GMP-konforme Expansion und funktionelle Charakterisierung humaner mesenchymaler Stromazellen

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Philipp Nold
aus Bretten

Gießen 2017

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. Gregor Bein

Gutachter: Prof. Dr. Holger Hackstein

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Dr. hc. Reinhard Schnettler

Tag der Disputation: 27.11.2017

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Stammzellen ... 1

1.2 Mesenchymale Stromazellen ... 1

1.3 Eigenschaften von MSC ... 2

1.4 T-Zellen und deren Funktion im humanen Immunsystem ... 3

1.4.1 Modulation der T-Zell Proliferation durch MSC ... 5

1.5 Stammzelltransplantation und Graft versus Host Disease ... 7

1.6 Klinische Anwendung mesenchymaler Stammzellen (MSC) ... 9

1.6.1 Expansion von MSC im Bioreaktor ... 10

1.7 Ziel der Arbeit ... 12

2 Material 13

2.1 Lösungen und Chemikalien ... 13

2.2 Verbrauchsmaterial ... 14

2.3 Geräte ... 15

2.4 Verwendete Software ... 15

2.5 Zellkultur ... 16

2.5.1 Humanes Plättchenlysat ... 16

2.5.2 GMP-konformes Zellkulturmedium ... 17

2.6 Antikörper ... 17

3 Methoden 18

3.1 Isolierung und Kultivierung von MSC ... 18

3.1.1 Kryokonservierung und Auftauen von MSC ... 18

3.2 Expansion von MSC im Bioreaktor ... 19

3.3 T-Zell Proliferationsassay ... 23

3.3.1 Versuchsdurchführung CFSE Färbung: ... 24

3.3.2 Versuchsdurchführung Antikörper Färbung: ... 24

3.3.3 CD274 Expression auf MSC in Ko-Kultur 24
3.4 Differenzierungen von MSC 25
3.4.1 Adipogene Differenzierung 25
3.4.2 Osteogene Differenzierung 26
3.5 Bestrahlung von MSC 27
3.5.1 Vitalitätstestung nach Bestrahlung 27
3.5.2 Proliferation nach Bestrahlung 27
3.5.3 T-Zell supprimierende Eigenschaft nach Bestrahlung 28
3.6 MSC unter Hypoxie Bedingungen 28
3.6.1 Proliferation von MSC unter Hypoxie Bedingungen 28
3.6.2 T-Zell suppressives Potential von Hypoxie kultivierten MSC 28
3.7 Durchflusszytometrische Charakterisierung von MSC 29
3.8 Statistik 29

4 Ergebnisse 30

4.1 Expansion von MSC im Bioreaktor 30
4.2 Charakterisierung von Bioreaktor expandierten MSC 32
4.2.1 MSC aus dem Bioreaktor exprimieren typische Oberflächenmarker 32
4.2.2 MSC aus dem Bioreaktor erhalten ihr Differenzierungspotential 34
4.2.3 Hemmung der T-Zell Proliferation durch Bioreaktor MSC 34
4.2.4 Differentielles Ansprechverhalten von T-Zellen auf MSC-Ko-Kultur 35
4.2.5 CD274 Expression von MSC im T-Zell Proliferationsassay 37
4.3 Einfluss von Kryokonservierung auf MSC 38
4.3.1 MSC zeigen nach Auftauen hohe Vitalität 38
4.3.2 Lange Kryokonservierung beeinträchtigt die T-Zell-suppressiven Eigenschaften von MSC 38
4.4 Einfluss von Kulturbedingungen auf T-Zell-suppressive Eigenschaften von MSC 40
4.4.1 MSC mit hoher Passagezahl induzieren eine reduzierte T-Zell-Proliferationshemmung 40

4.4.2 Aufgetaute MSC erlangen ihr supprimierendes Potential nach Äquilibrierung zurück 40
4.5 Kultivierung von MSC unter Hypoxiebedingungen 42
4.5.1 Hypoxisch kultivierte MSC supprimieren die T-Zell Proliferation..... 43
4.6 Effekt von γ-Bestrahlung auf MSC 44
4.6.1 MSC zeigen relativ hohe Resistenz gegenüber γ-Bestrahlung 44
4.6.2 γ-Strahlung beeinflusst die Proliferation von MSC..... 44
4.6.3 Bestrahlte MSC behalten ihr T-Zell-supprimierendes Potential 45
5 Diskussion 46
5.1 MSC lassen sich im Bioreaktor expandieren..... 46
5.2 Optimierung der Kulturbedingungen 47
5.3 Immunmodulatorische Eigenschaften von MSC..... 50
5.3.1 Einflussfaktoren auf die immunsuppressive Kapazität von MSC 51
5.4 Qualitäts- und Sicherheitsbetrachtungen 52
5.5 Ausblick 54
Zusammenfassung i
Summary ii
Abkürzungsverzeichnis iii
Abbildungsverzeichnis v
Tabellenverzeichnis vi
Literaturverzeichnis vii
Anhang xxiii
Publikationsverzeichnis xxv
Erklärung zur Dissertation xxvii
Danksagung xxviii
Lebenslauf xxix

1 Einleitung

1.1 Stammzellen

Als Stammzellen werden undifferenzierte Körperzellen bezeichnet die sich durch Teilung selbsterneuern und gleichzeitig eine differenzierte Tochterzelle bilden. Diese asymetrische Teilung ermöglicht eine Beibehaltung der Stammzelleigenschaften bei gleichzeitiger Generierung einer differenzierten Tochterzelle (Clevers 2005). Dabei unterscheidet man Stammzellen je nach Differenzierungskapazität zwischen toti-, pluri-, und multipotent. Totipotent sind Zellen der Zygote aus denen sämtliche Gewebe des intra- und extraembryonalen Typs sowie die Keimzellen entstehen. Pluripotent sind embroynale Stammzellen, die in Lage sind, Zellen der drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm) und Keimbahnen zu bilden. Multipotente Zellen sind auf die Ausreifung genetisch determinierter Gewebe beschränkt und bilden schließlich die ausdifferenzierten Zellen und Gewebe (Young and Black 2004). So werden hämatopoetische Stammzellen (HSC) als multipotente Zellen definiert, da aus ihnen alle Zellen des Blutes generiert werden. Einige dieser multipotenten Zellen bleiben nach der Embryogenese erhalten und können sich als Vorläuferzellen nur noch gewebespezifisch differenzieren und werden daher als ‚lineage commited' (festgelegt auf eine Verwandtschaft) bezeichnet wie zum Beispiel Mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks.

1.2 Mesenchymale Stromazellen

Mesenchymale Stromazellen oder auch mesenchymale Stammzellen werden gemeinhin als ‚MSC' bezeichnet. MSC sind Stromazellen mit einem ungewöhnlich hohen Teilungs- und Expansionspotenzial. Sie können aus verschiedenen Organen verschiedener Spezies gewonnen werden (Nardi and da Silva Meirelles 2006). Als Hauptquellen beim Menschen dienen Knochenmark (Friedenstein, Gorskaja, and Kulagina 1976; Pittenger 1999), und Fettgewebe (Zuk et al. 2002), und viele andere Gewebe und Organe (da Silva Meirelles, Chagastelles, and Nardi 2006) wie z.B. Nabelschnurblut von Neugeborenen. Erstmals beschrieben von Friedenstein et al.

1974 (Friedenstein et al. 1974), werden MSC durch ihr Wachstumsverhalten, die Expression von Oberflächenmarkern und ihrem Differenzierungspotential charakterisiert. So besitzen sie die Fähigkeit in unterschiedliches mesodermales Gewebe zu differenzieren.

Eine Vielzahl von Publikationen verwenden das Akronym MSC als Bezeichnung für eine Zellpopulation gewonnen aus verschiedenen Quellen und mit unterschiedlichen Eigenschaften. Horowitz und Kollegen begegneten dieser Inkonsistenz zwischen Nomenklatur und biologischen Eigenschaften mit der Definition der zur verwendenden Bezeichnung. So sollen mesenchymale Stammzellen nur als solche bezeichnet werden wenn sie spezifische Stammzell-Eigenschaften besitzen. Während fibroblastenähnliche pastikadhärente Zellen, ungeachtet ihrer Isolationsquelle, als mesenchymale Stromazellen bezeichnet werden sollen. Das Akronym MSC soll für beide gelten (Horwitz et al. 2005).

Die ISCT (International Society for Cellular Therapy) schlug daraufhin folgende drei minimale Kriterien vor, die für multipotente, mesenchymale Stromazellen gelten sollten. Demnach müssen MSC:

1. Plastik-Adhärent mit einer Fibroblasten ähnlichen Morphologie wachsen,
2. Ein definiertes Oberflächenmarkerprofil exprimieren (positiv für CD73, CD90, CD105 und negativ für CD14, CD19, CD34, CD45 und HLA-DR),
3. in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten *in-vitro* differenzierbar sein (Dominici et al. 2006).

Das Akronym ‚MSC' soll daher in dieser Arbeit als die Kurzform für multipotente mesenchymale Stromazellen verwendet werden.

1.3 Eigenschaften von MSC

MSC besitzen die Fähigkeit mit Zellen des adaptiven sowie des nativen Immunsystems regulatorisch zu interagieren (Uccelli, Moretta, and Pistoia 2008; Dorronsoro et al. 2013). Dies konnte *in-vitro* (Nicola et al. 2002; Krampera et al. 2003; Meisel et al. 2004; Zhang et al. 2004) als auch *in-vivo* (Katarina Le Blanc et al. 2004; Hackstein et al. 2015) in diversen Arbeiten nachgewiesen werden. So konnte von mehreren Gruppen gezeigt werden, dass MSC einen immunmodulatorischen Effekt auf diverse Immuneffektorzellen ausüben, u.a. T-Zellen, B-Zellen und dendritische Zellen (Nauta and Fibbe 2007; Shi, Liu, and Wang 2011; Hackstein et al. 2016). Dabei zeigte sich das MSC bei entsprechenden Voraussetzungen sowohl anti- aber auch proinflammatorische Immunantworten induzieren (Li et al. 2012). So scheinen MSC auf

eine Änderung des Immunstatus im Kontext z.B. einer Infektion angepasst zu reagieren, um eine Balance zwischen Immuntoleranz und Immunaktivierung zu vermitteln (Auletta, Deans, and Bartholomew 2012). Darüber hinaus können MSC die Wundheilung fördern in dem sie, einem Gradienten des Chemokin stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) folgend, in verletztes Gewebe einwandern und dort die Regeneration unterstützen (Chapel et al. 2003; Son et al. 2006).

1.4 T-Zellen und deren Funktion im humanen Immunsystem

T-Lymphozyten sind eine Untergruppe der Lymphozyten. Sie werden auch als T-Zellen bezeichnet, wobei das ‚T' für Thymus den Ort ihrer Reifung steht. Sie exprimieren an ihrer Oberfläche den sog. T-Zell Rezeptor (TCR), der mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC Abkürzung für *‚Major Histocompatibility Complex'*) von diversen Zelltypen interagiert. T-Zellen, die keinen Antigenkontakt hatten und nicht aktiviert wurden werden als naive (nicht aktivierte) T-Zellen bezeichnet. Nach Aktivierung werden sie gemeinhin in drei Subpopulationen eingeteilt:

CD4-positive T-Helferzellen (T_H-Zellen). Sie werden durch die Bindung des TCR an den antigenpräsentierenden MHC-II von antigenpräsentierenden Zellen (engl.: antigen-presenting cell, Abk. APC) aktiviert. So können aktivierte T_H-Zellen humorale sowie zellvermittelte Immunantworten induzieren. Diese Aktivierung führt zur Proliferation und Differenzierung der T-Zellen in T_H1- bzw. T_H2-Zellen, wobei die Anwesenheit von Interleukin (IL)-12 und Interferon Gamma (INF-γ) die eine Differenzierung zu T_H1 Zellen fördert, während IL-4 und Il-6 die Differenzierung zu T_H2 Zellen begünstigt. Die Gruppierung in T_H1 bzw. T_H2-Zellen ist durch die Sezernierung verschiedener Zytokine bestimmt. So werden T_H-Zellen, die proinflammatorische Zytokine wie INF-γ, IL-2 und Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) sezernieren zu T_H1 Zellen zugeordnet. Entsprechend werden T_H-Zellen die antiinflammatorsiche Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 erzeugen, dem Typ 2 zugesprochen (Mosmann et al. 1986).

CD8-positive T-Zellen die aufgrund ihrer Funktion als cytotoxische T-Zellen (CTL, auch *Killerzellen*) betitelt sind, sie werden aktiviert durch die Erkennung von Antigenen auf MHC-I aller kernhaltigen, körpereignen Zellen. Daraufhin können CTL z.B. virusinfizierte Zellen oder Tumorzellen detektieren und abtöten (Chaplin 2010).

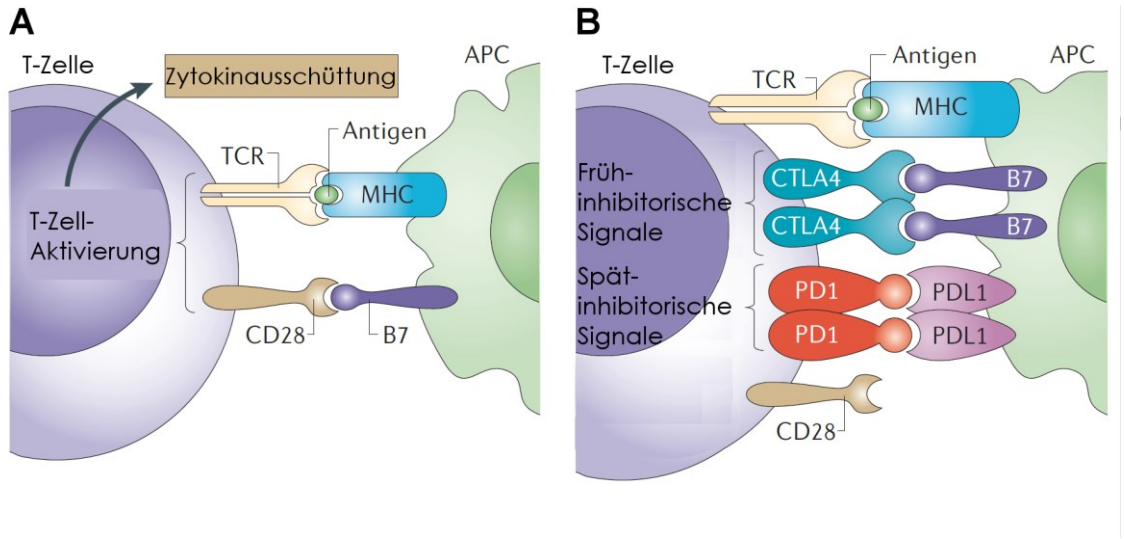


Abbildung 1.1 Positive und negative Regulation der T-Zellaktivierung.
(A) Positive Regulierung: Aktivierung einer naiven T-Zelle durch die Bindung eines vom Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC Abkürzung für *‚Major Histocompatibility Complex‘*) präsentierten Antigens einer antigenpräsentierenden Zelle (APC) mit dem T-Zell Rezeptor (TCR) der naiven T-Zelle. Co-Stimulation wird durch die Ligation von CD28 auf der T-Zelloberfläche mit B7 exprimiert von der APC erreicht. (B) Negative Regulation: Die T-Zellaktivierung wird durch verschiedene Mechanismen negativ reguliert. Die Ligation des zytotoxischen, T-Lymphozyten- assoziierten Proteins 4 (CTLA-4) auf der T-Zelle mit B7 auf der APC verhindert kompetitiv die Aktivierung von CD28, per Bindung mit B7 und dient so als co-inhibitorisches Signal in der frühen Phase der T-Zellaktivierung. Ein spät-inhibitorisches Signal wird durch die Ligation des programmierten Zelltods Protein 1 (PD-1) auf der T-Zelle mit dem programmierten Zelltod-Ligand-1 (PD-L1) auf der APC erreicht. Adaptiert aus: Sharma et al.(Sharma et al. 2011), 2011.

Regulatorische T-Zellen (T_{Reg}) sind durch die Oberflächenexpression von CD4 und CD25 sowie die Expression des Transkriptionsfaktors *‚forkhead box protein 3‘* (FoxP3) im Zellkern definiert. Durch die Limitierung der Aktivierung des Immunsystems regulieren T_{Reg} die Selbsttoleranz desselben. So ist beschrieben dass T_{Reg} eine suppressive Funktion auf selbstreaktive T-Zellen ausüben um Autoimmunreaktionen zu unterbinden (Wing and Sakaguchi 2010).

Obwohl für die Aktivierung der T-Zellen eine Antigenbindung im TCR per MHC essentiell ist, wird weitere Co-Stimulation benötigt. Diese wird, per Bindung von CD28 auf einer naiven T-Zelle mit dem B7 Protein auf einer APC, als zusätzliche Aktivierung der Proliferation und Zytokinausschüttung der T-Zelle erreicht (Greenfield, Nguyen, and Kuchroo 1998) (siehe Abbildung 1.1 (A)). Im Gegensatz dazu ist die T-Zell Aktivierung über diverse Mechanismen, wie CD28/ CTLA-4, PD-1/ PD-L1 oder PD-1/ PD-L2 auch negativ reguliert. So wird *‚programmed cell death protein 1‘* (PD-1) von aktivierten T-Zellen exprimiert (Keir et al. 2008). Eine Bindung von PD-1 an die Liganden *‚programmed death-ligand 1 bzw. 2‘* (PD-L1/2) führt zur Inhibierung der T-Zell-Aktivierung (Freeman et al. 2000; Latchman et al. 2001). Auch die Ligation von B7 an

das CD28-Homolg *‚cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4‘* (CTLA-4) hemmt die T-Zell-Aktivierung (Krummel and Allison 1995) (siehe Abbildung 1.1 (B)). Analog dazu wird CTLA-4 von T-Zellen nach deren Aktivierung auf Transkriptionsebene, hochreguliert (Lindsten et al. 1993; Walunas et al. 1994).
Diese Mechanismen dienen der negativen Regulierung der T-Zell- Aktivierung. Eine überschießende Immunantwort kann so eingeschränkt und dadurch Gewebeschädigungen sowie Autoimmunreaktionen verhindert werden (Pardoll 2012).

1.4.1 Modulation der T-Zell Proliferation durch MSC

Barthilomew et al. berichtete 2002 von einer suppressiven Funktion von MSC auf die induzierte Proliferation von Lymphozyten (A. Bartholomew et al. 2002). Dies geschieht durch Zell-Zell Kontakte (Tse et al. 2003; Sotiropoulou et al. 2006; Jiang et al. 2005) aber auch durch Sekretion solubler Faktoren wie Zytokine, Chemokine oder Stickoxid (Li et al. 2012)). Es wird angenommen, dass der ‚*transforming growth factor‘* (TGF)-β1, *‚hepatocyte growth factor‘* (HGF) (Nicola et al. 2002), Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) (Meisel et al. 2004) und Prostaglandin E2(PGE2) (Aggarwal and Pittenger 2005) von MSC sezerniert werden um inhibitorisch auf T-Zellen zu wirken. Diese Wirkung konnte durch neutralisierende Antikörper gegen TGF-β1 und HGF wieder aufgehoben werden (Nicola et al. 2002). Die immunmodulatorische Wirkung von MSC scheint kein einseitiger Einfluss von MSC auf T-Zellen zu sein, sondern vielmehr eine Wechselwirkung von Faktoren beider Zell Typen. So konnte gezeigt werden, dass MSC die Präsenz des proinflammatorischen Zytokins INF-γ benötigen, um immunsuppressive Wirkung zu entfalten (Krampera et al. 2006). Damit übereinstimmend konnten MSC im INF-γ Knock-out-Modell keine suppressive Wirkung erlangen (Polchert et al. 2008). Es wird eine Wirkweise von INF-γ durch die Erhöhung der immunsuppressiven Mediatoren HGF, TGF-β1 und IDO diskutiert (Ryan et al. 2007). Mehr noch konnte die immunsuppressive Wirkung durch eine Vorbehandlung von MSC mit INF-γ gesteigert werden (Duijvestein et al. 2011). Daneben wirken MSC suppressiv auf aktivierte T_H Subpopulation über den PD-1 / PD-L1 Signalweg (Luz-Crawford et al. 2012). Die Autoren unterscheiden dabei eine MSC-vermittelte Suppression auf T_H1 Zellen über lösliche Faktoren, von einer Zell-Zell-Kontakt abhängigen Suppression auf T_H17 Zellen.
MSC scheinen als ein Mediator der Immunbalance zu fungieren (Auletta, Deans, and Bartholomew 2012). So vermindern sie die Expansion der T_H1/T_H17 Zellen sowie deren Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie INF-γ und IL-17 und bewirken eine erhöhte Ausschüttung von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-4 (Krampera et al.

2003; Aggarwal and Pittenger 2005; Zappia et al. 2005) sowie IL10 (Gonzalez et al. 2009). Indem sie eine Nische für T_{Reg} darstellen, haben MSC auch Einfluss auf die Selbsttoleranz des Immunsystems. In Ko-Kultur mit MSC konnten T_{Reg} ihre suppressive Funktion länger aufrechterhalten als T_{Reg}, die nicht mit MSC co-kultiviert wurden (Di Ianni et al. 2008).

Da MSC keinen MHC-II sowie keine co-stimulatorischen Moleküle wie CD80, CD86 oder CD40 (Pittenger 1999; Tse et al. 2003; Deans and Moseley 2000) exprimieren werden sie nach Transplantation vom Empfängerorganismus nicht abgestoßen (Mackenzie and Flake 2001). Aufgrund der geringen Immunogenität wurden MSC, unabhängig der humanen Leukozytenantigen (HLA)-Kompatibilität (Katarina Le Blanc et al. 2003) sowohl bei autolog als auch bei allogen Transplantationen eingesetzt (K Le Blanc et al. 2003; Krampera et al. 2003).

