliegende Gewebe, spielen Integrine eine wichtige Rolle. So vermitteln das von Leukozyten exprimierte Integrin $\alpha L/\beta 2$ (LFA-1) über die Wechselwirkung mit dem interzellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und das Integrin $\alpha 4/\beta 1$ (VLA-4) über die Interaktion mit dem vaskulären Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1), das von aktivierten Endothelzellen gebildet wird, eine starke Adhäsion von Leukozyten an vaskuläres Endothel (s. Abbildung 2). Die Regulation der Affinität beider Integrinrezeptoren erfolgt dabei insbesondere durch die von Chemokinrezeptoren vermittelten intrazellulären Signale (Schmidt et al. 2013).

Die Expression und die Funktionen diverser Integrin-Untereinheiten in humanen MSCs verschiedener Gewebe ist in zahlreichen Studien untersucht worden (Semon et al. 2010). Dabei stellen MSCs aus dem Knochenmark den am besten charakterisierten Zelltyp dar. Eine mögliche Rolle des Integrins $\alpha L/\beta 2$ in MSCs ist nicht bekannt, da die Mehrzahl der Expressionsanalysen zeigen, dass beide Untereinheiten nicht auf der Oberfläche von MSCs nachweisbar sind (Sackstein et al. 2008, Semon et al. 2010). Demgegenüber wurde eine mögliche adhäsionsvermittelnde Wirkung der Untereinheit $\alpha 4$ und somit des Integrindimers $\alpha 4/\beta 1$ in $\alpha 4$ -positiven MSCs in zahlreichen Studien analysiert. So konnte durch den Einsatz von blockierenden Antikörpern ein koordiniertes Adhäsionsverhalten von Knochenmarks-MSCs in Abhängigkeit von Integrin $\alpha 4/\beta 1$ auf rekombinantem VCAM und auf aktivierten Endothelzellen unter Flussbedingungen beobachtet werden (Ruster et al. 2006). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die VLA-4/VCAM-1-Interaktion eine wichtige Rolle für die Transmigration von MSCs durch die endotheliale Barriere ins umliegende Gewebe spielt (Steingen et al. 2008). Die Kenntnisse über die Integrin-Expressionsprofile von MSCs sind darüber hinaus für die Wahl geeigneter Kulturbedingungen von Bedeutung, die wiederum zelluläre Funktionen wie das Migrationsverhalten, Differenzierungspotential oder auch das Wachstum in 3D-Kulturen beeinflussen können (Docheva et al. 2007).

1.1.6 Ektoenzyme

Für die Interaktion von Leukozyten mit Endothelzellen spielen Selektine, Chemokinrezeptoren und Integrine eine wichtige Rolle, indem sie die komplexe Abfolge der

einzelnen Schritte, wie das Rollen, die Aktivierung, die feste Adhäsion und die Transmigration im Laufe der Leukozyten-Adhäsionskaskade steuern. Neuere Studien zeigen jedoch, dass zusätzlich zu diesen „klassischen“ Adhäsionsfaktoren, auch Faktoren anderer Familien an den Prozessen der Leukozytenadhäsion beteiligt sind. Insbesondere die Gruppe der Ektoenzyme hat in diesem Kontext in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen, wengleich die physiologischen Funktionen vieler Ektoenzyme noch nicht vollständig aufgeklärt sind (Salmi & Jalkanen 2012) (s. Abbildung 5). Ektoenzyme bilden eine große, vielfältige Klasse an membrangebunden Proteinen, die unterschiedliche enzymatische Reaktionen katalysieren, deren katalytisch aktives Zentrum jedoch stets im extrazellulären Bereich lokalisiert ist. Die Wirkungsweise einzelner Ektoenzyme ist sehr unterschiedlich. So können Ektoenzyme über die Zugänglichkeit der Produkte bzw. Substrate ihrer Enzymreaktion schnellen Einfluss auf das Adhäsions- und Migrationsverhalten von Zellen nehmen, aber auch durch Interaktion mit anderen Faktoren direkte Zell-Zell-Kontakte vermitteln (Salmi & Jalkanen 2005).

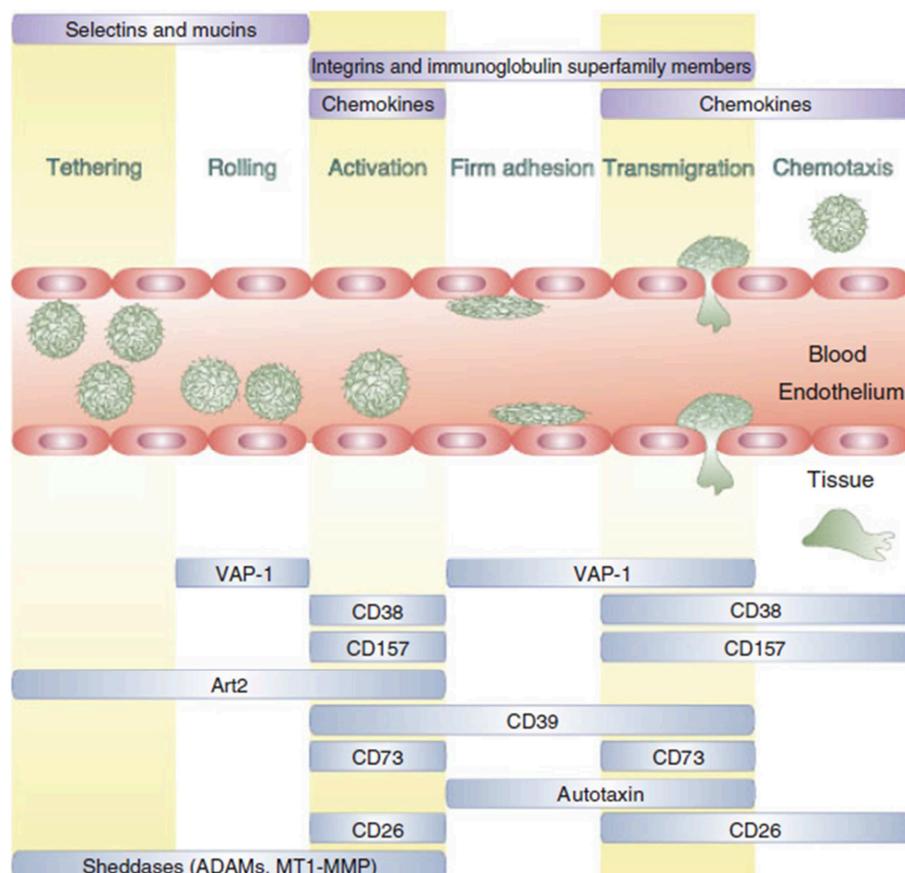


Abbildung 5: Leukozyten-Adhäsionskaskade: Zusätzlich zu den „klassischen“ Homing-, Adhäsions- und Migrationsfaktoren wie Selektinen, Integrinen und Chemokinrezeptoren, spielen Ektoenzyme eine wichtige Rolle in der komplexen Abfolge der einzelnen Schritte der Adhäsionskaskade. *Salmi und Jalkanen, Eur J Immunol. 2012 Feb;42(2):284-92*

Vertreter aus der Gruppe der Nukleotidasen, der NAD⁺-metabolisierenden Enzyme, der Proteasen und Peptidasen, aber auch der Oxidasen zählen zu den bisher am besten charakterisierten Ektoenzymen, die eine Rolle bei der Leukozytenadhäsion und Migration spielen (Salmi & Jalkanen 2012). Die Nukleotidasen CD73 sowie CD39 können über den sukzessiven Abbau von ATP Einfluss auf die vaskuläre Permeabilität nehmen, während die NAD⁺-metabolisierenden Enzyme CD38, CD157 und die ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) Chemotaxis- sowie Adhäsionsprozesse regulieren. Vertreter aus der Gruppe der ADAMs (*engl.* A Disintegrin and Metalloproteinase), membrangebundenes MT-MMP sowie CD26 sind wichtige Proteasen bzw. Peptidasen, die über so genanntes Shedding die Aktivität anderer wichtiger Faktoren beeinflussen. Die Aminooxidase VAP-1, die auch als AOC3 bezeichnet wird, kontrolliert durch oxidative Desaminierung primärer Amine und die Freisetzung von Wasserstoffperoxid den Prozess der Transmigration.

Obwohl viele Studien darauf hinweisen, dass Ektoenzyme je nach enzymatischer Aktivität, ähnlich den klassischen Zielfindungs- bzw. Rekrutierungsfaktoren, an den einzelnen Schritten der Leukozyten-Adhäsionskaskade beteiligt sind, ist ihre genaue Wirkungsweise in diesem Zusammenhang bisher nur unzureichend verstanden. Darüber hinaus sind im Allgemeinen die biologischen Funktionen und die physiologische Bedeutung vieler Ektoenzyme noch nicht im Detail aufgeklärt. Dennoch besitzen sie großes Potential auch eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion und Migration von MSCs zu spielen, aber auch an anderen wichtigen Prozessen beteiligt zu sein.

Dem Ektoenzym CD38, das durch seine enzymatische Aktivität und über intermolekulare Wechselwirkung direkte Zell-Zell-Kontakte mit anderen Zellen vermitteln kann, könnte im Kontext der MSC-Adhäsion eine besondere Bedeutung zukommen. Obwohl MSCs im Allgemeinen als CD38-negativ beschrieben werden, zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass in MSCs die Expression von CD38 unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine induziert wird.

1.2 CD38

1.2.1 Struktur und Verteilung

Das Ektoenzym CD38 ist ein aus 300 Aminosäureresten bestehendes, Typ-II membranassoziertes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa. Es besteht aus einem kurzen intrazellulären Abschnitt (~21 AS), einer Transmembranhelix (~22 AS) und einer extrazellulären Region (~257 AS), die das katalytisch aktive Zentrum trägt (s. Abbildung 6). CD38 wurde erstmals von E. L. Reinherz und S. F. Schlossmann in den frühen 1980er Jahren identifiziert und auf Thymozyten sowie T-Lymphozyten nachgewiesen (Reinherz et al. 1980). Durch die Aufklärung der Aminosäuresequenz Anfang der 1990er Jahre konnte eine starke Übereinstimmung von humanem CD38 mit der ADP-Ribosylzyklase, einem zytosolischem Enzym aus dem kalifornischen Seehasen *Aplysia californica* festgestellt werden (States et al. 1992). Beide Enzyme stimmen zu etwa 30 % in ihrer Aminosäuresequenz überein. Darüber hinaus sind 10 der 12 Cysteinreste komplett konserviert, was auf eine sehr ähnliche Konformation sowie Funktion beider Enzyme schließen lässt. Die durch die ADP-Ribosylzyklase aus *Aplysia* vermittelte Enzymreaktion konnte ebenfalls für CD38 nachgewiesen werden (Howard et al. 1993). Beide

Enzyme katalysieren die Umsetzung von β -Nicotinamadenindinukleotid (β -NAD⁺) in zyklisches Adenosin 5'-Diphosphoribose, das auch als zyklisches ADP-Ribose (cADPR) bezeichnet wird. Mit CD157, auch als BST-1 (*engl.* Bone marrow stromal cell antigen-1) bekannt, wurde nachfolgend in humanen Zellen ein weiteres Enzym identifiziert, das eine deutliche Homologie zu CD38 aufweist (Itoh et al. 1994, Kaisho et al. 1994). Im Gegensatz zu CD38, das eine Transmembranhelix besitzt, zeigt CD157 eine invertierte Orientierung und ist über einen GPI-Anker mit der Membran verbunden (s. Abbildung 7).

Neben ihrer Expression in humanen Zellen konnten sowohl CD38 als auch CD157 in weiteren Säugetieren und im Huhn nachgewiesen werden (Malavasi et al. 2006). CD38 und CD157 werden gemeinsam mit der ADP-Ribosylzyklase aus *Aplysia* und weiteren verwandten Enzymen, die in verschiedenen Organismen identifiziert wurden, als CD38 Genfamilie zusammengefasst. Im humanen Genom sind beide Gene auf dem p-Arm des Chromosoms 4

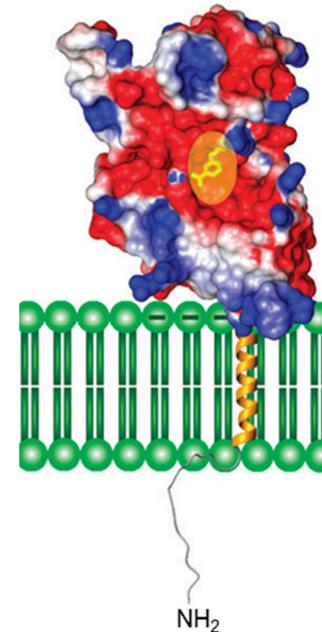


Abbildung 6: Kristallstruktur-Modell von CD38, einem Typ-II Transmembranprotein. Negativ geladene Regionen sind rot, positiv geladene blau dargestellt. Das gelbe Oval markiert das aktive Zentrum. Lee, *Mol Med*, 2006 Nov-Dec;12(11-12):317-23

(4p15) lokalisiert. Während das CD38-Gen mehr als 80 kb umfasst, erstreckt sich das CD157-Gen über etwa 35 kb (Muraoka et al. 1996). Die Orientierung beider Gene als so genanntes Kopf-an-Schwanz Tandem auf dem Chromosom sowie eine sehr ähnliche Intron-Exon-Organisation sind Hinweise darauf, dass eines der Gene durch Genduplikation aus dem anderen hervorgegangen ist.

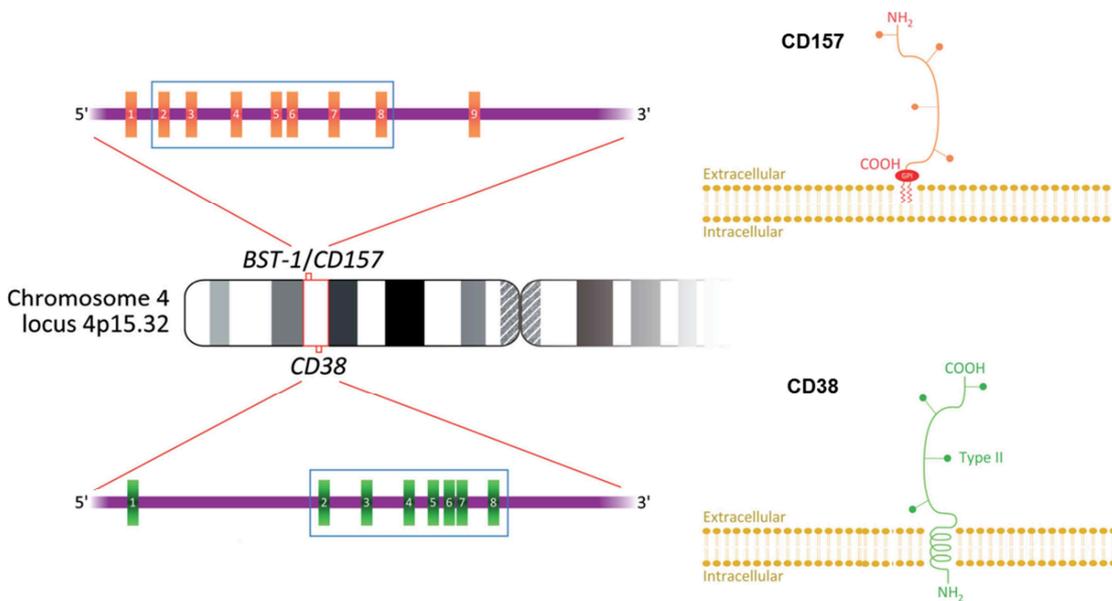


Abbildung 7: *Links*: Schematische Darstellung des humanen Chromosoms 4 und der Gene CD38 sowie CD157 und jeweiliger Intron-Exon-Organisation. *Rechts*: Strukturen der Membranproteine CD157 und CD38. CD157 zeigt eine gegenüber CD38 konvertierte Orientierung und ist über einen GPI-Anker mit der Membran verbunden. V. Quarona. et al., *Cytometry B Clin Cytom*, 2013 Jul-Aug;84(4):207-17

Obwohl CD38 in verschiedenen Geweben und Zellen detektiert werden konnte, zeigen in erster Linie die Zellen des hämatopoetischen Systems, insbesondere Immunzellen, eine starke, aber mitunter sehr variable CD38-Expression. So gilt CD38 als Marker im Zuge der Ontogenese von T-Lymphozyten. Während der Hauptanteil zirkulierender T-Zellen CD38-negativ ist, zeigen mehr als 80 % der medullaren Thymozyten sowie der überwiegende Anteil der in den Organen angesiedelt T-Zellen CD38-Expression (Malavasi et al. 2008). Die Expression von CD38 ist auch während der Entwicklung von B-Lymphozyten reguliert. Vorläuferzellen im Knochenmark sowie ausdifferenzierte Plasmazellen weisen ein höheres CD38-Level auf, wohingegen die Expression in ruhenden B-Zellen runterreguliert ist (Funaro & Malavasi 1999). Neben der Expression in Zellen der lymphoiden Linie lässt sich CD38 auch auf den Zellen der myeloiden Reihe detektieren. So tragen Granulozyten (Fujita et al. 2005) und zirkulierende Monozyten CD38 auf ihrer Oberfläche, während angesiedelte Makrophagen

CD38-negativ sind (Zilber et al. 2000). Funktionell aktive Formen von CD38 konnten ebenfalls auf der äußeren Membran von Erythrozyten (Zocchi et al. 1993), Thrombozyten (Ramaschi et al. 1996) sowie natürlichen Killerzellen (Mallone et al. 2001) nachgewiesen werden. Außerhalb des hämatopoetischen Systems wird CD38 in Prostataepithelzellen, in β -Zellen des Pankreas und in verschiedenen Zellen des zentralen Nervensystems wie Purkinjezellen sowie Astrozyten exprimiert. Ebenfalls zu den CD38-positiven Zellen zählen Osteoklasten, glatte Muskelzellen sowie Zellen der Nierentubuli und die Ganglienzellen der Netzhaut (Malavasi et al. 2008).

Aufgrund der äußerst variablen Expressionsmuster, insbesondere auf den lymphoiden Zellen, wird CD38 auch als so genannter Aktivierungsmarker bezeichnet. Darüber hinaus steht die Expression von CD38 auch unter dem Einfluss verschiedener proinflammatorischer Zytokine, die je nach Zelltyp jedoch unterschiedlich reguliert ist. Während die Expression von CD38 in Makrophagen (Iqbal & Zaidi 2006) und den glatten Muskelzellen der Atemwege (Deshpande et al. 2003) insbesondere durch TNF- α hochreguliert wird, zeigen CD34⁺ hämatopoetische Vorläuferzellen (Snoeck et al. 1993) und Monozyten eine verstärkte CD38-Expression als Reaktion auf IFN- γ nicht jedoch auf TNF- α (Musso et al. 2001). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass durch kombinierte Zugabe von TNF- α und IFN- γ zu glatten Muskelzellen der Atemwege ein synergetischer Effekt erzielt wird, der zu einer weitaus stärkeren CD38-Expression führt als die alleinige Behandlung mit TNF- α (Tliba et al. 2006).

CD157 wird vorwiegend von myeloiden Zellen des peripheren Blutes, aber auch von Stromazellen des Knochenmarks, Fibroblasten der Haut, auf Endothelzellen sowie auf Mastzellen der Lunge, des Uterus und der Haut exprimiert (Quarona et al. 2013). Obwohl die Expression von CD157 noch in weiteren Geweben und Organen nachgewiesen werden konnte, ist sein Expressionsmuster weit weniger gut charakterisiert als das von CD38.

1.2.2 Enzymatische Aktivität und Ca²⁺-Mobilisierung

Biochemische und kristallographische Daten zeigen, dass die extrazelluläre Region von CD38 in eine C-terminal und eine N-terminal orientierte Domäne aufgeteilt ist (Liu et al. 2005). Beide Domänen sind über eine Gelenkregion miteinander verbunden und mit dem katalytisch aktiven Zentrum assoziiert, welches eingebettet in einer tiefen Tasche liegt (s. Abbildung 6). Die katalytische Aktivität von CD38 ist abhängig von den sechs Disulfidbrücken, die die Konformation des Enzyms stabilisieren (Zocchi et al. 1995). Während die ADP-Ribosylzyklase aus *Aplysia* als Dimer vorkommt, wurde für CD38 gezeigt, dass es neben dimeren auch tetramere Komplexe ausbildet (Bruzzone et al. 1998). Durch die Analyse der Enzymaktivität nach gezielter Punktmutagenese (Munshi et al. 2000) und über

Kokristallisation der extrazellulären Domänen von CD38 mit verschiedenen Substraten konnte mit Glutamat-226 (E226) einer der für die katalytische Aktivität von CD38 kritischen Aminosäurereste identifiziert werden (Liu et al. 2007). Dabei ist während der enzymatischen Katalyse die Carboxygruppe von E226 entscheidend, um über Wasserstoffbrückenbindungen cADPR tief genug im aktiven Zentrum binden zu können. Übereinstimmend mit der enzymatischen Aktivität der ADP-Ribosylzyklase aus *Aplysia* katalysiert CD38 ebenfalls die Umsetzung von β -NAD⁺ (im Weiteren als NAD⁺ bezeichnet) in cADPR (ADP-Ribosylzyklaseaktivität). Weiterführende Studien zeigten jedoch, dass die Umsetzung von NAD⁺ in cADPR nicht die Hauptreaktion ist, sondern der überwiegende Anteil von cADPR zu Adenosin 5'-Diphosphoribose (ADPR) hydrolysiert wird (cADPR-Hydrolaseaktivität) (Howard et al. 1993). Da CD38 unter sauren Bedingungen überdies die Umsetzung von Nicotinamidenindinukleotidphosphat (NADP⁺), einem weiteren Substrat neben NAD⁺, in Nicotinsäureadenindinukleotidphosphat (NAADP) katalysiert, wird es auch als multifunktionelles Ektoenzym bezeichnet (Aarhus et al. 1995).

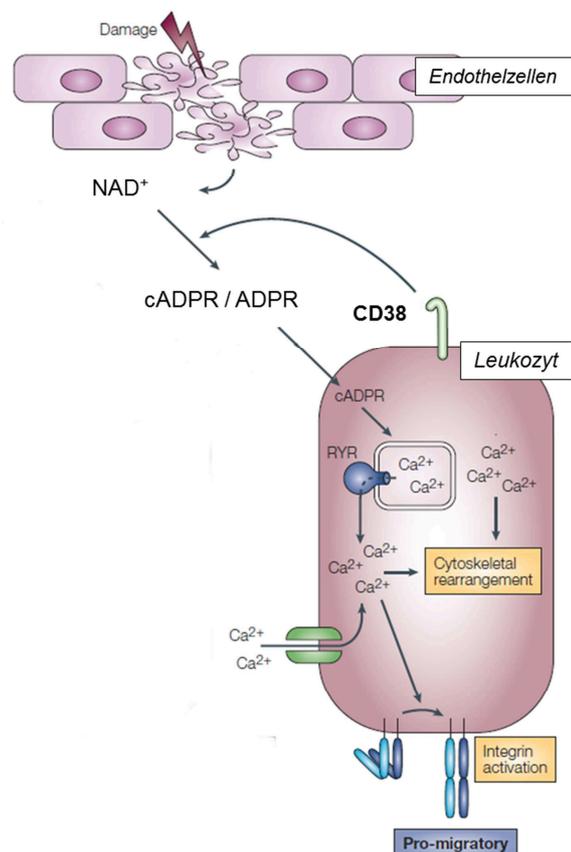
Die Reaktionsprodukte cADPR, ADPR sowie NAADP der durch CD38 vermittelten Enzymreaktion fungieren als so genannte Second-Messenger und führen über Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP3)-unabhängige Mechanismen zur Aktivierung intrazellulärer Ca²⁺-Signale. Während cADPR durch Aktivierung des Ca²⁺-permeablen Ryanodin-Rezeptors (RyR) auf dem endoplasmatischen Retikulum und NAADP über die Bindung an NAADP-Rezeptoren auf Lysosomen die Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern steuert (Schuber & Lund 2004), führt die intrazelluläre Interaktion von ADPR mit dem auf der Zelloberfläche lokalisierten Ca²⁺-Kanal TRMP2 zu einem Einstrom extrazellulärer Ca²⁺-Ionen ins Zytoplasma (Perraud et al. 2001). Die Erkenntnis, dass der enzymatisch aktive Teil von CD38 außerhalb des Zytoplasmas liegt, führte zu zwei grundlegenden Fragen: **(1)** Wie gelangen die Substrate NAD⁺ und NADP⁺, die für gewöhnlich intrazellulär vorliegen, ins extrazelluläre Milieu? **(2)** Wie werden die Produkte der enzymatischen Reaktion ins Zellinnere transportiert, um durch Interaktion mit intrazellulären Faktoren einen Ca²⁺-Einstrom auszulösen?

Eine mögliche Erklärung für den Transport der Substrate lieferte die Entdeckung, dass das auf der Zelloberfläche lokalisierte Connexin 43 (Cx43) als NAD⁺-Kanal fungiert (Bruzzone et al. 2001). Ferner könnten NAD⁺ und NADP⁺ auch aus umliegenden geschädigten Zellen freigesetzt werden. Auch der Transport der Reaktionsprodukte ins Zellinnere ist bisweilen nur unzureichend verstanden und wird kontrovers diskutiert. So deuten Studien daraufhin, dass CD38 selbst als cADPR-Pumpe fungiert (Franco et al. 1998) oder dass cADPR über separate Nucleosid-Transporter ins Zytoplasma geschleust wird (Pastor-Anglada et al. 2001).

1.2.3 Vermittelte Funktionen der CD38-Enzymaktivität

Erste Erkenntnisse darüber, welche biologischen Funktionen durch CD38 vermittelt werden, konnte durch die Entwicklung CD38-defizienter Knockout ($CD38^{-/-}$)-Mäuse gewonnen werden. Da diese Mäuse lebensfähig und in der Lage sind sich normal zu vermehren, scheint CD38 keine essentielle Rolle im Zuge der Entwicklung zu spielen und seine enzymatische Aktivität nicht lebensnotwendig zu sein. Allerdings zeigen die Mäuse einen sichtbaren Phänotyp hinsichtlich Mechanismen und Funktionen der adaptiven Immunantwort, die unter anderem durch eine verminderte T-zellvermittelte Antikörperproduktion gekennzeichnet ist (Cockayne et al. 1998). Später konnte außerdem gezeigt werden, dass sich der Ausfall von CD38 auch auf die Zellen des angeborenen Immunsystems auswirkt. So wiesen Neutrophile eine deutlich abgeschwächte Migration in bakteriell infizierte Lungen und in chemisch entzündetes Peritoneum von $CD38^{-/-}$ -Mäusen auf, was zu einer erhöhten Anfälligkeit der Tiere gegenüber Infektionen führte (Partida-Sanchez et al. 2001). Gleichermäßen waren aus $CD38^{-/-}$ -Mäusen isolierte Neutrophile nicht in der Lage als Reaktion auf bestimmte endogene Substanzen wie Chemokine zu migrieren (Partida-Sanchez et al. 2004b). Darüber hinaus wurde anhand von $CD38^{-/-}$ -Mäusen gezeigt, dass CD38 die Migration dendritischer Vorläuferzellen aus dem Blut ins periphere Gewebe reguliert und die Migration reifer dendritischer Zellen aus Entzündungsregionen in die Lymphknoten kontrolliert (Partida-Sanchez et al. 2004a).

Abbildung 8: Darstellung zur hypothetischen Rolle von CD38 bei der Leukozytenmigration. Nach Freisetzung von $NAD(P)^+$ aus geschädigtem Gewebe führt die Umsetzung von NAD^+ in cADPR bzw. ADPR durch CD38 zur Ca^{2+} -Mobilisierung ins Zytoplasma von Leukozyten und anschließend zu einer Reorganisation des Zytosketts sowie zur Änderung der Integrinaktivität. *Salmi und Jalkanen, Nat Rev Immunol. 2005 Oct;5(10):760-71 (modifiziert).*



Die bisherigen Studien deuten darauf hin, dass die beobachteten Defekte in der Leukozytenmigration insbesondere auf das Fehlen durch CD38 vermittelter Ca^{2+} -Signale und den davon abhängigen molekularen Mechanismen zurückzuführen sind (Salmi & Jalkanen 2005). So ist die Theorie, dass NAD^+ und NADP^+ aus geschädigten Zellen eines entzündeten oder nekrotischen Gewebes freigesetzt und durch CD38, das auf der Oberfläche bestimmter Leukozyten exprimiert ist, zu cADPR und ADPR bzw. NAADP umgesetzt werden (s. Abbildung 8). Diese werden anschließend in die Leukozyten geschleust und lösen über die Aktivierung bestimmter Ca^{2+} -Kanäle einen Ca^{2+} -Einstrom ins Zytoplasma aus, der wiederum zu einer Reorganisation des Zytoskeletts sowie zu einer Änderung des Aktivierungszustandes bestimmter Integrine führt und somit Einfluss auf das Migrationsverhalten der Leukozyten hat (Sanchez-Madrid & del Pozo 1999, Hyduk et al. 2007).

1.2.4 Rezeptorfunktion und Signaltransduktion

Neben der Eigenschaft über die enzymatische Aktivität Ca^{2+} -Signale zu steuern, gibt es Hinweise darauf, dass CD38 auch Rezeptorfunktionen sowie das Potential zur Signalübertragung besitzt. Diese ergaben sich aus der Beobachtung, dass die Bindung spezifischer anti-CD38 Antikörper (agonistische Antikörper) zur Proliferation und Aktivierung von T-Lymphozyten führt, da die Antikörperbindung die Bindung möglicher Liganden imitiert. Mit Hyaluronsäure, einem Bestandteil der extrazellulären Matrix, und CD31 (PECAM-1), das insbesondere von Endothelzellen exprimiert wird, konnten bisher zwei Liganden identifiziert werden, die von CD38 gebunden werden (Nishina et al. 1994, Deaglio et al. 1996). Die Interaktion von CD38 mit CD31 ist ein wichtiger Schritt der Leukozyten-Transmigration durch das Endothel und wurde bisher für T- und B-Lymphozyten, NK- und myeloide Zellen beschrieben (Deaglio et al. 1998, Deaglio et al. 2000). Obwohl es Anhaltspunkte dafür gibt, dass CD38 mit der Tyrosin-Proteinkinase Lck (Leukocyte cell specific) interagiert (Cho et al. 2000), konnten auf dem kurzen zytoplasmatischen Abschnitt von CD38 bislang keine für die Übertragung von Signalen typischen Motive nachgewiesen werden. So geht man davon aus, dass die über CD38 vermittelten Signaltransduktionen vor allem über laterale Assoziationen mit anderen Signalmolekülen erfolgen. Als Reaktion auf die Bindung agonistischer Antikörper durch CD38 wurden typische B- sowie T-Zellaktivierungsmuster beobachtet, die Hinweise auf eine funktionelle Verbindung mit daran beteiligten Rezeptoren lieferten. So konnte in T-Zellen gezeigt werden, dass CD38-Signale über den TCR/CD3-Komplex zur Phosphorylierung von PLC- γ 1, Lck, CD3- ζ , CD3- ϵ ZAP-70, Shc sowie LAT führen und die Aktivierung von ERK- und Akt/PKB-Signalwegen bewirken (Zubiaur et al. 1997, Zubiaur et al. 2002). Entsprechend

wurde in B-Zellen gezeigt, dass CD38 lateral mit den Faktoren CD19 und CD81 assoziiert ist, die Teil des BCR-Komplexes sind und die Aktivierung BCR-abhängiger Signale wie die Phosphorylierung von Syk sowie PLC- γ und PI3K vermitteln (Deaglio et al. 2007). Um die Signale übertragen zu können, bildet CD38 Dimere bzw. Tetramere, die mit anderen Signaltransduktionsfaktoren als supramolekulare Komplexe organisiert und in cholesterinreichen Mikrodomänen, den so genannten Lipid Rafts, lokalisiert sind. Je nach Zellart variiert die Zusammensetzung der Komplexe und so die Form der vermittelten Signale.

1.2.5 CD38 in chronischer lymphatischer Leukämie

CD38 gilt als negativ prognostischer Marker bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL), einem B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (Damle et al. 1999). B-CLL-Zellen mit hoher CD38-Expression (CD38⁺ CLL) spiegeln eine Untergruppe mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf wider. Studien zeigen, dass CD38 nicht nur als Marker für CLL fungiert, sondern darüber hinaus ein pathogenes Potential besitzt, das insbesondere durch ein ausgeprägtes Adhäsions- und Migrationsverhalten und durch eine verstärkte Interaktion von B-CLL Zellen mit anderen Zellpopulationen gekennzeichnet ist. Dabei resultieren die veränderten Adhäsions- und Migrationseigenschaften aus lateralen Assoziationen mit anderen Signalmolekülen, wie dem Chemokinrezeptor CXCR4, der eine gesteigerte Migrationsrate von B-CLL Zellen im CXCL12 (SDF-1)-Gradienten vermittelt (Vaisitti et al. 2010). Ferner wird durch die laterale Interaktion von CD38 mit dem Integrin-Dimer $\alpha 4\beta 1$ (CD49d/CD29) eine effizientere Adhäsion an CD49d-spezifische Substrate ermöglicht (Zucchetto et al. 2012).

1.3 MSCs unter proinflammatorischen Bedingungen

Als Antwort auf eine Gewebeschädigung oder das Eindringen von Fremdorganismen kommt es in entsprechenden Regionen in der Regel zu einer Entzündungsreaktion, die unter anderem durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine von den an der Reaktion beteiligten Zellen gekennzeichnet ist. Über die Aktivierung bestimmter Signalwege fungieren Zytokine als Mediatoren physiologischer sowie pathologischer Funktionen, indem sie Immunantworten steuern oder auch Wachstum, Reifung und Differenzierung vieler Zellarten beeinflussen. Bei der Vermittlung solcher Prozesse spielen neben anderen Faktoren der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und das Interferon- γ (IFN- γ) eine wichtige Rolle. So führt TNF- α , das insbesondere von Makrophagen ausgeschüttet wird, unter anderem zu einer gesteigerten Rekrutierung

bestimmter Leukozyten zum Ort der Entzündung, aber auch zu einer Aktivierung und damit verstärkten Expression von Adhäsionsfaktoren auf Endothelzellen (Aggarwal et al. 2012). IFN- γ , das hauptsächlich von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und zytotoxischen T-Zellen exprimiert wird, verstärkt unter anderem die Aktivität von Makrophagen sowie NK-Zellen und moduliert B-Zellfunktionen (Schroder et al. 2004). MSCs, die zu therapeutischen Zwecken verabreicht werden, sind unter Umständen diesen Bedingungen in erhöhtem Maße ausgesetzt. Der Einfluss solcher Bedingungen auf MSCs und die Expression bestimmter Faktoren, die potentiell eine Veränderung des Adhäsionsverhaltens gegenüber Endothelzellen oder der Migration ins umliegende Gewebe bewirken, ist bisher nur in Teilen erforscht. Um ein inflammatorisches Umfeld zu simulieren, wurden in bisherigen Studien MSCs unter anderem mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α und IFN- γ stimuliert. Die Konzentration der verwendeten Zytokine bewegte sich in einem Bereich von 10 ng/ml bis 50 ng/ml, wobei die Inkubationszeiten von 24 Stunden bis zu 14 Tagen reichten (Crop et al. 2010, Hemeda et al. 2010, Egea et al. 2011).

2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Im Kontext der Zelltherapie ist es von entscheidender Bedeutung, dass exogene MSCs mit geschädigtem oder entzündetem Gewebe in Wechselwirkung treten, um ihre potentiellen Wirkmechanismen entfalten zu können. So stellen die Adhäsion intravenös injizierter MSCs an vaskuläres Endothel und deren Migration in das umliegende, geschädigte Gewebe wichtige Vorgänge in diesem Kontext dar. Ob und wie Zellen miteinander interagieren ist maßgeblich davon abhängig, welche Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimiert werden. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, MSCs hinsichtlich ihrer Expression von Oberflächenmolekülen zu charakterisieren und deren Bedeutung für das Adhäsions- und Migrationsverhalten der Zellen zu bestimmen. Dazu sollte zunächst ein genaues Expressionsprofil von MSCs aus drei unterschiedlichen Geweben, die von je drei verschiedenen Spendern stammten, erstellt und die Entwicklung der Expression im Laufe der Kultivierung verfolgt werden. Der Fokus sollte dazu auf „klassische“ Adhäsions- bzw. Migrationsfaktoren gelegt werden, zu denen Vertreter der Integrine, Chemokinrezeptoren sowie weitere Adhäsionsfaktoren wie Selektine und deren Liganden zählen. In der Regel sind geschädigte und entzündete Gewebe durch das Auftreten hoher Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine gekennzeichnet, die eine Aktivierung von den an der Immunreaktion beteiligten Zellen bewirken und zu einer verstärkten Akkumulation von Leukozyten in Entzündungsregionen führen. Basierend auf der Annahme, dass MSCs, die durch intravenöse Injektion in die Zirkulation gebracht werden, in das inflammatorische Umfeld gelangen und so mit diesem in Wechselwirkung treten, sollte ebenfalls analysiert werden, wie sich Bedingungen dieser Art auf die Expression der untersuchten Adhäsionsfaktoren auswirken. Um diese inflammatorischen Konditionen *in vitro* zu simulieren, sollten die MSCs durch simultane Zugabe von TNF- α und IFN- γ stimuliert und der Einfluss auf das Expressionsprofil analysiert werden.

Zielfindungs- und Rekrutierungsvorgänge setzen das exakte Zusammenspiel vieler Moleküle voraus. Um neben den klassischen Adhäsions- und Migrationsfaktoren weitere Faktoren in MSCs zu identifizieren, die unter inflammatorischen Bedingungen reguliert sind und eine potentielle Rolle bei Rekrutierungsprozessen spielen, sollten in einer weitergehenden qPCR-Analyse die mRNA-Expression von insgesamt 371 Genen verschiedener Gruppen, zu denen auch Ektoenzyme zählen, sowohl unter normalen als auch unter proinflammatorischen Bedingungen untersucht werden. Von entsprechenden Kandidaten sollte die Funktionalität verifiziert und ferner mittels Migrationstests bestimmt werden, ob diese eine Rolle bei Adhäsions- und Migrationsvorgängen von MSCs spielen und so eine Wechselwirkung mit geschädigtem Gewebe begünstigen können.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

ChemiDoc™ MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
CO ₂ Inkubator BBD 6220	Thermo Scientific, Waltham, USA
Durchflusszytometer FACS Canto™ II	BD Biosciences, San Jose, USA
Einkanal-Pipetten Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg
FLIPR® Tetra HTC Screening System	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Gelsystem für Agarosegele	Peqlab, Sarisbury Green, UK
Heizblock Thermomixer® compact	Eppendorf AG, Hamburg
Laminar-Flow Werkbank	BDK Luft- und Reimraumtechnik, Sonnenbühl
LightCycler480® Instrument II	Roche Applied Science, Mannheim
Mehrkanal-Pipetten Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskope:	
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axio Observer Z.1	Carl Zeiss, Oberkochen
Konfokal-Mikroskop Nikon Eclipse Ti	Nikon Instruments Europe, Amsterdam, NL
Routine Zellkulturmikroskop Leica DM IL	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikrotiterplatten-Reader Infinite® M200 Pro	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mr. Frosty Kryocontainer	Nalgene - Thermo Scientific, Wilmington, USA
NanoDrop® 2000 Spektrophotometer	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Netzgerät Peqlab EV231	Peqlab, Sarisbury Green, UK
Neubauer Zählkammer	BRAND, Wertheim
PCR-Gerät Mastercycler® egradient	Eppendorf AG, Hamburg
pH-Messgerät SevenEasy™	Mettler-Toledo, Gießen
Pipettierhilfe Integra Pipetboy pro	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Stickstoffbehälter BIOSAFE®-System	Cryotherm, Kirchen
Vakuum-Pumpe Integra Vacusafe	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Wasserbad TW8	Julabo, Seelbach
xCELLigence Real Time Cell Analyzer (RTCA) DP	ACEA Biosciences, San Diego, USA
Zentrifugen:	
Tisch- und Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg
Tisch- und Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrozentrifuge Galaxy MiniStar	VWR International, Radnor, USA

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Absaugspitzen	BD Biosciences, San Jose, USA
CIM-Platten (Cell invasion/migration)	ACEA Biosciences, San Diego, USA
Deckgläser, rund, 18 mm Ø	Marienfeld, Lauda Königshofen
Röhrchen für Durchflusszytometrie, PS, 5 ml	BD Biosciences, San Jose, USA
Impfösen	VWR International, Radnor, USA
Kryoröhrchen, PP, 1,2 ml	VWR International, Radnor, USA
Kulturgefäß µ-slide, 8-Well	ibidi, Martinsried
Kulturröhrchen (14 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
LightCycler® 480 Multiwellplatte 96, weiß	Roche Applied Science, Mannheim

Mikrotiter-Gefäße (1,2 ml)	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Multiwell-Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-Well)	BD Biosciences, San Jose, USA
Mikrotiterplatten, Flachboden (96-Well, s/w)	BD Biosciences, San Jose, USA
Mikrotiterplatten, Rundboden (96-Well, transparent)	BD Biosciences, San Jose, USA
Objektträger	Marienburg, Lauda Königshofen
Parafilm® M Abdichtungsfilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
PCR-Sreifen (0,2 ml je Reaktionsgefäß)	Eppendorf AG, Hamburg
Zellkulturschalen (Ø 10 cm)	BD Biosciences, San Jose, USA
Pipettenspitzen mit Filter (10 µl / 200 µl / 1 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter für FLIPR® Tetra (200 µl)	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Reaktionsgefäße (0,2 ml / 1,5 ml / 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Serologische Pipetten (5 ml / 10 ml / 25 ml / 50 ml)	BD Biosciences, San Jose, USA
Zellkulturflaschen (25 cm ² / 75 cm ² / 175 cm ²)	BD Biosciences, San Jose, USA
Zellschaber, 32cm	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zentrifugenröhrchen, konisch, PP (15 ml / 50 ml)	BD Biosciences, San Jose, USA

3.1.3 Chemikalien und Enzyme

Adenosin 5'-Diphosphoribose (ADPR)	Sigma-Aldrich, St-Louis, USA
Ampicillin	Roche Applied Science, Mannheim
5-Chloromethylfluorescein Diacetat (CMFDA)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Ethanol (Analytische Qualität)	Fisher Scientific, Hampton, USA
Eindeckel-Lösung Fluoroshield™ mit DAPI	Sigma-Aldrich, St-Louis, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Fluo-4 Acetoxymethylester (AM)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Fötale Kälberserum (FKS)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Fibronektin (rein), aus Humanserum	Roche Applied Science, Mannheim
GlutaMAX™-I (100x)	Life Technologies, Carlsbad, USA
D(+)-Glukose	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St-Louis, USA
DNase I	Sigma-Aldrich, St-Louis, USA
Hoechst 33342, Trihydrochlorid, Trihydrat	Life Technologies, Carlsbad, USA
Hyaluronidase	AppliChem, Darmstadt
Interferon-γ (IFN-γ), human, 5 µg/ml	Roche Applied Science, Mannheim
Ionomycin	Sigma-Aldrich, St-Louis, USA
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kollagenase I	Biochrom, Berlin
Minimal essenzielles Medium – MEM alpha Eagle	Lonza, Basel, Schweiz
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe
β-Nikotinamidadenindinukleotid (β-NAD ⁺)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Nikotinamidguanindinukleotid (NGD ⁺)	Sigma-Aldrich, St-Louis, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Probenecid	Life Technologies, Carlsbad, USA
Puromycin-Dihydrochlorid	Life Technologies, Carlsbad, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Tris-Hydrochlorid Puffer, Tris-HCl, 1 M, pH 7,5	US Biological Life Sciences, Salem, USA

Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, St-Louis, USA
Trypsin-EDTA (1x), 0,05%, mit Phenolrot	Life Technologies, Carlsbad, USA
Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), human, 10 μ g/ml	Roche Applied Science, Mannheim
Zyklisches Adenosin 5'-Diphosphoribose (cADPR)	Sigma-Aldrich, St-Louis, USA

3.1.4 Kits

Fluo-4 Direct™ Calcium Assay Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
High Pure RNA Isolation Kit	Roche Applied Science, Mannheim
HiSpeed® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Mini NucleoSpin® Plasmid (NoLid) Kit	Macherey-Nagel, Düren
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Rapid DNA Ligation Kit	Roche Applied Science, Mannheim
Trascriptor First Strand cDNA-Synthesis Kit	Roche Applied Science, Mannheim

3.1.5 Software

AxioVision 4.8	Mikroskopie-Software	Carl Zeiss, Oberkochen
BD FACSDiva™ 6.1	Durchflusszytometrie, Messung	BD Biosciences, San Jose, USA
FlowJo 7.6.5	Durchflusszytometrie, Auswertung	Tree Star, Ashland, USA
GenEx 5.4.3	Auswertung von qPCR-Daten	multiD, Göteborg, Schweden
i-Control™ 1.8	Fluoreszenzmessung in Mikrotiterplatten	Tecan, Männedorf, Schweiz
LightCycler® 480	Realtime-PCR-Analyse	Roche Applied Science, Mannheim
Microsoft Excel™ 2010	Tabellenkalkulation, Diagramme	Microsoft, Redmond, USA
NIS-Elements	Mikroskopie-Software	Nikon Instruments, Amsterdam, NL
RTCA Software 1.2	Migrationstests	ACEA Biosciences, San Diego, USA
ScreenWorks® 3.1	Ca ²⁺ -Flux-Messungen	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Student's t-Test	Statistische Auswertung	www.physics.csbsju.edu
XLfit™ 5.3.1	Kurvenanpassungen	IDBS, Guildford, UK

3.1.6 Desoxyribonukleinsäuren (DNA)

3.1.6.1 Gensynthesen

Für die Expression von rekombinantem CD38 in MSCs wurden so genannte Gensynthesen drei verschiedener CD38-Konstrukte bei der Firma GeneArt® (Life Technologies) in Auftrag gegeben (s. Tabelle 1). Zu den Konstrukten zählten neben der normalen Form von CD38 eine am N-Terminus um 17 Aminosäuren verkürzte Variante (Δ 17-CD38) und eine Mutante (E226L-CD38), die an Position 226 einen Austausch von Glutamat (E) zu Leucin (L) aufwies. Die vollständigen Sequenzen der drei Konstrukte sind im Anhang beigefügt (s. Anhang Seite

127 ff.). Sie lagen jeweils als in Plasmide (pMA-RQ) klonierte Inserts vor und wurden später in einen retroviralen Transfervektor umkloniert (s. Abschnitt 3.2.2).

Tabelle 1: Gensynthesen der drei CD38-Konstrukte zur Klonierung in einen retroviralen Transfervektor.

CD38	Gesamtlänge:1570 Basenpaare <i>Xho</i> I-Schnittstelle, β -Globin 5'UTR inklusive Kozak-Sequenz, CD38 codierende Sequenz, CD38 3'UTR (30bp), IRES-Sequenz, <i>Sal</i> I-Schnittstelle
Δ17-CD38	Gesamtlänge:1519 Basenpaare <i>Xho</i> I-Schnittstelle, β -Globin 5'UTR inklusive Kozak-Sequenz, CD38 codierende Sequenz ohne die ersten 17 N-terminalen Aminosäuren, CD38 3'UTR (30bp), IRES-Sequenz, <i>Sal</i> I-Schnittstelle
E226L-CD38	Gesamtlänge:1570 Basenpaare <i>Xho</i> I-Schnittstelle, β -Globin 5'UTR inklusive Kozak-Sequenz, CD38 codierende Sequenz mit Triplett-Austausch (GAA \rightarrow CTA), CD38 3'UTR (30bp), IRES-Sequenz, <i>Sal</i> I-Schnittstelle

3.1.6.2 Plasmide

Für die Gewinnung retroviraler Partikel, die später zur Transduktion der verschiedenen CD38-Varianten in MSCs dienen, wurde der retrovirale Transfervektor pRetroQ-AcGFP-N1 sowie die beiden Verpackungsplasmide pCMV-VSV-G und pCMV-Gag-Pol verwendet (s. Tabelle 2), die von der Forschungsgruppe Prof. Dr. R. Fässler (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt wurden. Die jeweiligen Plasmidkarten befinden sich im Anhang (s. Anhang Seite 129).

Tabelle 2: Vektoren zur Gewinnung von Retroviren für die Transduktion von MSCs.

pRetroQ-AcGFP-N1 Retroviraler Transfervektor	Größe: 7606 bp 5'LTR (CMV/MSV) Hybrid, psi+ Verpackungssignal, P _{CMV} -IE Promotor, Multiple Klonierungsstelle (MCS), AcGFP, P _{PGK} Promotor, Puromycin-Resistenz, 3'MMLV LTR (Deletion in U3), Ampicillin-Resistenz
pCMV-VSV-G Verpackungsplasmid	Größe: 6051 bp P _{CMV} Promotor, VSV-G, SV40 pA Polyadenylierungssignal, Ampicillin-Resistenz
pCMV-Gag-Pol Verpackungsplasmid	Größe: 11.000 bp P _{CMV} Promotor, gag/pol, BGH pA Polyadenylierungssignal, Ampicillin-Resistenz

3.1.6.3 Oligonukleotide (Primer)

Für die Realtime-PCR (qRT-PCR)-Analyse zur relativen Quantifizierung der mRNA-Expression verschiedener Faktoren in MSCs wurden kommerziell erhältliche RealTime ready qPCR Tests (Roche Applied Science) verwendet. In diesem Testformat liegen die, für die Gene spezifischen Primerpaare sowie die Hydrolyse-Sonde (TaqMan) bereits als getrocknete Pellets in den Wells von Mikrotiterplatten vor. Zu diesen werden die Probe in Form von cDNA und der LightCycler® 480 Probes Master (Roche Applied Science), der Reaktionspuffer und Nukleotide enthält, hinzugegeben. Die Identifizierung valider Referenzgene, die auch unter verschiedenen Bedingungen stabil in MSCs exprimiert werden, erfolgte mittels des RealTime ready Human Reference Gene Panel (96-Well Format), das eine Analyse von 19 Referenzgenen ermöglicht (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: RealTime ready Human Reference Gene Panel zur Quantifizierung der mRNA-Expression 19 verschiedener Referenzgene in MSCs. Die mit einem Sternchen gekennzeichneten Gene wurden als valide Referenzgene im RealTime ready Custom Panel verwendet.

RealTime ready Human Reference Gene Panel, 96-Well <i>Das Panel enthält Primer zur Analyse von 19 Referenzgenen als Vierfachbestimmung.</i>	18S	18S ribosomale RNA
	ACTB*	Aktin, zytoplasmatisch-1, beta
	ALAS	δ-Aminolävulinatsynthase
	β-2M	β-2-Mikroglobulin
	β-Globin	Hämoglobin beta-Untereinheit
	G6PD*	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
	GAPDH*	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
	GUSB	β-Glucuronidase
	HPRT1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
	IPO8*	Importin-8
	PBG	Phorphobilinogen-Desaminase
	PGK1	Phosphoglyceratkinase 1
	PPIA	Cyclophilin A
	RPL13A*	60S ribosomales Protein L13a
	RPLP0	60S ribosomales Protein P0
	SDHA*	Succinat-Dehydrogenase Komplex, A
	TBP*	TATA-Box Bindeprotein
	TFRC	Transferrin-Rezeptor Protein-1
	YWHAZ*	14-3-3 Protein zeta

Für die spätere Expressionsanalyse diverser Faktoren aus unterschiedlichen Gruppen in MSCs wurde ein individuelles Panel (Custom Panel) zusammengestellt, das qRT-PCR-Tests für insgesamt 371 Gene sowie acht Referenzgene und fünf Kontrollen beinhaltet (384-Well Format). Tabelle 4 zeigt die Gruppen der 371 analysierten Faktoren des individuellen Panels. Die vollständige Liste aller 371 Gene sowie den auf der Platte enthaltenen Kontrollen ist im Anhang beigelegt (s. Anhang Tabelle 23, Seite 130 ff.).

Tabelle 4: RealTime ready Custom Panel zur Quantifizierung der mRNA-Expression in MSCs.

<p>RealTime ready Custom Panel, 384-Well <i>Das Panel enthält Primer zur Analyse von insgesamt 371 Genen aus den rechts stehenden Gruppen, sowie acht Referenzgene und fünf Kontrollen.</i></p>	<p>Apoptose und Zellzyklus Chemokine Chemokinrezeptoren Differenzierung Extrazelluläre Matrix Focal Adhesions Integrine Integrin-Liganden Intermediärfilamente Embryonale Stammzellmarker Matrix-Metalloproteasen MMP-Inhibitoren Metabolismus MSC-Negativmarker</p>	<p>MSC-Positivmarker Neuronale Faktoren Selektine Selektin-Liganden Seneszenzmarker Signaltransduktion Oberflächenenzyme Transkription Transformation Proteinsortierung Wachstumsfaktoren Wachstumsfaktor-Rezeptoren Zytokine Zytokinrezeptoren <i>weitere</i></p>
---	---	--

3.1.7 Puffer und Kulturmedien

1x PBS, pH 7,2 (Life Technologies):

144 mg/l KH₂PO₄
 9,0 g/l NaCl
 795mg/l Na₂HPO₄ • 7 H₂O

1x PBS, pH 7,2 (+ Ca²⁺, Mg²⁺):

500 ml 1x PBS, pH7,2
 50 mg CaCl₂
 50 mg MgCl₂ • 6 H₂O

1x HBSS (Life Technologies):

140 mg/l CaCl₂
 100 mg/l MgCl₂ • 6 H₂O
 100 mg/l MgSO₄ • 7 H₂O
 400 mg/l KCl
 60 mg/l KH₂PO₄
 350 mg/l NaHCO₃
 8,0 g/l NaCl
 48 mg/l Na₂HPO₄
 1,0 g/l D-Glukose

1x HBSS (- Ca²⁺, Mg²⁺) (Life Technologies):

400 mg/l KCl
 60 mg/l KH₂PO₄
 350 mg/l NaHCO₃
 8,0 g/l NaCl
 48 mg/l Na₂HPO₄
 1,0 g/l D-Glukose

Calcium-Testpuffer, pH 7,3:

490 ml 1x HBSS (+ Ca²⁺, Mg²⁺)
 10 ml 1 M HEPES
 pH auf 7,3 einstellen

Calcium-Waschpuffer, pH 7,3:

490 ml 1x HBSS (- Ca²⁺, Mg²⁺)
 10 ml 1 M HEPES
 pH auf 7,3 einstellen

**Homogenisierungspuffer:
 (20 mM Tris-HCl, pH 7,5)**

10 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5
 490 ml H₂O

Blockierungspuffer:

(1x PBS, + 3 % BSA, + 0,1 % Triton)

1,5 g BSA
 500 µl 10% Triton-X 100
 add 50 ml 1x PBS, pH 7,2

AM-Verdauung I

0,05% Trypsin/EDTA
 25 µg/ml DNase I

AM-Verdauung II

1x Zellkulturmedium
 265 U/ml Kollagenase I
 25 µg/ml Dnase I

Kulturmedium für Primärzellen:

500 ml MEM alpha-Eagle
 50 ml Fötale Kälberserum (FKS)
 5 ml GlutaMAX™-I (100x)
 5 ml Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)

UC-Verdauung

1x PBS (- Ca²⁺, Mg²⁺)
 530 U/ml Kollagenase I
 674 U/ml Hyaluronidase
 25 µg/ml DNase I

3.1.8 Antikörper

Tabelle 5: Übersicht über die zur Charakterisierung von MSCs eingesetzten Antikörper.

Primärantikörper

Humanes Antigen	Isotyp	Markierung	Klon	Hersteller
Integrin alpha-1	Maus IgG1, κ	PE	SR84	BD Biosciences
Integrin alpha-2	Maus IgG1, κ	FITC	AK-7	BD Biosciences
Integrin alpha-3	Maus IgG1, κ	PE	C3 IL1	BD Biosciences
Integrin alpha-4	Maus IgG1, κ	APC	9F10	BD Biosciences
Integrin alpha-5	Maus IgG1, κ	Biotin	IIA1	BD Biosciences
Integrin alpha-6	Ratte IgG2a, κ	FITC	GoH3	BD Biosciences
Integrin alpha-V	Maus IgG2a, κ	FITC	NKI-M9	BioLegend
Integrin beta-1	Maus IgG1, κ	PE	MAR4	BD Biosciences
Integrin beta-2	Maus IgG1, κ	-	6.7	BD Biosciences
Integrin beta-3	Maus IgG1, κ	-	VI-PL2	BD Biosciences
Integrin beta-4	Ratte IgG2b, κ	PE	439-9B	BD Biosciences
Integrin αVβ5	Maus IgG	-	P5H9	R&D Systems
Integrin beta-6	Maus IgG2b, κ	PE	437211	R&D Systems
Integrin beta-7	Ratte IgG2a, κ	-	FIB504	BD Biosciences
Integrin beta-8	Maus IgG2b, κ	-	416922	R&D Systems
CXCR4	Ratte IgG2a, κ	-	1D9	BD Biosciences
CCR2	Maus IgG2b, κ	AlexaFLuor647	48607	BD Biosciences
CCR7	Ratte IgG2a, κ	-	3D12	BD Biosciences
VCAM	Maus IgG1, κ	FITC	51-10C9	BD Biosciences
PSGL-1	Maus IgG1, κ	PE	KPL-1	BD Biosciences
L-Selektin	Maus IgG1, κ	-	DREG-56	BD Biosciences
CD38	Maus IgG1, κ	PE	HIT-2	BD Biosciences
CD38	Maus IgG1, κ	-	AT-1	Santa Cruz Biotech.
CD157	Maus IgG1, κ	FITC	RF3	LifeSpan BioSc.
TRPM2	Rabbit	-	Polyklonal	Abcam

Sekundärantikörper und -konjugate

Typ	Reaktivität	Markierung	Hersteller
Streptavidin-Konjugat	Bindung an Biotin	DyLight649	Jackson Im.-Res.
Fab ₂ -Fragment	Ziege anti-Ratte IgG (H+L)	FITC	Jackson Im.-Res.
Fab ₂ -Fragment	Ziege anti-Maus IgG (H+L)	DyLight649	Jackson Im.-Res.
Antikörper	Ziege anti-Hase IgG (H+L)	AlexaFluor488	Molecular Probes

Isotypkontrollen

Isoyp	Markierung	Klon	Hersteller
Maus IgG1, κ	PE	MOPC-21	BD Biosciences
Maus IgG1, κ	FITC	MOPC-21	BD Biosciences
Maus IgG1, κ	APC	MOPC-21	BD Biosciences
Maus IgG1, κ	Biotin	MOPC-21	BD Biosciences
Maus IgG1, κ	-	MOPC-21	BD Biosciences
Maus IgG2a, κ	FITC	G155-178	BD Biosciences
Maus IgG2a, κ	-	MOPC-173	BD Biosciences
Maus IgG2b, κ	-	MPC-11	BD Biosciences
Maus IgG2b, κ	AlexaFluor647	27-35	BD Biosciences
Maus IgG2b, κ	Biotin	27-35	BD Biosciences
Maus IgG2b, κ	PE	133303	R&D Systems
Ratte IgG2a, κ	FITC	R35-95	BD Biosciences
Ratte IgG2a, κ	-	R35-95	BD Biosciences
Ratte IgG2b, κ	PE	R35-38	BD Biosciences
Schaf IgG	Biotin	Polyklonal	R&D Systems
Hase IgG	-	Polyklonal	Jackson Im.-Res.

3.1.9 Biologisches Material

3.1.9.1 Humane Primärzellen

Für die Gewinnung von MSCs aus Humanmaterial wurden Nabelschnüre (UC) und Amnionmembranen (AM) humaner Plazentas vom Bluttransfusionservice des Roten Kreuzes in Oberösterreich direkt nach dem Kaiserschnitt bezogen. Humanes Knochenmark (BM) gesunder Spender wurde von der Firma Lonza erworben. Von den jeweiligen Spendern wurde eine von Ethikkomitees anerkannte Einverständniserklärung unterzeichnet. Die Isolation der MSCs aus den unterschiedlichen Geweben ist im Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben. Zusätzlich zu den MSCs wurden aus den Amnionmembranen Epithelzellen (AME) isoliert. Die Gewinnung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) erfolgte über Dichtegradientenzentrifugation von humanen Blutproben. In Tabelle 6 sind die verwendeten Primärzellen noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 6: Humane Primärzellen.

AM-MSC	Mesenchymale Stromazellen aus der Amnionmembran (<i>engl.</i> Amniotic membrane)
BM-MSC	Mesenchymale Stromazellen aus dem Knochenmark (<i>engl.</i> bone marrow)
UC-MSC	Mesenchymale Stromazellen aus der Nabelschnur (<i>engl.</i> umbilical cord)
AME	Epithelzellen aus der Amnionmembran (<i>engl.</i> Amniotic membrane)
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>engl.</i> peripheral blood mononuclear cells)

3.2 Methoden

3.2.1 Methoden der Isolation und Kultivierung von MSCs

3.2.1.1 Isolation von MSCs aus dem Gewebe

Zur Isolation von AM-MSCs wurde die jeweilige Amnionmembran (AM) kurz gewogen, mit PBS gewaschen und zerkleinert. Um zunächst die Epithelzellen (AME) herauszulösen, wurde das Gewebe in AM-Verdauung I für eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und die AMEs anschließend in Kulturmedium ausplattiert. Für die weitere Isolation der AM-MSCs wurde die Membran viermal mit kaltem HBSS gewaschen und danach durch 45-90 minütige Inkubation in AM-Verdauung II komplett aufgelöst. Die AM-MSCs wurden bei 300x g für 5 min sedimentiert, einmal mit HBSS gewaschen, in Kulturmedium aufgenommen und in einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² in Zellkulturflaschen ausgesät. Um UC-MSCs aus der

Nabelschnur (UC) zu isolieren, wurde diese gewogen, in kleinere Stücke zerschnitten und in UC-Verdaulösung I für 6 Std. bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension von den restlichen Nabelschnurstücken abgetrennt, die Zellen mit HBSS gewaschen und in Kulturmedium in einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² in Zellkulturflaschen ausgesät. Die Isolation von BM-MSCs aus dem Knochenmark (BM) erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Dazu wurden in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen 15 ml Ficoll-Paque® vorsichtig mit 35 ml Knochenmarkaspirat überschichtet und bei 445x g und 20 °C für 35 min zentrifugiert. Der Zentrifugationslauf wurde ohne Abbremsen beendet, um die ausgebildeten Schichten nicht zu vermischen. Die Fraktion mit den mononukleären Zellen wurde anschließend vorsichtig abgenommen und 2×10⁵ Zellen je 175 cm²-Flasche ausgesät.

3.2.1.2 Kultivierung von MSCs

Die MSCs wurden standardmäßig in MEM alpha-Eagle Medium (+ 10 % FKS, + 2 mM GlutaMAX™-I, + 100 U/ml PenStrep) im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Während der Expansion der Zellen wurde das Medium alle drei bis vier Tage durch frisches Medium ersetzt. Ab einer Dichte von 70-90 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert und in neue Kulturgefäße überführt. Dazu wurde das Kulturmedium mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden anschließend 7 ml (175 cm²-Flasche) bzw. 3 ml (75 cm²-Flasche) einer 0,05 %igen Trypsin/EDTA-Lösung hinzugegeben und die Flaschen für 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und gegebenenfalls durch leichtes Klopfen beschleunigt. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 13 ml (175 cm²-Flasche) bzw. 7 ml (75 cm²-Flasche) Kulturmedium gestoppt und die Zellen vorsichtig suspendiert. Danach wurden 10 µl der Zellsuspension entnommen und mit 10 µl Trypanblau (Lebend/Tot-Färbung) gemischt und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 min bei 300x g zentrifugiert, das Pellet in frischem Medium resuspendiert und die Zellen in einer Dichte von 1.000 Zellen/cm² in ein entsprechendes Gefäß ausgesät.

3.2.1.3 Einfrieren und Auftauen

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie unter 3.2.1.2 beschrieben geerntet und das Zellpellet vorsichtig in eiskaltem Kryomedium (FKS + 10 % DMSO) zu einer Konzentration von 1,0×10⁶ oder 0,5×10⁶ Zellen/ml resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 1 ml Aliquots in 1,5 ml-Kryogefäße pipettiert und diese anschließend in einen auf 4 °C vorgekühlten Kryocontainer

überführt. Dieser wurden über Nacht bei -80 °C gelagert. Danach wurden die Kryogefäße in flüssigen Stickstoff überführt und gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryogefäße aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und kurzzeitig bei 37 °C aufgewärmt. Die aufgetauten Zellen (1 ml) wurden vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen, in 9 ml Kulturmedium überführt und für 5 min bei 300x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellen in einer Dichte von 1.000 Zellen/cm² in ein entsprechendes Kulturgefäß ausgesät.

3.2.1.4 Stimulation von MSCs mit proinflammatorischen Zytokinen

In verschiedenen experimentellen Ansätzen wurde der Einfluss eines inflammatorischen Umfeldes auf das Expressionsverhalten sowie auf zelluläre Funktionen von MSCs untersucht. Dazu wurde durch die kombinierte Gabe der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ ein entsprechendes Umfeld simuliert. Abhängig von der jeweiligen Analysemethode wurden die Zellen in einer bestimmten Zellzahl in passende Gefäße ausgesät, nach Erreichen der erforderlichen Zelldichte das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit Stimulationsmedium (20 ng/ml TNF- α und IFN- γ) überschichtet. Je nach Test wurden die Zellen für 24 bzw. 48 Stunden stimuliert. Darüber hinaus wurden in kinetischen Ansätzen MSCs über mehrere Tage stimuliert und zu bestimmten Zeitpunkten eine Expressionsanalyse ausgewählter Faktoren durchgeführt (s. Abschnitt 3.2.4.1).

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Arbeiten zur Klonierung von CD38-Inserts in den retroviralen Transfervektor wurden von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Dr. P. M. Hülsmann (Roche Diagnostics) durchgeführt. Die Gewinnung der retroviralen Partikel sowie die anschließende Transduktion in MSCs erfolgte am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried und wurde von der Forschungsgruppe Prof. Dr. R. Fässler durchgeführt (s. Abschnitt 3.2.2.10).

3.2.2.1 Restriktionsverdau

Zur Expression von rekombinantem CD38 in MSCs wurden Gensynthesen von drei CD38-Konstrukten eingesetzt (s. Tabelle 1), zu denen neben der normalen Form von CD38, die beiden Varianten Δ 17-CD38 und E226L-CD38 zählen. Diese lagen jeweils als Insert in Plasmiden (pMA-RQ) vor und wurden zunächst über einen Restriktionsverdau, unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *SalI* aus diesen herausgeschnitten.

Ebenfalls über einen Restriktionsverdau mit *XhoI* und *SalI* erfolgte die Linearisierung des retroviralen Transfervektors pRetroQ-AcGFP-N1, der jeweils nur eine einzige Schnittstelle für beide Enzyme in seiner multiplen Klonierungsstelle aufweist, in die im weiteren Verlauf die jeweiligen CD38-Inserts kloniert werden sollten. Für die Verdaue wurden je Plasmid folgende Ansätze pipettiert (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Pipettierschema je Ansatz für den Restriktionsverdau zum Herausschneiden der jeweiligen CD38-Inserts aus den Plasmiden pMA-RQ (je 0,1 µg/µl) und zur Linearisierung des retroviralen Transfervektors pRetroQ-AcGFP-N1 (0,3 µg/µl).

Komponente	Konzentration im Test	Volumen
Restriktionspuffer (10x)	1x	2,7 µl
<i>XhoI</i> (20 U/µl)	10 U	0,5 µl
<i>SalI</i> (20 U/µl)	10 U	0,5 µl
Plasmid DNA	1 µg	variabel
ddH ₂ O	---	add 27 µl
Gesamtvolumen		27 µl

Für den Restriktionsverdau wurden die Ansätze zunächst für 60 min bei 37 °C inkubiert und die Restriktionsenzyme im Reaktionsgemisch anschließend für 15 min bei 65 °C inaktiviert. Danach wurden pro Ansatz 3 µl 10x DNA-Ladepuffer hinzugegeben.

3.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Aufreinigung der Produkte aus dem Restriktionsverdau wurden die Ansätze in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Zur Herstellung des Gels wurde 1 g Agarose MP in 100 ml 1x TAE-Puffer unter Erhitzen gelöst und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben. Das noch flüssige Gel wurde zum Aushärten in eine dafür vorgesehene Form gegeben, wo es für 45 min abkühlte. Zur Ausbildung der Taschen wurden Kämmen mit 1,0 bis 1,5 mm breiten Zähnen verwendet. Das erstarrte Gel wurde in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Gelkammer gelegt und der Kamm entfernt. Von den Proben aus dem Restriktionsverdau wurden 15 µl auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandard wurde der DNA Molecular Weight Marker III (Roche Applied Science) verwendet. Die Auftrennung im Gel erfolgte bei 100 V für 1 Std. Danach wurde das Gel unter UV-Licht auf einem UV-Transilluminator betrachtet und mit einem Skalpell die Banden der CD38-DNAs und die des retroviralen Transfervektors aus dem Gel herausgeschnitten und jeweils in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die in den Gelstückchen enthaltene DNA wurde anschließend unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit

(Qiagen) nach Herstellervorschrift isoliert. Die finale Elution der DNA erfolgte dabei unter sterilen Bedingungen in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0).

3.2.2.3 Alkalische Phosphatase-Reaktion

Um eine mögliche Religation des retroviralen Transfervektors vor der Klonierung der CD38-Inserts zu vermeiden, wurden die durch die Restriktion erzeugten 5'-Überhänge des linearisierten Vektors (7600 bp) mittels alkalischer Phosphatase (Roche Applied Science) dephosphoryliert. Dazu wurden 200 ng des Plasmids (entspricht 0,04 pmol DNA) und 0,04 U alkalische Phosphatase sowie 2 µl Dephosphorylierungspuffer (10x) gemischt und der Ansatz mit ddH₂O auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Umrechnung der Stoffmenge Plasmid-DNA von ng in pmol erfolgte nach folgender Formel:

$$[\text{dsDNA}] \text{ in pmol} = \frac{0,2 \mu\text{g DNA} \times 1515 \times 1 \text{ pmol}}{7600 \text{ bp} \times 1 \mu\text{g}} = 0,04 \text{ pmol}$$

Der Ansatz wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für 15 min bei 65 °C inaktiviert.

3.2.2.4 Ligation

Zur Klonierung der CD38-Inserts in den retroviralen Transfervektor wurde das Rapid DNA-Ligation Kit (Roche Applied Science), das eine T4 DNA Ligase enthält, verwendet. Dazu wurde der mitgelieferte 5x-Verdünnungspuffer mit ddH₂O zunächst auf die einfache Konzentration verdünnt. Pro Ansatz wurden 50 ng Transfervektor aus der Phosphatase-Reaktion sowie 150 ng eines jeweiligen CD38-Inserts aus dem Restriktionsverdau in den Verdünnungspuffer gegeben und mit diesem auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Anschließend wurde der Ansatz mit 10 µl T4 DNA-Ligationspuffer (2x) gemischt und 1 µl T4 DNA Ligase hinzugegeben. Für die Ligation wurde der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.2.5 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation von Plasmiden in *E. coli*-Zellen wurden XL10-Gold ultrakompetente Zellen (Stratagene) verwendet. 100 µl Zellaliquot wurden für 15 min auf Eis aufgetaut, 4 µl β-Mercaptoethanol hinzugegeben und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dabei alle 2 min vorsichtig geschwenkt. Zu den Zellen wurden 2 µl des zu transformierenden Plasmids aus der Ligasereaktion hinzugegeben und die Mischung für weitere 30 min auf Eis

inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C im Heizblock. Nach einer zweiminütigen Abkühlung auf Eis wurden 900 µl vorgewärmtes S.O.C Medium hinzugegeben und die Zellen für eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Von der Zellsuspension wurden 100 µl entnommen, auf eine vorgewärmte LB-Amp-Platte gegeben und mit einer Impföse ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

3.2.2.6 Plasmidpräparation

Mini-Plasmidpräparation

Um Plasmid-DNA eines Klons zu gewinnen, wurden je 5 ml LB-Amp-Medium in einem 14 ml-Kulturröhrchen mit einer der auf LB-Amp-Platten gewachsenen Kolonien angeimpft und für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Für die Plasmidpräparation im Minimaßstab wurden die Plasmide nach Herstellervorschrift mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit (Machery und Nagel) isoliert. Die finale Elution erfolgte mit 50 µl AE-Puffer (5 mM Tris/HCl, pH 8,5).

Maxi-Plasmidpräparation

Für die Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurden Maxi-Plasmidpräparationen angesetzt. Dazu wurden zunächst 5 ml LB-Amp-Medium mit einem Klon angeimpft und für 8 Std. bei 37 °C inkubiert. Danach wurde 1 ml dieser Starter-Kultur in einen mit 250 ml LB-Amp-Medium gefüllten Erlenmeyerkolben gegeben. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur bei 6.000x g für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit dem HiSpeed® Plasmid Purification Maxi-Kit (Qiagen) nach Herstellervorschrift isoliert. Die finale Elution der DNA erfolgte dabei unter sterilen Bedingungen in 1 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0).

3.2.2.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration erfolgte nach der in Abschnitt 3.2.3.1 beschriebenen Methode zur Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen unter Verwendung des NanoDrop 2000 UV-Vis Spektrophotometer (Thermo Scientific).

3.2.2.8 Kontrollverdau

Zur Verifizierung der erfolgreichen Ligation der Inserts in den Transfervektor wurden die Plasmide verschiedener Klone einem Kontrollverdau unterzogen. Dafür wurden diese wie unter 3.2.2.1 beschrieben mit Restriktionsendonukleasen behandelt, um das Insert wieder herauszuschneiden und so Fragmente einer definierten Größe zu erhalten. Die jeweiligen

Verdaue wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt, auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Dokumentation des Gels unter UV-Licht zur Identifizierung von Klonen mit positivem Fragmentmuster, jeweils bestehend aus einem großen (Backbone) und einem kleinen (Insert) Fragment.

3.2.2.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen sämtlicher Klone erfolgte durch die Firma Sequiserve (85591 Vaterstetten). Dazu wurden von Mini- bzw. Maxi-Plasmidpräparationen 5 µg Plasmid je Probe zur Sequenzierung gegeben.

3.2.2.10 Stabile Transduktion (Retrovirus)

Die Herstellung retroviraler Partikel zur Transduktion von MSCs erfolgte am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried (Forschungsgruppe Prof. Dr. R. Fässler). Zur Gewinnung der Viren wurden HEK293-Zellen in eine 10 cm-Petrischale eingesät und mit den beiden Verpackungsplasmiden pCMV-VSV-G und pCMV-Gag-Pol sowie dem retroviralen Transfervektor pRetroQ-AcGFP-N1, der jeweils eines der CD38-Inserts (s. Tabelle 1) und einen Puromycin-Selektionsmarker enthielt, mittels Calcium-Phosphat-Methode kotransfiziert. Zur Generierung CD38-negativer Zellen (mock-Kontrolle) wurde in einem zusätzlichen Ansatz pRetroQ-AcGFP-N1 als Leervektor verwendet. Nach 48 stündiger Inkubation erfolgte die Ernte der Virus enthaltenden Kulturüberstände, die zunächst filtriert (Porengröße 0,45 µM) und anschließend durch Zentrifugation für 2 Std. bei 68.000x g, gefolgt von einem zweiten Durchlauf für 2,5 Std. bei 59.000x g, aufkonzentriert wurden. Das Pellet wurde final in 200 µl 1x HBSS-Puffer aufgenommen.

Für die stabile Transduktion wurden UC-MSCs eines Spenders in einer frühen Passage verwendet, die eine sehr homogene Morphologie sowie kurze Verdopplungszeiten aufwies und mit konstanter Viabilität über mehrere Passagen kultiviert werden konnten. Pro Virusüberstand wurden die MSCs in je drei Wells einer 6-Well Platte in einer Dichte von 20.000 Zellen/Well ausgesät und für drei Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Bei etwa 50 % Konfluenz wurden die Zellen mit 1 ml DMEM + 10 % FKS je Well überschichtet und 8 µl Virusüberstand hinzugefügt. Nach 24 stündiger Inkubation wurden die Zellen erneut mit 8 µl Virusüberstand infiziert und für weitere sechs Stunden unter Kulturbedingungen inkubiert. Der Überstand wurde anschließend abgesaugt, die Zellen mehrmals mit frischem Kulturmedium gewaschen und mit diesem anschließend überschichtet. Nach der Transduktion wurden die Zellen für zwei mal zwei Tage in Selektionsmedium (1 µg/ml Puromycin) kultiviert, um CD38⁺-Zellen basierend auf ihrer Puromycin-Resistenz anzureichern. Im Anschluss an die

Puromycin-Selektion wurde die stabile CD38-Expression in den transgenen UC-MSCs mittels qPT-PCR auf mRNA-Ebene (s. Abschnitt 3.2.3) sowie per Durchflusszytometrie auf Proteinebene (s. Abschnitt 3.2.4) überprüft.

3.2.3 mRNA-Expressionsanalyse

3.2.3.1 Realtime-PCR (qRT-PCR)

Isolation zytoplasmatischer mRNA

Die Analyse der Genexpression in MSCs erfolgte über die Quantifizierung von mRNA mittels Realtime-PCR (qRT-PCR). Dazu wurde von jeder Probe stets die Gesamt-RNA isoliert und diese später in cDNA umgeschrieben. Für die Isolierung der RNA aus MSCs wurde das High Pure RNA Isolation Kit (Roche Applied Science) verwendet. Die Zellen wurden in einer 175 cm²-Flasche bis zu 90 %iger Konfluenz kultiviert und wie in 3.2.1.2 beschrieben geerntet. Die Zellsuspension wurde bei 300x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend in 5 ml PBS resuspendiert und nochmals bei 300x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 200 µl vorgekühltem PBS pro 2×10⁶ Zellen resuspendiert. Anschließend wurde die RNA nach Herstellervorschrift isoliert. Die finale Elution der RNA erfolgte mit 50 µl AE-Puffer (5 mM Tris/HCl, pH 8,5).

cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese aus der zuvor isolierten RNA wurde das Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science) verwendet. Pro cDNA-Synthesereaktion bzw. Probe wurden 10 µg isolierter Gesamt-RNA eingesetzt, die mit Random Hexamer Primern und Oligo (dT)₁₈ Primern zunächst zu einem Template-Primer-Mix zusammengegeben wurden (s. Tabelle 8). Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt und für die initiale Denaturierungsreaktion für 10 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf Eis gestellt und mit 35 µl cDNA-Synthese Mastermix (s. Tabelle 9) auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt.

Tabelle 8: Pipettierschema für den Template-Primer-Mix.

Komponente	Endkonzentration	Volumen
mRNA-Probe	10 µg	variabel
Random Hexamer Primer	60 µM	10 µl
Oligo (dT) ₁₈ Primer	2,5 µM	5 µl
H ₂ O, PCR-Qualität	-	add 65 µl
Endvolumen		65 µl

Tabelle 9: Pipettierschema für den cDNA-Synthese Mastermix

Komponente	Endkonzentration	Volumen
Reaktionspuffer (5x)	1x	20 µl
Protector RNase Inhibitor, 40 U/µl	20 U	2,5 µl
dNTPs, je 10 mM	je 1 mM	10 µl
Transcriptor Reverse Transcriptase, 20 U/µl	10 U	2,5 µl
Endvolumen		35 µl

Die cDNA-Synthese wurden in dem PCR-Gerät Mastercycler® pro (Eppendorf AG) durchgeführt und dazu das in Tabelle 10 aufgeführte Programm eingestellt.

Tabelle 10: Programm für die cDNA-Synthese.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Primeranlagerung	25 °C	10 min
Reverse Transkription	55 °C	30 min
Inaktivierung der reversen Transkriptase	85 °C	5 min
Kühlung	4 °C	unbegrenzt

Aufreinigung der cDNA

Um die cDNA aus den cDNA-Synthesereaktion aufzureinigen, wurde das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) verwendet. Dazu wurden die Proben aus der cDNA-Synthese in die dafür vorgesehen Säulen gegeben und die cDNA nach Herstellervorschrift aufgereinigt. Die finale Elution der cDNA erfolgte in 50 µl EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5).

Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration der aus den MSCs isolierten RNA und der nach der cDNA-Synthese aufgereinigten cDNA wurde das NanoDrop 2000 UV-Vis Spektrophotometer (Thermo Scientific) verwendet. Dazu wurden je RNA- bzw. cDNA-Probe 1,5 µl auf das Probenpodest des Gerätes pipettiert und das UV-Absorptionsspektrum aufgenommen. Als Referenz diente der jeweilige Elutionspuffer. Aus der Absorption A bei 260 nm und den jeweiligen Extinktionskoeffizienten ϵ lässt sich die Konzentration an RNA bzw. cDNA (dsDNA) nach folgenden Formeln berechnen:

$$[\text{RNA}] \text{ in ng/}\mu\text{l} = \epsilon \times A_{260} = 40 \text{ ng/}\mu\text{l} \times A_{260}$$

$$[\text{dsDNA}] \text{ in ng/}\mu\text{l} = \epsilon \times A_{260} = 50 \text{ ng/}\mu\text{l} \times A_{260}$$

Realtime-PCR (qRT-PCR)

Auswahl der Referenzgene: Für die Realtime-PCR-Analyse zur Bestimmung der Genexpression in MSCs musste zunächst ein Satz an validen Referenzgenen identifiziert werden, die auch unter verschiedenen Bedingungen stabil exprimiert werden und somit eine genaue relative Quantifizierung ermöglichen. So wurden MSCs aus den drei Quellen (BM, AM, UC) von jeweils unterschiedlichen Spendern in mehreren Passagen sowie unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine analysiert. Darüber hinaus wurde auch die Referenzgenexpression in humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) und humanen Fibroblasten der Haut (NHDF) getestet, um später die Genexpression von MSCs auch mit anderen Zellentypen vergleichen zu können. Für die Identifizierung stabil exprimierter Referenzgene wurde das RealTime ready Human Reference Gene Panel (Roche Applied Science) verwendet, das spezifische Primerpaare zur Analyse von 19 Referenzgenen enthält (s. Tabelle 3), die zusammen mit der Hydrolyse-Sonde (TaqMan) als getrocknete Pellets in einer 96-Well Mikrotiterplatte vorlagen.

Charakterisierung von MSCs: Um MSCs hinsichtlich ihrer Genexpression unter normalen Kulturbedingungen sowie nach 24 stündiger Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α und IFN- γ (s. Abschnitt 3.2.1.4) zu charakterisieren und insbesondere Faktoren zu identifizieren, die bei Zielfindungs- sowie Adhäsions- und Migrationsprozessen eine wichtige Rolle spielen, wurde die mRNA-Expression vorselektierter Gene verschiedener Gruppen analysiert. Dazu wurde ein individuell zusammengestelltes Custom-Panel verwendet, in dem spezifische Primerpaare zur Analyse von insgesamt 371 Genen in einer 384-Well Mikrotiterplatten vorlagen (s. Tabelle 4 und Anhang Tabelle 23, Seite 130 ff.).

Sowohl für die Referenzgenanalyse (Reference Gene Panel) als auch für die Expressionsanalyse der 371 Gene (Custom-Panel) wurde von jeder Probe die aufgereinigte cDNA zunächst auf 1 ng/ μ l vorverdünnt. Je qPCR-Test wurden 2 ng cDNA eingesetzt und der LightCycler® 480 Probes Master, der Puffer und Nukleotide enthält, sowie ddH₂O hinzugefügt (s. Tabelle 11).

Tabelle 11: Mastermixe für die qRT-PCR-Analyse zur Identifizierung valider Referenzgene (Reference Gene Panel – 96-Well) und für die Expressionsanalyse von 371 Genen (Custom Panel – 384-Well) in MSCs.

Komponente	Endkonzentration	Volumen (96-Well / 384-Well)
cDNA (1 ng/ μ l)	2 ng/Test	2 μ l / 2 μ l
LightCycler 480 Probes Master (2x)	1x	10 μ l / 5 μ l
H ₂ O, PCR-Reinheit		8 μ l / 3 μ l
Endvolumen		20 μl / 10 μl

Von dem Gemisch wurden je 20 µl (96-Well) bzw. 10 µl (384-Well) pro Well in die Mikrotiterplatten mit den spezifischen Primerpaaren pipettiert. Die Platten wurden anschließend in das LightCycler® 480 Instrument II gegeben und das qPCR-Programm aus Tabelle 12 durchgeführt.

Tabelle 12: qRT-PCR-Programm.

Reaktionsschritt		Temperatur	Zeit
Vorinkubation		95 °C	10 min
Denaturierung		95 °C	10 sek
Primeranlagerung	45 Zyklen	60 °C	30 sek
Polymerasereaktion		72 °C	1 sek
Kühlung		40 °C	unbegrenzt

3.2.4 Methoden der Proteinexpressionsanalyse

3.2.4.1 Durchflusszytometrie (FACS)

Allgemeine Durchführung

Die Expression auf der Zelloberfläche von MSCs lokalisierter Faktoren wurden mittels Durchflusszytometrie (FACS) analysiert. Dazu wurden MSCs zunächst wie oben beschrieben (s. Abschnitt 3.2.1.2) durch Trypsinisieren geerntet und mit einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Die Zellsuspension wurde bei 300x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in FACS-Puffer (PBS + 1 % FKS) resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden pro Färbung etwa 1×10^5 Zellen in ein Well einer Mikrotiterplatte abgelegt. Diese wurden bei 400x g und 4 °C für 4 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die spezifischen Primärantikörper und die jeweils korrespondierenden Isotypkontrollen wurden nach Herstellervorschrift in FACS-Puffer verdünnt und die Zellen in 100 µl Antikörperlösung resuspendiert. Die Zellen wurden im Dunkeln bei 4 °C für 30 min inkubiert und anschließend dreimal mit FACS-Puffer gewaschen. Bei jedem Waschschrift wurden die Zellen zunächst zentrifugiert (400x g, 4 °C, 4 min), der Überstand verworfen und die Zellen in 200 µl kaltem FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen, die mit nichtmarkierten Primärantikörpern behandelt wurden, wurden danach in 100 µl Sekundärantikörper-Lösung bzw. Sekundärkonjugat-Lösung aufgenommen und im Dunkeln bei 4 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit kaltem FACS-Puffer gewaschen, das Zellpellet abschließend in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und die Proben im BD FACSCanto™ II Durchflusszytometer (BD Biosciences) analysiert. Dazu wurden die

Zellsuspensionen in 5 ml-FACS-Röhrchen überführt und in das Durchflusszytometer eingespannt.

Bei der Durchflusszytometrie gelangen die sich in Suspension befindenden Zellen über einen Flüssigkeitsstrom in eine feine Kapillare des Durchflusszytometers, in der sie einzeln von mehreren Lasern erfasst und die emittierten Signale von verschiedenen Detektoren gemessen werden. Somit können Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften, hervorgerufen durch die Bindung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern, als auch ihrer morphologischen Parameter unterschieden werden. Durch das Vorwärtstreulicht (Forward scatter - FSC) wird die Größe bzw. das Volumen einer Zelle und durch das Seitwärtstreulicht (Sideward scatter - SSC) die Granularität einer Zelle, die beispielsweise durch Mitochondrien, den Zellkern oder andere subzelluläre Strukturen hervorgerufen wird, gemessen. Die Intensitäten beider Parameter werden typischerweise als Fläche (Area) unter dem Signal angegeben (SSC-A bzw. FSC-A) und in einem Dot-Plot gegeneinander aufgetragen. Durch Anlegen eines Analysefensters (Gate) werden nur die Zellen (Dots) als eigentliche Zellpopulation definiert, die einer gewissen Größe und Komplexität entsprechen. Je Probe wurden 10.000 Zellen innerhalb des Analysefensters im Dot-Plot detektiert und das Fluoreszenzsignal der jeweiligen Faktoren gemessen. Dabei wurde zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe FITC und PE ein blauer Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm verwendet, während für die Anregung der Farbstoffe APC, AlexaFluor647 und DyLight649 ein roter Laser mit einer Anregungswellenlänge von 635 nm eingesetzt wurde.

Da die Emissionsspektren einiger Fluoreszenzfarbstoffe in den Detektionskanal anderer Farbstoffe hineinstrahlen, wurde im Falle von Mehrfachfärbungen einer Probe durch rechnerische Kompensation der jeweilige Anteil, den ein Farbstoff in den Kanal des anderen hineinstrahlt, abgezogen. Für die Auswertung wurde die Verteilung des Fluoreszenzsignals eines Faktors in einem Histogramm dargestellt und dessen Intensität als geometrischer Mittelwert (GeoMean) angegeben. Als Referenz dienten Zellen, die jeweils mit einer entsprechenden Isotypkontrolle behandelt wurden. Der GeoMean-Wert eines zu analysierenden Faktors wurde anschließend ins Verhältnis zum GeoMean der entsprechenden Isotypkontrolle gesetzt (Signal-Rausch-Verhältnis) und so der relative GeoMean gebildet. Für die Einstufung der Expressionsintensität wurde anschließend die Bewertung aus Tabelle 13 zugrunde gelegt. Die Auswertung der Durchflusszytometrie-Daten erfolgte mittels der Analyse-Software FlowJo (Tree Star).

Tabelle 13: Bewertung der Expressionsintensität anhand des Verhältnisses zwischen dem GeoMean des zu analysierenden Faktors und der korrespondierenden Isotypkontrolle (Signal-Rausch-Verhältnis).

Relativer GeoMean	Expressionsintensität
1,0 – 1,5	- negativ
1,5 – 2,0	(+) schwach positiv
2,0 – 10	+ positiv
10 – 30	++ stark positiv
> 30	+++ sehr stark positiv

In einer Studie zur Charakterisierung von MSCs aus unterschiedlichen Geweben hinsichtlich der Expression klassischer Adhäsions- und Migrationsfaktoren, wie Integrin-Untereinheiten, Selektinen, Integrin- und Selektin-Liganden sowie Chemokinrezeptoren, wurden für die durchflusszytometrische Analyse die Antikörper und Konjugate sowie die korrespondierenden Isotypkontrollen aus der Tabelle 5 eingesetzt. Dabei sollten mögliche Einflüsse vom Ursprungsgewebe, der Spendervariabilität sowie der Dauer der Kultivierung auf diese Faktoren untersucht und ferner der Einfluss der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ (s. Abschnitt 3.2.1.4) auf deren Expressionsprofil bestimmt werden.

Kinetische Expressionsanalyse

In Form kinetischer Analyseansätze wurde die Expression ausgewählter Faktoren in MSCs während mehrtägiger Stimulation mit TNF- α und IFN- γ (s. Abschnitt 3.2.1.4) verfolgt. Dazu wurden Zellen aller drei Gewebe abhängig von der Anzahl der Analysezeitpunkte in mehrere 10 cm-Zellkulturschalen eingesät (s. Tabelle 14). Zu gegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen trypsinisiert und wie oben beschrieben die Expression der Faktoren mittels Durchflusszytometrie analysiert. Bei Zellen, die über mehrere Tage stimuliert wurden, wurde das Medium alle zwei Tage durch frisches Stimulationsmedium ersetzt.

Tabelle 14: Kinetische Expressionsanalyse ausgewählter Faktoren während der Stimulation von MSCs mit TNF- α und IFN- γ mittels Durchflusszytometrie.

Faktor	Analysezeitpunkte [Std.]	Antikörper (Klon)
CD49d (Integrin- α 4)	0, 16, 24, 40, 48, 72	anti-CD49 (9F10)
VCAM-1	0, 5, 16, 24, 40, 48, 72	anti-VCAM FITC (51-10C9)
CD38	0, 5, 16, 24, 48, 72, 96, 120	anti-CD38 PE (HIT-2)
CD157 (BST-1)	0, 5, 16, 24, 48	anti-CD157 (RF3)

Zur Auswertung der Expression der Faktoren CD49d, VCAM-1 und CD157 wurde jeweils der relative GeoMean bestimmt (siehe oben). Davon abweichend wurde für die Analyse der CD38-Expression der Anteil CD38-positiver Zellen während der Stimulation ermittelt.

3.2.4.2 Immunzytochemie

Herstellung einer 4 %igen Paraformaldehydlösung

Zur Herstellung einer 4 %igen Paraformaldehydlösung mit 120 mM Glukose wurden 80 ml PBS unter Rühren auf 60 °C erwärmt, 4 g Paraformaldehyd hinzugegeben und solange tropfenweise 1 M NaOH hinzugefügt, bis die Lösung klar wurde. Anschließend wurden 2,16 g D(+)-Glukose zur Lösung gegeben, diese mit PBS auf 100 ml aufgefüllt und mit 1 M HCl der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Immunfärbung

Für die Expressionsanalyse mittels Immunzytochemie wurden sterile 18 mm-Deckgläschen in die Wells einer 12-Well Mikrotiterplatte gelegt. Zur Beschichtung der Deckgläschen wurden je 400 µl einer 20 µg/ml Fibronectin-Lösung in die Wells pipettiert und die Platte für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Fibronectin-Lösung abgesaugt und die Deckgläschen für 15 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die zu analysierenden Zellen wurden wie unter 3.2.1.2 beschrieben geerntet, in einer Dichte von 10.000 Zellen pro Well auf die beschichteten Deckgläschen ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit vorgewärmtem PBS gewaschen und anschließend in der 4 %igen Paraformaldehydlösung bei 37 °C für 20 min fixiert. Die Deckgläschen mit den fixierten Zellen wurden zunächst zweimal mit 200 µl PBS gewaschen und danach für 60 min bei Raumtemperatur in Blockierlösung (PBS + 3 % BSA + 0,1 % Triton X-100) blockiert. Anschließend wurde der spezifische Primärantikörper nach Herstellervorschrift in Blockierlösung verdünnt, die Zellen für 30-60 Minuten bei Raumtemperatur in der Antikörperlösung inkubiert und danach dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls nach Herstellervorschrift in Blockierlösung verdünnt und die Zellen für 30-60 min bei Raumtemperatur in der Antikörperlösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Zum Eindeckeln der Proben wurden die Deckgläschen auf der Seite mit den Zellen mit Fluoroshield + DAPI (Sigma Aldrich) benetzt und auf Objektträger gelegt. Für die Analyse wurde das Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z.1 (Carl Zeiss) verwendet.

3.2.5 Analyse von CD38 vermittelten Funktionen in MSCs

3.2.5.1 Enzymaktivitätstest

Die extrazelluläre Domäne des Ektoenzym CD38 besitzt eine ADP-Ribosylzyklaseaktivität, die die Umsetzung von NAD^+ in cADPR katalysiert. Die Aktivität CD38 exprimierender Zellen kann mittels des von Graeff et al. etablierten Enzymaktivitätstests bestimmt werden, bei dem als Substrat der Enzymreaktion das in seiner Struktur zu NAD^+ analoge NGD^+ verwendet wird (Graeff et al. 1994). Anders als NAD^+ , das von ADP-Ribosylzyklasen in cADPR konvertiert wird, wird NGD^+ in das weitaus stabilere Fluoreszenzprodukt cGDPR umgewandelt, welches sich bei einer Wellenlänge von 300 nm anregen und dessen emittierte Fluoreszenz sich bei einer Wellenlänge von 410 nm detektieren lässt. Die Bildung von cGDPR kann somit photometrisch quantifiziert und daraus indirekt die ADP-Ribosylzyklaseaktivität bestimmt werden.

Die Messung der ADP-Ribosylzyklaseaktivität in MSCs wurde mit Zellhomogenaten von Zellen aller drei Ursprungsgewebe durchgeführt. Zur Gewinnung der Homogenate wurden die jeweiligen MSCs zunächst in einer 175 cm²-Zellkulturflasche bis zu 90-95 %iger Konfluenz kultiviert, der Kulturüberstand abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 12 ml vorgekühltes PBS zu den Zellen gegeben, diese auf Eis mit einem Zelleschaber abgelöst und anschließend in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Zellen wurden bei 1000x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde das Zellpellet zunächst in 200 µl Homogenisierungspuffer unter Verwendung einer 200 µl-Pipettenspitze durch harsches Pipettieren vorhomogenisiert. Durch Zugabe weiterer 1,3 ml Homogenisierungspuffer und unter Verwendung einer 1 ml-Pipettenspitze wurde die Suspension nochmals feiner homogenisiert. Um zu verifizieren, dass die Enzymaktivität auf der Zellmembran lokalisiert ist und die Reaktion nicht durch die bei der Homogenisierung freigesetzten Enzyme des Zytoplasmas katalysiert wird, wurden am Beispiel von stimulierten BM-MSCs und bei den CD38-transgenen UC-MSCs die jeweiligen Zellhomogenate in eine Membranfraktion sowie zytosolische Fraktion aufgetrennt. Dazu wurden die Homogenate bei 17.000x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, der Überstand (zytosolische Fraktion) anschließend vorsichtig abgenommen und in ein separates Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet (Membranfraktion) wurde erneut in 1,5 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert.

Die Messung der Enzymaktivität in den Zellhomogenaten bzw. Fraktionen erfolgte in 96-Well Mikrotiterplatten. Das Substrat NGD^+ wurde in ddH₂O gelöst und mit Homogenisierungspuffer eine Verdünnungsreihe mit sechs Konzentrationen (0, 12,5, 25, 50, 100 und 200 µM) hergestellt. Pro Well wurden jeweils 50 µl einer NGD^+ -Verdünnung in 2x-

konzentrierter Form vorgelegt und mit 50 μl Homogenat auf ein Endvolumen von 100 μl aufgefüllt. Die Mikrotiterplatten wurden bis zu 60 min bei 37 °C inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten das Fluoreszenzsignal mit einem Mikrotiterplatten-Reader (Tecan) detektiert. Die Messung erfolgte in technischen Quadruplikaten je NGD^+ -Konzentration. Als Referenz wurden die NGD^+ -Verdünnungen ohne Zugabe von Homogenat verwendet.

3.2.5.2 Ca²⁺-Flux-Test

Es wird davon ausgegangen, dass aus geschädigtem Gewebe freigesetztes NAD^+ einen durch CD38 vermittelten Ca^{2+} -Einstrom (Ca^{2+} -Flux) in Zellen auslösen kann, der potentiell eine Veränderung im Adhäsionsverhalten von Immunzellen nach sich zieht. Mittels so genannter Ca^{2+} -Flux-Tests sollte überprüft werden, ob durch NAD^+ auch in MSCs ein Ca^{2+} -Einstrom induziert werden kann, der in Abhängigkeit von CD38 vermittelt wird. Dazu sollten zunächst MSCs aus allen drei Geweben dahingehend analysiert werden, inwieweit sich unstimulierte von 48 Stunden stimulierten Zellen in den Signalen eines NAD^+ -induzierten Ca^{2+} -Fluxes unterscheiden. Darüber hinaus sollte der Einsatz transgener UC-MSCs, die CD38 bzw. die Varianten überexprimierten (s. Abschnitt 3.2.2.10), Aufschluss darüber geben, inwieweit CD38 am NAD^+ -induzierten Ca^{2+} -Flux beteiligt ist und welche strukturellen Merkmale von CD38 dazu erforderlich sind. Parallel zu NAD^+ wurde zugleich überprüft, ob durch den Einsatz von ADPR und cADPR, den Produkten der CD38-Enzymreaktion, ebenfalls ein Ca^{2+} -Flux induziert werden kann, um so zu analysieren, ob CD38 auch als Transporter für die an der Reaktion beteiligten Substanzen ins Zellinnere von MSCs fungiert. Ferner sollte ermittelt werden, ob die Ca^{2+} -Ionen, die ins Zytoplasma der Zellen strömen, primär aus intrazellulären Speichern oder aus dem extrazellulären Milieu mobilisiert werden.

Zur Quantifizierung des Ca^{2+} -Gehaltes im Zytoplasma wurde der Ca^{2+} -Indikator Fluo-4 Direct™ (Life Technologies) eingesetzt. Hierbei handelt es sich um den zunächst nicht-fluoreszierenden Acetoxymethylester Fluo-4 AM, ein Derivat des Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-4, das aufgrund membrangängiger Eigenschaften über die Plasmamembran ins Zytoplasma lebender Zellen gelangt und dort durch Esterasen in aktives Fluo-4 umgesetzt wird, welches in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen fluoresziert. Für die Messung des durch einströmende Ca^{2+} -Ionen induzierten Fluoreszenzsignals wurde das FLIPR® Tetra HTC Screening System (*engl.* Fluorometric Imaging Plate Reader) (Molecular Devices) verwendet, das eine simultane Detektion auf 96 Positionen ermöglicht. Die dabei eingesetzten 96-Well Mikrotiterplatten wurden mit 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fibronectin in PBS für 60 min bei Raumtemperatur beschichtet. Anschließend wurden die MSCs wie unter 3.2.1.2 beschrieben geerntet und in einer Dichte von 5.000 Zellen/Well in die beschichteten Platten eingesät und diese über Nacht bei 37 °C und 5 %

CO₂ im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Kulturüberstand abgesaugt und durch frisches Kulturmedium oder Stimulationsmedium ersetzt und die Zellen für weitere 48 Stunden inkubiert, um für den Test die maximale CD38-Expression zu erzielen.

Im Falle der transgenen UC-MSCs, die bereits CD38 bzw. die Varianten Δ 17-CD38 und E226L-CD38 exprimierten, wurden die Zellen am Tag vor dem Test in einer Dichte von 7.500 Zellen/Well in die beschichteten Platten eingesät und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Herstellung der Färbelösung wurde das in Calcium-Testpuffer gelöste Fluo-4 Direct™ im Verhältnis 1:1 mit Medium gemischt. Anschließend wurde für die Beladung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff der Kulturüberstand abgenommen, die Zellen pro Well mit je 180 μ l Färbelösung überschichtet und für 60 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Substanzen NAD⁺, cADPR und ADPR wurden jeweils in ddH₂O gelöst und mit PBS (+ Ca²⁺, Mg²⁺) zunächst vorverdünnt (10x konzentriert). Von den Vorverdünnungen wurden jeweils 100 μ l pro Well für 8x-Bestimmungen in einer 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt und diese im FLIPR-System auf der Position „Source plate“ arretiert. Die mit den Zellen vorbereitete Mikrotiterplatte wurde auf die Position „Reading plate“ gestellt und die Messung gestartet. Zum Auslösen des Ca²⁺-Einstroms wurden aus der „Source plate“ mittels des 96er-Pipettierkopfes je 20 μ l pro Well in die Platte mit den mit 180 μ l Färbelösung überschichteten Zellen pipettiert und die Substanzen so auf die für den Test vorgesehenen Konzentrationen gebracht. Das Fluoreszenzsignal wurde alle 0,5 Sekunden detektiert und über 120 Sekunden verfolgt.

Um zu ermitteln, ob die Ca²⁺-Ionen überwiegend aus intrazellulären Speichern oder aus dem extrazellulären Milieu mobilisiert werden, wurden MSCs aller drei Gewebe verwendet und dabei jeweils unstimulierte mit 48 Stunden stimulierten Zellen verglichen. Zur Induktion des Ca²⁺-Signals wurden 200 μ M NAD⁺ eingesetzt. Die Zellen wurden wie oben beschrieben vorbereitet und für die Beladung mit Fluo-4 mit 170 μ l Färbelösung pro Well überschichtet und für 60 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Kurz vor der Zugabe von NAD⁺ wurden 10 μ l einer 20 mM EDTA-Lösung pro Well hinzugefügt, die Platte umgehend in das Gerät gestellt und die Messung gestartet. Zusätzlich wurde in einem weiteren Ansatz der Test mit Ca²⁺-freiem Puffer durchgeführt. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben für 60 min mit Fluo-4 beladen, anschließend einmal mit 200 μ l/Well Calcium-Waschpuffer (- Ca²⁺, Mg²⁺) gewaschen und mit 180 μ l/Well desselben Puffers überschichtet. Das zum Auslösen des Ca²⁺-Signals verwendete NAD⁺ wurde in PBS (- Ca²⁺, Mg²⁺) gelöst und in einer Konzentration von 200 μ M im Test eingesetzt.

3.2.6 Analyse des Migrationsverhaltens von MSCs

3.2.6.1 Migrationstest

Um die Rolle von CD38 bei der Vermittlung von Migrationsprozessen in Gegenwart von NAD^+ zu analysieren, wurden Migrationstests (Transmigration) durchgeführt. Dazu wurde das RTCA DP Instrument (ACEA Biosciences) verwendet, das eine kontinuierliche Detektion migrierender Zellen erlaubt und so eine minutengenaue sowie exakte Quantifizierung der Migration von MSCs ermöglicht. In diesem System kommen so genannte Zellinvasions- und Migrations-Platten (CIM-Platten) zum Einsatz, die jeweils aus einer oberen und einer unteren Kammer zusammengesetzt sind (s. Abbildung 9). Die obere Kammer des Systems besteht aus 16 Wells, an deren Boden sich jeweils eine Polyethylenterephthalat (PET)-Membran befindet, die 8 μM große Poren besitzt. Die zu den Wells der oberen Kammer korrespondierenden Wells der unteren Kammer dienen als Medien- bzw. Signalstoffreservoir. Über das feine Netzwerk aus Goldelektroden an der Unterseite der PET-Membranen können die aus der oberen in die untere Kammer transmigrierenden Zellen detektiert werden. Der dabei hervorgerufene Widerstand wird als Impedanz bezeichnet und ist proportional zur Anzahl migrierter Zellen. Für die Migrationstests wurden sowohl die Oberseiten als auch die mit den Goldelektroden bedeckten Unterseiten der PET-Membranen stets mit Fibronectin beschichtet.

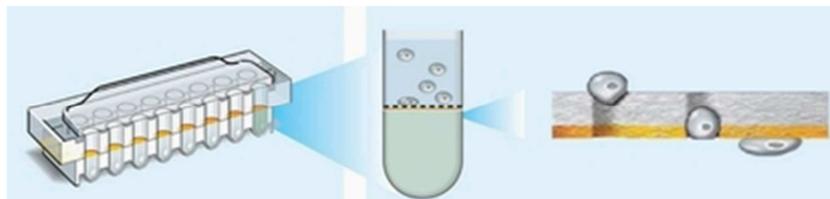


Abbildung 9: CIM-Platte für den Migrationstest: Jede Platte besteht aus 16 Wells, die jeweils aus einer oberen und einer unteren Kammer aufgebaut und durch eine feinporige Membran (8 μM) getrennt sind. An der Unterseite der Membran befindet sich ein Netz aus Goldelektroden, über das migrierte Zellen detektiert werden. www.aceabio.com

Um eine mögliche Rolle von CD38 für die Migration von MSCs in Gegenwart von NAD^+ zu analysieren, wurden die transgenen UC-MSCs (CD38^+ , $\Delta 17\text{-CD38}^+$, E226L-CD38^+) sowie die entsprechende mock-Kontrolle verwendet. Die Zellen wurden dazu über Nacht in Hungermedium ($\alpha\text{-MEM} + 0,5\% \text{ FKS}$) kultiviert, am nächsten Tag wie unter 3.2.1.2 beschrieben geerntet und das Zellpellet in Hungermedium resuspendiert. Mittels einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und die Konzentration der Zellsuspension auf 2×10^5 Zellen pro ml eingestellt. Um per se einen Migrationsdruck von den oberen in die

unteren Kammern der CIM-Platten zu erzeugen, wurden zur Ausbildung eines Serumgradienten jeweils 160 μ l Kulturmedium (alpha-MEM + 10 % FKS) in die Wells der unteren Kammern vorgelegt sowie je 30 μ l Hungermedium (alpha-MEM + 0,5 % FKS) in die Wells der oberen Kammern gefüllt. Anschließend wurden die Kammern zusammengefügt, die CIM-Platten ins Messgerät gestellt und zunächst das Hintergrundsignal gemessen. Von den einzelnen Zellsuspensionen wurden im Anschluss jeweils 100 μ l in die Wells der oberen Kammern pipettiert, so dass 20.000 Zellen pro Well eingesetzt wurden. Um die Zellen sedimentieren zu lassen, wurden die Platten für weitere 20 min im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden je 100 μ l NAD^+ -Lösung in zwei Konzentrationen (200 μ M, 20 μ M) sowie Puffer als Referenz zu den Zellen pipettiert, die Platten ins Messgerät eingespannt und die Messung gestartet. Die Analyse erfolgte dabei in 4x-Bestimmungen pro Konzentration NAD^+ . Die an den Goldelektroden der Membranunterseite durch migrierte Zellen erzeugte Impedanz wurde alle fünf Minuten detektiert und über einen Zeitraum von insgesamt 12 Stunden aufgezeichnet.

In einem zweiten Ansatz wurde der Einfluss von ADPR auf das Migrationsverhalten getestet. Dazu wurde wie oben beschrieben verfahren und anstellen von NAD^+ ADPR zu den Zellen gegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Expressionsprofilierung klassischer Adhäsions- und Migrationsfaktoren in MSCs

4.1.1 Charakterisierung von MSCs unter Normalbedingungen

Die Prozesse, die bei der Rekrutierung von Leukozyten in entzündetes Gewebe ablaufen und als Leukozyten-Adhäsionskaskade, einer Abfolge abgestimmter Rezeptor-Liganden-Interaktionen, zusammengefasst werden, sowie viele der daran beteiligten Moleküle konnten identifiziert und umfangreich charakterisiert werden (Schmidt et al. 2013). Demgegenüber sind die Mechanismen, die einer potentiell aktiven Zielfindung bzw. einer Rekrutierung von MSCs in geschädigte Gewebe zugrunde liegen, bisher nur unzureichend verstanden und nur wenige beteiligte Faktoren bekannt (Sohni & Verfaillie 2013). Während Chemokinrezeptoren eine wichtige Rolle für die Chemotaxis und Aktivierung (z.B. Änderung der Integrinaffinität) von Zellen spielen, ist für das so genannte Rollen die Gruppe der Selektine von zentraler Bedeutung. Integrine wiederum tragen zu starken Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen und daraus resultierend zu einer starken Zelladhäsion bei.

Davon ausgehend, dass die an dieser Kaskade beteiligten Moleküle potentiell auch in anderen Zelltypen diese Prozesse vermitteln können und um einen möglichst detaillierten Überblick über das Expressionsprofil zu erhalten, wurden MSCs aus drei verschiedenen Geweben (BM, AM, UC) hinsichtlich der Expression dieser Faktoren per Durchflusszytometrie untersucht. Um Aufschluss darüber zu erhalten, wie hoch die Spendervariabilität ist, wurden pro MSC-Quelle jeweils drei Spender analysiert. Verfeinert wurde die Analyse dahingehend, dass jeweils eine frühe (P2), eine mittlere (P4) und eine späte Passage (P6) gemessen wurde, um aufzuklären, ob die Dauer der Kultivierung und somit die Anzahl an Zellteilungen Einfluss auf das Expressionsprofil nimmt. Die Charakterisierungsstudie umfasste dabei insgesamt 15 Integrin-Untereinheiten (sieben α -Untereinheiten, acht β -Untereinheiten), drei Chemokinrezeptoren (CXCR4, CCR2, CCR7) und drei weitere Adhäsionsfaktoren, zu denen ein Selektin (L-Selektin), ein Selektin-Ligand (PSGL-1) und ein Integrin-Ligand (VCAM-1) zählten. In Tabelle 15 sind die Ergebnisse dieser Studie zusammengefasst. Für jeden Faktor geben die Werte die durchschnittliche Expression von drei Spendern der jeweiligen MSC-Quelle in der entsprechenden Passage an. Die gesamte Liste aller Messwerte (s. Anhang Tabelle 24, Seite 148 ff.) sowie Positivkontrollen (s. Anhang Abbildung 39, Seite 150) sind im Anhang zusammengestellt.

Tabelle 15: Expressionsanalyse von Adhäsionsfaktoren in MSCs unter Normalbedingungen mittels Durchflusszytometrie. Angegeben ist die Fluoreszenzintensität als relativer GeoMean im Verhältnis zur Isotypkontrolle: > 30 = + + +, 10-30 = + +, 2-10 = +, 1,5-2 = (+), < 1,5 = -. Die Integrin-Untereinheiten sind mit dem jeweiligen Namen des Gens abgekürzt (Einzelmesswerte s. Anhang Tabelle 24, Seite 148 ff).

	BM-MSC			AM-MSC			UC-MSC		
	P2	P4	P6	P2	P4	P6	P2	P4	P6
ITGA1	+	+	++	++	++	++	++	+	++
ITGA2	+	+	+	++	+	+	+	++	++
ITGA3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++
ITGA4	(+)	+	+	+	+	+	++	++	++
ITGA5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ITGA6	(+)	+	+	+	(+)	+	+	+	+
ITGAV	++	++	++	++	++	++	++	+	++
ITGB1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ITGB2	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-
ITGB3	++	++	++	+++	++	++	+++	+++	+++
ITGB4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ITGB5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ITGB6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ITGB7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ITGB8	+	(+)	+	-	-	-	-	-	-
CXCR4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCR2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCR7	(+)	(+)	-	+	+	+	+	+	+
VCAM	-	-	(+)	-	(+)	(+)	-	-	-
PSGL-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sele	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4.1.1.1 Expression der Integrin-Untereinheiten

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass MSCs aus den drei unterschiedlichen Quellen jeweils hohe und konstante Expressionsintensitäten der Integrin-Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 5$, αV , $\beta 1$ sowie $\beta 3$ aufweisen und negativ für die Untereinheiten $\beta 4$, $\beta 6$ und $\beta 7$ sind (s. Tabelle 15). Im Vergleich dazu wurden schwächere bis mittlere Expressionsintensitäten bei den Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 6$ und $\beta 5$ detektiert. Ausnahmen bilden die beiden Untereinheiten $\beta 2$ und $\beta 8$, die in AM- sowie UC-MSCs nicht exprimiert wurden, jedoch unregelmäßig auf

BM-MSCs einiger Spender nachgewiesen werden konnten (s. Anhang Tabelle 24, Seite 148 ff.). Tendenziell besitzen AM- und UC-MSCs ähnlichere Profile und zeigen im Vergleich mit BM-MSCs stärkere Expressionsintensitäten vieler Integrine. Es ist beschrieben, dass sich MSCs aus perinatalem Gewebe, wie AM- und UC-MSCs eher entsprechen und sich in ihrer Genexpression von MSCs aus dem Knochenmark unterscheiden (Wegmeyer et al. 2013). Insgesamt konnten keine großen Unterschiede zwischen den einzelnen Passagen und somit kein nennenswerter Einfluss der Kulturdauer auf die Integrinexpression in MSCs festgestellt werden. Lediglich in UC-MSCs wurde ein signifikanter Anstieg der $\alpha 3$ -Expression in höheren Passagen beobachtet (P2/P4 $p \leq 0,02$).

Basierend auf den Expressionsdaten könnten potentiell mehrere Integrinrezeptoren auf der Zelloberfläche von MSCs vorhanden sein. Die beiden Untereinheiten $\alpha 1$ (CD49a) und $\alpha 2$ (CD49b) bilden in der Regel mit der Untereinheit $\beta 1$ die Dimere $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$, die beide als Kollagen- und Lamininrezeptoren fungieren und auch als VLA-1 bzw. VLA-2 (*engl.* Very late antigen) bezeichnet werden. Bei BM- und AM-MSCs war die Expressionsintensität der $\alpha 1$ -Untereinheit stets höher als die der $\alpha 2$ -Untereinheit (BM $p \leq 0,005$; AM $p \leq 0,01$), während in UC-MSCs vergleichbare Intensitäten auftraten. Integrin- $\alpha 3$ (CD49c), das ebenfalls durch Dimerisierung mit $\beta 1$ den Laminin- und Thrombospondinrezeptor $\alpha 3\beta 1$ (VLA-3) bildet, wurde in allen MSC-Typen konstant auf sehr hohem Niveau exprimiert. Auch im Falle der Untereinheit Integrin- $\alpha 5$ (CD49e), die mit $\beta 1$ zum Rezeptor $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5) dimerisiert, zeigten alle MSC-Typen eine starke Expression. Der Rezeptor $\alpha 5\beta 1$ bindet Liganden, die so genannte RGD-Motive (Arg-Gly-Asp) tragen und fungiert unter anderem als Rezeptor für Fibronectin. Die Untereinheit αV (CD51), die mit insgesamt fünf anderen β -Untereinheiten RGD-Motiv-bindende Rezeptoren bilden kann, zeigte bei allen MSCs-Typen eine gleichmäßig starke Expression auf der Zelloberfläche. Demgegenüber ließ sich bei Integrin- $\alpha 6$ (CD49f), das mit den Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 4$ zu den Lamininrezeptoren $\alpha 6\beta 1$ (VLA-6) bzw. $\alpha 6\beta 4$ dimerisieren kann, in BM-MSCs nur eine schwache Expression detektieren, während AM- und UC-MSCs eine stärkere, wenngleich auch nicht sehr hohe Expression zeigten. Dabei war der Unterschied zwischen BM- und UC-MSCs signifikant ($p \leq 0,001$).

Deutlich hervorzuheben ist die Untereinheit Integrin- $\alpha 4$ (CD49d). Sie ist Teil des Integrin-Dimers bzw. Rezeptors $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4), der über die Bindung seines Ligand VCAM-1 (CD106) direkte Zell-Zell-Kontakte vermitteln kann. Die Wechselwirkung von VLA-4 und VCAM-1 spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Adhäsion von Leukozyten an aktivierte Endothelzellen. Aufgrund dieser Eigenschaft stellt CD49d einen potentiell wichtigen Faktor für die Adhäsion von MSCs an Endothelzellen dar. Aus den Ergebnissen der Expressionsanalyse geht hervor, dass die MSCs aus den verschiedenen Geweben signifikante Unterschiede in der Expression von CD49d aufweisen (BM/AM $p \leq 0,004$; BM/UC $p \leq 0,001$; AM/UC $p \leq 0,021$).

Während in BM-MSCs lediglich schwache CD49d-Expressionsintensitäten detektiert wurden, wiesen AM-MSCs deutlich stärkere Signale auf. Die höchsten Expressionslevel wurden in UC-MSCs gemessen. Die Diagramme in Abbildung 10, in denen für jeden MSC-Typ die Histogramme der CD49d-Expression von allen Spendern in allen drei Passagen übereinandergelegt sind, verdeutlichen die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gewebetypen. Die abweichenden Expressionsintensitäten von CD49d könnten bedeuten, dass MSCs aus verschiedenen Geweben möglicherweise unterschiedliche Adhäsionseigenschaften besitzen. Demzufolge könnten UC-MSCs das größte Potential besitzen, um über CD49d mit VCAM zu interagieren und an andere Zellen zu adhären.

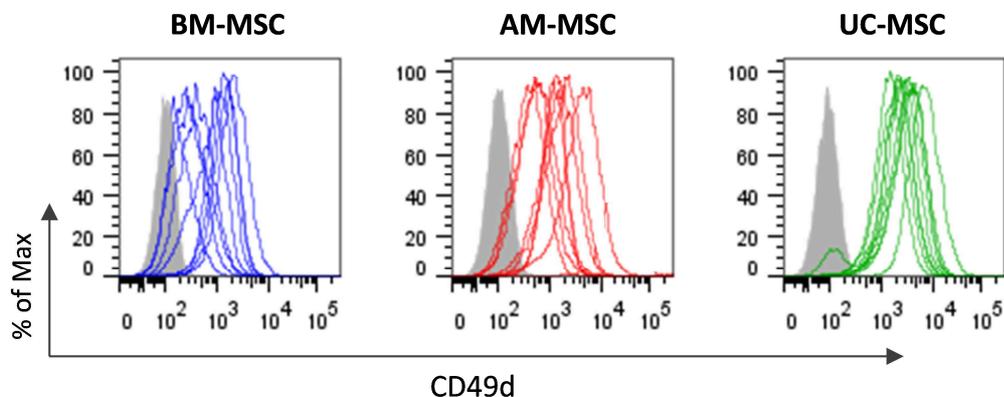


Abbildung 10: Integrin- $\alpha 4$ (CD49d)-Expression in MSCs aus drei verschiedenen Geweben. Um die unterschiedlichen Expressionsniveaus zwischen BM-MSCs (blau), AM-MSCs (rot) und UC-MSCs (grün) zu verdeutlichen, wurden für jedes Gewebe die Histogramme sämtlicher Spender in den Passagen 2, 4 und 6 übereinandergelegt. Insgesamt zeigten von den drei MSC-Typen BM-MSCs die niedrigste und UC-MSCs die höchsten Expressionsintensitäten (BM/AM $p \leq 0,004$; BM/UC $p \leq 0,001$; AM/UC $p \leq 0,021$). Der Anteil an Zellen mit entsprechender CD49d-Expressionsintensität ist in „% of Max“ angegeben. Grau schattierte Histogramme repräsentieren die Isotypkontrollen.

Die Analyse aller acht bekannten β -Untereinheiten zeigte, dass die drei MSC-Typen ein sehr ähnliches Expressionsprofil besitzen (s. Tabelle 15). Die im Allgemeinen am häufigsten vorkommende Untereinheit Integrin- $\beta 1$ (CD29), die mit diversen α -Untereinheiten 12 verschiedene Dimere bilden kann (s. Abbildung 3), wurde von den MSCs aller drei Gewebe stark exprimiert. Ebenfalls von allen MSCs auf hohem Niveau exprimiert wurde die Untereinheit Integrin- $\beta 3$ (CD61), die mit der Untereinheit αV das Dimer $\alpha V\beta 3$ bildet. Es gehört zur Gruppe der RGD-Motiv-bindenden Integrine, zu dessen Liganden unter anderem Fibronectin, Fibrinogen sowie Vitronectin zählen. Zudem kann $\alpha V\beta 3$ über die Interaktion mit PECAM (CD31), das überwiegend an den interzellulären Kontaktstellen von Endothelzellen und von T-Lymphozyten exprimiert wird, direkten Zell-Zell-Kontakt vermitteln (Muller 2013).

Das Integrin-Dimer $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ besitzt zwar ebenfalls eine β3 -Untereinheit, allerdings handelt es sich um ein thrombozytenspezifisches Integrin-Dimer (Hynes 2002).

Bezüglich der Untereinheit Integrin- β5 , die mit αV den Rezeptor $\alpha\text{V}\beta\text{5}$ bildet und damit einen weiteren Vertreter der Rezeptoren darstellt, die Liganden mit RGD-Motiv binden, waren alle MSCs positiv und es ließen sich keine Unterschiede zwischen den Gewebetypen beobachten. Die Expression von Integrin- β4 (CD104) und Integrin- β6 ist typischerweise auf Epithelzellen beschränkt (Quaranta 1990). Dabei bildet die Untereinheit β4 für gewöhnlich mit der Untereinheit α6 den Lamininrezeptor $\alpha\text{6}\beta\text{4}$, wohingegen die Untereinheit β6 mit der Untereinheit αV zum Rezeptor $\alpha\text{V}\beta\text{6}$ dimerisiert, der Liganden mit RGD-Motiven erkennt. Wie erwartet zeigten die MSCs keine Expression beider epithelzellspezifischen Untereinheiten.

Die Untereinheit Integrin- β8 , die ebenfalls mit αV ein Dimer ($\alpha\text{V}\beta\text{8}$) bilden kann, wurde auf BM-MSCs nur sehr schwach exprimiert und war darüber hinaus nicht konstant in jeder Passage detektierbar. AM- und UC-MSCs zeigten keine β8 -Expression. Bei den Untereinheiten Integrin- β2 (CD18) und β7 handelt es sich um leukozytenspezifische Integrin-Untereinheiten (Hynes 2002). Auf AM-MSCs und UC-MSCs, sprich den MSCs aus perinatalem Gewebe, waren beide Untereinheiten nicht detektierbar. BM-MSCs, die ebenfalls β7 -negativ waren, zeigten hingegen vereinzelt eine schwache β2 -Expression. Diese war jedoch nicht in jeder Passage und nicht in jedem Spender nachweisbar (s. Anhang Tabelle 24, Seite 148 ff.).

4.1.1.2 Expression der Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren spielen eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von Leukozyten durch die Bindung von Chemokinen und einer daraus resultierenden, gerichteten Zielfindung bzw. Rekrutierung dieser Zellen („Homing“) entlang des Chemokingradienten. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind die Rezeptoren CXCR4, CCR2 und CCR7, die jeweils an der Rekrutierung von Leukozyten ins Knochenmark, Entzündungsregionen oder in periphere lymphatische Organe beteiligt sind (s. Abschnitt 1.1.5.2). Aufgrund ihrer biologischen Funktionen könnten Chemokinrezeptoren für die Rekrutierung der MSCs in Richtung entzündeter oder geschädigter Gewebe von Bedeutung sein. Die Expressionsanalyse zeigte jedoch, dass CXCR4 und CCR2 von allen MSC-Typen nicht exprimiert werden (s. Tabelle 15). Der Chemokinrezeptor CCR7, der insbesondere für die Migration bestimmter T-Zellen in sekundäre lymphatische Organe wie den Lymphknoten wichtig ist, wurde hingegen von MSCs aus allen drei Geweben, wenn auch nicht von allen Spendern exprimiert. Allerdings unterschieden sich dabei die Zellen in der Höhe der Expressionen deutlich voneinander. So wurde in den MSCs perinatalen Ursprungs eine stärkere CCR7-Expression als in BM-MSCs gemessen. Darüber hinaus ließ sich in einigen Fällen eine erhöhte Spendervariabilität beobachten. So zeigten beispielsweise AM-MSCs aus

dem einen Spender eine starke Expression, während Zellen eines anderen Spenders CCR7-negativ waren (s. Anhang Tabelle 24, Seite 148).

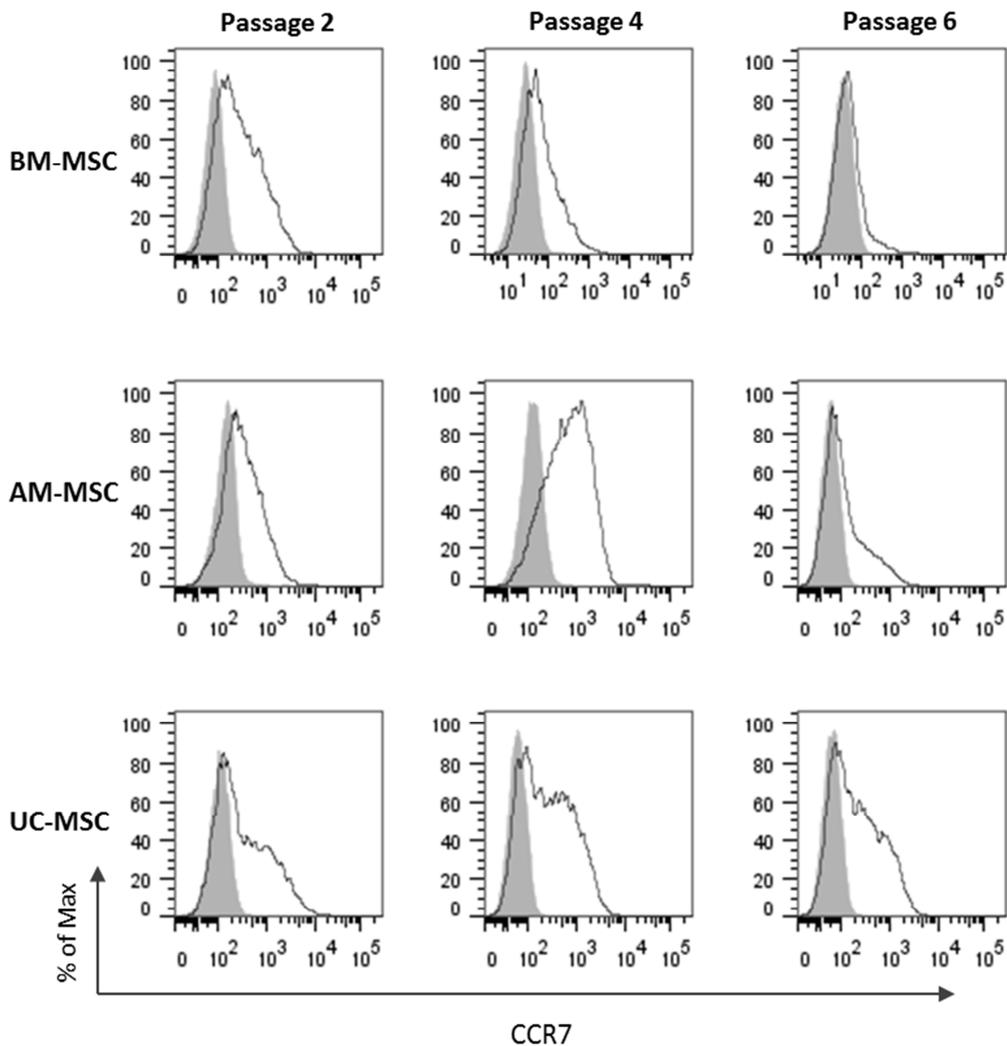


Abbildung 11: Entwicklung der CCR7-Expression in MSCs im Laufe der Kultivierung am Beispiel eines Spenders je MSC-Typ in den Passagen 2, 4 und 6. Der Anteil an Zellen mit entsprechender CCR7-Expressionsintensität ist in „% of Max“ angegeben. Grau schattierte Histogramme repräsentieren die Isotypkontrollen.

Ähnliches wurde auch für BM-MSCs beobachtet, hier war lediglich ein Spender positiv. Insgesamt wurden die stärksten CCR7-Expressionslevel in UC-MSCs gemessen. Am Beispiel eines Spenders je MSC-Typ sind in der Abbildung 11 die Histogramme der CCR7-Expression über mehrere Passagen dargestellt. Sie zeigen, dass die Expression von CCR7 in MSCs bis auf wenige Ausnahmen, wie z.B. bei AM-MSCs in Passage 4, auf Subpopulationen beschränkt ist. Insbesondere UC-MSCs wiesen eine sehr inhomogene Verteilung der Expression von CCR7

auf. Ferner lässt sich anhand der Diagramme von BM- und AM-MSCs erkennen, dass CCR7 im Laufe der Kultivierung nicht konstant exprimiert wurde.

4.1.1.3 Expression weiterer Adhäsionsfaktoren

Bei der Vermittlung der ersten Bindung von Leukozyten an Endothelzellen während der Leukozyten-Adhäsionskaskade spielen Selektine und ihre Liganden eine wichtige Rolle. Durch die schwache Wechselwirkung zwischen diesen Faktoren wird das so genannte Rollen der Leukozyten (*engl.* Rolling) auf dem Endothel induziert, das zu einem Abbremsen der Zellen führt (Sackstein 2005). Als Vertreter der Selektine wurde auf den MSCs die Expression des L-Selektins analysiert, das typischerweise von Lymphozyten exprimiert wird (s. Abschnitt 1.1.5.1). Daneben wurde die Expression des Glykoproteins PSGL-1 auf MSCs untersucht, einem wichtigen Selektin-Liganden, der mit einer hohen Affinität an P-Selektin, aber auch an das von aktivierten Endothelzellen gebildete E-Selektin bindet. Sowohl L-Selektin als auch PSGL-1 wären potentiell wichtige Faktoren, um MSCs nach systemischer Infusion im Blutstrom abzubremsen und eine Migration ins Gewebe zu induzieren. Die MSCs aller drei Gewebe zeigten jedoch weder L-Selektin- noch PSGL-1-Expression und sind somit für beide Faktoren negativ (s. Tabelle 15).

Das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1), das unter anderem von aktivierten Endothelzellen gebildet wird, spielt eine wichtige Rolle bei der Vermittlung direkter Zell-Zell-Kontakte. Über die Interaktion mit dem auf Leukozyten exprimierten Integrinrezeptor $\alpha 4/\beta 1$ kann es eine starke Adhäsion von Leukozyten an vaskuläres Endothel induzieren. Bei der Expressionsanalyse zeigte der überwiegende Anteil der verschiedenen MSC-Kulturen keine VCAM-Expression (s. Tabelle 15). Nur in vereinzelten Fällen konnte eine geringe Anzahl an VCAM-Molekülen auf der Zelloberfläche detektiert werden. So zeigten die AM-MSCs von Spender 1 in den Passagen 4 und 6 einen VCAM-positiven Phänotyp (s. Anhang Tabelle 24, Seite 148).

4.1.2 Charakterisierung von MSCs unter proinflammatorischen Bedingungen

Entzündungsregionen sind in der Regel durch das Vorkommen hoher Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine gekennzeichnet. Um ein inflammatorisches Umfeldes zu simulieren und die Auswirkungen auf die Expression der bisher analysierten Adhäsions- und Migrationsfaktoren in MSCs zu untersuchen, wurden die MSCs aus den drei unterschiedlichen Geweben durch die simultane Zugabe von 20 ng/ml der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ für 24 Stunden stimuliert. Die Stimulation mit TNF- α oder IFN- γ stellt eine

klassische Methode dar, um MSCs einem proinflammatorischen Umfeld auszusetzen und ist bereits mehrfach beschrieben (s. Abschnitt 1.3).

4.1.2.1 Einfluss der Stimulation auf die Integrin-Untereinheiten

Zur Analyse des Einflusses proinflammatorischer Zytokine auf die Expression der einzelnen Integrin-Untereinheiten wurden in einem ersten Schritt die Auswirkungen der Stimulation auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR untersucht. Die Diagramme zeigen dabei die relative mRNA-Expression in unstimulierten und stimulierten MSCs im Verhältnis zum Expressionslevel der Referenzgene (Referenzgenlevel = 1) (s. Abbildung 12). Je Gewebetyp wurden die Zellen von jeweils drei Spendern untersucht. Die Analyse ergab, dass es in MSCs innerhalb einer 24 stündigen Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen zu keiner signifikanten Änderung der mRNA-Expression der einzelnen Integrin-Untereinheiten kommt. Die mRNA-Expressionsdaten unstimulierter MSCs stimmen weitestgehend mit den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analyse der Proteinexpression überein (s. Tabelle 15).

So waren zum einen ähnliche Verhältnisse zwischen den einzelnen Untereinheiten innerhalb eines jeweiligen Zelltyps, zum anderen auch vergleichbare Unterschiede zwischen den verschiedenen MSC-Typen zu erkennen. So wurde in den MSCs aller Gewebe bezüglich der α -Untereinheiten von Integrin- $\alpha 5$ stets das höchste, von Integrin- $\alpha 4$ stets das niedrigste mRNA-Level gemessen. Dabei war im Vergleich zwischen den MSC-Typen die Expression von Integrin- $\alpha 4$ in UC- und AM-MSCs am stärksten. Bei den β -Untereinheiten wurde die mRNA von Integrin- $\beta 1$ in allen MSC-Typen auf sehr hohem Niveau exprimiert. Wie schon bei der Proteinexpressionsanalyse war $\beta 1$ die am stärksten exprimierte Integrin-Untereinheit. Gegenüber $\beta 1$ wurden von den Untereinheiten Integrin- $\beta 3$ und Integrin- $\beta 5$ etwas geringere mRNA-Level detektiert, wobei das mRNA-Level der Untereinheit $\beta 5$ stets höher lag als das von $\beta 3$.

Interessanterweise wurde in BM-MSCs eine deutliche, in AM-MSCs und UC-MSCs eine sehr schwache bzw. keine Expression der Untereinheit Integrin- $\beta 2$ detektiert. Dies entspricht in gewisser Hinsicht den Daten aus der Proteinexpressionsanalyse, bei der in BM-MSCs vereinzelt ein schwaches $\beta 2$ -Signal gemessen wurde (s. Anhang Tabelle 24, Seite 148). Demgegenüber zeigten die MSCs aller drei Gewebe mRNA-Expression der Untereinheit Integrin- $\beta 8$, wohingegen nur in BM-MSCs eine schwache $\beta 8$ -Expression auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte (s. Tabelle 15).

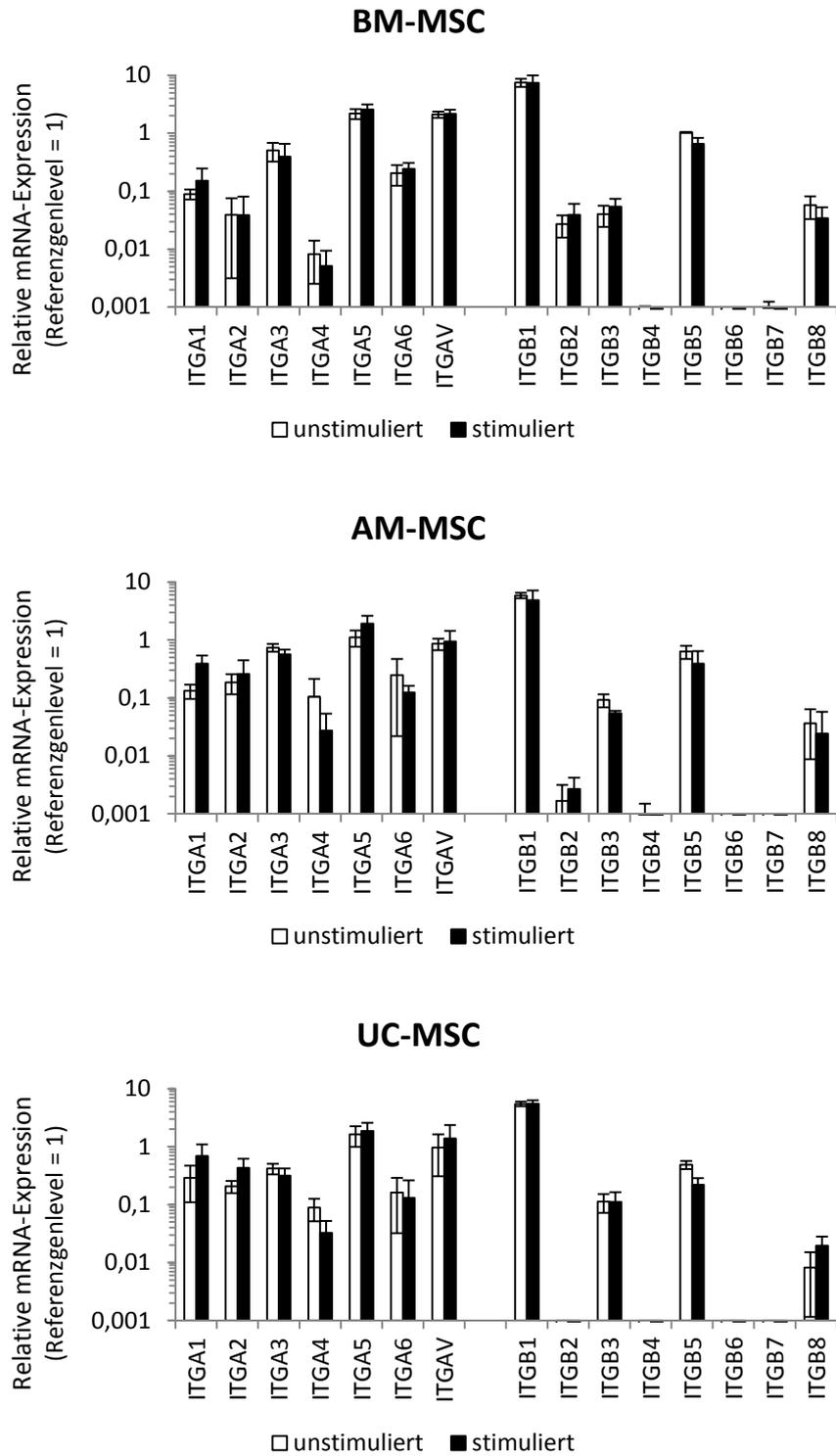


Abbildung 12: mRNA-Expression der Integrin-Untereinheiten relativ zur Expression der Referenzgene in MSCs unter Normalbedingungen (unstimuliert) und nach 24 stündiger Stimulation mit TNF- α und IFN- γ (stimuliert).

Um einen möglichen Einfluss der Zytokinstimulation der Zellen auf Proteinebene zu untersuchen, wurden in einem zweiten Schritt die Zellen je eines Spenders pro MSC-Typ für 24 Stunden mit TNF- α und IFN- γ stimuliert und anschließend die Proteinexpression der einzelnen Integrin-Untereinheiten von den jeweils unstimulierten und stimulierten Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen (s. Tabelle 16). Die gesamte Liste der einzelnen Messwerte ist im Anhang beigefügt (s. Anhang Tabelle 25, Seite 149). Wie schon die mRNA-Analyse zeigte auch die Analyse auf Proteinebene, dass innerhalb der 24 stündigen Stimulation kein nennenswerter Einfluss auf die Expression der Integrin-Untereinheiten zu erkennen ist.