1.5 Stammzelltransplantation und Graft versus Host Disease

Bei einer Vielzahl von Krankheiten des blutbildenden Systems, wie der akuten Leukämie, wird die hämatopoetsiche Stammzelltransplantation angewendet. Die Transplantation erfolgt nach Zerstörung der Knochenmarkzellen des Patienten, z.B. durch Chemotherapie, um diese zu ersetzen. Die dafür benötigten Stammzellen können aus dem Knochenmark, peripherem Blut (nach Mobilisierung aus dem Knochenmark) oder aus dem Nabelschnurblut von passenden Spendern gewonnen werden. Passende Spender werden aufgrund der Expression ihrer HLA Moleküe bestimmt. Diese sollte so ähnlich wie möglich dem Expression-Profil des Patienten sein um Abstoßungsreaktionen zu minimieren. Doch selbst passende HLA-Individuen schließen Beeinträchtigungen nicht aus. So hängt die Effektivität der Transplantation auch von den Nebenhistokompatibilitätsantigenen (MHA Abkürzung für *‚Minor histocompatibility antigens‘*), vom Alter des Patienten, der Quelle der Stammzellen und dem Verwandtschaftsgrad von Spender und Empfänger ab (Kai and Hara 2003).
Die ‚*Graft-versus-Host-Disease‘* ((GvHD) deutsch: Graft-versus-Host-Krankheit) ist eine häufige Komplikation, die Patienten einer allogenen Stammzeltransplantation erleiden. Dabei richten sich die im Transplantat enthaltenen T-Zellen des Spenders gegen den Empfängerorganismus. Die Inzidenz eine GvHD zu erleiden reicht von 35-45%, in Fällen einer HLA-identischen Spende bei Geschwistern, zu 60-80% für Patienten, die Zellen eines nicht verwandten HLA-unpassenden Spenders erhalten (J. Ferrara et al. 2009). Es wird unterschieden zwischen der akuten GvHD, die innerhalb 100 Tage nach Gabe des Transplantats auftritt und der chronischen GvHD, die nach dieser Zeit entsteht (J. L. Ferrara and Deeg 1991). Die Entstehung der GvHD wird in drei aufeinanderfolgende Phasen unterteilt. In Phase eins kommt es, aufgrund des Konditionierungsregimes, zu Gewebeschädigungen, was Inflammationen und die Aktivierung der APC des Patienten über Zytokine zur Folge hat. Dies aktiviert, in Phase zwei, die transplantierten T-Zellen welches zu deren Proliferation und Migration führt. Diese Aktivierung kann durch T_{Reg} und deren suppressiven Einfluss auf T-Zellen abgeschwächt werden. So kommt es in der finalen Phase zu Zerstörung des Gewebes im Patienten, vermittelt durch die aktivierten T-Zellen des Spenders (siehe Abbildung 1.2).

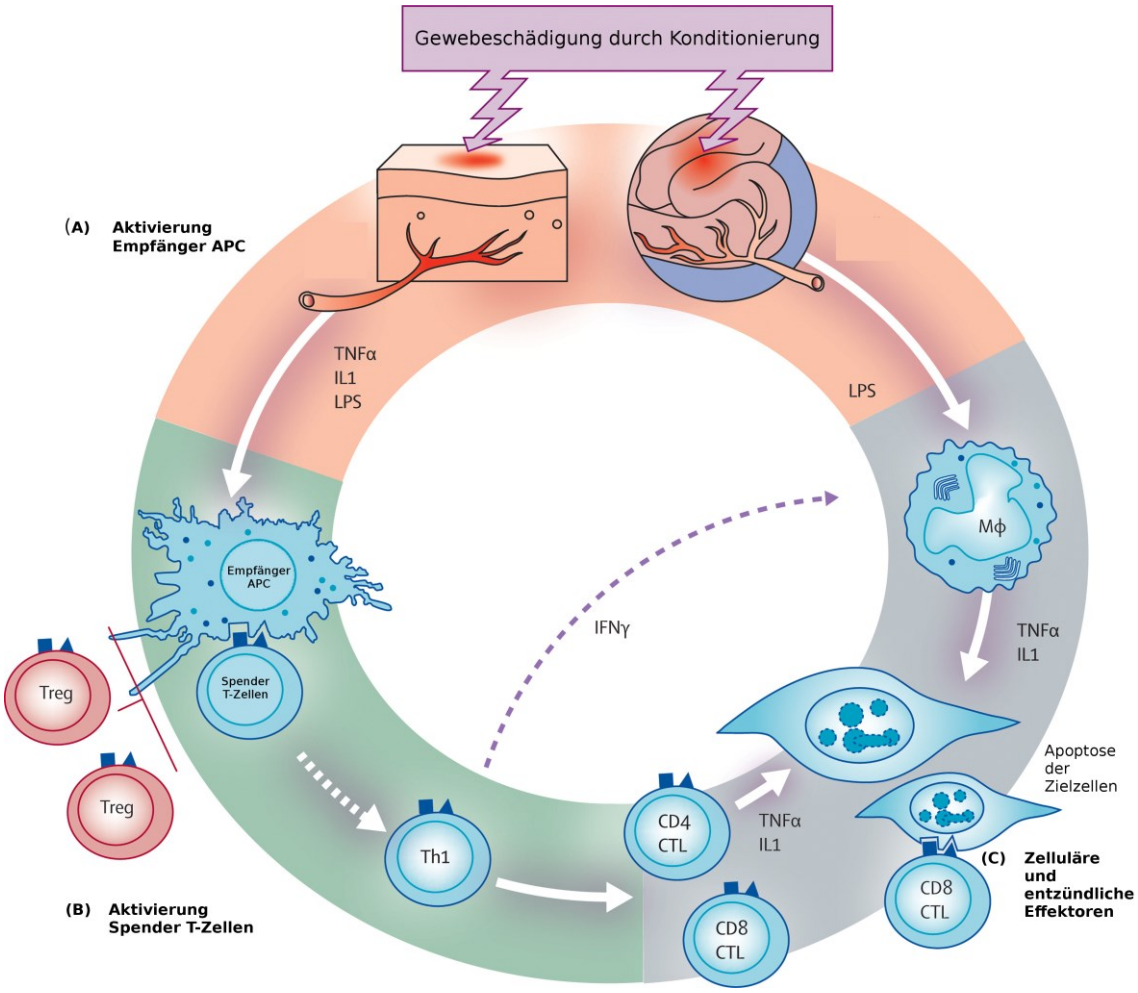


Abbildung 1.2 Die drei aufeinanderfolgenden Phasen der Graft-versus-Host-Disease. (A) Durch die bestehende Erkrankung und die Konditionierung für die Transplantation werden am Wirtsgewebe Schäden induziert, die die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine zur Folge haben. Dies aktiviert die antigenpräsentierenden Zellen (APC) des Wirts. (B) Die Interaktion der APC des Wirts und der Spender T-Zellen induziert deren Aktivierung, Proliferation, Differenzierung und Migration. Dies kann durch regulatorische T-Zellen (Treg) abgeschwächt werden. (C) Eine Kaskade von zellulären und löslichen Entzündungseffektoren löst die Apoptose von Zielzellen, die durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) vermittelt wird, aus. Zusätzlich führt die Freisetzung von Interferon gamma (IFN-γ) durch T-Helferzellen (Th1) und bakterieller Membranbestandteile wie Lipopolysaccharid (LPS), zur Aktivierung von Makrophagen (MΦ). Dies führt beides zur Entzündung und Zerstörung des Zielgewebes. Adaptiert aus: Ferrara et al.(J. Ferrara et al. 2009), 2009.

Die am häufigsten von einer GvHD betroffenen Organe sind Haut, Leber und der Gastrointestinaltrakt. Dabei werden 4 Subtypen, anhand der betroffenen Organe und der Ausprägung der Symptome, unterschieden (Glucksberg et al. 1974). Die Behandlung der GvHD erfolgt durch Immunsuppressiva. Besonders Patienten, die ein allogenes Transplantat eines nicht verwandten Spenders erhielten, benötigen eine intensive immunsuppressive Behandlung z.B. durch eine *ex-vivo* oder *in-vivo*-T-Zell-Depletion (Pavletic et al. 2005; Slavin et al. 1998) oder der Blockade von T-Zell co-stimulatorischen Signalwege durch Antiköper (Soiffer 2004; Guinan et al. 1999). Die

etablierte GvHD wird durch die Gabe von Steroiden oder durch die extrakorporale Photopherese behandelt (MacMillan et al. 2002; Greinix et al. 2006). Allerdings sprechen nur ca. 50% der Patienten auf die Therapie mit Corticosteroiden an (Deeg 2007). Steroidrefraktäre GvHD wird durch die Blockade der Januns Kinasen (JAK) 1/2 durch Antikörper (z.B. Ruxolitinib) behandelt (Spoerl et al. 2014). Da der JAK 1/2 Signalweg essentiell für das T-Zell-Ansprechen ist, bewirkt seine Blockade reduzierte Zytokinlevel und damit einhergehend verringerte GvHD-Symptomatik (Schindler, Levy, and Decker 2007). Die Nebenwirkungen von Ruxolitinib sind Anämie, Thrombozytopenie und Infektionen, begründet durch die herbeigeführte Immundefizienz (Verstovsek et al. 2012; Wysham, Sullivan, and Allada 2013).
Andererseits ist eine gerichtete Reaktion der transplantieren T-Zellen auf die malignen Zellen des Patienten durchaus erwünscht, da der sogenannte „Graft-versus-Leukemia“-Effekt die Rezidivrate verringert. So kann übermäßige GvHD Prävention, in Form von Immunosuppression, zu höheren Infektionsraten und vor allem, zu erhöhten Rückfallraten führen (Chalandon et al. 2006).
Da eine deutliche Zunahme der allogenen Stammzelltransplantationen und damit einhergehend, die Inzidenz der GvHD in den kommenden Jahren erwartet wird, werden neue Therapien intensiver erforscht. Eine mögliche Anwendung in der Behandlung der GvHD bieten mesenchymale Stammzellen (Katarina Le Blanc et al. 2008; Amorin et al. 2014; Ringdén et al. 2006).

1.6 Klinische Anwendung mesenchymaler Stammzellen (MSC)

Durch ihr hohes, regeneratives Potential, das sich durch die angesprochene Differenzierungskapazität der Produktion von Wachstumsfaktoren sowie der Sekretion von parakrinen Faktoren begründet, sind MSC als Zelltherapeutikum Gegenstand zahlreicher klinischer Studien. MSC sind nach den blutbildenden Stammzellen die derzeit am zweit¬häufigsten therapeutisch eingesetzten Stammzellen beim Menschen. Derzeit sind ca. 600 Studien in unterschiedlichen klinischen Phasen (Phase I, II etc.) registriert und decken ein großes Behandlungsspektrum ab (http://www.clinicaltrials.gov (abgerufen am 20. Mai 2016)). Das Anwendungsspektrum reicht dabei von Wundheilung bis zur Behandlung von Schlaganfällen, Diabetes, der Regeneration von verletzten Geweben der Lunge, Leber, Niere und des Herzens sowie der Bekämpfung von Autoimmunkrankheiten (Wang, Qu, and Zhao 2012).

Basierend auf ihrem immunmodulatorischen Effekt behandelten 2004 Katarina Le Blanc und Kollegen, in einem Heilversuch, einen Patienten der nach Stammzelltransplantation unter einer schweren GvHD litt erfolgreich mit MSC (Katarina Le Blanc et al. 2004). Daraufhin wurden MSC, in einer klinischen Phase-II-Studie von Le Blanc et al., erfolgreich zur Behandlung der Graft versus Host Disease (GvHD) eingesetzt (Katarina Le Blanc et al. 2008). Als Folge davon wurden allogene MSC mehrfach zur Therapie der steroid-refraktären GvHD eingesetzt (Wang, Qu, and Zhao 2012). Betrachtet man die Vielzahl an publizierten Studien, allein für die Behandlung der GvHD, die MSC als Zelltherapeutikum nutzen so fällt die hohe Varianz der Kulturbedingungen der eingesetzten MSC auf. So werden MSC frisch, krykonserviert, in unterschiedlicher Passagezahl und in unterschiedlichen Medienzusätzen (fetales Kälberserum (engl.: ‚*fetal calf serum*', (Abk. FCS)), HPL (humanes Plättchenlysat)) expandiert. Die gegebene Dosis variiert ebenso wie der Ursprung (Knochenmark, Periphere MSC; allogene oder autologe Spende) aus dem die MSC gewonnen wurden (Amorin et al. 2014). Die Konsequenz dieser Heterogenität spiegelt sich in den abweichenden Ergebnissen, die teilweise sogar gegenläufig sind, wider. Eine Vergleichbarkeit der Studien untereinander ist damit erheblich erschwert. Die bisher einzige Phase-III-Studie die MSC als Zelltherapeutikum bei GvHD einsetzte ergab keinen Vorteil gegenüber der Kontrollgruppe (Martin et al. 2010).
Die Heterogenität der bisher publizierten Studien, die MSC als Zelltherapeutikum nutzen, hinsichtlich Kulturbedingungen wie Medium, Passagezahl, frische oder kryokonservierte MSC aber auch der Ursprung aus denen MSC gewonnen werden, wird als möglicher Grund für die gegenläufigen Resultate diskutiert (Galipeau 2013).

1.6.1 Expansion von MSC im Bioreaktor

Der geschätzte Anteil von MSC im menschlichen Knochenmark liegt bei ca. 0,001-0,01% an der Gesamtheit der nukleären Zellen (Caplan 1994). Für eine Dosis werden 1-5 Mio Zellen pro kg Körpergewicht eingesetzt (Subbanna 2007). Somit ist ein zuverlässiges, schnelles *ex-vivo* Expansionssystem erforderlich. Die begrenzte Verfügbarkeit ist daher ein Hauptproblem in Bezug auf den klinischen Einsatz von MSC. Außerdem kann die klinische Wirksamkeit auf der Gabe von mehreren Dosen beruhen, was eine umfangreiche Amplifikation voraussetzt, um ausreichend MSC zu generieren. Die gegenwärtige Methode zur Generierung von MSC in großer Anzahl ist die Verwendung von Zellkulturflaschen oder Zellfabrik-basierten Methoden (Katarina Le Blanc et al. 2008). Dazu werden hunderte von Flaschen benötigt, um die erforderlichen Zellzahlen zu erreichen. Diese Methodik ist sehr arbeitsaufwändig und

verknüpft mit einer hohen Anzahl von Manipulationen an der offenen Flasche was die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination deutlich erhöht (Hanley et al. 2013). Weitere Probleme bereiten dabei unter anderem die schlechte Skalierbarkeit sowie Standardisierbarkeit, um MSC in klinischen Maßstab zu generieren.

In dieser Arbeit wurden daher MSC, unter zu Hilfenahme des ‚Quantum Cell Expansion System' expandiert. Das Quantum Cell Expansion System ist ein funktionell geschlossener, automatisierter Bioreaktor, der adhärente- sowie Suspensionszellen kultiviert. Das Kultursystem ist aus einem mit Hohlfasern bestückten Bioreaktor aufgebaut, der wiederum Teil eines sterilen Schlauchkreislaufs für den Austausch von Medium und Gas ist. Es besteht die Möglichkeit, Zellen im Innern der Hohlfasern innerkapillar sowie an der Außenseite, extrakapillar, zu kultivieren. Die Hohlfasern bilden dabei auf der intrakapillaren Seite eine Fläche von ca. 2,1 m² und ersetzen damit 120 Zellkulturflaschen (à 175 cm²). Das System ist optimiert auf die Expansion von adhärenten Zellen in FCS-haltigem Kulturmedium (Startz, Vang, and Baila 2012). Die Beschaffenheit der Hohlfasern ist so gewählt, dass Nährstoffe, Metabolite und Gase leicht durch die Faser diffundieren können, während Proteine und größer makromolekulare Medium-Komponenten auf der intrakapillaren Seite verbleiben. Durch den sogenannten ‚Sample Port' ist eine sterile Probenentnahme des Mediums der extrakapillaren Seite möglich, um darin beispielsweise die Glukose- oder Laktatkonzentration zu messen.

Typische Arbeitsschritte der Zellkultur wie Zellaussaat, Mediumwechsel, Ablösen und Ernte von Zellen werden, kontrolliert vom System, durch Pumpen und automatisierte Ventile, die die Flüssigkeitsströme durch das System lenken, durchgeführt. Die einzelnen Arbeitsschritte können dabei manuell definiert oder komplett automatisiert durchgeführt werden. Die Verwendung von sterilen Schlauchscheißgeräten ermöglicht es, die funktionell geschlossene Einheit des Systems aufrechtzuerhalten. So ist es möglich Beutel für den Zu- und Abfluss von Medium zu verbinden und so die Zell-Aussaat sowie Ernte steril durchzuführen. Im Gegensatz zur klassischen Zellkultur in Flaschen, ermöglicht der Bioreaktor kontinuierlichen Zufluss von frischem Medium, bei äquivalentem Abfluss von verbrauchtem Medium. Dabei kann die gewählte Zuflussrate anhand der bestimmten Glukose und/oder Laktatwerte so gewählt werden dass eine optimale Versorgung der Zellen mit Nährstoffen gewährleistet ist.

Ein geschlossenes System, wie es der Bioreaktor bietet, ist dabei vorteilhaft, da es die kontinuierliche Überwachung der Produktionsprozesse durch in-Prozess-Kontrollen ermöglicht. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Sicherstellung der Konsistenz und der Qualität von biologischen Arzneimitteln.

1.7 Ziel der Arbeit

Die vielfache Verwendung von MSC in klinischen Heilversuchen und Studien (Katarina Le Blanc et al. 2004; Wang, Qu, and Zhao 2012; De Becker and Van Riet 2015) führte zu einigen vielversprechenden Resultaten, während andere hinter den Erwartungen zurück blieben (Galipeau 2013). Diese Inkonsistenzen evozieren den Bedarf eines standardisierten medizinischen Zellprodukts mit verlässlicher Effizienz. MSC werden im Rahmen der Vorschriften in der Europäischen Union als Arzneimittel für neuartige Therapien (engl.: *‚Advanced Therapy Medicinal Products‘*, Abk. ATMP) klassifiziert (Slaper-Cortenbach 2008). Die Europäische Arzneimittel-Agentur (engl.: *‚European Medicines Agency‘*, Abk. EMA) hat daher spezielle angepasste Vorschriften ausgegeben die die biologische Sicherheit und Wirksamkeit des Zellprodukts betreffen, um einen optimalen Schutz zu gewährleisten. Dabei soll das Zellprodukt nur minimale Manipulationen ausgesetzt und das Kulturmedium sowie verwendete Reagenzien humanen oder synthetischen Ursprung haben. Eine klinische Herstellung von MSC muss daher gemäß, der guten Herstellungspraxis (engl.: *‚Good Manufacturing Practice‘*, Abk. GMP) für Arzneimittel durchgeführt werden (Bieback, Kinzebach, and Karagianni 2011; Sensebé, Gadelorge, and Fleury-Cappellesso 2013).

Ziel dieser Arbeit ist es, ein Protokoll für die GMP-gerechte *ex-vivo* Expansion für MSC zu etablieren. Dabei soll auf den Einsatz tierischer Komponenten und Produkte weitestgehend verzichtet werden. Die so gewonnen MSC sollen charakterisiert und auf ihr immunmodulatorisches Potential überprüft werden. Eine Optimierung des Expansionsprotokolls soll im Hinblick auf Funktionalität und Sicherheit des Zellprodukts vorgenommen werden. Dabei sollen Einflussgrößen wie Passagezahl, Krykonservierung und Bestrahlung überprüft werden.

2 Material

2.1 Lösungen und Chemikalien

Tabelle 2.1 Liste der verwendeten Lösungen und Chemikalien und deren Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
RPMI 1640 Flüssigmedium	Gibco life technologies
DMEM Flüssigmedium	Biochrom GmbH
Fetales Kälberserum	PAN Biotech GmbH
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Pantec
Dimethyle sulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Trypanblau Lösung	Sigma Aldrich
Phosphate buffered saline (PBS) Tabletten	Gibco (Invitrogen)
Aqua destillata (Aqua dest.)	Arium 611 VF, Sartorius AG
DAPI A1001	AppliChem
AnnexinV apoptosis detection kit	eBioscience
N(2)-L-alanyl-L-Glutamin (Dipeptamin®)	Fresenius Kabi
Heparin-Natrium 25000 I.E Injektionslösung	Ratiopharm GmbH
AB Serum	Eigenherstellung Transfusionsmedizin Gießen
HPL	Eigenherstellung Transfusionsmedizin Gießen
Sodiumpyruvat 100mM	Gibco life technologies
Hepes (1M)	Gibco life technologies
nicht essentielle Aminosäuren	Sigma–Aldrich
GlutaMAX 100x	Gibco life technologies
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare
0.25% Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) Lösung	Gibco life technologies
5,6-carboxyfluorescein di-acetate N-succinimidyl ester (CFSE)	Molecular Probes
Sytox	Life technologies
NH-AdipoDiff und NH-OsteoDiff Medium	Miltenyi Biotec GmbH
Silbernitrat - Lösung 5 %	AppliChem GmbH
Colchicin	Sigma–Aldrich
Natriumthiosulfatlösung 0,1 mol/l	Carl Roth GmbH & Co. KG
Methanol	Sigma–Aldrich

2.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.2 Liste der Verbauchsmaterialien und deren Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
Zentrifugenröhrchen, konisch, (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One
Zellkulturflaschen (25 cm², 75 cm², 175 cm²)	Greiner Bio-One
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 mL)	Eppendorf AG
Pipettenspitzen; (10, 200, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co.
Serologische Pipetten (1, 2, 5, 10, 25, 50 mL)	Sarstedt AG & Co.
Vakuum Filtersysteme 0,22µm	Merck Millipore
Zellkulturplatte, 24 Vertiefungen	Greiner Bio-One
Parafilm M	Pechiney
Kryo-Röhrchen	Greiner Bio-One
FACS-Röhrchen	Sarstedt AG & Co.
Flouridmonovetten 05.1073	Sarstedt
In-Line Filter 200 Micron	TerumoBCT
Waste Bag 4 L, Accessory Set	TerumoBCT
Cell Inlet Bag 0,5 L, Accessory Set	TerumoBCT
Cell Expansion Set	TerumoBCT
Omnifix®-Einmalspritze (5; 20 ml Luer-Lock Solo)	B.Braun
Perfusor®-Spritze (50 ml)	B.Braun
Mini-Spike	B.Braun
Zellkulturschalen (35 mm, 145 mm)	Greiner Bio-One
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Nalgene

2.3 Geräte

Tabelle 2.3 Liste verwendeter Geräte und deren Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
WasserbadType 1003	GFL GmbH
Vortex REAX top	Heidolph
Sicherheits-Werkbank class II VFR 1006	clanLAF
Micro-Zentrifuge SPROUT	Heathrow Scientific
Mikroskop 10x40	Helmut Hund GmbH
Zentrifuge Rotina 420R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG
Accu-jet pro Pipettierhilfe	Brand GmbH & Co.KG
Zählkammer; Neubauer-improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
HERAcell CO_2 Inkubator	Heraeus
Eismaschine Ziegra ZBE 70-35	Ziegra Eismaschinen GmbH
Micro-Pipetten; (10, 20, 200, 1000 µ)l	Gilson/Eppendorf
Schlauchversiegeler Composeal Mobilea II	Fresenius Kabi
Steriles Schlauchschweißgerät TSCD®II	TerumoBCT
Durchflusszytometer: FACSCanto II, FACSCalibur, LSR II	BD Biosciences
X-Rad320iX Gamma Bestrahlungsgerät	Precision X-Ray

2.4 Verwendete Software

Tabelle 2.4 Verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller
BD FACS DIVA, Vers. 6.0	BD Biosciences
FlowJo, Vers.7.6.5	Tree Star, Inc.
GraphPad Prism, Vers. 5.01	GraphPad Software, Inc.
CellQuest Pro	BD Biosciences

2.5 Zellkultur

Tabelle 2.5 Zusammensetzung des Kulturmediums für PBMC (engl.: *‚Peripheral Blood Mononuclear Cell'*)

Kulturmedium PBMC/Co-Kultur	
86 Vol.-%	RPMI 1640 mit L-Glutamine
10 Vol.-%	AB-Serum
1 Vol.-%	nicht essentielle Aminosäuren (100x)
1 Vol.-%	Sodiumpyruvat (100 mM)
1 Vol.-%	Hepes
1 Vol.-%	Penicillin/Streptomycin

Tabelle 2.6 Zusammensetzung des Kulturmediums der mesenchymalen Stammzellen

Kulturmedium mesenchymale Stammzellen	
87,9 Vol.-%	DMEM
10 Vol.-%	HPL
1 Vol.-%	Glutamax 100x
1 Vol.-%	Penicillin/Streptomycin
0,1% Vol.-%	Phenolrot
2Unit / mL	Heparin

Tabelle 2.7 Zusammensetzung des Einfriermediums

Einfriermedium	
90 Vol.-%	Fötales Kälberserum
10 Vol.-%	Dimethyle sulfoxid (DMSO)

2.5.1 Humanes Plättchenlysat

Humanes Plättchenlysat, von der Transfusionsmedizin Giessen bezogen, wurde aus Thrombozytenspenden nach dem Protokoll von Schallmoser und Kollegen (Schallmoser and Strunk 2009) hergestellt. Es wurden frische Thrombozytenkonzentrate von 4 Einzelspendern gemischt.