Tabelle 16: Einfluss 24 stündiger Stimulation mit 20 ng/ml TNF- α und IFN- γ auf die Expression der Integrin-Untereinheiten in MSCs am Beispiel eines Spenders in Passage 4 je MSC-Typ. Angegeben ist die Fluoreszenzintensität als relativer GeoMean im Verhältnis zur Isotypkontrolle: > 30 = + + +, 10-30 = + +, 2-10 = +, 1,5-2 = (+), < 1,5 = -. Die Integrin-Untereinheiten sind mit dem jeweiligen Namen des Gens abgekürzt. Die Expression von ITGB3 in BM-MSCs wurde nicht bestimmt (nd).

Stimulation	BM-MSC		AM-MSC		UC-MSC	
	-	+	-	+	-	+
ITGA1	+	+	++	++	+	++
ITGA2	+	+	+	+	+++	+++
ITGA3	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ITGA4	(+)	-	+	+	++	++
ITGA5	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ITGA6	+	+	+	+	+	+
ITGAV	++	++	++	++	++	++
ITGB1	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ITGB2	-	(+)	-	-	-	-
ITGB3	nd	nd	++	++	++	++
ITGB4	-	-	-	-	-	-
ITGB5	++	++	+	+	+	+
ITGB6	-	-	-	-	-	-
ITGB7	-	-	-	-	-	-
ITGB8	(+)	(+)	-	-	-	-

Obwohl es in der Tabelle lediglich bei BM-MSCs auf den ersten Blick zu erkennen ist, zeigten jedoch bei genauerer Betrachtung auch AM- und UC-MSCs im Falle der Untereinheit Integrin- α 4 (CD49d) stets eine Reduktion des relativen GeoMean und somit eine Abnahme der Expression nach Stimulation (s. dazu Anhang Tabelle 25, Seite 149). Da die Untereinheit einen

wichtigen Faktor bei der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten darstellt, wurde der Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf dessen Expression in den verschiedenen MSCs genauer untersucht. Dazu wurden in einem kinetischen Ansatz die Zellen von je drei Spendern pro Zelltyp für 72 Stunden mit TNF- α und IFN- γ stimuliert und zu bestimmten Zeitpunkten die Expression von Integrin- α 4 mittels Durchflusszytometrie gemessen (s. Abbildung 13).

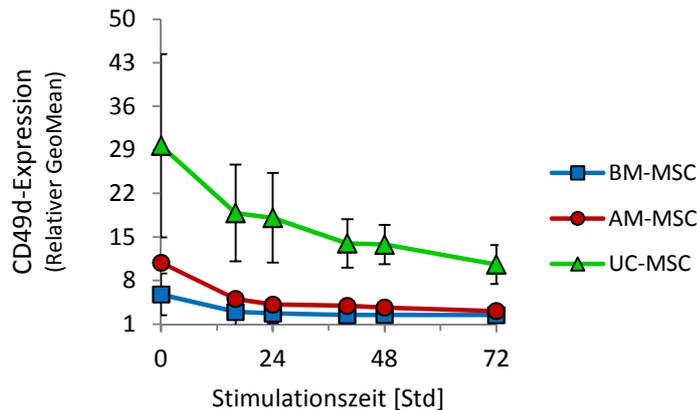


Abbildung 13: Änderung der Integrin- α 4 (CD49d)-Proteinexpression in MSCs während 72 stündiger Stimulation mit 20 ng/ml TNF- α und IFN- γ . Im Diagramm ist die Fluoreszenzintensität als relativer GeoMean im Verhältnis zur Isotypkontrolle über der Stimulationszeit aufgetragen.

Die kinetische Analyse zeigte, dass die Stimulation mit einer deutlichen Änderung der CD49d-Expression in allen MSC-Typen verbunden ist. So reagierten die Zellen mit einer starken Abnahme der CD49d-Expression, wobei innerhalb der ersten 24 Stunden die stärkste Veränderung beobachtet werden konnte. Im weiteren Verlauf nahm die Expression zusätzlich ab, so dass AM- und BM-MSCs nach 72 stündiger Stimulation nur noch ein sehr schwaches CD49d-Signal zeigten, während UC-MSCs zwar ebenfalls eine abgeschwächte, aber weiterhin starke Expression aufwiesen.

4.1.2.2 Einfluss der Stimulation auf die Chemokinrezeptoren

Neben den Integrin-Untereinheiten wurde ebenfalls der Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die Expression der drei Chemokinrezeptoren CXCR4, CCR2 und CCR7 in MSCs untersucht. Dazu wurden am Beispiel eines Spenders pro Zelltyp die MSCs, wie schon für die qRT-PCR-Analysen, für 24 Stunden mit TNF- α und IFN- γ stimuliert. Anschließend wurde die Expression per Durchflusszytometrie analysiert (s. Tabelle 17). Die Liste der einzelnen Messwerte befindet sich im Anhang (s. Anhang Tabelle 25, Seite 149).

Tabelle 17: Einfluss 24 stündiger Stimulation mit 20 ng/ml TNF- α und IFN- γ auf die Expression der Chemokinrezeptoren in MSCs am Beispiel eines Spenders in Passage 4 je MSC-Typ. Angegeben ist die Fluoreszenzintensität als relativer GeoMean im Verhältnis zur Isotypkontrolle: >30 = + + +, 10-30 = + +, 2-10 = +, 1,5-2 = (+), <1,5 = -.

Stimulation	BM-MSC		AM-MSC		UC-MSC	
	-	+	-	+	-	+
CXCR4	-	-	-	-	-	-
CCR2	-	-	-	-	-	-
CCR7	-	+	(+)	-	+	+

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass auch unter proinflammatorischen Bedingungen die beiden Rezeptoren CXCR4 und CCR2 in MSCs nicht exprimiert werden. Bezüglich des Chemokinrezeptors CCR7 führte die Stimulation in BM-MSCs zu einer verstärkten, in AM-MSCs hingegen zu einer schwächeren Expression. In den UC-MSCs konnte keine Änderung durch Stimulation detektiert werden. Die unterschiedlichen Reaktionen der verschiedenen Zelltypen deuten darauf hin, dass nicht unbedingt die Stimulation für die Veränderung verantwortlich ist, sondern CCR7 im Allgemeinen auf der Oberfläche von MSCs nicht konstant exprimiert wird (vgl. hierzu Abbildung 11).

4.1.2.3 Einfluss der Stimulation auf weitere Adhäsionsfaktoren

Abschließend wurde auch die Expression weiterer Adhäsionsfaktoren unter Einfluss proinflammatorischer Zytokine in MSCs untersucht. Dazu wurden die Zellen eines Spenders je MSC-Typ für 24 Stunden stimuliert und Expression anschließend mittels Durchflusszytometrie bestimmt (s. Tabelle 18). Die Liste der einzelnen Messwerte befindet sich im Anhang (s. Anhang Tabelle 25, Seite 149).

Tabelle 18: Einfluss 24 stündiger Stimulation mit 20 ng/ml TNF- α und IFN- γ auf die Expression von VCAM, PSGL-1 und L-Selektin in MSCs am Beispiel eines Spenders in Passage 4 je MSC-Typ. Angegeben ist die Fluoreszenzintensität als relativer GeoMean im Verhältnis zur Isotypkontrolle: >30 = + + +, 10-30 = + +, 2-10 = +, 1,5-2 = (+), <1,5 = -.

Stimulation	BM-MSC		AM-MSC		UC-MSC	
	-	+	-	+	-	+
VCAM	+	++	(+)	++	-	+
PSGL-1	-	-	-	-	-	-
L-Selektin	-	-	-	-	-	-

Die Expression des Selektin-Liganden PSGL-1 und des L-Selektins zeigten keine Veränderung durch Stimulation und wurden unter beiden Bedingungen von MSCs nicht exprimiert. Bei VCAM war hingegen in allen MSC-Typen durch Stimulation eine deutliche Zunahme der Expression zu erkennen. Diese fiel in BM- und AM-MSCs stärker aus als in UC-MSCs. Um die Reaktion der VCAM-Expression in MSCs auf proinflammatorische Zytokine genauer zu untersuchen, wurden die Zellen von je drei Spendern pro Zelltyp wie bereits beschrieben zunächst für 24 Stunden mit TNF- α und IFN- γ stimuliert und die mRNA-Expression mittels qRT-PCR analysiert (s. Abbildung 14 A).

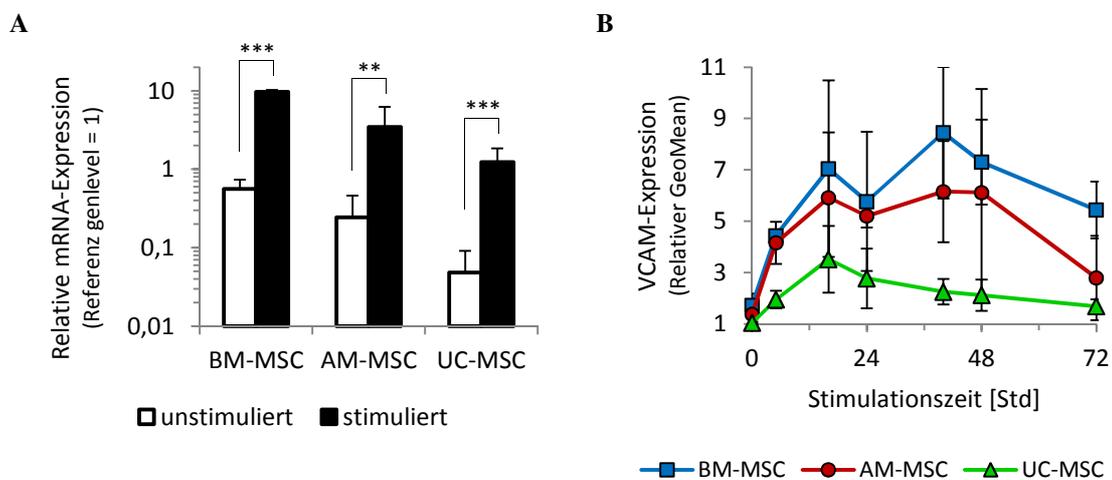


Abbildung 14: A) Relative VCAM-mRNA-Expression in unstimulierten und 24 Stunden mit TNF- α und IFN- γ stimulierten MSCs. Je Gewebetyp wurde die mRNA-Expression von drei Spendern analysiert. B) Kinetische Analyse zur Entwicklung der VCAM-Proteinexpression auf MSCs während 72 stündiger Stimulation mit 20 ng/ml TNF- α und IFN- γ . Das Diagramm zeigt die Fluoreszenzintensität als relativen GeoMean im Verhältnis zur Isotypkontrolle. Je Gewebetyp wurden drei Spender analysiert.

Ferner wurde auch die Entwicklung der VCAM-Expression nach Stimulation auf Proteinebene in einem kinetischen Ansatz verfolgt. Dazu wurden die Zellen von je drei Spendern pro Zelltyp für 72 Stunden stimuliert und zu bestimmten Zeitpunkten die Expression mittels Durchflusszytometrie gemessen (s. Abbildung 14 B). Aus der qRT-PCR-Analyse ging hervor, dass bereits in unstimulierten MSCs die VCAM-mRNA auf relativ hohem Niveau vorlag. So zeigten BM-MSCs eine relative Expression von 0,56, AM-MSCs von 0,24 und UC-MSCs von 0,05 im Vergleich zum Referenzgenlevel (1,0).

Die 24 stündige Stimulation führte zu einem weiteren, stark signifikanten Anstieg des mRNA-Expressionslevels, der vor allem in BM-MSCs am stärksten ausfiel. Dort stieg die relative mRNA-Expression auf den 10fachen Wert des Referenzgenlevels. AM-MSCs zeigten einen Anstieg auf das ca. 3,5fache und UC-MSCs auf das 1,2fache des Referenzgenlevels.

Hinsichtlich der Expression auf Proteinebene war in unstimulierten MSCs (entspricht 0 Stunden stimuliert) jedoch keine oder nur eine schwache VCAM-Expression mittels Durchflusszytometrie detektierbar. Die Stimulation mit den Zytokinen führte allerdings in allen Zelltypen zu einem sehr raschen Anstieg des VCAM-Signals auf der Zelloberfläche, das im Laufe der Stimulation jedoch zahlreiche Schwankungen in allen Zelltypen aufwies. Mit zunehmender Dauer der Stimulation kam es zu einer Abnahme der Expression. Die mitunter großen Standardabweichungen deuten darüber hinaus auf eine hohe Spendervariabilität hin. Bezüglich der Expressionslevel zwischen den MSC-Typen gehen die Daten der mRNA-Analyse mit den Ergebnissen der kinetischen Proteinanalyse konform. BM-MSCs zeigten jeweils die höchste, UC-MSCs die niedrigste VCAM-Expression.

4.2 Identifizierung und Charakterisierung neuer adhäsions- und migrationsvermittelnder Faktoren in MSCs

4.2.1 Genexpressionsanalyse zur Identifizierung durch Stimulation regulierter Faktoren

Mit der Analyse klassischer Adhäsions- und Migrationsfaktoren in MSCs konnte gezeigt werden, dass MSCs aus unterschiedlichen Geweben, bezogen auf die untersuchten Faktoren, zwar ein ähnliches Expressionsprofil besitzen, aber auch charakteristische Unterschiede aufweisen, die sich unter anderem in den Expressionsintensitäten einiger Faktoren widerspiegeln. Durch Stimulation der MSCs mit proinflammatorischen Zytokinen wurde ein entzündliches Umfeld simuliert und dessen Einfluss auf die Expression dieser Faktoren untersucht. Dabei ließen sich jedoch keine oder nur minimale Veränderungen beobachten. Lediglich bei VCAM konnte eine starke Zunahme, jedoch keine konstante Expression nach Stimulation in MSCs detektiert werden. Daneben zeigten MSCs eine Abnahme der Integrin- $\alpha 4$ (CD49d)-Expression im Laufe der Stimulation. Um einen tieferen Einblick in die Auswirkungen einer Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen und damit eines entzündlichen Umfeldes auf MSCs zu erhalten, wurden in einer umfangreichen Genexpressionsanalyse die Expression von 371 Genen analysiert. Diese sollte Aufschluss darüber geben, welche MSC-Quellen ein ähnliches Expressionsprofil bzw. entsprechend ähnliche Reaktionen auf die Stimulation zeigen, welche Gruppen von Faktoren dabei betroffen sind und ob Faktoren, die speziell bei Zielfindungs-, Adhäsions- und Migrationsprozessen beteiligt sind, durch eine Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen reguliert sind.

Dazu wurden pro MSC-Typ (BM, AM, UC) die Zellen von je drei Spendern mit TNF- α und IFN- γ für 24 stimuliert und die mRNA-Expression von insgesamt 371 Genen im Vergleich mit unstimulierten MSCs mittels qRT-PCR quantifiziert.

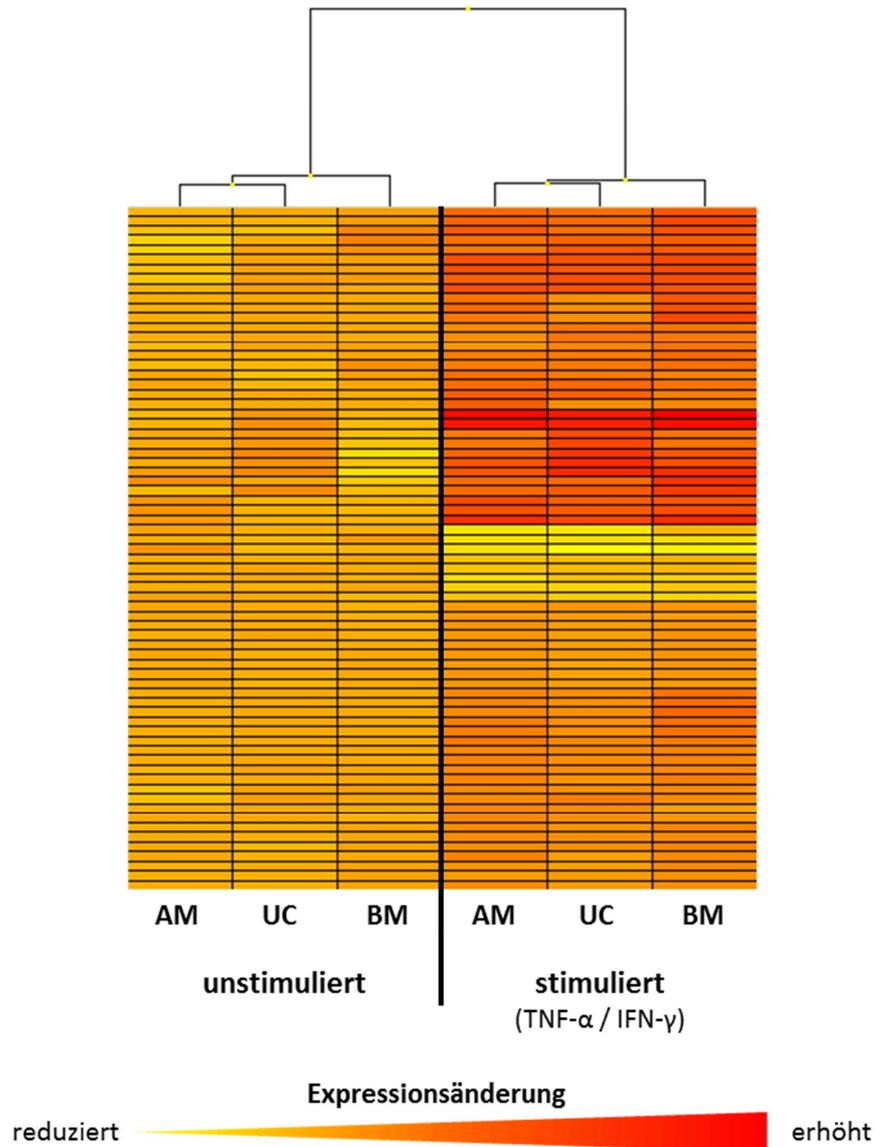


Abbildung 15: Hierarchische Clusteranalyse aller durch 24 stündige Stimulation mit 20 ng/ml TNF- α und IFN- γ regulierten Gene. Jede Reihe repräsentiert ein Gen und zeigt die relative Expression in den jeweiligen Zellen. Die farbliche Unterlegung entspricht dabei der Intensität der Expressionsänderung im Verhältnis zur durchschnittlichen Expression des Gens in allen unstimulierten MSCs.

In der anschließenden Auswertung wurden nur die Gene berücksichtigt, die bei mindestens einer der beiden Bedingungen (unstimuliert/stimuliert) einen Cp-Wert (Zyklusanzahl) von maximal 37 aufwiesen. Alle darüber liegenden wurden als negativ definiert. Für die

Quantifizierung wurde pro Zelltyp und Bedingung der für jedes Gen gemessene Cp-Wert gegenüber den der Referenzgene normalisiert (ΔCp), anschließend die Differenz von stimulierten zu unstimulierten Zellen bestimmt ($\Delta\Delta\text{Cp}$) und daraus die relative mRNA-Expression eines Gens in stimulierten gegenüber unstimulierten Zellen berechnet ($2^{-\Delta\Delta\text{Cp}}$).

Abbildung 15 zeigt in einer hierarchischen Clusteranalyse all die Gene, deren Expression sich in stimulierten MSCs gegenüber unstimulierten um den Faktor 2 (fold change $\geq 2,0$ bzw. $\leq -2,0$) verändert hat. Für jedes Gen ist dabei die Expressionsänderung im Verhältnis zur durchschnittlichen Expression des Gens in allen unstimulierten MSCs dargestellt. Die Clusteranalyse zeigt, dass sich durch Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen deutliche Veränderungen in der mRNA-Expression in MSCs ergaben. So wurde die Expressionsintensität einiger Gene durch die Stimulation reduziert (gelb), während die Stimulation bei der Mehrzahl der Gene jedoch zu einer erhöhten Expression führte (rot). Insgesamt wiesen die MSCs aus perinatalem Gewebe, sprich AM- und UC-MSCs im Vergleich zu BM-MSCs sowohl im unstimulierten wie auch im stimulierten Zustand eine höhere Ähnlichkeit in ihren Expressionsmustern auf. Dass sich MSCs aus perinatalem Gewebe eher entsprechen und sich in ihrer Genexpression von MSCs aus dem Knochenmark unterscheiden, wurde bereits in der Studie von Wegmeyer et al. beschrieben (Wegmeyer et al. 2013).

Tabelle 19: Gene, deren Expression in den Zellen aller drei MSC-Typen verhältnismäßig am stärksten hochreguliert wurde. Die jeweilige Änderung der Expression (fold change) ist dabei als Logarithmus zur Basis 2 (log2) mit der jeweiligen Signifikanz angegeben.

	BM-MSC		AM-MSC		UC-MSC	
	fold change (log2)	p-Wert	fold change (log2)	p-Wert	fold change (log2)	p-Wert
CXCL10	21,21	$1,0 \times 10^{-8}$	17,36	$2,8 \times 10^{-4}$	18,32	$6,4 \times 10^{-5}$
IDO1	17,45	$1,0 \times 10^{-8}$	17,29	$4,4 \times 10^{-7}$	16,58	$3,9 \times 10^{-7}$
CXCL9	19,09	$2,9 \times 10^{-8}$	17,09	$2,1 \times 10^{-5}$	16,89	$1,1 \times 10^{-5}$
CXCL11	17,87	$2,9 \times 10^{-7}$	15,86	$4,7 \times 10^{-6}$	15,94	$3,1 \times 10^{-7}$
CCL8	16,17	$7,4 \times 10^{-6}$	14,30	$3,5 \times 10^{-5}$	13,77	$5,3 \times 10^{-5}$
CCL5	17,18	$3,0 \times 10^{-5}$	14,28	$7,7 \times 10^{-4}$	10,07	$1,6 \times 10^{-4}$
CX3CL1	13,27	$1,6 \times 10^{-4}$	12,14	$2,5 \times 10^{-4}$	10,55	$2,1 \times 10^{-4}$
CD38	10,09	$5,5 \times 10^{-4}$	10,30	$3,1 \times 10^{-3}$	8,64	$1,0 \times 10^{-3}$
ICAM1	11,33	$6,6 \times 10^{-6}$	7,75	$1,4 \times 10^{-2}$	8,36	$3,5 \times 10^{-4}$
IL8	11,28	$2,6 \times 10^{-6}$	6,44	$9,0 \times 10^{-3}$	5,63	$2,3 \times 10^{-4}$

In Tabelle 19 sind die Gene aufgeführt, deren mRNA-Expression nach der Stimulation der MSCs insgesamt am stärksten hochreguliert wurde. Die jeweilige Änderung der Expression (fold change) ist dabei als Logarithmus zur Basis 2 (\log_2) mit der jeweiligen Signifikanz angegeben. Die gesamte Tabelle der regulierten Gene ist im Anhang beigefügt (s. Anhang Tabelle 26, Seite 151). Bei den durch Stimulation am stärksten hochregulierten Faktoren handelt es sich in erster Linie um Chemokine. In allen MSC-Typen wurde dabei die größte Änderung beim Faktor CXCL10 beobachtet. Ebenfalls verändert ist die mRNA-Expression des immunmodulatorischen Enzyms IDO-1 sowie des Oberflächenrezeptors ICAM-1, der über die Interaktion mit Integrinen direkte Zell-Zell-Kontakte vermitteln kann. Es ist bekannt, dass sich beide Faktoren durch proinflammatorische Zytokine in MSCs induzieren lassen. Sie spielen insbesondere bei der Vermittlung immunsuppressiver Effekte durch MSCs eine wichtige Rolle (Uccelli et al. 2008, Ren et al. 2010).

Daneben befindet sich unter den am stärksten regulierten Faktoren mit CD38 auch ein Vertreter aus der Familie der so genannten Ektoenzyme. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe membranassoziierter Proteine, die eine extrazelluläre Enzymaktivität besitzen. Basierend auf phänotypischen Merkmalen von CD38^{-/-}-Mäusen, die eine erhöhtes Infektionsrisiko und reduzierte chemotaktische Aktivität bestimmter Leukozyten aufweisen, sowie auf Daten verschiedener *in vitro* Studien, wird CD38 eine wichtige Rolle bei der Zielfindung entzündeter bzw. geschädigter Gewebe durch Leukozyten zugeschrieben (Cockayne et al. 1998). CD38 ist eine ADP-Ribosylzyklase, die die Umsetzung von NAD⁺ in cADPR katalysiert (s. Abschnitt 1.2.2). Es ist verwandt mit CD157, das zwar dieselbe Reaktion wie CD38 vermittelt, aber eine deutlich niedrigere Enzymaktivität besitzt (Hussain et al. 1998). Der genaue Wirkmechanismus sowie weitere biologische Funktionen von CD38 sind bisher nur unzureichend aufgeklärt und Gegenstand aktueller Forschung (Malavasi et al. 2008). Bisher konnte keine Expression von CD38 in MSCs nachgewiesen werden, so dass sie im Allgemeinen als CD38-negativ gelten (Qiao et al. 2008, Mitrano et al. 2010, Tao et al. 2011). Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie, die zeigt, dass durch die Stimulation mit TNF- α und IFN- γ die Expression von CD38 in MSCs aus verschiedenen Quellen induziert werden kann. Um zu untersuchen, welche mögliche Rolle CD38 bei der Rekrutierung von MSCs in geschädigte Gewebe spielt, wurden die MSCs aus den unterschiedlichen Geweben zunächst hinsichtlich der Expression von CD38 genauer charakterisiert.

4.2.2 Analyse der Expression von CD38 in MSCs

4.2.2.1 mRNA-Expression

Die Daten der Clusteranalyse zeigten, dass CD38 in stimulierten MSCs deutlich stärker exprimiert wird als in unstimulierten MSCs. Zur Quantifizierung der CD38-mRNA in den drei MSC-Typen vor und nach Stimulation wurde die relative CD38-mRNA-Expression im Verhältnis zur Expression der Referenzgene ($2^{-\Delta CP}$) berechnet (s. Abbildung 16).

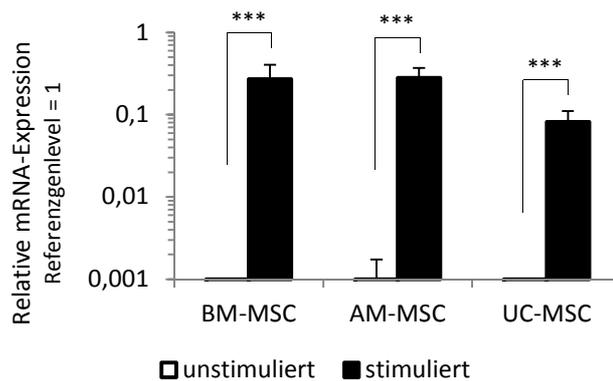


Abbildung 16: Relative CD38-mRNA-Expression in MSCs der drei verschiedenen Gewebe im unstimulierten Zustand und nach 24 stündiger Stimulation mit TNF- α und IFN- γ . Je Gewebetyp wurde die mRNA-Expression von drei Spendern analysiert.

Die relative Quantifizierung zeigte, dass in unstimulierten MSCs keine oder nur eine minimale Anzahl an CD38-mRNA-Kopien vorlag. Demgegenüber wiesen nach der Stimulation alle MSCs-Typen einen stark signifikanten Anstieg der CD38-mRNA-Expression auf. So stieg in UC-MSCs das CD38-mRNA-Expressionslevel auf einen Wert von etwa 0,1, in BM- und AM-MSCs auf einen Wert von etwa 0,3 im Verhältnis zum jeweiligen Referenzgenlevel.

4.2.2.2 CD38-Proteinexpression

Basierend auf den mRNA-Daten, die eine starke CD38-Expression in stimulierten MSCs zeigten, wurde darüber hinaus die CD38-Expression auf Proteinebene in Form eines kinetischen Ansatzes analysiert. Von den drei MSC-Typen wurden dazu jeweils Zellen von drei verschiedenen Spendern für insgesamt 120 Stunden mit TNF- α und IFN- γ stimuliert und zu bestimmten Zeitpunkten die CD38-Expression mittels Durchflusszytometrie gemessen (s. Abbildung 17).

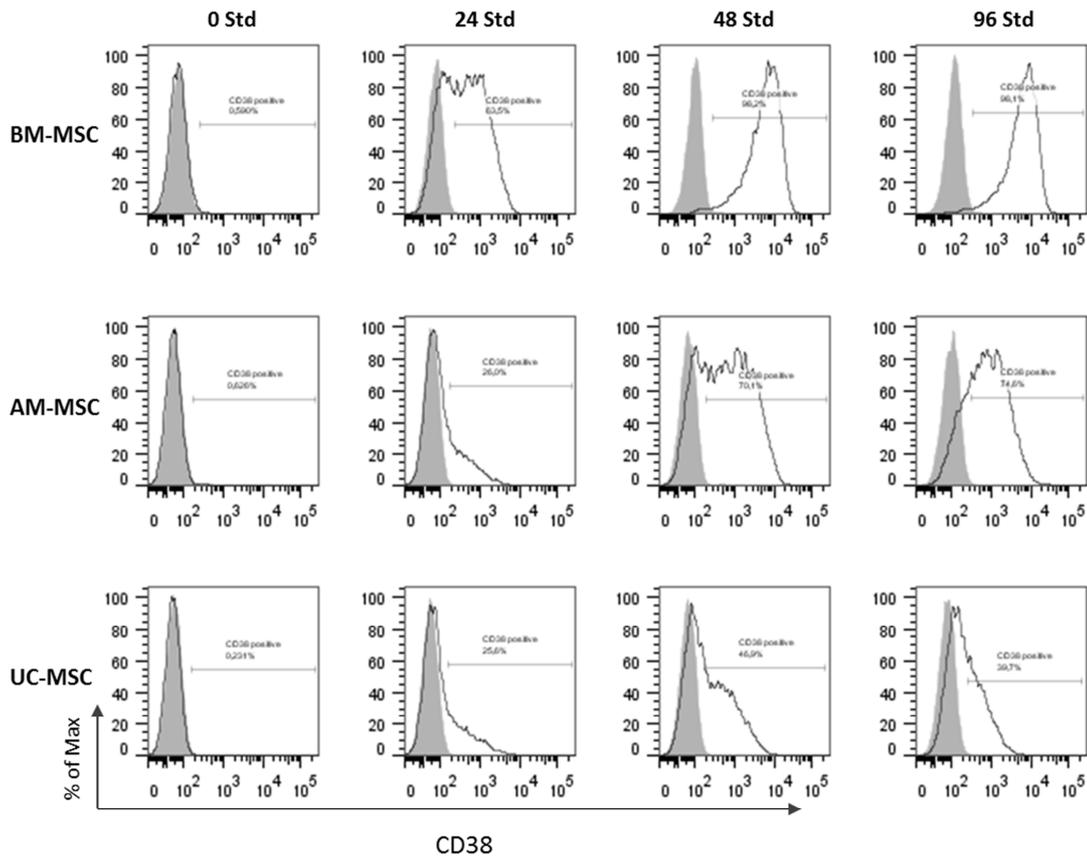


Abbildung 17: Kinetische Analyse der CD38-Proteinexpression in MSCs während der Stimulation mit TNF- α und IFN- γ am Beispiel eines Spenders pro MSC-Typ. Insgesamt wurden die Zellen für 120 Stunden stimuliert. Dargestellt sind die jeweiligen FACS-Histogramme bei 0, 24, 48 sowie 96 stündiger Stimulation. Der Anteil an Zellen mit entsprechender CD38-Expressionsintensität ist in „% of Max“ angegeben. Grau schattierte Histogramme repräsentieren die Isotypkontrollen.

Wie schon die mRNA-Analyse, zeigte auch die durchflusszytometrische Proteinanalyse, dass CD38 auf unstimulierten MSCs nicht exprimiert wird und erst nach der Stimulation mit TNF- α und IFN- γ auf den Zellen nachzuweisen ist. Insgesamt zeigten BM-MSCs den stärksten Anstieg in der CD38-Expression, während in AM-MSCs eine etwas schwächere und in UC-MSCs die niedrigste Expression gemessen wurde. Die anfängliche Zunahme der CD38-Expression war dabei stets auf einen Teil der Gesamtpopulation beschränkt, so dass für die Auswertung der Anteil an CD38-positiven Zellen ermittelt wurde. In einem Diagramm wurden die Mittelwerte CD38-positiver Zellen von den drei Spendern jedes Zelltyps über der Stimulationszeit aufgetragen (s. Abbildung 18). Während höhere Standardabweichungen bei BM-MSCs in erster Linie im Bereich des Expressionsanstieges auftauchten, war die Variabilität zwischen den Spendern bei AM- und UC-MSCs insbesondere durch Unterschiede in den Maximal-Plateaus gekennzeichnet. Somit ergab sich aus der kinetischen Analyse, dass

MSCs aus verschiedenen Geweben während der Stimulation einen unterschiedlichen maximalen Anteil an CD38-positiven Zellen erreichen.

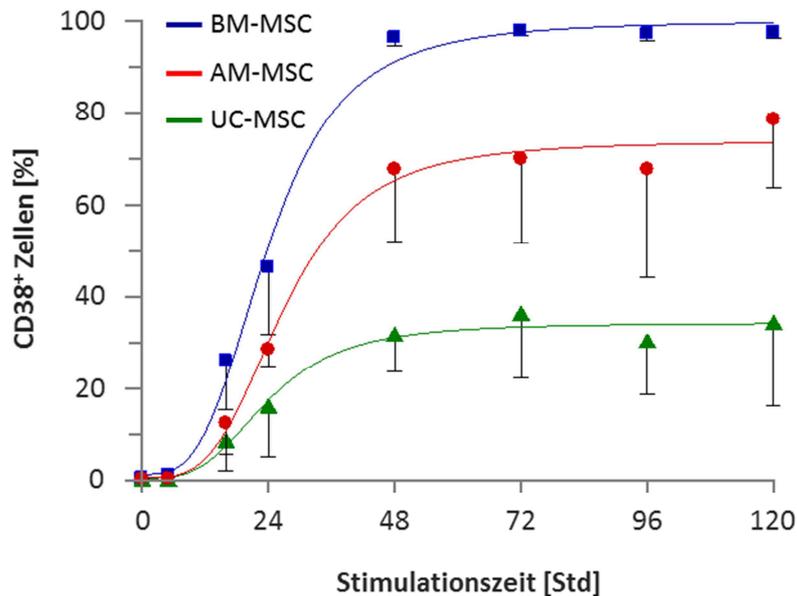


Abbildung 18: Sigmoidale Kurvenanpassung (Formel s. Text) aus den Datenpunkten der kinetischen Analyse der CD38-Proteinexpression während 120 stündiger Stimulation mit TNF- α und IFN- γ .

Um die CD38-Expression in den drei MSC-Typen zu charakterisieren, wurden über die Kurvenanpassung der Datenpunkte, die die folgende Sigmoidfunktion zugrunde liegt, die kinetischen Parameter berechnet (s. Tabelle 20).

$$Exp [\%] = Min + \frac{(Max - Min)}{\left(1 + \left(\frac{t_{1/2}}{x}\right)^n\right)}$$

Dabei gibt *Min* den minimalen und *Max* den maximalen Anteil CD38-positiver Zellen in Prozent an. Der Koeffizient *n* beschreibt die Steigung der Kurve im Wendepunkt $t_{1/2}$, der Stimulationszeit bis zur halbmaximalen CD38-Expression. In BM-MSCs betrug der maximale Anteil CD38-positiver Zellen 100 %, somit wurde CD38 von allen Zellen innerhalb der Population exprimiert. Bei den AM-MSCs hingegen lag der maximale Anteil bei ca. 70 %, im Falle von UC-MSCs lediglich bei etwas mehr als 30 %. Beim Vergleich der Geschwindigkeit des Anstiegs der CD38-Expression ergab sich allerdings, dass die halbmaximale CD38-Expression in allen MSC-Typen nach ca. 24 stündiger Stimulation, die maximale Expression dann nach ca. 48 stündiger Stimulation erreicht wurde.

Tabelle 20: Kinetische Parameter der CD38-Proteinexpression in MSCs während der Stimulation mit 20 ng/ml TNF- α und IFN- γ . Angegeben ist der jeweilige Koeffizient n , der Zeitpunkt bis zur halbmaximalen Expression ($t_{1/2}$) und der maximale Anteil an CD38-positiven Zellen (Max). Die Daten ergeben sich dabei aus den Mittelwerten von drei verschiedenen Spendern je Zelltyp.

Zelltyp	n	$t_{1/2}$	Max
BM-MSK	3,3	24 Std.	100 %
AM-MSK	3,5	27 Std.	74 %
UC-MSK	3,3	24 Std.	34 %

Die Zellen zeigten demnach zwar Unterschiede im maximalen Anteil an positiven Zellen, wiesen aber eine vergleichbare Dynamik im Anstieg der CD38-Proteinexpression auf. Basierend auf diesen Daten wurden für weitergehende Analysen die MSCs aus den drei Geweben stets für 48 Stunden stimuliert, um jeweils einen maximalen Anteil an CD38-exprimierenden Zellen zu erzielen.

4.2.2.3 Abhängigkeit der CD38-Expression in MSCs von der Art des Stimulus

In den bisherigen Expressionsanalysen wurden MSCs stets simultan mit TNF- α und IFN- γ stimuliert. Um zu ermitteln, auf welches der beiden Substanzen die Induktion der CD38-Expression in MSCs zurückzuführen ist oder ob es sich sogar um einen synergetischen Effekt handelt, wurden BM-MSKs eines Spenders zusätzlich mit jeweils nur einem der Zytokine für 48 Stunden stimuliert. Die Expressionsanalyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie (s. Abbildung 19).

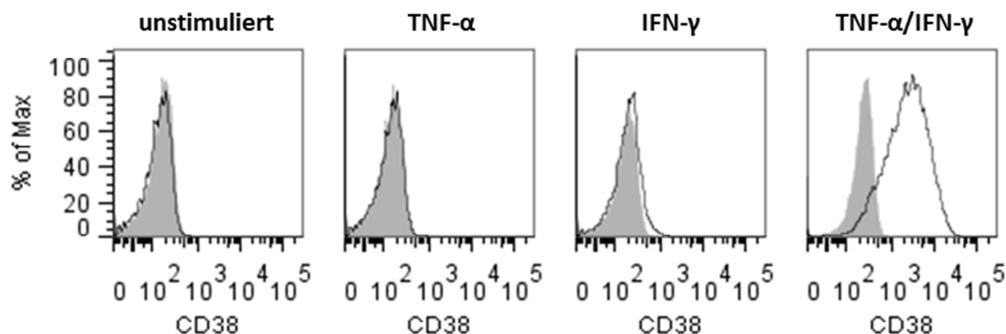


Abbildung 19: Abhängigkeit der CD38-Expression in MSCs von der Art des Stimulus: Unstimulierte BM-MSKs im Vergleich zu unterschiedlich stimulierten Zellen; die Stimulation erfolgte für 48 Std. jeweils mit TNF- α bzw. IFN- γ oder beiden Zytokinen in Kombination. Der Anteil an Zellen mit entsprechender CD38-Expressionsintensität ist in „% of Max“ angegeben. Grau schattierte Histogramme repräsentieren die Isotypkontrollen.

Unstimulierte Zellen zeigten wie erwartet keine CD38-Expression. Auffällig ist, dass weder die alleinige Stimulation mit TNF- α noch mit IFN- γ zu einer Induktion der CD38-Expression führte. Erst nach simultaner Zugabe beider Zytokine ließ sich CD38 auf der Zelloberfläche von BM-MSCs detektieren. Dies zeigt, dass von TNF- α und IFN- γ ein synergetischer Effekt ausgeht und nur in Gegenwart beider Faktoren eine CD38-Expression in MSCs zu erwarten ist.

4.2.2.4 CD157-Expression

Als zweiter Vertreter der CD38 Genfamilie besitzt CD157, das auch als BST-1 (*engl.* Bone marrow stromal cell antigen-1) bezeichnet wird, ähnliche enzymatische Eigenschaften wie CD38. Um neben dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die CD38-Expression auch die Auswirkungen auf die CD157-Expression zu untersuchen, wurden die Zellen für 48 Stunden mit TNF- α und IFN- γ stimuliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert (s. Abbildung 20). Im Gegensatz zu CD38 war die Expression von CD157 innerhalb einer jeweiligen Population homogen verteilt, so dass zur graphischen Darstellung des Expressionsverlaufes der relative GeoMean (CD157/Isotypkontrolle) über der Stimulationszeit aufgetragen wurde. Deutlich zu erkennen ist, dass CD157 im Unterschied zu CD38 bereits im unstimulierten Zustand (0 Stunden stimuliert) von MSCs exprimiert wurde. Dabei zeigten BM-MSCs insgesamt eine stärkere Expression, während AM-MSCs und UC-MSCs eine ähnliche Expression auf niedrigem Niveau aufwiesen. Die Stimulation der Zellen führte innerhalb der ersten 24 Stunden insbesondere in BM-MSCs zu einem Rückgang der CD157-Expression, die jedoch anschließend wieder anstieg, so dass in allen Zelltypen nach 48 Stunden das anfängliche Expressionslevel nahezu wieder erreicht wurde. Somit wurde die Expression von CD157 bei langanhaltender Stimulation insgesamt nur in geringem Maße beeinflusst.

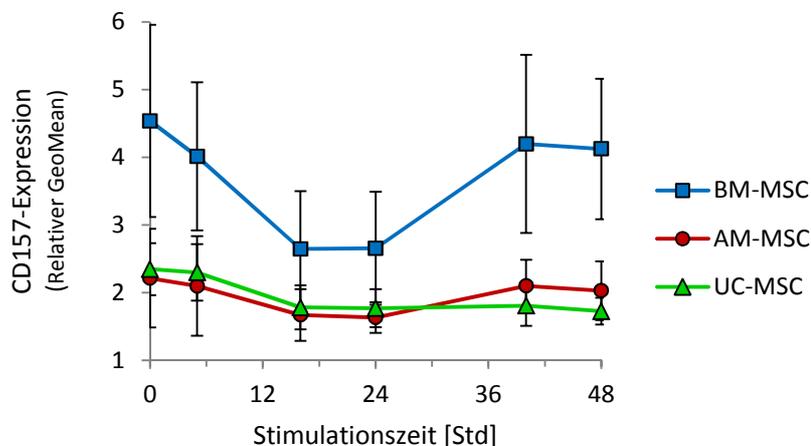


Abbildung 20: CD157-Proteinexpression in MSCs während 48 stündiger Stimulation mit TNF- α und IFN- γ . Im Diagramm ist die Expressionsintensität als relativer GeoMean im Verhältnis zur Isotypkontrolle über der Stimulationszeit aufgetragen.

4.2.3 Überexpression rekombinanter CD38-Varianten in UC-MSCs

4.2.3.1 Expressionsanalyse

Bisherige Studien zeigten, dass das Ektoenzym CD38 wichtige Funktionen bei Adhäsionsprozessen von Leukozyten übernimmt. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind dabei insbesondere auf die enzymatische Aktivität von CD38 zurückzuführen, indem es die Umsetzung von extrazellulärem NAD^+ in die Ca^{2+} -mobilisierenden Substanzen cADPR und ADPR katalysiert (Salmi & Jalkanen 2012). Ob MSCs enzymatisch aktives CD38 exprimieren und welche Rolle dies für Adhäsions- und Migrationsprozesse spielt, ist bisher gänzlich unbekannt und sollte im Weiteren untersucht werden. Da jedoch die Stimulation von MSCs mit proinflammatorischen Zytokinen nicht nur eine Induktion von CD38 bewirkt, sondern auch die Expression einer ganzen Reihe weiterer Faktoren beeinflusst, wurden neben der Charakterisierung von stimulierten, CD38-positiven MSCs aus allen drei Geweben, auch unstimulierte UC-MSCs analysiert, die rekombinantes CD38 überexprimierten. Für die Transduktion der UC-MSCs mit retroviralen Vektoren wurden die Zellen eines Spenders verwendet, die eine sehr homogene Morphologie sowie kurze Verdopplungszeiten aufwiesen und nach Puromycin-Selektion problemlos über mehrere Passagen kultiviert werden konnten. Neben Zellen, die die normale Form von CD38 überexprimierten (CD38^+), wurden darüber hinaus Zellen mit weiteren Varianten generiert. Eine am N-Terminus um 17 Aminosäuren verkürzte Form ($\Delta 17\text{-CD38}^+$), die nicht mehr über den intrazellulären Abschnitt verfügt, sollte Aufschluss darüber geben, ob dieser eine Rolle für die von CD38 vermittelten Mechanismen spielt (Sun et al. 2002). Über den Austausch der Aminosäure Glutamat durch Leucin an Position 226 wurde zusätzlich eine enzymatisch inaktive Variante von CD38 gewonnen (E226L-CD38^+), um Hinweise über die Funktion des aktiven Zentrums von CD38 im Kontext der Ca^{2+} -Mobilisierung zu erhalten (Munshi et al. 2000).

Mittels qRT-PCR und Durchflusszytometrie wurde die Expression der mit rekombinanten CD38-Varianten transduzierten UC-MSCs im Vergleich zu jeweils untransduzierten Zellen (wt) und der mock-transduzierten Kontrolle verifiziert (s. Abbildung 21). So zeigte die qRT-PCR, dass weder wt noch die mock-transduzierten UC-MSCs CD38-mRNA exprimierten, wohingegen die jeweils mit den CD38-Varianten transduzierten Zellen deutliche CD38-mRNA-Expression aufwiesen. Auch die Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse zur Bestimmung der CD38-Proteinexpression zeigten insgesamt eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenzsignale der CD38-Varianten gegenüber wt-Zellen und der mock-Kontrolle. Somit konnte bestätigt werden, dass alle drei CD38-Varianten von den UC-MSCs stabil exprimiert und zur Zelloberfläche gebracht werden.

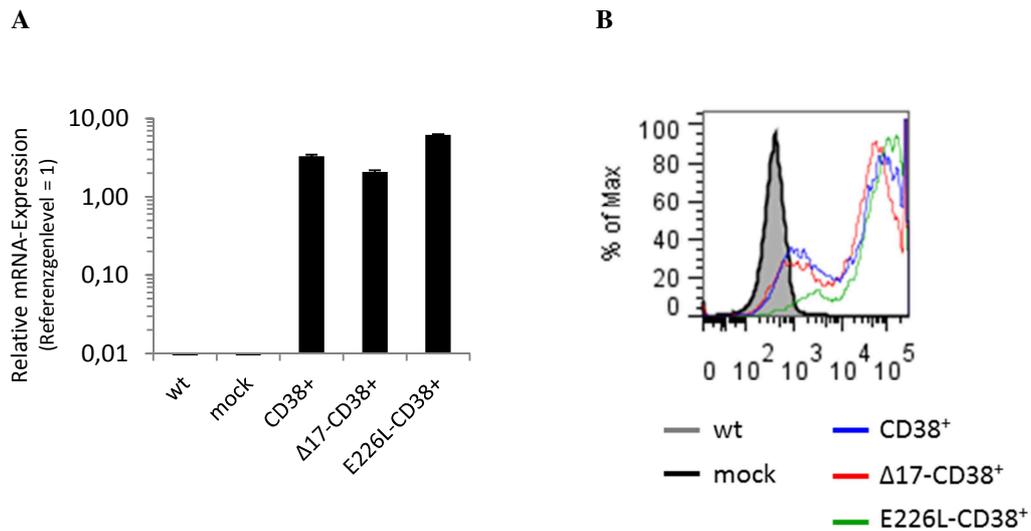


Abbildung 21: Expression der CD38-Varianten und der mock-Kontrolle in transgenen UC-MSCs im Vergleich zum Wildtyp (wt). A) qRT-PCR-Analyse zu Bestimmung der CD38-mRNA-Expression. B) Durchflusszytometrie zur Bestimmung der CD38-Proteinexpression. Der Anteil an Zellen mit entsprechender CD38-Expressionsintensität ist in „% of Max“ angegeben.

4.2.3.2 CD38-Enzymaktivität

CD38 ist ein multifunktionales Enzym, dessen extrazelluläre Domäne eine ADP-Ribosylzyklaseaktivität besitzt und die Umsetzung von NAD^+ in cADPR katalysiert. Dies wird als wichtiger Schritt der Leukozyten-Adhäsionskaskade diskutiert, bei dem das von geschädigtem Gewebe freigesetzte NAD^+ in cADPR bzw. dessen Folgeprodukt ADPR (cADPR-Hydrolaseaktivität von CD38) umgesetzt wird (Salmi & Jalkanen 2012). Sowohl cADPR als auch ADPR lösen durch Binden an intrazelluläre Regionen bestimmter Kanäle einen Ca^{2+} -Einstrom aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern oder extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen ins Zytosol der Leukozyten aus, der zu einer Reorganisation des Zytoskeletts sowie einer Änderung des Aktivitätszustandes bestimmter Integrine (Integrinaffinität) führt, woraus letztendlich ein verändertes Migrationsverhalten resultiert (Hyduk et al. 2007).

Um die ADP-Ribosylzyklaseaktivität und somit die Umsetzung von NAD^+ in cADPR in MSCs zu analysieren, wurde ein entsprechender Enzymaktivitätstest durchgeführt. In dem Test wurde als Substrat NGD^+ verwendet, das eine zu NAD^+ analoge Struktur aufweist und ausschließlich von ADP-Ribosylzyklasen wie CD38 oder CD157 zu cGDPR umgesetzt werden kann. Da cGDPR stabil und darüber hinaus ein Fluoreszenzprodukt ist, kann mittels photometrischer Analyse die Bildung von cGDPR auf einfache Weise quantifiziert werden (Graeff et al. 1994). Der Anstieg des Fluoreszenzsignals ist dabei direkt proportional zur

Menge des gebildeten Produkts cGDPR. So wurde in dem Enzymaktivitätstest zur Anregung von cGDPR eine Wellenlänge von 300 nm gewählt, während die Emission bei einer Wellenlänge von 410 nm detektiert wurde.

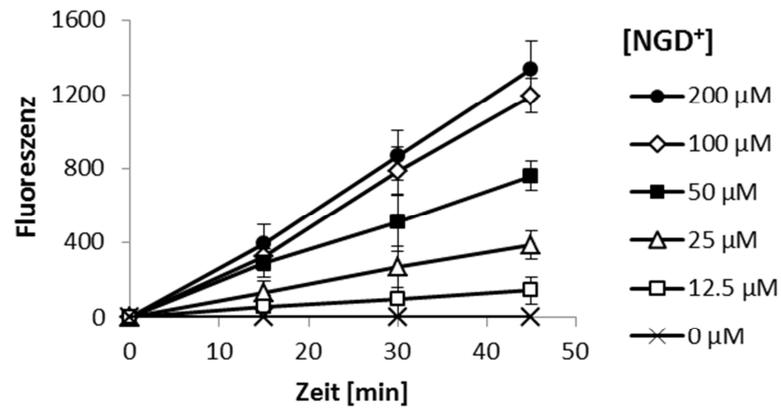


Abbildung 22: Zeit-Umsatz-Kurven: Umsatz von NGD⁺ zu cGDPR am Beispiel stimulierter UC-MSCs bei sechs verschiedenen NGD⁺-Konzentrationen.

Abbildung 22 zeigt am Beispiel stimulierter UC-MSCs eine so genannte Zeit-Umsatz-Kurve, in der für jede Substratkonzentration ([NGD⁺]) die Fluoreszenzintensität über der Zeit aufgetragen wurde. Aus den Steigungen der Zeit-Umsatz-Kurven, die die Änderung der Fluoreszenzintensität pro Zeiteinheit angeben, wurde die Geschwindigkeit des Substratumsatzes und damit der enzymatischen Reaktion ermittelt (s. Anhang Tabelle 28 Seite 155 ff.).

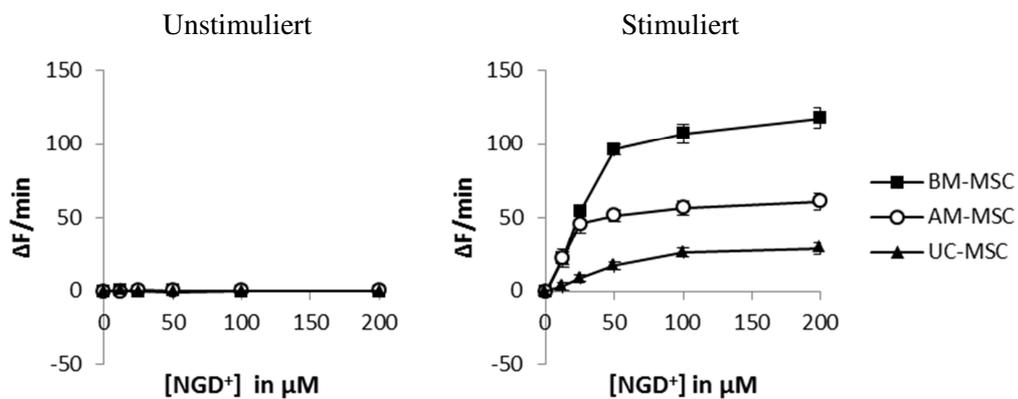


Abbildung 23: Michaelis-Menten-Diagramme der ADP-Ribosylzyklasereaktion in Zellhomogenaten jeweils unstimulierter und für 48 Stunden stimulierter MSCs.

Da es sich bei der Umsetzung von NGD^+ zu cGDPR um eine Ein-Substrat-Reaktion handelt, die der Michaelis-Menten-Kinetik folgt, wurde die Umsatzgeschwindigkeit über der entsprechenden NGD^+ -Konzentration aufgetragen. Die Diagramme in Abbildung 23 zeigen die enzymatische Aktivität in den Zellhomogenaten jeweils stimulierter und unstimulierter MSCs der drei Gewebetypen. Es ist eindeutig zu erkennen, dass lediglich stimulierte MSCs enzymatische Aktivität aufwiesen, wohingegen in unstimulierten Zellen keine Aktivität nachweisbar war. Dies bedeutet, dass MSCs erst nach Stimulation ADP-Ribosylzyklaseaktivität besitzen und dann potentiell NAD^+ in cADPR umsetzen können. Zur Beschreibung der ADPR-Ribosylzyklasereaktion in stimulierten MSCs wurden zunächst die Messwerte auf die im Test eingesetzte Zellmenge normiert (s. Anhang Tabelle 28, Seite 155). Anschließend wurden durch die Kurvenanpassung der Datenpunkte auf Grundlage der Michaelis-Menten-Gleichung die kinetischen Parameter K_m und V_{\max} berechnet.

$$v [\Delta F/min] = \frac{V_{\max} [\text{NGD}^+]}{K_m + [\text{NGD}^+]}$$

In Tabelle 21 sind die Parameter der Reaktion noch einmal zusammengefasst. Der K_m -Wert ist eine enzymspezifische Konstante und somit eine charakteristische Größe zur Beschreibung einer Enzymreaktion. Sie stellt die Affinität eines Enzyms zum Substrat dar und ist damit unabhängig von der Enzym- sowie der Substratkonzentration. Demgegenüber ist die maximale Umsatzgeschwindigkeit V_{\max} ein von der Enzymkonzentration abhängiger Wert, der mit steigender Enzymkonzentration zunimmt.

Tabelle 21: Enzymkinetische Parameter der Umsetzung NGD^+ zu cGDPR durch 48 Stunden stimulierte MSCs.

	BM-MSC	AM-MSC	UC-MSC
K_m [μM]	16,0	13,2	22,9
V_{\max} [$\Delta F/min$]	126,4	64,9	29,2

Die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter der ADP-Ribosylzyklasereaktion in stimulierten MSCs ergab K_m -Werte von 16,0 μM für BM-MSCs, 13,2 μM für AM-MSCs und 22,9 μM für UC-MSCs. Sie liegen somit recht genau in dem Bereich von 15-25 μM , der für CD38 in der Literatur angegeben ist (Graeff et al. 1994, Cakir-Kiefer et al. 2001). Darüber hinaus zeigten die stimulierten MSCs aus den drei Geweben unterschiedliche V_{\max} -Werte, die ein ähnliches Verhältnis wie die Intensitäten der CD38-Expression in den verschiedenen MSC-

Typen aufweisen. Die ermittelten kinetischen Parameter geben demnach einen Hinweis darauf, dass es sich bei der in stimulierten MSCs gemessenen ADP-Ribosylzyklaseaktivität um eine durch CD38 vermittelte Reaktion handelt. Am Beispiel stimulierter BM-MSCs konnte überdies durch Auftrennung des Homogenats in die zytosolische Fraktion und die Membranfraktion nachgewiesen werden, dass die Enzymaktivität auf der Membran lokalisiert ist, da nur diese Fraktion Aktivität zeigte (s. Anhang Abbildung 41, Seite 157).

Ähnlich der Analyse von stimulierten MSCs wurde darüber hinaus die ADP-Ribosylzyklaseaktivität in den Zellhomogenaten der CD38-transgenen UC-MSCs, die ebenfalls in Membranfraktion und zytosolische Fraktion aufgetrennt wurden, gemessen und die entsprechenden Umsatzgeschwindigkeiten ermittelt (s. Anhang Tabelle 29, Seite 158 ff.). Diese wurden anschließend in Michaelis-Menten-Diagrammen über der Zeit aufgetragen (s. Abbildung 24). Von den transgenen UC-MSCs zeigten die Membranfraktionen der Zellen mit normalem CD38, wie auch mit der verkürzten $\Delta 17$ -CD38-Variante eine deutliche Enzymaktivität. Die Zellen mit mutiertem CD38 (E226L-CD38⁺), die mock-Kontrolle und der wt waren enzymatisch inaktiv. In der jeweiligen zytosolischen Fraktion von CD38⁺- und $\Delta 17$ -CD38⁺-Zellen wurde zwar eine minimale enzymatische Aktivität detektiert, die aber mit hoher Wahrscheinlichkeit auf restliche Spuren von Membranpartikeln zurückgeführt werden kann. Die Ergebnisse zeigen, dass die von CD38 ausgehende Enzymaktivität wie bei stimulierten MSCs auf der Membran lokalisiert ist.

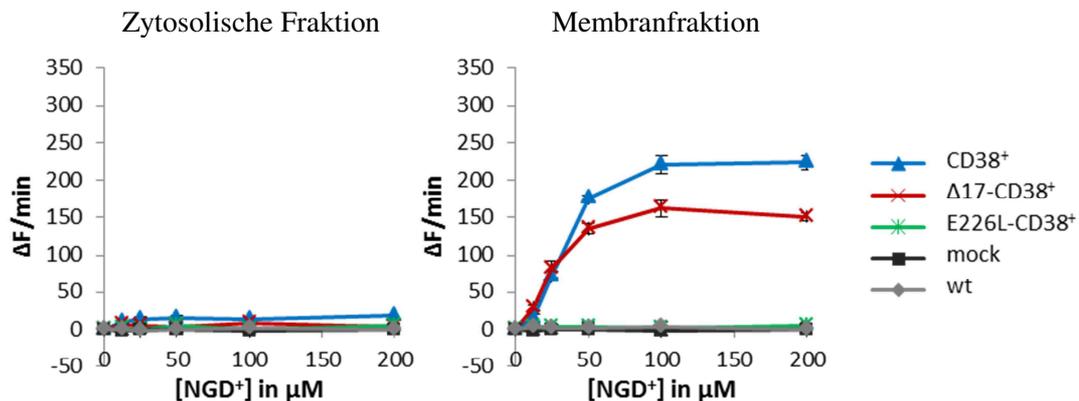


Abbildung 24: Michaelis-Menten-Diagramme der ADP-Ribosylzyklaseaktivität in den Überständen und Membranfraktionen der Zellhomogenate transgener UC-MSCs.

Die enzymkinetischen Parameter der transgenen Zellen wurden ebenfalls über die Kurvenanpassung der Datenpunkte auf Grundlage der Michaelis-Menten-Gleichung bestimmt und sind in der Tabelle 22 zusammengefasst. Bedingt durch die starke Überexpression der jeweiligen CD38-Varianten in den UC-MSCs fielen die V_{\max} -Werte mit 223,8 $\Delta F/\min$ (CD38⁺)

und 161,9 $\Delta F/\text{min}$ ($\Delta 17\text{-CD38}^+$) entsprechend hoch aus und lagen damit deutlich über denen der stimulierten Zellen (vgl. Tabelle 21). Die jeweiligen K_m -Werte betragen 21,9 μM bei CD38^+ - bzw. 15,2 μM bei $\Delta 17\text{-CD38}^+$ -Zellen und lagen somit in dem für CD38 angegebenen Konzentrationsbereich von 15-25 μM (Graeff et al. 1994, Cakir-Kiefer et al. 2001).

Tabelle 22: Enzymkinetische Parameter der Umsetzung von NAD^+ zu cADPR durch transgene UC-MSCs.

	CD38⁺	$\Delta 17\text{-CD38}^+$	E226L-CD38⁺
K_m [μM]	21,9	15,2	0,0
V_{max} [$\Delta F/\text{min}$]	223,8	161,9	0,0

Aufgrund der Spezifität des Enzymaktivitätstests verdeutlichen die Ergebnisse aus der Analyse transgener UC-MSCs, dass die auf stimulierten MSCs gemessene ADP-Ribosylzyklaseaktivität mit hoher Wahrscheinlichkeit auf CD38 zurückzuführen ist, diese Zellen also potentiell NAD^+ in cADPR umsetzen können. Wie erwartet konnte anhand der enzymatisch aktiven $\Delta 17\text{-CD38}$ -Variante gezeigt werden, dass der kurze intrazelluläre Abschnitt des CD38-Moleküls keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität von CD38 nimmt. Darüber hinaus bestätigte die enzymatisch inaktive Mutante E226L-CD38, dass Glutamat-226 einen essentiellen Aminosäurerest für die Enzymreaktion darstellt und ohne das intakte katalytisch aktive Zentrum keine Umsetzung von NAD^+ in cADPR durch CD38 stattfinden kann.

4.2.4 Ca^{2+} -Mobilisierung

4.2.4.1 Ca^{2+} -Flux-Messungen in MSCs

Durch die enzymatische Aktivität von CD38 wird extrazelluläres NAD^+ in cADPR (ADP-Ribosylzyklaseaktivität) sowie ADPR (cADPR-Hydrolaseaktivität) umgesetzt, die über einen noch nicht aufgeklärten Mechanismus ins Zellinnere transportiert werden und über IP_3 -unabhängige Wege Ca^{2+} -Mobilisierung (Ca^{2+} -Flux) ins Zytoplasma induzieren. Während cADPR über die Interaktion mit dem cADPR-sensitiven Ryanodin-Rezeptor (RyR) zur Ca^{2+} -Mobilisierung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern führt, löst ADPR in erster Linie über die Aktivierung des auf der Oberflächenmembran lokalisierten Ca^{2+} -Kanals TRMP2 einen Einstrom extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen in das Zytoplasma aus (Sumoza-Toledo & Penner 2011). Die daraus resultierenden, kurzzeitigen Anstiege der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration können zu einer Reorganisation des Zytoskeletts und somit zu einer Änderung des

Migrationsverhaltens der Zellen führen (Sanchez-Madrid & del Pozo 1999). Um die Rolle von CD38 bei der Ca^{2+} -Mobilisierung in MSCs zu untersuchen, wurde ein so genannter Ca^{2+} -Flux-Test durchgeführt. In diesem Test wurden in unstimulierten und für 48 Stunden stimulierten MSCs aller drei Gewebearten, sowie in den CD38-transgenen UC-MSCs das Ca^{2+} -Signal als Reaktion auf die Zugabe von NAD^+ , cADPR und ADPR analysiert. Zur photometrischen Detektion der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurden die Zellen unmittelbar vor dem Test mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 beladen. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte im FLIPR[®] Tetra HTC Screening System (*engl.* Fluorometric Imaging Plate Reader). Um die Intensitäten der verschiedenen Zellen quantifizieren und miteinander vergleichen zu können, wurden die MSCs stets in einer definierten Zellzahl im Test eingesetzt. Zur Ermittlung der adäquaten Substratkonzentration, die ein differenziertes Auslösen eines Ca^{2+} -Einstroms in verschiedenen MSC-Typen sowohl im unstimulierten als auch stimulierten Zustand bewirkt, wurde im Vorfeld eine NAD^+ -Titration durchgeführt (s. Anhang Abbildung 43, Seite 161). Für jede verwendete Substratkonzentration wurden Achtfachbestimmungen durchgeführt. Die einzelnen Graphen der Mehrfachbestimmungen aller Substrate und Zelltypen sind im Anhang beigefügt (s. Anhang Abbildung 44, Seite 163).

Einfluss von NAD^+

Um einen durch NAD^+ induzierten Ca^{2+} -Einstrom in MSCs zu untersuchen, wurde NAD^+ in einer Konzentration von 200 μM zu jeweils unstimulierten und stimulierten Zellen gegeben und alle 0,5 Sekunden das durch die Reaktion der Ca^{2+} -Ionen mit dem Farbstoff hervorgerufene Fluoreszenzsignal detektiert. Der Verlauf des Ca^{2+} -Signals wurde über insgesamt 120 Sekunden verfolgt (s. Abbildung 25 A-C). Die Kurven bilden dabei den Durchschnitt der Achtfachbestimmungen ab. Durch die Zugabe von NAD^+ konnte in den MSCs der verschiedenen Gewebe ein Ca^{2+} -Flux-Signal induziert werden. Dieses zeigte stets den für Ca^{2+} -Signale typischen Kurvenverlauf, der durch einen raschen Anstieg, also einen schnellen Ca^{2+} -Einstrom, sowie einem verzögerten Abfall gekennzeichnet ist, der auf den aktiven Transport der Ca^{2+} -Ionen durch Ca^{2+} -Pumpen aus dem Zytoplasma in intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher bzw. in den extrazellulären Raum zurückzuführen ist. Insgesamt wurde in den stimulierten MSCs aller drei Gewebe stets ein deutlich höheres Signal detektiert als in den jeweils unstimulierten Zellen. Im Falle unstimulierter BM-MSCs wurde im Vergleich zu den unstimulierten Zellen der anderen Gewebe noch das höchste Signal gemessen. So konnte in unstimulierten UC-MSCs ein sehr schwacher, in unstimulierten AM-MSCs jedoch überhaupt kein Ca^{2+} -Einstrom induziert werden. In den jeweils stimulierten Zellen kam es beim Vergleich der drei Gewebe zu sehr differenzierten Signalen. So wurde das höchste Signal in stimulierten BM-MSCs, in AM-MSCs ein schwächeres Signal und das niedrigste Signal in UC-MSCs gemessen.

Um die Stärke der jeweiligen Ca^{2+} -Flux-Signale zu quantifizieren und vergleichen zu können, wurden mittels Kurvenanpassung die Flächen unter den Kurven ermittelt (XLfit: Spline-Interpolation) und diese auf die Intensität stimulierter BM-MSCs (100 %), die das stärkste Signal zeigten, normiert (s. Abbildung 25 D).

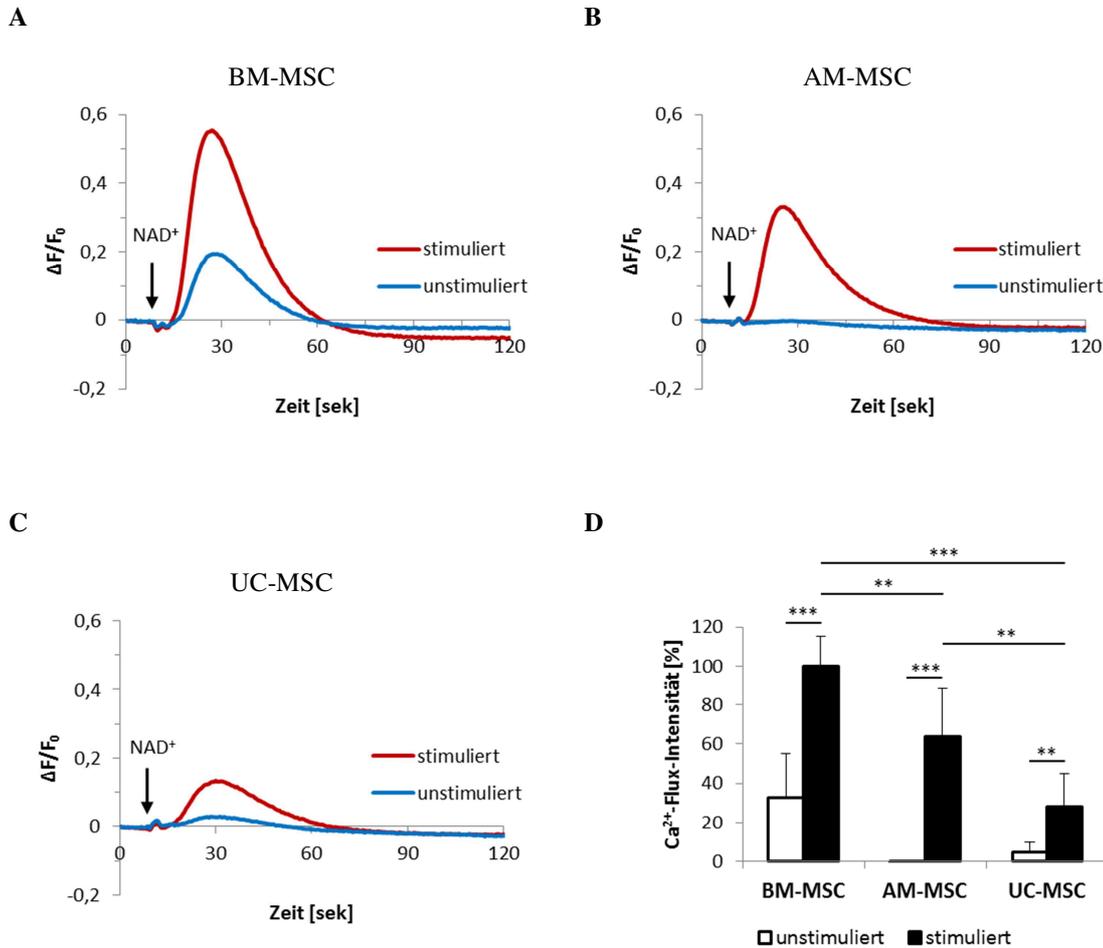


Abbildung 25: A-C) Ca^{2+} -Mobilisierung (Ca^{2+} -Flux) in stimulierten und unstimulierten BM-, AM- und UC-MSCs nach Zugabe von $200 \mu\text{M}$ NAD^+ . Die Diagramme zeigen die Änderung des Fluoreszenzsignals (F) im Verhältnis zum Ausgangssignal (F_0) über der Zeit. D) Flächen unter den Kurven normiert auf das Signal stimulierter BM-MSCs (100 %).

Das Diagramm verdeutlicht noch einmal die signifikanten Unterschiede in den Reaktionen der verschiedenen MSC-Typen auf die Zugabe von NAD^+ . Beim Vergleich stimulierter Zellen aus den verschiedenen Geweben untereinander zeigten AM-MSCs eine Intensität von 64 % und UC-MSCs von 28 % des BM-MSC Signals. Wie schon die Unterschiede in der Enzymaktivität spiegeln die Abstufungen der NAD^+ -induzierten Ca^{2+} -Signale in stimulierten MSCs die divergente CD38-Expression der drei MSC-Typen wider.

Einfluss der enzymatischen Produkte ADPR und cADPR

Um weitere Hinweise darauf zu bekommen, ob CD38 als der entscheidende Faktor zur NAD^+ -induzierten Ca^{2+} -Mobilisierung in MSCs fungiert und CD38 darüber hinaus auch im Zusammenhang mit dem Transport der enzymatischen Produkte ADPR bzw. cADPR ins Zellinnere steht, wurde in weiteren Analysen das Ca^{2+} -Signal nach Zugabe von 200 μM ADPR und 400 μM cADPR gemessen (s. Abbildung 26 A-C & Abbildung 27 A-C). Die Kurven bilden dabei im Falle von ADPR den Durchschnitt aus Achtfachbestimmungen und bei cADPR von Sechsfachbestimmungen ab.

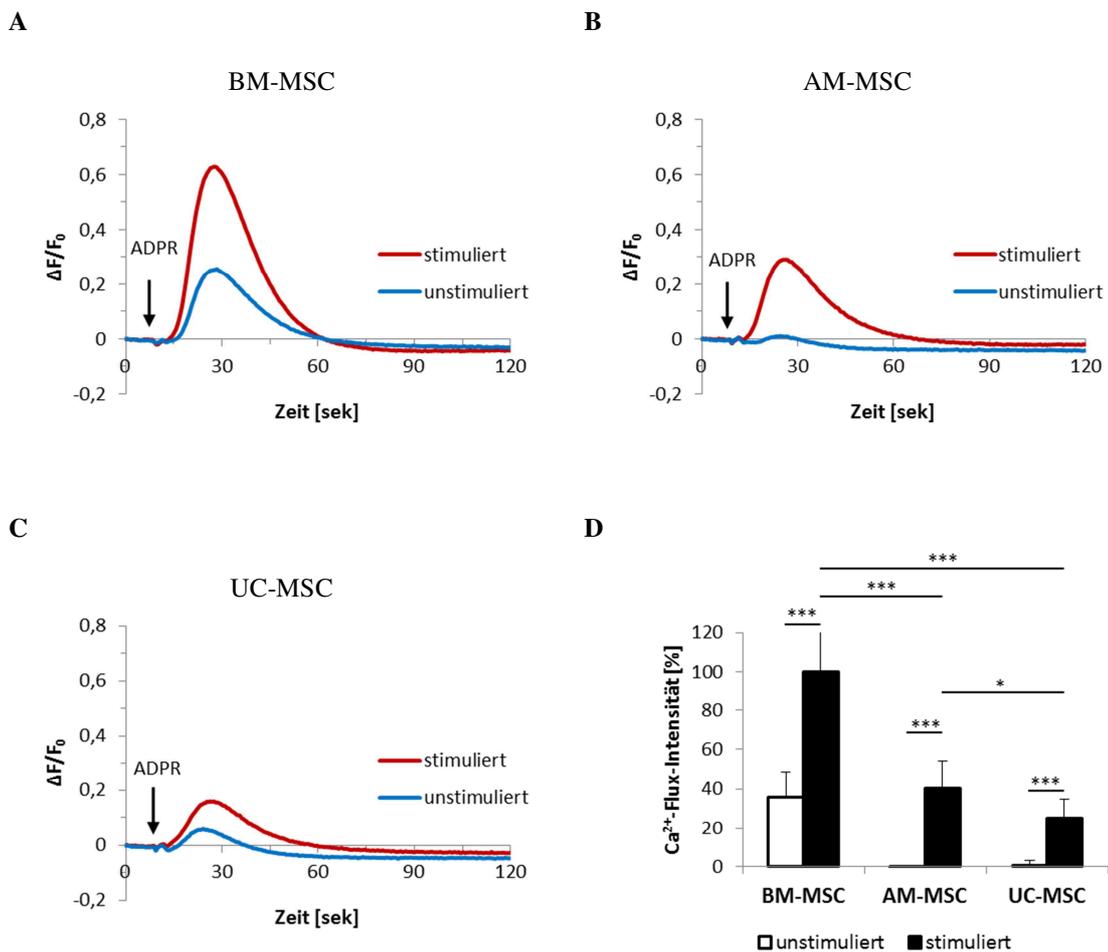


Abbildung 26: A-C) Ca^{2+} -Mobilisierung (Ca^{2+} -Flux) in stimulierten und unstimulierten BM-, AM- und UC-MSCs nach Zugabe von 200 μM ADPR. Die Diagramme zeigen die Änderung des Fluoreszenzsignals (F) im Verhältnis zum Ausgangssignal (F_0) über der Zeit. D) Flächen unter den Kurven normiert auf das Signal stimulierter BM-MSCs (100 %).

Die Diagramme zeigen, dass sämtliche MSCs wie im Falle der NAD^+ -induzierten Ca^{2+} -Mobilisierung, in sehr ähnlicher Weise auf die Zugabe der enzymatischen Produkte ADPR und cADPR reagierten. So zeigten auch hier die stimulierten Zellen stets ein deutlich höheres

Signal als die jeweils unstimulierten Zellen eines MSC-Typs. Dabei wurde in unstimulierten BM-MSCs im Vergleich zu unstimulierten AM- und UC-MSCs noch das höchste Signal detektiert. Diese zeigten als Antwort auf ADPR- bzw. cADPR-Zugabe nur schwachen Ca^{2+} -Flux, wobei UC-MSCs stets ein minimal höheres Signal als AM-MSCs lieferten. Im Falle stimulierter MSCs kam es beim Vergleich der drei Gewebearten untereinander ebenfalls zu den Abstufungen in den Signalen der Ca^{2+} -Mobilisierung. Stimulierte BM-MSCs zeigten die höchste Intensität, während in AM-MSCs ein schwächerer und in UC-MSCs der niedrigste Ca^{2+} -Einstrom gemessen wurde.

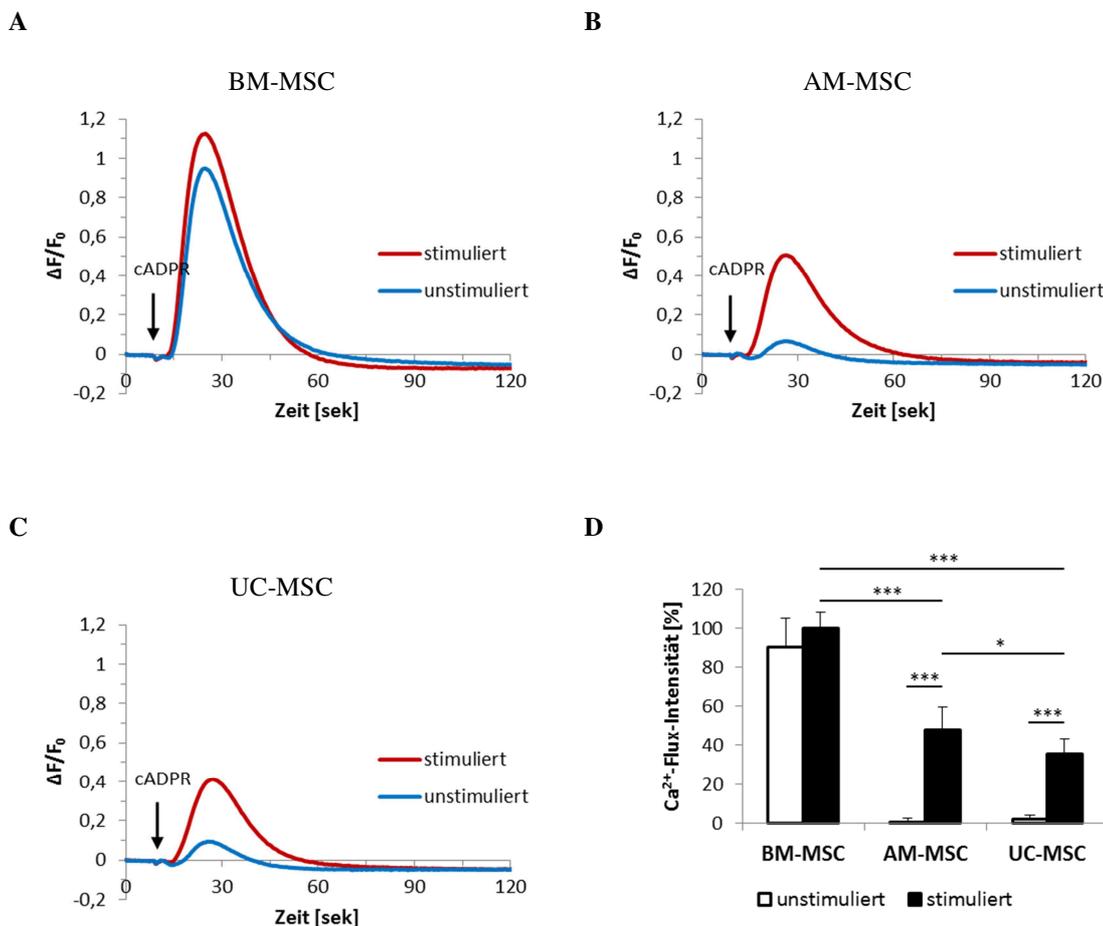


Abbildung 27: A-C) Ca^{2+} -Mobilisierung (Ca^{2+} -Flux) in stimulierten und unstimulierten BM-, AM- und UC-MSCs nach Zugabe von $400 \mu\text{M}$ cADPR. Die Diagramme zeigen die Änderung des Fluoreszenzsignals (F) im Verhältnis zum Ausgangssignal (F_0) über der Zeit. D) Flächen unter den Kurven normiert auf das Signal stimulierter BM-MSCs (100 %).

Zur Quantifizierung der ADPR- bzw. cADPR-induzierten Ca^{2+} -Signale wurden die Flächen unter den Ca^{2+} -Flux Kurven berechnet und auf die Intensität stimulierter BM-MSCs (100 %) normiert (s. Abbildung 26 D & Abbildung 27 D). Diese verdeutlichen noch einmal die

signifikanten Unterschiede in den Ca^{2+} -Flux-Signalen. Beim Vergleich der jeweils stimulierten Zellen der verschiedenen MSC-Typen zeigten AM-MSCs durch Zugabe von ADPR eine Intensität von 40 % und UC-MSCs eine Intensität von 25 % des BM-MSC Signals, im Falle der Zugabe von cADPR wurden in AM-MSCs 48 % und in UC-MSCs 35 % des BM-MSC Signals gemessen.

4.2.4.2 Ca^{2+} -Flux in CD38-transgenen UC-MSCs

Um zu verifizieren, dass CD38 an der Vermittlung des durch NAD^+ -induzierten Ca^{2+} -Einstroms in MSCs beteiligt ist, wurden die mit den CD38-Varianten transduzierten UC-MSCs im Vergleich mit dem wt und den mock-transduzierten Zellen ebenfalls mittels Ca^{2+} -Flux-Test analysiert (s. Abbildung 28 A-C).

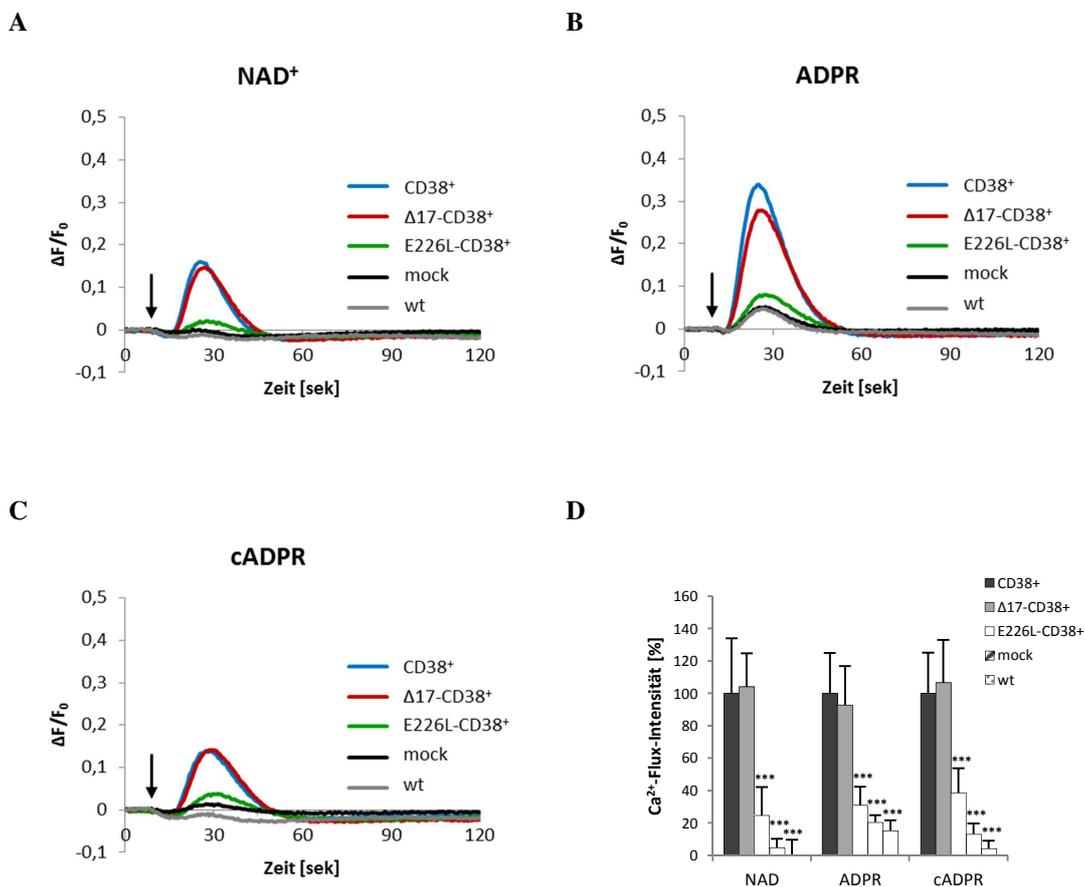


Abbildung 28: Ca^{2+} -Mobilisierungssignale (Ca^{2+} -Flux) in CD38-transgenen UC-MSCs: A-C) Ca^{2+} -Flux nach jeweiliger Zugabe von 200 μM NAD^+ , ADPR und cADPR. Gezeigt ist die Änderung des Fluoreszenzsignals (F) im Verhältnis zum Ausgangssignal (F_0) über der Zeit. D) Quantifizierung der Ca^{2+} -Flux-Intensität durch Berechnung der Signalthöhen normiert auf das Signal in CD38^+ -UC-MSCs (100 %).

Zum Auslösen des Ca^{2+} -Fluxes wurden NAD^+ , ADPR und cADPR jeweils in einer Konzentration von 200 μM eingesetzt. Sowohl wt als auch mock-Kontrolle zeigten keine Reaktion auf die Zugabe von NAD^+ oder cADPR und jeweils nur ein schwaches Signal bei der Zugabe von ADPR. Demgegenüber konnte in CD38^- - und $\Delta 17\text{-CD38}^+$ -Zellen durch alle Substanzen ein deutlicher Ca^{2+} -Einstrom ins Zytoplasma ausgelöst werden. Am stärkste reagierten die Zellen dabei auf die Zugabe von ADPR. Auffällig ist, dass beide Varianten dabei unabhängig von der zugebenen Substanz stets exakt dieselbe Reaktion zeigten. Im Vergleich dazu wurde bei den Zellen mit der enzymatisch inaktiven Mutante E226L-CD38 nur ein äußerst schwacher Ca^{2+} -Einstrom detektiert.

Zur Quantifizierung der durch die verschiedenen Substanzen ausgelösten Ca^{2+} -Signale wurde die maximale Signalthöhe der jeweiligen Kurven berechnet (s. Abbildung 28 D). Sie verdeutlichen noch einmal die signifikant differenzierte Induzierbarkeit des Ca^{2+} -Einstroms in den unterschiedlichen CD38-Varianten. Die Ergebnisse bestätigten somit, dass CD38 beim Auslösen von NAD^+ -induzierten Ca^{2+} -Signalen in MSCs beteiligt und dabei nicht auf seinen intrazellulären Abschnitt angewiesen ist. Darüber hinaus geben die schwachen Reaktionen der Mutante E226L-CD38 einen deutlichen Hinweis darauf, dass die Produkte der Enzymreaktion cADPR und ADPR in erster Linie über das katalytische Zentrum von CD38 ins Zellinnere transportiert werden, um den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen auszulösen. Die einzelnen Graphen der Mehrfachbestimmungen befinden sich im Anhang (s. Anhang Abbildung 45, Seite 166).

4.2.5 Extrazelluläres Calcium und TRPM2-Expression

4.2.5.1 Ca^{2+} -Flux in MSCs im Ca^{2+} -freien Milieu

Von den Reaktionsprodukten, die durch die ADP-Ribosylzyklase- bzw. cADPR-Hydrolaseaktivität von CD38 gebildet werden, bewirkt cADPR im Allgemeinen eine Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern wie dem endoplasmatischen Retikulum, während durch ADPR in erster Linie Ca^{2+} über die Aktivierung von TRPM2-Kanälen auf der Plasmamembran aus dem extrazellulären Milieu mobilisiert wird (Sumoza-Toledo & Penner 2011). Um zu überprüfen über welchen Weg die Ca^{2+} -Ionen bei einem NAD^+ -induzierten Einstrom ins Zytoplasma der MSCs gelangen, wurden die Ca^{2+} -Flux-Messungen mit 48 Stunden stimulierten MSCs aller drei Gewebe zum einen in Anwesenheit von EDTA (s. Abbildung 29 A) und in einem weiteren Ansatz in Ca^{2+} -freiem Puffer durchgeführt (s. Abbildung 29 B).

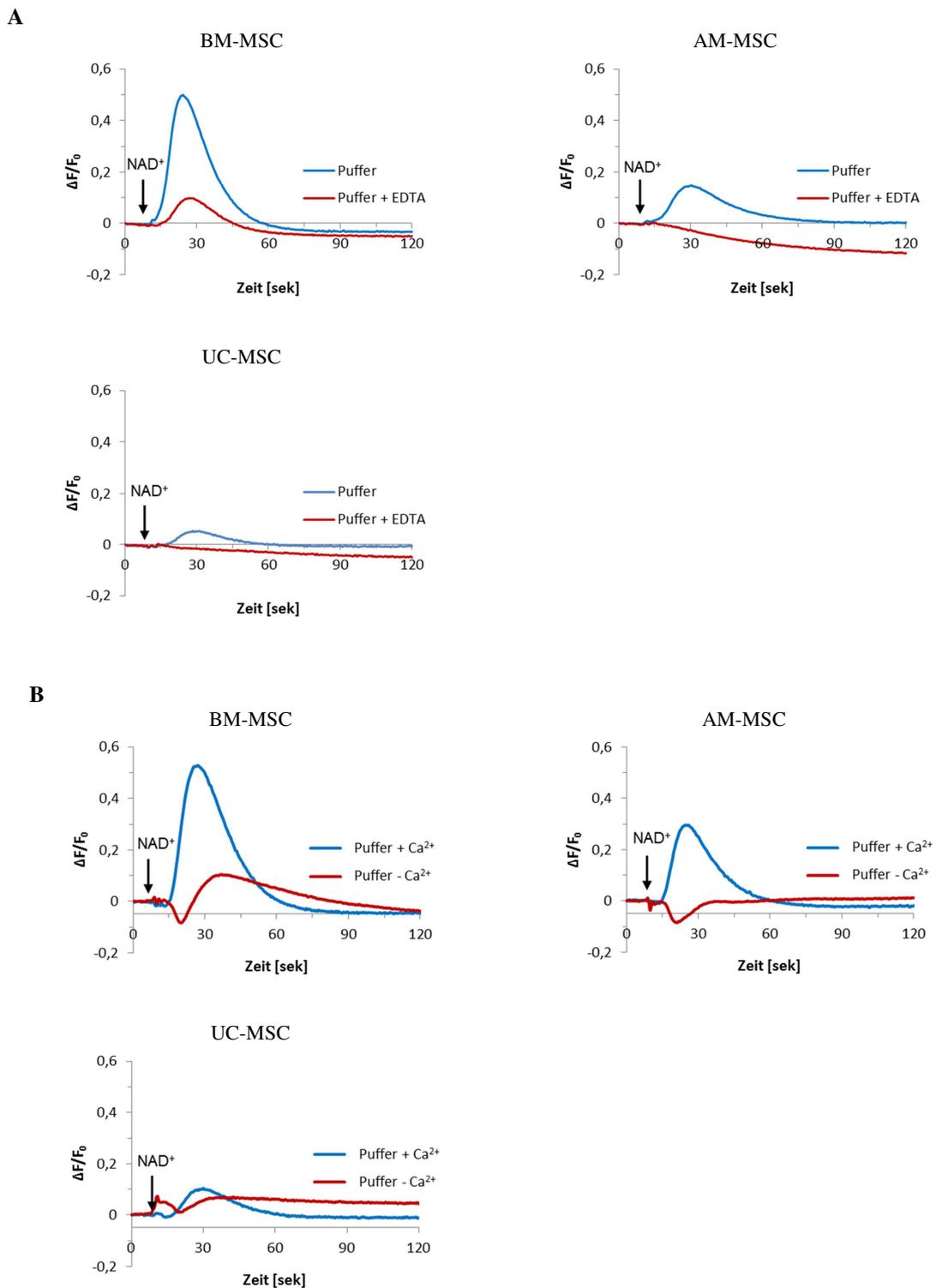


Abbildung 29: Ca^{2+} -Mobilisierung (Ca^{2+} -Flux). Gezeigt ist die Änderung des Fluoreszenzsignals (F) im Verhältnis zum Ausgangssignal (F_0) über der Zeit. A) Auswirkungen der Reduktion der extrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ auf den NAD^+ -induzierten Ca^{2+} -Einstrom in 48 Stunden stimulierten MSCs durch Zugabe von 2 mM EDTA vor der Zugabe von NAD^+ . B) Auswirkungen der Reduktion der extrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ auf den NAD^+ -induzierten Ca^{2+} -Einstrom in 48 Stunden stimulierten MSCs durch Austausch des Testpuffers durch Ca^{2+} -freien Puffer vor der Zugabe von NAD^+ .

Sowohl bei Zugabe von EDTA zur Komplexierung extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen als auch bei Verwendung Ca^{2+} -freien Puffers konnte in stimulierten BM-MSCs nur noch eine schwache Reaktion beobachten werden. In stimulierten AM- und UC-MSCs führten beide Bedingungen zu einem kompletten Einbruch des Ca^{2+} -Fluxes. Die Daten legen nahe, dass der durch NAD^{+} -induzierte Ca^{2+} -Einstrom in CD38-positiven MSCs in erster Linie über Kanäle auf der Plasmamembran aus dem extrazellulären Milieu erfolgt.

4.2.5.2 Nachweis des Ca^{2+} -Kanals TRPM2

Der auf der Plasmamembran lokalisierte Ca^{2+} -Kanal TRPM2, ein Mitglied der TRP-Superfamilie, besitzt auf der intrazellulären NUD9-H Domäne eine ADPR-Bindungsstelle (Sumoza-Toledo & Penner 2011).

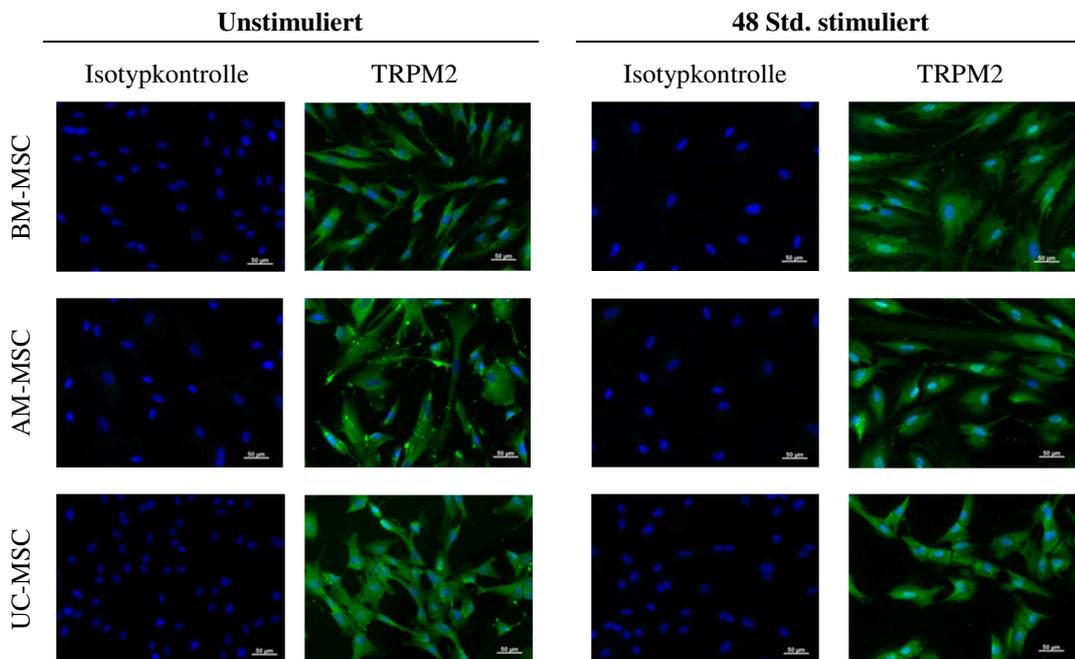


Abbildung 30: Expression des Ca^{2+} -Kanals TRPM2 in MSCs. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm .

Über die Bindung zytosolischen ADPRs wird ein Ca^{2+} -Einstrom durch den TRMP2-Kanal ins Zellinnere induziert, der durch Ca^{2+} -Ionen und auch von cADPR noch einmal weiter verstärkt wird. Mittels immunzytochemischer Färbung konnte die Expression von TRPM2 sowohl in unstimulierten wie auch für 48 Stunden stimulierten MSCs aller drei Gewebe verifiziert werden (s. Abbildung 30). TRPM2 bildet somit ein potentielles Einfallstor über das Ca^{2+} -Ionen, ausgelöst durch die Bindung von ADPR, ins Zellinnere von MSCs gelangen können.

4.2.6 Potentielle Rolle von CD38 bei der Migration von MSCs

Die Ca^{2+} -Flux-Tests zeigten, dass sich durch Zugabe von NAD^+ und den Produkten der Enzymreaktion in Abhängig von CD38 ein Ca^{2+} -Einstrom in MSCs induzieren lässt. Bisher ist jedoch ungeklärt, inwieweit ein durch CD38 vermittelter Ca^{2+} -Einstrom Einfluss auf das Migrationsverhalten von MSCs nimmt. Um dies zu untersuchen, wurde unter Verwendung eines Zwei-Kammern-Systems ein Migrationstest mit den transgenen UC-MSCs (CD38^+ , $\Delta 17\text{-CD38}^+$, E226L- CD38^+ , mock-Kontrolle) durchgeführt. Dazu wurden die feinporigen PET-Membranen (Porengröße 8 μm), die jeweils die oberen und unteren Kammern voneinander trennen, beidseitig mit Fibronectin beschichtet und die Zellen in einer definierten Zellmenge in die oberen Kammern gegeben. Anschließend wurden jeweils 200 μM (entspricht der Konzentration im Ca^{2+} -Flux-Test; vgl. Abschnitt 4.2.4) und 20 μM NAD^+ (entspricht dem K_m -Wert von CD38 für NAD^+ ; vgl. Tabelle 21 und Tabelle 22) sowie Puffer ohne NAD^+ zu den Zellen pipettiert. Je Konzentration wurden dabei Vierfachbestimmungen durchgeführt. Das an den Goldelektroden der jeweiligen Membranunterseite durch migrierte Zellen erzeugte Signal (Impedanz) wurde alle fünf Minuten detektiert und über insgesamt 12 Stunden aufgezeichnet. Zur graphischen Darstellung des Migrationsverlaufs wurde das Impedanzsignal über der Zeit aufgetragen (s. Abbildung 31).

Die Zugabe von NAD^+ führte in allen vier CD38-Varianten stets zu einer deutlichen Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit. Bemerkenswert ist, dass unabhängig von der jeweiligen Variante sowohl bei einer Konzentration von 200 μM als auch bei 20 μM NAD^+ exakt derselbe Effekt beobachtet werden konnte. Da sich der Effekt auch bei Zellen, die kein CD38 exprimierten (mock-Kontrolle) und bei Zellen mit enzymatisch inaktivem CD38 (E226L-CD38) zeigte, kann dieser somit nicht auf CD38 zurückgeführt werden. Überdies deuten die Daten daraufhin, dass die reduzierte Migrationsgeschwindigkeit nicht durch einen NAD^+ -induzierten Ca^{2+} -Einstrom bedingt sein kann, da in den vorherigen Ca^{2+} -Flux-Analysen selbst in CD38-positiven UC-MSCs kein Ca^{2+} -Einstrom bei Zugabe von weniger als 100 μM NAD^+ ausgelöst werden konnte (s. Anhang Abbildung 43, Seite 161). Auch in einem weiteren Ansatz, in dem ADPR in gleicher Weise wie zuvor NAD^+ auf die Zellen gegeben und die Migration analysiert wurde, konnte unabhängig von der ADPR-Konzentration eine verminderte Migrationsgeschwindigkeit der Zellen und somit derselbe Effekt wie bei NAD^+ beobachtet werden (s. Anhang Abbildung 47, Seite 170).

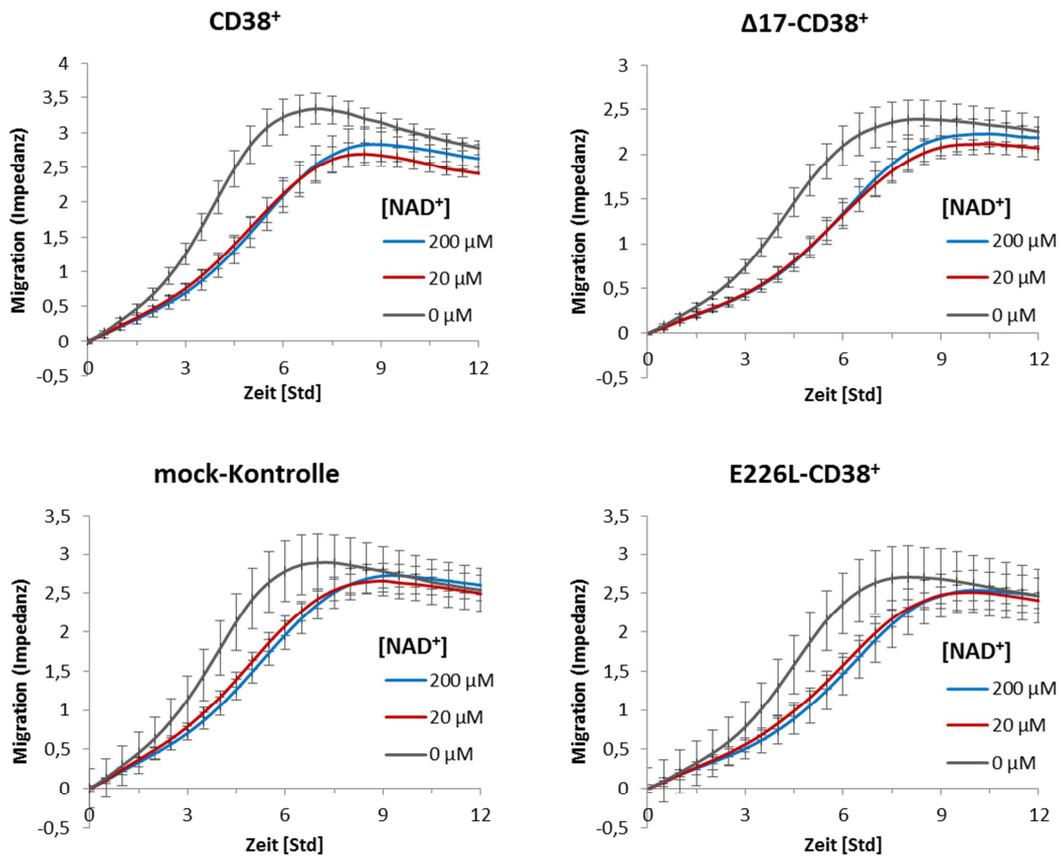


Abbildung 31: Migrationstest im Zwei-Kammern-System zur Analyse der Rolle von CD38 bei der Migration von MSCs: Einfluss von jeweils 200 μM (blaue Kurven), 20 μM (rote Kurven) und 0 μM (graue Kurven) NAD⁺ auf die Migrationsgeschwindigkeit von transgenen UC-MSCs (CD38⁺, Δ17-CD38⁺, E226L-CD38⁺, mock-Kontrolle) über einen Zeitraum von 12 Stunden. Das an den Goldelektroden auf den Unterseiten der PET-Membranen gemessene Impedanzsignal ist dabei proportional zur Anzahl migrierter Zellen.

4.2.7 Expressionsanalyse weiterer Ektoenzyme in MSCs

4.2.7.1 mRNA-Expressionsanalyse

Neben den klassischen Adhäsionsfaktoren, wie Integrinen, Selektinen und Chemokinrezeptoren bzw. deren Liganden, spielen die NAD⁺-metabolisierenden Ektoenzyme CD38 und CD157 eine wichtige Rolle während der Leukozyten-Adhäsionskaskade, indem sie über die Aktivierung Ca²⁺-abhängiger Signalwege Einfluss auf das Migrationsverhalten von Leukozyten nehmen. Darüber hinaus deuten Ergebnisse neuerer Studien darauf hin, dass weitere Ektoenzyme an diesem Prozess beteiligt sind und einen entscheidenden Beitrag zum Austritt der Leukozyten aus dem Blutstrom leisten (Salmi & Jalkanen 2012). So werden bestimmte Vertreter der Nukleotidasen, Peptidasen bzw. Proteasen und Oxidasen, die von

Leukozyten aber auch von Endothelzellen exprimiert werden, als wichtige Faktoren für den komplexen Ablauf beschrieben (s. Abbildung 5).

Um MSCs hinsichtlich der Expression ausgewählter Ektoenzyme und den Einfluss der Stimulation auf diese zu untersuchen, wurden Zellen von je drei Spendern pro MSC-Typ für 24 Stunden stimuliert und die mRNA-Expression von unstimulierten sowie den stimulierten Zellen mittels qRT-PCR analysiert (s. Abbildung 32).

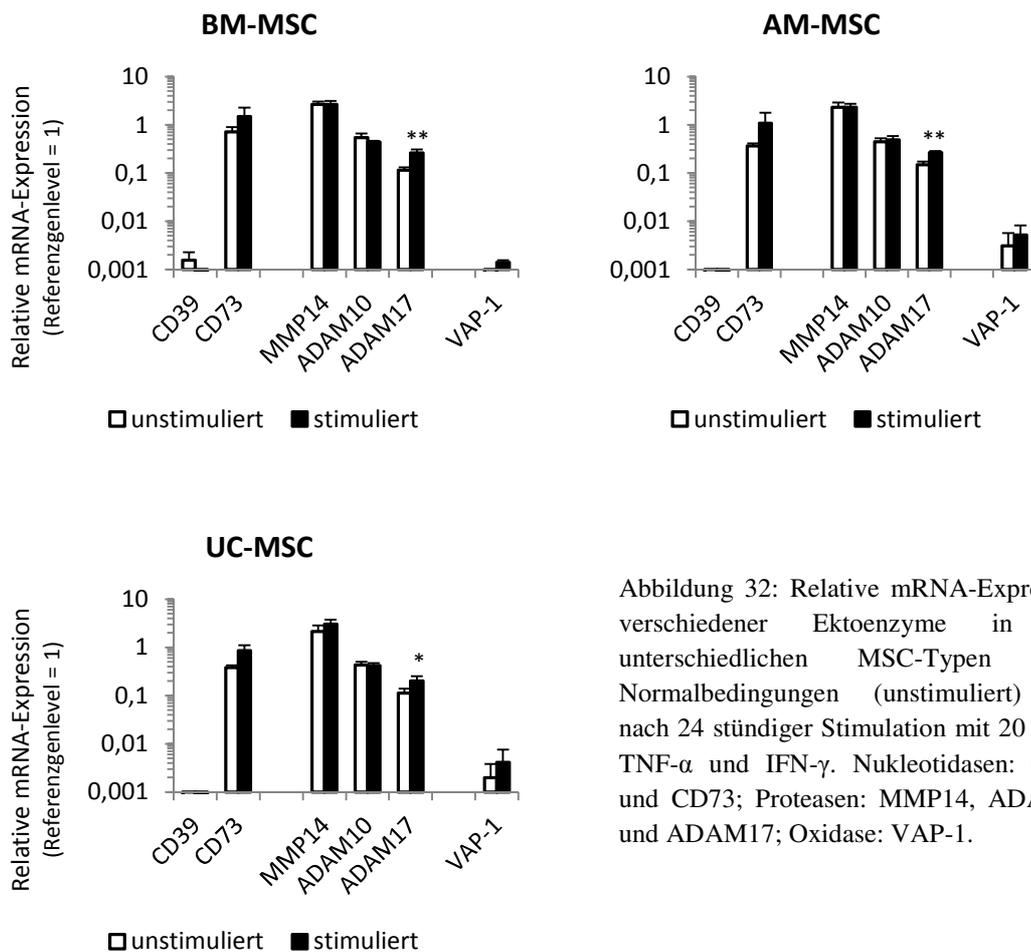


Abbildung 32: Relative mRNA-Expression verschiedener Ektoenzyme in den unterschiedlichen MSC-Typen unter Normalbedingungen (unstimuliert) und nach 24 stündiger Stimulation mit 20 ng/ml TNF- α und IFN- γ . Nukleotidasen: CD39 und CD73; Proteinasen: MMP14, ADAM10 und ADAM17; Oxidase: VAP-1.

4.2.7.2 ATP-metabolisierende Enzyme (Nukleotidasen)

Die qRT-PCR-Analyse zeigte, dass MSCs aus den unterschiedlichen Geweben im Grunde keine CD39-mRNA oder, wie im Falle unstimulierter BM-MSCs mit einer relativen Expression von etwa 0,002 des Referenzgenlevels, nur äußerst geringe Mengen exprimierten. CD73, das auch als 5'-Nukleotidase bezeichnet wird, gilt als Positivmarker für MSCs. Wie erwartet zeigten MSCs aus allen drei Geweben bereits im unstimulierten Zustand CD73-mRNA-

Expression, die durch Stimulation jeweils noch einmal verstärkt wurde. In den MSCs der drei Gewebe kam es etwa zu einer Verdopplung des CD73-mRNA-Levels (BM-MSC: 0,7 => 1,5; AM-MSC: 0,4 => 1,1; UC-MSC: 0,4 => 0,9). CD73 und CD39 die von verschiedenen Endothelzellarten und von bestimmten Leukozyten exprimiert werden, vermitteln einen antiinflammatorischen Effekt, indem sie den sukzessiven Abbau des proinflammatorischen ATPs zu Adenosin katalysieren (Salmi & Jalkanen 2005). Erst der Abbau des Adenosins durch die Adenosindesaminase, die an CD26 gebunden an der Oberfläche von Lymphozyten vorliegt, führt wiederum zu erhöhter Durchlässigkeit der endothelialen Barriere.

Um die MSCs hinsichtlich ihrer CD26-Expression im unstimulierten und stimulierten Zustand zu charakterisieren, wurde die mRNA-Expression in MSCs am Beispiel eines Spenders je Gewebetyp mittels qRT-PCR untersucht (s. Abbildung 33). Unstimulierte UC-MSCs zeigten mit einem Expressionslevel von 1,1 relativ zum Referenzgenlevel eine starke CD26-mRNA-Expression. In unstimulierten AM-MSCs wurde eine relative Expression von 0,2, in unstimulierten BM-MSCs von nur 0,02 und somit eine sehr schwache Expression ermittelt. Nach Stimulation zeigten die Zellen aller Gewebe stets eine Abnahme der Expression. So ging das Expressionslevel in UC-MSCs auf 0,5, in AM-MSCs auf 0,1 und in BM-MSCs auf 0,014 des Referenzgenlevels zurück.

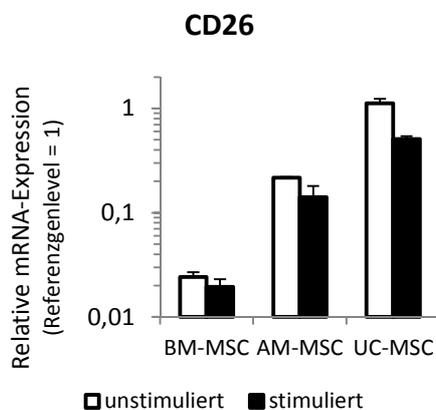


Abbildung 33: Relative CD26-mRNA-Expression in den verschiedenen MSC-Typen unter Normalbedingungen (unstimuliert) und nach 24 stündiger Stimulation mit 20 ng/ml TNF- α und IFN- γ .

4.2.7.3 Proteasen

Bei der Protease MMP14 wurden in allen MSC-Typen sehr starke mRNA-Expressionen detektiert, die durch Stimulation nicht beeinflusst wurden (s. Abbildung 32). In allen MSCs wurde unter beiden Bedingungen stets das 2- bis 3fache des Referenzgenlevels gemessen. MMP14 ist eine membrangebundene Matrix-Metalloprotease, die sowohl von Leukozyten als auch von Endothelzellen exprimiert wird (Itoh & Seiki 2004). Die mRNAs der Proteasen

ADAM10 und ADAM17 wurden in den MSCs aller drei Gewebetypen jeweils deutlich und auf ähnlichem Niveau exprimiert (s. Abbildung 32). So lag das Expressionslevel von ADAM10 in den jeweils unstimulierten Zellen bei etwa 0,4 bis 0,5, im Falle von ADAM17 bei etwa 0,1 im Verhältnis zum Referenzgenlevel. Während die Stimulation in allen MSCs etwa zu einer Verdopplung (signifikant) der ADAM17-mRNA-Expression auf das ca. 0,2fache des Referenzgenlevels führte, konnte hingegen keine Änderung der ADAM10-mRNA-Expression detektiert werden. Beide Faktoren werden von verschiedenen Zelltypen, darunter auch Endothelzellen und Leukozyten exprimiert (Klein & Bischoff 2011).

4.2.7.4 Expression der Aminooxidase VAP-1 (AOC3)

Unstimulierte MSCs zeigten keine oder allenfalls eine äußerst geringe VAP-1-mRNA-Expression (s. Abbildung 32). So konnte in AM-MSCs lediglich ein Wert von 0,003, in UC-MSCs von 0,002 im Verhältnis zum Referenzgenlevel detektiert und in BM-MSCs keine mRNA-Expression nachgewiesen werden. Da alle MSCs durch Stimulation eine leichte Zunahme der VAP-1-mRNA-Expression zeigten, wurden die Zellen in einer weiteren Analyse hinsichtlich der VAP-1-Proteinexpression untersucht. Dazu wurden in einem kinetischen Ansatz die Zellen von je drei Spendern eines Gewebetyps für 72 Stunden stimuliert und zu bestimmten Zeitpunkten die VAP-1-Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie gemessen (s. Abbildung 34).

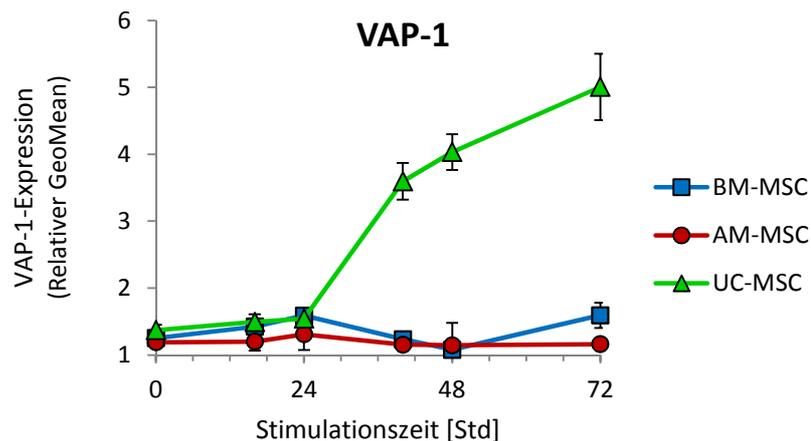


Abbildung 34: Entwicklung der VAP-1-Proteinexpression auf MSCs während 72 stündiger Stimulation mit 20 ng/ml TNF- α und IFN- γ . Die VAP-1-Expression ist als relativer GeoMean im Verhältnis zur Isotypkontrolle über der Stimulationszeit aufgetragen.

Die Expressionsanalyse zeigte, dass in unstimulierten MSCs aller Gewebetypen (entspricht 0 Stunden stimuliert) kein VAP-1-Protein auf der Oberfläche detektierbar war (Relativer GeoMean $\leq 1,5$). Während in BM- und AM-MSCs die Expression im Laufe der Stimulation weitestgehend unverändert niedrig blieb, führte die Stimulation in UC-MSCs zu einer deutlichen Zunahme an VAP-1 auf der Zelloberfläche auf das etwa 5fache des Ausgangssignals. Der Anstieg des Signals erfolgte jedoch erst nach etwa 24 Stunden. VAP-1 wird in erster Linie von Endothelzellen exprimiert und ist im Ruhezustand vornehmlich in intrazellulären Vesikeln lokalisiert. Inflammatorische Signale führen zu einem raschen Transport von VAP-1 an die zum Lumen orientierte Zelloberfläche der Endothelzellmembranen, aber auch zu einem Anstieg der VAP-1-Expression (Jaakkola et al. 2000).

5 Diskussion

5.1 Expressionsprofilierung klassischer Adhäsions- und Migrationsfaktoren in MSCs

In MSC-basierten Therapieansätzen ist eine intensive Wechselwirkung der Zellen mit dem Zielgewebe von entscheidender Bedeutung. Während die Vermittlung eines therapeutischen Effekts in erster Linie auf die Ausschüttung parakriner Faktoren zurückgeführt wird, übernehmen insbesondere Rezeptoren auf der Zelloberfläche wichtige Funktionen, um die Adhäsion an Endothelzellen und Migrationsprozesse in umliegendes Gewebe zu steuern und einen längeren Verbleib der Zellen in den geschädigten Regionen zu ermöglichen (Meirelles Lda et al. 2009, Salem & Thiernemann 2010). So spielen Integrine eine wichtige Rolle bei der Vermittlung direkter Zell-Zell- als auch von Zell-Matrix-Wechselwirkungen. Die Vielfalt an Geweben, aus denen MSCs isoliert werden können, zieht die Frage nach sich, inwieweit zwischen MSCs charakteristische Unterschiede bestehen, die je nach Indikation einen gezielten Therapieeinsatz ermöglichen. Daran orientiert sollte ein detailliertes Expressionsprofil klassischer Oberflächenmoleküle in MSCs erstellt werden, um daraus mögliche Eigenschaften hinsichtlich ihres Adhäsions- sowie Migrationsvermögens abzuleiten. Dazu wurden humane MSCs von je drei Spendern aus dem Knochenmark (BM-MSCs), aus der Amnionmembran (AM-MSCs) und aus der Nabelschnur (UC-MSCs) auf die Expression zahlreicher Integrin-Untereinheiten sowie gängiger Chemokinrezeptoren und weiterer Adhäsionsfaktoren untersucht. In der Studie wurde die Expression der Faktoren sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene analysiert und dabei neben dem Gewebsursprung, der Kulturdauer sowie der Spendervariabilität, auch der Einfluss proinflammatorischer Zytokine berücksichtigt.

5.1.1 Integrine und Integrin-Liganden

Die umfangreiche Charakterisierung zeigte, dass MSCs aus den verschiedenen Geweben im Wesentlichen dieselben Integrin-Untereinheiten exprimieren, sich aber in den Expressionsintensitäten der jeweiligen Moleküle unterscheiden. Mit einer entsprechenden Spendervariabilität zeigten BM-, AM- und UC-MSCs sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene Expressionen der α -Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αV und der β -Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 3$ und $\beta 5$. Keine Expression wurde dagegen bei den Untereinheiten $\beta 4$, $\beta 6$ und $\beta 7$ beobachtet. Von der Untereinheit $\beta 2$ ließ sich lediglich mRNA in BM-MSCs detektieren. Im Allgemeinen stellen BM-MSCs den MSC-Standard dar, in dem die Expression

diverser Integrin-Untereinheiten am intensivsten analysiert wurde (Semon et al. 2010). Während von UC-MSCs neben der vorliegenden Arbeit bislang keine umfassenden Integrin-Profile existieren, liegen Expressionsanalysen von Integrin-Untereinheiten in BM-MSCs im Vergleich mit MSCs aus der Plazenta (Brooke et al. 2008, Jaramillo-Ferrada et al. 2012) sowie aus dem Fettgewebe (Goessler et al. 2008) vor, die ebenfalls gering ausgeprägte Unterschiede zwischen den Geweben aufzeigen. Während die Studien hinsichtlich α -Untereinheiten mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit im Wesentlichen übereinstimmen, weichen jedoch die Angaben zur Expression der β -Untereinheiten - auch zwischen den Studien - teilweise voneinander ab. So ermittelten Brooke et al. per Microarray-Analysen einen β 3-negativen, dafür einen β 4- und β 7-positiven Phänotyp (Brooke et al. 2008). Jaramillo-Ferrada et al. beschrieben MSCs nach durchflusszytometrischer Analyse als β 2-positiv sowie β 3- und β 5-negativ (Jaramillo-Ferrada et al. 2012). Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zur Analyse von Lee et al., die in MSCs aus der Plazenta β 3- und β 5-Expression feststellen konnten (Lee et al. 2009a). Als mögliche Ursachen für die mitunter stark divergierenden Angaben könnten Unterschiede in den Isolationsprotokollen, abweichende Kulturbedingungen oder unterschiedliche Nachweisgrenzen der verwendeten Methoden zugrunde liegen.

In Hinblick auf die Dauer der Kultivierung wird deutlich, dass die Anzahl an Zellteilungen weit weniger Auswirkung auf die Integrinexpression hat, sondern eher davon auszugehen ist, dass sie in erster Linie von der Dichte der Zellkultur abhängig ist (Semon et al. 2010). Die ähnlicheren Expressionsprofile von UC- und AM-MSCs gegenüber BM-MSCs spiegeln potentiell die unterschiedlichen ontologischen Ursprünge (fetal vs. maternal) sowie Unterschiede in der Matrixkomposition der jeweiligen Nischen wider. Anhand der Integrin-Expressionsprofile *ex vivo* kultivierter Zellen lassen sich jedoch nur theoretische Rückschlüsse auf die jeweilige Expression *in vivo* ziehen. Die Variabilität zwischen den Zellen verschiedener Spender könnte einen donorspezifischen Hintergrund haben oder auch durch Abweichungen während der Gewinnung aus dem Spendermaterial sowie Schwankungen der Kulturbedingungen bedingt sein. Nach Isolation aus dem Gewebe kommt es im Allgemeinen zu einer schnellen Reorganisation der Integrinexpression (Au et al. 2007). Darüber hinaus besitzen MSCs die Fähigkeit je nach Zusammensetzung der extrazellulären Matrix beim Wachstum in 3D-Kultur die Integrinexpression zu ändern (Docheva et al. 2007). Auch zelluläre Funktionen wie Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung werden durch die Art der Matrix beeinflusst (Ode et al. 2010).

Die Variationen in der Integrinexpression unterstreichen die Bedeutung eines guten Verständnisses von Präparation und Kultivierung der MSCs, die das Gestalten standardisierter Behandlungsweisen der MSC-basierten Therapie begünstigen, um so nach Möglichkeit eine erhöhte Wirksamkeit zu erzielen. Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass die

Affinität von Integrinen zu ihren Liganden im Wesentlichen durch ihren Aktivitätszustand bestimmt wird (s. Abschnitt 1.1.5.3). Somit wäre neben der Angabe zur Expression eines Integrins, insbesondere bei Studien, die funktionelle Tests mit einschließen, zudem ein Nachweis über den Aktivitätszustand erforderlich.

Basierend auf den ermittelten Integrin-Profilen sind MSCs potentiell in der Lage an zahlreiche Matrix-Moleküle zu binden, aber auch Wechselwirkungen einzugehen, um direkte Zell-Zell-Kontakte zu vermitteln (s. Abbildung 3). Die Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ bilden in Kombination mit der Untereinheit $\beta 1$ zahlreiche Rezeptoren, die verschiedene Moleküle der extrazellulären Matrix binden, zu denen unter anderem Kollagen, Laminin, Thrombospondin oder auch Fibronectin zählen. Über die Dimerisierung mit den Untereinheiten $\beta 3$ bzw. $\beta 5$ bildet die Untereinheit αV die Rezeptoren $\alpha V\beta 3$ sowie $\alpha V\beta 5$, die über die Erkennung von RGD-Motiven unter anderem an Fibronectin, Fibrinogen sowie Vitronectin binden (Humphries et al. 2006). Je nach Integrinexpression und Zusammensetzung der extrazellulären Matrix zeigen Zellen unterschiedliche Migrationseigenschaften (Parameswaran et al. 2004).

Von den zahlreichen α -Untereinheiten liegt der Fokus jedoch insbesondere auf der Untereinheit Integrin- $\alpha 4$ (CD49d), die als Teil des Rezeptors VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) über die Bindung an VCAM direkte Zell-Zell-Kontakte vermittelt. Sie besitzt somit hohes Potential, die Adhäsion von MSCs, die im Allgemeinen einen CD49d-positiven Phänotyp aufweisen, an aktivierte, VCAM-positive Endothelzellen zu steuern. Die Interaktion von VLA-4 mit VCAM ist Ansatzpunkt zahlreicher Studien, so dass CD49d die Untereinheiten darstellt, deren Rolle bei Adhäsions- und Migrationsprozessen in MSCs bisher am umfangreichsten analysiert wurde. Dabei konnten sowohl *in vitro* als auch anhand von Tiermodellen *in vivo* die Vermittlung von Homing-Mechanismen verifiziert werden (Ruster et al. 2006, Kumar & Ponnazhagan 2007, Steingen et al. 2008). Von den drei analysierten MSC-Typen wurde die stärkste CD49d-Expression in UC-MSCs und die schwächste in BM-MSCs detektiert. AM-MSCs der verschiedenen Spender zeigten stark variierende Expressionen, die auch im Laufe der Kultur Schwankungen unterworfen waren. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass MSCs, die aus der Amnionmembran isoliert werden, eine relativ heterogene Zellpopulation darstellen (Wegmeyer et al. 2013). Diese gewebsspezifischen Unterschiede gehen mit den Beobachtungen von Mariotti et al. sowie Barlow et al. und Nystedt et al. konform, die jeweils eine schwache Expression von CD49d in BM-MSCs, hingegen eine starke in MSCs aus Plazenta und Nabelschnur beobachteten (Barlow et al. 2008, Mariotti et al. 2008, Nystedt et al. 2013). Demnach besäßen UC-MSCs das größte Potential über die VLA-4/VCAM-Achse mit aktivierten Endothelzellen zu interagieren. Die Expression von CD49d in MSCs unterliegt jedoch einem deutlichen Einfluss proinflammatorischer Zytokine. Innerhalb von 24 Std. führte

eine Stimulation mit TNF- α und IFN- γ zu einer signifikanten Abnahme an CD49d auf der Plasmamembran der drei MSC-Typen. Demgegenüber konnten Xiao et al. bei Stimulation muriner BM-MSCs mit TNF- α keinen Einfluss auf die Expression von CD49d beobachten (Xiao et al. 2012). In einem MSC-basierten Therapieansatz hätte eine verminderte Interaktion von VLA-4 mit VCAM im inflammatorischen Umfeld möglicherweise eine Reduktion des Adhäsionsvermögens der Zellen zur Folge, die noch am ehesten von UC-MSCs mit der stärksten CD49d-Expression abgefangen werden könnte.

Im Gegensatz zu CD49d wurde durch Stimulation mit TNF- α und IFN- γ eine starke Expression von VCAM auf der Oberfläche von MSCs induziert, die in BM-MSCs am stärksten, in UC-MSCs wiederum am schwächsten ausfiel. Die extrem schnelle Reaktion der VCAM-Expression auf Stimulation und die darauf folgenden starken Schwankungen in den Expressionsleveln lassen darauf schließen, dass VCAM in unstimulierten MSCs bereits in Vesikeln vorliegt. Dafür spricht ebenfalls, dass MSCs per se eine starke VCAM-mRNA-Expression, jedoch keine Proteinexpression an der Zelloberfläche aufwiesen. Sowohl die Induzierbarkeit der VCAM-Expression als Reaktion auf TNF- α , als auch eine potentiell wichtige Rolle von VCAM im Kontext der Zelltherapie wurde bereits in einzelnen Studien gezeigt. So konnten in murinen Herzinfarkt-Modellen eine durch VCAM vermittelte Migration von MSCs in die geschädigte Region nachgewiesen (Segers et al. 2006, Xiao et al. 2012), aber auch immunsuppressive Eigenschaften in Form inhibierter Zellproliferation CD49d-positiver T-Zellen beobachtet werden (Ren et al. 2010).

5.1.2 Selektine und Chemokinrezeptoren

Um die Geschwindigkeit im Blutstrom zirkulierender Zellen zu reduzieren, spielt die Wechselwirkung von Selektinen mit korrespondierenden Liganden eine wichtige Rolle. Obwohl Ruster et al. ein von P-Selektin abhängiges Rollen von MSCs unter Flussbedingungen beobachteten, konnte konform zur vorliegenden Arbeit bislang keine Expression eines der Selektine und auch nicht des Selektin-Liganden PSGL-1 auf MSCs nachgewiesen werden (Ruster et al. 2006, Sackstein et al. 2008). Zwar exprimieren MSCs CD44 in ausreichender Menge auf ihrer Zelloberfläche, dieses besitzt jedoch nicht das erforderliche Glykosylierungsmuster, um als möglicher Selektin-Ligand zu fungieren (Brooke et al. 2008, Sackstein et al. 2008). Über verschiedene Engineering-Ansätze wurden Oberflächen von BM-MSCs dahingehend modifiziert, dass sie die Interaktion mit Selektinen und somit ein Rollen von MSCs auf Endothelzellen vermitteln. Beispielsweise konnte durch die chemische Konjugation der Zelloberfläche mit Sialyl-Lewis^x-Konjugaten bzw. enzymatische

Glykosylierung bestimmter Oberflächenproteine eine Wechselwirkung mit Selektinen induziert und das Potential von MSCs ins Knochenmark einzuwandern deutlich erhöht werden (Sackstein et al. 2008, Sarkar et al. 2008, Sarkar et al. 2011).

Der Chemokinrezeptor CXCR4 spielt durch die Bindung des Faktors SDF-1 eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung von Zellen ins Knochenmark und stellt somit eine potentiell wichtige Komponente für das gezielte Homing von MSCs in bestimmte Gewebe dar. Eine Expression von CXCR4 konnte jedoch in den drei MSC-Typen weder als mRNA noch als Protein auf der Plasmamembran nachgewiesen werden. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass MSCs unmittelbar nach der Isolation aus dem Gewebe die Expression von CXCR4 im Laufe ihrer Kultivierung einstellen (Shi et al. 2007, Jones et al. 2012). Wynn et al. zeigten, dass MSCs weder die CXCR4-mRNA noch das Protein auf der Zelloberfläche exprimieren, es sich jedoch intrazellulär nachweisen lässt und somit potentiell in Vesikeln vorliegt (Wynn et al. 2004). Eine mögliche Induzierbarkeit der CXCR4-Expression wurde durch die Arbeit von Egea et al. demonstriert, in der durch die Stimulation von MSCs mit TNF- α eine verstärkte Expression von CXCR4 und so eine erhöhte Infiltration von Gliomasphäroiden mit MSCs erzielt werden konnte (Egea et al. 2011). Hemedá et al. wiesen nach IFN- γ -Stimulation muriner MSCs aus peripherem Blut eine erhöhte CXCR4-Expression sowie eine gesteigerte Migrationsrate der Zellen im SDF-1 Gradienten *in vitro* nach (Hemedá et al. 2010). Diese Befunde stehen jedoch im Gegensatz zu den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit, in der die Stimulation der MSCs mit TNF- α und IFN- γ zu keiner detektierbaren Induktion der CXCR4-Expression führte.

Aufgrund der enormen Bedeutung der CXCR4/SDF-1-Achse für die Rekrutierung von MSCs wurden verschiedene Ansätze gefahren, um eine Expression von CXCR4 in MSCs zu induzieren und so die Rekrutierungseigenschaften von MSCs zu erhöhen. Durch die Überexpression von CXCR4 mittels Transfektion (Yu et al. 2012), das Wachstum in dreidimensionalen Sphäroiden (Potapova et al. 2008, Bartosh et al. 2010) oder auch eine Kultivierung unter Flussbedingungen (Yuan et al. 2013) konnten MSCs mit einem CXCR4-positiven Phänotyp generiert werden. Auch die Kultivierung muriner MSCs unter Hypoxie, die zur Simulation der niedrigen Sauerstoffsättigung physiologischer Nischen (2-7 % im Knochenmark) oder ischämischer Regionen dient, führte zu einer gesteigerten CXCR4-Expression (Hung et al. 2007, Liu et al. 2010).

Der Chemokinrezeptor CCR2, der das Chemokin MCP-1 (CCL2) bindet, das von aktivierten Endothelzellen, Epithelzellen sowie Fibroblasten geschädigter Gewebe gebildet wird, stellt einen der wichtigsten Faktoren für die Rekrutierung von Monozyten in Entzündungsregionen dar (Deshmane et al. 2009). Die MSCs aus Knochenmark, Amnionmembran und Nabelschnur wiesen jedoch keine CCR2-Expression auf. Auch durch Stimulation mit TNF- α und IFN- γ ließ

sich keine Expression induzieren. In bisherigen Studien gehen die Beobachtungen hinsichtlich der Expression von CCR2 in MSCs mitunter deutlich auseinander. Während auf der einen Seite MSCs, übereinstimmend mit der vorliegenden Arbeit, als CCR2-negativ beschrieben werden (Sordi et al. 2005, Honczarenko et al. 2006, Brooke et al. 2008), wurde jedoch auf der anderen Seite auch eine Expression von CCR2 in MSCs nachgewiesen (Ringe et al. 2007, Belema-Bedada et al. 2008, Guo et al. 2013). Darüber hinaus ließ sich in humanen BM-MSCs eine CCR2-Expression durch Stimulation mit TNF- α induzieren (Ponte et al. 2007). Wang et al. konnten die Intensität der Migrationsrate muriner, CCR2-positiver MSCs auf die jeweilige MCP-1-Konzentration zurückführen (Wang et al. 2002). In einer weiteren Studie wurde in einem murinen Herzinfarktmodell gezeigt, dass systemisch injizierte MSCs in Abhängigkeit des Chemokins MCP-3 (CCL7), einem weiteren Liganden von CCR2, verstärkt im Herzmuskelgewebe lokalisieren (Schenk et al. 2007).

Im Gegensatz zu CCR2 zeigten MSCs auf ihrer Zelloberfläche eine deutliche Expression des Chemokinrezeptors CCR7. Diese unterlag jedoch Schwankungen und war abhängig vom jeweiligen Gewebetyp, dem Spendermaterial, der Dauer der Kultivierung, aber auch von der Zytokin-Stimulation. Da keine mRNA-Expression von CCR7 nachgewiesen werden konnte, liegt CCR7 möglicherweise in Vesikeln vor, die unter bestimmten Bedingungen an die Zelloberfläche gebracht und wieder internalisiert werden. So zeigten BM-MSCs nach Stimulation einen Anstieg der Proteinexpression auf der Zelloberfläche. Obwohl keine mRNA-Expression von CCR7 in MSCs nachgewiesen werden konnte, ließ sich jedoch das Auftreten deutlicher Banden im Western blot detektieren (Daten nicht gezeigt). Die Expression von CCR7 in MSCs wurde in zahlreichen Studien beschrieben (Sordi et al. 2005, Honczarenko et al. 2006, Brooke et al. 2008). Im Allgemeinen spielt CCR7 über die Bindung der Chemokine CCL19 und CCL21 unter anderem eine wichtige Rolle für die Rekrutierung von T-Zellen in sekundäre lymphatische Organe (Forster et al. 2008). Von Lüttichau et al. konnten eine gesteigerte Migrationsrate muriner, CD34-negativer Progenitorzellen sowohl im CCL19- als auch CCL21-Gradienten nachweisen (Von Lüttichau et al. 2005). Auch Sasaki et al. beobachteten eine gesteigerte Migrationsraten von MSCs sowie eine beschleunigte Wundheilung im Mausmodell nach intradermaler Injektion von CCL21 (Sasaki et al. 2008).

Insgesamt zeigte die Expressionsprofilierung, dass zwischen MSCs aus verschiedenen Quellen Unterschiede in den Expressionsintensitäten einiger Adhäsionsfaktoren existieren, was unter anderem im Falle der Integrin-Untereinheit CD49d sehr deutlich beobachtet werden konnte. Basierend darauf könnten in Abhängigkeit vom Ursprungsgewebe Unterschiede im Adhäsions- und Migrationsverhalten der Zellen bestehen, was wiederum eine wichtige Rolle bei der Wahl des MSC-Typs für bestimmte Indikationen spielen könnte.

5.2 Die Rolle von CD38 und weiterer Ektoenzyme in MSCs

5.2.1 CD38-Expression in MSCs

Das Ektoenzym CD38, das in erster Linie von Zellen des Immunsystems exprimiert wird, spielt eine wichtige Rolle bei der Adhäsion von Leukozyten an vaskuläres Endothel sowie der Migration der Zellen in umliegendes, entzündetes Gewebe (Salmi & Jalkanen 2012). Demgegenüber ist die Funktion von CD38 in MSCs, die im Allgemeinen als CD38-negativ beschrieben werden, bislang unbekannt (Qiao et al. 2008, Mitrano et al. 2010, Tao et al. 2011). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass durch die Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α und IFN- γ die Expression von CD38 in MSCs induziert werden kann. Eine Besonderheit ist, dass sich MSCs verschiedener Gewebe dabei in der Intensität der CD38-Expression unterscheiden. BM-MSCs aus dem Knochenmark wiesen im Vergleich mit AM-MSCs und UC-MSCs aus perinatalem Gewebe die stärkste Expression auf. Insgesamt zeigten UC-MSCs die schwächste CD38-Expression. Nicht publizierte Genexpressionsanalysen von MSCs nach Stimulation deuten darauf hin, dass je nach Gewebeer sprung die Zellen im Allgemeinen mit unterschiedlicher Sensitivität auf Zytokine reagieren (s. Anhang Abschnitt 8.11, Seite 172). Möglicherweise besteht jedoch bei CD38 ein Zusammenhang mit der Herkunft der Zellen und es lassen sich eventuell Rückschlüsse auf eine Funktion innerhalb der physiologischen Nische ziehen. Während Endothel- und Epithelzellen schwach bzw. gar nicht auf Stimulation reagierten, war ein starker Anstieg der CD38-Expression charakteristisch für die Zellen des Immunsystems (s. Anhang Abschnitt 8.10, Seite 171). Diese stellen gemeinsam mit BM-MSCs einen wichtigen Teil des Knochenmarks und somit der hämatopoetischen Nische dar. Basierend auf der Funktion in Leukozyten birgt CD38 im zelltherapeutischen Kontext ein enormes Potential die Adhäsion von MSCs an vaskuläres Endothel im inflammatorischen Umfeld und so die Interaktion von MSCs mit entzündetem oder geschädigtem Gewebe zu vermitteln. Basierend auf der starken CD38-Expressionsintensität besäßen BM-MSCs aus dem Knochenmark diesbezüglich das größte Potential. Entscheidend ist jedoch, wie schnell eine ausreichende Anzahl an CD38-Molekülen auf die Zelloberfläche gebracht und über welchen Zeitraum CD38 stabil exprimiert wird.

Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie, die aufzeigt, dass MSCs nach Zytokin-Stimulation CD38 exprimieren und die darüber hinaus den Verlauf der CD38-Expression auf der Zelloberfläche während der Stimulation beschreibt. Über die kinetische Expressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass unabhängig vom Zelltyp die Expression von CD38 einer Sigmoidfunktion folgt und frühestens nach 48 Stunden ein Maximallevel erreicht. Erfolgte die Einwirkung der Zytokine jedoch deutlich weniger als 48 Stunden, führte dies zu einer raschen

Abnahme der Expression auf der Zelloberfläche (Daten nicht gezeigt). Um in einem zelltherapeutischen Ansatz eine über CD38 vermittelte Interaktion von MSCs mit dem Zielgewebe zu induzieren, wäre eine länger andauernde Exposition der Zellen im inflammatorischen Bereich erforderlich. Dem steht jedoch gegenüber, dass bei systemischer Gabe der Zellen diese innerhalb weniger Minuten aus der Blutzirkulation verschwinden und bereits nach 24 Stunden nicht mehr in Organismus nachweisbar sind (Prockop 2009).