2.5.2 GMP-konformes Zellkulturmedium

Bei Einsatz von GMP-konformen Medium wurde Glutamax durch 1% N(2)-L-alanyl-L-Glutamin ersetzt. Es wurde kein Phenolrot zugesetzt und kein Penicillin/Streptoymcin verwendet.

2.6 Antikörper

Tabelle 2.8 Verwendete Antikörper für die Immunophänotypisierung von MSC

Bezeichnung	Klon	Hersteller
anti-CD14-PE-	MφP9	BD Biosciences
anti-CD19-PerCp-Cy5.5	SJ25C1	BD Biosciences
anti-CD34-FITC	8G12	BD Biosciences
anti-CD45-PerCp-Cy5.5	3d1	BD Biosciences
anti-CD73-PE	AD2	BD Biosciences
anti-CD90-APC	5E10	BD Biosciences
anti-CD105-APC	266	BD Biosciences
anti-HLA-DR-FITC	B8.12.2	Immunotech
anti-IgG1-PE	X40	BD Biosciences
anti-IgG1-PerCp-Cy5.5	X40	BD Biosciences
anti-IgG-FITC	X39	BD Biosciences
anti-IgG1-APC	X40	BD Biosciences

Tabelle 2.9 Verwendete Antikörper für den T-Zell Proliferationsassay

Bezeichnung	Klon	Hersteller
anti-CD3 purified	HIT3a	BD Biosciences
anti-CD28 purified	CD28.2	BD Biosciences
anti-CD4APC-Cy7	RPA-T4	BD Biosciences
anti-CD8PE-Cy7	SK1	BioLegend
anti-CD45-PE	HI30	BioLegend
anti-CD90-APC	5E10	BD Biosciences
anti-CD274-PE-Cy7	29E.2A3	BioLegend

3 Methoden

3.1 Isolierung und Kultivierung von MSC

Knochenmark aus dem Beckenkamm und Spongiosastücke aus Hüftoperationen wurden von freiwilligen gesunden Spendern gewonnen, nachdem die Patienten ihr schriftliches Einverständnis gegeben hatten. Beide Eingriffe sind von der lokalen Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg (Studien-Nr. 64/01 und 25/10) zugelassen.
Zur Knochenmarkaspiration wurden mit 160 I.U. Heparin Antikoagulantium vorgefüllte 10 mL Spritzen verwendet.
Spongiosastücke wurden mit einer sterilen OP-Klemme in PBS zerdrückt und das Gemisch durch ein 70 µm Filter gegeben. Das gewonne Filtrat wurde einer Dichtegradzentrifugation unterzogen. Knochenmarkaspirat wurde direkt der Dichtegradzentrifugation zugeführt. Die so gewonnenen Mononukleären Zellen wurden von Erythrozyten per Lyse befreit und anschließend in PBS gewaschen und in Medium resuspendiert. Für eine Expansion in Plastikflaschen wurden das Zellgemisch in einer Dichte von 5.000 Zelle / cm² ausplattiert und in einem CO_2 – Inkubator bei 37 °C kultiviert. Nach 48h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um nicht adhärente Zellen zu entfernen. Im Folgenden wurde das Medium alle 3-4 Tage ausgetauscht, bis eine Konfluenz von 80% erreicht wurde. Zur Ernte der Zellen wurde das Medium entfernt, mit PBS gewaschen und die Flasche mit Trypsin/EDTA für 5min bei 37 °C inkubiert. Die so gewonnen Zellen wurden mit einer Dichte von 5.000 Zellen / cm² in eine entsprechende Anzahl Zellkulturflaschen ausgesät und die Passagennummer um eins erhöht. Die so vorangereicherten Zellen wurden in Passage 1-4 für Versuche verwendet.

3.1.1 Kryokonservierung und Auftauen von MSC

Mit Trypsin abgelöste Zellen wurden in PBS gewaschen und im Einfriermedium eingefroren. Dazu wurden $1*10^6$ Zellen in 1,5 ml Einfriermedium (siehe Tabelle 2.7) resuspendiert, in Kryo-Röhrchen pipettiert und umgehend in einen Einfriercontainer bei -80°C verbracht. Dieser ermöglicht ein schonendes Einfrieren durch schrittweises Absenken der Temperatur um 1°C pro Minute. Nach 24h wurden die Röhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryo-Röhrchen im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Sobald das Einfriermedium begann flüssig zu werden, wurde es in ein Röhrchen mit vorgewärmtem Kulturmedium verbracht, anschließend umgehend mit PBS gewaschen und für Versuche verwendet.

3.2 Expansion von MSC im Bioreaktor

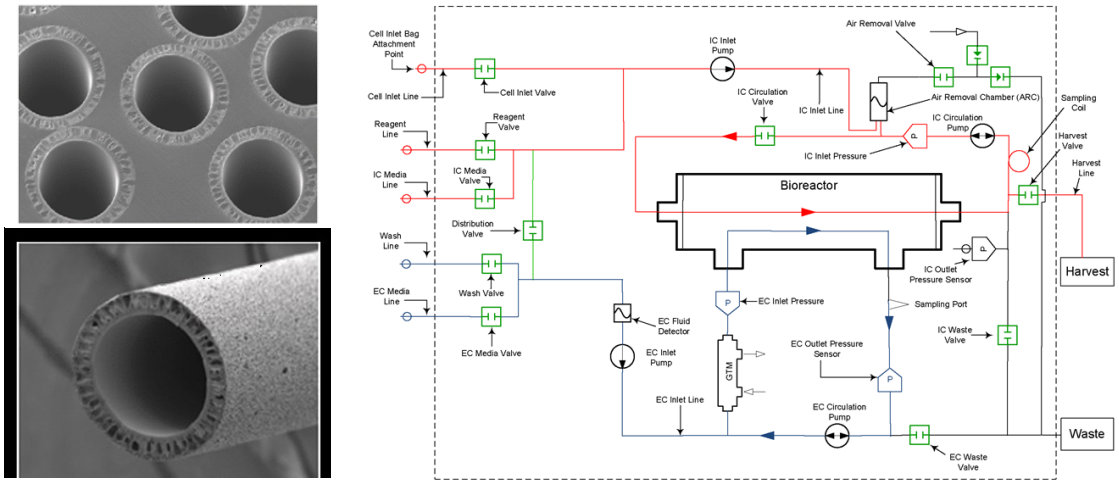


Abbildung 3.1 Aufbau der Hohlfasern und Hydraulisches Layout des Quantum Cell Expansion Systems.
Links: poröse Hohlfasern im Querschnitt mit einer Porengröße von < 10nm, Rechts: Schematische Darstellung des extrakapillaren in blau sowie des innerkapillaren Mediumkreislaufs in Rot. GTM bezeichnet das zur Begasung des Mediums verbaute Gastransfermodul. Es sind in Grün diverse Ventile sowie diverse Peristaltik - Pumpen als schwarze Kreise dargestellt. Pfeile geben die Pumprichtung des Mediums an. ©Terumo BCT

Zur GMP-gerechten Expansion von MSC wurde das Quantum *Cell Expansion System* von TerumoBCT verwendet. Dieses Gerät ermöglicht es Routineaufgaben der Zellkultur, wie Aussaat, Mediumzugabe, Ablösen sowie Ernte der Zellen automatisiert durchzuführen (siehe Tabelle 3.1). Diese werden aufgrund des Geräteaufbaus als geschlossenes System steril durchgeführt. Als zentrales Element dient im *Cell Expansion Set* der Bioreaktor, welcher poröse Hohlfasern beinhaltet, die zusammen einer Oberfläche von 21.000 cm² entsprechen. Dieser Reaktor verfügt über 2 Mediumkreisläufe: Einen innerkapillaren, durch die Faser hindurch, sowie einen extrakapillaren der an der Außenseite der Faser vorbei verläuft, wobei die Zellen auf der innerkapillaren Seite kultiviert werden (siehe Abbildung 3.1). Die Versorgung der Zellen wird durch Medium aus Beuteln gewährleistet welche, ebenso wie verbrauchtes Medium im Abfallbeutel, steril per Schlauchschweißgerät an die entsprechende Leitung des *Cell Expansion Set* angeschweißt bzw. abgeschweißt werden (siehe Abbildung

3.2). Eine ausreichende Begasung der Zellen wird durch ein Gastransfermodul gewährleistet, welches das Medium mit Gas versetzt.

Einen Tag vor Beladung des Bioreaktors mit Zellen oder Knochenmarkaspirat wurde das Cell Expansion Set in das Gerät installiert und mit PBS vorgefüllt. Um den Zellen eine Matrix zum Anwachsen zu bieten, wurden die Hohlfasern des Reaktors mit 5 mg Fibronektin nach Herstellerangaben, über Nacht ausgekleidet. Der Cell Inlet Bag, der vorangereicherten Zellen oder Knochenmarkaspirat enthielt, wurde dann mit MSC GMP Medium auf 100 mL Volumen aufgefüllt, steril per Schlauchschweißgerät an den Zellschlauch verbunden und per automatischer Funktion in den Bioreaktor geladen. Nach 48h wurde ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt, um ungewollte Zellen (z.B. Erythrozyten oder nonviable Zellen) zu entfernen. Die Versorgung der Zellen mit Medium wurde durch einen kontinuierlichen Mediumfluss gewährleistet. Dieser betrug initial 0,1 ml/ min und wurde Anhand von Messungen des Laktat sowie Glukosewerts im Medium schrittweise erhöht. Bei Erreichen eines Laktatwertes von 5 mmol/L und/oder Unterschreiten einer Glukosekonzentration von 70 mg/dL wurde die Zuflussrate verdoppelt Tabelle 3.2. Dazu wurden regelmäßig Mediumproben über einen Sample Port steril per 5 mL Luer-Lock Spritze aspiriert. Bei Erreichen einer definierten Zuflussrate wurde am darauffolgenden Tag die Zellernte eingeleitet (siehe Tabelle 3.2). Zur Ablösung der Zellen von der Oberfläche wurde ein mit 180 mL 0,25% Trypsin/EDTA Lösung vorgefüllter Cell Inlet Bag an den Reagenzschlauch geschweißt und der Bioreaktor automatisiert beladen. Nach 4-6 minütiger Inkubation wurden die abgelösten Zellen mit Hilfe von 500 mL Medium in den Erntebeutel gespült und für weitere Versuche verwendet.



Abbildung 3.2 Quantum Cell Expansion System. Links in der Außenansicht. Erkennbar ist das Touchpad mit Status Menü sowie der am Beutelhalter hängende Medium-, Abfall- und Erntebeutel. Rechts das *Cell Expansion Set* mit Bioreaktor im installierten Zustand. ©Terumo BCT

Tabelle 3.1 Fließschema der MSC Expansion im Bioreaktor

Prozess	Ablauf	Zeit
Vorbereiten des Bioreaktors	- Einsetzen des Cell Expansion Sets - Priming des Cell Expansion Sets mit PBS - Coating des Bioreaktors mit Fibronektin - DMEM-Medium mit 10% HPL herstellen und 50ml in Cell Inlet Bag für Beladung vorbereiten	Tag -1 (Tag vor Beladung)
Vorbereiten des Bioreaktors	- Mediumbeutel an System anschweißen - Überschüssiges Fibronektin mit Medium auswaschen	Tag 0
Bioreaktor beladen	Knochenmarkaspirat in Cell Inlet Bag (CIB) überführen und in Bioreaktor infundieren	Tag 0
Zelladhärenzphase	Ermöglicht MSC das Anwachsen an die Fibronektin-Matrix (48h)	
Ausspülen des Systems mit Medium	Entfernen von unerwünschten nicht-adhärenten Zellen (z.B. Erythrozyten)	Tag 2
Zellexpansionsphase	Probenentnahme aus Sample Port zur Überwachung des MSC- Wachstums per Bestimmung der Glukose- bzw. Laktatkonzentration Verdopplung der Inlet-Rate wenn Glukosekonzentration <70 mg/dl und/oder Laktatkonzentration >5 mmol/L	Siehe Tabelle 3.2
MSC-Kultivierung beenden	wenn Inlet-Rate 0,8 ml/min	Tag nach Verdopplung der Inlet-Rate auf 0,8 ml/min
Ernte der MSC	- 180 mL 0,25% Trypsin/EDTA Lösung in CIB überführen - Medium mit PBS aus System spülen - Trypsin/EDTA Lösung in System infundieren - Inkubation um MSC abzulösen - Nach 4-6min Stoppen der enzymatischen Reaktion durch Zuführen von Medium	

Tabelle 3.2 Laktat bzw. Glukosekonzentrationsabhänige Zuflussrate sowie Probenentnahmeplan

Zuflussrate	Probenentnahme
Start 0,1 ml/min = 144 ml/d	an Tag 3 und 5 Laktat- und Glukosekonzentrationsbestimmung im Medium
Glukosekonzentration <70 mg/dl und/oder Laktatkonzentration >5 mmol/L	
Zuflussrate verdoppeln: 0,2 ml/min = 288 ml/d	tägliche Laktat- und Glukosekonzentrationsbestimmung im Medium
Glukosekonzentration <70 mg/dl und/oder Laktatkonzentration >5 mmol/L	
Zuflussrate verdoppeln	tägliche Laktat- und Glukosekonzentrationsbestimmung im Medium Schema fortsetzen bis Zuflussrate auf 0,8 ml/min verdoppelt wird
Ernte für darauffolgenden Tag initiieren	

3.3 T-Zell Proliferationsassay

Um die Auswirkungen von MSC auf die Proliferation von T-Zellen zu testen, wurden PBMC / MSC Ko-Kultur Experimente durchgeführt. Zu Beginn wurden MSC in 24 Well Platten ausgesät, um diese anwachsen und äquilibieren zu lassen. Nach 24h folgte die Zugabe von $1*10^6$ frischen PBMC, die zuvor mit 1µM CFSE, für 10 min bei 37°C im Dunkeln, gefärbt wurden. Die Proliferation der PBMC wurde mit je 0,1 µg / ml CD3 und CD28 Antikörper induziert. Nach einer Inkubation von 5 Tagen in PBMC/Co-Kulturmedium (siehe Tabelle 2.5) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 wurden die PBMC mit monoklonalen Antikörpern gegen CD4 und CD8 gefärbt. Für die Färbung wurden die PBMC mit PBS gewaschen und nach Zugabe von AB-Serum zur Unterbindung unspezifischer Bindungen der Antikörper für 30 min bei 4°C inkubiert. Vor der Messung am Durchflusszytometer wurde zur Detektion von toten Zellen Sytox Farbstoff hinzugegeben. Die CFSE Intensität wurde auf CD4+ und CD8+ Zellen per FACSCanto II Durchflusszytometer mit BD FACS DIVA, Vers. 6.0, gemessen. Weitere Analysen wurden mit FlowJo, Vers.7.6.5 und GraphPad Prism, Vers. 5.01 durchgeführt.

3.3.1 Versuchsdurchführung CFSE Färbung:

- Wasserbad auf 37°C erhitzen
- PBMC in PBS aufnehmen (5x10^6 PBMC / ml)
- Reaktionsgefäß mit Alufolie umwickeln
- CFSE (1µM Endkonzentration) zugeben
- 10min ins Wasserbad stellen (37°C)
- Lösung bei 500g für 5min zentrifugieren, anschließend Überstand dekantieren
- Pellet in 37°C warmen PBMC Medium (1x10^6 PBMC / ml) resuspendieren
- 15min ins Wasserbad stellen (37°C)
- Lösung bei 500g für 5min zentrifugieren, anschließend Überstand dekantieren
- Pellet in 37°C warmen PBMC Medium (1x10^6 PBMC / ml) resuspendieren

3.3.2 Versuchsdurchführung Antikörper Färbung:

- PBMC in FACS Tube pipettieren. Dabei eventuelle Cluster durch Auf und Ab-pipettieren vereinzeln
- Lösung bei 500g für 5min zentrifugieren, anschließend Überstand dekantieren
- Pellet in 1 ml PBS resuspendieren
- Lösung bei 500g für 5min zentrifugieren, anschließend Überstand dekantieren
- 10 µl AB Serum hinzugeben
- Antikörper hinzugeben und kurz durchmischen
- 30 min auf Eis im Dunkeln inkubieren
- 1 ml PBS hinzugeben
- Lösung bei 500g für 5min zentrifugieren, anschließend Überstand dekantieren
- Pellet in Restvolumen resuspendieren
- Messung per Durchflusszytometrie

3.3.3 CD274 Expression auf MSC in Ko-Kultur

Zur Detektion der CD274 (PD-L1) Expression auf MSC im T-Zell Proliferationsassay wurden diese, analog zu den gemessenen PBMC, nach Ende des T-Zell

Proliferationsassays (siehe Abschnitt 3.3), mit monoklonalen Antikörpern gegen CD45, CD90 und CD274 gefärbt (Durchführung wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben)und nach Zugabe von Sytox am FACS gemessen.

3.4 Differenzierungen von MSC

3.4.1 Adipogene Differenzierung

Die Differenzierung in adipogene Zellen wurde mit Hilfe des NH-AdipoDiff Media von Mitltenyi nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden 8.500 Zellen pro cm² in 35 mm Zellkulturschalen mit NH-AdipoDiff-Medium ausgesät und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Alle 3-4 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach 18-21 Tagen und Bildung der typischen Lipidtröpfchen wurden die Zellen mit 0,5% Oil-Red O Lösung für 20 Minuten gefärbt. Schließlich wurde nach dem Abwaschen der Färbelösung Aqua dest. auf die Zellen gegeben und die Färbung unter dem Lichtmikroskop fotografiert.

Vorgehensweise:

- Zellsuspension mit $7{,}5x10^4$ MSC in 1,5 ml NH-Adipo Diff herstellen
- Zellsuspension in eine kleine Zellkulturschale (35 mm) pipettieren
- Feuchte Kammer herstellen: Dazu 2- 3 kleine 35mm-Zellkulturschalen mit 1,5 ml sterilem Aqua dest befüllen. Diese unverschlossen zusammen mit den Proben in eine große Zellkulturschale (145 mm) stellen.
- Verschlossene, große Zellkulturschale bei 37°C und 5% CO_2 inkubieren
- Alle 3 Tage das NH Adipo Medium wechseln
- Nach ca. 3 Wochen Kultur Zellen Anfärben und Auswerten
- Dazu eine 0,5% Oil red O Lösung mit Isopropanol herstellen
- Medium aus Zellkulturschale komplett entfernen
- 2 x mit jeweils 2 ml PBS waschen
- PBS komplett entfernen
- 2 ml Methanol hinzufügen
- 5 Min. inkubieren lassen
- Methanol komplett entfernen
- 2 x mit jeweils 2 ml Aqua dest. waschen

- 1,5 ml 0,5% Oil Red O Lösung mit 1 ml Aqua dest. mischen und 2 ml der Lösung in Kulturschale pipettieren
- 20 Min. bei RT auf einer Schüttelplattform inkubieren
- 2 x mit jeweils 2 ml Aqua dest. waschen
- Aqua dest. komplett entfernen
- 300 µl Aqua dest. je Schale pipettieren, um die Zellen feucht zu halten
- Differenzierung sofort durchführen.

3.4.2 Osteogene Differenzierung

Die osteogene Differenzierung der Zellen wurde in 35 mm Zellkulturschalen mit 5.000 Zellen pro cm² in NH-OsteoDiff Medium durchgeführt. Nach einer 10-15 tätigen Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO_2), bei 2-3 tägigen Mediumwechseln, wurden die Zellen mit Aceton/Methanol (1:1) für 5 min bei -20°C fixiert. Anschließend wurde eine von Kossa-Färbung (Meloan and Puchtler 1985) der extrazellulären Kalziummatrix durchgeführt, indem die Zellen mit 5 % Silbernitrat - Lösung für 20 min auf einer Schüttelplattform bei RT inkubiert wurden. Nach Abspülen der Färbelösung mit PBS wurde die Färbung per Lichtmikroskop dokumentiert.