Zusätzlich zur Dauer des Stimulus ist die Expression von CD38 in MSCs darüber hinaus von der Anwesenheit beider Zytokine abhängig. Alleinige Stimulation mit TNF- α oder IFN- γ führte zu keiner nennenswerten Expression auf BM-MSCs. Dieser synergetische Effekt konnte bereits bei glatten Muskelzellen der Atemwege beobachtet werden, die jedoch auch auf die alleinige Stimulation mit TNF- α mit einem Anstieg der CD38-Expression reagierten (Tliba et al. 2006). Demgegenüber konnte in Monozyten mit IFN- γ , nicht jedoch mit TNF- α die CD38-Expression induziert werden (Musso et al. 2001). Es wird angenommen, dass der synergistische Effekt auf einer gemeinsamen Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF1 (*engl.* Interferon regulatory factor 1) und anderen Faktoren wie NF- κ B oder STAT1 beruht (Tliba et al. 2004). Somit spielt, je nach Zelltyp, die Zytokinzusammensetzung des inflammatorischen Umfeldes für die Induktion von CD38 eine wichtige Rolle. Um jedoch in einem zellbasierten Therapieansatz unabhängig von den gegebenen Bedingungen *in vivo* zu sein, ließe sich beispielsweise vor der Transplantation der Zellen die Expression von CD38 durch Stimulation *in vitro* induzieren. Ferner könnten mittels stabiler Transfektion MSCs mit einem CD38-positiven Phänotyp generiert werden.

5.2.2 CD38-Enzymaktivität und Ca²⁺-Mobilisierung

Die verminderte Infiltration entzündeter Regionen mit Immunzellen in CD38^{-/-}-Mäusen wird auf eine reduzierte Ca²⁺-Mobilisierung in Leukozyten zurückgeführt (Partida-Sanchez et al. 2001). So geht man davon aus, dass CD38 über die ADPR-Ribosylzyklaseaktivität seiner extrazellulären Domäne die Umsetzung von aus nekrotischen Zellen freigesetztem NAD⁺ zu Ca²⁺-mobilisierendem cADPR katalysiert und so eine Wechselwirkung von Leukozyten mit den geschädigten Geweben induziert (Salmi & Jalkanen 2012). Inwieweit MSCs ADP-Ribosylzyklaseaktivität aufweisen und somit in der Lage sind NAD⁺ in cADPR umzusetzen, um potentiell einen Ca²⁺-Einstrom auszulösen, wurde bislang nicht untersucht. In dieser Studie konnte mittels Enzymaktivitätstest erstmalig nachgewiesen werden, dass TNF- α /IFN- γ -stimulierte und somit CD38-positiv MSCs aller Gewebe proportional zur Intensität ihrer CD38-Expression ADP-Ribosylzyklaseaktivität besitzen und dass diese auf der Zellmembran

lokalisiert ist. Gleichzeitig wurde über die Überexpression von CD38 in UC-MSCs verifiziert, dass die enzymatische Aktivität dabei von CD38 vermittelt wird. Anhand der Variante $\Delta 17$ -CD38 zeigte sich, dass die Aktivität unabhängig vom intrazellulären Abschnitt ist, während durch die Mutante E226L-CD38 bestätigt wurde, dass Glutamat-226 einen für die Reaktion kritischen Aminosäurerest im katalytisch aktiven Zentrum darstellt (Munshi et al. 2000, Liu et al. 2007). In den Ca^{2+} -Flux-Analysen zur Messung des durch NAD^+ -induzierten Ca^{2+} -Einstroms ins Zytoplasma verhielten sich MSCs stets konform ihrer ADP-Ribosylzyklaseaktivität und somit proportional zur CD38-Expression. Wie sich eindeutig anhand der Variante $\Delta 17$ -CD38 zeigen ließ, ist neben der Enzymaktivität auch der Ca^{2+} -Einstrom unabhängig vom intrazellulären Abschnitt von CD38. Dass ein Zusammenhang zwischen der Enzymaktivität von CD38 und dem Auslösen des Ca^{2+} -Fluxes besteht, wurde erstmalig in dieser Arbeit anhand der Mutante E336L-CD38 gezeigt. Die Zellen waren nicht nur enzymatisch inaktiv, sondern wiesen darüber hinaus eine stark reduzierte Induktion des Ca^{2+} -Einstroms als Antwort auf NAD^+ auf.

Zum Auslösen eines Ca^{2+} -Einstroms nach der Umsetzung von extrazellulärem NAD^+ durch CD38 ist ein Transport der Ca^{2+} -mobilisierenden Substanzen cADPR bzw. ADPR ins Zytoplasma erforderlich. In Abhängigkeit vom Zelltyp werden bisweilen verschiedene Mechanismen diskutiert, in denen entweder CD38 selbst als Transporter von cADPR bzw. ADPR fungiert (Franco et al. 1998) oder der Eintritt beider Produkte über Nukleosid-Transporter erfolgt (Guida et al. 2002). Die durch die Reaktionsprodukte cADPR und ADPR ausgelösten Ca^{2+} -Signale deuten darauf hin, dass in MSCs CD38 nicht nur die Umsetzung von NAD^+ katalysiert, sondern auch für den Transport von cADPR und ADPR ins Zytoplasma verantwortlich ist. Insbesondere die Einbrüche der Ca^{2+} -Signale im Falle der Mutante E226L-CD38 liefern starke Hinweise darauf, dass ohne das intakte katalytische Zentrum NAD^+ nicht nur nicht umgesetzt werden kann, sondern auch die Reaktionsprodukte cADPR bzw. ADPR für den Transport nicht adäquat im aktiven Zentrum von CD38 verpackt werden können, um diese ins Zytoplasma einzuschleusen. Kristallstrukturdaten von Liu et al. zeigen auf, dass durch den Aminosäureaustausch von Glutamat zu Leucin keine Wasserstoffbrücken ausgebildet werden können, die cADPR im aktiven Zentrum stabilisieren (Liu et al., 2006).

Die Ca^{2+} -Ionen, die nach einem NAD^+ -Stimulus ins Zellinnere von MSCs strömen, werden in erster Linie aus dem extrazellulären Milieu und weniger aus intrazellulären Speichern mobilisiert. Da MSCs einen TRPM2-positiven Phänotyp aufweisen, deutet dies darauf hin, dass hauptsächlich ADPR den TRPM2-Kanal auf der Plasmamembran aktiviert, der potentiell das Haupteinfallstor für extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen in MSCs darstellt. Die Expression von TRPM2 auf BM-MSCs wurde bereits von Tao et al. beschrieben (Tao et al. 2011). Dafür, dass eher

ADPR denn cADPR der Auslöser des Ca^{2+} -Einstroms ist, spricht ebenfalls, dass cADPR äußerst instabil ist und schnell zu ADPR hydrolysiert wird (Liu et al. 2007).

Insgesamt lassen sich fünf Rückschlüsse hinsichtlich der Rolle von CD38 in MSCs ziehen: (1) Das Ektoenzym CD38 vermittelt einen durch NAD^+ -induzierten Ca^{2+} -Einstrom ins Zytoplasma. (2) Die Reaktion ist dabei unabhängig vom kurzen, intrazellulären Abschnitt. (3) CD38 ist ebenfalls am Transport von cADPR und ADPR ins Zellinnere beteiligt, (4) für den ein intaktes enzymatisch aktives Zentrum erforderlich ist. (5) ADPR ist wahrscheinlich Hauptauslöser für das Einströmen von Ca^{2+} -Ionen, die potentiell über den TRPM2-Kanal aus dem extrazellulären Milieu mobilisiert werden. In Abbildung 35 ist der potentielle Mechanismus der Ca^{2+} -Mobilisierung in MSCs durch die von CD38 katalysierte Umsetzung von NAD^+ dargestellt.

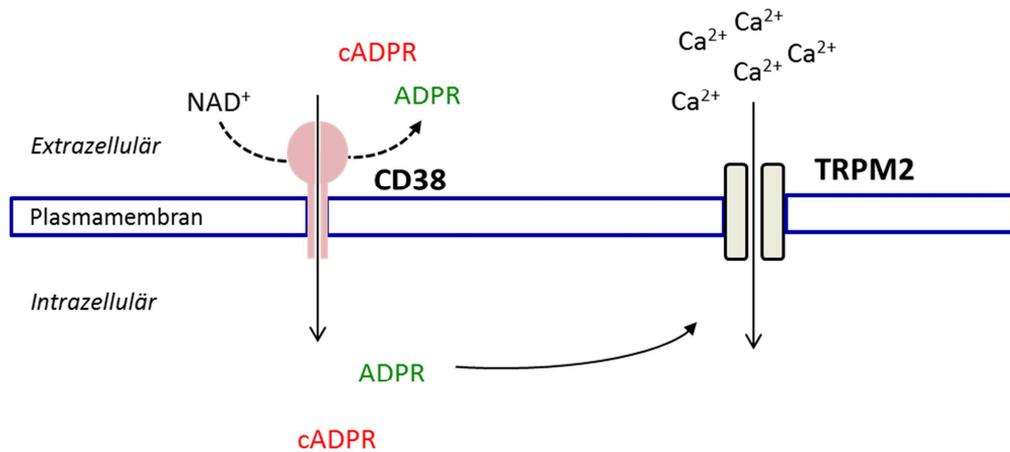


Abbildung 35: Darstellung des potentiellen Mechanismus von CD38 in MSCs bei der Vermittlung eines NAD^+ -induzierten Ca^{2+} -Einstroms: Extrazelluläres NAD^+ wird von CD38 in cADPR und ADPR umgesetzt und diese ins Zellinnere transportiert. In erster Linie führt anschließend die Aktivierung des TRPM2-Kanals durch ADPR über die Interaktion mit der intrazellulären Bindungsstelle zum Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} ins Zytoplasma.

Die durch NAD^+ -Zugabe ausgelösten klassischen Ca^{2+} -Signale in MSCs sind durch einen raschen Anstieg (Ca^{2+} -Einstrom) sowie einen verzögerten Abfall (Export mittels Ca^{2+} -Pumpen) gekennzeichnet. Ähnliche Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration als Antwort auf NAD^+ -Zugaben wurden ebenfalls in Astrozyten beobachtet (Verderio et al. 2001). Bisherige Studien, die eine Beteiligung von NAD^+ oder cADPR an Ca^{2+} -Signalen in BM-MSCs beschreiben, zeigen jedoch den Einfluss jeweils unterschiedlicher Faktoren sowie abweichende Ausprägungen bzw. Muster der Ca^{2+} -Signale. So wurde für BM-MSCs, die CD38-mRNA-Expression aufwiesen, eine langsame Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach

Zugabe von cADPR beobachtet, die durch den Einsatz von 8-Br-cADPR, einem Antagonisten des Ryanodin-Rezeptors (RyR), sowie einem CD38-Knockdown unterbunden werden konnte (Scarfi et al. 2008). Fruscione et al. beschrieben später, dass in BM-MSCs nach NAD^+ -Zugabe über die Aktivierung des purinergen Rezeptors P2Y11 zunächst ein schneller Ca^{2+} -Einstrom ausgelöst wird, dem anschließend ein stetiger Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration folgt (Fruscione et al. 2011). Das in der Arbeit von Tao et al. beschriebene, spontane Auftreten hochfrequenter Ca^{2+} -Oszillationen in BM-MSCs, die durch den Einsatz von cADPR modifiziert werden konnten, wurde aufgrund fehlender CD38-mRNA-Expression auf den Ca^{2+} -Kanal TRPM2 sowie das zum CD38 verwandte CD157 zurückgeführt (Tao et al. 2011).

BM-MSCs weisen per se eine deutliche CD157-Expression auf und unterscheiden sich damit von AM- und UC-MSCs. Da auch in unstimulierten BM-MSCs ein Ca^{2+} -Einstrom ins Zytoplasma detektiert wurde, könnte CD157 somit für diesen verantwortlich sein. Im Gegensatz zu CD38 besitzt CD157 eine geringere Affinität zum Substrat NAD^+ und eine ca. 300- bis 500fach schwächere ADP-Ribosylzyklaseaktivität (Hussain et al. 1998). Bei entsprechend hohen NAD^+ -Konzentrationen könnte CD157 demnach in ähnlicher Weise wie CD38 als Transporter der an der Reaktion beteiligten Substanzen fungieren und somit einen Ca^{2+} -Einstrom auslösen. Auf intrazellulärer Seite wiederum wird für die Aktivierung des TRPM2-Kanals eine deutlich geringere ADPR-Konzentration benötigt. So wird für die Affinität von TRPM2 ein EC_{50} -Wert von 1-90 μM ADPR angegeben (Perraud et al. 2001). Im Widerspruch zur Theorie, dass CD157 als Transporter fungiert, steht, dass CD157 über einen GPI-Anker mit der Plasmamembran verbunden ist und demzufolge keine Transmembranregion besitzt (Quarona et al. 2013). Es lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass auch die Anwesenheit weiterer Transporter oder Kanäle für den Ca^{2+} -Einstrom in unstimulierten BM-MSCs verantwortlich ist.

5.2.3 Einfluss von NAD^+ auf die Migration von MSCs

Die Mechanismen, über die CD38 bei Adhäsions- und Migrationsprozessen von Leukozyten beteiligt ist, sind nur unzureichend verstanden. Man geht derzeit davon aus, dass der durch NAD^+ induzierte Ca^{2+} -Einstrom zu einer Reorganisation des Zytoskeletts führt (Sanchez-Madrid & del Pozo 1999) und potentiell von einer Modulation der Affinität bestimmter Integrine wie $\beta 2$ -Integrinen oder Integrin- $\alpha 4$ begleitet ist (Dewitt & Hallett 2002, Hyduk et al. 2007). Die dadurch induzierten morphologischen und physiologischen Änderungen bewirken eine veränderte Zellbewegung sowie ein promigratorisches Verhalten. Da MSCs unter proinflammatorischen Bedingungen CD38 exprimieren, das einen NAD^+ -induzierten Ca^{2+} -

Einstrom vermittelt, stellt sich die Frage, ob in diesem Zusammenhang von CD38 auch ein Einfluss auf das Migrationsverhalten von MSCs ausgeht. Die Migrationstests mit transgenen UC-MSCs, die CD38 bzw. die CD38-Varianten überexprimierten, zeigten deutlich, dass NAD^+ einen erheblichen Einfluss auf die Migration von MSCs nimmt und stets zu einer Verminderung der Migrationsgeschwindigkeit der Zellen führt. Jedoch belegen die Daten, dass diese Reaktion der Zellen unabhängig von einem durch CD38 vermittelten Ca^{2+} -Einstrom ist. Da dieser Effekt sowohl bei $200 \mu\text{M NAD}^+$ als auch bei $20 \mu\text{M NAD}^+$ exakt gleich ausfiel, ist davon auszugehen, dass sich diese Konzentrationen im Sättigungsbereich des dafür verantwortlichen Mechanismus bewegen. Auch bei Zugabe von ADPR wurde derselbe Effekt beobachtet. Diese Daten stehen im direkten Kontrast zu bisherigen Studien, die den Einfluss des von NAD^+ - bzw. cADPR-mobilisierten Calciums nicht nur in Form verstärkter Zellproliferation, sondern auch eines gesteigerten Migrationsvermögens von MSCs aufzeigen (Scarfi et al. 2008, Fruscione et al. 2011). Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass in diesen Studien die Zellen jeweils für 15 Stunden mit den entsprechenden Substanzen präinkubiert und erst anschließend im Migrationstest eingesetzt wurden.

Da der Einfluss von NAD^+ auf die Migration von MSCs höchstwahrscheinlich nicht auf CD38 zurückzuführen ist, vermitteln möglicherweise andere NAD^+ -metabolisierende Enzyme, die natürlicherweise über ein komplexes Zusammenspiel, auch unter Beteiligung von CD38, die extrazelluläre NAD^+ -Balance kontrollieren (s. Abbildung 36).

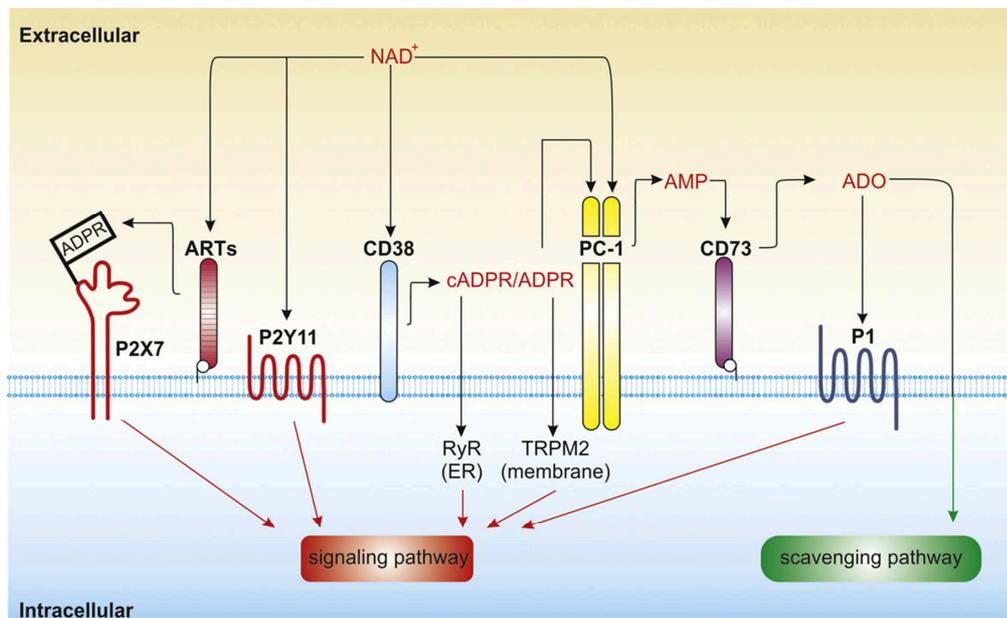


Abbildung 36: Extrazelluläre NAD^+ -Signalwege: NAD^+ -metabolisierende Ektoenzyme wie CD38 und Mono-ADP-Ribosyltransferasen (ART) oder die purinergen Rezeptoren P2X7 und P2Y11 spielen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der extrazellulären NAD^+ -Balance. *Vaisitti et al., FEBS Lett. 2011 Jun 6;585(11):1514-20*

So kann NAD^+ auch als eine Art Zytokin fungieren und über die Bindung an den purinergen Rezeptor P2Y11 die Aktivierung bestimmter Signalwege induzieren. Diese Mechanismen spielen beispielsweise bei Chemotaxisprozessen von Granulozyten eine wichtige Rolle (Moreschi et al. 2006). Darüber hinaus werden auf der Oberfläche vieler Zellen weitere NAD^+ -metabolisierende Ektoenzyme exprimiert, die zur Gruppe der Mono-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) zählen. Vertreter dieser Familie können über die kovalente Bindung einzelner ADPR-Moleküle an spezifische Aminosäurereste die Aktivität anderer Oberflächenproteine regulieren. So führt die ADP-Ribosylierung des purinergen Rezeptors P2X7 zu einer ATP-unabhängigen Aktivierung intrazellulärer Signalwege in T-Zellen, die die Einleitung von Apoptoseprozessen bewirken. Ein Phänomen, das als NAD^+ -induzierter Zelltod bezeichnet wird (Koch-Nolte et al. 2008).

So bleibt die Frage, welche Rolle der Ca^{2+} -Einstrom in MSCs potentiell spielen könnte. Ca^{2+} stellt ein vielseitiges, intrazelluläres Signal dar, das in räumlichen und zeitlichen Mustern auftritt. Durch Bindung von Ca^{2+} an Effektormoleküle wie Calmodulin werden zahlreiche Ca^{2+} -abhängige Prozesse reguliert, die über ein breites zeitliches Spektrum verteilt sein können. So spielen sich Exozytoseprozesse wie die Ausschüttung von Neurotransmittern oder auch Muskelkontraktionen im μs - bzw. ms -Bereich ab, während sich die Änderung in der Transkription oder Proliferation im Bereich von Minuten bis mehreren Stunden bewegen (Berridge et al. 2003). Verderio et al. konnten zeigen, dass durch NAD^+ in Astrozyten eine Ca^{2+} -abhängige Ausschüttung der Neurotransmitter Glutamat und GABA (γ -Aminobuttersäure) induziert wird (Verderio et al. 2001). Auch die Freisetzung von kleinen Membranvesikeln, so genannter Exosomen, kann durch den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration stimuliert werden (Savina et al. 2003). MSCs stellen eine bedeutende Quelle für Exosomen dar, die im Kontext der Zelltherapie zunehmend in den Fokus rücken (Yeo et al. 2013). Sie könnten als Transportvehikel für Wachstumsfaktoren oder andere Wirkstoffe fungieren und diese durch Fusion mit Membranen anderer Zellen ins Zielgewebe freisetzen. Es ist somit von Interesse, ebenfalls in MSCs Signalwege zu identifizieren, die durch einen NAD^+ -induzierten Ca^{2+} -Einstrom aktiviert werden und zelluläre Prozesse wie das Adhäsions- und Migrationsverhalten oder auch die Proliferation, die Differenzierung sowie die Freisetzung von Exosomen beeinflussen.

Neben der enzymatischen Aktivität ist ferner von Interesse, welche Bedeutung die Bindung von CD38 an CD31 für MSCs bei der Vermittlung direkter Zell-Zell-Kontakte haben könnte. So spielt die CD38/CD31-Interaktion unter anderem eine wichtige Rolle beim Durchtritt von Lymphozyten durch die endotheliale Barriere (Deaglio et al. 1998, Deaglio et al. 2000). Da die Übertragung von Signalen durch CD38 in erster Linie über laterale Assoziationen mit anderen Signalmolekülen geschieht, stellt sich die Frage, ob auf der Membran von MSCs ebenfalls

Verbindungen zu anderen Faktoren bestehen, über die potentiell zellulären Prozesse gesteuert werden können (Malavasi et al. 2008).

5.2.4 Potentielle Rollen weiterer Ektoenzyme in MSCs

Neben CD38 und CD157, die über die Metabolisierung von NAD^+ die Motilität sowie Adhäsionsprozesse von Leukozyten regulieren, sind in diesem Kontext weitere Vertreter aus der Familie der Ektoenzyme beteiligt (s. Abbildung 5). Die Rolle von Ektoenzymen in MSCs hingegen und wie sie über die Substrate und Produkte ihrer enzymatischen Reaktionen potentielle Adhäsions-, Migrations- oder sogar immunmodulatorische Prozesse vermitteln, ist ein bislang wenig untersuchtes Feld. Aus den mRNA-Expressionsanalysen der verschiedenen MSC-Typen ergab sich, dass einige Faktoren in MSCs exprimiert und in Teilen auch durch Stimulation beeinflusst werden. Die Nukleotidasen CD39 (Ecto-ATP-Diphosphohydrolase) und CD73 (Ecto-5'-Nucleotidase) katalysieren den sukzessiven Abbau proinflammatorischer ATPs zu Adenosin (s. Abbildung 37).

Adenosin hingegen wirkt als Antiinflammationssignal, indem es unter anderem durch Bindung an die Rezeptoren $\text{A}_{2\text{A}}\text{R}$ und $\text{A}_{2\text{B}}\text{R}$ auf Leukozyten sowie Endothelzellen die Expression von Adhäsionsfaktoren, wie Selektine oder VCAM herunterreguliert und so einen immunsuppressiven Effekt vermittelt (Bouma et al. 1996). Während CD73 als MSC-Positivmarker gilt und entsprechend stark von MSCs aller Gewebearten exprimiert wurde, zeigten MSCs weder im unstimulierten noch im stimulierten Zustand eine Expression von CD39. Dennoch konnte in einigen Studien in Abhängigkeit beider Faktoren eine immunsuppressive Wirkung von MSCs beobachtet werden. So konnten Sadanah-Araujo et al. durch Kokultur humaner BM-MSCs mit T-Zellen die Expression von CD39 in den MSCs induzieren und so eine gesteigerte Adenosinkonzentration erzielen (Saldanha-Araujo et al. 2011). Dies konnte durch die Arbeit von Sattler et al. untermauert werden, die die Koexpression von CD39 und CD73 auf murinen BM-MSCs nachwies, die über die Produktion von Adenosin die Proliferation aktivierter T-Lymphozyten inhibierten (Sattler et al. 2011). Die auf diese Weise vermittelte immunsuppressive Wirkung eröffnet potentiell neue Zugänge für die Behandlung von GvHD oder anderer Entzündungskrankheiten mit MSCs.

Der Abbau von Adenosin wird wiederum von der extrazellulären Adenosin-Desaminase (ADA) katalysiert, die gebunden an die Dipeptidylpeptidase-4 (CD26) auf der Zelloberfläche von Leukozyten lokalisiert ist (s. Abbildung 37). Sie wirkt dem antiinflammatorischen Effekt entgegen und führt unter anderem zu einer verstärkten Transmigration von Lymphozyten (Henttinen et al. 2003). Von den untersuchten MSC-Typen wiesen UC-MSCs die höchste

CD26-mRNA-Expression auf, vergleichbar den Daten von Buyl et al., die UC-MSCs als CD26-positiv beschreiben (Buyl et al. 2014). In MSCs aus der Plazenta sowie aus dem Knochenmark wurde hingegen das Auftreten von sowohl CD26-negativer als auch CD26-positiver Subpopulationen beobachtet (Battula et al. 2007, Buhring et al. 2009). Bislang wurde allerdings nicht untersucht, welche Rolle CD26 in MSCs spielt. Basierend auf der hohen Expressionsintensität von CD26 in UC-MSCs könnte durch die Bindung von ADA ein unerwünschter proinflammatorischer Effekt von diesen Zellen ausgehen.

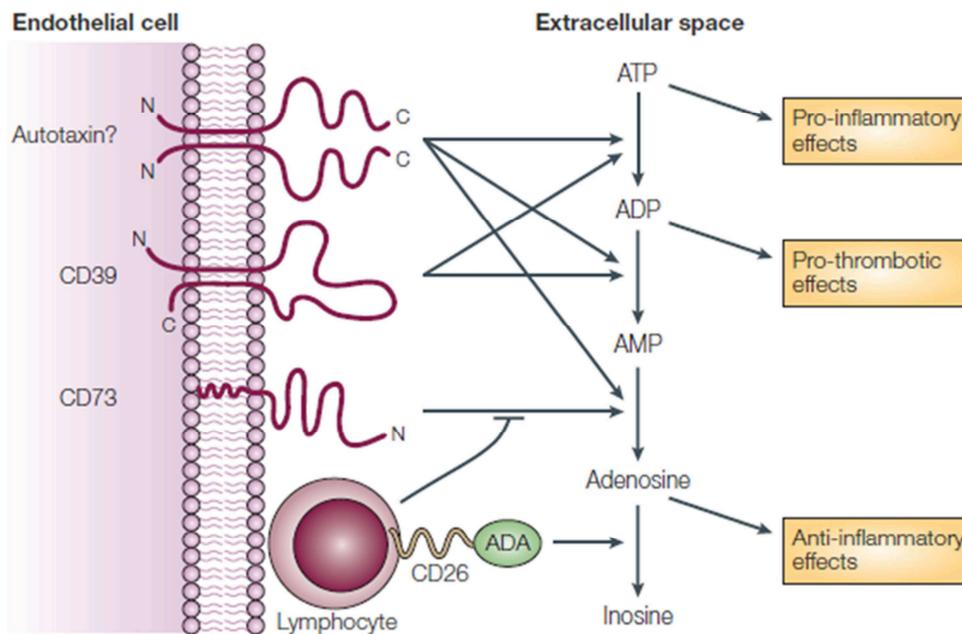


Abbildung 37: Extrazellulärer ATP-Metabolismus: ATP wird von CD39 zu ADP und zu AMP dephosphoryliert, das von CD73 weiter zu Adenosin dephosphoryliert wird. Über die Bindung an purinerge Rezeptoren der P2X- und P2Y-Familie vermittelt ATP proinflammatorische Effekte. Demgegenüber bewirkt Adenosin durch Bindung an Adenosin-Rezeptoren aus der P1-Familie, zu denen die Rezeptoren A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃ zählen, eine Induktion antiinflammatorischer Effekte. Gebunden an CD26 auf Lymphozyten katalysiert die Adenosin-Desaminase (ADA) den Abbau von Adenosin, was zu einer erhöhten Transmigrationsaktivität von Lymphozyten führt und so dem antiinflammatorischen Effekt von Adenosin entgegenwirkt. *Salmi und Jalkanen, Nat Rev Immunol. 2005 Oct;5(10):760-71*

Die Ektoenzyme ADAM10 und ADAM17 aus der Gruppe der Metalloproteasen werden in allen drei MSC-Typen auf hohem Niveau exprimiert, jedoch ist zu möglichen Funktionen beider Faktoren in MSCs bisher nichts bekannt. Sowohl ADAM10, das in erster Linie an der Spaltung der Chemokine CX3CL1 und CXCL16 sowie des VE-Cadherins auf Endothelzellen beteiligt ist, als auch ADMA17, das die proteolytische Modifikation von L-Selektin und

VCAM katalysiert, könnten als wichtige Vermittler bei der Feinabstimmung von Adhäsionsprozessen fungieren (Klein & Bischoff 2011). Die Metalloprotease MT1-MMP (MMP14) wird von verschiedenen Zelltypen, darunter auch Leukozyten und Endothelzellen, exprimiert (Itoh & Seiki 2004). Die MSCs aus den drei Geweben zeigten eine starke MMP14-Expression. Es konnte gezeigt werden, dass MMP-14 eine Rolle bei der Invasion von MSCs durch Membranen und der Infiltration von kollagenhaltiger Matrix spielt (Ries et al. 2007, Lu et al. 2010). Über die Shedding-Aktivitäten von MMP14, die die Modifikation von Adhäsionsmolekülen wie CD44 und ICAM oder auch den Chemokinen CCL7 und CXCL12 bewirken, könnten MSCs ferner Adhäsionsprozesse regulieren und immunregulatorische Funktionen übernehmen.

Von der Aminooxidase VAP-1 sind bislang weder die Expression noch eine Funktion für MSCs beschrieben. Typischerweise wird VAP-1 von Endothelzellen exprimiert und liegt unter ruhenden Bedingungen in intrazellulären Vesikeln vor. Erst durch inflammatorische Stimuli gelangt es an die Oberfläche der Zellen (Jalkanen & Salmi 2008). Obwohl MSCs per se VAP-1-negativ sind und auch nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen nur eine äußerst schwache Zunahme auf mRNA-Ebene beobachtet werden konnte, ließ sich im Falle von UC-MSCs eine deutlich gesteigerte Anzahl an VAP-1-Molekülen auf der Zelloberfläche detektieren. So liegt VAP-1 möglicherweise in UC-MSCs in Vesikeln vor, so dass eine Stimulation eine Translokation an die Zelloberfläche bewirkt. Potentiell könnte demnach über VAP-1 die Interaktion von UC-MSCs mit Immunzellen induziert werden, die wiederum über die oxidative Desaminierung primärer Amine zur Bildung von Aldehydgruppen und somit zur Aktivierung weiterer Signalwege führt (Jalkanen & Salmi 2008).

6 Zusammenfassung und Ausblick

Mesenchymale Stromazellen besitzen als neue therapeutische Modalität enormes Potential, um zur Behandlung von Krankheiten mit einem hohen medizinischen Bedarf eingesetzt zu werden. Für eine wirkungsvolle Anwendung von MSCs im zelltherapeutischen Bereich spielen unter anderem die Beschaffenheit des Spendergewebes, die Isolationsmethoden und die Kultivierungsbedingungen eine ebenso große Rolle wie die Art der Zellapplikation. Gegenüber einer lokalen Transplantation stellt insbesondere die systemische Injektion von MSCs einen Weg dar, die Zellen über einen minimalinvasiven Weg in den Empfängerorganismus zu bringen. Dieser birgt jedoch bislang das Problem, dass nur ein geringer Anteil der Zellen in die geschädigten Gewebe bzw. Organe rekrutiert wird. Um MSCs mit hoher Effizienz zum Zielgewebe zu bringen, ist ein detailliertes Verständnis über die Biologie der Zellen und über Zielfindungs- und Rekrutierungsprozesse sowie über die Mechanismen, die der Zelladhäsion und Migration zugrunde liegen erforderlich. Hierbei stellt sich ebenfalls die Frage, inwieweit ein stimulatorisches Umfeld Einfluss auf die Morphologie sowie das Adhäsionsverhalten von MSCs nehmen könnte und somit das Migrationsverhalten der Zellen bestimmt (s. Anhang Abschnitt 8.11, Seite 172 ff.).

In den vergangenen Jahren lag der Fokus hinsichtlich Zielfindungs- und Rekrutierungsprozesse von MSCs stets auf klassischen Adhäsions- und Migrationsfaktoren, die insbesondere Vertreter aus den Familien der Integrine, Selektine und Chemokinrezeptoren einschließen. Im Kontext der Leukozytenadhäsion gewinnen jedoch Ektoenzyme, die über die Zugänglichkeit der Produkte bzw. Substrate ihrer Enzymreaktion schnellen Einfluss auf das Verhalten von Zellen nehmen, aber auch durch Interaktion mit anderen Faktoren direkte Zell-Zell-Kontakte vermitteln können, zunehmend an Bedeutung. Vor diesem Hintergrund könnten sie potentiell auch für Adhäsions- und Migrationsprozesse von MSCs eine wichtige Rolle spielen, indem sie über lösliche Faktoren im extrazellulären Raum, die die entsprechenden Mechanismen steuern, ein enges Wechselspiel zwischen Gewebe und Zellen erzeugen. Seitens geschädigter Gewebe sind es insbesondere proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IFN- γ , die nach ihrer Ausschüttung in der Regel zu einer veränderten Genexpression in den Zellen der unmittelbaren Umgebung führen. Während die Stimulation von MSCs mit TNF- α und IFN- γ eine deutliche Abnahme der Expression von CD49d hervorruft, das als Untereinheit des Rezeptors VLA-4 über die Interaktion mit VCAM eine wichtige Rolle für die Adhäsion von MSCs an Endothelzellen spielt, bewirkt sie hingegen eine starke Induktion der Expression des Ektoenzym CD38.

Die Art und Weise über die MSCs in einem Zelltherapieansatz über CD38 mit geschädigtem Gewebe hypothetisch in Wechselwirkung treten könnten, ließe sich als Abfolge zeitlich abgestimmter Schritte skizzieren (s. Abbildung 38). In Entzündungsregionen werden zahlreiche Zytokine freigesetzt, zu denen auch TNF- α sowie IFN- γ zählen, die von MSCs durch entsprechende Rezeptoren gebunden werden. Als Antwort auf den Stimulus beginnen exogen verabreichte MSCs CD38 auf ihrer Zelloberfläche zu exprimieren. Das von nekrotischen Zellen des entzündeten Gewebes freigesetzte NAD⁺ wird von CD38 in der ADP-Ribosylzyklusreaktion sowie der cADPR-Hydrolasereaktion zu cADPR und ADPR umgesetzt, die wiederum einen schnellen Einstrom extrazellulärer Ca²⁺-Ionen in MSCs auslösen. Folglich ist es von Bedeutung Signalwege zu identifizieren, die durch einen Ca²⁺-Einstrom in MSCs induziert werden und Adhäsions- sowie Migrationsprozesse oder auch andere Funktionen beeinflussen, die das therapeutische Potential von MSCs begünstigen. Dem Nachteil, dass die Induktion der CD38-Expression in MSCs einen längeren Zeitraum in Anspruch nimmt, ließe sich durch eine Stimulation der Zellen *in vitro* oder durch Überexpression von CD38 begegnen, um vor der Injektion MSCs mit einem CD38-positiven Phänotyp zu generieren.

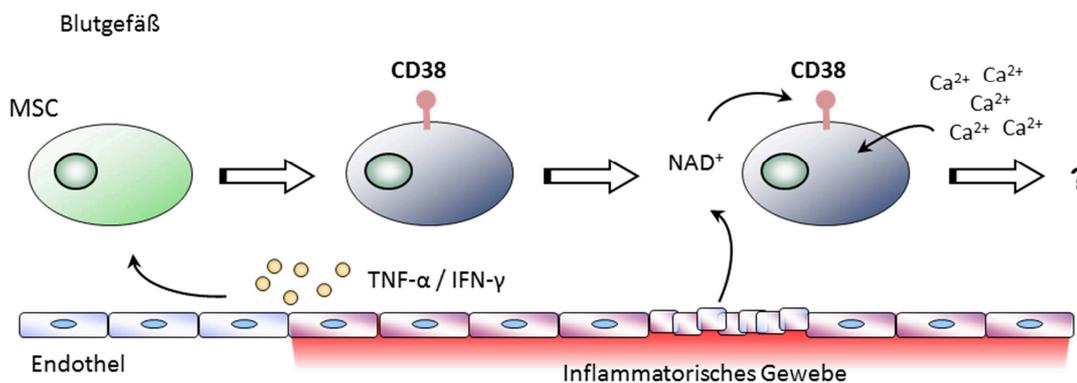


Abbildung 38: Hypothetischer Ablauf einer durch CD38 vermittelten Wechselwirkung von MSCs mit inflammatorischem Gewebe: Von Zellen des inflammatorischen Gewebes werden größere Mengen Zytokine ausgeschüttet, zu denen TNF- α und IFN- γ zählen, die zusammen die Expression von CD38 auf MSCs induzieren. Von geschädigten Zellen wird intrazelluläres NAD⁺ ins extrazelluläre Milieu freigesetzt, das von CD38 durch die ADP-Ribosylzyklusreaktion sowie die cADPR-Hydrolasereaktion zu cADPR und ADPR umgesetzt wird und wiederum einen schnellen Einstrom von Ca²⁺-Ionen in die Zellen induziert.

Welche genaue Rolle der Einstrom von Ca²⁺-Ionen in MSCs spielt, konnte im Zuge der vorliegenden Arbeit final nicht aufgeklärt werden. Obwohl von NAD⁺ ein deutlicher Einfluss auf das Migrationsverhalten von MSCs ausgeht, ist dieser jedoch nicht auf die durch CD38

vermittelte Ca^{2+} -Mobilisierung zurückzuführen. Somit bleibt zu klären, welche Effekte ein kurzzeitiger Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration auf MSCs ausübt und welche Signalwege induziert werden, die insbesondere Adhäsion, Proliferation oder andere Funktionen betreffen, aber auch welche molekularen Mechanismen der stark inhibierenden Wirkung von NAD^+ auf das Migrationsverhalten von MSCs zugrunde liegen. Mögliche Antworten könnten Analysen von anderen NAD^+ -metabolisierenden Enzymen oder Rezeptoren liefern, die zusammen mit CD38 die extrazelluläre Konzentration von NAD^+ beeinflussen. Neben Faktoren, die eine direkte physische Interaktion von MSCs mit Zellen andere Gewebe vermitteln, könnten Moleküle bzw. Enzyme, die die Konzentration löslicher Bestandteile des extrazellulären Milieus kontrollieren und darüber zelluläre Funktionen wie Adhäsion, Migration, Proliferation oder Differenzierung beeinflussen, eine immer wichtigere Rolle für eine wirkungsvolle Anwendung der MSC-basierten Therapie spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit dem Ektoenzym CD38 ein neues durch $\text{TNF-}\alpha/\text{IFN-}\gamma$ -Stimulation induzierbares Oberflächenmolekül auf MSCs identifiziert werden, das enzymatisch aktiv ist und einen durch NAD^+ induzierten Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen vermittelt. Dies könnte aufgrund der unterschiedlich starken Expression in verschiedenen MSC-Typen auch für die klinische Anwendung der Zellen von Bedeutung sein. Zukünftig wird es erforderlich sein, über funktionelle *in vitro* und *in vivo* Analysen aufzuklären, welche Signalwege durch einen Ca^{2+} -Einstrom induziert und welche potentiellen therapeutischen Effekte darüber vermittelt werden.

7 Literaturverzeichnis

- Aarhus, R., Graeff, R. M., Dickey, D. M., Walseth, T. F. and Lee, H. C. (1995) ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *The Journal of biological chemistry*, **270**, 30327-30333.
- Aggarwal, B. B., Gupta, S. C. and Kim, J. H. (2012) Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*, **119**, 651-665.
- Alon, R., Hammer, D. A. and Springer, T. A. (1995) Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow. *Nature*, **374**, 539-542.
- Au, A., Boehm, C. A., Mayes, A. M., Muschler, G. F. and Griffith, L. G. (2007) Formation of osteogenic colonies on well-defined adhesion peptides by freshly isolated human marrow cells. *Biomaterials*, **28**, 1847-1861.
- Baharvand, H., Totonchi, M., Taei, A., Seifinejad, A., Aghdami, N. and Salekdeh, G. H. (2010) Human-induced pluripotent stem cells: derivation, propagation, and freezing in serum- and feeder layer-free culture conditions. *Methods in molecular biology*, **584**, 425-443.
- Barbash, I. M., Chouraqui, P., Baron, J. et al. (2003) Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*, **108**, 863-868.
- Barlow, S., Brooke, G., Chatterjee, K. et al. (2008) Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*, **17**, 1095-1107.
- Bartosh, T. J., Ylostalo, J. H., Mohammadipoor, A., Bazhanov, N., Coble, K., Claypool, K., Lee, R. H., Choi, H. and Prockop, D. J. (2010) Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 13724-13729.
- Battula, V. L., Bareiss, P. M., Treml, S. et al. (2007) Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation; research in biological diversity*, **75**, 279-291.
- Belema-Bedada, F., Uchida, S., Martire, A., Kostin, S. and Braun, T. (2008) Efficient homing of multipotent adult mesenchymal stem cells depends on FROUNT-mediated clustering of CCR2. *Cell stem cell*, **2**, 566-575.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Roderick, H. L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **4**, 517-529.
- Bianco, P., Cao, X., Frenette, P. S., Mao, J. J., Robey, P. G., Simmons, P. J. and Wang, C. Y. (2013) The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nature medicine*, **19**, 35-42.
- Bouma, M. G., van den Wildenberg, F. A. and Buurman, W. A. (1996) Adenosine inhibits cytokine release and expression of adhesion molecules by activated human endothelial cells. *The American journal of physiology*, **270**, C522-529.
- Brooke, G., Tong, H., Levesque, J. P. and Atkinson, K. (2008) Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta. *Stem cells and development*, **17**, 929-940.
- Bruzzo, S., Franco, L., Guida, L., Zocchi, E., Contini, P., Bisso, A., Usai, C. and De Flora, A. (2001) A self-restricted CD38-connexin 43 cross-talk affects NAD⁺ and cyclic ADP-ribose metabolism and regulates intracellular calcium in 3T3 fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 48300-48308.

- Bruzzone, S., Guida, L., Franco, L., Zocchi, E., Corte, G. and De Flora, A. (1998) Dimeric and tetrameric forms of catalytically active transmembrane CD38 in transfected HeLa cells. *FEBS letters*, **433**, 275-278.
- Buhring, H. J., Treml, S., Cerabona, F., de Zwart, P., Kanz, L. and Sobiesiak, M. (2009) Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1176**, 124-134.
- Buyl, K., De Kock, J., Najar, M., Lagneaux, L., Branson, S., Rogiers, V. and Vanhaecke, T. (2014) Characterization of hepatic markers in human Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, **28**, 113-119.
- Cakir-Kiefer, C., Muller-Steffner, H., Oppenheimer, N. and Schuber, F. (2001) Kinetic competence of the cADP-ribose-CD38 complex as an intermediate in the CD38/NAD⁺ glycohydrolase-catalysed reactions: implication for CD38 signalling. *The Biochemical journal*, **358**, 399-406.
- Calderwood, D. A. (2004) Talin controls integrin activation. *Biochemical Society transactions*, **32**, 434-437.
- Caplan, A. I. (1991) Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, **9**, 641-650.
- Caplan, A. I. (1994) The mesengenic process. *Clinics in plastic surgery*, **21**, 429-435.
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B. and Middleton, J. (2007) Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells*, **25**, 2739-2749.
- Chamberlain, G., Wright, K., Rot, A., Ashton, B. and Middleton, J. (2008) Murine mesenchymal stem cells exhibit a restricted repertoire of functional chemokine receptors: comparison with human. *PloS one*, **3**, e2934.
- Chen, S., Liu, Z., Tian, N., Zhang, J., Yei, F., Duan, B., Zhu, Z., Lin, S. and Kwan, T. W. (2006) Intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery. *The Journal of invasive cardiology*, **18**, 552-556.
- Cheng, Z., Ou, L., Zhou, X. et al. (2008) Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 gene to infarcted myocardium improves cardiac performance. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, **16**, 571-579.
- Cho, Y. S., Han, M. K., Choi, Y. B., Yun, Y., Shin, J. and Kim, U. H. (2000) Direct interaction of the CD38 cytoplasmic tail and the Lck SH2 domain. Cd38 transduces T cell activation signals through associated Lck. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 1685-1690.
- Chong, P. P., Selvaratnam, L., Abbas, A. A. and Kamarul, T. (2012) Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, **30**, 634-642.
- Cockayne, D. A., Muchamuel, T., Grimaldi, J. C., Muller-Steffner, H., Randall, T. D., Lund, F. E., Murray, R., Schuber, F. and Howard, M. C. (1998) Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune responses. *Blood*, **92**, 1324-1333.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L. et al. (2008) A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell*, **3**, 301-313.
- Crop, M. J., Baan, C. C., Korevaar, S. S. et al. (2010) Inflammatory conditions affect gene expression and function of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Clinical and experimental immunology*, **162**, 474-486.
- da Silva Meirelles, L., Caplan, A. I. and Nardi, N. B. (2008) In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem cells*, **26**, 2287-2299.

- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C. and Nardi, N. B. (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science*, **119**, 2204-2213.
- Damle, R. N., Wasil, T., Fais, F. et al. (1999) Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **94**, 1840-1847.
- Dazzi, F., Ramasamy, R., Glennie, S., Jones, S. P. and Roberts, I. (2006) The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood reviews*, **20**, 161-171.
- Deaglio, S., Dianzani, U., Horenstein, A. L. et al. (1996) Human CD38 ligand. A 120-KDA protein predominantly expressed on endothelial cells. *Journal of immunology*, **156**, 727-734.
- Deaglio, S., Mallone, R., Baj, G., Arnulfo, A., Surico, N., Dianzani, U., Mehta, K. and Malavasi, F. (2000) CD38/CD31, a receptor/ligand system ruling adhesion and signaling in human leukocytes. *Chemical immunology*, **75**, 99-120.
- Deaglio, S., Morra, M., Mallone, R., Ausiello, C. M., Prager, E., Garbarino, G., Dianzani, U., Stockinger, H. and Malavasi, F. (1998) Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *Journal of immunology*, **160**, 395-402.
- Deaglio, S., Vaisitti, T., Billington, R., Bergui, L., Omede, P., Genazzani, A. A. and Malavasi, F. (2007) CD38/CD19: a lipid raft-dependent signaling complex in human B cells. *Blood*, **109**, 5390-5398.
- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S. and Sawaya, B. E. (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, **29**, 313-326.
- Deshpande, D. A., Walseth, T. F., Panettieri, R. A. and Kannan, M. S. (2003) CD38/cyclic ADP-ribose-mediated Ca²⁺ signaling contributes to airway smooth muscle hyper-responsiveness. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **17**, 452-454.
- Dewitt, S. and Hallett, M. B. (2002) Cytosolic free Ca(2+) changes and calpain activation are required for beta integrin-accelerated phagocytosis by human neutrophils. *The Journal of cell biology*, **159**, 181-189.
- Docheva, D., Popov, C., Mutschler, W. and Schieker, M. (2007) Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *Journal of cellular and molecular medicine*, **11**, 21-38.
- Domanska, U. M., Kruizinga, R. C., Nagengast, W. B., Timmer-Bosscha, H., Huls, G., de Vries, E. G. and Walenkamp, A. M. (2013) A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. *European journal of cancer*, **49**, 219-230.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I. et al. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, **8**, 315-317.
- Egea, V., von Baumgarten, L., Schichor, C. et al. (2011) TNF-alpha respecifies human mesenchymal stem cells to a neural fate and promotes migration toward experimental glioma. *Cell death and differentiation*, **18**, 853-863.
- Forster, R., Davalos-Missslitz, A. C. and Rot, A. (2008) CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature reviews. Immunology*, **8**, 362-371.
- Fox, J. M., Chamberlain, G., Ashton, B. A. and Middleton, J. (2007) Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *British journal of haematology*, **137**, 491-502.
- Franco, L., Guida, L., Bruzzone, S., Zocchi, E., Usai, C. and De Flora, A. (1998) The transmembrane glycoprotein CD38 is a catalytically active transporter responsible for generation and influx of the second messenger cyclic ADP-ribose across membranes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **12**, 1507-1520.

- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I. and Frolova, G. P. (1968) Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, **6**, 230-247.
- Fruscione, F., Scarfi, S., Ferraris, C. et al. (2011) Regulation of human mesenchymal stem cell functions by an autocrine loop involving NAD⁺ release and P2Y₁₁-mediated signaling. *Stem cells and development*, **20**, 1183-1198.
- Fujita, T., Kantarci, A., Warbington, M. L., Zawawi, K. H., Hasturk, H., Kurihara, H. and Van Dyke, T. E. (2005) CD38 expression in neutrophils from patients with localized aggressive periodontitis. *Journal of periodontology*, **76**, 1960-1965.
- Funaro, A. and Malavasi, F. (1999) Human CD38, a surface receptor, an enzyme, an adhesion molecule and not a simple marker. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, **13**, 54-61.
- Goessler, U. R., Bugert, P., Bieback, K., Stern-Straeter, J., Bran, G., Hormann, K. and Riedel, F. (2008) Integrin expression in stem cells from bone marrow and adipose tissue during chondrogenic differentiation. *International journal of molecular medicine*, **21**, 271-279.
- Graeff, R. M., Walseth, T. F., Fryxell, K., Branton, W. D. and Lee, H. C. (1994) Enzymatic synthesis and characterizations of cyclic GDP-ribose. A procedure for distinguishing enzymes with ADP-ribosyl cyclase activity. *The Journal of biological chemistry*, **269**, 30260-30267.
- Guida, L., Bruzzone, S., Sturla, L., Franco, L., Zocchi, E. and De Flora, A. (2002) Equilibrative and concentrative nucleoside transporters mediate influx of extracellular cyclic ADP-ribose into 3T3 murine fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 47097-47105.
- Guo, Z., Zhou, X., Li, J., Meng, Q., Cao, H., Kang, L., Ni, Y., Fan, H. and Liu, Z. (2013) Mesenchymal stem cells reprogram host macrophages to attenuate obliterative bronchiolitis in murine orthotopic tracheal transplantation. *International immunopharmacology*, **15**, 726-734.
- Harburger, D. S. and Calderwood, D. A. (2009) Integrin signalling at a glance. *Journal of cell science*, **122**, 159-163.
- Hemeda, H., Jakob, M., Ludwig, A. K., Giebel, B., Lang, S. and Brandau, S. (2010) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha differentially affect cytokine expression and migration properties of mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*, **19**, 693-706.
- Henttinen, T., Jalkanen, S. and Yegutkin, G. G. (2003) Adherent leukocytes prevent adenosine formation and impair endothelial barrier function by Ecto-5'-nucleotidase/CD73-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry*, **278**, 24888-24895.
- Hicok, K. C. and Hedrick, M. H. (2011) Automated isolation and processing of adipose-derived stem and regenerative cells. *Methods in molecular biology*, **702**, 87-105.
- Honczarenko, M., Le, Y., Swierkowski, M., Ghiran, I., Glodek, A. M. and Silberstein, L. E. (2006) Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem cells*, **24**, 1030-1041.
- Horuk, R. (2001) Chemokine receptors. *Cytokine & growth factor reviews*, **12**, 313-335.
- Howard, M., Grimaldi, J. C., Bazan, J. F., Lund, F. E., Santos-Argumedo, L., Parkhouse, R. M., Walseth, T. F. and Lee, H. C. (1993) Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science*, **262**, 1056-1059.
- Humphries, J. D., Byron, A. and Humphries, M. J. (2006) Integrin ligands at a glance. *Journal of cell science*, **119**, 3901-3903.
- Hung, S. C., Pochampally, R. R., Hsu, S. C., Sanchez, C., Chen, S. C., Spees, J. and Prockop, D. J. (2007) Short-term exposure of multipotent stromal cells to low oxygen increases their expression of CX3CR1 and CXCR4 and their engraftment in vivo. *PloS one*, **2**, e416.

- Huss, R. (2010) Stem cell therapeutics: hope for patients and biopharma! *Stem cells and development*, **19**, 593-594.
- Hussain, A. M., Lee, H. C. and Chang, C. F. (1998) Functional expression of secreted mouse BST-1 in yeast. *Protein expression and purification*, **12**, 133-137.
- Hyduk, S. J., Chan, J. R., Duffy, S. T. et al. (2007) Phospholipase C, calcium, and calmodulin are critical for alpha4beta1 integrin affinity up-regulation and monocyte arrest triggered by chemoattractants. *Blood*, **109**, 176-184.
- Hynes, R. O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, **110**, 673-687.
- Imberti, B., Morigi, M., Tomasoni, S. et al. (2007) Insulin-like growth factor-1 sustains stem cell mediated renal repair. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, **18**, 2921-2928.
- Iqbal, J. and Zaidi, M. (2006) TNF regulates cellular NAD⁺ metabolism in primary macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, **342**, 1312-1318.
- Itoh, M., Ishihara, K., Tomizawa, H., Tanaka, H., Kobune, Y., Ishikawa, J., Kaisho, T. and Hirano, T. (1994) Molecular cloning of murine BST-1 having homology with CD38 and Aplysia ADP-ribosyl cyclase. *Biochemical and biophysical research communications*, **203**, 1309-1317.
- Itoh, Y. and Seiki, M. (2004) MT1-MMP: an enzyme with multidimensional regulation. *Trends in biochemical sciences*, **29**, 285-289.
- Jaakkola, K., Nikula, T., Holopainen, R. et al. (2000) In vivo detection of vascular adhesion protein-1 in experimental inflammation. *The American journal of pathology*, **157**, 463-471.
- Jalkanen, S. and Salmi, M. (2008) VAP-1 and CD73, endothelial cell surface enzymes in leukocyte extravasation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **28**, 18-26.
- Jaramillo-Ferrada, P. A., Wolvetang, E. J. and Cooper-White, J. J. (2012) Differential mesengenic potential and expression of stem cell-fate modulators in mesenchymal stromal cells from human-term placenta and bone marrow. *Journal of cellular physiology*, **227**, 3234-3242.
- Jones, G. N., Moschidou, D., Lay, K. et al. (2012) Upregulating CXCR4 in human fetal mesenchymal stem cells enhances engraftment and bone mechanics in a mouse model of osteogenesis imperfecta. *Stem cells translational medicine*, **1**, 70-78.
- Kaisho, T., Ishikawa, J., Oritani, K., Inazawa, J., Tomizawa, H., Muraoka, O., Ochi, T. and Hirano, T. (1994) BST-1, a surface molecule of bone marrow stromal cell lines that facilitates pre-B-cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 5325-5329.
- Karp, J. M. and Leng Teo, G. S. (2009) Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell stem cell*, **4**, 206-216.
- Keating, A. (2012) Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell stem cell*, **10**, 709-716.
- Klein, T. and Bischoff, R. (2011) Active metalloproteases of the A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) family: biological function and structure. *Journal of proteome research*, **10**, 17-33.
- Koch-Nolte, F., Kernstock, S., Mueller-Dieckmann, C., Weiss, M. S. and Haag, F. (2008) Mammalian ADP-ribosyltransferases and ADP-ribosylhydrolases. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, **13**, 6716-6729.
- Kumar, S. and Ponnazhagan, S. (2007) Bone homing of mesenchymal stem cells by ectopic alpha 4 integrin expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **21**, 3917-3927.
- Lange, C., Togel, F., Itrich, H., Clayton, F., Nolte-Ernsting, C., Zander, A. R. and Westenfelder, C. (2005) Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Kidney international*, **68**, 1613-1617.
- Lapidot, T., Dar, A. and Kollet, O. (2005) How do stem cells find their way home? *Blood*, **106**, 1901-1910.

- Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L. et al. (2008) Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*, **371**, 1579-1586.
- Lee, M. Y., Huang, J. P., Chen, Y. Y., Aplin, J. D., Wu, Y. H., Chen, C. Y., Chen, P. C. and Chen, C. P. (2009a) Angiogenesis in differentiated placental multipotent mesenchymal stromal cells is dependent on integrin alpha5beta1. *PloS one*, **4**, e6913.
- Lee, R. H., Pulin, A. A., Seo, M. J., Kota, D. J., Ylostalo, J., Larson, B. L., Semprun-Prieto, L., Delafontaine, P. and Prockop, D. J. (2009b) Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell stem cell*, **5**, 54-63.
- Legate, K. R. and Fassler, R. (2009) Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails. *Journal of cell science*, **122**, 187-198.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. and Nourshargh, S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology*, **7**, 678-689.
- Liu, H., Xue, W., Ge, G., Luo, X., Li, Y., Xiang, H., Ding, X., Tian, P. and Tian, X. (2010) Hypoxic preconditioning advances CXCR4 and CXCR7 expression by activating HIF-1alpha in MSCs. *Biochemical and biophysical research communications*, **401**, 509-515.
- Liu, Q., Kriksunov, I. A., Graeff, R., Lee, H. C. and Hao, Q. (2007) Structural basis for formation and hydrolysis of the calcium messenger cyclic ADP-ribose by human CD38. *The Journal of biological chemistry*, **282**, 5853-5861.
- Liu, Q., Kriksunov, I. A., Graeff, R., Munshi, C., Lee, H. C. and Hao, Q. (2005) Crystal structure of human CD38 extracellular domain. *Structure*, **13**, 1331-1339.
- Lu, C., Li, X. Y., Hu, Y., Rowe, R. G. and Weiss, S. J. (2010) MT1-MMP controls human mesenchymal stem cell trafficking and differentiation. *Blood*, **115**, 221-229.
- Malavasi, F., Deaglio, S., Ferrero, E. et al. (2006) CD38 and CD157 as receptors of the immune system: a bridge between innate and adaptive immunity. *Molecular medicine*, **12**, 334-341.
- Malavasi, F., Deaglio, S., Funaro, A., Ferrero, E., Horenstein, A. L., Ortolan, E., Vaisitti, T. and Aydin, S. (2008) Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiological reviews*, **88**, 841-886.
- Mallone, R., Funaro, A., Zubiaur, M., Baj, G., Ausiello, C. M., Tacchetti, C., Sancho, J., Grossi, C. and Malavasi, F. (2001) Signaling through CD38 induces NK cell activation. *International immunology*, **13**, 397-409.
- Mariotti, E., Mirabelli, P., Abate, G., Schiattarella, M., Martinelli, P., Fortunato, G., Di Noto, R. and Del Vecchio, L. (2008) Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow and placenta: CD10, CD49d, and CD56 make a difference. *Stem cells and development*, **17**, 1039-1041.
- Martins-Taylor, K. and Xu, R. H. (2012) Concise review: Genomic stability of human induced pluripotent stem cells. *Stem cells*, **30**, 22-27.
- Meirelles Lda, S., Fontes, A. M., Covas, D. T. and Caplan, A. I. (2009) Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & growth factor reviews*, **20**, 419-427.
- Mimeault, M., Hauke, R. and Batra, S. K. (2007) Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clinical pharmacology and therapeutics*, **82**, 252-264.
- Mitrano, T. I., Grob, M. S., Carrion, F., Nova-Lamperti, E., Luz, P. A., Fierro, F. S., Quintero, A., Chaparro, A. and Sanz, A. (2010) Culture and characterization of mesenchymal stem cells from human gingival tissue. *Journal of periodontology*, **81**, 917-925.
- Moreschi, I., Bruzzone, S., Nicholas, R. A. et al. (2006) Extracellular NAD+ is an agonist of the human P2Y11 purinergic receptor in human granulocytes. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 31419-31429.

- Moser, M., Legate, K. R., Zent, R. and Fassler, R. (2009) The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science*, **324**, 895-899.
- Muller, W. A. (2013) Getting leukocytes to the site of inflammation. *Veterinary pathology*, **50**, 7-22.
- Munshi, C., Aarhus, R., Graeff, R., Walseth, T. F., Levitt, D. and Lee, H. C. (2000) Identification of the enzymatic active site of CD38 by site-directed mutagenesis. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 21566-21571.
- Muraoka, O., Tanaka, H., Itoh, M., Ishihara, K. and Hirano, T. (1996) Genomic structure of human BST-1. *Immunology letters*, **54**, 1-4.
- Muschler, G. F., Nakamoto, C. and Griffith, L. G. (2004) Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, **86-A**, 1541-1558.
- Musso, T., Deaglio, S., Franco, L., Calosso, L., Badolato, R., Garbarino, G., Dianzani, U. and Malavasi, F. (2001) CD38 expression and functional activities are up-regulated by IFN-gamma on human monocytes and monocytic cell lines. *Journal of leukocyte biology*, **69**, 605-612.
- Nishina, H., Inageda, K., Takahashi, K., Hoshino, S., Ikeda, K. and Katada, T. (1994) Cell surface antigen CD38 identified as ecto-enzyme of NAD glycohydrolase has hyaluronate-binding activity. *Biochemical and biophysical research communications*, **203**, 1318-1323.
- Nystedt, J., Anderson, H., Tikkanen, J. et al. (2013) Cell surface structures influence lung clearance rate of systemically infused mesenchymal stromal cells. *Stem cells*, **31**, 317-326.
- Ode, A., Duda, G. N., Glaeser, J. D., Matziolis, G., Frauenschuh, S., Perka, C., Wilson, C. J. and Kasper, G. (2010) Toward biomimetic materials in bone regeneration: functional behavior of mesenchymal stem cells on a broad spectrum of extracellular matrix components. *Journal of biomedical materials research. Part A*, **95**, 1114-1124.
- Omori, Y., Honmou, O., Harada, K., Suzuki, J., Houkin, K. and Kocsis, J. D. (2008) Optimization of a therapeutic protocol for intravenous injection of human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia in adult rats. *Brain research*, **1236**, 30-38.
- Ortiz, L. A., Dutreil, M., Fattman, C., Pandey, A. C., Torres, G., Go, K. and Phinney, D. G. (2007) Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 11002-11007.
- Owen, M. (1988) Marrow stromal stem cells. *Journal of cell science. Supplement*, **10**, 63-76.
- Parameswaran, K., Radford, K., Zuo, J., Janssen, L. J., O'Byrne, P. M. and Cox, P. G. (2004) Extracellular matrix regulates human airway smooth muscle cell migration. *The European respiratory journal*, **24**, 545-551.
- Parekkadan, B. and Milwid, J. M. (2010) Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annual review of biomedical engineering*, **12**, 87-117.
- Partida-Sanchez, S., Cockayne, D. A., Monard, S. et al. (2001) Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nature medicine*, **7**, 1209-1216.
- Partida-Sanchez, S., Goodrich, S., Kusser, K., Oppenheimer, N., Randall, T. D. and Lund, F. E. (2004a) Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: impact on the development of humoral immunity. *Immunity*, **20**, 279-291.
- Partida-Sanchez, S., Iribarren, P., Moreno-Garcia, M. E., Gao, J. L., Murphy, P. M., Oppenheimer, N., Wang, J. M. and Lund, F. E. (2004b) Chemotaxis and calcium responses of phagocytes to formyl peptide receptor ligands is differentially regulated by cyclic ADP ribose. *Journal of immunology*, **172**, 1896-1906.

- Pastor-Anglada, M., Casado, F. J., Valdes, R., Mata, J., Garcia-Manteiga, J. and Molina, M. (2001) Complex regulation of nucleoside transporter expression in epithelial and immune system cells. *Molecular membrane biology*, **18**, 81-85.
- Perraud, A. L., Fleig, A., Dunn, C. A. et al. (2001) ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature*, **411**, 595-599.
- Phinney, D. G. and Prockop, D. J. (2007) Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem cells*, **25**, 2896-2902.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C. et al. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, **284**, 143-147.
- Ponte, A. L., Marais, E., Gallay, N., Langonne, A., Delorme, B., Herault, O., Charbord, P. and Domenech, J. (2007) The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem cells*, **25**, 1737-1745.
- Potapova, I. A., Brink, P. R., Cohen, I. S. and Doronin, S. V. (2008) Culturing of human mesenchymal stem cells as three-dimensional aggregates induces functional expression of CXCR4 that regulates adhesion to endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*, **283**, 13100-13107.
- Prockop, D. J. (2009) Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, **17**, 939-946.
- Qiao, C., Xu, W., Zhu, W. et al. (2008) Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. *Cell biology international*, **32**, 8-15.
- Quaranta, V. (1990) Epithelial integrins. *Cell differentiation and development : the official journal of the International Society of Developmental Biologists*, **32**, 361-365.
- Quarona, V., Zaccarello, G., Chillemi, A., Brunetti, E., Singh, V. K., Ferrero, E., Funaro, A., Horenstein, A. L. and Malavasi, F. (2013) CD38 and CD157: a long journey from activation markers to multifunctional molecules. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, **84**, 207-217.
- Ramaschi, G., Torti, M., Festetics, E. T., Sinigaglia, F., Malavasi, F. and Balduini, C. (1996) Expression of cyclic ADP-ribose-synthetizing CD38 molecule on human platelet membrane. *Blood*, **87**, 2308-2313.
- Ranganath, S. H., Levy, O., Inamdar, M. S. and Karp, J. M. (2012) Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell stem cell*, **10**, 244-258.
- Ratajczak, M. Z., Zuba-Surma, E., Kucia, M., Reza, R., Wojakowski, W. and Ratajczak, J. (2006) The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia*, **20**, 1915-1924.
- Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G., Levey, R. H. and Schlossman, S. F. (1980) Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **77**, 1588-1592.
- Ren, G., Zhao, X., Zhang, L. et al. (2010) Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *Journal of immunology*, **184**, 2321-2328.
- Ries, C., Egea, V., Karow, M., Kolb, H., Jochum, M. and Neth, P. (2007) MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood*, **109**, 4055-4063.
- Ringe, J., Strassburg, S., Neumann, K., Endres, M., Notter, M., Burmester, G. R., Kaps, C. and Sittinger, M. (2007) Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *Journal of cellular biochemistry*, **101**, 135-146.

- Rosen, S. D. (2004) Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annual review of immunology*, **22**, 129-156.
- Ruster, B., Gottig, S., Ludwig, R. J., Bistran, R., Muller, S., Seifried, E., Gille, J. and Henschler, R. (2006) Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*, **108**, 3938-3944.
- Sackstein, R. (2005) The lymphocyte homing receptors: gatekeepers of the multistep paradigm. *Current opinion in hematology*, **12**, 444-450.
- Sackstein, R., Merzaban, J. S., Cain, D. W., Dagia, N. M., Spencer, J. A., Lin, C. P. and Wohlgemuth, R. (2008) Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nature medicine*, **14**, 181-187.
- Saldanha-Araujo, F., Ferreira, F. I., Palma, P. V., Araujo, A. G., Queiroz, R. H., Covas, D. T., Zago, M. A. and Panepucci, R. A. (2011) Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. *Stem cell research*, **7**, 66-74.
- Salem, H. K. and Thiemermann, C. (2010) Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem cells*, **28**, 585-596.
- Salmi, M. and Jalkanen, S. (2005) Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nature reviews. Immunology*, **5**, 760-771.
- Salmi, M. and Jalkanen, S. (2012) Ectoenzymes controlling leukocyte traffic. *European journal of immunology*, **42**, 284-292.
- Sanchez-Madrid, F. and del Pozo, M. A. (1999) Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *The EMBO journal*, **18**, 501-511.
- Sarkar, D., Spencer, J. A., Phillips, J. A. et al. (2011) Engineered cell homing. *Blood*, **118**, e184-191.
- Sarkar, D., Vemula, P. K., Teo, G. S., Spelke, D., Karnik, R., Wee le, Y. and Karp, J. M. (2008) Chemical engineering of mesenchymal stem cells to induce a cell rolling response. *Bioconjugate chemistry*, **19**, 2105-2109.
- Sasaki, M., Abe, R., Fujita, Y., Ando, S., Inokuma, D. and Shimizu, H. (2008) Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *Journal of immunology*, **180**, 2581-2587.
- Sattler, C., Steinsdoerfer, M., Offers, M., Fischer, E., Schierl, R., Heseler, K., Daubener, W. and Seissler, J. (2011) Inhibition of T-cell proliferation by murine multipotent mesenchymal stromal cells is mediated by CD39 expression and adenosine generation. *Cell transplantation*, **20**, 1221-1230.
- Savina, A., Furlan, M., Vidal, M. and Colombo, M. I. (2003) Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *The Journal of biological chemistry*, **278**, 20083-20090.
- Scarfi, S., Ferraris, C., Fruscione, F. et al. (2008) Cyclic ADP-ribose-mediated expansion and stimulation of human mesenchymal stem cells by the plant hormone abscisic acid. *Stem cells*, **26**, 2855-2864.
- Schenk, S., Mal, N., Finan, A., Zhang, M., Kiedrowski, M., Popovic, Z., McCarthy, P. M. and Penn, M. S. (2007) Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor. *Stem cells*, **25**, 245-251.
- Schiller, H. B. and Fassler, R. (2013) Mechanosensitivity and compositional dynamics of cell-matrix adhesions. *EMBO reports*, **14**, 509-519.
- Schmidt, S., Moser, M. and Sperandio, M. (2013) The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. *Molecular immunology*, **55**, 49-58.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. and Hume, D. A. (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology*, **75**, 163-189.