Vorgehensweise:

- Zellsuspension mit $4{,}5x10^4$ MSC in 1,5 ml NH-Osteo Diff herstellen
- Zellsuspension in eine kleine Zellkulturschale (35 mm) pipettieren
- Feuchte Kammer herstellen: Dazu 2- 3 kleine 35mm Zellkulturschalen mit 1,5 ml sterilem Aqua dest befüllen. Diese unverschlossen zusammen mit den Proben in eine große Zellkulturschale (145 mm) stellen.
- Verschlossene, große Zellkulturschale bei 37°C und 5% CO_2 inkubieren
- Alle 3 Tage das NH Osteo Medium wechseln
- Nach ca. 10 Tagen Kultur Zellen anfärben und auswerten
- Dazu 5%iger Silbernitratlösung herstellen
- Medium aus Zellkulturschale komplett entfernen
- 2 x mit jeweils 2 ml PBS, waschen
- PBS komplett entfernen
- Zellen mit -20°C kaltem Methanol bedecken
- 5 min bei -20°C inkubieren
- Methanol entfernen und mit 2 ml Aqua dest. waschen

- mit 5%iger Silbernitratlösung bedecken und maximal 10 min unter UV- Lampe stellen
- mit 2 ml Aqua dest. waschen
- 2 min mit 5%iger Natriumthiosulfatlösung fixieren
- Natriumthiosulfatlösung entfernen und 2x mit Aqua dest. spülen300 µl Aqua dest. je Schale pipettieren, um die Zellen feucht zu halten.
- Differenzierung sofort durchführen.

3.5 Bestrahlung von MSC

Zur Testung des Einflusses von γ-Strahlung auf Vitalität, Proliferation und die T-Zell supprimierende Eigenschaft auf MSC, wurden diese mit verschiedenen Dosen bestrahlt.

3.5.1 Vitalitätstestung nach Bestrahlung

Um den Einfluss von γ-Strahlung auf Vitalität und Apoptose auf MSC zu überprüfen, wurden 5.000 Zellen / cm² in T-25 Zellkulturflaschen ausgesät und mit 0, 30, 90, 180 und 240 Gray bestrahlt. Nach Bestrahlung mit dem Gerät X-Rad320iX wurden die Proben für 3 Tage im Brutschrank (37°C, 5% CO_2) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, nach Ablösen aus der Flasche und Waschen in PBS, für 15min bei RT mit AnnexinV (annexinV apoptosis detection kit) angefärbt. Nach Zugabe von DAPI wurden die Proben umgehend per Durchflusszytometer (LSR II) gemessen.

3.5.2 Proliferation nach Bestrahlung

Vor Bestrahlung wurden die Zellen mit CFSE, analog wie in Abschnitt 3.3 aufgeführt markiert und in T-25 Zellkulturflaschen mit 5.000 Zellen/ cm² ausgesät. Danach wurden die Ansätze mit den Dosen 0, 30, 60, 90 und 120 Gray bestrahlt. Als nichtproliferierende Kontrolle dienten Zellen, deren Kulturmedium mit 1mM Colchicin versetzt wurde. Colchicin hemmt als Gift der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*) die Mitose. Die in T-25 Zellkulturflaschen bestrahlten Zellen wurden für 7 Tage im Brutschrank inkubiert.

3.5.3 T-Zell supprimierende Eigenschaft nach Bestrahlung

Die in den Dosen 0, 30 und 60 Gray bestrahlten MSC wurden für den T-Zell Proliferationsassay wie in Abschnitt 0 beschrieben verwendet. Als einziger Unterschied zur beschriebenen Methode wurden bestrahlte MSC in die 24 Well-Platte verbracht.

3.6 MSC unter Hypoxie Bedingungen

Zur Testung des Einflusses von Hypoxie Konditionen auf das Wachstum und die T-Zell-supprimierende Kapazität von MSC wurden diese mit 5% O_2 im Brutschrank begast. Dieser Zustand wurde als Hypoxie definiert. Im Gegensatz dazu wurden normoxische Bedingungen als 21% O_2 Gasanteil in der Begasung festgelegt (siehe Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3 Normoxie und Hypoxie Bedingungen

Gasanteil (%)	Normoxie	Hypoxie
O_2	21	5
CO_2	5	5
N_2	74	90

3.6.1 Proliferation von MSC unter Hypoxie Bedingungen

Zur Analyse der Proliferation wurden 3.000 MSC / cm² unter Hypoxie und Normoxie Bedingungen inkubiert. Nach 3 Tagen oder Erreichen von 80% Konfluenz, wurden sowohl die MSC unter Normoxie als auch die Zellen, die unter Hypoxie kultiviert wurden, geerntet. Nach Anfärben mit Trypanblau wurden die lebenden Zellen mit Hilfe eines Hämozytometers gezählt. Dieses Vorgehen wurde für weitere 5 Passagen fortgeführt.

3.6.2 T-Zell suppressives Potential von Hypoxie kultivierten MSC

MSC aus Hypoxie- und Normoxie-Kulturen wurden in dem im Abschnitt 3.3 beschriebenen T-Zell Proliferationsassay auf ihre T-Zell supprimierenden Eigenschaften getestet.

3.7 Durchflusszytometrische Charakterisierung von MSC

Zur Analyse der Oberflächenmarker Expression von MSC wurden sowohl Zellen aus Normoxie- als auch Zellen aus Hypoxie-Kulturen, nach 7-tägiger Kultur im Brutschrank, per Durchflusszytometrie gemessen. Hierfür wurden die Proben 30 min bei 4°C mit Antikörper gegen CD14, CD19, CD34, CD45, CD73, CD105, CD90 und HLA-DR (siehe Tabelle 2.8) angefärbt (siehe 3.3.2), anschließend mit PBS gewaschen und resuspendiert. Die Proben wurden mit Hilfe eines Durchflusszytometers (FACSCalibur), ausgestattet mit 4 Farben und der Software CellQuest Pro, gemessen. Als Negativkontrollen wurden die Isotypen-Klone der entsprechenden Antikörper verwendet (siehe Tabelle 2.8). Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der Software FlowJo analysiert.

3.8 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte angegeben. Die Standardabweichung wurde aus unabhängig durchgeführten Experimenten berechnet. Statistische Analysen zur Berechnung der Wahrscheinlichkeit von Unterschieden wurden mit Hilfe des Student's t-test oder der einfaktoriellen Varianzanalyse, mit nachgeschaltetem Bonferroni-Test, unter Verwendung der Software GraphPad Prism Vers. 5.01, durchgeführt. P-Werte von $< 0{,}05 < 0.01$, und < 0.001 wurden als signifikant erachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Expansion von MSC im Bioreaktor

Es wurde der Einfluss des Bioreaktors auf Vitalität, Wachstumsrate, Phänotyp und Suppressions-Potential der MSC überprüft.

Zur Kontrolle der Proliferation der MSC wurden, ab Beginn der Expansion, Laktat sowie Glukosewerte im Medium bestimmt. Diese sollen als Indikator für das Wachstum der Zellen im Reaktor dienen. Abbildung 4.1 zeigt die Entwicklung der Laktat- und Glukosewerte einer exemplarischen Expansion. Erkennbar sind der typische, ansteigende Verbrauch von Glukose und die daran gekoppelte Laktatentstehung, anhand des gegensätzlichen Verlaufs beider Kurven.

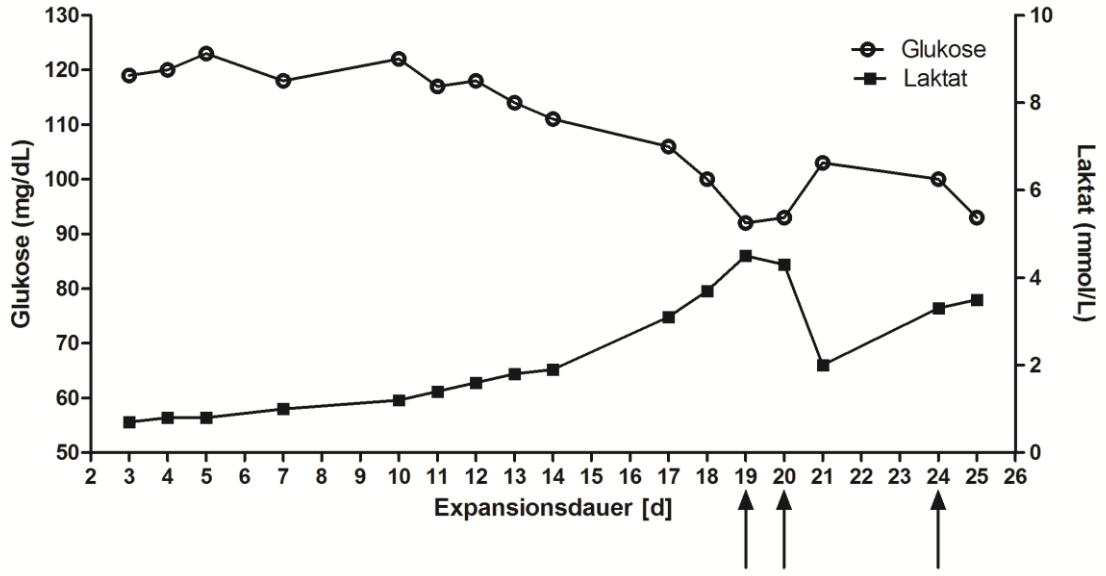


Abbildung 4.1 Exemplarischer Verlauf der Lakatgeneration sowie des Glukosekonsum während der Expansion von MSC im Bioreaktor.
Der Konsum von Glukose verläuft gegensätzlich zur Laktatentstehung. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der jeweiligen Verdopplung des Mediumzuflusses. Adaptiert aus Nold et al., 2012

In Tabelle 4.1 sind die erreichten Zellmengen nach Expansion aus Knochenmarkaspirat (primäre Expansion) bzw. aus vorselektierten MSC (Tabelle 4.2) aufgetragen. Es zeigt sich eine Korrelation von Expansionsdauer und Zellzahl nach Ernte.

Tabelle 4.1 MSC Expansion aus primären Knochenmarkaspirat.
Modifiziert aus: Nold et al., 2012.

Spender	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Knochenmarkaspirat (ml)	30	8	30	26	32	30
Expansionsdauer (Tage)	15	19	15	18	27	14
Zellernte (Mio.)	2	6	7	9	58	125

Tabelle 4.2 Expansion vorselektierter MSC.
Modifiziert aus: Nold et al., 2012.

Spender	**A**	**B**	**C**	**D**	**5**	**6**
ausgesäte Zellen (Mio.)	2	3.5	5	5.9	7.6	17
Expansionsdauer (Tage)	6	11	13	13	13	11
Zellernte (Mio.)	18.7	50	98	124	17.2	418
Faktor Expansion	9.4	14.2	20	21	2.3	24

4.2 Charakterisierung von Bioreaktor expandierten MSC

MSC wurden in HPL-Medium, bestehend aus individuellen Plättchenlysaten im Bioreaktor expandiert. Direkt nach Beendigung der Expansion schlossen sich Differenzierungs- sowie Immunphäntoypisierungsversuche an.

4.2.1 MSC aus dem Bioreaktor exprimieren typische Oberflächenmarker

Umgehend nach Ernte des Bioreaktors wurden die Zellen auf die Expression der nach ISCT Kriterien definierten Marker (Dominici et al. 2006) überprüft.
Abbildung 4.2 zeigt exemplarisch die Expression charakteristischer MSC-Marker von bioreaktor-expandierten MSC, im Vergleich zu MSC aus Flaschenkultivierung. Beide Kultivierungsarten führten zu vergleichbarer Markerexpressionen. Beide exprimieren CD73, CD90 und CD105, aber nicht CD14, CD19, CD34, CD45 und HLA-DR. Dabei zeigen bioreaktor-expandierte MSC eine konstant niedrige Expression der Marker CD14 und CD19 bzw. eine hohe Expression von CD73 und CD105.

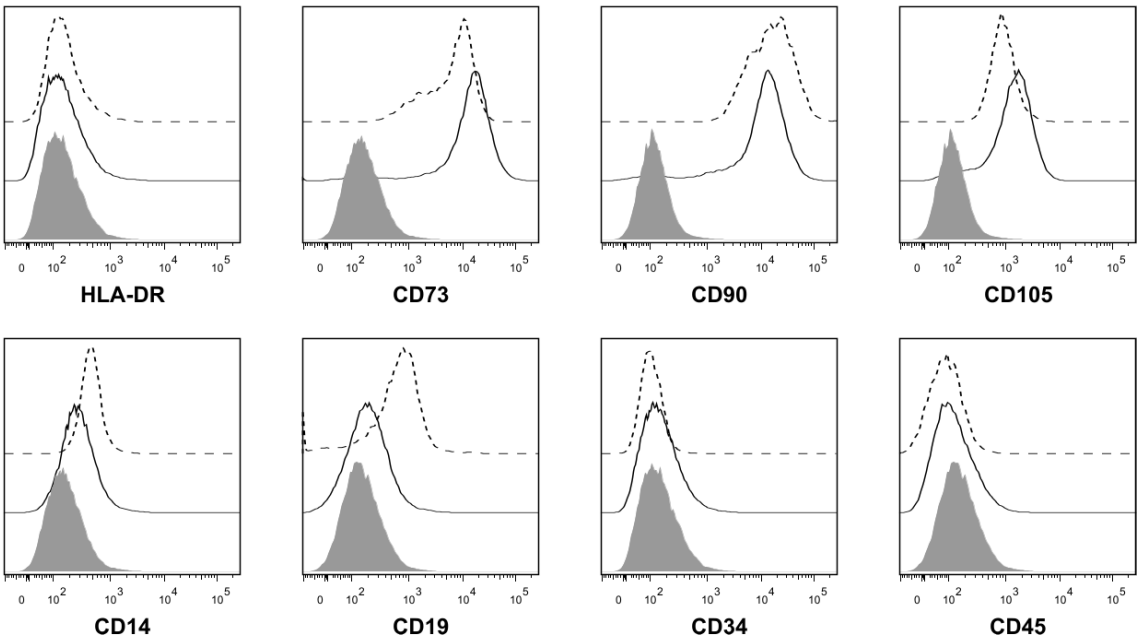


Abbildung 4.2 Typische Expression von charakteristischen Markern für MSC aus Bioreaktor bzw. Flaschenkulturen.
Repräsentative FACS - Histogramme der MSC Oberflächenmarker; schwarze Linie = MSC expandiert im Bioreaktor, gestrichelte Linie = MSC aus Flaschenkultur, ausgefüllte graue Kurve = Isotyp Kontrolle

In Tabelle 4.3 sind die Expressionen der jeweiligen Oberflächenmarker, der einzelnen Bioreaktor-Expansionen, zusammenfasst. Die Expansionen No. 4 und 5, bei denen aus primären Knochenmarkaspirat expandiert wurde, zeigen gegenüber den Läufen mit vorselektierten MSC eine vergleichsweise erhöhte Expression der Marker CD14, 19 und 34.

Tabelle 4.3 Expression von Oberflächenmarkern nach ISCT-Kriterien auf MSC nach Kultivierung im Bioreaktor.
Selektierte MSC (Sel. MSC) wurden in Flaschenkulturen per Adhärenz vorkultiviert. KMA = Knochenmarkaspirat, n.a. = nicht akquiriert

	Spender	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
	Quelle	Sel. MSC	Sel. MSC	Sel. MSC	KMA	KMA	Sel. MSC	Sel. MSC	KMA	Sel. MSC	Sel. MSC
Negative Marker [%]	**CD14**	0,44	0,21	0,87	8,32	1,63	1,44	0,47	0,1	0,17	1,45
	CD19	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,88	0,1	1,58	0,97
	CD34	0,44	0,48	0,06	4,54	1,66	1,47	0,39	0	0,02	0,14
	CD45	0,48	0,34	0,02	0,32	0,24	0,7	0,15	0,2	0,04	0,46
	HLA-DR	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,24	0,31	1,1	0,59	0,51
Positive Marker [%]	**CD73**	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	97,02	92	99	99,8	92,5
	CD90	n.a.	99,97	96,33	85,95	94,05	98,36	99,17	98,9	99,8	92,27
	CD105	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	89,41	96,22	99,4	98,9	90,93

4.2.2 MSC aus dem Bioreaktor erhalten ihr Differenzierungspotential

Analog zur Immphänotypbestimmung wurden Differenzierungsversuche im Anschluss der Zellexpansion im Bioreaktor initiiert.
Eine Anfärbung der charakteristischen Fettvakuolen für Adipozyten wurde erfolgreich mit Oli-Red-O durchgeführt, wie in. Abbildung 4.3 darstellt. Die nach von Kossa-Färbung schwarz erscheinenden Kalziumablagerungen, lassen die Differenzierung der MSC in Osteozyten erkennen (Abbildung 4.3).

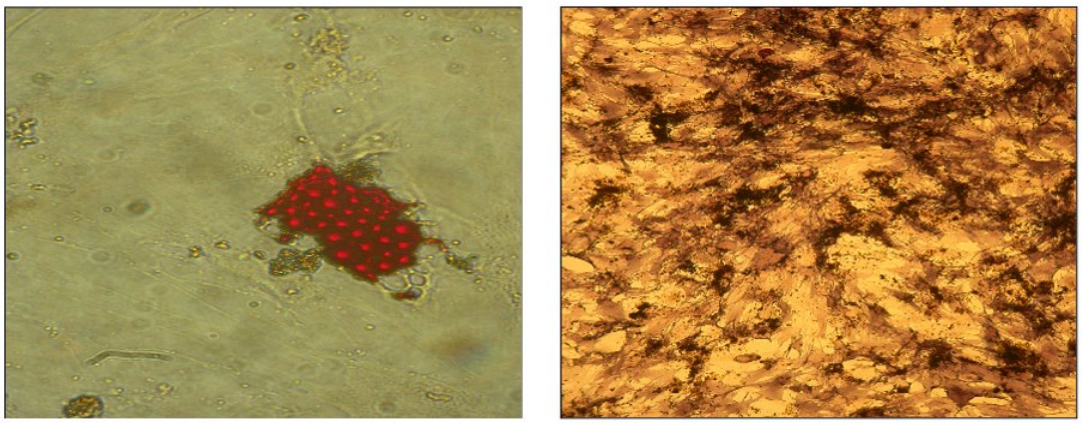


Abbildung 4.3 *In Vitro*-Differenzierung von MSC in Adipozyten (links) und Osteozyten (rechts). Die rot erscheinenden Fettvakuolen wurden mit Oil-Red-O und die schwarzen Kalziumablagerungen wurden mit $AgNO_3$ angefärbt. Adaptiert aus Nold et al., 2012.

4.2.3 Hemmung der T-Zell Proliferation durch Bioreaktor MSC

In Abbildung 4.4 ist die Hemmung der CD4+ und CD8+ T-Zell-Proliferation durch MSC aus dem Bioreaktor dargestellt. MSC inhibieren signifikant die Proliferation von stimulierten allogenen PBMC sowohl der CD4+ als auch der CD8+ T-Zellen. Diese Hemmung verläuft abhängig der eingesetzten Dosis an MSC. So lag die Proliferation bei Zugabe von 10% MSC im Mittel bei 71% bzw. bei Zugabe von 20% MSC bei 58% der CD4+ Zellen. Es fallen bei jeder Dosis Spender auf, die eine deutliche Hemmung der Proliferation der T-Zellen zur Folge hatten. So ist z.B. die Proliferation der CD8+ Zellen bei Zugabe von 20% MSC bei einem Spender auf 3% gesunken.

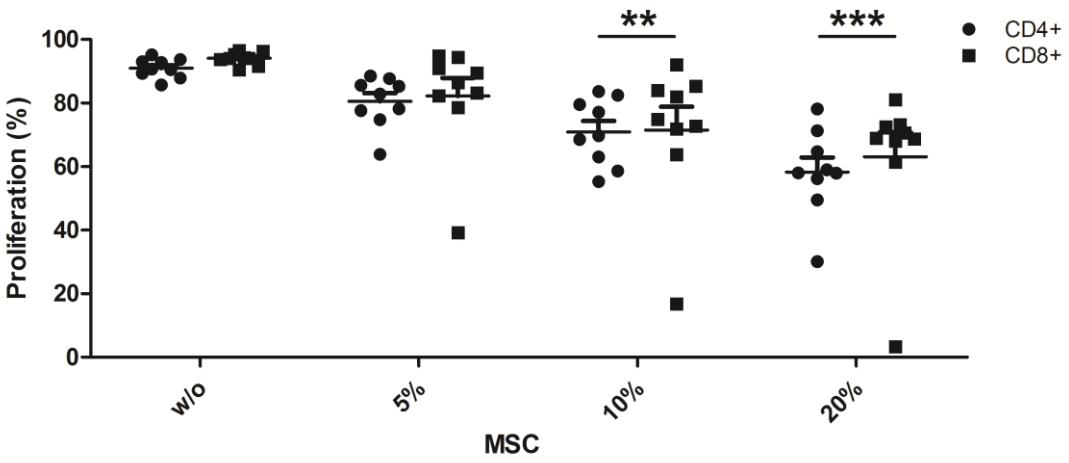


Abbildung 4.4 Dosisabhängige Hemmung der T-Zell-Proliferation.
Die Ko-Kultur von 10% bzw. 20% bioreaktorexpandierten MSC führte zu einer signifikanten Hemmung der T-Zell Proliferation gegenüber der Kontrolle (kultiviert ohne MSC), n=9. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen; **p < 0,01; ***p < 0,001. Adaptiert aus: Nold et al., 2012.

4.2.4 Differentielles Ansprechverhalten von T-Zellen auf MSC-Ko-Kultur

Um zu untersuchen, ob die Hemmung der T-Zell Proliferation durch MSC nur von den Eigenschaften der MSC abhängt oder, ob auch die T-Zellen der einzelnen PBMC Spender ein unterschiedliches Ansprechen zeigen, wurden PBMC mehrerer Spender mit gleichen MSC-Linien im T-Zell Proliferationsassay überprüft. In Abbildung 4.5 sind die Proliferationsraten von CD4+ und CD8+ T-Zellen dargestellt. So zeigen die T-Zellen in Abbildung 4.5 (A) jeweils ein differentielles Ansprechen auf die supprimierdene Wirkung der eingesetzten MSC Linie. Während die T-Zellen des PBMC Spenders A stark durch die MSC Linie in ihrer Proliferation gehemmt werden, sprechen die T-Zellen des Spenders C deutlich schlechter auf die gleiche MSC Linie an. In Abbildung 4.5 (B) ist das Ansprechen der T-Zellen eines PBMC Spenders auf die T-Zell Proliferationshemmung vier verschiedener MSC Linien dargestellt. Es zeigt sich ein differentiell starkes Ansprechen der T-Zellen auf die jeweiligen eingesetzten, unterschiedlichen MSC Linien. Während MSC Linie I die T-Zell Proliferation des PBMC Spenders nur in geringem Maße hemmte, konnte z.B. die MSC Linie IV einen deutlich stärkeren supprimierenden Effekt ausüben (siehe auch Anhang Tabelle 1).