- Schuber, F. and Lund, F. E. (2004) Structure and enzymology of ADP-ribosyl cyclases: conserved enzymes that produce multiple calcium mobilizing metabolites. *Current molecular medicine*, **4**, 249-261.
- Segers, V. F., Van Riet, I., Andries, L. J., Lemmens, K., Demolder, M. J., De Becker, A. J., Kockx, M. M. and De Keulenaer, G. W. (2006) Mesenchymal stem cell adhesion to cardiac microvascular endothelium: activators and mechanisms. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **290**, H1370-1377.
- Semon, J. A., Nagy, L. H., Llamas, C. B., Tucker, H. A., Lee, R. H. and Prockop, D. J. (2010) Integrin expression and integrin-mediated adhesion in vitro of human multipotent stromal cells (MSCs) to endothelial cells from various blood vessels. *Cell and tissue research*, **341**, 147-158.
- Shi, M., Li, J., Liao, L., Chen, B., Li, B., Chen, L., Jia, H. and Zhao, R. C. (2007) Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica*, **92**, 897-904.
- Singer, J. W., Keating, A., Cuttner, J. et al. (1984) Evidence for a stem cell common to hematopoiesis and its in vitro microenvironment: studies of patients with clonal hematopoietic neoplasia. *Leukemia research*, **8**, 535-545.
- Snoeck, H. W., Lardon, F., Lenjou, M., Nys, G., Van Bockstaele, D. R. and Peetermans, M. E. (1993) Differential regulation of the expression of CD38 and human leukocyte antigen-DR on CD34+ hematopoietic progenitor cells by interleukin-4 and interferon-gamma. *Experimental hematology*, **21**, 1480-1486.
- Sohni, A. and Verfaillie, C. M. (2013) Mesenchymal Stem Cells Migration Homing and Tracking. *Stem cells international*, **2013**, 130763.
- Sordi, V., Malosio, M. L., Marchesi, F. et al. (2005) Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood*, **106**, 419-427.
- States, D. J., Walseth, T. F. and Lee, H. C. (1992) Similarities in amino acid sequences of Aplysia ADP-ribosyl cyclase and human lymphocyte antigen CD38. *Trends in biochemical sciences*, **17**, 495.
- Steingen, C., Brenig, F., Baumgartner, L., Schmidt, J., Schmidt, A. and Bloch, W. (2008) Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*, **44**, 1072-1084.
- Sumoza-Toledo, A. and Penner, R. (2011) TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signalling. *The Journal of physiology*, **589**, 1515-1525.
- Sun, L., Adebajo, O. A., Koval, A. et al. (2002) A novel mechanism for coupling cellular intermediary metabolism to cytosolic Ca²⁺ signaling via CD38/ADP-ribosyl cyclase, a putative intracellular NAD⁺ sensor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **16**, 302-314.
- Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H. et al. (1998) The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*, **393**, 591-594.
- Takada, Y., Ye, X. and Simon, S. (2007) The integrins. *Genome biology*, **8**, 215.
- Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**, 663-676.
- Tao, R., Sun, H. Y., Lau, C. P., Tse, H. F., Lee, H. C. and Li, G. R. (2011) Cyclic ADP ribose is a novel regulator of intracellular Ca²⁺ oscillations in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, **15**, 2684-2696.
- Tliba, O., Cidlowski, J. A. and Amrani, Y. (2006) CD38 expression is insensitive to steroid action in cells treated with tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by a mechanism involving the up-regulation of the glucocorticoid receptor beta isoform. *Molecular pharmacology*, **69**, 588-596.
- Tliba, O., Panettieri, R. A., Jr., Tliba, S., Walseth, T. F. and Amrani, Y. (2004) Tumor necrosis factor-alpha differentially regulates the expression of proinflammatory genes in human

- airway smooth muscle cells by activation of interferon-beta-dependent CD38 pathway. *Molecular pharmacology*, **66**, 322-329.
- Togel, F., Cohen, A., Zhang, P., Yang, Y., Hu, Z. and Westenfelder, C. (2009) Autologous and allogeneic marrow stromal cells are safe and effective for the treatment of acute kidney injury. *Stem cells and development*, **18**, 475-485.
- Togel, F., Hu, Z., Weiss, K., Isaac, J., Lange, C. and Westenfelder, C. (2005) Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *American journal of physiology. Renal physiology*, **289**, F31-42.
- Togel, F. E. and Westenfelder, C. (2010) Mesenchymal stem cells: a new therapeutic tool for AKI. *Nature reviews. Nephrology*, **6**, 179-183.
- Uccelli, A., Moretta, L. and Pistoia, V. (2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews. Immunology*, **8**, 726-736.
- Vaisitti, T., Aydin, S., Rossi, D. et al. (2010) CD38 increases CXCL12-mediated signals and homing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, **24**, 958-969.
- Verderio, C., Bruzzone, S., Zocchi, E., Fedele, E., Schenk, U., De Flora, A. and Matteoli, M. (2001) Evidence of a role for cyclic ADP-ribose in calcium signalling and neurotransmitter release in cultured astrocytes. *Journal of neurochemistry*, **78**, 646-657.
- Von Lutichau, I., Notohamiprodjo, M., Wechselberger, A., Peters, C., Henger, A., Seliger, C., Djafarzadeh, R., Huss, R. and Nelson, P. J. (2005) Human adult CD34- progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4. *Stem cells and development*, **14**, 329-336.
- Wang, L., Li, Y., Chen, J., Gautam, S. C., Zhang, Z., Lu, M. and Chopp, M. (2002) Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Experimental hematology*, **30**, 831-836.
- Wang, S., Qu, X. and Zhao, R. C. (2012) Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Journal of hematology & oncology*, **5**, 19.
- Wegener, K. L., Partridge, A. W., Han, J., Pickford, A. R., Liddington, R. C., Ginsberg, M. H. and Campbell, I. D. (2007) Structural basis of integrin activation by talin. *Cell*, **128**, 171-182.
- Wegmeyer, H., Broske, A. M., Leddin, M. et al. (2013) Mesenchymal stromal cell characteristics vary depending on their origin. *Stem cells and development*, **22**, 2606-2618.
- Wickstrom, S. A., Lange, A., Montanez, E. and Fassler, R. (2010) The ILK/PINCH/parvin complex: the kinase is dead, long live the pseudokinase! *The EMBO journal*, **29**, 281-291.
- Wu, Y. and Zhao, R. C. (2012) The role of chemokines in mesenchymal stem cell homing to myocardium. *Stem cell reviews*, **8**, 243-250.
- Wynn, R. F., Hart, C. A., Corradi-Perini, C., O'Neill, L., Evans, C. A., Wraith, J. E., Fairbairn, L. J. and Bellantuono, I. (2004) A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*, **104**, 2643-2645.
- Xiao, Q., Wang, S. K., Tian, H. et al. (2012) TNF-alpha increases bone marrow mesenchymal stem cell migration to ischemic tissues. *Cell biochemistry and biophysics*, **62**, 409-414.
- Yeo, R. W., Lai, R. C., Zhang, B., Tan, S. S., Yin, Y., Teh, B. J. and Lim, S. K. (2013) Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, **65**, 336-341.
- Yu, X., Chen, D., Zhang, Y., Wu, X., Huang, Z., Zhou, H., Zhang, Y. and Zhang, Z. (2012) Overexpression of CXCR4 in mesenchymal stem cells promotes migration, neuroprotection and angiogenesis in a rat model of stroke. *Journal of the neurological sciences*, **316**, 141-149.

- Yuan, L., Sakamoto, N., Song, G. and Sato, M. (2013) Low-level shear stress induces human mesenchymal stem cell migration through the SDF-1/CXCR4 axis via MAPK signaling pathways. *Stem cells and development*, **22**, 2384-2393.
- Zilber, M. T., Gregory, S., Mallone, R., Deaglio, S., Malavasi, F., Charron, D. and Gelin, C. (2000) CD38 expressed on human monocytes: a coaccessory molecule in the superantigen-induced proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 2840-2845.
- Zocchi, E., Franco, L., Guida, L., Benatti, U., Bargellesi, A., Malavasi, F., Lee, H. C. and De Flora, A. (1993) A single protein immunologically identified as CD38 displays NAD⁺ glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities at the outer surface of human erythrocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, **196**, 1459-1465.
- Zocchi, E., Franco, L., Guida, L., Calder, L. and De Flora, A. (1995) Self-aggregation of purified and membrane-bound erythrocyte CD38 induces extensive decrease of its ADP-ribosyl cyclase activity. *FEBS letters*, **359**, 35-40.
- Zou, Y. R., Kottmann, A. H., Kuroda, M., Taniuchi, I. and Littman, D. R. (1998) Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, **393**, 595-599.
- Zubiaur, M., Fernandez, O., Ferrero, E., Salmeron, J., Malissen, B., Malavasi, F. and Sancho, J. (2002) CD38 is associated with lipid rafts and upon receptor stimulation leads to Akt/protein kinase B and Erk activation in the absence of the CD3-zeta immune receptor tyrosine-based activation motifs. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 13-22.
- Zubiaur, M., Izquierdo, M., Terhorst, C., Malavasi, F. and Sancho, J. (1997) CD38 ligation results in activation of the Raf-1/mitogen-activated protein kinase and the CD3-zeta/zeta-associated protein-70 signaling pathways in Jurkat T lymphocytes. *Journal of immunology*, **159**, 193-205.
- Zucchetto, A., Vaisitti, T., Benedetti, D. et al. (2012) The CD49d/CD29 complex is physically and functionally associated with CD38 in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, **26**, 1301-1312.

8 Anhang

8.1 CD38-Gensynthesen

CD38

ctcgagacattgctctgacacaactgtttcactagcaacctcaaacagacaccatggccaactgcgagttcagcccgtgtccgggacaaaacc
ctgctccggctcttaggagagcccaactctgtcttggcgtcagatcctgtctctgatcctcgtcgtgctcgcgggtgtcgtcccagggtggcgc
cagcagtgagcgggtccgggaccaccaagcgtttcccagaccgtcctggcgcgatcgtcgaagtacactgaaattcctctgagatgacatgt
agactgccaagtgtatgggatgcttcaagggtgcatatttcaaaacatccttgaacattactgaagaactatcagccactaatgaagttgggaac
tcagaccgtacctgcaacaagattcttcttggagcagaataaaagatctggccatcagttcacacaggtccagcgggacatgtccacctggaggac
acgtgctaggtcactgtgatgacctacatggtgtggtgaattcaacacttccaaaataaactatcaatctgcccagactgggaaaggactgcag
caacaacctgtttcagatctggaacgggttcccaggtttgcagaagctcctgtgatgtggtccatgtgatgtcaatgatcccgcagtaaaat
ctttgacaaaaacagcacttttgggaggtggagtcataattgcaaccagagaaggttcagacactagaggcctgggtgatacatgttggaaagaga
agattccagagacttatccaggatcccaccataaaagagctggaatcgaattataagcaaaaggaaatattcaatttctgcaagaatatctacagacctg
acaagtttctcagtggtgaaaaatcctgaggattcatctgcacatctgagatctgagccagtcgctgtggtgttttagtccttggcggccgctccc
ccccccctaacgttactggccgaagccgcttggaaatagccggtgtgcttggctctatgttatttccaccatattgcccgttttggcaatgtgagggc
ccggaacctggccctgtctctgacgagcattctaggggtctttcccctcgcgcaaaaggaatgcaaggctgttgaatgtcgtgaaggaaagcagttc
ctctggaagcttctgaagacaaaacgctctgtagcgaccttctcagggcagcggaaacccccacctggcgacaggtgcctctcggccaaaagcc
acgtgtataagatacactgcaaaaggcggcacaacccagtgccacgttggatgtgagttgatagtgtgaaagagtcfaatgctctcctcaagcgtatc
aacaaggggtgaaggtgccagaaggtacccattgtatggatctgatctgggctcctgggtgcacatgctttacatgtgtttagtcgaggttaaaa
aacgtctagggccccgaaccacgggacgtgttttcttggaaaaacagatgataatgtcgac

A17-CD38

ctcgagacattgctctgacacaactgtttcactagcaacctcaaacagacaccatgtctagagagcccaactctgtcttggcgtcagatcctgg
tctgatcctcgtcgtggtgctcgcgggtgctcctccgaggtggcggcagcagtgagcgggtcgggaccaccaagcgtttcccagaccgtcct
ggcgcgatgcgtaagtaactgaaattcctctgagatgagacatgtagactgccaagtgtatgggatgcttcaagggtgcatatttcaaaacatcc
ttgcaacattactgaagaactatcagccactaatgaagttgggaactcagaccgtacctgcaacaagattcttcttggagcagaataaaagatctgg
cccatcagttcacacaggtccagcgggacatgtccacctggaggacacgctgtaggctacctgtgatgacctacatggtgtggtgaattcaacac
ttcaaaaataaactatcaatcttcccagactgggaaaggactgcagcaacaacctgtttcagatctggaacgggttcccaggtttgcagaag
ctgctgtgatgtggtccatgtgatgctcaatggatcccgcagtaaaatcttggacaaaacagcacttttgggaggtggaaagtcataattgcaaccag
agaaggttcagacactagaggcctgggtgatacatggtggaagagaagattccagagacttatgcccaggtccaccataaaagagctggaatcgaat
ataagcaaaaggaaatattcaatttctgcaagaatatctacagacctgacaagtttctcagtggtgaaaaatcctgaggattcatcttgcacatctgagat
ctgagccagtcgctgtggtgttttagtccttggcggccgctccccccccctaacgttactggccgaagccgcttggaaatagccggtgtgctgtt
gtctatgttatttccaccatattgcccgttttggcaatgtgagggccccgaaacctggccctgtctctgacgagcattctaggggtcttcccctc
gccaaggaatgcaaggtctgttgaatgtcgtgaaggaaagcagttcctctggaagcttcttgaagacaaaacgctctgtagcgaccttggcagcag
cggaacccccacctggcgacaggtgcctctcggccaaaagccactgtataagatacactgcaaaaggcggcacaacccagtgccacgttgtg
agttggatagttgtgaaagagtcfaatgctctcctcaagcgtatcaacaagggctgaaggatgccagaaggtacccattgtatggatctgatc
tgggctcctgggtgcacatgctttacatgtgttttagtcgaggttaaaaaacgtctagggccccgaaccacgggacgtgttttcttggaaaaacagc
gataatgtcgac

E226L-CD38

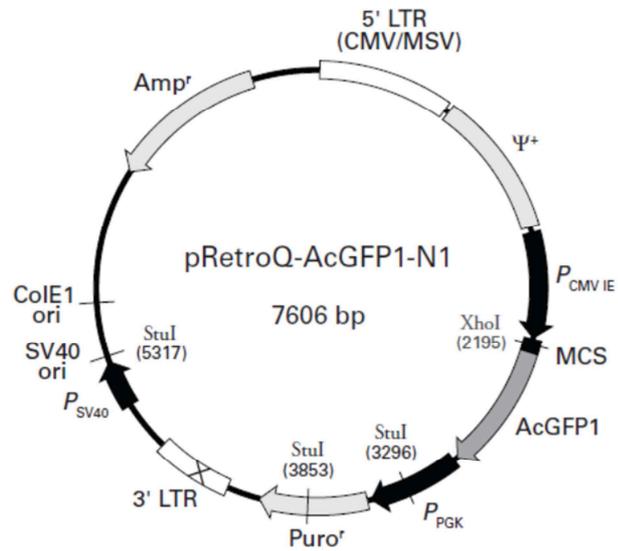
ctcgagacattgcttctgacacaactgtgttctactagcaacctcaacaagacaccatggccaactgcgagttcagcccgggtgtccggggacaacc
ctgctgccggctctctaggagagcccaactctgtcttggcgtcagatcctgtgctcctgacccctgctggtgctcgcgggtggtcgtcccagggtggcgc
cagcagtgagcgggtccgggaccaccaagcgtttcccagaccgtcctggcgcgatgctcaagtacactgaaattcctcctgagatgagacatgt
agactgccaaaagtgtatgggatgcttcaagggtgcatfitttcaaaacatccttgaacattactgaagaagactatcagccactaatgaagtgggaac
tcagaccgtaccttgaacaagattcttcttggagcagaataaaagatctggccatcagttcacacaggtccagcgggacatgtcacctggaggac
acgtgctaggtaccttctgtagctcactatggtgtggtgaattcaacacttccaaaataactatcaatcttcccagactggagaaaggactgcag
caacaacctgtttcagatcttggaaaacggttcccaggttgcagaagctgcctgtgatgtgtccatgtgatgctcaatggatcccagtaaaat
cttgcacaaaacagcactttgggagtgtgta^{fa}gtccataattgcaaccagagaagggtcagacactagaggcctgggtgatacatggtggaagaga
agattccagagacttatgccagatcccaccataaaagagctggaatcgattatagcaaaaggaatattcaatttctgcaagaatatctacagacctg
acaagtttctcagtggtgaaaaatcctgaggattcatcttgcacatctgagatctga^{ccagtcgctgtggtgttttagctccttggcggccgcctccc}
^{ccccctaacgttactggccgaagcgcgttgaataagcgggtgtgcgttctctatgttattttccaccatattgccgtcttttggcaatgtgagggc}
^{ccggaacctggcctgtctcttgacgagcattcctaggggtctttcccctctcgcacaaaggaatgcaaggctgttgaatgctgtaaggaagcagttc}
^{ctctggaagcttctgaagacaacaacgtctgtagcgaccttgcagcagcgggaacccccacctggcgacaggtgcctctcggccaaaagcc}
^{acgtgtataagatacacctgcaaaagcgggcacacccccagtgccacgttgtgagttgatagttgtgaaagagtcaaatggtctctcctcaagcgtattc}
^{aacaaggggctgaaggatgccagaaaggtacccattgtatgggatctgatctgggcctcgtgacatgctttacatgtgtttagtcgaggtfaaaaa}
^{aacgtctagggcccccgaaccacgggacgtgttttctttgaaaaacacgatgataatgtcgac}

Legende

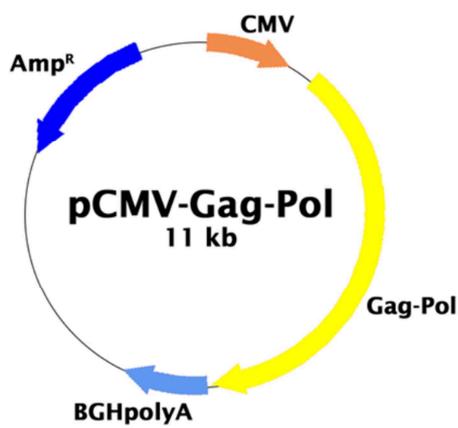
<i>Xho</i> I-Schnittstelle	Beta-Globin 5'UTR	Kozak-Sequenz	CD38 (kodierende Sequenz)
30 nt CD38 3'UTR inkl. <i>Not</i> I-Schnittstelle	IRES-Sequenz	E226L-Austausch	<i>Sall</i> I-Schnittstelle

8.2 Plasmidkarten

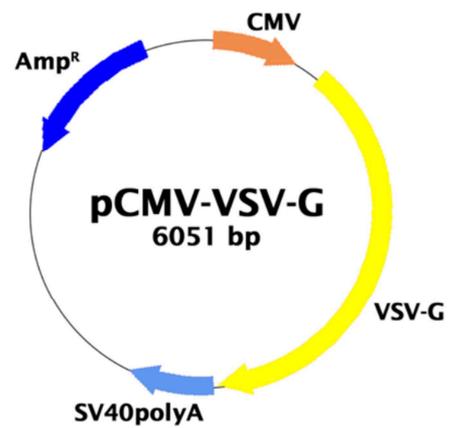
pRetroQ-AcGFP-N1 Retroviraler Transfevektor



pCMV-Gag-Pol Verpackungsplasmid



pCMV-VSV-G Verpackungsplasmid



8.3 RealTime ready Custom Panel

Tabelle 23: Lister der im Realtime ready Custom Panel enthaltenen spezifischen Primerpaare zur Genexpressionsanalyse. Neben Tests zur Analyse von 371 Genen befinden sich zusätzlich acht Referenzgene (rot markiert) und fünf Kontrollen im Panel. Insgesamt besteht das Panel aus 384 Tests.

Nr.	Test-ID	Gensymbol	Alias	Beschreibung
1	117237	CSPG4 H. sapiens	HMW-MAA, MCSP, MCSPG, MEL-CSPG, MSK16, NG2	chondroitin sulfate proteoglycan 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:2466]
2	100426	FAS H. sapiens	ALPS1A, APO-1, APT1, CD95, FAS1, FASTM, TNFRSF6	Fas (TNF receptor superfamily, member 6) [Source:HGNC Symbol;Acc:11920]
3	113395	CCL5 H. sapiens	D17S136E, MGC17164, RANTES, SCYA5, SISd, TCP228	chemokine (C-C motif) ligand 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:10632]
4	113971	IL2RB H. sapiens	CD122, P70-75	interleukin 2 receptor, beta [Source:HGNC Symbol;Acc:6009]
5	112452	FST H. sapiens	FS	follistatin [Source:HGNC Symbol;Acc:3971]
6	104651	LTBP1 H. sapiens	MGC163161	latent transforming growth factor beta binding protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:6714]
7	110688	FGF1 H. sapiens	AFGF, ECGF, ECGF-beta, ECGFA, ECGFB, FGF-alpha, FGFA, GLIO703, HBGF1	fibroblast growth factor 1 (acidic) [Source:HGNC Symbol;Acc:3665]
8	105821	NTRK3 H. sapiens	gp145(trkC), TRKC	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:8033]
9	110765	ITGA4 H. sapiens	CD49D, IA4, MGC90518	integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor) [Source:HGNC Symbol;Acc:6140]
10	103943	MMP1 H. sapiens	CLG, CLGN	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase) [Source:HGNC Symbol;Acc:7155]
11	103193	ROBO1 H. sapiens	DUTT1, FLJ21882, MGC131599, MGC133277, SAX3	roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (Drosophila) [Source:HGNC Symbol;Acc:10249]
12	135876	HLA-G H. sapiens	MHC-G	HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain G Precursor (HLA G antigen) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P17693]
13	110687	CD44 H. sapiens	CD44R, CDW44, CSPG8, ECMR-III, HCELL, HUTCH-I, IN, LHR, MC56, MDU2, MDU3, MGC10468, MIC4, Pgp1	CD44 molecule (Indian blood group) [Source:HGNC Symbol;Acc:1681]
14	108032	TFPI2 H. sapiens	FLJ21164, PP5, REF1, TFPI-2	tissue factor pathway inhibitor 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:11761]
15	109591	ECE1 H. sapiens	ECE	endothelin converting enzyme 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:3146]
16	100917	FOS H. sapiens	AP-1, c-fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog [Source:HGNC Symbol;Acc:3796]
17	111243	NCAM1 H. sapiens	CD56, MSK39, NCAM	neural cell adhesion molecule 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:7656]
18	104048	FASLG H. sapiens	APT1LG1, CD178, CD95-L, CD95L, FasL, TNFSF6	Fas ligand (TNF superfamily, member 6) [Source:HGNC Symbol;Acc:11936]
19	110710	CCL7 H. sapiens	FIC, MARC, MCP-3, MCP3, MGC138463, MGC138465, NC28, SCYA6, SCYA7	chemokine (C-C motif) ligand 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:10634]
20	117429	IL3RA H. sapiens	CD123, hIL-3Ra, IL3R, IL3RAY, IL3RX, IL3RY, MGC34174	interleukin 3 receptor, alpha (low affinity) [Source:HGNC Symbol;Acc:6012]

Anhang

21	100950	IL1B H. sapiens	IL-1, IL-1B, IL1-BETA, IL1F2	interleukin 1, beta [Source:HGNC Symbol;Acc:5992]
22	115675	CCDC80 H. sapiens	DRO1, MGC131805, MGC134851, okuribin, SSG1, URB	coiled-coil domain containing 80 [Source:HGNC Symbol;Acc:30649]
23	100912	FGF2 H. sapiens	BFGF, FGFB, HBGF-2	fibroblast growth factor 2 (basic) [Source:HGNC Symbol;Acc:3676]
24	100524	IGF1R H. sapiens	CD221, IGFIR, IGFR, JTK13, MGC142170, MGC142172, MGC18216	insulin-like growth factor 1 receptor [Source:HGNC Symbol;Acc:5465]
25	113140	ITGA5 H. sapiens	CD49e, FNRA, VLA5A	integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide) [Source:HGNC Symbol;Acc:6141]
26	103899	MMP2 H. sapiens	CLG4, CLG4A, MMP-II, MONA, TBE-1	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase) [Source:HGNC Symbol;Acc:7166]
27	118787	NGFRAP1 H. sapiens	Bex, BEX3, DXS6984E, HGR74, NADE	nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:13388]
28	139599	NOS3 H. sapiens	ECNOS, eNOS	nitric oxide synthase 3 (endothelial cell) [Source:HGNC Symbol;Acc:7876]
29	135943	SELE H. sapiens	CD62E, ELAM, ELAM1, ESEL, LECAM2	selectin E [Source:HGNC Symbol;Acc:10718]
30	137543	DDIT4 H. sapiens	Dig2, FLJ20500, REDD-1, REDD1, RP11-442H21, RTP801	DNA-damage-inducible transcript 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:24944]
31	109516	XPNPEP1 H. sapiens	APP1, SAMP, XPNPEP, XPNPEPL, XPNPEPL1	X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P) 1, soluble [Source:HGNC Symbol;Acc:12822]
32	110770	TWIST1 H. sapiens	ACS3, bHLHa38, BPES2, BPES3, CRS1, H-twist, SCS, TWIST	twist homolog 1 (Drosophila) [Source:HGNC Symbol;Acc:12428]
33	104740	THBS1 H. sapiens	THBS, THBS-1, TSP, TSP-1, TSP1	thrombospondin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:11785]
34	104431	SFRP2 H. sapiens	FRP-2, SARP1, SDF-5	secreted frizzled-related protein 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:10777]
35	111343	CCL8 H. sapiens	HC14, MCP-2, MCP2, SCYA10, SCYA8	chemokine (C-C motif) ligand 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:10635]
36	110880	IL4R H. sapiens	CD124, IL4RA	interleukin 4 receptor [Source:HGNC Symbol;Acc:6015]
37	100958	IL2 H. sapiens	IL-2, lymphokine, TCGF	interleukin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:6001]
38	110108	ILK H. sapiens	DKFZp686F1765, ILK-2, P59	integrin-linked kinase [Source:HGNC Symbol;Acc:6040]
39	140318	FGF4 H. sapiens	HBGF-4, HST, HST-1, HSTF1, K-FGF, KFGF	fibroblast growth factor 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:3682]
40	111759	IGF2R H. sapiens	CD222, CIMPR, M6P-R, MPR1, MPRI	insulin-like growth factor 2 receptor [Source:HGNC Symbol;Acc:5467]
41	113076	ITGA6 H. sapiens	CD49f, DKFZp686J01244, FLJ18737, ITGA6B, VLA-6	integrin, alpha 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:6142]
42	103167	MMP3 H. sapiens	CHDS6, MGC126102, MGC126103, MGC126104, MMP-3, SL-1, STMY, STMY1, STR1	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase) [Source:HGNC Symbol;Acc:7173]
43	133030	NAV1 H. sapiens	DKFZp781D0314, FLJ12560, FLJ14203,	neuron navigator 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:15989]

			KIAA1151, MGC14961, POMFIL3, steerin-1, STEERIN1, UNC53H1	
44	105530	MCAM H. sapiens	CD146, MUC18	melanoma cell adhesion molecule [Source:HGNC Symbol;Acc:6934]
45	112968	SELL H. sapiens	CD62L, hLHRc, LAM-1, LAM1, LECAM1, Leu-8, LEU8, LNHR, LSEL, Lyam-1, LYAM1, PLNHR, TQ1	selectin L [Source:HGNC Symbol;Acc:10720]
46	114601	RGS4 H. sapiens	DKFZp761F1924, MGC2124, MGC60244, RGP4, SCZD9	regulator of G-protein signaling 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:10000]
47	115339	ENTPD1 H. sapiens	ATPDase, CD39, DKFZp686D194, DKFZp686I093, FLJ40921, FLJ40959, NTPDase-1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:3363]
48	114775	ZEB1 H. sapiens	AREB6, BZP, DELTAEF1, FECD6, MGC133261, NIL-2- A, NIL2A, TCF8, ZEB, Zfhep, Zfhx1a	zinc finger E-box binding homeobox 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:11642]
49	137066	CDH2 H. sapiens	CD325, CDHN, CDw325, NCAD	cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal) [Source:HGNC Symbol;Acc:1759]
50	116705	SFRP2 H. sapiens	FRP-2, SARP1, SDF- 5	secreted frizzled-related protein 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:10777]
51	111292	CCL13 H. sapiens	CKb10, MCP-4, MGC17134, NCC-1, NCC1, SCYA13, SCYL1	chemokine (C-C motif) ligand 13 [Source:HGNC Symbol;Acc:10611]
52	112257	IL5RA H. sapiens	CD125, CDw125, HSIL5R3, IL5R, MGC26560	interleukin 5 receptor, alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:6017]
53	137634	IL3 H. sapiens	IL-3, MCGF, MGC79398, MGC79399, MULTI- CSF	interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple) [Source:HGNC Symbol;Acc:6011]
54	126341	FBLIM1 H. sapiens	CAL, DKFZp434G171, FBLP-1, FBLP1, migfilin	filamin binding LIM protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:24686]
55	113109	FGF7 H. sapiens	HBGF-7, KGF	fibroblast growth factor 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:3685]
56	105772	TEK H. sapiens	CD202b, TIE-2, TIE2, VMCM, VMCM1	TEK tyrosine kinase, endothelial [Source:HGNC Symbol;Acc:11724]
57	111900	ITGA7 H. sapiens	FLJ25220	integrin, alpha 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:6143]
58	104396	MMP7 H. sapiens	MMP-7, MPSSL1, PUMP-1	matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine) [Source:HGNC Symbol;Acc:7174]
59	103642	SERPINE2 H. sapiens	DKFZp686A13110, GDN, nexin, PI-7, PI7, PN-1, PN1, PNI	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:8951]
60	105242	NT5E H. sapiens	CD73, E5NT, eN, eNT, NT, NT5, NTE	5'-nucleotidase, ecto (CD73) [Source:HGNC Symbol;Acc:8021]
61	113067	SELP H. sapiens	CD62, CD62P, FLJ45155, GMP140, GRMP, LECAM3, PADGEM, PSEL	selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62) [Source:HGNC Symbol;Acc:10721]
62	136966	S100A6 H. sapiens	2A9, 5B10, CABP, CACY, PRA	S100 calcium binding protein A6 [Source:HGNC Symbol;Acc:10496]
63	100250	CD38 H. sapiens	T10	CD38 molecule [Source:HGNC Symbol;Acc:1667]
64	114816	ZEB2 H. sapiens	FLJ42816, HSPC082, KIAA0569, SIP-1,	zinc finger E-box binding homeobox 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:14881]

Anhang

			SIP1, SMADIP1, ZFHX1B	
65	130877	NLGN1 H. sapiens	KIAA1070, MGC45115, NL1	neuroligin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:14291]
66	101232	TNFRSF10A H. sapiens	Apo2, CD261, DR4, MGC9365, TRAILR-1, TRAILR1	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a [Source:HGNC Symbol;Acc:11904]
67	102711	CCL17 H. sapiens	A-152E5, ABCD-2, MGC138271, MGC138273, SCYA17, TARC	chemokine (C-C motif) ligand 17 [Source:HGNC Symbol;Acc:10615]
68	112272	IL6R H. sapiens	CD126, IL-6R-1, IL-6R-alpha, IL6RA, MGC104991	interleukin 6 receptor [Source:HGNC Symbol;Acc:6019]
69	113614	IL6 H. sapiens	BSF2, HGF, HSF, IFNB2, IL-6	interleukin 6 (interferon, beta 2) [Source:HGNC Symbol;Acc:6018]
70	112950	PXN H. sapiens	FLJ16691	paxillin [Source:HGNC Symbol;Acc:9718]
71	111498	FGF9 H. sapiens	GAF, HFBG-9, MGC119914, MGC119915, SYNS3	fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor) [Source:HGNC Symbol;Acc:3687]
72	104725	TGFBR1 H. sapiens	AAT5, ACVRLK4, ALK-5, ALK5, LDS1A, LDS2A, SKR4, TGFR-1	transforming growth factor, beta receptor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:11772]
73	140643	ITGA8 H. sapiens		integrin, alpha 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:6144]
74	136019	MMP9 H. sapiens	CLG4B, GELB, MANDP2, MMP-9	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase) [Source:HGNC Symbol;Acc:7176]
75	113134	NRG1 H. sapiens	ARIA, GGF, GGF2, HGL, HRG, HRG1, HRGA, MST131, NDF, SMDF	neuregulin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:7997]
76	116810	THY1 H. sapiens	CD90, FLJ33325	Thy-1 cell surface antigen [Source:HGNC Symbol;Acc:11801]
77	122929	ARHGAP29 H. sapiens	PARG1, RP11-255E17	Rho GTPase activating protein 29 [Source:HGNC Symbol;Acc:30207]
78	108043	JAG1 H. sapiens	AGS, AHD, AWS, CD339, HJ1, JAGL1, MGC104644	jagged 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:6188]
79	108460	MMP24 H. sapiens	MMP25, MT-MMP5, MT5-MMP	matrix metalloproteinase 24 (membrane-inserted) [Source:HGNC Symbol;Acc:7172]
80	101406	CDK1 H. sapiens	CDC2, CDC28A, DKFZp686L2022, MGC111195, P34CDC2	cyclin-dependent kinase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:1722]
81	126309	NLGN3 H. sapiens	ASPGX1, AUTSX1, HNL3, KIAA1480	neuroligin 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:14289]
82	101236	TNFRSF10B H. sapiens	CD262, DR5, KILLER, KILLER/DR5, TRAIL-R2, TRAILR2, TRICK2, TRICK2A, TRICK2B, TRICKB, ZTNFR9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b [Source:HGNC Symbol;Acc:11905]
83	103845	CCL19 H. sapiens	CKb11, ELC, exodus-3, MGC34433, MIP-3b, MIP3B, SCYA19	chemokine (C-C motif) ligand 19 [Source:HGNC Symbol;Acc:10617]
84	114202	IL7R H. sapiens	CD127, CDW127, IL-7R-alpha, IL7RA, ILRA	interleukin 7 receptor [Source:HGNC Symbol;Acc:6024]
85	103136	IL8 H. sapiens	3-10C, AMCF-I, b-ENAP, CXCL8, GCP-1, GCP1, IL-8, K60, LECT, LUCT, LYNAP, MDNCF,	interleukin 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:6025]

Anhang

			MONAP, NAF, NAP-1, NAP1, SCYB8, TSG-1	
86	138591	PARVB H. sapiens	CGI-56	parvin, beta [Source:HGNC Symbol;Acc:14653]
87	140778	FGF23 H. sapiens	ADHR, HPDR2, HYPF, PHPTC	fibroblast growth factor 23 [Source:HGNC Symbol;Acc:3680]
88	104727	TGFBR2 H. sapiens	AAT3, FAA3, LDS1B, LDS2B, MFS2, RIIC, TAAD2, TGFbeta-RII, TGFR-2	transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa) [Source:HGNC Symbol;Acc:11773]
89	127494	ITGA9 H. sapiens	ALPHA-RLC, ITGA4L, RLC	integrin, alpha 9 [Source:HGNC Symbol;Acc:6145]
90	103818	MMP12 H. sapiens	HME, MGC138506, MME	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase) [Source:HGNC Symbol;Acc:7158]
91	139822	NRG1 H. sapiens	ARIA, GGF, GGF2, HGL, HRG, HRG1, HRGA, MST131, NDF, SMDF	neuregulin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:7997]
92	104599	ENG H. sapiens	CD105, END, FLJ41744, HHT1, ORW, ORW1	endoglin [Source:HGNC Symbol;Acc:3349]
93	101439	CDKN2B H. sapiens	CDK4I, INK4B, MTS2, P15, p15INK4b, TP15	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4) [Source:HGNC Symbol;Acc:1788]
94	112380	NOTCH3 H. sapiens	CADASIL, CASIL	notch 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:7883]
95	109262	MMP25 H. sapiens	MMP-25, MMP20, MMP20A, MMPL1, MT-MMP 6, MT-MMP6, MT6-MMP, MT6MMP, MTMMP6	matrix metalloproteinase 25 [Source:HGNC Symbol;Acc:14246]
96	101416	CDK2 H. sapiens	p33(CDK2)	cyclin-dependent kinase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:1771]
97	101376	CCNB2 H. sapiens	HsT17299	cyclin B2 [Source:HGNC Symbol;Acc:1580]
98	103019	CCR2 H. sapiens	CC-CKR-2, CCR2A, CCR2B, CD192, CKR2, CKR2A, CKR2B, CMKBR2, FLJ78302, MCP-1-R, MGC103828, MGC111760, MGC168006	chemokine (C-C motif) receptor 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:1603]
99	110753	CCL20 H. sapiens	CKb4, exodus-1, LARC, MIP-3a, MIP3A, SCYA20, ST38	chemokine (C-C motif) ligand 20 [Source:HGNC Symbol;Acc:10619]
100	103952	IL10RA H. sapiens	CDW210A, HIL-10R, IL-10R1, IL10R	interleukin 10 receptor, alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:5964]
101	137153	IL10 H. sapiens	CSIF, IL-10, IL10A, MGC126450, MGC126451, TGIF	interleukin 10 [Source:HGNC Symbol;Acc:5962]
102	116543	PARVG H. sapiens		parvin, gamma [Source:HGNC Symbol;Acc:14654]
103	100692	NTF3 H. sapiens	HDNF, MGC129711, NGF-2, NGF2, NT3	neurotrophin 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:8023]
104	116516	TLN1 H. sapiens	ILWEQ, KIAA1027, TLN	talin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:11845]
105	127809	ITGA10 H. sapiens	PRO827	integrin, alpha 10 [Source:HGNC Symbol;Acc:6135]
106	140652	MMP13 H. sapiens	CLG3, MANDP1	matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) [Source:HGNC Symbol;Acc:7159]
107	138553	DLGAP1 H. sapiens	DAP-1, DAP-1-ALPHA, DAP-1-BETA, GKAP, hGKAP, MGC88156, SAPAP1	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:2905]

108	101788	ABCG2 H. sapiens	ABC15, ABCP, BCRP, BCRP1, BMDP, CD338, CDw338, EST157481, MGC102821, MRX, MXR, MXR1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:74]
109	137382	PTN H. sapiens	HARP, HBGF8, HBNF, NEGF1	pleiotrophin [Source:HGNC Symbol;Acc:9630]
110	138422	EFNA3 H. sapiens	EFL2, Ehk1-L, EPLG3, LERK3	ephrin-A3, ephrin-A3 [Source:HGNC Symbol;Acc:3223]
111	109490	ADAM8 H. sapiens	CD156, MGC134985, MS2	ADAM metallopeptidase domain 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:215]
112	101418	CDK4 H. sapiens	CMM3, MGC14458, PSK-J3	cyclin-dependent kinase 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:1773]
113	101512	MKI67 H. sapiens	KIA	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 [Source:HGNC Symbol;Acc:7107]
114	104065	CCR2 H. sapiens	CC-CKR-2, CCR2A, CCR2B, CD192, CKR2, CKR2A, CKR2B, CMKBR2, FLJ78302, MCP-1-R, MGC103828, MGC111760, MGC168006	chemokine (C-C motif) receptor 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:1603]
115	110668	CCL21 H. sapiens	6CKine, CKb9, ECL, exodus-2, MGC34555, SCYA21, SLC, TCA4	chemokine (C-C motif) ligand 21 [Source:HGNC Symbol;Acc:10620]
116	103569	IL10RB H. sapiens	CDW210B, CRF2-4, CRFB4, D21S58, D21S66, IL-10R2	interleukin 10 receptor, beta
117	112242	IL12A H. sapiens	CLMF, IL-12A, NFSK, NKSF1, p35	interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35) [Source:HGNC Symbol;Acc:5969]
118	111326	PGF H. sapiens	D12S1900, PGFL, PLGF, PIGF-2, SHGC-10760	placental growth factor [Source:HGNC Symbol;Acc:8893]
119	105654	ERBB2 H. sapiens	CD340, HER-2, HER-2/neu, HER2, MLN 19, NEU, NGL, TKR1	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian) [Source:HGNC Symbol;Acc:3430]
120	130026	TLN2 H. sapiens	DKFZp451B1011, DKFZp686I0976, DKFZp686K0979, ILWEQ, KIAA0320	talin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:15447]
121	140155	ITGA11 H. sapiens	HsT18964	integrin, alpha 11 [Source:HGNC Symbol;Acc:6136]
122	109081	MMP14 H. sapiens	MMP-X1, MT1-MMP, MTMMP1	matrix metallopeptidase 14 (membrane-inserted) [Source:HGNC Symbol;Acc:7160]
123	100568	LGALS1 H. sapiens	DKFZp686E23103, GAL1, GBP	lectin, galactoside-binding, soluble, 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:6561]
124	104380	FZD9 H. sapiens	CD349, FZD3	frizzled homolog 9 (Drosophila) [Source:HGNC Symbol;Acc:4047]
125	101501	MCM3 H. sapiens	HCC5, MGC1157, P1-MCM3, P1.h, RLFb	minichromosome maintenance complex component 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:6945]
126	137312	EFNB2 H. sapiens	EPLG5, Htk-L, HTKL, LERK5, MGC126226, MGC126227, MGC126228	ephrin-B2 [Source:HGNC Symbol;Acc:3227]
127	103838	ADAM9 H. sapiens	CORD9, KIAA0021, MCMP, MDC9, Mltng	ADAM metallopeptidase domain 9 [Source:HGNC Symbol;Acc:216]
128	101427	CDK6 H. sapiens	MGC59692, PLSTIRE	cyclin-dependent kinase 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:1777]

129	141172	IER3 H. sapiens	DIF-2, IEX-1, IEX-1L, PRG1	Radiation-inducible immediate-early gene IEX-1 (Immediate early protein GLY96)(Immediate early response 3 protein)(PACAP-responsive gene 1 protein)(Protein PRG1)(Differentiation-dependent gene 2 protein)(Protein DIF-2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P46695]
130	111241	CCR3 H. sapiens	CC-CKR-3, CD193, CKR3, CMKBR3, MGC102841	chemokine (C-C motif) receptor 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:1604]
131	102713	CCL22 H. sapiens	A-152E5, ABCD-1, DC/B-CK, MDC, MGC34554, SCYA22, STCP-1	chemokine (C-C motif) ligand 22 [Source:HGNC Symbol;Acc:10621]
132	105951	CSF1R H. sapiens	C-FMS, CD115, CSFR, FIM2, FMS	colony stimulating factor 1 receptor [Source:HGNC Symbol;Acc:2433]
133	112368	IL13 H. sapiens	ALRH, BHR1, IL-13, MGC116786, MGC116788, MGC116789, P600	interleukin 13 [Source:HGNC Symbol;Acc:5973]
134	118616	GMFB H. sapiens	GMF	glia maturation factor, beta [Source:HGNC Symbol;Acc:4373]
135	105673	FLT1 H. sapiens	FLT, VEGFR1	fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor) [Source:HGNC Symbol;Acc:3763]
136	115773	FERMT1 H. sapiens	C20orf42, DTGCU2, FLJ20116, FLJ23423, KIND1, UNC112A, URP1	fermitin family member 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:15889]
137	127153	ITGAE H. sapiens	CD103, HUMINAE, MGC141996	integrin, alpha E (antigen CD103, human mucosal lymphocyte antigen 1; alpha polypeptide) [Source:HGNC Symbol;Acc:6147]
138	108327	MMP15 H. sapiens	MT2-MMP, MTMMP2, SMCP-2	matrix metalloproteinase 15 (membrane-inserted) [Source:HGNC Symbol;Acc:7161]
139	103804	IDO1 H. sapiens	IDO, INDO	indoleamine 2,3-dioxygenase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:6059]
140	108274	FAP H. sapiens	DKFZp686G13158, DPPIV, FAPA	fibroblast activation protein, alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:3590]
141	137724	NMB H. sapiens	MGC17211, MGC2277, MGC3936	neuromedin B [Source:HGNC Symbol;Acc:7842]
142	105893	EPHB2 H. sapiens	CAPB, DRT, EK5, EPHT3, ERK, Hek5, MGC87492, PCBC, Tyro5	EPH receptor B2 [Source:HGNC Symbol;Acc:3393]
143	108628	ADAM10 H. sapiens	AD10, CD156c, HsT18717, kuz, MADM	ADAM metalloproteinase domain 10 [Source:HGNC Symbol;Acc:188]
144	101373	CCNB1 H. sapiens	CCNB	cyclin B1 [Source:HGNC Symbol;Acc:1579]
145	110619	TERT H. sapiens	EST2, hEST2, TCS1, TP2, TRT	telomerase reverse transcriptase [Source:HGNC Symbol;Acc:11730]
146	104068	CCR4 H. sapiens	CC-CKR-4, CD194, ChemR13, CKR4, CMKBR4, k5-5, MGC88293	chemokine (C-C motif) receptor 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:1605]
147	105522	CXCL1 H. sapiens	FSP, GRO1, GROa, MGSA, MGSA-a, NAP-3, SCYB1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha) [Source:HGNC Symbol;Acc:4602]
148	111882	IFNGR1 H. sapiens	CD119, FLJ45734, IFNGR	interferon gamma receptor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:5439]
149	112398	KITLG H. sapiens	DKFZp686F2250, FPH2, Kitl, KL-1, MGF, SCF, SF, SHEP7	KIT ligand [Source:HGNC Symbol;Acc:6343]
150	100445	GDNF H. sapiens	ATF1, ATF2, HFB1-GDNF	glial cell derived neurotrophic factor [Source:HGNC Symbol;Acc:4232]
151	105649	KDR H. sapiens	CD309, FLK1, VEGFR, VEGFR2	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase) [Source:HGNC Symbol;Acc:6307]
152	103255	PLEKHC1 H.	DKFZp686G11125,	fermitin family member 2 [Source:HGNC

Anhang

		sapiens	FERMT2, FLJ34213, FLJ44462, KIND2, mig-2, MIG2, UNC112, UNC112B	Symbol;Acc:15767]
153	113362	ITGAL H. sapiens	CD11A, LFA-1, LFA1A	integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide) [Source:HGNC Symbol;Acc:6148]
154	108882	MMP16 H. sapiens	C8orf57, DKFZp761D112, MMP-X2, MT-MMP2, MT-MMP3, MT3-MMP	matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted) [Source:HGNC Symbol;Acc:7162]
155	117914	BST2 H. sapiens	CD317, tetherin	bone marrow stromal cell antigen 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:1119]
156	113344	TNC H. sapiens	150-225, GMEM, GP, HXB, JI, MGC167029, TN, TN-C	tenascin C [Source:HGNC Symbol;Acc:5318]
157	109653	PAMR1 H. sapiens	DKFZP586H2123, RAMP	peptidase domain containing associated with muscle regeneration 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:24554]
158	138424	MIF H. sapiens	GIF, GLIF, MMIF	macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)
159	140145	ADAM12 H. sapiens	MCMP, MCMPMltna, MLTN, MLTNA	ADAM metalloproteinase domain 12 [Source:HGNC Symbol;Acc:190]
160	115063	LIG4 H. sapiens		ligase IV, DNA, ATP-dependent [Source:HGNC Symbol;Acc:6601]
161	100977	MYC H. sapiens	bHLHe39, c-Myc, MRTL	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) [Source:HGNC Symbol;Acc:7553]
162	104069	CCR5 H. sapiens	CC-CKR-5, CCCKR5, CD195, CKR-5, CKR5, CMKBR5, FLJ78003, IDDM22	chemokine (C-C motif) receptor 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:1606]
163	137825	CXCL1 H. sapiens	FSP, GRO1, GROa, MGSA, MGSA-a, NAP-3, SCYB1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha) [Source:HGNC Symbol;Acc:4602]
164	114055	IFNGR2 H. sapiens	AF-1, IFGR2, IFNGT1	interferon gamma receptor 2 (interferon gamma transducer 1) [Source:HGNC Symbol;Acc:5440]
165	113007	LIF H. sapiens	CDF, DIA, HILDA	leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor) [Source:HGNC Symbol;Acc:6596]
166	113440	NGF H. sapiens	Beta-NGF, HSAN5, MGC161426, MGC161428, NGFB	nerve growth factor (beta polypeptide) [Source:HGNC Symbol;Acc:7808]
167	105674	KIT H. sapiens	C-Kit, CD117, PBT, SCFR	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog [Source:HGNC Symbol;Acc:6342]
168	103286	VCAM1 H. sapiens	CD106, DKFZp779G2333, INCAM-100, MGC99561	vascular cell adhesion molecule 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:12663]
169	140359	ITGAM H. sapiens	CD11B, CR3A, MAC-1, MAC1A, MGC117044, MO1A, SLEB6	integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit) [Source:HGNC Symbol;Acc:6149]
170	109447	MMP17 H. sapiens	MT4-MMP	matrix metalloproteinase 17 (membrane-inserted) [Source:HGNC Symbol;Acc:7163]
171	126215	CD58 H. sapiens	FLJ23181, FLJ43722, LFA-3, LFA3	CD58 molecule [Source:HGNC Symbol;Acc:1688]
172	104030	CD274 H. sapiens	B7-H, B7H1, MGC142294, MGC142296, PD-L1, PDCD1L1, PDCD1LG1, PDL1	CD274 molecule [Source:HGNC Symbol;Acc:17635]
173	102909	CDKN1A H. sapiens	CAP20, CDKN1, CIP1, MDA-6, P21, p21CIP1,	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) [Source:HGNC Symbol;Acc:1784]

Anhang

			p21Cip1/Waf1, SDI1, WAF1	
174	111000	TLR1 H. sapiens	CD281, DKFZp54710610, DKFZp56410682, KIAA0012, MGC104956, MGC126311, MGC126312, rsc786, TIL, TIL. LPRS5	toll-like receptor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:11847]
175	136024	ADAM17 H. sapiens	ADAM18, CD156B, cSVP, MGC71942, TACE	ADAM metallopeptidase domain 17 [Source:HGNC Symbol;Acc:195]
176	100844	CCND1 H. sapiens	BCL1, D11S287E, PRAD1, U21B31	cyclin D1 [Source:HGNC Symbol;Acc:1582]
177	110892	HRAS H. sapiens	C-BAS/HAS, C-H-RAS, C-HA-RAS1, CTLO, H-RASIDX, HAMSIV, HRAS1, K-RAS, N-RAS, RASH1	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog [Source:HGNC Symbol;Acc:5173]
178	111317	CCR7 H. sapiens	BLR2, CD197, CDw197, CMKBR7, EB11	chemokine (C-C motif) receptor 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:1608]
179	103070	CXCL2 H. sapiens	CINC-2a, GRO2, GROb, MGSA-b, MIP-2a, MIP2, MIP2A, SCYB2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:4603]
180	102682	TNFRSF1B H. sapiens	CD120b, p75, p75TNFR, TBPII, TNF-R-II, TNF-R75, TNFBR, TNFR1B, TNFR2, TNFR80	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B [Source:HGNC Symbol;Acc:11917]
181	100861	COL1A1 H. sapiens	OI4	collagen, type I, alpha 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:2197]
182	100113	BDNF H. sapiens	MGC34632	brain-derived neurotrophic factor [Source:HGNC Symbol;Acc:1033]
183	105613	PDGFRA H. sapiens	CD140a, MGC74795, PDGFR2, RHEPDGFRA	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide [Source:HGNC Symbol;Acc:8803]
184	100945	ICAM1 H. sapiens	BB2, CD54, P3.58	intercellular adhesion molecule 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:5344]
185	110698	ITGAV H. sapiens	CD51, DKFZp686A08142, MSK8, VNRA	integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51) [Source:HGNC Symbol;Acc:6150]
186	112320	ALDH1A1 H. sapiens	ALDC, ALDH-E1, ALDH1, ALDH11, MGC2318, PUMB1, RALDH1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1 [Source:HGNC Symbol;Acc:402]
187	113197	BDKRB2 H. sapiens	B2R, BK-2, BK2, BKR2, BRB2, DKFZp686O088	bradykinin receptor B2 [Source:HGNC Symbol;Acc:1030]
188	117537	PDCD1LG2 H. sapiens	B7DC, bA574F11, Btdc, CD273, MGC142238, MGC142240, PD-L2, PDCD1L2, PDL2	programmed cell death 1 ligand 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:18731]
189	101180	STAT1 H. sapiens	DKFZp686B04100, ISGF-3, STAT91	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa [Source:HGNC Symbol;Acc:11362]
190	101225	TLR2 H. sapiens	CD282, TIL4	toll-like receptor 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:11848]
191	109730	ADAM19 H. sapiens	MADDAM, MLTNB	ADAM metallopeptidase domain 19 [Source:HGNC Symbol;Acc:197]
192	112143	CDH6 H. sapiens	KCAD	cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney) [Source:HGNC Symbol;Acc:1765]
193	110975	KRAS H. sapiens	C-K-RAS, K-RAS2A, K-RAS2B, K-RAS4A, K-	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog [Source:HGNC Symbol;Acc:6407]

			RAS4B, KI-RAS, KRAS1, KRAS2, NS, NS3, RASK2	
194	110870	CXCR1 H. sapiens	C-C, C-C-CKR-1, CD128, CD181, CDw128a, CKR-1, CMKAR1, IL8R1, IL8RA, IL8RBA	chemokine (C-X-C motif) receptor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:6026]
195	103888	CXCL3 H. sapiens	CINC-2b, GRO3, GROg, MIP-2b, MIP2B, SCYB3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:4604]
196	102679	TNFRSF1A H. sapiens	CD120a, PPF, MGC19588, p55, p55-R, p60, TBP1, TNF-R, TNF-R-I, TNF-R55, TNFAR, TNFR1, TNFR55, TNFR60	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A [Source:HGNC Symbol;Acc:11916]
197	103048	COL1A2 H. sapiens	OI4	collagen, type I, alpha 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:2198]
198	113809	TNFAIP6 H. sapiens	TSG-6, TSG6	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:11898]
199	105627	PDGFRB H. sapiens	CD140b, JTK12, PDGFR, PDGFR1	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide [Source:HGNC Symbol;Acc:8804]
200	126792	ICAM2 H. sapiens	CD102	intercellular adhesion molecule 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:5345]
201	113049	ITGA2B H. sapiens	CD41, CD41B, GP2B, GPIIb, GTA, HPA3	integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41) [Source:HGNC Symbol;Acc:6138]
202	103847	TIMP1 H. sapiens	CLGI, EPA, EPO, FLJ90373, HCI, TIMP	TIMP metalloproteinase inhibitor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:11820]
203	111910	CD55 H. sapiens	CR, CROM, DAF, TC	CD55 molecule, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group) [Source:HGNC Symbol;Acc:2665]
204	113302	F3 H. sapiens	CD142, FLJ17960, TF, TFA	coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor) [Source:HGNC Symbol;Acc:3541]
205	104675	RHOA H. sapiens	ARH12, ARHA, Rho12, RHOH12	ras homolog gene family, member A [Source:HGNC Symbol;Acc:667]
206	111008	TLR3 H. sapiens	CD283	toll-like receptor 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:11849]
207	109117	ADAM22 H. sapiens	MDC2, MGC149832	ADAM metalloproteinase domain 22 [Source:HGNC Symbol;Acc:201]
208	112995	SNAI1 H. sapiens	dJ710H13, SLUGH2, SNA, SNAH	snail homolog 1 (Drosophila) [Source:HGNC Symbol;Acc:11128]
209	101277	TP53 H. sapiens	FLJ92943, LFS1, p53, TRP53	tumor protein p53 [Source:HGNC Symbol;Acc:11998]
210	110641	CXCR2 H. sapiens	CD182, CDw128b, CMKAR2, IL8R2, IL8RA, IL8RB	chemokine (C-X-C motif) receptor 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:6027]
211	110613	CXCL5 H. sapiens	ENA-78, SCYB5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:10642]
212	110625	ANGPT1 H. sapiens	AGP1, AGPT, Ang1, KIAA0003	angiopoietin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:484]
213	137855	PECAM1 H. sapiens	CD31, FLJ34100, FLJ58394, PECAM-1	platelet/endothelial cell adhesion molecule
214	110191	WISP1 H. sapiens	CCN4, WISP1c, WISP1i, WISP1tc	WNT1 inducible signaling pathway protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:12769]
215	105972	FGFR1 H. sapiens	BFGFR, CD331, CEK, FGFBR, FLG, FLJ99988, FLT2, H2, H3, H4, H5, HBGFR, KAL2, N-SAM, OGD	fibroblast growth factor receptor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:3688]
216	110652	ITGB1 H. sapiens	CD29, FNBR, GPIIA, MDF2, MSK12, VLA-	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12) [Source:HGNC Symbol;Acc:6153]

Anhang

			BETA, VLAB	
217	116588	ITGAX H. sapiens	CD11C, SLEB6	integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit) [Source:HGNC Symbol;Acc:6152]
218	110664	TIMP2 H. sapiens	CSC-21K	TIMP metalloproteinase inhibitor 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:11821]
219	110060	DDR1 H. sapiens	CAK, CD167, DDR, EDDR1, HGK2, MCK10, NEP, NTRK4, PTK3, PTK3A, RTK6, TRKE	Epithelial discoidin domain-containing receptor 1 Precursor (Epithelial discoidin domain receptor 1)(EC 2.7.10.1)(Tyrosine kinase DDR)(Discoidin receptor tyrosine kinase)(Tyrosine-protein kinase CAK)(Cell adhesion kinase)(TRK E)(Protein-tyrosine kin /.../)(Protein-tyrosine kinase RTK-6)(HGK2)(CD167 antigen-like family member A)(Mammary car
220	108903	ACE H. sapiens	ACE1, CD143, DCP, DCP1, MGC26566, MVCD3	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:2707]
221	100597	MAPK1 H. sapiens	ERK, ERK2, ERT1, MAPK2, p38, p40, p41, p41mapk, P42MAPK, PRKM1, PRKM2	mitogen-activated protein kinase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:6871]
222	135752	TLR4 H. sapiens	ARMD10, CD284, hToll, TOLL	toll-like receptor 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:11850]
223	115054	AOC3 H. sapiens	HPAO, SSAO, VAP-1, VAP1	amine oxidase, copper containing 3 (vascular adhesion protein 1) [Source:HGNC Symbol;Acc:550]
224	120754	COL5A2 H. sapiens	MGC105115	collagen, type V, alpha 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:2210]
225	101538	RB1 H. sapiens	OSRC, p105-Rb, pp110, pRb, RB	retinoblastoma 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:9884]
226	113470	CXCR3 H. sapiens	CD182, CD183, CKR-L2, CMKAR3, GPR9, IP10-R, Mig-R, MigR	chemokine (C-X-C motif) receptor 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:4540]
227	104231	CXCL9 H. sapiens	CMK, crg-10, Humig, MIG, SCYB9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9 [Source:HGNC Symbol;Acc:7098]
228	140975	ANGPT1 H. sapiens	AGP1, AGPT, Ang1, KIAA0003	angiopoietin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:484]
229	116429	MYH11 H. sapiens	AAT4, DKFZp686D10126, DKFZp686D19237, FAA4, FLJ35232, MGC126726, MGC32963, SMHC, SMMHC	myosin, heavy chain 11, smooth muscle [Source:HGNC Symbol;Acc:7569]
230	100872	CTGF H. sapiens	CCN2, HCS24, IGFBP8, MGC102839, NOV2	connective tissue growth factor [Source:HGNC Symbol;Acc:2500]
231	105812	FGFR2 H. sapiens	BEK, BFR-1, CD332, CEK3, CFD1, ECT1, FLJ98662, JWS, K-SAM, KGFR, TK14, TK25	fibroblast growth factor receptor 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:3689]
232	103578	ITGB2 H. sapiens	CD18, LAD, LCAMB, LFA-1, MAC-1, MF17, MFI7	integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit) [Source:HGNC Symbol;Acc:6155]
233	114523	AC107016.2 H. sapiens	CYK18, K18, KRT18	Keratin, type I cytoskeletal 18 (Cytokeratin-18)(CK-18)(Keratin-18)(K18)(Cell proliferation-inducing gene 46 protein) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P05783]
234	101221	TIMP3 H. sapiens	HSMRK222, K222, K222TA2, SFD	TIMP metalloproteinase inhibitor 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:11822]
235	106545	DDR1 H. sapiens	CAK, CD167, EDDR1, NEP, NTRK4, PTK3A, RTK6	Epithelial discoidin domain-containing receptor 1 Precursor (Epithelial discoidin domain receptor 1)(EC 2.7.10.1)(Tyrosine kinase DDR)(Discoidin receptor tyrosine kinase)(Tyrosine-protein kinase

Anhang

				CAK)(Cell adhesion kinase)(TRK E)(Protein-tyrosine kin /.../)(Protein-tyrosine kinase RTK-6)(HGK2)(CD167 antigen-like family member A)(Mammary car
236	117143	ALCAM H. sapiens	CD166, FLJ38514, MEMD, MGC71733	activated leukocyte cell adhesion molecule [Source:HGNC Symbol;Acc:400]
237	119183	HDGF H. sapiens	DKFZp686J1764, FLJ96580, HMG1L2	hepatoma-derived growth factor [Source:HGNC Symbol;Acc:4856]
238	103674	TLR5 H. sapiens	FLJ10052, MGC126430, MGC126431, SLEB1, TIL3	toll-like receptor 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:11851]
239	138030	TAPBP H. sapiens	TAPA	tapasin isoform 1 precursor [Source:RefSeq peptide;Acc:NP_003181]
240	101384	CCND2 H. sapiens	KIAK0002, MGC102758	cyclin D2 [Source:HGNC Symbol;Acc:1583]
241	101596	RB1 H. sapiens	OSRC, p105-Rb, pp110, pRb, RB	retinoblastoma 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:9884]
242	110817	CXCR4 H. sapiens	CD184, D2S201E, FB22, fusin, HM89, HSY3RR, LAP3, LCR1, LESTR, NPY3R, NPYR, NPYRL, NPYY3R, WHIM	chemokine (C-X-C motif) receptor 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:2561]
243	103807	CXCL10 H. sapiens	C7, crg-2, gIP-10, IFI10, INP10, IP-10, mob-1, SCYB10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10 [Source:HGNC Symbol;Acc:10637]
244	104558	BMP2 H. sapiens	BMP2A	bone morphogenetic protein 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:1069]
245	138054	COL2A1 H. sapiens	ANFH, AOM, COL11A3, MGC131516, SEDC	collagen, type II, alpha 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:2200]
246	110648	PDGFA H. sapiens	PDGF-A, PDGF1	platelet-derived growth factor alpha polypeptide [Source:HGNC Symbol;Acc:8799]
247	105621	FGFR3 H. sapiens	ACH, CD333, CEK2, HSFGR3EX, JTK4	fibroblast growth factor receptor 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:3690]
248	110631	ITGB3 H. sapiens	CD61, GP3A, GPIIIa	integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61) [Source:HGNC Symbol;Acc:6156]
249	103587	KRT7 H. sapiens	CK7, K2C7, K7, MGC129731, MGC3625, SCL	keratin 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:6445]
250	112044	TIMP4 H. sapiens		TIMP metalloproteinase inhibitor 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:11823]
251	110125	DDR1 H. sapiens	CAK, CD167, EDDR1, NEP, NTRK4, PTK3A, RTK6	Epithelial discoidin domain-containing receptor 1 Precursor (Epithelial discoidin domain receptor 1)(EC 2.7.10.1)(Tyrosine kinase DDR)(Discoidin receptor tyrosine kinase)(Tyrosine-protein kinase CAK)(Cell adhesion kinase)(TRK E)(Protein-tyrosine kin /.../)(Protein-tyrosine kinase RTK-6)(HGK2)(CD167 antigen-like family member A)(Mammary car
252	103448	ALPL H. sapiens	AP-TNAP, APTNAP, FLJ40094, FLJ93059, HOPS, MGC161443, MGC167935, TNAP, TNSALP	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney [Source:HGNC Symbol;Acc:438]
253	140662	LY6E H. sapiens	RIG-E, RIGE, SCA-2, SCA2, TSA-1	lymphocyte antigen 6 complex, locus E [Source:HGNC Symbol;Acc:6727]
254	111018	TLR6 H. sapiens	CD286	toll-like receptor 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:16711]
255	125013	SNX6 H. sapiens	MGC3157, MSTP010, TFAF2	sorting nexin 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:14970]
256	125175	ACTA2 H. sapiens	AAT6, ACTSA	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta [Source:HGNC Symbol;Acc:130]
257	100033	ANXA1 H. sapiens	ANX1, LPC1	annexin A1 [Source:HGNC Symbol;Acc:533]
258	113770	CXCR6 H. sapiens	BONZO, CD186, STRL33, TYMSTR	chemokine (C-X-C motif) receptor 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:16647]

Anhang

259	110800	CXCL11 H. sapiens	b-R1, H174, I-TAC, IP-9, IP9, MGC102770, SCYB11, SCYB9B	chemokine (C-X-C motif) ligand 11 [Source:HGNC Symbol;Acc:10638]
260	104574	BMP7 H. sapiens	OP-1	bone morphogenetic protein 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:1074]
261	100269	CEBPB H. sapiens	C/EBP-beta, CRP2, IL6DBP, LAP, MGC32080, NF-IL6, NFIL6, TCF5	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta [Source:HGNC Symbol;Acc:1834]
262	110713	PDGFB H. sapiens	c-sis, FLJ12858, PDGF2, SIS, SSV	platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog) [Source:HGNC Symbol;Acc:8800]
263	137059	FGFR4 H. sapiens	CD334, JTK2, MGC20292, TKF	fibroblast growth factor receptor 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:3691]
264	140120	ITGB4 H. sapiens	CD104	integrin, beta 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:6158]
265	140436	NES H. sapiens	FLJ21841	nestin [Source:HGNC Symbol;Acc:7756]
266	104880	PTPRC H. sapiens	B220, CD45, CD45R, GP180, LCA, LY5, T200	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C [Source:HGNC Symbol;Acc:9666]
267	110779	S100A4 H. sapiens	18A2, 42A, CAPL, FSP1, MTS1, P9KA, PEL98	S100 calcium binding protein A4 [Source:HGNC Symbol;Acc:10494]
268	100809	AGTR1 H. sapiens	AG2S, AGTR1A, AGTR1B, AT1, AT1B, AT1R, AT2R1, AT2R1A, AT2R1B, HAT1R	angiotensin II receptor, type 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:336]
269	108132	PPP2R5C H. sapiens	B56G, MGC23064, PR61G	protein phosphatase 2, regulatory subunit B', gamma [Source:HGNC Symbol;Acc:9311]
270	111012	TLR7 H. sapiens		toll-like receptor 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:15631]
271	138448	SNX2 H. sapiens	MGC5204, TRG-9	sorting nexin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:11173]
272	113656	SDC2 H. sapiens	fibroglycan, HSPG, HSPG1, SYND2	syndecan 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:10659]
273	107233	ANXA1 H. sapiens	ANX1, LPC1	annexin A1 [Source:HGNC Symbol;Acc:533]
274	135913	CXCR7 H. sapiens	CMKOR1, GPR159, RDC1	chemokine (C-X-C motif) receptor 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:23692]
275	110618	CXCL12 H. sapiens	IRH, PBSF, SCYB12, SDF-1a, SDF-1b, SDF1, SDF1A, SDF1B, TLSF, TLSF-a, TLSF-b, TPAR1	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 [Source:HGNC Symbol;Acc:10672]
276	110609	IFNG H. sapiens	IFG, IFI	interferon, gamma [Source:HGNC Symbol;Acc:5438]
277	103663	EPCAM H. sapiens	17-1A, 323/A3, CD326, CO-17A, DIAR5, EGP-2, EGP314, EGP34, EGP40, Ep-CAM, ESA, GA733-2, HEA125, HNPCC8, KS1/4, KSA, Ly74, M4S1, MH99, MIC18, MK-1, MOC31, TACST-1, TACSTD1, TROP1	epithelial cell adhesion molecule [Source:HGNC Symbol;Acc:11529]
278	113548	IGF2 H. sapiens	C11orf43, FLJ22066, FLJ44734, IGF-II, pp9974	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A), insulin-like growth factor 2 (somatomedin A) [Source:HGNC Symbol;Acc:5466]
279	103085	EGFR H. sapiens	ERBB, ERBB1, HER1, mENA, PIG61	epidermal growth factor receptor [Source:HGNC Symbol;Acc:3236]
280	110842	ITGB5 H. sapiens	FLJ26658	integrin, beta 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:6160]
281	101014	SERPINE1 H. sapiens	PAI, PAI-1, PAI1, PLANH1	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:8583]

Anhang

282	113025	SDC1 H. sapiens	CD138, SDC, SYND1, syndecan	syndecan 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:10658]
283	116867	STC1 H. sapiens	STC	stanniocalcin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:11373]
284	140936	EPOR H. sapiens	EPO-R, MGC138358	erythropoietin receptor [Source:HGNC Symbol;Acc:3416]
285	115267	YWHAQ H. sapiens	14-3-3, 1C5, HS1	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide [Source:HGNC Symbol;Acc:12854]
286	103816	TLR8 H. sapiens	CD288, MGC119599, MGC119600	toll-like receptor 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:15632]
287	138099	PTMA H. sapiens	hsa-mir-1244, hsa-mir-1244-2, hsa-mir-1244-3, MGC104802, MIR1244, MIR1244-2, MIR1244-3, MIRN1244, TMSA	microRNA 1244-3 [Source:HGNC Symbol;Acc:38390]
288	115300	ERCC4 H. sapiens	ERCC11, RAD1, XPF	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:3436]
289	102892	APAF1 H. sapiens	APAF-1, CED4, DKFZp781B1145	apoptotic peptidase activating factor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:576]
290	135912	CXCR7 H. sapiens	CMKOR1, GPR159, RDC1	chemokine (C-X-C motif) receptor 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:23692]
291	102721	CX3CL1 H. sapiens	ABCD-3, C3Xkine, CXC3, CXC3C, fractalkine, neurotactin, NTN, NTT, SCYD1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:10647]
292	103295	TNF H. sapiens	DIF, TNF-alpha, TNFA, TNFSF2	Tumor necrosis factor Precursor (TNF-alpha)(Tumor necrosis factor ligand superfamily member 2)(TNF-a)(Cachectin) [Contains Tumor necrosis factor, membrane form;Tumor necrosis factor, soluble form] [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P01375]
293	105683	MST1R H. sapiens	CD136, CDw136, PTK8, RON	macrophage stimulating 1 receptor (c-met-related tyrosine kinase) [Source:HGNC Symbol;Acc:7381]
294	103127	IGF1 H. sapiens	IGF-I, IGF1A, IGFI	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) [Source:HGNC Symbol;Acc:5464]
295	106100	ERBB3 H. sapiens	c-erbB-3, c-erbB3, ErbB-3, erbB3-S, HER3, LCCS2, MDA-BF-1, MGC88033, p180-ErbB3, p45-sErbB3, p85-sErbB3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian) [Source:HGNC Symbol;Acc:3431]
296	119126	ITGB6 H. sapiens		integrin, beta 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:6161]
297	110208	ALPP H. sapiens	ALP, FLJ61142, PALP, PLAP	alkaline phosphatase, placental [Source:HGNC Symbol;Acc:439]
298	130242	SEMA3C H. sapiens	SEMAE, SemE	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C [Source:HGNC Symbol;Acc:10725]
299	118034	STC2 H. sapiens	STC-2, STCRP	stanniocalcin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:11374]
300	137888	SELPLG H. sapiens	CD162, CLA, PSGL-1, PSGL1	selectin P ligand [Source:HGNC Symbol;Acc:10722]
301	110953	GRB2 H. sapiens	ASH, EGFRBP-GRB2, Grb3-3, MST084, MSTP084, NCKAP2	growth factor receptor-bound protein 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:4566]
302	136102	RP11-330H6.5 H. sapiens	CD289, RP11-330H6.5, TLR9	cDNA FLJ56277, highly similar to Toll-like receptor 9 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:B4E0A1], toll-like receptor 9
303	104631	ID1 H. sapiens	bHLHb24, dJ857M17.1, ID	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein [Source:HGNC Symbol;Acc:5360]
304	101125	ACTB H. sapiens	PS1TP5BP1	actin, beta [Source:HGNC Symbol;Acc:132]
305	104034	BAD H. sapiens	BBC2, BCL2L8	BCL2-associated agonist of cell death [Source:HGNC Symbol;Acc:936]