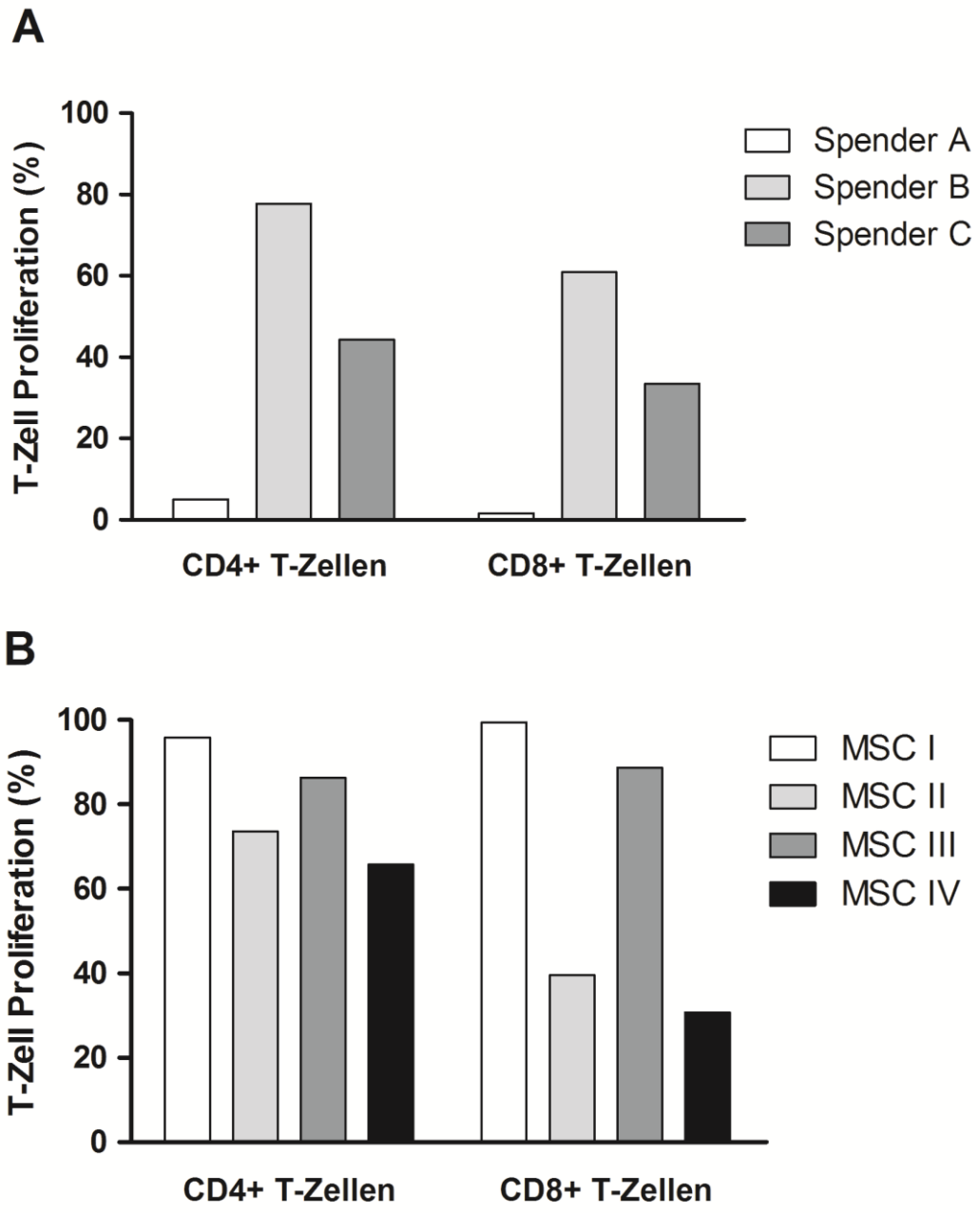


Abbildung 4.5 Spenderabhängiges, immunsuppressives Potential von MSC.
Aufgetragen ist jeweils die Proliferationsrate der CD4+- und CD8+-Zellen der PBMC-Spender als Prozentangabe, abhängig von der im jeweiligen Ansatz verwendeten Positivkontrolle. In (A) sind die verringerten Proliferationsraten der T-Zellen aller drei PBMC-Spender, unter Einfluss einer MSC Linie, dargestellt. Es ergaben sich deutliche Unterschiede in der Proliferationshemmung durch die gleiche MSC Linie zwischen den einzelnen Spendern A, B und C. In (B) ist die T-Zell Proliferation eines PBMC-Spenders in Abhängigkeit unterschiedlicher MSC Linien aufgetragen. So konnte die MSC Linie I nicht die T-Zell Proliferation hemmen, wohingegen die T-Zellen durch MSC Linie IV, deutlich in ihrer Proliferation gehemmt wurden. Die Experimente wurden gemeinsam mit der Masterstudentin Tabea Riedlinger durchgeführt (Riedlinger 2014).

4.2.5 CD274 Expression von MSC im T-Zell Proliferationsassay

Die im T-Zell Proliferationsassay verwendeten ko-kultivierten MSC exprimieren signifikant mehr CD274, im Vergleich zu MSC, die ohne PBMC ko-kultiviert wurden (siehe Abbildung 4.6). Die alleinige Kultur von MSC mit CD3/28 ist ebenfalls nicht mit erhöhter PD-L1 Expression verbunden.

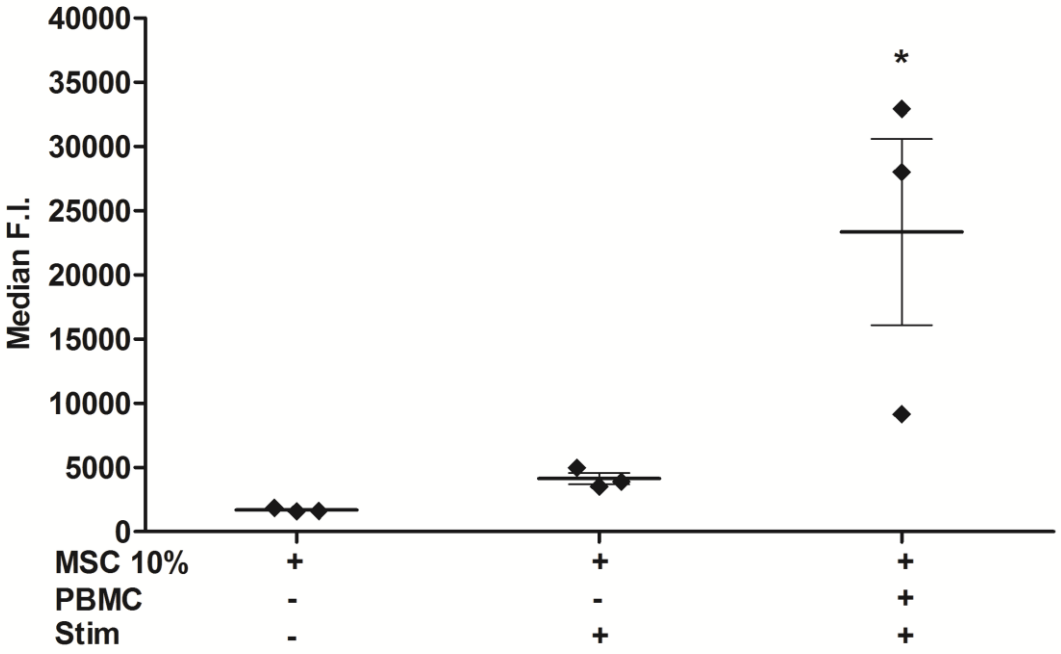


Abbildung 4.6 Expression von CD274 auf MSC.
Ohne Ko-Kultur mit stimulierten PBMC (links), nach Zugabe der Stimulations-Antikörper CD3/CD28 (Mitte) und in Ko-Kultur mit stimulierten PBMC (rechts), n=3. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen; *p < 0,05. Adaptiert aus: Nold et al., 2014.

4.3 Einfluss von Kryokonservierung auf MSC

Die nach Expansion im Bioreaktor gewonnen MSC wurden in N_2 eingefroren, um den Einfluss der Kryokonservierung auf Vitalität und das immunmodulatorische Potential der Zellen zu überprüfen.

4.3.1 MSC zeigen nach Auftauen hohe Vitalität

Nach Auftauen der Zellen wurden diese umgehend, per Trypanblaufärbung in der Zählkammer, auf ihre Vitalität kotrolliert. Tabelle 4.4 zeigt die Vitalität von 6 unabhängigen MSC Expansionen aus dem Bioreaktor. Die Vitalität ist konstant über 80%.

Tabelle 4.4 Vitalität von MSC vor- und nach Auftauen anhand Trypanblau-Färbung bestimmt per Hemazytometer.
Selektierte MSC (Sel. MSC) wurden in Flaschenkulturen per Adhärenz kultiviert. KMA = Knochenmarkaspirat.

	Spender	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**STABW**
	Quelle	Sel. MSC	Sel. MSC	Sel. MSC	KMA	KMA	KMA	
Vor Kryo-konservierung	**Zellzahl [x10^6]**	7	7	5	6	7	10	
	Lebende Zellen [%]	99	99	92	89,50	94,5	94	3,79
Dauer Kryo-konservierung [t]		18	21	35	17	18	193	
Nach Kryo-konservierung	**Zellzahl [x10^6]**	5,91	6,00	4,94	5,21	5,81	7,36	
	Lebende Zellen [%]	83,42	95,83	85,02	84,84	92,25	95,07	5,61

4.3.2 Lange Kryokonservierung beeinträchtigt die T-Zell-suppressiven Eigenschaften von MSC

In Abbildung 4.7 ist der Einfluss von Kryokonservierung auf die suppressiven Eigenschaften von MSC im T-Zell Proliferationsassay dargestellt. Eine Krykonservierung von über 10 Monaten führte zu signifikant höheren T-Zell Proliferationsraten im Vergleich zu MSC, die kürzer eingefroren waren.

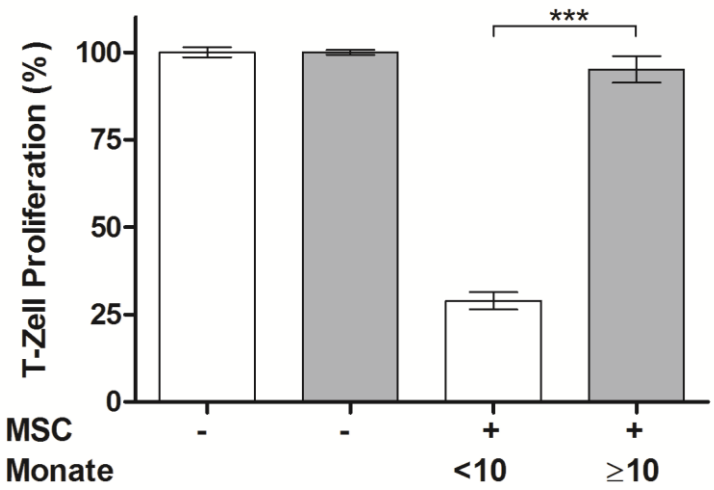


Abbildung 4.7 Suppression der T-Zell Proliferation von MSC die unter bzw. über 10 Monaten kryokonserviert wurden, n=3.
Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen; ***p < 0,001. Adaptiert aus: Nold et al., 2014.

4.4 Einfluss von Kulturbedingungen auf T-Zell-suppressive Eigenschaften von MSC

Zur Untersuchung des Einflusses von Zellkulturbedingungen, wie Passagezahl und Äquilibrierungsdauer, nach Auftauen auf die MSC, wurden T-Zell Assays nach den genannten Parametern ausgewertet.

4.4.1 MSC mit hoher Passagezahl induzieren eine reduzierte T-Zell-Proliferationshemmung

Abbildung 4.8 zeigt den Verlust des hemmenden Potentials von MSC, die mehr als 5-mal (Median 6) passagiert wurden auf die T-Zell Proliferation. Im Gegensatz dazu hemmen MSC, die geringere Passagezahlen als 5 (Median 2) aufweisen, die T-Zell Proliferation signifikant besser.

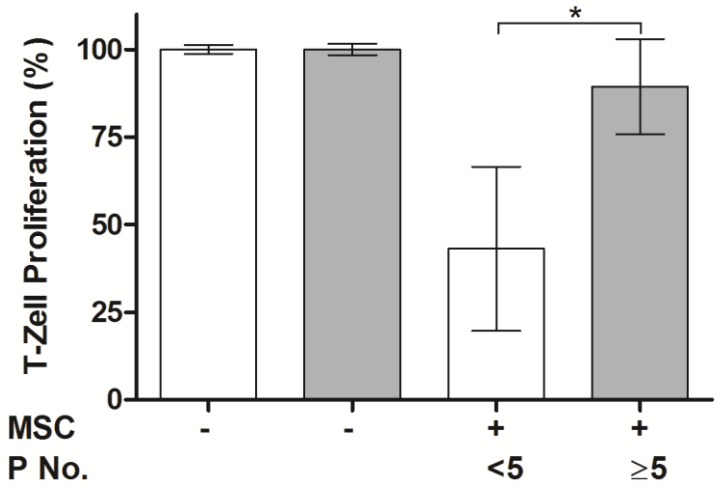


Abbildung 4.8 Verminderte T-Zell Proliferationshemmung durch MSC in Passagen ≥5, n=3. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen; *p < 0,05. Adaptiert aus: Nold et al., 2014.

4.4.2 Aufgetaute MSC erlangen ihr supprimierendes Potential nach Äquilibrierung zurück

MSC, die direkt nach auftauen im T-Zell Proliferationsassay verwendet wurden, wiesen einen temporären Verlust ihrer suppressiven Kapazität auf. Eine Äquilibrierungsdauer von 5 Tagen oder mehr (Median 7), führte zu einer signifikant stärkeren T-Zellsuppression (siehe Abbildung 4.9).

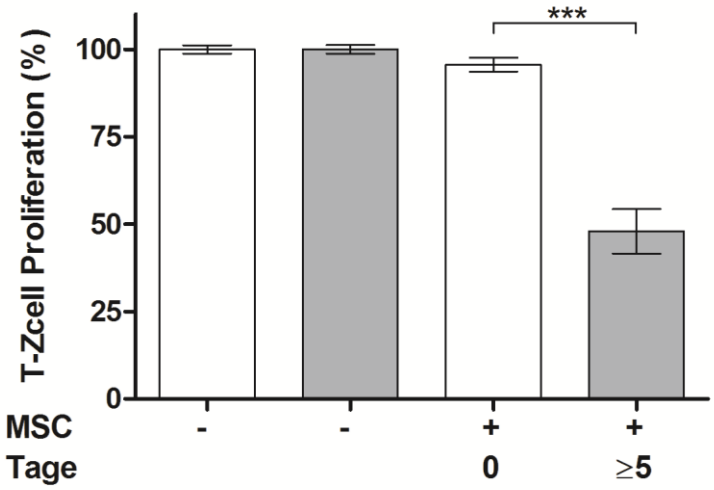


Abbildung 4.9 Wiedererlangen des supprimierenden Potentials von MSC auf T-Zellen, nach Äquilibrierung.
Eine Äquilibrierungsdauer von ≥5 Tagen, vor Beginn des T-Zell Proliferationsassays, stellt dieses Potential wieder her, n=6. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen; ***p < 0,001. Adaptiert aus: Nold et al., 2014.

4.5 Kultivierung von MSC unter Hypoxiebedingungen

In Abbildung 4.10 sind die Zellzahlen von MSC, die unter Normoxie sowie Hypoxie (siehe auch Tabelle 3.3) gewachsen sind, über mehrere Passagen aufgetragen. Es zeigt sich, dass MSC die unter Hypoxie inkubiert wurden, im Vergleich zu normoxisch kultivierten MSC siginifikant höhere Zellzahlen erreichten.

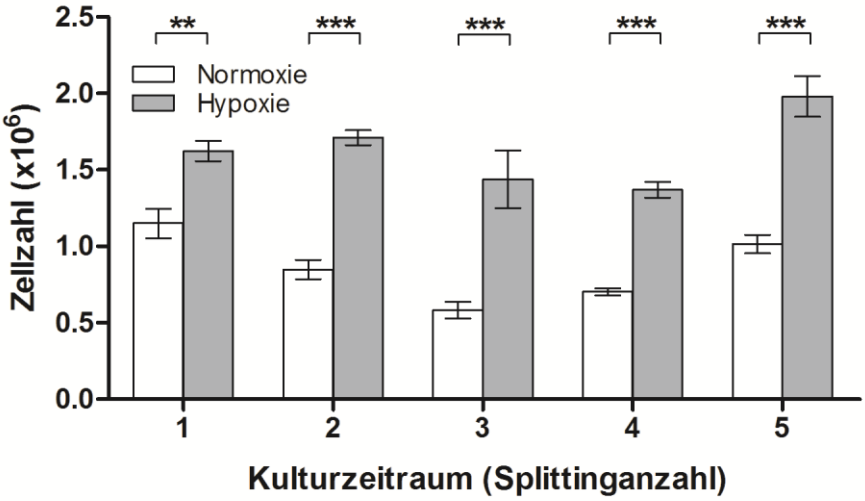


Abbildung 4.10 Gesteigertes Zellwachstum unter Hypoxie.
Es wurde die gleiche Anzahl an MSC ausgesät und unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen für 3 Tage oder bis zu 80% Konfluenz kultiviert und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Zellen erneut in gleicher Zellzahl aufgeteilt und beiden Kulturbedingungen zugeführt, n=4. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen; **p < 0,01; ***p < 0,001. Adaptiert aus: Nold et al., 2014.

Hypoxie Bedingungen im Vergleich zu normoxischen Bedingungen führten zu keiner Änderung der Oberflächenexpression charakteristischer MSC Marker. Dies ist in Abbildung 4.11 dargestellt.

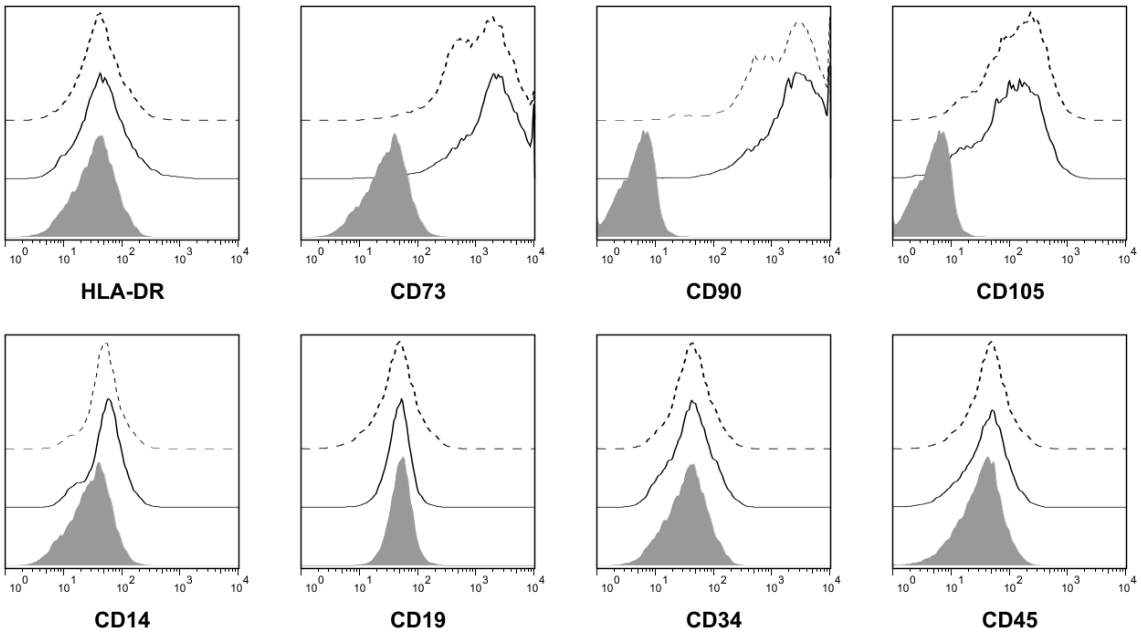


Abbildung 4.11 MSC, die in normoxischen oder hypoxischen Kulturbedingungen expandiert wurden weisen keine Unterschiede in ihrem Immunphänotyp auf.
Exemplarische FACS-Histogramme der MSC Oberflächenmarker; normoxische (schwarze Linie) und hypoxische (gestrichelte Linie) Kulturbedingungen, ausgefüllte graue Kurve = Isotyp Kontrolle. Modifiziert nach: Nold et al., 2014.

4.5.1 Hypoxisch kultivierte MSC supprimieren die T-Zell Proliferation

MSC, die nach Hypoxie-Kultur im T-Zell Proliferationsassay erprobt wurden, zeigten im Vergleich zu normoxisch kultivierten MSC keine Änderung in ihrem Potential die Proliferation von T-Zellen zu supprimieren (siehe Abbildung 4.12).

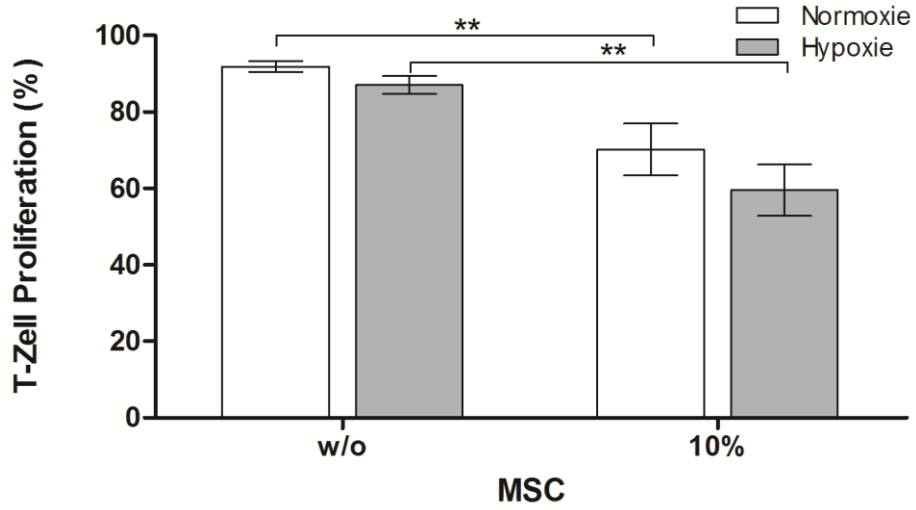


Abbildung 4.12 Signifikante Hemmung der T-Zell Proliferation von MSC die unter Normoxie bzw. Hypoxiebedingungen kultiviert wurden, n=5.
Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen; **p < 0,01. Adaptiert aus: Nold et al., 2014.

4.6 Effekt von γ-Bestrahlung auf MSC

MSC, die in verschiedenen Dosen bestrahlt wurden, zeigen veränderte Vitalitäts-, Proliferations- und immunologische Eigenschaften.