Anhang

306	112338	CX3CR1 H. sapiens	CCRL1, CMKBRL1, CMKDR1, GPR13, GPRV28, V28	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:2558]
307	110738	CXCL13 H. sapiens	ANGIE, ANGIE2, BCA-1, BCA1, BLC, BLR1L, SCYB13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13 [Source:HGNC Symbol;Acc:10639]
308	112032	CSF1 H. sapiens	M-CSF, MCSF, MGC31930	colony stimulating factor 1 (macrophage) [Source:HGNC Symbol;Acc:2432]
309	115237	FABP4 H. sapiens	A-FABP, aP2	fatty acid binding protein 4, adipocyte [Source:HGNC Symbol;Acc:3559]
310	136007	EGF H. sapiens	HOMG4, URG	epidermal growth factor [Source:HGNC Symbol;Acc:3229]
311	105757	ERBB4 H. sapiens	HER4, MGC138404, p180erbB4	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian) [Source:HGNC Symbol;Acc:3432]
312	111111	ITGB7 H. sapiens		integrin, beta 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:6162]
313	113034	POU5F1 H. sapiens	MGC22487, Oct-3, Oct-4, OCT3, Oct4, OTF-3, OTF3, OTF4	POU domain, class 5, transcription factor 1 (Octamer-binding transcription factor 3)(OTF-3)(Octamer-binding protein 3)(Oct-3)(Octamer-binding protein 4)(Oct-4) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q01860]
314	119222	SEMA3F H. sapiens	SEMA-IV, Sema4, SEMAK	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3F [Source:HGNC Symbol;Acc:10728]
315	137818	ADM H. sapiens	AM	adrenomedullin [Source:HGNC Symbol;Acc:259]
316	115669	GLG1 H. sapiens	CFR-1, DKFZp686L08213, ESL-1, FLJ23319, FLJ23967, FLJ32797, MG-160, MG160	golgi glycoprotein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:4316]
317	110943	SHC1 H. sapiens	FLJ26504, p66, SHC, SHCA	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:10840]
318	108970	ANPEP H. sapiens	APN, CD13, gp150, LAP1, p150, PEPN	alanyl (membrane) aminopeptidase [Source:HGNC Symbol;Acc:500]
319	111867	SOX2 H. sapiens	ANOP3, MCOPS3, MGC2413	SRY (sex determining region Y)-box 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:11195]
320	102119	RPL13A H. sapiens	RNU32, RNU33, RNU34, RPL13AP20, RPL13AP25, SNORD32A, SNORD33, SNORD34, TSTA1, U32, U32A, U33, U34	small nucleolar RNA, C/D box 32A [Source:HGNC Symbol;Acc:10159]
321	100083	BCL2 H. sapiens	Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:990]
322	137009	XCR1 H. sapiens	CCXCR1, GPR5	chemokine (C motif) receptor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:1625]
323	114685	CXCL16 H. sapiens	CXCLG16, SR-PSOX, SRPSOX	chemokine (C-X-C motif) ligand 16 [Source:HGNC Symbol;Acc:16642]
324	110860	CSF2 H. sapiens	GM-CSF, GMCSF, MGC131935, MGC138897	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage) [Source:HGNC Symbol;Acc:2434]
325	110607	PPARG H. sapiens	CIMT1, GLM1, NR1C3, PPARG1, PPARG2, PPARGgamma	peroxisome proliferator-activated receptor gamma [Source:HGNC Symbol;Acc:9236]
326	110787	TGFA H. sapiens	TFGA	transforming growth factor, alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:11765]
327	105981	MET H. sapiens	AUTS9, c-Met, HGFR, RCCP2	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor) [Source:HGNC Symbol;Acc:7029]
328	119759	ITGB8 H. sapiens		integrin, beta 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:6163]
329	138243	POU5F1P1 H. sapiens	OCT4-pg1, OTF3C, OTF3P1, POU5F1B, POU5F1P4, POU5FLC20,	POU class 5 homeobox 1B [Source:HGNC Symbol;Acc:9223]

Anhang

			POU5FLC8	
330	111705	NRP2 H. sapiens	MGC126574, NP2, NPN2, PRO2714, VEGF165R2	neuropilin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:8005]
331	137782	ADM2 H. sapiens	AM2, dJ579N16, FLJ21135	adrenomedullin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:28898]
332	118619	FUT4 H. sapiens	CD15, ELFT, FCT3A, FUC-TIV, FUTIV, LeX, SSEA-1	fucosyltransferase 4 (alpha (1,3) fucosyltransferase, myeloid-specific) [Source:HGNC Symbol;Acc:4015]
333	133970	SHC4 H. sapiens	MGC34023, RaLP, SHCD	SHC (Src homology 2 domain containing) family, member 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:16743]
334	109445	DPP4 H. sapiens	ADABP, ADCP2, CD26, DPPIV, TP103	dipeptidyl-peptidase 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:3009]
335	112829	GATA4 H. sapiens	MGC126629	GATA binding protein 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:4173]
336	102125	YWHAZ H. sapiens	14-3-3-zeta, KCIP-1, MGC111427, MGC126532, MGC138156, YWHAD	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide [Source:HGNC Symbol;Acc:12855]
337	100227	CASP8 H. sapiens	ALPS2B, CAP4, Casp-8, FLICE, FLJ17672, MACH, MCH5, MGC78473	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase [Source:HGNC Symbol;Acc:1509]
338	141156	CCL2 H. sapiens	GDCF-2, HC11, HSMCR30, MCAF, MCP-1, MCP1, MGC9434, SCYA2, SMC-CF	chemokine (C-C motif) ligand 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:10618]
339	100951	IL1R1 H. sapiens	CD121A, D2S1473, IL-1R-alpha, IL1R, IL1RA, P80	interleukin 1 receptor, type I [Source:HGNC Symbol;Acc:5993]
340	103133	IL1RN H. sapiens	DIRA, ICIL-1RA, IL-1ra, IL-1ra3, IL-1RN, IL1F3, IL1RA, IRAP, MGC10430, MVCD4	interleukin 1 receptor antagonist [Source:HGNC Symbol;Acc:6000]
341	138057	ACAN H. sapiens	AGC1, AGCAN, CSPG1, CSPGCP, MSK16, SEDK	aggrecan [Source:HGNC Symbol;Acc:319]
342	111432	AREG H. sapiens	AR, AREGB, CRDGF, MGC13647, SDGF	amphiregulin [Source:HGNC Symbol;Acc:651]
343	100652	NGFR H. sapiens	CD271, Gp80-LNGFR, p75(NTR), p75NTR, TNFRSF16	nerve growth factor receptor [Source:HGNC Symbol;Acc:7809]
344	110762	ITGA1 H. sapiens	CD49a, VLA1	integrin, alpha 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:6134]
345	114796	NANOG H. sapiens	FLJ12581, FLJ40451, NANOGP8	Nanog homeobox pseudogene 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:23106]
346	111930	NRP1 H. sapiens	BDCA4, CD304, DKFZp686A03134, DKFZp781F1414, NP1, NRP, VEGF165R	neuropilin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:8004]
347	113254	NOS1 H. sapiens	bNOS, IHPS1, N-NOS, NC-NOS, nNOS, NOS	nitric oxide synthase 1 (neuronal) [Source:HGNC Symbol;Acc:7872]
348	139818	CD24 H. sapiens	CD24A, FLJ22950, FLJ43543, MGC75043	CD24 molecule
349	139743	CHN1 H. sapiens	ARHGAP2, CHN, DURS2, n-chimerin, RhoGAP2	chimerin (chimaerin) 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:1943]
350	109278	CPM H. sapiens		carboxypeptidase M [Source:HGNC Symbol;Acc:2311]

351	101316	TSC22D3 H. sapiens	DIP, DKFZp313A1123, DSIPI, GILZ, hDIP, TSC-22R	TSC22 domain family, member 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:3051]
352	102136	SDHA H. sapiens	CMD1GG, FP, SDH1, SDH2, SDHF	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp) [Source:HGNC Symbol;Acc:10680]
353	100233	CASP9 H. sapiens	APAF-3, APAF3, CASPASE-9c, ICE-LAP6, MCH6	caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase [Source:HGNC Symbol;Acc:1511]
354	100240	CCL2 H. sapiens	GDCF-2, HC11, HSMCR30, MCAF, MCP-1, MCP1, MGC9434, SCYA2, SMC-CF	chemokine (C-C motif) ligand 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:10618]
355	102462	IL1R2 H. sapiens	CD121b, IL1RB, MGC47725	interleukin 1 receptor, type II [Source:HGNC Symbol;Acc:5994]
356	101210	TGFB1 H. sapiens	CED, DPD1, LAP, TGFB, TGFbeta	transforming growth factor, beta 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:11766]
357	114769	ATXN1 H. sapiens	ATX1, D6S504E, SCA1	ataxin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:10548]
358	108357	HGF H. sapiens	DFNB39, F-TCF, HGFB, HPTA, SF	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor) [Source:HGNC Symbol;Acc:4893]
359	136972	NTRK1 H. sapiens	DKFZp781I14186, MTC, p140-TrkA, TRK, Trk-A, TRK1, TRKA	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:8031]
360	111263	ITGA2 H. sapiens	BR, CD49B, GPIa, VLA-2, VLAA2	integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor) [Source:HGNC Symbol;Acc:6137]
361	116328	PODXL H. sapiens	Gp200, MGC138240, PC, PCLP, PCLP-1	podocalyxin-like [Source:HGNC Symbol;Acc:9171]
362	127380	ROBO4 H. sapiens	ECSM4, FLJ20798, MGC133352, MGC133353, MRB	roundabout homolog 4, magic roundabout (Drosophila) [Source:HGNC Symbol;Acc:17985]
363	102470	NOS2 H. sapiens	HEP-NOS, iNOS, NOS, NOS2A	nitric oxide synthase 2, inducible [Source:HGNC Symbol;Acc:7873]
364	113224	CD34 H. sapiens		CD34 molecule [Source:HGNC Symbol;Acc:1662]
365	125167	CHN2 H. sapiens	ARHGAP3, BCH, MGC138360, RhoGAP3	chimerin (chimaerin) 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:1944]
366	109438	MME H. sapiens	CALLA, CD10, DKFZp686O16152, MGC126681, MGC126707, NEP	membrane metallo-endopeptidase [Source:HGNC Symbol;Acc:7154]
367	110660	HIF1A H. sapiens	bHLHe78, HIF-1alpha, HIF1, HIF1-ALPHA, MOP1, PASD8	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor) [Source:HGNC Symbol;Acc:4910]
368	101128	GAPDH H. sapiens	G3PD, GAPD, MGC88685	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Source:HGNC Symbol;Acc:4141]
369	100417	FADD H. sapiens	GIG3, MGC8528, MORT1	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain [Source:HGNC Symbol;Acc:3573]
370	136214	CCL3 H. sapiens	G0S19-1, LD78ALPHA, MIP-1-alpha, MIP1A, SCYA3	chemokine (C-C motif) ligand 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:10627]
371	111304	IL2RA H. sapiens	CD25, IDDM10, IL2R, TCGFR	interleukin 2 receptor, alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:6008]
372	103779	INHBA H. sapiens	EDF, FRP	inhibin, beta A [Source:HGNC Symbol;Acc:6066]
373	113380	RUNX2 H. sapiens	AML3, CBFA1, CCD, CCD1, MGC120022, MGC120023, OSF-2, OSF2, PEA2aA, PEBP2A1, PEBP2A2, PEBP2aA, PEBP2aA1	runt-related transcription factor 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:10472]

Anhang

374	101034	VEGFA H. sapiens	MGC70609, MVCD1, VEGF, VEGF-A, VPF	vascular endothelial growth factor A [Source:HGNC Symbol;Acc:12680]
375	105907	NTRK2 H. sapiens	GP145-TrkB, TRKB	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:8032]
376	111330	ITGA3 H. sapiens	CD49c, FLJ34631, FLJ34704, GAP-B3, GAPB3, MSK18, VCA-2, VL3A, VLA3a	integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor) [Source:HGNC Symbol;Acc:6139]
377	102098	G6PD H. sapiens	G6PD1	glucose-6-phosphate dehydrogenase [Source:HGNC Symbol;Acc:4057]
378	102132	IPO8 H. sapiens	FLJ21954, FLJ26580, RANBP8	importin 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:9853]
379	101145	TBP H. sapiens	GTF2D, GTF2D1, HDL4, MGC117320, MGC126054, MGC126055, SCA17, TFIID	TATA box binding protein [Source:HGNC Symbol;Acc:11588]
380		Pos. control		
381		Pos. control		
382		Pos. control		
383		Neg. control		
384		Neg. control		

8.4 Expressionsprofilierung

Tabelle 24: Expressionsanalyse von Integrin-Untereinheiten, Chemokinrezeptoren und weiterer Adhäsionsfaktoren in MSCs mittels Durchflusszytometrie. Dazu wurden Zellen aus drei Geweben (BM, AM und UC), in drei verschiedenen Passagen und von je drei verschiedenen Spendern untersucht. Angegeben ist die Fluoreszenzintensität als relativer GeoMean im Verhältnis zur Isotypkontrolle: > 30 = + + +, 10-30 = + +, 2-10 = +, 1,5-2 = (+), < 1,5 = -. Die Integrin-Untereinheiten sind mit dem jeweiligen Namen des Gens abgekürzt.

BM-MSC

		Spender 1			Spender 2			Spender 3		
		P2	P4	P6	P2	P4	P6	P2	P4	P6
ITGA1	CD49a	+ 6,7	+ 3,5	++ 12,4	+ 9,7	+ 7,8	++ 15,0	+ 3,6	+ 6,4	+ 7,2
ITGA2	CD49b	+ 2,6	+ 8,8	+ 3,5	(+) 1,7	+ 2,1	+ 3,0	+ 2,2	(+) 1,9	+ 3,0
ITGA3	CD49c	+++ 43,5	+++ 62,7	+++ 122,8	+++ 46,1	+++ 55,3	+++ 125,0	+++ 63,5	+++ 74,3	+++ 36,9
ITGA4	CD49d	+ 3,3	+ 5,4	+ 6,7	(+) 1,8	+ 2,4	+ 7,3	(+) 1,6	+ 2,2	- 1,4
ITGA5	CD49e	+++ 69,5	+++ 101,3	+++ 134,2	+++ 92,6	+++ 89,3	+++ 157,5	+++ 91,0	+++ 105,6	+++ 83,8
ITGA6	CD49f	(+) 1,5	+ 2,1	+ 3,1	(+) 1,5	+ 2,1	+ 2,2	(+) 1,7	(+) 1,4	(+) 1,6
ITGAV	CD51	++ 12,9	++ 11,3	++ 24,1	++ 12,9	++ 14,3	++ 27,1	++ 12,9	++ 19,2	++ 19,2
ITGB1	CD29	+++ 113,9	+++ 144,5	+++ 306,3	+++ 184,5	+++ 202,2	+++ 336,4	+++ 153,0	+++ 166,7	+++ 131,2
ITGB2	CD18	(+) 1,6	- 1,4	- 1,1	(+) 1,5	+ 2,2	- 1,1	(+) 1,6	- 1,1	nd
ITGB3	CD61	++ 13,7	++ 10,2	+++ 30,4	++ 18,8	++ 14,2	++ 32,7	++ 26,3	++ 15,2	++ 18,2
ITGB4	CD104	- 1,0	- 1,0	- 1,0	- 1,0	(+) 1,5	- 1,0	- 1,0	- 1,0	- 1,0
ITGB5	---	+ 5,3	+ 5,2	+ 5,7	++ 12,6	+ 9,9	+ 7,4	nd	+ 4,9	nd
ITGB6	---	- 1,0	- 0,9	- 1,0	- 0,9	- 0,9	- 1,0	- 0,9	- 1,0	nd
ITGB7	---	- 1,1	- 1,1	- 1,0	- 1,0	- 1,2	- 1,0	- 1,0	- 1,0	nd
ITGB8	---	+ 2,1	(+) 1,6	+ 2,6	+ 2,2	(+) 1,7	+ 5,3	+ 2,3	+ 2,0	nd
CXCR4	CD184	- 1,2	- 1,1	- 1,0	- 1,0	- 1,0	- 1,1	- 1,0	- 1,0	- 1,0
CCR2	CD192	- 0,9	- 0,9	- 1,0	- 1,1	- 0,9	- 1,0	- 0,6	- 1,0	- 1,0
CCR7	CD197	(+) 1,9	(+) 1,6	- 1,3	+ 3,5	+ 2,3	- 1,3	- 1,3	- 1,2	- 1,1
VCAM	CD106	- 1,3	- 1,3	- 1,0	(+) 1,7	- 1,3	+ 2,0	- 1,1	(+) 1,5	(+) 1,8
PSGL-1	CD162	- 1,1	- 1,0	- 1,3	- 1,0	- 1,0	- 1,3	- 1,0	- 1,2	- 1,2
L-Sele	CD62L	- 1,0	- 0,9	- 1,2	+ 4,4	- 1,4	- 1,1	- 1,1	- 0,9	nd

AM-MSC

		Spender 1			Spender 2			Spender 3		
		P2	P4	P6	P2	P4	P6	P2	P4	P6
ITGA1	CD49a	++ 26,9	++ 13,9	+ 9,0	++ 13,0	++ 25,6	++ 20,8	++ 14,5	+++ 35,4	+++ 36,8
ITGA2	CD49b	++ 22,3	+ 6,3	+ 6,7	+ 4,5	+ 4,8	+ 5,7	++ 19,7	+ 9,4	++ 13,4
ITGA3	CD49c	+++ 134,2	+++ 149,6	+++ 143,9	+++ 70,7	+++ 200,4	+++ 190,1	+++ 61,9	+++ 53,8	+++ 152,5
ITGA4	CD49d	+++ 83,1	+ 9,5	++ 10,0	+ 5,3	+ 4,9	+ 4,8	++ 11,0	+ 6,0	++ 11,3
ITGA5	CD49e	+++ 178,0	+++ 110,0	+++ 114,0	+++ 62,4	+++ 65,6	+++ 73,9	+++ 71,9	+++ 83,3	+++ 111,0
ITGA6	CD49f	++ 15,4	(+) 1,8	+ 2,0	+ 2,2	+ 4,4	+ 7,5	+ 2,5	(+) 1,6	+ 2,5
ITGAV	CD51	++ 16,2	++ 15,9	++ 16,8	++ 11,7	++ 15,2	++ 15,8	++ 11,5	++ 10,4	+ 8,3
ITGB1	CD29	+++ 454,2	+++ 327,4	+++ 320,5	+++ 158,4	+++ 261,3	+++ 313,0	+++ 288,7	+++ 210,5	+++ 334,4
ITGB2	CD18	nd	- 1,1	- 1,1	- 1,1	- 1,4	- 1,2	- 0,9	- 1,1	- 1,0
ITGB3	CD61	+++ 42,1	++ 21,2	++ 15,5	nd	+++ 40,3	++ 21,7	nd	++ 25,6	++ 29,1
ITGB4	CD104	- 1,2	- 1,1	- 1,1	- 1,1	(+) 1,7	- 1,0	- 1,1	- 1,0	- 1,1
ITGB5	---	nd	+ 5,6	+ 7,2	+ 4,8	+ 5,6	+ 3,6	+ 2,8	+ 3,5	+ 3,9
ITGB6	---	nd	- 1,0	- 1,0	- 1,1	- 1,0	- 1,0	- 1,2	- 1,0	- 1,0
ITGB7	---	nd	- 0,8	- 1,0	nd	- 0,9	- 1,0	nd	- 1,2	- 1,0
ITGB8	---	nd	- 1,4	(+) 1,6	- 1,2	+ 2,0	- 1,2	- 0,9	+ 3,9	- 1,4
CXCR4	CD184	- 1,0	- 0,9	- 1,1	- 1,0	- 0,9	- 1,1	- 1,0	- 1,3	- 1,1
CCR2	CD192	- 0,9	- 1,0	- 1,0	- 1,0	- 1,0	- 1,0	- 1,2	- 1,0	- 1,0
CCR7	CD197	+ 2,5	+ 8,3	+ 4,2	+ 2,0	(+) 1,8	(+) 1,9	+ 2,2	+ 5,9	+ 2,5
VCAM	CD106	- 1,1	+ 3,5	+ 3,3	- 1,3	- 1,0	- 1,0	(+) 1,5	(+) 1,6	(+) 1,5
PSGL-1	CD162	+ 2,5	- 0,9	- 1,0	- 1,1	- 0,9	- 0,9	(+) 1,5	- 1,0	- 1,0
L-Sele	CD62L	- 1,1	- 1,3	- 1,2	nd	+ 3,5	- 1,0	nd	- 1,3	- 1,3

UC-MSC

		Spender 1			Spender 2			Spender 3		
		P2	P4	P6	P2	P4	P6	P2	P4	P6
ITGA1	CD49a	+ 3,0	+ 3,6	+ 5,4	++ 14,9	+ 8,8	++ 18,3	+++ 37,7	+ 5,4	++ 11,2
ITGA2	CD49b	+ 3,3	++ 27,9	++ 22,0	++ 10,3	++ 11,0	++ 11,3	+ 5,4	++ 20,0	++ 20,4
ITGA3	CD49c	(+) 1,5	+++ 104,9	+++ 166,6	+ 5,9	+++ 100,8	+++ 127,4	+ 4,3	+++ 66,2	+++ 134,5
ITGA4	CD49d	++ 23,0	++ 13,1	++ 15,5	+++ 36,9	++ 15,3	++ 24,2	+ 6,6	+ 6,1	++ 11,3
ITGA5	CD49e	+++ 148,2	+++ 92,9	+++ 104,0	+++ 164,4	+++ 80,7	+++ 94,2	+++ 163,1	+++ 137,2	+++ 129,7
ITGA6	CD49f	+ 4,0	+ 6,0	+ 6,5	+ 3,0	+ 3,2	+ 2,8	+ 2,0	+ 3,9	+ 4,0
ITGAV	CD51	++ 15,9	+ 8,0	++ 12,2	++ 14,8	+ 8,9	++ 11,0	++ 17,9	+ 5,4	++ 16,4
ITGB1	CD29	+++ 81,2	+++ 203,3	+++ 333,7	+++ 239,7	+++ 172,3	+++ 280,5	+++ 230,4	+++ 196,2	+++ 350,4
ITGB2	CD18	- 1,0	- 1,0	- 1,1	- 1,0	- 0,9	- 1,0	- 0,6	- 1,3	- 0,9
ITGB3	CD61	+++ 40,6	+++ 30,6	+++ 49,0	+++ 58,5	+++ 42,9	+++ 44,6	+++ 35,6	+++ 46,8	+++ 54,4
ITGB4	CD104	- 1,1	- 1,1	- 1,0	- 1,0	- 1,1	+ 2,3	- 0,9	- 1,1	- 1,1
ITGB5	---	++ 13,0	+ 4,5	+ 7,5	++ 11,5	+ 3,1	+ 6,1	+ 3,8	+ 9,2	+ 8,6
ITGB6	---	- 1,0	- 1,1	- 1,0	- 1,0	- 1,0	- 1,0	- 1,0	- 1,0	- 1,0
ITGB7	---	nd	- 1,2	- 0,9	nd	- 0,9	- 0,9	nd	- 1,0	- 0,9
ITGB8	---	- 0,9	- 1,4	- 1,3	- 1,0	- 1,1	- 1,4	- 1,0	+ 3,0	+ 9,9
CXCR4	CD184	- 1,1	- 1,2	- 1,1	- 1,1	- 1,0	- 1,0	- 0,9	- 1,1	- 1,0
CCR2	CD192	- 1,0	- 1,0	- 1,0	- 1,0	- 1,0	- 1,0	- 0,9	- 1,2	- 1,0
CCR7	CD197	+ 5,1	+ 6,8	+ 2,8	+ 3,1	+ 5,4	+ 3,9	(+) 1,8	(+) 1,7	+ 3,6
VCAM	CD106	- 0,4	- 1,3	- 1,2	- 1,2	- 1,1	- 1,2	- 1,0	- 1,0	(+) 1,5
PSGL-1	CD162	- 0,6	- 1,2	- 1,1	(+) 1,8	- 1,0	- 1,0	- 1,3	- 1,0	- 1,1
L-Sele	CD62L	nd	- 1,1	(+) 1,6	nd	- 1,2	- 1,3	nd	- 1,2	- 1,3

Tabelle 25: Expressionsanalyse von Integrin-Untereinheiten, Chemokinrezeptoren und weiterer Adhäsionsfaktoren in MSCs mittels Durchflusszytometrie von stimulierten im Vergleich mit unstimulierten Zellen. Dazu wurden pro Gewebetyp (BM, AM und UC) die Zellen eines Spenders analysiert. Angegeben ist die Fluoreszenzintensität als relativer GeoMean im Verhältnis zur Isotypkontrolle: > 30 = + + +, 10-30 = + +, 2-10 = +, 1,5-2 = (+), < 1,5 = -. Die Integrin-Untereinheiten sind mit dem jeweiligen Namen des Gens abgekürzt.

		BM-MSC Spender 1		AM-MSC Spender 1		UC-MSC Spender 1	
		unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert
ITGA1	CD49a	+ 5,9	+ 5,8	++ 11,0	++ 11,0	+ 6,7	++ 10,5
ITGA2	CD49b	+ 2,6	+ 2,7	+ 6,8	+ 6,9	+++ 34,6	+++ 52,2
ITGA3	CD49c	+++ 97,5	+++ 96,7	+++ 107,9	+++ 96,2	+++ 87,0	+++ 92,9
ITGA4	CD49d	(+) 1,6	- 1,4	+ 5,2	+ 4,4	++ 19,4	++ 12,2
ITGA5	CD49e	+++ 100,5	+++ 120,8	+++ 81,7	+++ 120,5	+++ 140,4	+++ 143,2
ITGA6	CD49f	+ 2,0	+ 2,1	+ 2,1	+ 2,2	+ 4,2	+ 4,7
ITGAV	CD51	++ 19,1	++ 26,3	++ 14,5	++ 16,3	++ 11,8	++ 17,2
ITGB1	CD29	+++ 208,7	+++ 245,8	+++ 219,6	+++ 239,9	+++ 337,0	+++ 382,6
ITGB2	CD18	- 1,3	(+) 1,5	- 1,2	- 1,2	- 0,8	- 1,0
ITGB3	CD61	nd	nd	++ 29,1	++ 28,6	++ 25,3	++ 26,7
ITGB4	CD104	- 1,0	- 1,0	- 1,0	- 1,0	- 0,9	- 1,0
ITGB5	---	++ 10,0	++ 10,3	+ 4,9	+ 7,2	+ 3,4	+ 4,0
ITGB6	---	- 0,9	- 0,9	- 0,9	- 1,0	- 1,0	- 1,0
ITGB7	---	- 0,9	- 1,0	- 0,9	- 0,9	- 1,0	- 1,0
ITGB8	---	(+) 1,8	(+) 1,6	+ 6,9	- 1,4	+ 2,3	- 1,0
CXCR4	CD184	- 1,0	- 1,2	- 0,8	- 0,9	- 1,0	- 0,9
CCR2	CD192	- 1,0	- 1,1	- 1,0	- 1,0	- 1,0	- 1,0
CCR7	CD197	- 1,4	+ 2,7	(+) 1,7	- 1,4	+ 4,1	+ 2,3
VCAM	CD106	+ 2,3	++ 19,7	(+) 1,5	++ 11,3	- 1,1	+ 3,3
PSGL-1	CD162	- 1,1	- 1,0	- 0,9	- 0,9	- 1,0	- 1,4
PGP-1	CD44	+++ 277,1	+++ 322,6	+++ 237,3	+++ 208,1	+++ 254,8	+++ 237,6
L-Sele	CD62L	- 1,2	- 1,4	- 1,1	- 1,2	- 0,8	- 1,2

Positivkontrollen

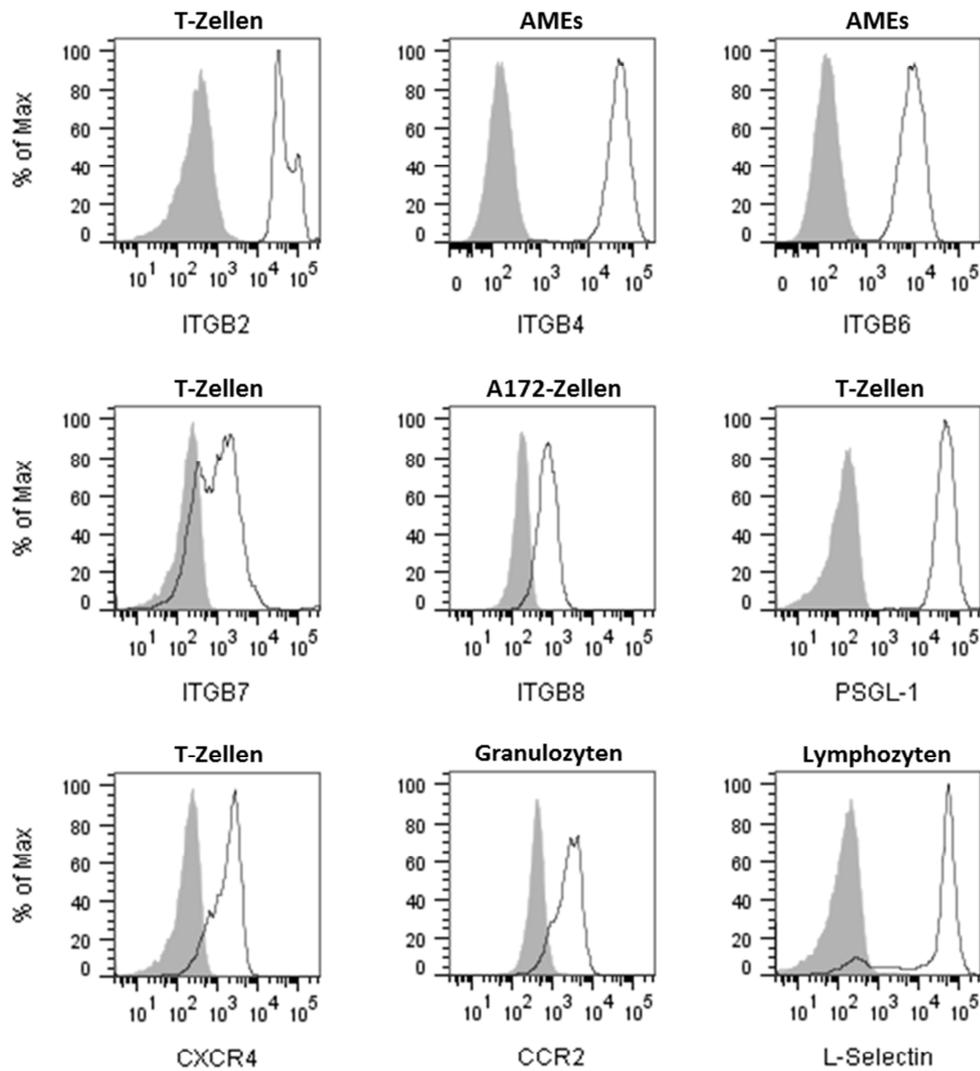


Abbildung 39: Positivkontrollen der Expressionsanalyse: T-Zellen als Kontrollen für ITGB2, ITGB7, PSGL-1 und CXCR4. Amnionmembran-Epithelzellen (AME) als Kontrolle für ITGB4 und ITGB6. Glioblastom-Zelllinie A172 als Kontrolle für ITGB8, Granulozyten für CCR2 und Lymphozyten für L-Selectin. Der Anteil an Zellen mit entsprechender Expressionsintensität ist in „% of Max“ angegeben. Grau schattierte Histogramme repräsentieren die Isotypkontrollen.

8.5 Realtime-PCR

Tabelle 26: Liste aller nach 24 stündiger Stimulation regulierten Gene des Custom Panels in MSCs, deren mRNA-Menge sich mindestens um den Faktor 2 (Fold change $\geq 2,0$ bzw. $\leq -2,0$) geändert hat (grün: $p \leq 0,0001$, gelb: $p = 0,0001-0,005$, rot: $p > 0,05$ => nicht signifikant).

MSC (unstim) vs MSC (stim)	Fold change	Difference (log scale)	P-Value				
Hs_CXCL10_103807	511552,55	18,96	1,00E-08	Hs_VEGFA_101034	3,47	1,80	0,001371381
Hs_CXCL9_104231	211455,75	17,69	1,00E-08	Hs_PECAM1_137855	3,37	1,75	0,029129623
Hs_IDO1_103804	141120,78	17,11	1,00E-08	Hs_BDKRB2_113197	3,34	1,74	0,002124999
Hs_CXCL11_110800	96357,40	16,56	1,00E-08	Hs_IFNGR2_114055	3,28	1,72	5,06E-06
Hs_CCL8_111343	27459,94	14,75	1,00E-08	Hs_TLR5_103674	3,04	1,60	0,008269639
Hs_CCL5_113395	14709,77	13,84	1,00E-08	Hs_STC1_116867	2,94	1,56	0,033007522
Hs_CX3CL1_102721	4060,46	11,99	1,00E-08	Hs_NANOG_114796	2,92	1,55	0,012696531
Hs_CD38_100250	816,98	9,67	1,00E-08	Hs_DDI4_137543	2,83	1,50	0,005633957
Hs_ICAM1_100945	565,93	9,14	1,00E-08	Hs_ZEB2_114816	2,72	1,44	6,51E-06
Hs_IL8_103136	250,06	7,97	1,61E-06	Hs_NGFR_100652	2,71	1,44	0,067646658
Hs_CCL13_111292	195,60	7,61	1,66E-05	Hs_FUT4_118619	2,69	1,43	5,71E-06
Hs_BST2_117914	111,86	6,81	1,00E-08	Hs_RB1_101538	2,63	1,39	3,02E-06
Hs_CXCL3_103888	103,69	6,70	3,22E-06	Hs_LIF_113007	2,60	1,38	0,009593359
Hs_CCL7_110710	98,36	6,62	1,48E-07	Hs_ROBO4_127380	2,55	1,35	0,018092882
Hs_CD274_104030	95,23	6,57	1,00E-08	Hs_CHN1_139743	2,52	1,34	0,00258291
Hs_TNF_103295	81,93	6,36	4,80E-08	Hs_NRP2_111705	2,52	1,34	0,013807305
Hs_CXCL1_137825	68,23	6,09	0,001682294	Hs_ROBO1_103193	2,52	1,33	0,003967406
Hs_CCL2_141156	65,05	6,02	1,00E-08	Hs_MST1R_105683	2,43	1,28	0,024988332
Hs_CCL2_100240	60,99	5,93	1,00E-08	Hs_RB1_101596	2,43	1,28	1,08E-07
Hs_CXCL2_103070	56,63	5,82	0,000520052	Hs_XPNPEP1_109516	2,41	1,27	1,08E-05
Hs_CXCL1_105522	53,84	5,75	0,001949091	Hs_MMP9_136019	2,38	1,25	0,04769254
Hs_CCL20_110753	51,93	5,70	1,38E-05	Hs_CXCR4_110817	2,36	1,24	0,008669645
Hs_SELE_135943	43,41	5,44	2,06E-07	Hs_SNX6_125013	2,26	1,17	1,97E-05
Hs_IL3RA_117429	42,45	5,41	0,000268189	Hs_ITGA1_110762	2,24	1,17	0,034126477
Hs_IL1B_100950	42,31	5,40	0,001429639	Hs_F3_113302	2,22	1,15	0,348320187
Hs_CSF1_112032	42,26	5,40	1,00E-08	Hs_IL10RB_103569	2,19	1,13	6,83E-05
Hs_CCL3_136214	40,88	5,35	1,00E-08	Hs_FGF2_100912	2,12	1,09	0,011300453
Hs_CXCL5_110613	39,79	5,31	0,004451824	Hs_TNFRSF10B_101236	2,12	1,08	3,29E-06
Hs_TLR2_101225	39,49	5,30	1,87E-06	Hs_NT5E_105242	2,12	1,08	0,002755072
Hs_TNFRSF1B_102682	37,81	5,24	1,49E-06	Hs_ILK_110108	2,11	1,08	5,08E-07
Hs_TNFAIP6_113809	35,00	5,13	1,20E-05	Hs_WISP1_110191	2,07	1,05	0,309925378
Hs_CXCL16_114685	28,64	4,84	1,89E-06	Hs_IL3_137634	2,05	1,04	0,060663362
Hs_IL7R_114202	28,51	4,83	1,05E-07	Hs_SELL_112968	2,05	1,03	0,007726628
Hs_VCAM1_103286	28,44	4,83	0,000574477	Hs_TNFRSF10A_101232	2,03	1,02	0,146236326
Hs_IL10RA_103952	23,36	4,55	3,20E-08	Hs_FGF23_140778	2,02	1,02	0,217387883
Hs_TGFA_110787	23,32	4,54	0,000519612	Hs_TIMP4_112044	-2,01	-1,00	0,045097004
Hs_MMP13_140652	22,22	4,47	0,000905664	Hs_TEK_105772	-2,02	-1,01	0,222727548
Hs_CD34_113224	20,57	4,36	4,72E-06	Hs_CDH6_112143	-2,02	-1,02	0,052405935
Hs_IL6_113614	19,38	4,28	1,38E-05	Hs_NOTCH3_112380	-2,05	-1,04	0,284223814
Hs_BMP2_104558	18,36	4,20	0,001297023	Hs_CD24_139818	-2,07	-1,05	0,455759853
Hs_TLR3_111008	17,94	4,17	1,00E-08	Hs_TGFBFR1_104725	-2,10	-1,07	0,000948772
Hs_NOS2_102470	15,00	3,91	2,90E-08	Hs_COL1A1_100861	-2,26	-1,18	0,023023599
Hs_MMP12_103818	14,83	3,89	0,005888883	Hs_NGFRAP1_118787	-2,28	-1,19	0,000210729
Hs_MYH11_116429	14,13	3,82	0,000416349	Hs_NTRK3_105821	-2,29	-1,20	0,158518664
Hs_IL1RN_103133	12,68	3,66	0,00290971	Hs_FBLIM1_126341	-2,34	-1,23	0,006875993
Hs_STAT1_101180	11,89	3,57	8,47E-07	Hs_CDC80_115675	-2,35	-1,23	0,032483529
Hs_HLA-G_135876	11,31	3,50	1,46E-06	Hs_ITGB7_111111	-2,36	-1,24	0,021420744
Hs_IL12A_112242	10,18	3,35	1,00E-08	Hs_NTF3_100692	-2,39	-1,26	0,036813707
Hs_IL13_112368	9,51	3,25	0,002366736	Hs_EGF_136007	-2,39	-1,26	0,175760999
Hs_ADM_137818	8,07	3,01	2,17E-05	Hs_FGFR3_105621	-2,46	-1,30	0,0194309
Hs_MMP3_103167	7,70	2,94	0,031809737	Hs_MCAM_105530	-2,49	-1,31	0,006487769
Hs_SEMA3F_119222	7,26	2,86	0,092316564	Hs_TLR6_111018	-2,51	-1,33	0,002767302
Hs_TFPI2_108032	7,00	2,81	0,030828615	Hs_ACTA2_125175	-2,51	-1,33	0,013155781
Hs_MMP1_103943	6,98	2,80	0,012466174	Hs_ID1_104631	-2,58	-1,37	0,021429818
Hs_TLR7_111012	6,95	2,80	0,000447405	Hs_FGFR4_137059	-2,58	-1,37	0,053076026
Hs_FST_112452	6,33	2,66	0,001671155	Hs_TLN2_130026	-2,68	-1,42	7,04E-05
Hs_CSF2_110860	5,99	2,58	0,006261185	Hs_NCAM1_111243	-2,70	-1,43	0,195869281
Hs_PDGFBR_110713	5,63	2,49	0,005337491	Hs_SNAI1_112995	-2,71	-1,44	0,004866665
Hs_ITGAL_113362	5,15	2,36	0,000348271	Hs_CCNB1_101373	-2,74	-1,45	0,021736514
Hs_NGF_113440	4,95	2,31	0,002300661	Hs_ITGA4_110765	-2,78	-1,47	0,10616794
Hs_BMP7_104574	4,84	2,27	2,99E-06	Hs_PAMR1_109653	-3,02	-1,60	0,004483705
Hs_FAS_100426	4,66	2,22	4,98E-06	Hs_FGF7_113109	-3,27	-1,71	0,181514269
Hs_PDCD11G2_117537	4,51	2,17	2,90E-08	Hs_KRT7_103587	-3,39	-1,76	0,057796728
Hs_ADM2_137782	4,51	2,17	0,001280538	Hs_CCNB2_101376	-3,87	-1,95	0,005810859
Hs_CCL17_102711	4,43	2,15	3,60E-05	Hs_MMP15_108327	-3,93	-1,97	0,011155304
Hs_NRG1_139822	4,37	2,13	0,042450148	Hs_MKI67_101512	-4,02	-2,01	0,021534684
Hs_IL4R_110880	4,28	2,10	8,33E-07	Hs_SDC1_113025	-4,08	-2,03	0,010447311
Hs_LY6E_140662	4,17	2,06	1,00E-08	Hs_IL6R_112272	-4,16	-2,06	0,007375844
Hs_NRG1_113134	4,14	2,05	0,067723089	Hs_SDC2_113656	-4,31	-2,11	5,78E-05
Hs_CEBPB_100269	3,96	1,99	1,00E-08	Hs_FGFR2_105812	-4,47	-2,16	0,046695766
Hs_TAPBP_138030	3,93	1,97	1,50E-08	Hs_FGF9_111498	-4,82	-2,27	0,011528641
Hs_FLT1_105673	3,91	1,97	0,192309186	Hs_ERBB3_106100	-5,05	-2,34	0,023381814
Hs_TNC_113344	3,85	1,94	0,003027356	Hs_CDK1_101406	-5,09	-2,58	0,012047098
Hs_AOC3_115054	3,80	1,93	0,047568933	Hs_CDKN2B_101439	-6,42	-2,68	0,000681894
Hs_ARHGAP29_122929	3,75	1,91	0,015822522	Hs_RGS4_114601	-10,85	-3,44	2,93E-07
Hs_TLR4_135752	3,50	1,81	0,350707141	Hs_KIT_105674	-11,35	-3,50	0,000253186
				Hs_MMP16_108882	-12,01	-3,59	3,89E-05

8.6 Kinetik

Tabelle 27: Kinetische Expressionsanalyse mittels Durchflusszytometrie während der Stimulation von MSCs mit 20 ng/ml TNF- α und IFN- γ . Für die Auswertung wurde im Falle von CD38 der Anteil an CD38-positiven Zellen bestimmt. Für CD157, CD49d und VCAM wurde der relative GeoMean herangezogen.

CD38

BM-MSC					
CD38+ Zellen [%]					
Zeitpunkt [h]	Spender 1	Spender 2	Spender 3	Mittelw. [%]	Stabw. [%]
0	0,6	0,6	0,6	0,6	0,0
5	1,0	1,6	0,9	1,2	0,4
16	20,3	38,3	19,7	26,1	10,6
24	37,1	63,5	39,0	46,5	14,7
48	94,4	98,2	96,5	96,4	1,9
72	97,6	99,2	96,9	97,9	1,2
96	98,1	98,1	95,3	97,2	1,6
120	97,9	98,5	96,0	97,5	1,3
AM-MSC					
CD38+ Zellen [%]					
Zeitpunkt [h]	Spender 1	Spender 2	Spender 3	Mittelw. [%]	Stabw. [%]
0	0,2	0,3	0,6	0,4	0,2
5	0,3	0,4	0,6	0,4	0,1
16	9,7	20,3	7,4	12,5	6,9
24	26,8	33,0	26,0	28,6	3,8
48	82,0	51,0	70,1	67,7	15,6
72	85,7	49,9	74,3	70,0	18,3
96	87,0	41,5	74,6	67,7	23,5
120	89,1	61,5	85,0	78,5	14,9
UC-MSC					
CD38+ Zellen [%]					
Zeitpunkt [h]	Spender 1	Spender 2	Spender 3	Mittelw. [%]	Stabw. [%]
0	nd	0,6	0,3	0,5	0,3
5	0,2	0,6	0,3	0,4	0,2
16	nd	13,4	4,1	8,7	6,6
24	7,8	28,7	12,3	16,3	11,0
48	24,4	40,5	30,8	31,9	8,1
72	20,1	44,4	44,9	36,5	14,2
96	17,8	40,8	32,9	30,5	11,7
120	21,6	47,3	nd	34,5	18,2

CD157

BM-MSc											
	Spender 1			Spender 2			Spender 3				
Zeitpunkt [h]	CD157	Isotyp	CD157/Isotyp	CD157	Isotyp	CD157/Isotyp	CD157	Isotyp	CD157/Isotyp	Mittelw.	Stabw
0	435	128	3,4	515	84,1	6,1	433	106	4,1	4,5	1,4
5	374	126	3,0	429	83,3	5,2	415	106	3,9	4,0	1,1
16	259	128	2,0	291	80,4	3,6	257	112	2,3	2,6	0,9
24	251	136	1,8	296	84,2	3,5	289	111	2,6	2,7	0,8
48	544	176	3,1	640	124	5,2	617	150	4,1	4,1	1,0
AM-MSc											
	Spender 1			Spender 2			Spender 3				
Zeitpunkt [h]	CD157	Isotyp	CD157/Isotyp	CD157	Isotyp	CD157/Isotyp	CD157	Isotyp	CD157/Isotyp	Mittelw.	Stabw
0	124	40,8	3,0	112	67,7	1,7	114	58,5	1,9	2,2	0,7
5	127	43,5	2,9	104	69,3	1,5	111	59,2	1,9	2,1	0,7
16	88,5	41,9	2,1	109	74,5	1,5	76,7	53,4	1,4	1,7	0,4
24	84,9	44,8	1,9	108	72,9	1,5	87,8	57,7	1,5	1,6	0,2
48	200	79,8	2,5	149	90	1,7	149	77,4	1,9	2,0	0,4
UC-MSc											
	Spender 1			Spender 2			Spender 3				
Zeitpunkt [h]	CD157	Isotyp	CD157/Isotyp	CD157	Isotyp	CD157/Isotyp	CD157	Isotyp	CD157/Isotyp	Mittelw.	Stabw
0	126	54,6	2,3	148	53,8	2,8	135	68	2,0	2,3	0,4
5	129	56,8	2,3	150	55	2,7	127	67	1,9	2,3	0,4
16	98,4	59,4	1,7	118	54,8	2,2	105	68,3	1,5	1,8	0,3
24	103	59,8	1,7	119	57,4	2,1	99,2	65,4	1,5	1,8	0,3
48	112	68,7	1,6	142	72,7	2,0	104	65,3	1,6	1,7	0,2

CD49d

BM-MSc											
	Spender 1			Spender 2			Spender 3				
Zeitpunkt [h]	CD49d	Isotyp	CD49d/Isotyp	CD49d	Isotyp	CD49d/Isotyp	CD49d	Isotyp	CD49d/Isotyp	Mittelw.	Stabw
0	1383	147	9,4	509	98,8	5,2	325	116	2,8	5,8	3,3
16	1090	234	4,7	429	161	2,7	325	204	1,6	3,0	1,6
24	1028	246	4,2	412	173	2,4	338	209	1,6	2,7	1,3
40	1195	323	3,7	468	239	2,0	462	270	1,7	2,5	1,1
48	1258	337	3,7	500	243	2,1	493	286	1,7	2,5	1,1
72	1226	332	3,7	543	272	2,0	532	312	1,7	2,5	1,1
AM-MSc											
	Spender 1			Spender 2			Spender 3				
Zeitpunkt [h]	CD49d	Isotyp	CD49d/Isotyp	CD49d	Isotyp	CD49d/Isotyp	CD49d	Isotyp	CD49d/Isotyp	Mittelw.	Stabw
0	718	69,7	10,3	1235	108	11,4	1008	92,7	10,9	10,9	0,6
16	541	114	4,7	1136	209	5,4	657	132	5,0	5,1	0,4
24	480	124	3,9	934	222	4,2	663	151	4,4	4,2	0,3
40	760	192	4,0	1024	259	4,0	750	191	3,9	3,9	0,0
48	825	224	3,7	798	237	3,4	758	190	4,0	3,7	0,3
72	881	265	3,3	611	255	2,4	733	202	3,6	3,1	0,6
UC-MSc											
	Spender 1			Spender 2			Spender 3				
Zeitpunkt [h]	CD49d	Isotyp	CD49d/Isotyp	CD49d	Isotyp	CD49d/Isotyp	CD49d	Isotyp	CD49d/Isotyp	Mittelw.	Stabw
0	2707	87,1	31,1	3579	82	43,6	1377	96,2	14,3	29,7	14,7
16	2049	101	20,3	2559	99,1	25,8	1301	124	10,5	18,9	7,8
24	2062	107	19,3	2560	104	24,6	1286	124	10,4	18,1	7,2
40	2135	150	14,2	2875	162	17,7	1391	140	9,9	14,0	3,9
48	2265	153	14,8	2679	164	16,3	1480	144	10,3	13,8	3,1
72	2274	179	12,7	2484	206	12,1	1228	175	7,0	10,6	3,1

VCAM (CD106)

UC-MSc											
	Spender 1			Spender 2			Spender 3				
Zeitpunkt [h]	VCAM	Isotyp	VCAM/Isotyp	VCAM	Isotyp	VCAM/Isotyp	VCAM	Isotyp	VCAM/Isotyp	Mittelw.	Stabw
0	57,6	54,6	1,1	58,1	53,8	1,1	66,8	68	1,0	1,0	0,1
5	130	56,8	2,3	107	55	1,9	108	67	1,6	1,9	0,3
16	236	59,4	4,0	248	54,8	4,5	140	68,3	2,0	3,5	1,3
24	189	59,8	3,2	212	57,4	3,7	95,5	65,4	1,5	2,8	1,2
40	150	71,1	2,1	216	77,1	2,8	126	68,2	1,8	2,3	0,5
48	157	68,7	2,3	191	72,7	2,6	94,2	65,3	1,4	2,1	0,6
72	111	72,5	1,5	171	85,4	2,0	125	82,4	1,5	1,7	0,3
AM-MSc											
	Spender 1			Spender 2			Spender 3				
Zeitpunkt [h]	VCAM	Isotyp	VCAM/Isotyp	VCAM	Isotyp	VCAM/Isotyp	VCAM	Isotyp	VCAM/Isotyp	Mittelw.	Stabw
0	46,7	40,8	1,1	121	67,7	1,8	69,2	58,5	1,2	1,4	0,4
5	221	43,5	5,1	244	69,3	3,5	229	59,2	3,9	4,2	0,8
16	350	41,9	8,4	456	74,5	6,1	175	53,4	3,3	5,9	2,5
24	256	44,8	5,7	353	72,9	4,8	292	57,7	5,1	5,2	0,5
40	342	40,8	8,4	423	90,8	4,7	388	71,6	5,4	6,2	2,0
48	438	40,8	10,7	299	90	3,3	333	77,4	4,3	6,1	4,0
72	191	40,8	4,7	175	102	1,7	172	87	2,0	2,8	1,6
BM-MSc											
	Spender 1			Spender 2			Spender 3				
Zeitpunkt [h]	VCAM	Isotyp	VCAM/Isotyp	VCAM	Isotyp	VCAM/Isotyp	VCAM	Isotyp	VCAM/Isotyp	Mittelw.	Stabw
0	225	128	1,8	106	84,1	1,3	229	106	2,2	1,7	0,5
5	545	126	4,3	365	83,3	4,4	488	106	4,6	4,4	0,1
16	512	128	4,0	866	80,4	10,8	712	112	6,4	7,0	3,4
24	363	136	2,7	647	84,2	7,7	773	111	7,0	5,8	2,7
40	966	173	5,6	1250	119	10,5	1249	135	9,3	8,4	2,6
48	1467	176	8,3	669	124	5,4	1227	150	8,2	7,3	1,7
72	1273	192	6,6	751	143	5,3	755	170	4,4	5,4	1,1

8.7 Enzymaktivität

Tabelle 28: Bestimmung der ADP-Ribosylzyklaseaktivität in MSC-Zellhomogenaten aus den verschiedenen Geweben durch Verwendung von NGD⁺, das zu fluoreszentelem cGDPR umgesetzt wird. Angegeben sind die jeweils gemessenen Fluoreszenzintensitäten (F) zu den entsprechenden Zeitpunkten, die in Diagrammen über der Zeit aufgetragen wurden (Zeit-Umsatz-Kurven). Die Berechnung des Substratumsatzes ($\Delta F/\text{min}$) erfolgte durch Bestimmung der jeweiligen Steigungen im linearen Bereich zwischen 0 und 45 min. Die Messwerte wurden auf die eingesetzten Zellmengen normiert.

Normierung der Zellmenge

	Signal Zellen (F)	Faktor (UC-MS)
BM-MS	507,5	5,24
AM-MS	644,8	4,12
UC-MS	2659,5	1,00

BM-MSCs

Unstimuliert							
Fluoreszenzintensität (F)							
		[NGD ⁺]					
	Zeit [min]	0 μM	12,5 μM	25 μM	50 μM	100 μM	200 μM
1	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	-71	12	-26	18	-2
	30	0	-48	24	-27	15	-35
	45	0	-47	34	-31	26	7
2	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	-5	-18	1	-39	-2
	30	0	3	-26	-13	-36	-4
	45	0	54	-13	-16	-9	12
3	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	5	28	44	24	49
	30	0	-14	29	12	9	39
	45	0	-49	26	12	15	-5
4	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	-12	13	4	1	-40
	30	0	26	51	70	6	10
	45	0	9	9	28	-9	-14
Substratumsatz ($\Delta F/\text{min}$)							
	[NGD ⁺]	1	2	3	4	Mittelw.	Stabw.
	0 μM	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	12,5 μM	0,8	0,8	-0,8	0,3	0,3	0,8
	25 μM	-1,5	-0,5	0,8	0,7	-0,1	1,1
	50 μM	-0,8	-0,3	0,5	1,1	0,1	0,8
	100 μM	0,6	-0,7	0,4	-0,1	0,1	0,6
	200 μM	-0,2	0,1	0,5	-0,3	0,0	0,4

Stimuliert							
Fluoreszenzintensität (F)							
		[NGD ⁺]					
	Zeit [min]	0 μM	12,5 μM	25 μM	50 μM	100 μM	200 μM
1	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	649	1270	1629	1618	1533
	30	0	678	1751	2948	3006	3268
	45	0	573	2024	3863	4479	4998
2	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	789	1152	1895	1672	1624
	30	0	947	1917	2960	2982	3262
	45	0	754	2048	4208	4648	5319
3	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	696	1347	1883	1654	1742
	30	0	673	1858	3233	3586	3629
	45	0	573	2060	4153	4981	5443
4	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	982	1484	1853	1769	1755
	30	0	1006	2125	3300	3477	3766
	45	0	1134	2232	4026	5017	5744
Substratumsatz ($\Delta F/\text{min}$)							
	[NGD ⁺]	1	2	3	4	Mittelw.	Stabw.
	0 μM	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	12,5 μM	17,8	23,6	17,8	30,4	22,4	6,0
	25 μM	51,9	52,9	53,4	59,2	54,4	3,3
	50 μM	91,2	97,5	99,0	98,0	96,4	3,6
	100 μM	100,6	102,7	113,2	113,2	107,4	6,7
	200 μM	110,0	114,8	120,5	126,3	117,9	7,0

AM-MSCs

Unstimuliert							
Fluoreszenzintensität (F)							
		[NGD+]					
	Zeit [min]	0 μ M	12,5 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	200 μ M
1	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	-27	25	11	39	21
	30	0	-7	18	-7	48	-3
	45	0	1	40	24	64	30
2	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	23	31	15	-11	65
	30	0	26	29	18	6	49
	45	0	11	12	-11	-24	35
3	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	-26	10	31	32	41
	30	0	-17	19	6	2	37
	45	0	-25	19	0	23	14
4	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	-35	-15	-1	-12	-15
	30	0	-15	-22	-9	4	20
	45	0	-23	-16	-15	-16	1
Substratumsatz (Δ F/min)							
	[NGD+]	1	2	3	4 Mittelw.	Stabw.	
	0 μ M	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	12,5 μ M	-0,2	0,6	-0,6	-0,6	-0,2	0,6
	25 μ M	0,9	1,3	0,5	-0,5	0,6	0,8
	50 μ M	0,3	0,5	0,2	-0,3	0,2	0,3
	100 μ M	1,6	0,1	0,5	-0,2	0,5	0,8
	200 μ M	0,5	-0,3	0,7	0,1	0,3	0,4

Stimuliert							
Fluoreszenzintensität (F)							
		[NGD+]					
	Zeit [min]	0 μ M	12,5 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	200 μ M
1	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	618	920	592	500	613
	30	0	801	1537	1237	1463	1475
	45	0	943	2421	2325	2453	2620
2	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	563	800	600	798	862
	30	0	755	1333	1636	1695	1753
	45	0	943	2123	2353	2779	3018
3	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	417	715	830	682	532
	30	0	413	1164	1406	1557	1576
	45	0	722	2052	2240	2498	2874
4	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	709	800	931	1079	824
	30	0	885	1586	1684	1945	1911
	45	0	985	1453	2534	3073	2798
Substratumsatz (Δ F/min)							
	[NGD+]	1	2	3	4 Mittelw.	Stabw.	
	0 μ M	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	12,5 μ M	23,9	23,5	16,1	26,0	22,4	4,3
	25 μ M	53,6	47,0	43,7	39,6	45,9	5,9
	50 μ M	47,8	51,9	49,4	56,9	51,5	4,0
	100 μ M	51,5	59,7	54,0	62,2	56,9	5,0
	200 μ M	54,4	63,9	58,5	67,6	61,1	5,8

UC-MSCs

Unstimuliert							
Fluoreszenzintensität (F)							
		[NGD+]					
	Zeit [min]	0 μ M	12,5 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	200 μ M
1	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	-47	-54	-45	-8	-47
	30	0	-40	-24	-40	24	-52
	45	0	-30	-9	-18	-1	-15
2	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	34	49	21	54	75
	30	0	40	31	28	29	41
	45	0	26	2	-45	-6	-15
3	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	-22	-42	-55	-49	-28
	30	0	-5	-34	-70	-40	-19
	45	0	-21	-33	-57	-26	-33
4	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	42	60	42	-5	48
	30	0	38	16	-4	-35	5
	45	0	90	65	53	1	60
Substratumsatz (Δ F/min)							
	[NGD+]	1	2	3	4 Mittelw.	Stabw.	
	0 μ M	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	12,5 μ M	-1,0	0,9	-0,5	1,8	0,3	1,3
	25 μ M	-0,6	0,6	-1,0	1,4	0,1	1,1
	50 μ M	-0,9	-0,3	-1,7	0,9	-0,5	1,1
	100 μ M	0,2	0,5	-1,0	-0,3	-0,2	0,7
	200 μ M	-0,9	0,5	-0,8	1,1	0,0	1,0

Stimuliert							
Fluoreszenzintensität (F)							
		[NGD+]					
	Zeit [min]	0 μ M	12,5 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	200 μ M
1	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	-38	41	173	217	250
	30	0	-42	103	316	632	694
	45	0	67	277	667	1070	1163
2	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	121	197	308	408	492
	30	0	191	318	521	930	1015
	45	0	246	449	771	1298	1534
3	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	44	145	325	347	449
	30	0	21	296	502	736	851
	45	0	126	419	741	1197	1324
4	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	82	126	342	324	369
	30	0	216	351	693	842	914
	45	0	126	392	864	1212	1310
Substratumsatz (Δ F/min)							
	[NGD+]	1	2	3	4 Mittelw.	Stabw.	
	0 μ M	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	12,5 μ M	0,4	5,9	2,2	4,3	3,2	2,4
	25 μ M	5,1	10,4	9,5	9,5	8,6	2,4
	50 μ M	13,4	17,4	16,9	20,6	17,1	2,9
	100 μ M	22,3	29,4	25,8	26,9	26,1	2,9
	200 μ M	24,4	33,9	29,2	29,2	29,2	3,9

Kalkulation der enzymkinetischen Parameter

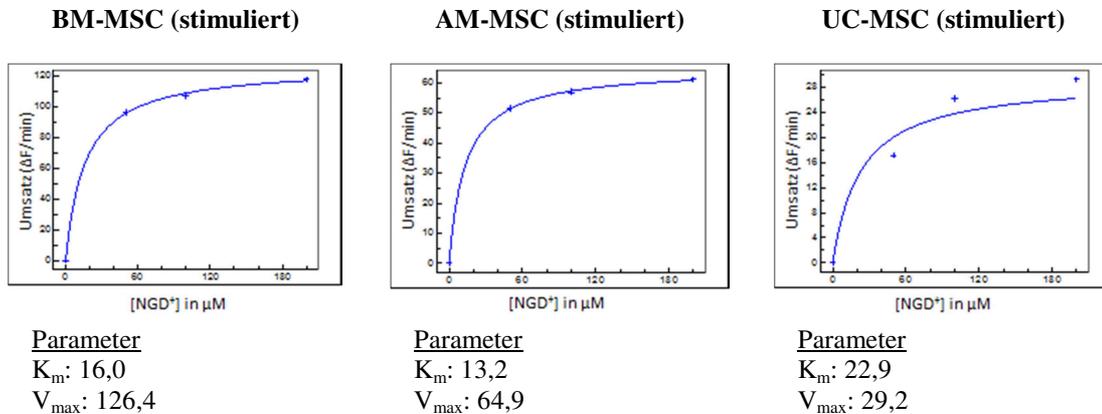


Abbildung 40: Für die Kalkulation der enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} der ADP-Ribosylzyklasereaktion in den Zellhomogenaten stimulierter MSCs wurden in einem jeweiligen Diagramm die Umsatzrate ($\Delta F/\text{min}$) bei der entsprechenden NGD^+ -Konzentration aufgetragen (Michaelis-Menten-Diagramm). Anschließend wurde eine Kurvenanpassung (Fit) durch die Datenpunkte gelegt. Nicht berücksichtigt wurden die Datenpunkte bei $12,5 \mu\text{M}$ sowie $25 \mu\text{M}$ NGD^+ und die Kurven somit auf den unteren Konzentrationsbereich extrapoliert.

Enzymaktivität in Membranfraktion und zytosolischer Fraktion stimulierter BM-MSCs

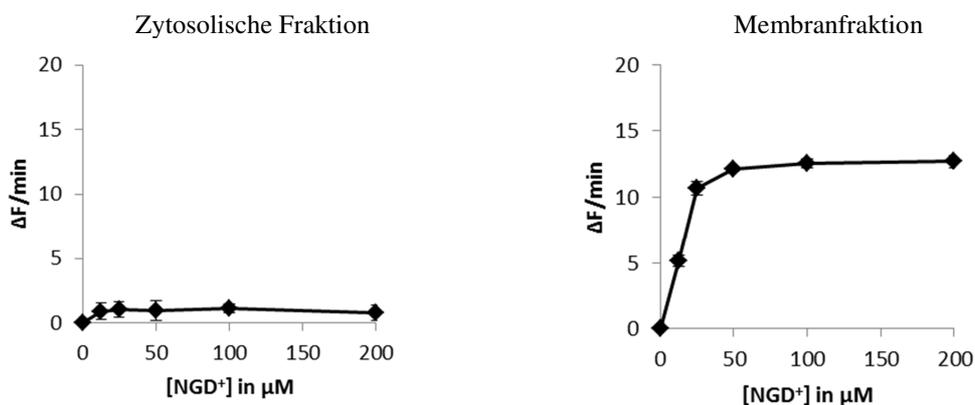


Abbildung 41: Michaelis-Menten-Diagramme: Bestimmung der ADP-Ribosylzyklaseaktivität in der zytosolischen Fraktion und in der Membranfraktion stimulierter BM-MSCs. Aufgetragen ist die Umsatzgeschwindigkeit über der $[\text{NGD}^+]$. Lediglich in der Membranfraktion ließ sich eine deutliche Enzymaktivität nachweisen. Die minimale Aktivität in der zytosolischen Fraktion ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf restliche Spuren von Membranpartikeln zurückzuführen.

Tabelle 29: Bestimmung der ADP-Ribosylzyklaseaktivität in transduzierten UC-MSCs. Angegeben sind die jeweils gemessenen Fluoreszenzintensitäten (F) und die aus den Zeit-Umsatz-Kurven ermittelten Substratumsätze ($\Delta F/\text{min}$) innerhalb des linearen Bereiches zwischen 0 und 5 min.