4.6.1 MSC zeigen relativ hohe Resistenz gegenüber γ-Bestrahlung

Abbildung 4.13 zeigt den Einfluss von 0, 30, 90, 180 und 240 Gray auf die Vitalität und die Apoptose von MSC. Die Annexin- und DAPI- negative Population steht für den Anteil vitaler MSC. Es zeigt sich keine signifikante Beeinträchtigung der Vitalität der MSC durch die verwendeten Strahlendosen.

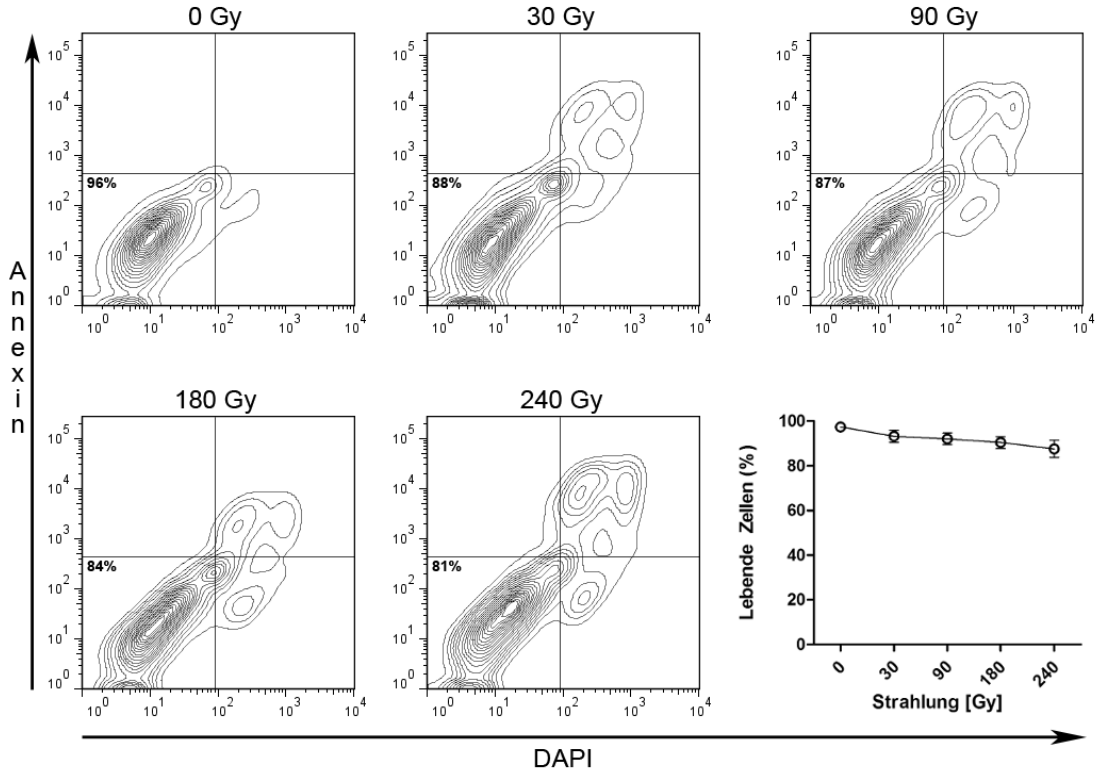


Abbildung 4.13 Durchflusszytometrische Analyse der Vitalität von MSC nach Bestrahlung. Diese wurde per Annexin/DAPI Färbung 3 Tage nach Bestrahlung gemessen. Das Diagramm stellt das Ergebnis von 3 unabhängigen Versuchen dar. Darin sind Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt. Adaptiert aus: Nold et al., 2014.

4.6.2 γ-Strahlung beeinflusst die Proliferation von MSC

Abbildung 4.14 zeigt die Proliferation von MSC nach γ-Bestrahlung und Anschließender 7-tägiger Inkubation. Eine Bestrahlung mit 30 Gray hemmt die Proliferation von MSC ähnlich stark wie eine Vorbehandlung mit dem Mitosegift

Colchicin. Einer Erhöhung der Strahlendosis bis zu 120 Gray führt nicht zu einer stärkeren Hemmung (siehe auch Anhang Abbildung 1).

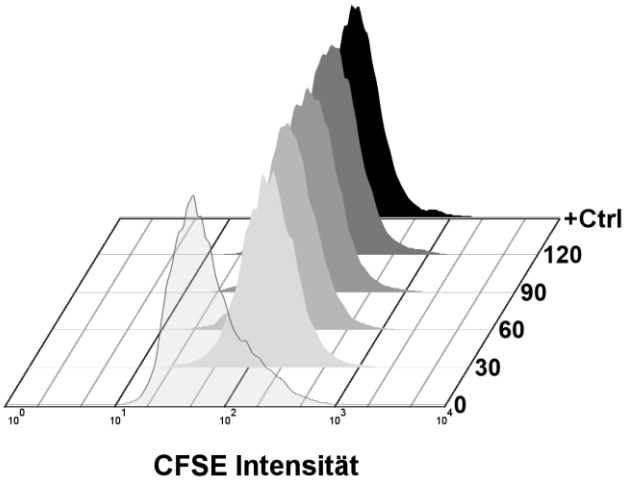


Abbildung 4.14 Repräsentatives Histogramm für den Verlust der Proliferationsfähigkeit von MSC nach Bestrahlung.
CFSE gefärbte MSC wurden 7 Tage nach Bestrahlung per FACS analysiert. Als Positiv-Kontrolle (+Ctrl) dienten mit Colchicin behandelte MSC. Adaptiert aus: Nold et al., 2014.

4.6.3 Bestrahlte MSC behalten ihr T-Zell-supprimierendes Potential

Wie in Abbildung 4.15 aufgetragen ist, zeigt sich keine signifikante Änderung in der T-Zell-Suppression von bestrahlten im Vergleich mit unbestrahlten MSC. Dies gilt sowohl für 30 Gray als auch für 60 Gray bestrahlte MSC die im T-Zell Proliferationsassay verwendet wurden.

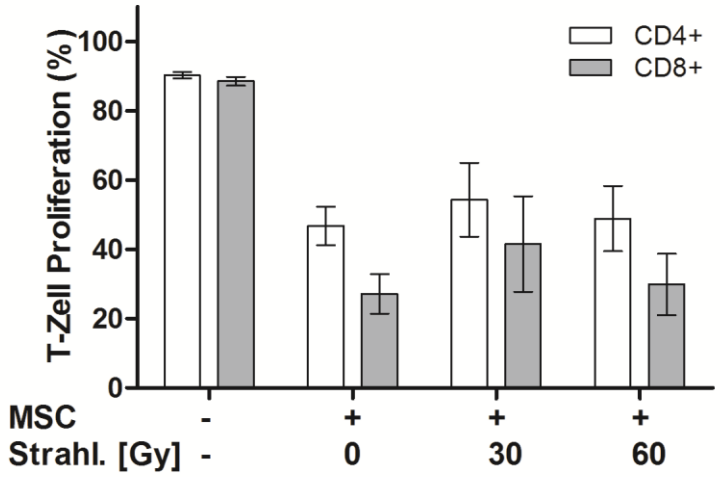


Abbildung 4.15 γ-Bestrahlung von MSC beeinflusst nicht deren T-Zell-supprimierendes Potential.
Messung der T-Zell Proliferation anhand des CFSE Signals nach Ko-Kultur mit MSC, die zuvor in den angegebenen Dosen bestrahlt wurden. Unterschiede in der T-Zell Proliferation zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben waren nicht signifikant, n=6. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Adaptiert aus: Nold et al., 2014.

5 Diskussion

Die Plastizität, das regenerative sowie immunmodulatorische Potential von MSC werden intensiv wissenschaftlich untersucht.
Die immunmodulatorischen und regenerativen Eigenschaften führten dazu dass sie in zahlreichen Klinischen Studien der Phase I und II geprüft wurden (Katarina Le Blanc et al. 2008; Wang, Qu, and Zhao 2012; De Becker and Van Riet 2015). Diese Anwendungen benötigen eine große Anzahl an standarisiert und qualitativ hochwertig hergestellten MSC. Da mesenchymale Stammzellen *in vitro* expandiert werden können, ist ihre Herstellung in Zellkulturflaschen weit verbreitet. Dieses Herstellungsverfahren ist aufwändig und nur schlecht standardisierbar. Für die Herstellung von MSC in großen Mengen für therapeutische Zwecke ist deren GMP-gerechte Expansion eine Grundvoraussetzung (Bieback, Kinzebach, and Karagianni 2011; Sensebé, Gadelorge, and Fleury-Cappellesso 2013). Nur dann kann das Zellprodukt nach ATMP Statuten als Zelltherapeutika am Patienten angewendet werden. Die Herstellung von klinischen Zelltherapeutika im Bioreaktor ermöglicht es erstmals, große Zellmengen in einem funktionell geschlossenen System unter Sterilbedingungen nach automatisierten Prozeduren zu generieren. Dabei wurde auf die Verwendung von Komponenten tierischen Ursprungs sowie Antibiotika im Expansionsprozess verzichtet.

5.1 MSC lassen sich im Bioreaktor expandieren

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine effiziente Expansion von MSC direkt aus Knochenmarkaspirat im Bioreaktor möglich ist. Die erlangten Zellmengen sind dabei abhängig von der eingesetzten Menge an KMA sowie von der Expansionsdauer. Durch das geschlossene System des Bioreaktors und den Einsatz von konventionellen Schlauchschweissgeräten für die Verbindung von z.B. Mediumbeuteln war es möglich, sterile Bedingungen ohne den Einsatz von Antibiotika auch für Expansionen bis zu 27 Tagen aufrecht zu erhalten (Nold et al. 2013). Wie in den europäischen GMP-Vorschriften angegeben, müssen Zellprodukte unter sterilen Bedingungen hergestellt werden. Da die Verwendung von Antibiotika in der Zellkultur unter Anderem als Nachteilig auf die Zellproliferation beschrieben ist (Kuhlmann 1996), wurde auf deren Einsatz verzichtet. Dadurch sind erhöhte Ansprüche an die Keimfreiheit des Prozesses gestellt. Ein komplett geschlossenes System, wie es der

Bioreaktor bietet, ist dafür optimal. Weitere Vorteile des verwendeten Hohlfaser-Bioreaktors gegenüber Flaschenkultivierung sind seine große Zell-Wachstumoberfläche im Verhältnis zum Flüssigkeitsvolumen, sein geschlossenes System, die automatisierte Zell -aussaat und -ernte und die automatische Kontrolle der Kulturparameter. Die Zellexpansion konnte so durch vordefinierte Programmabläufe, die durch die Kontrollsoftware überwacht wurden, standardisiert durchgeführt werden. Eine optimale Versorgung mit Medium über den Expansionszeitraum konnte mit Hilfe von Glukose und Laktatproben gewährleistet werden. Ebenso ermöglichten diese das Zellwachstum bzw. die Sterilität der Expansion zu kontrollieren und dienten damit als Kriterium für den Endpunkt der Expansion.

Für die Behandlung der GvHD werden für eine Dosis 1-5 Mio. Zellen pro kg Körpergewicht benötigt (Subbanna 2007). Aufgrund des geringen Anteils von MSC im KMA (Caplan 1994) bewegt sich deren Dichte bei Aussaat annähernd auf klonaler Ebene. Um innerhalb einer Passage eine hohe Anzahl von MSC zu generieren ist daher eine großflächige Aussaat und folglich eine große Oberfläche notwendig [87]. Zur Generierung einer ausreichenden Zellmenge, je nach Körpergewicht des Patienten und zu applizierenden Dosis 50-500 Mio. Zellen, ist dann eine zweite Expansion der MSC aus primärer KMA-Expansion nötig. Die Anzahl an MSC die nach 2-4 Wochen Expansion aus primärem Material erzielt wurden, waren stets ausreichend um eine zweite Expansion mit den so selektierten MSC zu initiieren. Mehr noch war die erhaltene Zellzahl der primären Expansion ausreichend für mehrere Zweit-Expansionen zur MSC-Generierung. So konnten, durch eine höhere Start-Zellzahl der Zweit-Expansion, mehr Zellen in kürzerer Zeit kultiviert werden. Mehrfache Gaben sind so, abhängig von der applizierten Dosis von MSC pro kg Körpergewicht, innerhalb kurzer Zeit möglich (Subbanna 2007).

Durch seine große Zell-Wachstumoberfläche im Verhältnis zum geringen Platzbedarf ist es mit dem Hohlfaser Bioreaktor System möglich, innerhalb 2 Passagen deutlich über 100 Millionen MSC zu generieren, was die Möglichkeit einer klinischen Anwendung eröffnet (Rojewski et al. 2013a).

5.2 Optimierung der Kulturbedingungen

Die meisten Kulturmedien für die *ex vivo* Expansion von MSC beinhalten FCS in verschiedenen Konzentrationen als wachstumsfördernden Zusatz. FCS als xenogener Zusatz birgt ein erhebliches Risiko hinsichtlich infektiöser Kontaminationen, wie z.B. Prionen (Erreger der übertragbaren spongiformen Enzephalopathie), aber auch die

Gefahr von unerwünschten Immunreaktionen (Senseb?? et al. 2010) und ist daher für die klinische Anwendung abzulehnen. Als Konsequenz daraus wird FCS von den Zulassungsbehörden kritisch bewertet und GMP-gerechte MSC Produktionen benötigen eine solide wissenschaftliche Begründung dafür, dass FCS unverzichtbar ist sowie spezifische Analysen, die das Fehlen von Rinder-Viren und Prionen zusichern (Medicines Agency 2013). Als Alternative zu FCS wurde in mehreren Studien HPL zur *in vitro* Expansion von MSC eingesetzt (Amorin et al. 2014; von Bonin et al. 2009). Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit auf FCS verzichtet und HPL als wachstumsfördernden Zusatz für das Kulturmedium etabliert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine verlässliche MSC-Expansion mit HPL aus gepoolten Thrombozytenkonzentraten geringer Spender Anzahl möglich ist. Die, im Vergleich mit z.B. kommerziellen Produkten, definiert geringe Anzahl von Spendern zur Herstellung der Plättchenlysate. ermöglicht so eine Rückverfolgbarkeit des Produkts. In Verbindung mit einer ausreichend langen Quarantänelagerung des HPL könnte so eine Verhinderung der Freigabe bei gegebenenfalls auftretenden Infektionen nach Spende erfolgen. Dies dient der Erhöhung der Sicherheit des Zellprodukts da das Infektionsrisiko entsprechend minimiert ist. Der Verwendung von individuellen Plättchenlysaten stehen die schwankenden Zytokinlevel bei Einzelspendern und somit einer fehlenden Standardisierbarkeit der Expansion entgegen. Durch die hohen Mengen an enthaltenen Wachstumsfaktoren befördert HPL die Proliferation von MSC (Fekete et al. 2012). So konnte gezeigt werden, dass MSC, die in HPL-haltigem Medium expandiert wurden, ihr immunmodualtorisches Potential erhielten. Darüber hinaus führte die Verwendung von HPL als Mediumzusatz zu einem erhöhten immunsuppressiven Effekt auf Immunzellen (Flemming et al. 2011). Dadurch eignet sich HPL als Ersatz von FCS, da es eine effiziente und sichere Expansion ermöglicht (Schallmoser et al. 2007) ohne dabei MSC in ihren Charakteristika nachteilig zu beeinflussen (Bieback et al. 2009; Chevallier et al. 2010). So erhöht der Einsatz von FCS als Medium-Zusatz das Risiko genetischer und epigenetischer Instabilität in MSC (Dahl et al. 2008). Im Gegensatz dazu konnte chromosomale Instabilität durch den Einsatz von autologem Serum, statt FCS vermieden werden (Dahl et al. 2008). Um die Fibrinbildung in HPL-haltigem Medium zu unterbinden, wurde in dieser Arbeit sowie in einer Vielzahl von anderen Studien Heparin als Antikoagulanz eingesetzt (Schallmoser et al. 2007; Capelli et al. 2007). Walenda et al. berichten von einem nachteiligen Effekt von Heparin in hohen Dosen auf die Proliferation von MSC (Hemeda et al. 2013). Zusätzlich dazu wurde von Moretta et al eine Verminderung der inhibitorischen Kapazität von MSC auf T-Zellen durch die Verwendung von HPL publiziert (Abdelrazik et al. 2011). Die beobachteten Effekte werden von Walenda et. al auf die zytotoxische

Wirkung von Heparin in hohen Dosen zurückgeführt. So wurde bei der Herstellung des verwendeten HPL in der Arbeit von Moretta et al. eine hohe Heparin Dosis eingesetzt. Die verwendete Dosis in dieser Arbeit entsprach einer Dosis in der Walenda et. al keine signifikante Verminderung der Proliferation beobachteten.

Der Einsatz des Bioreaktors zur Expansion führte nicht zu nachteilig veränderter Expression von typischen Oberflächenmarkern und Differenzierungskapazität der MSC. Flaschenkultivierte MSC zeigten im Vergleich mit bioreaktorexpandierten MSC eine geringere Expression von Positiv-Markern und gleichzeitig eine stärkere Expression von Ausschlussmarkern (Dominici et al. 2006). So deutet die Vergleichsweise leicht erhöhte Expression von Markern für Monozyten und hämatopoetischen Vorläuferzellen der Primären Expansionen aus Knochenmark auf eine Kontamination der MSC mit zuvor genannten Zelltypen hin. Eine Depletion dieser unerwünschten Zellen wird durch die Zweit-Expansion erreicht (Sensebé 2008).

Genetische Stabilität, Differenzierungskapazität sowie Expression typischer Oberflächenmarker bioreaktorgenerierter MSC wurden als gleichwertig zu Flaschenkulturen beschrieben (Jones et al. 2013). Dies deutet auf eine optimierte Kultur von MSC im Bioreaktor hin. So wurde die Kultur von Zellen im Monolayer, im Gegensatz zu 3D-Kultivierungsarten, als nachteilig für die Erhaltung der Stammzelleigenschaften beschrieben (Gottwald et al. 2007). Durch die sehr geringe Expression des Leukozytenmarkers (<2%) ist die Basis für eine immunmodulatorische Anwendung gegeben (Wuchter et al. 2014).

MSC residieren in der Stammzellnische unter sauerstoffarmen, hypoxischen Bedingungen (Harrison et al. 2002). Lavrentieva et al. berichten von Vorteilen der Hypoxie in der Kultur von MSC. So ist der oxidative Stress durch reaktive Sauerstoffverbindungen (*ROS – reactive oxygen species*) vermindert. Wie gezeigt werden konnte, führten hypoxische Kulturbedingungen zu bis zu 2,5-facher erhöhter Zellproliferation. Die erhöhte Proliferationsrate könnte das Ergebnis von geringerer zellulärer Apoptose und Nekrose aufgrund geringere ROS und damit verbundenem oxidativem Stress sein (Ma et al. 2016). Als weiterer Vorteil ermöglicht die gesteigerte Zellproliferation in kürzerer Zeit gewünschte Zelldosen zu expandieren (Subbanna 2007). Die Dauer der *ex vivo* Expansion könnte somit gesenkt werden, was als vorteilig für das Ansprechverhalten von GvHD-Patienten auf die Behandlung mit MSC berichtet wurde (Moll et al. 2014). Zusätzlich wurden nachteilige Effekte von normoxischen Kulturbedingungen auf MSC wie DNA-Schädigungen (Estrada et al. 2012), schlechtes Engraftment (Hung et al. 2007) und frühere Seneszenz (Tsai et al. 2011) publiziert. Eine hypoxie-induzierte Verminderung der immunsuppressiven Kapazität wurde nicht detektiert. Dies steht im Einklang mit der Arbeit von Lonne et al., die keine hypoxie-

induzierte Änderungen der Zytokinexpression auf Proteinebene von MSC aus Nabelschnurblut feststellen (Lönne et al. 2013). Ebenso konnte keine Abweichung der Markerexpression von hypoxisch-kultivierten MSC gemessen werden.

5.3 Immunmodulatorische Eigenschaften von MSC

Die inhibierende Wirkung von MSC aus Flaschenkulturen auf die Proliferation von Lymphozyten konnte 2002 von Bartholomew und Kollegen nachgewiesen werden (a. Bartholomew et al. 2002). MSC, die im Bioreaktor expandiert wurden, zeigen ebenfalls eine dosisabhängige, signifikante Hemmung auf die Proliferation von T-Zellen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Expansion von MSC im Bioreaktor als geschlossenem System mit HPL-haltigem Medium die berichteten immunsuppressiven Eigenschaften von MSC erhält. Dabei scheint die Hemmung der Proliferation von T-Zellen nicht nur von MSC-Seite vermittelt, sondern auch abhängig vom Ansprechverhalten der jeweiligen T-Zellen. So sprachen einige T-Zell-Linien nicht auf die Ko-Kultur mit MSC hinsichtlich einer verringerten Proliferation an. Dieselben MSC zeigten bei Verwendung weiterer T-Zell-Linien aber ihr antiproliferatives Potential auf T-Zellen. Dieses differentielle Ansprechen der T-Zellen auf MSC hat Auswirkungen auf klinische Anwendungen von MSC, die zur Behandlung von inflammatorischen Erkrankungen, wie z.B. der GvHD verwenden werden. Die Heterogenität der Erfolgsraten der einzelnen klinischen Studien die MSC zur Behandlung der GvHD nutzten, wurde mehrfach berichtet (Wang, Qu, and Zhao 2012; De Becker and Van Riet 2015). Ein möglicher Grund für diese Heterogenität könnte das angesprochene differenzielle Ansprechen von T-Zellen auf die MSC vermittelte antiproliferative Wirkung sein. Daraus ergibt sich die Folgerung nicht nur die MSC selbst auf ihr inhibitorisches Potential zu prüfen sondern auch die T-Zellen auf ihr Ansprechverhalten auf die entsprechenden MSC. In der Anwendung von MSC bei der Behandlung der GvHD könnten so die T-Zellen des Empfängers, also des Patienten, auf ein Ansprechen, der zu verwendenden MSC getestet werden und damit die Erfolgschancen verbessert werden.

Augello et. al vermuten die antiproliferative Wirkung von MSC auf T-Zellen durch die Bindung von PD-L1 der antigenpräsentierenden Zelle an PD-1 auf der T-Zelle (Augello et al. 2005). So zeigten antiproliferativ wirkende MSC im T-Zell Proliferationsassay eine signifikant erhöhte Expression von PD-L1. Dies weist auf eine Reaktion der MSC auf das inflammatorische Milieu des T-Zell Proliferationsassays hin. So berichten Fernandez et. al von einer Induktion der PD-L1 Expression auf MSC im Mausmodell

durch die Anwesenheit von aktivierten T-Zellen. Dieselben Autoren konnten die antiproliferative Wirkung von MSC auf aktivierte T-Zellen durch eine antiköpervermittelte Blockade des PD-1 PD-L1 Signalwegs aufheben (Luz-Crawford et al. 2012).

5.3.1 Einflussfaktoren auf die immunsuppressive Kapazität von MSC

Galipeau berichtete von möglichen Einflussgrößen, auf das Potential von MSC immunsuppressiv zu wirken. Eine erhöhte Passagenzahl und Kryokonservierung werden als negative Faktoren auf MSC hinsichtlich ihrer Immunsuppressivität diskutiert (Galipeau 2013). So konnte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Passagenzahl, Kryokonservierung und fehlender Äquilibrierung nach Auftauen der MSC, hinsichtlich ihrer Fähigkeit die T-Zell Proliferation zu hemmen, gezeigt werden. MSC, die häufig passagiert wurden (≥5 Passagen), verloren ihre Fähigkeit die T-Zell Proliferation zu hemmen. So ist die Funktion von MSC schon in frühen Passagen beeinträchtigt, die Zellen verlieren ihr Differenzierungspotential (Schellenberg et al. 2012) und sekretorische sowie immunmodulatorische Eigenschaften (Wagner, Ho, and Zenke 2010). Ebenso wirkte sich eine zu lange Kryokonservierung (≥10 Monate) aus. Kryokonservierung scheint dabei die grundlegende funktionelle Charakteristik hinsichtlich Phänotyp, Differenzierung und Immunsuppressivität von MSC zu erhalten (Mamidi et al. 2012; Samuelsson et al. 2009). Allerdings konnte eine temporäre Beeinflussung der Immunsuppressivität beobachtet werden. So führte die Anwendung von kryokonservierten MSC als Zelltherapeutikum in einer Studie von Moll et al. zu 50% schlechteren Ansprechraten, verglichen mit frisch präparierten MSC. Die Autoren folgern, dass die beeinträchtigten, immunregulatorischen Eigenschaften der Zellen, hervorgerufen durch die Kryokonservierung, in einer Eliminierung der MSC durch das Komplementsystem resultiert (Moll et al. 2014). Obwohl die verwendeten Zellen dieser Arbeit nach Auftauen eine hohe Vitalität aufwiesen, benötigten sie eine Äquilibrierungsphase, um ihre volle Wirksamkeit im T-Zell Proliferationsassay zu entfalten. Francois et al. berichten ebenfalls, dass MSC ihre immunmodulatorischen Eigenschaften nach Auftauen durch Äquilibrierung wieder erlangen können. Die Autoren stellten eine erhöhte Expression von Hitzeschockproteinen von frisch aufgetauten MSC fest sowie ein refraktäres Ansprechen auf die INF-γ –induzierte IDO Hochregulierung, die unter anderem für die T-Zell suppressiven Eigenschaften von MSC verantwortlich gemacht wird (François et al. 2012). Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die Notwendigkeit einer Äquilibrierungsphase von aufgetauten MSC die

als Zelltherapeutikum eingesetzt werden sollen. Ein Expansionsablauf in 2 Schritten, der nach primärer Expansion eine Kryokonservierung der MSC vorsieht, ermöglicht es die Zellen bei Bedarf rechtzeitig aufzutauen in einer zweiten, präselektieren Expansion, zu expandieren um dann frisch und äquilibriert als Zelltherapeutikum eingesetzt zu werden.

5.4 Qualitäts- und Sicherheitsbetrachtungen

Um die Sicherheit des Zellprodukts zu gewährleisten müssen Freigabekriterien definiert werden die eine Beurteilung der expandierten Zellen ermöglichen. Dabei muss die Sterilität die Reinheit und, idealerweise, die Funktion der Zellen überprüft werden. Da für die *in vitro* Expansion von MSC Knochenmarkaspirat als Quelle verwendet wurde ist vor Beginn der Expansion sicherzustellen dass die Viabilität und die Keimfreiheit des Ausgangsmaterials gewährleistet sind. Durch die Möglichkeit Mediumproben während des Expansionsprozesses zu entnehmen können sowohl Sterilität als auch Glukose und Laktatkonzentration als Inprozesskontrollen gewonnen werden. Somit ist es möglich mikrobielle Tests des Mediums durchzuführen um dadurch, im Sinne von GMP, die Sicherheit des Zellprodukts zu erhöhen. Idealerweise sollten Proben für mikrobielle Tests des Mediums am Ende des Expansionsprozesses gewonnen werden. Dadurch ist gewährleistet dass es zu keiner unbemerkten Kontamination bei, ansonsten stattfindender Restlaufzeit, der Expansion kommt. Eine Überprüfung der Zellen selbst sollte dann direkt nach der Ernte erfolgen. Parameter wie Vitalität, Zellzahl und die Charakterisierung der Oberflächenmarker ermöglichen eine Qualitätsbeurteilung der Zellen und der Expansion und dienen als Freigabekriterium (Barckhausen et al. 2016). Daher wurde die Reinheit des Zellprodukts umgehend nach der Ernte per Durchflusszytometrie auf die Expression definierte Marker getestet (Dominici et al. 2006). Dabei muss, neben der Expression typischer MSC-assoziierter Marker auch der Ausschluss von hämatopoetischen Progenitoren, Leukozyten sowie des co-stimulatorischen Moleküls HLA-DR gewährleistet werden. Dies ist im Hinblick auf die Verwendung des Zellprodukts bei der Behandlung der GvHD eine Grundvoraussetzung da eine zusätzliche Infusion von z.B. T-Zellen die Inflammation weiter verstärken würde. Die Expression von HLA-DR könnte bei allogener Transplantation eine Abstoßung der transplantierten MSC zur Folge haben (Krensky et al. 2010). Zur Beurteilung der relevanten biologischen Funktion des Zellproduktes sollte ein Wirksamkeitstest (engl.: ‚*Potency Assay*') durchgeführt werden. Dabei sollten die Ergebnisse schnell und verlässlich erlangt werden. Im Falle der

GvHD ist dies die suppressive Funktion von MSC auf die T-Zell-Proliferation. Die Definition eines prädiktiven Markers für die Wirksamkeit von MSC würde bei der Auswahl von Probanden für Studien helfen. Im Bestreben solch ein Marker zu definieren wurden präklinisch Mausmodelle mit klinischen Studien der GvHD korreliert. Jedoch ist die Vergleichbarkeit in der Biologie der MSC zwischen Nagern und Menschen eingeschränkt, weshalb häufig der T-Zell Proliferationsassay als Modell für Vorhersage der Wirksamkeit von MSC verwendet wird (Romieu-Mourez, Coutu, and Galipeau 2012). Durch die angesprochene Varianz im Bezug auf das Ansprechen der T-Zellen auf MSC ist die Reproduzierbarkeit und damit Standardisierbarkeit des Assays nur bedingt möglich (Bloom et al. 2015; Ketterl et al. 2015). Für die Durchführung des T-Zell-Proliferationsassay werden 5 Tage benötigt. Diese Dauer ist im Hinblick auf den prädiktiven Einsatz des Assays zu lang.

Basierend auf dem T-Zell-Proliferationsassay schlugen Zafranskaya et al. die Analyse der Expression von CD119 auf Gedächtnis T-Zellen vor. Sie diente als Mittel, um die Wirksamkeit von MSC Therapie in MS Patienten zu antizipieren (Zafranskaya et al. 2013). Als Surrogatmarker für die Immunsuppressivität wurden die Eigenschaften von MSC untersucht. So war die Expression von CXCL12(CXC-Motiv-Chemokin 12)/SDF-1 in immunsuppressiven MSC erhöht. Eine Blockierung der Verbindung zwischen CXCL12 und seinem Rezeptor CXCR4 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4) führte allerdings nicht zu einer Beeinträchtigung der T-Zell-suppressiven-Kapazität von MSC. Was einer direkten Verbindung dieses Zytokins mit der immunsuppressiven Funktion von MSC entgegen steht (Nold et al. 2015). Es konnte gezeigt werden, dass eine positive β-Galaktosidase Färbung bei MSC mit schlechter Wirksamkeit im T-Zell-Proliferationsassay korrelierte (Nold et al. 2015). Dies legt eine Verbindung von Seneszenz und fehlender immunsuppressiver Kapazität nahe. So wurde bereits vom Einfluss der Seneszenz auf typische MSC Eigenschaften, wie vermindertes Differenzierungspotential, berichtet (Alessio et al. 2013; Despars et al. 2013). Langezeit *ex vivo* Kultur von MSC führt zu hohen Passagezahlen und daraus folgend zu erhöhter Seneszenz die wiederrum einhergeht mit verminderter immunsuppressiver Kapazität (Schellenberg et al. 2011; Jin et al. 2016). Daher ist die in dieser Arbeit angewendete Expansionsmethodik der MSC, mit vergleichsweiser geringer Kultivierungsdauer und maximal zwei Zell-Passagen, im Hinblick auf potentiellen Einsatz als Zelltherapeutikum essentiell.

Es konnten bisher keine genetische Instabilitäten oder die Formierung von Teratomen von flaschen- und bioreaktorexpandierten MSC beobachtet werden (Jones et al. 2013; Barkholt et al. 2013; von Bahr et al. 2012; Choumerianou et al. 2008; Rojewski et al.

2013b). Trotzdem besteht die Möglichkeit der Entwicklung bösartiger Tumore oder ektopischem Gewebe, aufgrund einer Transplantation von MSC in Patienten.
Es ist eine gängige Methode, Blutprodukte mit 30 Gray zu bestrahlen, um die Proliferation der Lymphozyten zu unterbinden (Ärzteverlag 2010). Daher wurden 30 Gray als minimale Dosis gewählt, um Einflüsse der γ-Bestrahlung auf Vitalität, Proliferation und die immunsuppressive Kapazität von MSCs zu testen. Durch Bestrahlung mit 30 Gray wurde die Vitalität und die immunsuppressive Kapazität von MSC nicht beeinträchtig, während die Proliferation aufgehoben wurde. Somit wäre eine Dosis von 30 Gray eine mögliche Option, um die Proliferation von MSC im Empfänger zu verhindern. Höhere Strahlungsdosen scheinen, vor dem Hintergrund des erhöhten Risikos von strahlungsinduzierten Aberrationen, nicht sinnvoll. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtung einer Proliferationshemmung, bei gleichzeitiger unbeeinträchtigter Suppressivität der MSCs nach γ-Bestrahlung (de Andrade et al. 2014). Obwohl Andrade et al. eine Änderung der Zytokinexpression nach Bestrahlung beobachteten, kam es zu keiner Änderungen der immunsuppressiven Kapazität. Allerdings waren die verwendeten Dosen geringer. Jedoch sollte im Hinblick auf eine zuverlässige Proliferationsverhinderung die Dosis hoch genug gewählt werden, um das Risiko eines erhöhten kanzerogenen Potentials von MSC nach Bestrahlung zu mindern. Fekete und Kollegen berichten von einer persistierenden MSC Population, die die Bestrahlung überlebte (Fekete et al., n.d.). Diese könnten eine potentielle Quelle für neoplastische Prozesse sein. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Bestrahlung Seneszenz induziert die, nach unserer Erkenntnis, mit einer beeinträchtigten, immunsuppressiven Kapazität einhergeht (Despars et al. 2013). Im Hinblick auf ein sicheres und effektives Zelltherapeutikum ist es daher wichtig, durch weitere Forschungsergebnisse, die Vor- und Nachteile der Bestrahlung von MSC abzuwägen.

5.5 Ausblick

Die erhaltenen Ergebnisse weisen auf die Bedeutung der Expansions- sowie Kulturbedingungen von MSC, auf ihr klinisches Potential als Zelltherapeutikum hin. Die Vielzahl an Studien zeigen eine hohe Variabilität hinsichtlich Expansionsprotokollen, Quelle der MSC usw. dies resultiert darin, dass sehr oft *in vitro* und *in vivo*-Daten variabel sind, wenn nicht widersprüchlich und daher wechselseitig nicht vergleichbar. Daher ist eine Standardisierung der Herstellung Voraussetzung, um die angesprochene Heterogenität zu verhindern und eine Vergleichbarkeit von Studien zu gewährleisten. Die Verwendung des Bioreaktors zusammen mit einem definierten

Expansionsprotokoll ermöglicht es erstmals MSC standardisiert zu generieren die eine Vergleichbarkeit erst zulassen.

Es zeigt sich, dass eine Verwendung von MSC in möglichst niedrigen Passagezahlen, optimaler Weise, nur einmal passagiert zu bevorzugen ist. Die Verwendung des Bioreaktors ermöglicht dies aufgrund der erreichten Zellmengen in relativ kurzer Zeit. Da eine Gabe von frischen MSC wünschenswert ist sollte, falls eine Kryokonservierung nicht zu verhindern ist, eine Äquilibrierungsphase eingehalten werden um die Wirksamkeit der MSC nicht zu beeinträchtigen. So könnten MSC nach primärer Expansion kryokonserviert werden und somit als ‚Zell-Bank auf Abruf' zur Verfügung stehen. Bei Expansion vorselektierter MSC kann die Expansionsdauer bei Einsatz einer entsprechend hohen Ausgangszellzahl weiter verkürzt werden. was die Planung der Zelleernte ermöglicht. Bei prospektivem Beginn der Expansion könnten so MSC zu einem gewünschten Zeitpunkt äquilibriert und frisch geerntet werden um direkt als Zelltherapeutikum verwendet zu werden. Bei multizentrischer Anwendung der MSC ist, ein Transport als Kryokonservat aufgrund der Versanddauer sinnvoll. Auch hier sollte eine Äquilibrierungsphase vor Transplantation beachtet werden.

Des Weiteren muss ein ‚Potency Assay' etabliert werden, der eine verlässliche Aussage über die gewünschte Funktion der zu verwendenden MSC zulässt. Dieser muss zugleich robust und schnell in der Anwendung sein. Bislang ist kein Surrogatparameter bekannt, der verlässlich die immunoregulatorische Kapazität von MSC *in vivo* vorhersagt. Daher werden sowohl standardisierte *in vitro* Potency Assays als auch standardisierte klinische Studien benötigt. Idealerweise könnten so *in vitro* Surrogatparamter mit *in vivo* Daten korreliert werden. Die vorliegende Arbeit bietet die Basis für zukünftige, standardisierte klinische Studien anhand eines standardisierten *ex vivo* Expansion-Protokolls von MSC in GMP-konformer Weise.

Zusammenfassung

Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind aufgrund ihres Differenzierungspotential sowie ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften Gegenstand zahlreicher klinischer Studien. Ein häufiger Anwendungsbereich von MSC als Zelltherapeutikum ist die Behandlung der Transplantatabstoßung, nach einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation, in Form der ‚Graft-versus-Host-Disease' (GvHD). Dabei fällt die hohe Heterogenität der Studien, bezüglich der Kulturbedingungen, der Quelle, aus denen die MSC gewonnen wurden, die eingesetzte Zelldosis und diverser weiterer Faktoren auf. Die Konsequenz ist eine erheblich erschwerte Vergleichbarkeit der Studien untereinander sowie deren höchst unterschiedlichen Ergebnisse. MSC werden üblicherweise i*n vitro* in Zellkulturflaschen in aufwändigen und schlecht standardisierbaren Prozeduren expandiert. Diese sind nur schwer in Einklang mit den Vorgaben der der „Guten Herstellungspraxis" (GMP) zu bringen. In dieser Arbeit wurde, unter Verwendung eines Bioreaktors, erstmals eine standardisierte Expansionsmethode für MSC etabliert, die den Regeln der Guten Herstellungspraxis entspricht. So war es möglich, in nur 2 Passagen, aus Knochenmarkaspirat über 400 Mio. MSC innerhalb kurzer Zeit *ex-vivo* zu expandieren. Durch den Einsatz von HPL als Ersatz von FCS war es möglich, auf den Einsatz xenogener Reagenzien zu verzichten. Die so erhaltenen MSC, entsprachen den Vorgaben der ISCT (International Society for Cellular Therapy) für Oberflächenmarker und Differenzierbarkeit. Eine Optimierung der Expansion, im Hinblick auf Zellausbeute und kürzerer Expansionsdauer, konnte durch die Verwendung hypoxischer Kulturbedingungen erreicht werden. Durch Anwendung des T-Zell Proliferationsassays war es möglich, bioreaktorexpandierte MSC hinsichtlich ihrer immunsuppressiven Kapazität zu überprüfen. So konnte in der vorliegenden Arbeit der negative Einfluss von erhöhter Passagenzahl (≥5), Kryokonservierung und fehlender Äquilibrierung nach Auftauen der MSC, auf ihre Fähigkeit, die T-Zell Proliferation zu hemmen, gezeigt werden. Des Weiteren scheint die Hemmung der Proliferation von T-Zellen nicht nur von MSC-Seite vermittelt, sondern auch abhängig vom Ansprechverhalten der jeweiligen T-Zellen zu sein. Durch Bestrahlung der Zellen nach Expansion wurde die Proliferation der MSC aufgehoben, gleichzeitig blieben die Vitalität und die T-Zell suppressiven Eigenschaften der Zellen erhalten. Zusammenfassend bildet die vorliegende Arbeit die Basis für zukünftige, vergleichbare klinische Studien, anhand eines standardisierten *ex vivo* Expansion-Protokolls von MSC in GMP -konformer Weise.

Summary

Mesenchymal stromal cells (MSC) are subject of numerous clinical studies due to their differentiation potential and their immunomodulatory properties. A common application of MSC as a cellular therapeutic is the treatment of transplant rejection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the form of Graft-versus-host disease (GvHD). Pertinent studies, however, vary widely with respect to culture conditions, MSC source (e.g., bone marrow or adipose tissue), cell dose, etc., thus limiting comparability between these studies and therefore the ability to strengthen conclusions. To date, no standardized MSC culture conditions have been established to relieve this limitation and strengthen the conclusions of the field.

MSC are typically expanded *in vitro* in cell culture flasks, a laborious and tedious process that is prone to variability. Consequently, this traditional process can present challenges regarding manufacture in accordance with Good Manufacturing Practice (GMP). In the current work, for the first time, a standardized method of MSC expansion was established using a bioreactor to conform to the rules of GMP. Additionally, the use of HPL as a replacement for FCS made it possible to achieve a xeno-free process. Results demonstrated the ability to achieve *ex vivo* yields of 400 million MSC within 2 passages. The cells were shown to meet the requirements of ISCT (International Society for Cellular Therapy) for surface markers and differentiation. An optimization of the expansion, with respect to cell yield, and a shorter duration of expansion were achieved by the use of hypoxic culture conditions. Moreover, the immunosuppressive capacity was assessed using a T-cell proliferation assay. Thus, in the present thesis, the immunosuppressive capacity was shown to diminish with increased passages (≥5), cryopreservation and a lack of equilibration after thawing. Furthermore, the inhibition of T-cell proliferation seems not only to be dictated by the MSC, but also to be dependent on the response of the respective T-cell population. Irradiation after expansion led to proliferation stop but did not diminish the viability or their T-cell suppressive function of the MSC. In summary, the present thesis provides the basis for a comparability of future clinical studies, using a standardized *ex vivo* expansion protocol of MSC in GMP-compliant manner.

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
Abk.	Abkürzung
APC	*antigen-presenting cell*
ATMP	*Advanced Therapy Medicinal Products*
CD	*cluster of differentiation*
CFSE	5,6-carboxyfluorescein di-acetate N-succinimidyl ester
CIB	*Cell Inlet Bag*
CO_2	Kohlendioxid
CTL	cytotoxische T-Zellen
CTLA-4	*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	*European Medicines Agency*
FCS	*fetal calf serum* (Fetales Kälberserum)
FoxP3	*forkhead box protein 3*
GMP	*Good Manufacturing Practice*
GTM	Gastransfermodul
GvHD	*Graft-versus-Host-Disease*
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGF	*hepatocyte growth factor*
HLA	humanes Leukozytenantigen
HPL	Humanes Plättchenlysat
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
IDO	Indoleamine 2,3-Dioxygenase
IL	Interleukin
INF-γ	Interferon Gamma
ISCT	*International Society for Cellular Therapy*
JAK	Januns Kinase
KMA	Knochenmarkaspirat

LPS	Lipopolysaccharid
MHC	*major histocompatibility complex*
MSC	Mesenchymale Stromazellen bzw. mesenchymale Stammzellen
O_2	Sauerstoff
PBMC	*peripheral blood mononuclear cell*
PBS	*phospate buffered saline*
PD-1	*programmed cell death protein 1*
PDL-1	*programmed death-ligand 1*
PG	Prostaglandin
ROS	*Reactive Oxygen Species*
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDF-1	*stromal cell-derived factor-1*
STABW	Standardabweichung
TCR	T-Zell Rezeptor
TGF	*transforming growth factor*
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α

Abbildungsverzeichnis

1.1 Positive und negative Regulation der T-Zellaktivierung. 4
1.2 Die drei aufeinanderfolgenden Phasen der Graft-versus-Host-Disease. 7
3.1 Aufbau der Hohlfasern und Hydraulisches Layout des Quantum Cell Expansion Systems. 19
3.2 Quantum Cell Expansion System. Links in der Außenansicht. 21
4.1 Exemplarischer Verlauf der Lakatgeneration sowie des Glukosekonsum während der Expansion von MSC im Bioreaktor. 30
4.2 Typische Expression von charakteristischen Markern für MSC aus Bioreaktor bzw. Flaschenkulturen. 32
4.3 *In Vitro*-Differenzierung von MSC in Adipozyten (links) und Osteozyten (rechts). 34
4.4 Dosisabhängige Hemmung der T-Zell-Proliferation. 35
4.5 Spenderabhängiges, immunsuppressives Potential von MSC. 36
4.6 Expression von CD274 auf MSC. 37
4.7 Suppression der T-Zell Proliferation von MSC die unter bzw. über 10 Monaten kryokonserviert wurden, n=3. 39
4.8 Verminderte T-Zell Proliferationshemmung durch MSC in Passagen ≥5, n=3. 40
4.9 Wiedererlangen des supprimierenden Potentials von MSC auf T-Zellen, nach Äquilibrierung. 41
4.10 Gesteigertes Zellwachstum unter Hypoxie. 42
4.11 MSC, die in normoxischen oder hypoxischen Kulturbedingungen expandiert wurden weisen keine Unterschiede in ihrem Immunphänotyp auf. 43
4.12 Signifikante Hemmung der T-Zell Proliferation von MSC die unter Normoxie bzw. Hypoxiebedingungen kultiviert wurden, n=5. 43
4.13 Durchflusszytometrische Analyse der Vitalität von MSC nach Bestrahlung. 44
4.14 Repräsentatives Histogramm für den Verlust der Proliferationsfähigkeit von MSC nach Bestrahlung. 45
4.15 γ-Bestrahlung von MSC beeinflusst nicht deren T-Zell-supprimierendes Potential. 45

Anhang 1 Proliferation von MSC nach γ-Bestrahlung mit angegeben Dosen..... xxiv

Tabellenverzeichnis

2.1 Liste der verwendeten Lösungen und Chemikalien und deren Hersteller . 13
2.2 Liste der Verbauchsmaterialien und deren Hersteller 14
2.3 Liste verwendeter Geräte und deren Hersteller 15
2.4 Verwendete Software 15
2.5 Zusammensetzung des Kulturmediums für PBMC (engl.: *‚Peripheral Blood Mononuclear Cell‘*) 16
2.6 Zusammensetzung des Kulturmediums der mesenchymalen Stammzellen 16
2.7 Zusammensetzung des Einfriermediums..... 16
2.8 Verwendete Antikörper für die Immunophänotypisierung von MSC 17
2.9 Verwendete Antikörper für den T-Zell Proliferationsassay 17
3.1 Fließschema der MSC Expansion im Bioreaktor 22
3.2 Laktat bzw. Glukosekonzentrationsabhänige Zuflussrate sowie Probenentnahmeplan 23
3.3 Normoxie und Hypoxie Bedingungen 28
4.1 MSC Expansion aus primären Knochenmarkaspirat..... 31
4.2 Expansion vorselektierter MSC. 31
4.3 Expression von Oberflächenmarkern nach ISCT-Kriterien auf MSC nach Kultivierung im Bioreaktor. 33
4.4 Vitalität von MSC vor- und nach Auftauen anhand Trypanblau-Färbung bestimmt per Hemazytometer. 38

Anhang 1 PBMC-Spenderabhängigkeit des immunsuppressiven Potentials von MSC. xxiii

Literaturverzeichnis

Abdelrazik, Heba, Grazia M Spaggiari, Laura Chiossone, and Lorenzo Moretta. 2011. "Mesenchymal Stem Cells Expanded in Human Platelet Lysate Display a Decreased Inhibitory Capacity on T- and NK-Cell Proliferation and Function." *European Journal of Immunology* 41 (11): 3281–90. doi:10.1002/eji.201141542.