CD38-transduzierte UC-MSCs

CD38⁺ (Membranfraktion)

Fluoreszenzintensität (F)							
[NGD+]							
Nr.	Zeit [min]	0 μM	12,5 μM	25 μM	50 μM	100 μM	200 μM
1	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	84	394	906	1075	1077
2	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	110	373	881	1078	1081
3	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	62	349	858	1065	1145
4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	48	325	885	1189	1173

Substratumsatz ($\Delta F/\text{min}$)							
[NGD+]	1	2	3	4	Mittelw.	Stabw.	
0 μM	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
12,5 μM	16,8	22,0	12,4	9,6	15,2	5,4	
25 μM	78,8	74,6	69,8	65,0	72,1	6,0	
50 μM	181,2	176,2	171,6	177,0	176,5	3,9	
100 μM	215,0	215,6	213,0	237,8	220,4	11,7	
200 μM	215,4	216,2	229,0	234,6	223,8	9,5	

CD38⁺ (Zytosolische Fraktion)

Fluoreszenzintensität (F)							
[NGD+]							
Nr.	Zeit [min]	0 μM	12,5 μM	25 μM	50 μM	100 μM	200 μM
1	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	50	87	91	73	108
2	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	43	48	60	60	79
3	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	68	82	79	66	92
4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	55	62	96	93	97

Substratumsatz ($\Delta F/\text{min}$)							
[NGD+]	1	2	3	4	Mittelw.	Stabw.	
0 μM	0	0	0	0	0,0	0,0	
12,5 μM	10	8,6	13,6	11	10,8	2,1	
25 μM	17,4	9,6	16,4	12,4	14,0	3,6	
50 μM	18,2	12	15,8	19,2	16,3	3,2	
100 μM	14,6	12	13,2	18,6	14,6	2,9	
200 μM	21,6	15,8	18,4	19,4	18,8	2,4	

CD38- $\Delta 17^+$ (Membranfraktion)

Fluoreszenzintensität (F)							
[NGD+]							
Nr.	Zeit [min]	0 μM	12,5 μM	25 μM	50 μM	100 μM	200 μM
1	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	128	436	658	741	717
2	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	140	369	660	802	762
3	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	158	476	660	817	776
4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	162	348	724	877	768

Substratumsatz ($\Delta F/\text{min}$)							
[NGD+]	1	2	3	4	Mittelw.	Stabw.	
0 μM	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
12,5 μM	25,6	28,0	31,6	32,4	29,4	3,2	
25 μM	87,2	73,8	95,2	69,6	81,5	11,8	
50 μM	131,6	132,0	132,0	144,8	135,1	6,5	
100 μM	148,2	160,4	163,4	175,4	161,9	11,2	
200 μM	143,4	152,4	155,2	153,6	151,2	5,3	

CD38- $\Delta 17^+$ (Zytosolische Fraktion)

Fluoreszenzintensität (F)							
[NGD+]							
Nr.	Zeit [min]	0 μM	12,5 μM	25 μM	50 μM	100 μM	200 μM
1	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	9	28	65	36	5
2	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	53	31	33	67	29
3	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	64	39	-12	25	23
4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	53	31	33	67	29

Substratumsatz ($\Delta F/\text{min}$)							
[NGD+]	1	2	3	4	Mittelw.	Stabw.	
0 μM	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
12,5 μM	1,8	-0,6	12,8	10,6	6,2	6,5	
25 μM	5,6	3,0	7,8	6,2	5,7	2,0	
50 μM	13,0	-1,2	-2,4	6,6	4,0	7,2	
100 μM	7,2	7,4	5,0	13,4	8,3	3,6	
200 μM	1,0	2,0	4,6	5,8	3,4	2,2	

E226L-CD38⁺ (Membranfraktion)

Fluoreszenzintensität (F)							
Nr.	Zeit [min]	[NGD+]					
		0 μ M	12,5 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	200 μ M
1	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	12	28	24	54	48
2	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	37	20	38	-22	32
3	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	19	21	40	45	25
4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	1	-9	-33	-31	-17

Substratumsatz (Δ F/min)						
[NGD+]	1	2	3	4	Mittelw.	Stabw.
0 μ M	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12,5 μ M	2,4	7,4	3,8	0,2	3,5	3,0
25 μ M	5,6	4,0	4,2	-1,8	3,0	3,3
50 μ M	4,8	7,6	8,0	-6,6	3,5	6,8
100 μ M	10,8	-4,4	9,0	-6,2	2,3	8,8
200 μ M	9,6	6,4	5,0	-3,4	4,4	5,5

E226L-CD38⁺ (Zytosolische Fraktion)

Fluoreszenzintensität (F)							
Nr.	Zeit [min]	[NGD+]					
		0 μ M	12,5 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	200 μ M
1	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	5	22	-7	3	24
2	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	14	-2	85	26	68
3	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	-11	-4	14	2	-17
4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	30	-2	10	-15	23

Substratumsatz (Δ F/min)						
[NGD+]	1	2	3	4	Mittelw.	Stabw.
0 μ M	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12,5 μ M	1,0	2,8	-2,2	6,0	1,9	3,4
25 μ M	4,4	-0,4	-0,8	-0,4	0,7	2,5
50 μ M	-1,4	17,0	2,8	2,0	5,1	8,1
100 μ M	0,6	5,2	0,4	-3,0	0,8	3,4
200 μ M	4,8	13,6	-3,8	4,6	4,8	7,1

mock (Membranfraktion)

Fluoreszenzintensität (F)							
Nr.	Zeit [min]	[NGD+]					
		0 μ M	12,5 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	200 μ M
1	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	-40	-33	-40	-38	-58
2	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	-26	-12	-5	-21	-16
3	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	-10	37	-5	20	27
4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	20	8	5	-24	13

Substratumsatz (Δ F/min)						
[NGD+]	1	2	3	4	Mittelw.	Stabw.
0 μ M	0	0	0	0	0,0	0,0
12,5 μ M	-4,2	-6	0	6,8	-0,9	5,7
25 μ M	-7,4	-1,6	4,6	7	0,7	6,5
50 μ M	-4,6	-6,4	10,6	4,2	1,0	7,9
100 μ M	-9,4	-3,6	6,6	0	-1,6	6,7
200 μ M	-5,4	-4,4	7,6	4,4	0,6	6,4

mock (Zytosolische Fraktion)

Fluoreszenzintensität (F)							
Nr.	Zeit [min]	[NGD+]					
		0 μ M	12,5 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	200 μ M
1	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	-40	-33	-40	-38	-58
2	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	-26	-12	-5	-21	-16
3	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	-10	37	-5	20	27
4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	20	8	5	-24	13

Substratumsatz (Δ F/min)						
[NGD+]	1	2	3	4	Mittelw.	Stabw.
0 μ M	0	0	0	0	0,0	0,0
12,5 μ M	-8	-5,2	-2	4	-2,8	5,2
25 μ M	-6,6	-2,4	7,4	1,6	0,0	6,0
50 μ M	-8	-1	-1	1	-2,3	3,9
100 μ M	-7,6	-4,2	4	-4,8	-3,2	5,0
200 μ M	-11,6	-3,2	5,4	2,6	-1,7	7,5

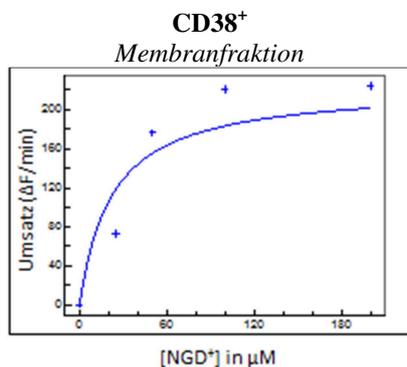
wt (Membranfraktion)							
Fluoreszenzintensität (F)							
		[NGD ⁺]					
Nr.	Zeit [min]	0 μ M	12,5 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	200 μ M
1	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	-30	-20	-26	-20	-36
2	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	51	17	44	39	20
3	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	38	14	0	47	15
4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	10	29	4	20	-8

wt (Zytosolische Fraktion)							
Fluoreszenzintensität (F)							
		[NGD ⁺]					
Nr.	Zeit [min]	0 μ M	12,5 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	200 μ M
1	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	12	-16	-28	-20	-8
2	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	-16	-2	29	10	-11
3	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	13	-16	-6	24	21
4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	-9	-10	9	11	10

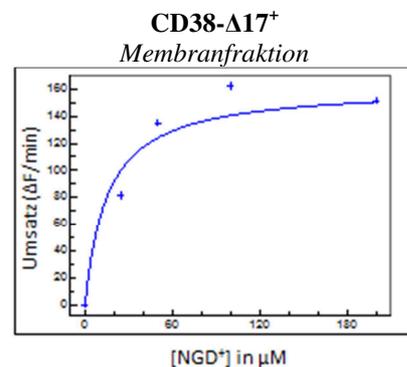
Substratumsatz (ΔF /min)						
[NGD ⁺]	1	2	3	4	Mittelw.	Stabw.
0 μ M	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12,5 μ M	-6,0	10,2	7,6	2,0	3,5	7,2
25 μ M	-4,0	3,4	2,8	5,8	2,0	4,2
50 μ M	-5,2	8,8	0,0	0,8	1,1	5,8
100 μ M	-4,0	7,8	9,4	4,0	4,3	6,0
200 μ M	-7,2	4,0	3,0	-1,6	-0,5	5,1

Substratumsatz (ΔF /min)						
[NGD ⁺]	1	2	3	4	Mittelw.	Stabw.
0 μ M	0	0	0	0	0,0	0,0
12,5 μ M	2,4	-3,2	2,6	-1,8	0,0	2,9
25 μ M	-3,2	-0,4	-3,2	-2	-2,2	1,3
50 μ M	-5,6	5,8	-1,2	1,8	0,2	4,8
100 μ M	-4	2	4,8	2,2	1,3	3,7
200 μ M	-1,6	-2,2	4,2	2	0,6	3,0

Kalkulation der enzymkinetischen Parameter



Parameter
 K_m : 21,9
 V_{max} : 223,8



Parameter
 K_m : 15,2
 V_{max} : 161,9

Abbildung 42: Für die Kalkulation der enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} der ADP-Ribosylzyklasereaktion in den Membranfraktionen der Zellhomogenate von CD38- und Δ 17-CD38-transduzierten MSCs wurden in einem Diagramm die Umsatzraten (ΔF /min) bei den entsprechenden NGD⁺-Konzentrationen aufgetragen (Michaelis-Menten-Diagramm). Anschließend wurde eine Kurvenanpassung (Fit) durch die Datenpunkte gelegt. Nicht berücksichtigt wurden die Datenpunkte bei 12,5 μ M NGD⁺.

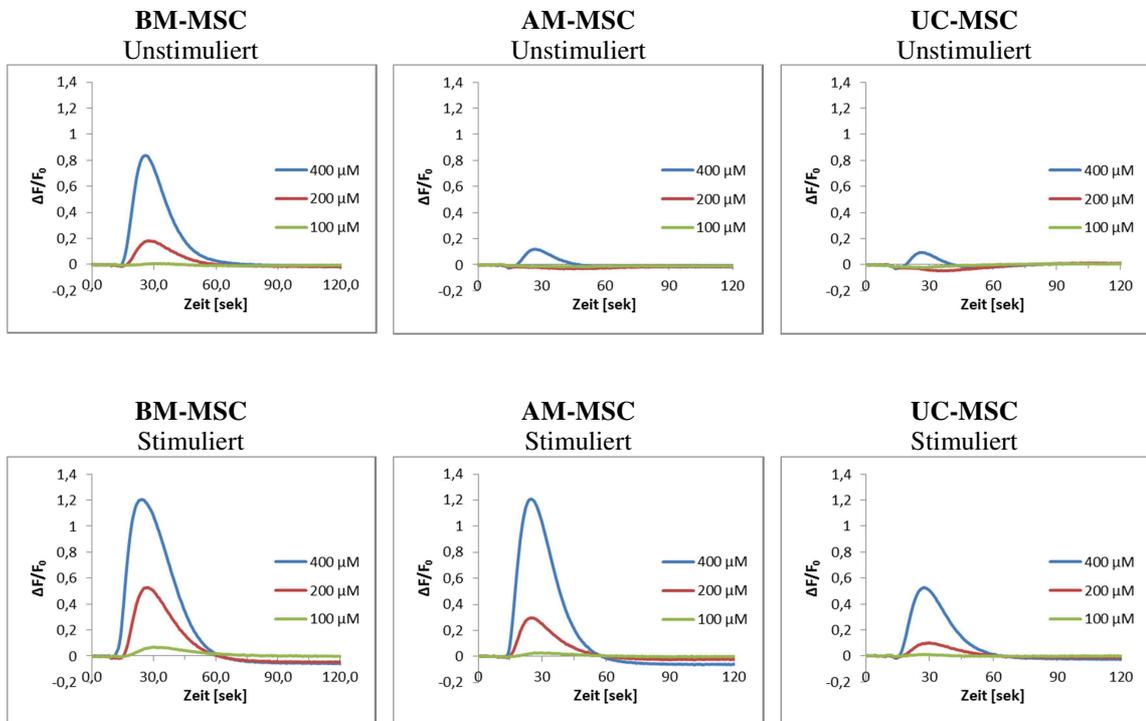
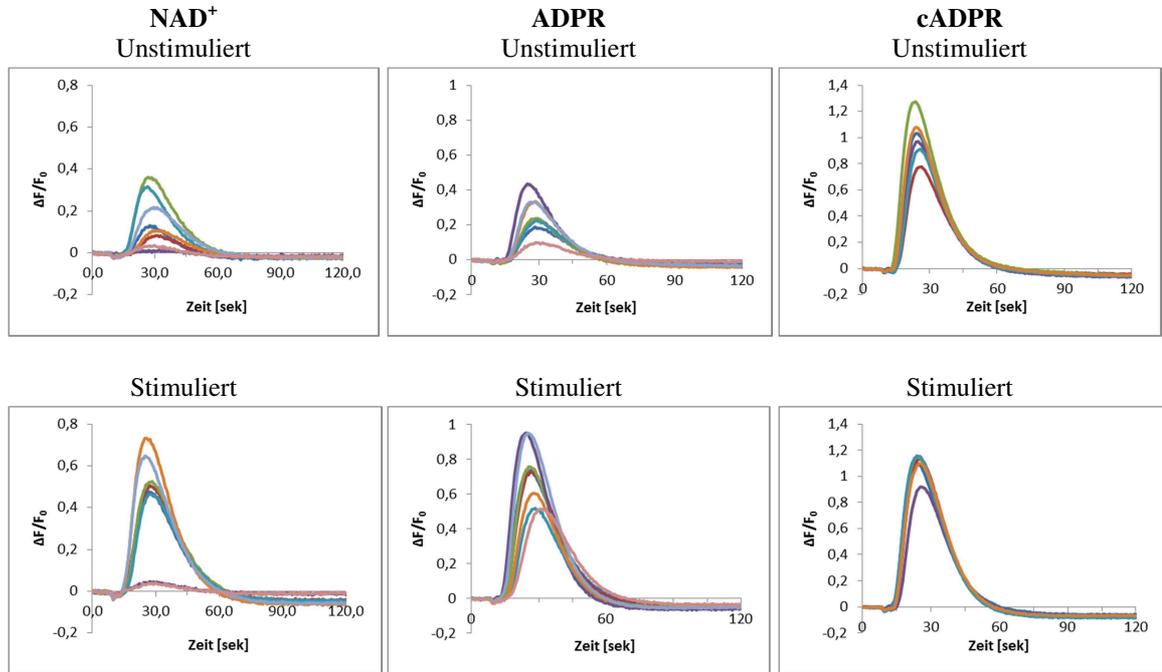
8.8 Ca^{2+} -Flux-TestNAD⁺-Titration

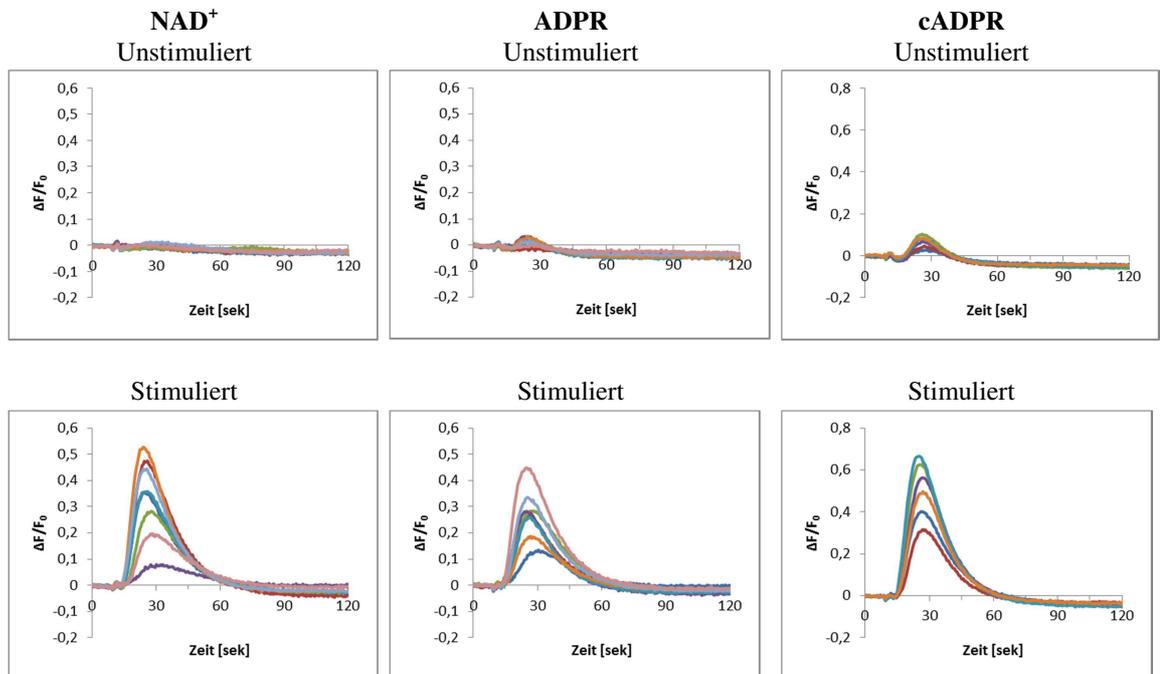
Abbildung 43: Um die geeignete Konzentration zum differenzierten Auslösen eines Ca^{2+} -Einstroms in verschiedenen MSC-Typen sowohl im unstimulierten als auch stimulierten Zustand zu ermitteln, wurde eine NAD⁺-Titration durchgeführt. Dabei wurde NAD⁺ in Konzentrationen von 0 μM (PBS), 100 μM , 200 μM und 400 μM zu den Zellen gegeben. In den Diagrammen ist jeweils die Änderung des Fluoreszenzsignals (F) im Verhältnis zum Ausgangssignal (F_0) über der Zeit aufgetragen. Von den Kurven wurde das durch PBS ausgelöste Hintergrundsignal abgezogen. Die Kurven setzen sich jeweils aus Achtfachbestimmungen zusammen. Final wurde eine Konzentration von 200 μM NAD⁺ für weitere Ca^{2+} -Flux-Experimente ausgewählt.

Ca²⁺-Einstrom nach Zugabe verschiedener Nukleotide

BM-MSK



AM-MSK



UC-MSC

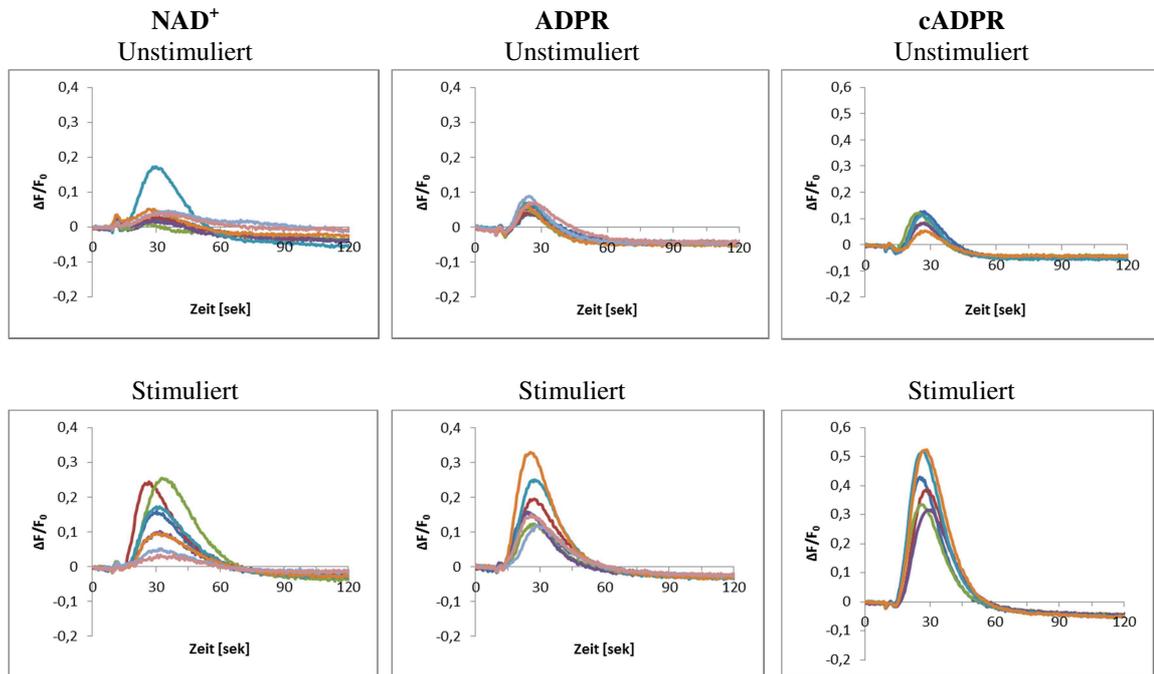


Abbildung 44 (inkl. vorherige Seite): Ca^{2+} -Flux in verschiedenen MSC-Typen sowohl im unstimulierten als auch stimulierten Zustand nach Zugabe von NAD^+ , ADPR und cADPR: In den Diagrammen ist jeweils die Änderung des Fluoreszenzsignals (F) im Verhältnis zum Ausgangssignal (F_0) über der Zeit aufgetragen. Dabei zeigen diese jeweils die einzelnen Kurven aus den Mehrfachbestimmungen jeder Probe. NAD^+ und ADPR wurden in Konzentrationen von jeweils 200 μM hinzugegeben und Achtfachbestimmungen durchgeführt. cADPR wurde in einer Konzentration von 400 μM eingesetzt und Sechsfachbestimmungen durchgeführt.

Quantifizierung des Ca²⁺-Einstroms

Tabelle 30: Die Quantifizierung des Ca²⁺-Einstroms nach jeweiliger Zugabe von NAD⁺, ADPR und cADPR in jeweils unstimulierten und stimulierten MSCs aus den verschiedenen Geweben erfolgte durch Berechnung der Fläche unter den Kurven (XLfit: Spline-Interpolation). Datenpunkte, die als Ausreißer gewertet wurden, sind rot markiert.

NAD⁺

	BM-MSC		AM-MSC		UC-MSC	
	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert
1	0,75	-0,23	2,16	-0,26	2,36	0,05
2	9,45	1,49	7,39	-0,78	3,48	0,34
3	10,79	1,00	9,88	-0,44	5,27	0,30
4	11,25	7,32	6,35	-0,61	6,25	-0,31
5	9,66	5,54	7,91	-0,55	4,06	3,38
6	13,79	1,76	10,46	-0,58	2,31	0,90
7	12,76	4,57	9,20	-0,03	1,18	1,32
8	0,47	-0,07	4,86	-0,41	0,76	1,07
Mittelw.	11,28	3,61	7,28	-0,46	3,21	0,52
Stabw	1,72	2,57	2,78	0,26	1,93	0,59

ADPR

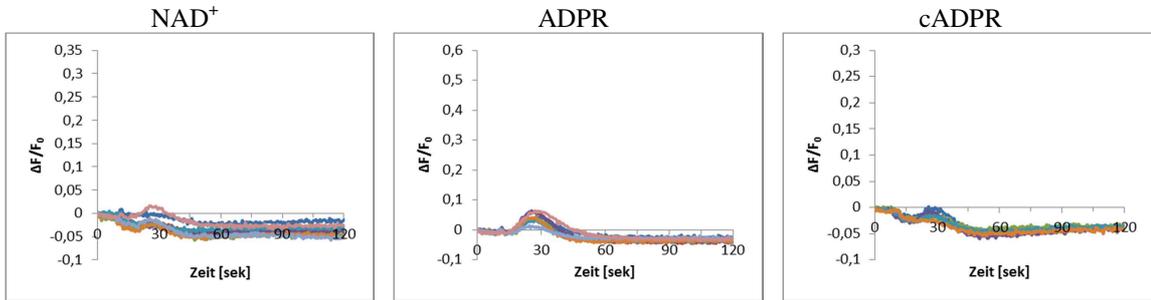
	BM-MSC		AM-MSC		UC-MSC	
	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert
1	16,08	4,23	3,33	-0,68	3,29	0,02
2	15,50	4,88	5,73	-1,16	3,98	-0,22
3	14,78	4,61	6,71	-0,91	2,31	-0,31
4	17,97	8,32	5,57	-0,66	2,70	0,03
5	10,42	4,61	5,03	-0,95	5,08	0,21
6	12,16	6,45	4,18	-0,64	6,41	-0,26
7	19,21	6,78	7,17	-0,70	2,48	0,47
8	11,84	2,25	9,91	-0,67	3,15	0,76
Mittelw.	14,75	5,27	5,95	-0,80	3,68	0,09
Stabw	3,08	1,86	2,03	0,19	1,42	0,38

cADPR

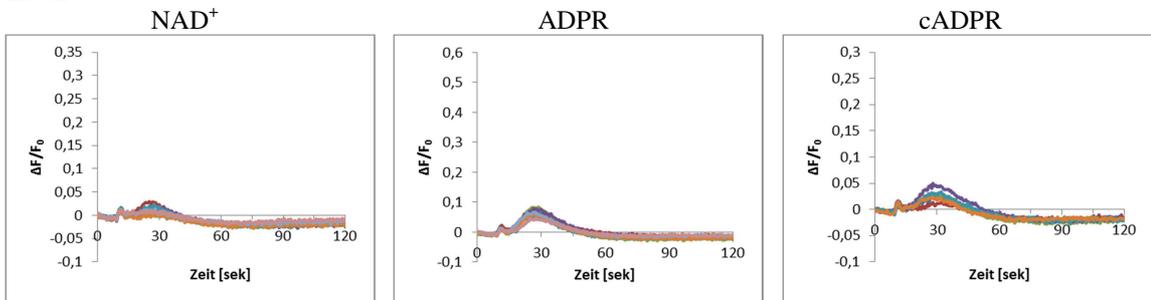
	BM-MSC		AM-MSC		UC-MSC	
	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert	stimuliert	unstimuliert
1						
2	21,99	19,93	8,52	-0,23	7,22	1,10
3	21,95	15,47	6,26	-0,32	7,00	0,10
4	22,16	24,58	12,43	0,62	5,84	0,71
5	17,92	18,20	11,38	0,01	6,08	0,24
6	22,61	17,38	13,04	0,46	9,20	0,54
7	21,93	20,57	9,99	0,43	9,76	-0,13
8						
Mittelw.	21,43	19,36	10,27	0,16	7,52	0,43
Stabw	1,74	3,14	2,56	0,40	1,62	0,45

CD38-transgene UC-MSCs

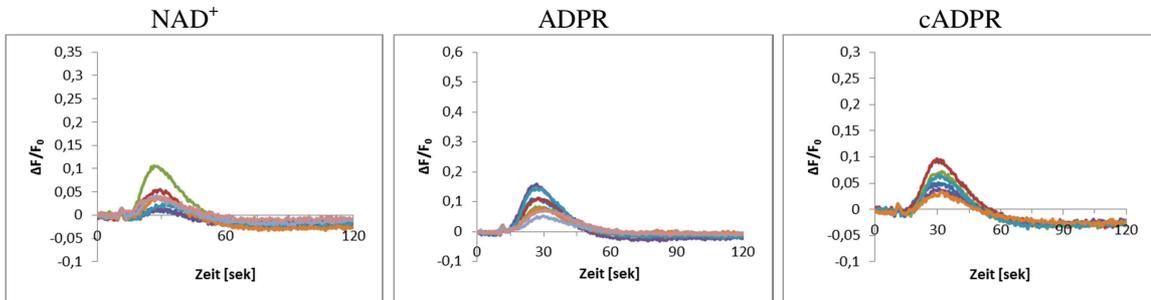
wt



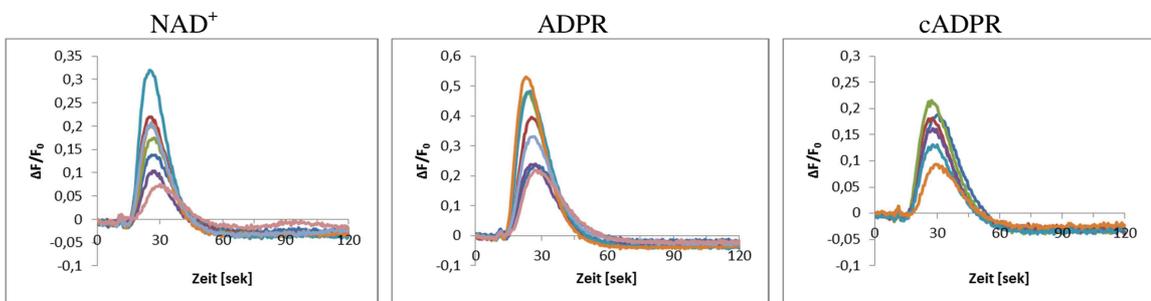
mock



CD38-E226L⁺



CD38⁺



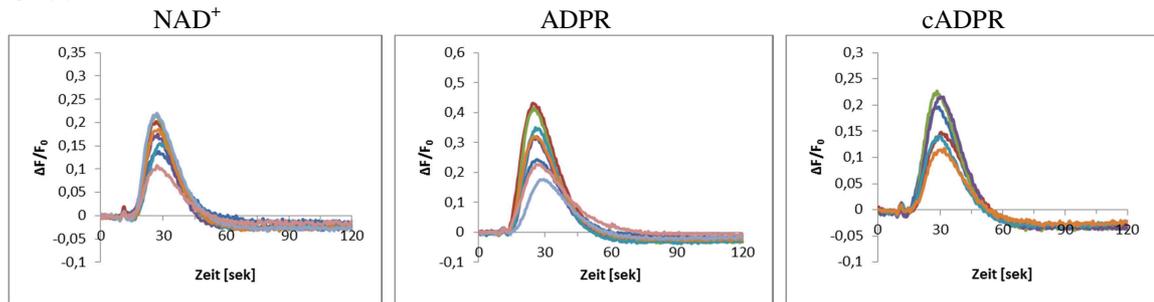
CD38- Δ 17⁺

Abbildung 45 (inkl. vorherige Seite): Ca^{2+} -Flux in transgenen UC-MSCs nach jeweiliger Zugabe von NAD^+ , ADPR und cADPR: In den Diagrammen ist jeweils die Änderung des Fluoreszenzsignals (F) im Verhältnis zum Ausgangssignal (F_0) über der Zeit aufgetragen. Dabei zeigen diese jeweils die einzelnen Kurven aus den Mehrfachbestimmungen jeder Probe. Alle drei Nukleotide wurden in Konzentrationen von jeweils 200 μM hinzugegeben. Bei NAD^+ und ADPR wurden Achtfachbestimmungen, im Falle von cADPR Sechsfachbestimmungen durchgeführt. Die Quantifizierung der Ca^{2+} -Flux-Intensität erfolgte durch Berechnung der Signalthöhen, normiert auf das Signal in CD38^+ -UC-MSCs (100 %).

Herkunft der einströmenden Ca^{2+} -Ionen

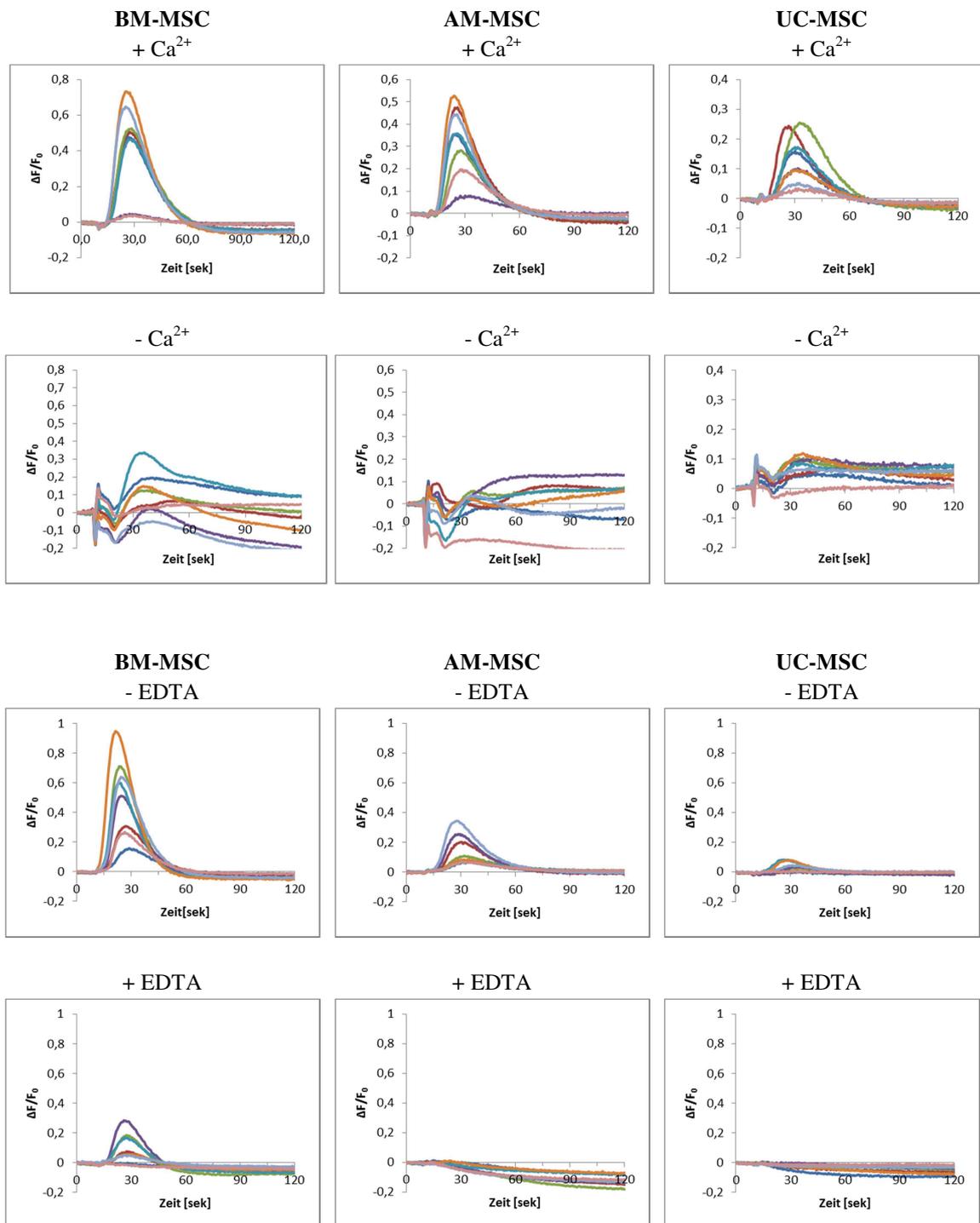


Abbildung 46: Ca^{2+} -Flux-Tests in stimulierten BM-MSCs unter Verwendung von $200 \mu\text{M}$ NAD^+ . In einem ersten Ansatz wurde der Test in einem Ca^{2+} -haltigen im Vergleich mit einem Ca^{2+} -freien Puffer durchgeführt. Im zweiten Ansatz wurde durch Verwendung von $2 \mu\text{M}$ EDTA extrazelluläres Ca^{2+} abgefangen. Gezeigt sind die einzelnen Kurven der Achtfachbestimmungen.

8.9 Migrationstest

Tabelle 31: Analyse der Rolle von CD38 und des Einflusses eines NAD⁺- bzw. ADPR-induzierten Ca²⁺-Einstroms auf das Migrationsverhalten von MSCs unter Verwendung so genannter CIM-Platten (*engl.* Cell Invasion and Migration plate). In einem Ansatz wurde NAD⁺, in einem weiteren Ansatz ADPR auf die in die jeweils oberen Kammern ausgesäten Zellen geben. Beide Substanzen wurden in Konzentrationen von 20 µM und 200 µM eingesetzt. Als Referenz dienten Zellen zu denen lediglich Puffer gegeben wurde (0 µM).

ADPR

Zeit [Std]	CD38						Δ17-CD38					
	Impedanz			Stabw.			Impedanz			Stabw.		
	200 µM	20 µM	0 µM	200 µM	20 µM	0 µM	200 µM	20 µM	0 µM	200 µM	20 µM	0 µM
0,0	0,000	0,000	0,000	0,015	0,006	0,009	0,000	0,000	0,000	0,007	0,006	0,009
0,5	0,134	0,151	0,213	0,027	0,013	0,019	0,132	0,145	0,216	0,021	0,013	0,033
1,0	0,363	0,390	0,593	0,071	0,023	0,040	0,366	0,409	0,627	0,064	0,033	0,093
1,5	0,627	0,663	1,042	0,133	0,054	0,059	0,638	0,706	1,089	0,104	0,057	0,168
2,0	0,921	0,974	1,593	0,206	0,082	0,082	0,940	1,029	1,635	0,148	0,087	0,252
2,5	1,256	1,330	2,216	0,283	0,121	0,115	1,282	1,383	2,251	0,198	0,116	0,345
3,0	1,616	1,709	2,854	0,361	0,161	0,159	1,648	1,768	2,865	0,237	0,157	0,404
3,5	1,979	2,088	3,408	0,438	0,198	0,205	2,016	2,161	3,381	0,257	0,192	0,436
4,0	2,311	2,445	3,808	0,494	0,229	0,222	2,377	2,535	3,750	0,257	0,237	0,438
4,5	2,607	2,790	4,073	0,527	0,265	0,216	2,694	2,883	3,970	0,239	0,288	0,405
5,0	2,844	3,083	4,201	0,518	0,280	0,198	2,951	3,169	4,067	0,209	0,299	0,356
5,5	3,015	3,294	4,221	0,494	0,277	0,186	3,141	3,371	4,079	0,174	0,296	0,309
6,0	3,137	3,449	4,191	0,463	0,266	0,165	3,249	3,509	4,036	0,146	0,280	0,283
6,5	3,206	3,534	4,118	0,432	0,245	0,150	3,288	3,562	3,945	0,132	0,243	0,255
7,0	3,230	3,560	4,026	0,401	0,216	0,133	3,285	3,573	3,864	0,127	0,204	0,237
7,5	3,226	3,567	3,937	0,349	0,193	0,122	3,247	3,543	3,780	0,107	0,155	0,218
8,0	3,202	3,527	3,842	0,304	0,161	0,128	3,179	3,470	3,670	0,092	0,102	0,201
8,5	3,156	3,459	3,752	0,275	0,135	0,112	3,108	3,388	3,572	0,081	0,083	0,203
9,0	3,110	3,385	3,657	0,247	0,145	0,091	3,027	3,289	3,463	0,081	0,059	0,201
9,5	3,055	3,315	3,566	0,208	0,136	0,089	2,942	3,184	3,378	0,072	0,050	0,190
10,0	2,991	3,235	3,493	0,191	0,125	0,068	2,880	3,098	3,285	0,057	0,033	0,177
Zeit [Std]	mock-Kontrolle						E226L-CD38					
	Impedanz			Stabw.			Impedanz			Stabw.		
	200 µM	20 µM	0 µM	200 µM	20 µM	0 µM	200 µM	20 µM	0 µM	200 µM	20 µM	0 µM
0,0	0,000	0,000	0,000	0,015	0,009	0,019	0,000	0,000	0,000	0,014	0,006	0,008
0,5	0,145	0,135	0,189	0,025	0,015	0,031	0,155	0,145	0,190	0,030	0,007	0,019
1,0	0,452	0,414	0,564	0,052	0,038	0,062	0,447	0,418	0,551	0,078	0,021	0,063
1,5	0,785	0,724	0,972	0,071	0,073	0,100	0,785	0,727	0,957	0,129	0,041	0,113
2,0	1,117	1,039	1,427	0,089	0,121	0,136	1,140	1,047	1,412	0,183	0,060	0,157
2,5	1,451	1,374	1,928	0,102	0,185	0,162	1,523	1,404	1,933	0,236	0,093	0,201
3,0	1,795	1,721	2,435	0,111	0,248	0,183	1,923	1,786	2,470	0,274	0,127	0,230
3,5	2,131	2,063	2,868	0,115	0,306	0,218	2,317	2,174	2,943	0,290	0,163	0,232
4,0	2,440	2,388	3,198	0,115	0,351	0,232	2,675	2,537	3,307	0,303	0,201	0,230
4,5	2,712	2,678	3,373	0,129	0,379	0,230	2,961	2,852	3,528	0,290	0,219	0,210
5,0	2,925	2,908	3,434	0,139	0,378	0,203	3,158	3,096	3,614	0,262	0,223	0,174
5,5	3,069	3,073	3,405	0,145	0,369	0,167	3,261	3,245	3,618	0,219	0,214	0,142
6,0	3,136	3,169	3,337	0,144	0,340	0,160	3,304	3,330	3,568	0,183	0,190	0,123
6,5	3,154	3,204	3,258	0,142	0,306	0,132	3,280	3,360	3,491	0,133	0,160	0,113
7,0	3,127	3,190	3,178	0,121	0,274	0,112	3,233	3,334	3,411	0,097	0,146	0,109
7,5	3,064	3,129	3,094	0,106	0,242	0,093	3,172	3,274	3,326	0,072	0,109	0,085
8,0	2,982	3,046	3,016	0,095	0,196	0,078	3,088	3,216	3,247	0,055	0,087	0,084
8,5	2,898	2,959	2,943	0,085	0,172	0,069	3,018	3,148	3,176	0,044	0,083	0,073
9,0	2,821	2,879	2,886	0,082	0,154	0,081	2,948	3,069	3,098	0,040	0,078	0,066
9,5	2,745	2,800	2,823	0,082	0,134	0,065	2,883	2,998	3,029	0,027	0,071	0,058
10,0	2,688	2,731	2,760	0,074	0,122	0,065	2,830	2,927	2,971	0,035	0,054	0,069

NAD⁺

Zeit [Std]	CD38						Δ17-CD38					
	Impedanz			Stabw.			Impedanz			Stabw.		
	200 μM	20 μM	0 μM	200 μM	20 μM	0 μM	200 μM	20 μM	0 μM	200 μM	20 μM	0 μM
0,0	0,000	0,000	0,000	0,041	0,011	0,018	0,000	0,000	0,000	0,011	0,017	0,013
0,5	0,100	0,104	0,129	0,048	0,014	0,025	0,068	0,064	0,086	0,016	0,021	0,017
1,0	0,211	0,224	0,294	0,055	0,021	0,038	0,139	0,142	0,190	0,024	0,028	0,023
1,5	0,316	0,339	0,467	0,064	0,032	0,058	0,205	0,212	0,299	0,031	0,034	0,032
2,0	0,427	0,463	0,671	0,074	0,043	0,085	0,272	0,282	0,418	0,040	0,037	0,042
2,5	0,551	0,599	0,932	0,094	0,056	0,118	0,347	0,356	0,564	0,050	0,040	0,056
3,0	0,695	0,757	1,255	0,114	0,073	0,155	0,432	0,442	0,741	0,059	0,046	0,076
3,5	0,869	0,941	1,646	0,138	0,090	0,194	0,532	0,545	0,958	0,073	0,055	0,102
4,0	1,074	1,154	2,069	0,167	0,109	0,236	0,651	0,667	1,202	0,089	0,065	0,132
4,5	1,307	1,390	2,479	0,193	0,130	0,262	0,794	0,809	1,463	0,108	0,077	0,158
5,0	1,563	1,637	2,824	0,215	0,152	0,270	0,963	0,972	1,713	0,125	0,093	0,180
5,5	1,831	1,884	3,071	0,234	0,171	0,264	1,147	1,147	1,924	0,149	0,110	0,198
6,0	2,094	2,119	3,222	0,250	0,187	0,255	1,342	1,327	2,098	0,165	0,127	0,218
6,5	2,330	2,326	3,303	0,258	0,195	0,229	1,539	1,502	2,223	0,182	0,138	0,235
7,0	2,537	2,496	3,341	0,268	0,192	0,216	1,730	1,668	2,303	0,194	0,142	0,223
7,5	2,676	2,613	3,317	0,269	0,188	0,200	1,892	1,813	2,359	0,194	0,137	0,221
8,0	2,777	2,676	3,273	0,273	0,182	0,179	2,024	1,930	2,390	0,199	0,128	0,219
8,5	2,827	2,691	3,198	0,255	0,163	0,152	2,121	2,020	2,393	0,198	0,132	0,213
9,0	2,829	2,671	3,145	0,242	0,163	0,135	2,182	2,079	2,385	0,192	0,126	0,204
9,5	2,812	2,639	3,065	0,222	0,146	0,125	2,212	2,108	2,372	0,177	0,113	0,192
10,0	2,779	2,594	3,003	0,192	0,126	0,113	2,228	2,114	2,353	0,169	0,114	0,189
10,5	2,745	2,542	2,940	0,181	0,111	0,110	2,230	2,118	2,328	0,148	0,109	0,182
11,0	2,704	2,481	2,880	0,187	0,097	0,106	2,218	2,107	2,310	0,128	0,107	0,175
11,5	2,659	2,445	2,828	0,192	0,086	0,094	2,195	2,089	2,287	0,119	0,116	0,175
12,0	2,626	2,408	2,780	0,192	0,088	0,097	2,187	2,071	2,256	0,115	0,129	0,162
Zeit [Std]	mock-Kontrolle						E226L-CD38					
	Impedanz			Stabw.			Impedanz			Stabw.		
	200 μM	20 μM	0 μM	200 μM	20 μM	0 μM	200 μM	20 μM	0 μM	200 μM	20 μM	0 μM
0,0	0,000	0,000	0,000	0,034	0,016	0,248	0,000	0,000	0,000	0,048	0,010	0,265
0,5	0,107	0,112	0,137	0,038	0,018	0,247	0,088	0,082	0,097	0,055	0,019	0,269
1,0	0,225	0,245	0,295	0,045	0,025	0,253	0,180	0,180	0,210	0,065	0,028	0,277
1,5	0,336	0,370	0,456	0,056	0,032	0,261	0,261	0,272	0,326	0,079	0,035	0,284
2,0	0,448	0,496	0,641	0,067	0,037	0,270	0,338	0,360	0,452	0,095	0,040	0,294
2,5	0,569	0,633	0,866	0,081	0,042	0,286	0,419	0,455	0,600	0,115	0,050	0,307
3,0	0,706	0,790	1,135	0,093	0,048	0,302	0,510	0,562	0,786	0,135	0,055	0,322
3,5	0,868	0,969	1,451	0,107	0,060	0,324	0,616	0,686	1,015	0,157	0,062	0,340
4,0	1,055	1,168	1,789	0,118	0,079	0,347	0,744	0,830	1,288	0,179	0,070	0,357
4,5	1,267	1,394	2,132	0,129	0,093	0,366	0,892	0,991	1,583	0,203	0,074	0,371
5,0	1,497	1,629	2,429	0,146	0,107	0,386	1,064	1,167	1,878	0,228	0,078	0,381
5,5	1,733	1,866	2,641	0,163	0,118	0,393	1,254	1,365	2,151	0,244	0,087	0,383
6,0	1,964	2,080	2,784	0,183	0,123	0,394	1,465	1,576	2,364	0,266	0,098	0,390
6,5	2,175	2,270	2,867	0,193	0,125	0,387	1,680	1,789	2,530	0,274	0,105	0,400
7,0	2,361	2,428	2,894	0,193	0,127	0,366	1,903	1,991	2,637	0,290	0,115	0,406
7,5	2,511	2,540	2,892	0,202	0,141	0,359	2,099	2,170	2,694	0,301	0,109	0,400
8,0	2,618	2,613	2,860	0,203	0,135	0,348	2,264	2,306	2,708	0,295	0,117	0,396
8,5	2,687	2,645	2,822	0,182	0,147	0,331	2,390	2,404	2,701	0,286	0,107	0,390
9,0	2,726	2,660	2,783	0,164	0,144	0,318	2,466	2,479	2,685	0,279	0,107	0,385
9,5	2,728	2,635	2,737	0,142	0,137	0,309	2,522	2,505	2,652	0,265	0,105	0,378
10,0	2,711	2,618	2,695	0,129	0,130	0,290	2,542	2,512	2,617	0,249	0,103	0,366
10,5	2,684	2,592	2,643	0,130	0,112	0,292	2,532	2,500	2,576	0,236	0,099	0,366
11,0	2,660	2,564	2,610	0,134	0,109	0,291	2,513	2,472	2,537	0,231	0,101	0,360
11,5	2,632	2,531	2,574	0,131	0,097	0,281	2,494	2,441	2,505	0,234	0,105	0,351
12,0	2,606	2,500	2,544	0,129	0,090	0,280	2,468	2,405	2,467	0,233	0,100	0,347

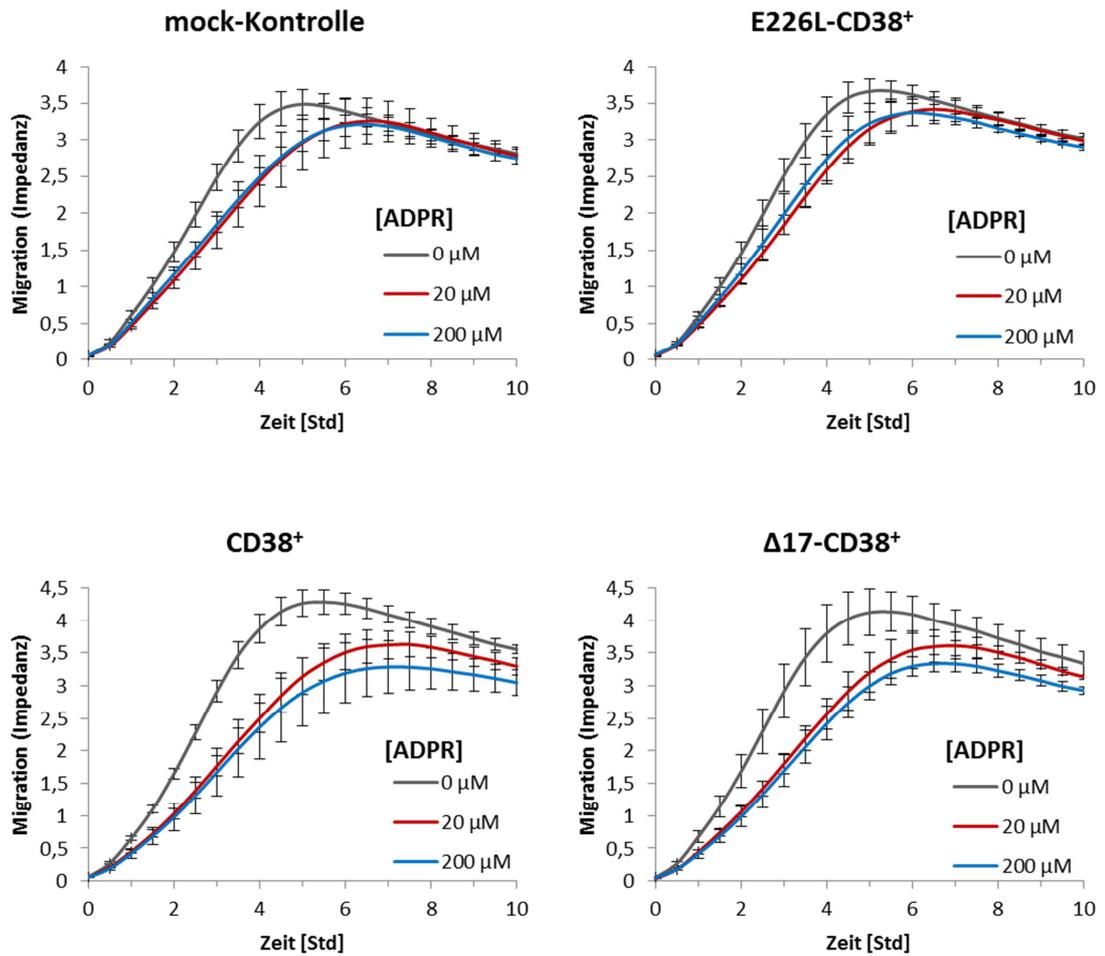


Abbildung 47: Migrationstest im Zwei-Kammern-System zur Analyse der Rolle von CD38 und des Einflusses von Nukleotiden bei der Migration von MSCs: Einfluss von jeweils 200 μM (blaue Kurven), 20 μM (rote Kurven) und 0 μM (graue Kurven) ADPR auf die Migrationsgeschwindigkeit von transgenen UC-MSCs (CD38⁺, Δ17-CD38⁺, E226L-CD38⁺, mock-Kontrolle) über einen Zeitraum von 10 Stunden. Das an den Goldelektroden auf den Unterseiten der PET-Membranen gemessene Impedanzsignal ist dabei proportional zur Anzahl migrierter Zellen.

8.10 Vergleich der CD38-Expression in Zellen unterschiedlicher Gewebe

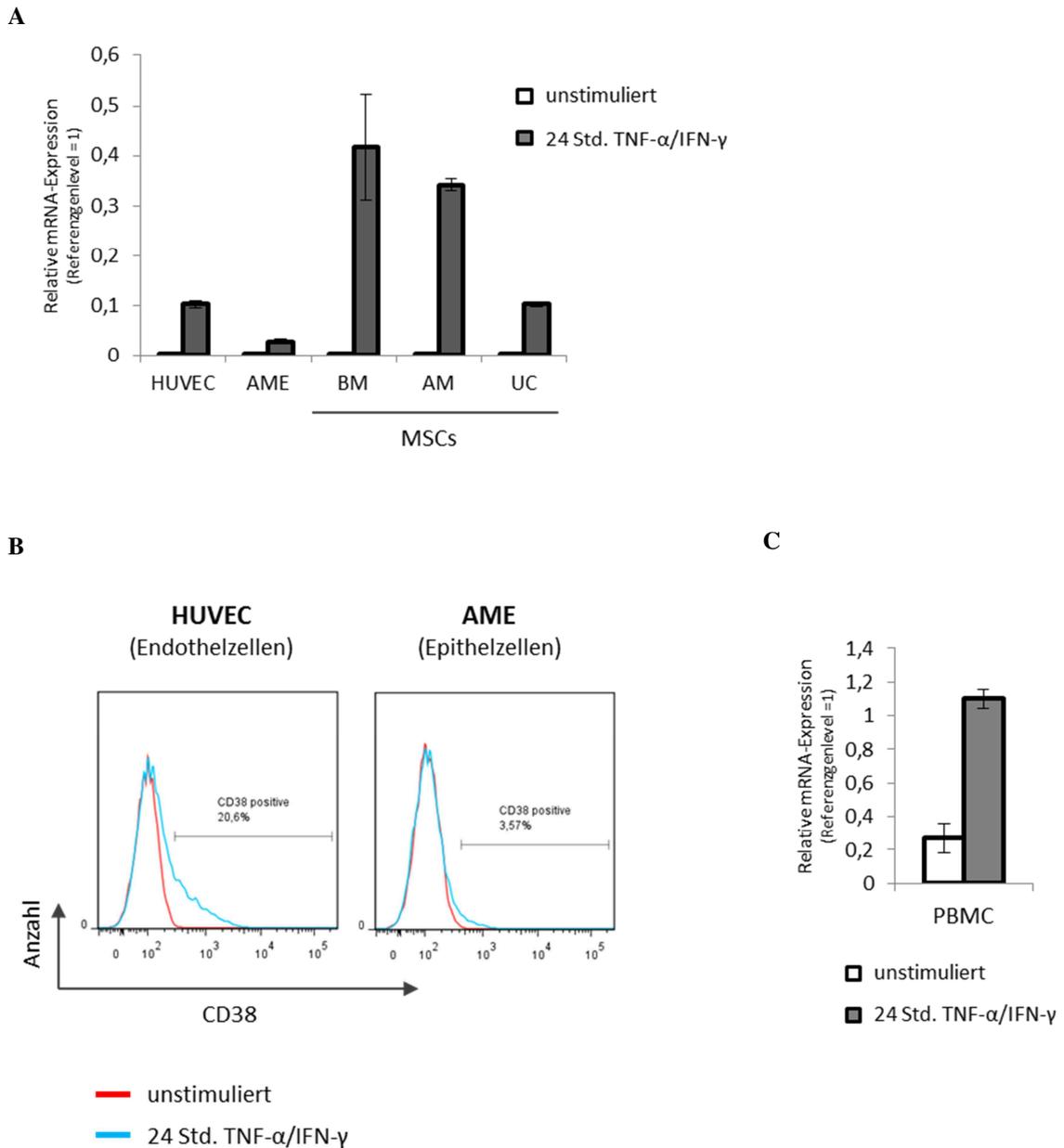


Abbildung 48: CD38-Expression in Zellen unterschiedlicher Gewebe: A) CD38-mRNA-Expression in HUVECs (Endothelzellen), AMEs (Epithelzellen) und BM-, AM- und UC-MSCs in unstimulierten und für 24 Stunden mit TNF- α und IFN- γ stimulierten Zellen. Je Gewebetyp wurde ein Spender analysiert. B) CD38-Proteinexpression in HUVECs und AMEs in unstimulierten und für 24 Stunden stimulierten Zellen eines Spenders. C) CD38-mRNA-Expression in PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) von stimulierten und stimulierten Zellen eines Spenders.

8.11 Einfluss der Stimulation auf Morphologie und Migration von MSCs

Durchflusszytometrie

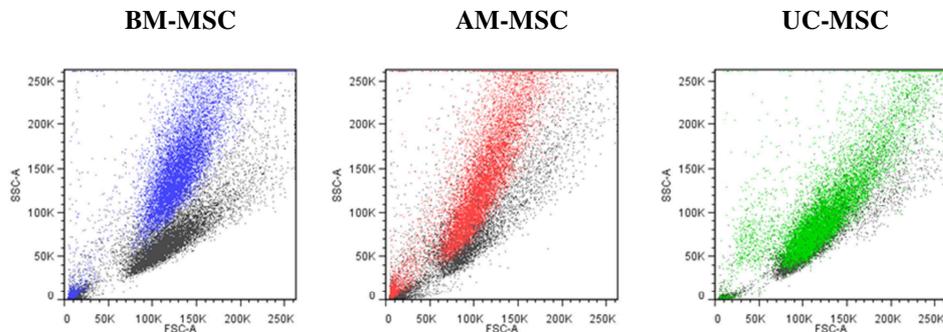


Abbildung 49: Durchflusszytometrische Analysen zeigten, dass die Stimulation erheblichen Einfluss auf das morphologische Erscheinungsbild von MSCs nimmt. Insbesondere bei BM- und AM-MSCs kommt es zu einer deutlichen Verschiebung des Forward-Sideward-Scatter-Signals nach Stimulation (Färbungen). Somit fällt dieser Effekt in diesen Zellen stärker aus als in UC-MSCs. Die dunkelgrau gefärbten Punkte repräsentieren die jeweils unstimulierten Zellen.

Microarray

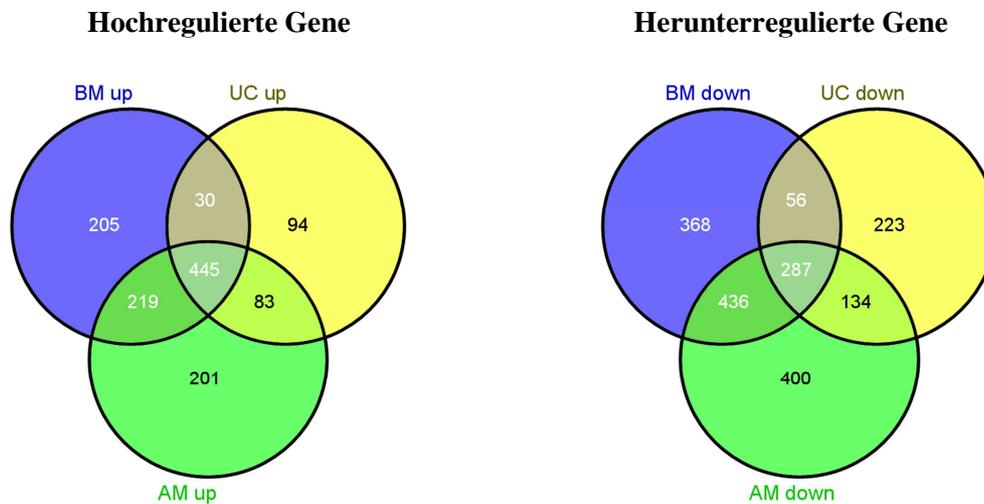


Abbildung 50: Übertragung von Microarray-Daten in Mengendiagramme nach Venn zum Vergleich der Änderungen in der Genexpression in BM-, AM- und UC-MSCs nach 48 stündiger Stimulation mit 20 ng/ml TNF- α und IFN- γ (Oliveros, J.C., 2007, VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>). Die Diagramme geben die Anzahl an hochregulierten Genen (links) und herunterregulierten Genen (rechts) in den Zelltypen mit den entsprechenden Überschneidungen an. Im Vergleich zu UC-MSCs (652 Gene hoch, 700 runter) wurden in AM-MSCs (948 hoch, 1257 runter) und BM-MSCs (899 hoch, 1147 runter) deutlich mehr Gene reguliert. Sie zeigten somit eine stärkere Reaktion auf die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen als UC-MSCs.

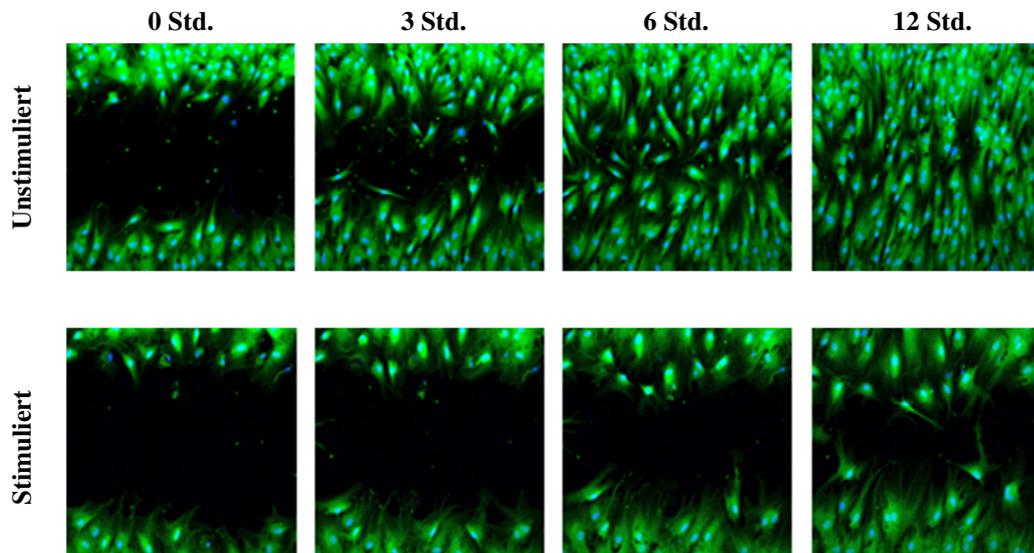
2D-Invasiostest

Abbildung 51: Analyse des Einflusses der Stimulation auf die Migrationseigenschaften von MSCs auf Fibronektin in einem 2D-Invasionstest. Unstimulierte und für 48 Stunden stimulierte BM-MSCs wurden mit dem Lebend-Farbstoff CMFDA (CellTracker™Green) und deren Zellkerne mit Hoechst 33342 gefärbt. Das Einwandern der Zellen in den 500 μ M breiten Spalt wurde über einen Zeitraum von 12 Stunden im konfokalen Mikroskop verfolgt. Stimulierte MSCs unterschieden sich in ihrer Morphologie von unstimulierten Zellen und zeigten eine deutlich reduzierte Migrationsgeschwindigkeit. Bei Betrachtung des Bewegungsablaufes zeigten die unstimulierten MSCs die beim Prozess der Zellmigration für gewöhnlich beteiligten Schritte, die in erster Linie die Membranausstülpungen und die Ausbildung neuer Adhäsionspunkte am vorderen Leitsaum sowie ein Auflösen bisheriger Adhäsionspunkte am hinteren Ende der Zelle einschließen. Die auf diese Weise vermittelte asymmetrische Polarisation der Zellen führte zu einer gerichteten Zellbewegung. Obwohl sich auch bei stimulierten Zellen die Bildung von Ausstülpungen am vorderen Saum beobachten ließen, zeigten sie jedoch erhebliche Defizite beim Nachziehen des hinteren Zellendes, was zu einer deutlich verminderten Motilität führte.

Aktin-Zytoskelett- und Focal Adhesion-Färbung

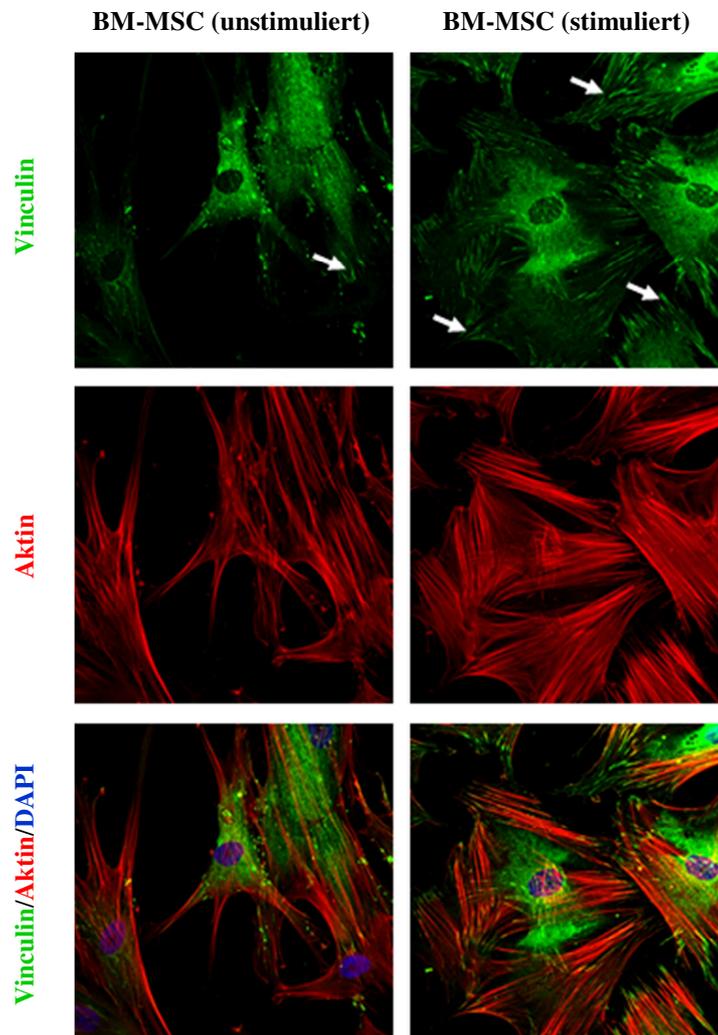


Abbildung 52: Um den Einfluss proinflammatorischer Bedingungen auf Zelladhäsionsmoleküle sowie das Zytoskelett von MSCs zu untersuchen, wurden BM-MSCs über die immunzytochemische Färbung von Vinculin, einem Bestandteil von Focal Adhesions, und von Aktin-Filamenten analysiert. Dazu wurden jeweils unstimulierte und für 48 Stunden stimulierte Zellen auf eine mit Fibronectin beschichtete Oberfläche ausgesät, über Nacht adhären gelassen und anschließend gefärbt. Im Vergleich zu unstimulierten BM-MSCs, die eine weniger starre Aktin-Struktur aufwiesen, führte die Stimulation der Zellen zu einer stark veränderten Organisation des Aktin-Zytoskeletts, die insbesondere durch die Ausbildung so genannter Fibrillenbündel (*engl.* Stress-Fibers) gekennzeichnet ist. Entsprechend der Ausprägung der Vinculin-Expression zeigten stimulierte Zellen darüber hinaus eine deutlich größere Anzahl an Focal Adhesions als unstimulierte Zellen (Pfeile). Die insgesamt statischere Struktur simulierter BM-MSCs deutet daraufhin,

dass durch den Einfluss proinflammatorischer Zytokine sowohl die Zytoskelett-Dynamik als auch der Focal Adhesion-Turn-over reduziert und so potentiell eine stärkere Verankerung der Zellen induziert wird, die in einer verminderten Motilität resultiert.

9 Abkürzungsverzeichnis

A172-Zellen	Humane Glioblastom-Zelllinie A172
A ₂₆₀	Absorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$
AcGFP	Modifiziertes grün fluoreszierendes Protein (GFP)
ADA	Adenosindesaminase
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase (engl.)
ADP	Adenosindiphosphat
ADPR	Adenosin 5'-Diphosphoribose
AKI	Akute Nierenschädigung
AME	Amnionmembran-Epithelzellen
AM-MSCs	MSCs aus der Amnionmembran
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
ART	ADP-Ribosyltransferasen
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BM-MSCs	MSCs aus dem Knochenmark
BSA	Rinderserumalbumin
BST-1	Bone marrow stromal cell antigen-1(engl.)
cADPR	zyklisches Adenosin 5'-Diphosphoribose
CCL	Chemokinliganden der CC-Familie
CCR	Chemokinrezeptoren der CC-Familie
CD	Cluster of Differentiation (engl.)
cDNA	Komplementäre DNA
CFU-F	Colony-forming unit-fibroblast (engl.)
cGDPR	Zyklisches GDP-Ribose
CIM-Platte	Cell Invasion and Migration plate (engl.)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cp	Crossing point (engl.)
CXCL	Chemokinliganden der CXC-Familie
CXCR	Chemokinrezeptoren der CXC-Familie
$\Delta 17$ -CD38	Um die ersten 17 n-terminalen AS verkürztes CD38
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E226L-CD38	CD38 mit dem Aminosäureaustausch E226L
EC ₅₀	Halbmaximale effektive Konzentration
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESC	Embryonale Stammzellen
F	Fluoreszenzintensität
Fab	Antigenbindendes Fragment eines Antikörpers
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (engl.)
FAK	Focal adhesion kinase (engl.)
FKS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Normalbeschleunigung (9,81 m/s ²)
gag	Group-specific antigen (engl.) des Retrovirus
GeoMean	Geometrischer Mittelwert

Glu (E)	Glutamat
GvHD	Graft-versus-Host-Krankheit
HEK293-Zellen	Humane embryonale Nierenzellen
HEV	Hochendotheliale Venolen
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (engl.)
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IFN- γ	Interferon- γ
ILK	Integrin-linked kinase (engl.)
IP3	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
iPS Zellen	Induzierte pluripotente Stammzellen
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
IRI	Ischämischer Reperfusionsschaden
ISCT	Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie
ITGA	Integrin α -Untereinheit
ITGB	Integrin β -untereinheit
IV	Intravenös
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
K_m	Michealiskonstante
LB	Lysogeny broth-Medium
Leu (L)	Leucin
L-Sele	L-Selektin
MSC	Mesenchymale Stromazellen
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1 (engl.)
MCS	Multiple Klonierungsstelle
min	Minute
Mittelw.	Mittelwert
MMP	Matrix-Metalloprotease
mock	Leervektor
mRNA	Messenger RNA (engl.)
MSC	Mesenchymale Stromazellen
NAADP	Nicotinsäureadenindinukleotidphosphat
NAD^+	β -Nicotinamidadenindinukleotid
$NADP^+$	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NGD^+	Nicotinamidguanindinukleotid
NHDF	Normale humane Hautfibroblasten
P	Passage
PBMC	Nikotinamidguanindinukleotid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
P_{CMV}	Cytomegalovirus promotor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül 1
PET	Polyethylenterephthalat
Pol	Polymerasegen des Retrovirus
PSGL-1	P-Selektin Glykoproteinligand 1
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transkription-PCR
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur

SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
RGD-Motiv	Sequenz: Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RyR	Ryanodin-Rezeptor
sek	Sekunde
SFK	Src-family kinases (engl.)
SLeX	Sialyl-Lewis ^X
Stabw.	Standardabweichung
Std / Std.	Stunde
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UE	Untereinheit
UC-MSC	MSCs aus der Nabelschnur
UTR	Untranslatierter Bereich
UV-VIS	Ultraviolettes Licht – sichtbares Licht
VAP-1 (AOC3)	Vaskuläres Adhäsionsprotein 1
VCAM-1	Vasculäres Zelladhäsionsmolekül 1
VLA	Very late antigen (engl.)
V_{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
VSV-G	Glykoprotein G des Vesicular-Stomatitis-Virus
wt	Wildtyp

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Ralf Huss sehr dafür danken, dass er mir das spannende Thema dieser Arbeit zur selbständigen Bearbeitung überlassen hat und mir in zahlreichen Diskussionen beratend zur Seite stand.

Besonderer Dank gebührt Frau Dr. Heike Wegmeyer und Herrn Dr. Markus Neubauer für die hervorragende Betreuung und die kritische Durchsicht der Arbeit.

Ich bedanke mich sehr bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Fässler vom Max-Planck-Institut für Biochemie für die hervorragende Zusammenarbeit und die vielen guten Anregungen sowie kritischen Anmerkungen zu dieser Arbeit. Großen Dank auch seinen Mitarbeitern Moritz Widmaier, Emanuel Rognoni und Hildegard Reiter für die tatkräftige Unterstützung bei der Kultivierung und Charakterisierung der Zellen sowie für die Arbeiten zur Gewinnung der Retroviren.

Dank aussprechen möchte ich auch Herrn Dr. Gerhard Niederfellner und Frau Dr. Rita Mateus Seidl für die Bereitstellung eines Laborarbeitsplatzes in der Onkologie sowie Frau Hedda Herrmuth für die Materialbeschaffung und die hervorragende Atmosphäre im Labor.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich Frau Britta Ostner und Herrn Florian Büddefeld aus der Gruppe von Herrn Dr. Peter M. Hülsmann für die große Unterstützung bei den molekularbiologischen Arbeiten.

Ich bedanke mich sehr bei Herrn Jakob Rosenhauer für die unermüdliche Hilfe bei den mikroskopischen Analysen und Herrn Dr. Andreas Franke für die Durchführung von Microarrays.

Schließlich möchte ich mich bei allen Kollegen der therapeutischen Zellinitiative für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und die großartige Zusammenarbeit bedanken.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und meinen Geschwistern, die mir stets einen festen Rückhalt gaben und mich nach besten Kräften unterstützt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Charakterisierung von Adhäsions- und Migrationsfaktoren auf mesenchymalen Stromazellen unter dem Einfluss proinflammatorischer Bedingungen“ selbständig verfasst, mich außer den angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Kenntnisse, 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 vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde

.....

Ort, Datum

.....

Kornelius Wiechmann