Aggarwal, S, and M F Pittenger. 2005. "Human Mesenchymal Stem Cells Modulate Allogeneic Immune Cell Responses." *Blood* 105 (4): 1815–22. doi:10.1182/blood-2004-04-1559.

Alessio, Nicola, Wolfgang Bohn, Verena Rauchberger, Flavio Rizzolio, Marilena Cipollaro, Michael Rosemann, Martin Irmler, Johannes Beckers, Antonio Giordano, and Umberto Galderisi. 2013. "Silencing of RB1 but Not of RB2/P130 Induces Cellular Senescence and Impairs the Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 70 (9): 1637–51. doi:10.1007/s00018-012-1224-x.

Amorin, Bruna, Ana Paula Alegretti, Vanessa Valim, Annelise Pezzi, Alvaro Macedo Laureano, Maria Aparecida Lima da Silva, Andréa Wieck, and Lucia Silla. 2014. "Mesenchymal Stem Cell Therapy and Acute Graft-versus-Host Disease: A Review." *Human Cell* 27 (4): 137–50. doi:10.1007/s13577-014-0095-x.

Ärzteverlag, Deutscher. 2010. *Gesetz Zur Regelung Des Transfusionswesens (Transfusionsgesetz). Richtlinien Zur Gewinnung von Blut Und Blutbestandteilen Und Zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie). Gesamtnovelle 2005 Mit Richtlinienanpassung 2010*. Köln.

Augello, Andrea, Roberta Tasso, Simone Maria Negrini, Andrea Amateis, Francesco Indiveri, Ranieri Cancedda, and Giuseppina Pennesi. 2005. "Bone Marrow Mesenchymal Progenitor Cells Inhibit Lymphocyte Proliferation by Activation of the Programmed Death 1 Pathway." *European Journal of Immunology* 35 (5): 1482–90. doi:10.1002/eji.200425405.

Auletta, Jeffery J, Robert J Deans, and Amelia M Bartholomew. 2012. "Emerging Roles for Multipotent, Bone Marrow-Derived Stromal Cells in Host Defense." *Blood* 119 (8): 1801–9. doi:10.1182/blood-2011-10-384354.

Barckhausen, Christina, Brent Rice, Stefano Baila, Luc Sensebé, Hubert Schrezenmeier, Philipp Nold, Holger Hackstein, and Markus Thomas Rojewski. 2016. "GMP-Compliant Expansion of Clinical-Grade Human Mesenchymal Stromal/Stem Cells Using a Closed Hollow Fiber Bioreactor." *Methods in*

Molecular Biology (Clifton, N.J.) 1416: 389–412. doi:10.1007/978-1-4939-3584-0_23.

Barkholt, Lisbeth, Egbert Flory, Veronika Jekerle, Sophie Lucas-Samuel, Peter Ahnert, Louise Bisset, Dirk Büscher, et al. 2013. “Risk of Tumorigenicity in Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapies--Bridging Scientific Observations and Regulatory Viewpoints.” *Cytotherapy* 15 (7): 753–59. doi:10.1016/j.jcyt.2013.03.005.

Bartholomew, a., C. Sturgeon, M. Siatskas, K. Ferrer, K. McIntosh, S. Patil, W. Hardy, et al. 2002. “Mesenchymal Stem Cells Suppress Lymphocyte Proliferation in Vitro and Prolong Skin Graft Survival in Vivo.” *Experimental Hematology* 30 (1): 42–48. doi:10.1016/S0301-472X(01)00769-X.

Bartholomew, Amelia, Cord Sturgeon, Mandy Siatskas, Karen Ferrer, Kevin McIntosh, Sheila Patil, Wayne Hardy, et al. 2002. “Mesenchymal Stem Cells Suppress Lymphocyte Proliferation in Vitro and Prolong Skin Graft Survival in Vivo.” *Experimental Hematology* 30 (1): 42–48. doi:10.1016/S0301-472X(01)00769-X.

Bieback, Karen, Andrea Hecker, Asli Kocaömer, Heinrich Lannert, Katharina Schallmoser, Dirk Strunk, and Harald Klüter. 2009. “Human Alternatives to Fetal Bovine Serum for the Expansion of Mesenchymal Stromal Cells from Bone Marrow.” *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 27 (9): 2331–41. doi:10.1002/stem.139.

Bieback, Karen, Sven Kinzebach, and Marianna Karagianni. 2011. “Translating Research into Clinical Scale Manufacturing of Mesenchymal Stromal Cells.” *Stem Cells International* 2010: 193519. doi:10.4061/2010/193519.

Bloom, Debra D., John M. Centanni, Neehar Bhatia, Carol A. Emler, Diana Drier, Glen E. Leverson, David H. McKenna, et al. 2015. “A Reproducible Immunopotency Assay to Measure Mesenchymal Stromal Cell–mediated T-Cell Suppression.” *Cytotherapy* 17 (2): 140–51. doi:10.1016/j.jcyt.2014.10.002.

Capelli, C, M Domenghini, G Borleri, P Bellavita, R Poma, a Carobbio, C Micò, a Rambaldi, J Golay, and M Introna. 2007. “Human Platelet Lysate Allows Expansion and Clinical Grade Production of Mesenchymal Stromal Cells from Small Samples of Bone Marrow Aspirates or Marrow Filter Washouts.” *Bone Marrow Transplantation* 40 (8): 785–91. doi:10.1038/sj.bmt.1705798.

Caplan, A I. 1994. “The Mesengenic Process.” *Clinics in Plastic Surgery* 21 (3): 429–35.

Chalandon, Yves, Eddy Roosnek, Bernadette Mermillod, Laurent Waelchli, Claudine Helg, and Bernard Chapuis. 2006. “Can Only Partial T-Cell Depletion of the Graft before Hematopoietic Stem Cell Transplantation Mitigate Graft-versus-Host Disease While Preserving a Graft-versus-Leukemia Reaction? A Prospective Phase II Study.” *Biology of Blood and Marrow Transplantation : Journal of the*

American Society for Blood and Marrow Transplantation 12 (1): 102–10. doi:10.1016/j.bbmt.2005.09.010.

Chapel, Alain, Jean Marc Bertho, Morad Bensidhoum, Loic Fouillard, Randell G. Young, Johanna Frick, Christelle Demarquay, et al. 2003. “Mesenchymal Stem Cells Home to Injured Tissues When Co-Infused with Hematopoietic Cells to Treat a Radiation-Induced Multi-Organ Failure Syndrome.” *Journal of Gene Medicine* 5 (12): 1028–38. doi:10.1002/jgm.452.

Chaplin, David D. 2010. “Overview of the Immune Response.” *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2 Suppl 2): S3-23. doi:10.1016/j.jaci.2009.12.980.

Chevallier, Nathalie, Fani Anagnostou, Sebastien Zilber, Gwellaouen Bodivit, Sophie Maurin, Aurelie Barrault, Philippe Bierling, Philippe Hernigou, Pierre Layrolle, and Helene Rouard. 2010. “Osteoblastic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells with Platelet Lysate.” *Biomaterials* 31 (2): 270–78. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.043.

Choumerianou, D M, H Dimitriou, C Perdikogianni, G Martimianaki, M Riminucci, and M Kalmanti. 2008. “Study of Oncogenic Transformation in Ex Vivo Expanded Mesenchymal Cells, from Paediatric Bone Marrow.” *Cell Proliferation* 41 (6): 909–22. doi:10.1111/j.1365-2184.2008.00559.x.

Clevers, Hans. 2005. “Stem Cells, Asymmetric Division and Cancer.” *Nature Genetics* 37 (10): 1027–28. doi:10.1038/ng1005-1027.

da Silva Meirelles, Lindolfo, Pedro Cesar Chagastelles, and Nance Beyer Nardi. 2006. “Mesenchymal Stem Cells Reside in Virtually All Post-Natal Organs and Tissues.” *Journal of Cell Science* 119 (Pt 11): 2204–13. doi:10.1242/jcs.02932.

Dahl, John-Arne, Shivali Duggal, Neralie Coulston, Douglas Millar, John Melki, Aboulghassem Shahdadfar, Jan E Brinchmann, and Philippe Collas. 2008. “Genetic and Epigenetic Instability of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Expanded in Autologous Serum or Fetal Bovine Serum.” *The International Journal of Developmental Biology* 52 (8): 1033–42. doi:10.1387/ijdb.082663jd.

de Andrade, Ana Valéria Gouveia, Julia Riewaldt, Rebekka Wehner, Marc Schmitz, Marcus Odendahl, Martin Bornhäuser, and Torsten Tonn. 2014. “Gamma Irradiation Preserves Immunosuppressive Potential and Inhibits Clonogenic Capacity of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells.” *Journal of Cellular and Molecular Medicine* XX (X): 1–10. doi:10.1111/jcmm.12264.

De Becker, Ann, and Ivan Van Riet. 2015. “Mesenchymal Stromal Cell Therapy in Hematology: From Laboratory to Clinic and Back Again.” *Stem Cells and Development* 24 (15): 1713–29. doi:10.1089/scd.2014.0564.

Deans, R J, and a B Moseley. 2000. “Mesenchymal Stem Cells: Biology and Potential

Clinical Uses." *Experimental Hematology* 28 (8): 875–84. doi:10.1016/S0301-472X(00)00482-3.

Deeg, H J. 2007. "How I Treat Refractory Acute GVHD." *Blood* 109 (10): 4119–26. doi:blood-2006-12-041889 [pii]\n10.1182/blood-2006-12-041889.

Despars, Geneviève, Cynthia L Carbonneau, Pascal Bardeau, Daniel L Coutu, and Christian M Beauséjour. 2013. "Loss of the Osteogenic Differentiation Potential during Senescence Is Limited to Bone Progenitor Cells and Is Dependent on p53." *PloS One* 8 (8). Public Library of Science: e73206. doi:10.1371/journal.pone.0073206.

Di Ianni, Mauro, Beatrice Del Papa, Maria De Ioanni, Lorenzo Moretti, Elisabetta Bonifacio, Debora Cecchini, Paolo Sportoletti, Franca Falzetti, and Antonio Tabilio. 2008. "Mesenchymal Cells Recruit and Regulate T Regulatory Cells." *Experimental Hematology* 36 (3): 309–18. doi:10.1016/j.exphem.2007.11.007.

Dominici, M, K Le Blanc, I Mueller, I Slaper-Cortenbach, Fc Marini, Ds Krause, Rj Deans, a Keating, Dj Prockop, and Em Horwitz. 2006. "Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement." *Cytotherapy* 8 (4): 315–17. doi:10.1080/14653240600855905.

Dorronsoro, Akaitz, Jon Fernández-Rueda, Karoline Fechter, Izaskun Ferrin, Juan Manuel Salcedo, Emma Jakobsson, and César Trigueros. 2013. "Human Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Immunoregulation: Mechanisms of Action and Clinical Applications." *Bone Marrow Research* 2013 (January): 203643. doi:10.1155/2013/203643.

Duijvestein, Marjolijn, Manon E. Wildenberg, Mick M. Welling, Simone Hennink, Ilse Molendijk, Vanessa L. Van Zuylen, Tjalling Bosse, et al. 2011. "Pretreatment with Interferon-?? Enhances the Therapeutic Activity of Mesenchymal Stromal Cells in Animal Models of Colitis." *Stem Cells* 29: 1549–58. doi:10.1002/stem.698.

Estrada, J C, C Albo, A Benguría, A Dopazo, P López-Romero, L Carrera-Quintanar, E Roche, et al. 2012. "Culture of Human Mesenchymal Stem Cells at Low Oxygen Tension Improves Growth and Genetic Stability by Activating Glycolysis." *Cell Death and Differentiation* 19 (5). Macmillan Publishers Limited: 743–55. doi:10.1038/cdd.2011.172.

Fekete, Natalie, Alexander Erle, Elisa Maria Amann, and Daniel Fü. n.d. "Effect of High Dose Irradiation on Human Bone Marrow-Derived MSCs," 1–53.

Fekete, Natalie, Mélanie Gadelorge, Daniel Fürst, Caroline Maurer, Julia Dausend, Sandrine Fleury-Cappellesso, Volker Mailänder, et al. 2012. "Platelet Lysate from Whole Blood-Derived Pooled Platelet Concentrates and Apheresis-Derived

Platelet Concentrates for the Isolation and Expansion of Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells: Production Process, Content and Identification of Active Comp." *Cytotherapy* 14 (5): 540–54. doi:10.3109/14653249.2012.655420.

Ferrara, J L, and H J Deeg. 1991. "Graft-versus-Host Disease." *The New England Journal of Medicine* 324 (10): 667–74. doi:10.1056/NEJM199103073241005.

Ferrara, Jlm, Je Levine, P Reddy, and E Holler. 2009. "Graft-versus-Host Disease." *The Lancet* 373 (9674): 1550–61. doi:10.1016/S0140-6736(09)60237-3.Graft-versus-Host.

Flemming, Antoinette, Katharina Schallmoser, Dirk Strunk, Meaghan Stolk, Hans-Dieter Volk, and Martina Seifert. 2011. "Immunomodulative Efficacy of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Cultured in Human Platelet Lysate." *Journal of Clinical Immunology* 31 (6): 1143–56. doi:10.1007/s10875-011-9581-z.

François, Moïra, Ian B Copland, Shala Yuan, Raphaëlle Romieu-Mourez, Edmund K Waller, and Jacques Galipeau. 2012. "Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells Display Impaired Immunosuppressive Properties as a Result of Heat-Shock Response and Impaired Interferon-γ Licensing." *Cytotherapy* 14 (2): 147–52. doi:10.3109/14653249.2011.623691.

Freeman, G J, A J Long, Y Iwai, K Bourque, T Chernova, H Nishimura, L J Fitz, et al. 2000. "Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation." *The Journal of Experimental Medicine* 192 (7): 1027–34. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193311&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Friedenstein, A J, R K Chailakhyan, N V Latsinik, A F Panasyuk, and I V Keiliss-Borok. 1974. "Stromal Cells Responsible for Transferring the Microenvironment of the Hemopoietic Tissues. Cloning in Vitro and Retransplantation in Vivo." *Transplantation* 17 (4): 331–40. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4150881.

Friedenstein, A J, J F Gorskaja, and N N Kulagina. 1976. "Fibroblast Precursors in Normal and Irradiated Mouse Hematopoietic Organs." *Experimental Hematology* 4 (5): 267–74. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/976387.

Galipeau, Jacques. 2013. "The Mesenchymal Stromal Cells Dilemma--Does a Negative Phase III Trial of Random Donor Mesenchymal Stromal Cells in Steroid-Resistant Graft-versus-Host Disease Represent a Death Knell or a Bump in the Road?" *Cytotherapy* 15 (1). Elsevier Inc: 2–8. doi:10.1016/j.jcyt.2012.10.002.

Glucksberg, H., R. Storb, A. Fefer, C. D. Buckner, P. E. Neiman, R. A. Clift, K. G. Lerner, and E. D. Thomas. 1974. "Clinical Manifestations of Graft versus Host Disease in Human Recipients of Marrow from HL A Matched Sibling Donors."

Transplantation 18 (4): 295–304. http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0016187133&partnerID=tZOtx3y1.

Gonzalez, M A, E Gonzalez-Rey, L Rico, D Buscher, and M Delgado. 2009. “Treatment of Experimental Arthritis by Inducing Immune Tolerance with Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells.” *Arthritis and Rheumatism* 60 (4): 1006–19. doi:10.1002/art.24405.

Gottwald, Eric, Stefan Giselbrecht, Caroline Augspurger, Brigitte Lahni, Nina Dambrowsky, Roman Truckenmüller, Volker Piotter, et al. 2007. “A Chip-Based Platform for the in Vitro Generation of Tissues in Three-Dimensional Organization.” *Lab on a Chip* 7 (6). The Royal Society of Chemistry: 777–85. doi:10.1039/b618488j.

Greenfield, E A, K A Nguyen, and V K Kuchroo. 1998. “CD28/B7 Costimulation: A Review.” *Critical Reviews in Immunology* 18 (5): 389–418. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9784967.

Greinix, H T, R M Knobler, N Worel, B Schneider, A Schneeberger, P Hoecker, M Mitterbauer, W Rabitsch, A Schulenburg, and P Kalhs. 2006. “The Effect of Intensified Extracorporeal Photochemotherapy on Long-Term Survival in Patients with Severe Acute Graft-versus-Host Disease.” *Haematologica* 91 (3): 405–8. doi:10.3324/haematol.2009.018390.

Guinan, E C, V a Boussiotis, D Neuberg, L L Brennan, N Hirano, L M Nadler, and J G Gribben. 1999. “Transplantation of Anergic Histoincompatible Bone Marrow Allografts.” *The New England Journal of Medicine* 340 (22): 1704–14. doi:10.1056/NEJM199906033402202.

Hackstein, Holger, Anne Lippitsch, Philipp Krug, Inna Schevtschenko, Sabine Kranz, Matthias Hecker, Kristina Dietert, et al. 2015. “Prospectively Defined Murine Mesenchymal Stem Cells Inhibit Klebsiella Pneumoniae-Induced Acute Lung Injury and Improve Pneumonia Survival.” *Respiratory Research* 16 (1). Respiratory Research: 123. doi:10.1186/s12931-015-0288-1.

Hackstein, Holger, Inna Tschipakow, Gregor Bein, Philipp Nold, Cornelia Brendel, and Nelli Baal. 2016. “Contact-Dependent Abrogation of Bone Marrow-Derived Plasmacytoid Dendritic Cell Differentiation by Murine Mesenchymal Stem Cells.” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, May. doi:10.1016/j.bbrc.2016.05.108.

Hanley, Patrick J., Zhuyong Mei, Maria Da Graca Cabreira-Hansen, Mariola Klis, Wei Li, Yali Zhao, April G. Durett, et al. 2013. “Manufacturing Mesenchymal Stromal Cells for Phase I Clinical Trials.” *Cytotherapy* 15 (4): 416–22. doi:10.1016/j.jcyt.2012.09.007.

Harrison, Jonathan S, Pranela Rameshwar, Vicotr Chang, and Persis Bandari. 2002. “Oxygen Saturation in the Bone Marrow of Healthy Volunteers.” *Blood* 99 (1). American Society of Hematology: 394. http://www.bloodjournal.org/content/99/1/394.abstract.

Hemeda, Hatim, Jana Kalz, Gudrun Walenda, Michael Lohmann, and Wolfgang Wagner. 2013. “Heparin Concentration Is Critical for Cell Culture with Human Platelet Lysate.” *Cytotherapy* 15 (9). Elsevier Inc: 1174–81. doi:10.1016/j.jcyt.2013.05.006.

Horwitz, E M, K Le Blanc, M Dominici, I Mueller, I Slaper-Cortenbach, F C Marini, R J Deans, D S Krause, and a Keating. 2005. “Clarification of the Nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy Position Statement.” *Cytotherapy* 7 (5): 393–95. doi:10.1080/14653240500319234.

Hung, Shih-Chieh, Radhika R Pochampally, Shu-Ching Hsu, Cecelia Sanchez, Sy-Chi Chen, Jeffrey Spees, and Darwin J Prockop. 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 (5). Public Library of Science: e416. doi:10.1371/journal.pone.0000416.

Jiang, Xiao-Xia, Yi Zhang, Bing Liu, Shuang-Xi Zhang, Ying Wu, Xiao-Dan Yu, and Ning Mao. 2005. “Human Mesenchymal Stem Cells Inhibit Differentiation and Function of Monocyte-Derived Dendritic Cells.” *Blood* 105 (10): 4120–26. doi:10.1182/blood-2004-02-0586.Supported.

Jin, H. J., J. H. Kwon, M. Kim, Y. K. Bae, S. J. Choi, W. Oh, Y. S. Yang, and H. B. Jeon. 2016. “Downregulation of Melanoma Cell Adhesion Molecule (MCAM/CD146) Accelerates Cellular Senescence in Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells.” *Stem Cells Translational Medicine* 5 (4): 427–39. doi:10.5966/sctm.2015-0109.

Jones, Mark, Marileila Varella-Garcia, Margaret Skokan, Steven Bryce, Jeffrey Schowinsky, Rebecca Peters, Boah Vang, et al. 2013. “Genetic Stability of Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stromal Cells in the Quantum System.” *Cytotherapy* 15 (11). Elsevier Inc: 1323–39. doi:10.1016/j.jcyt.2013.05.024.

Kai, Shunro, and Hiroshi Hara. 2003. “Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation.” *Therapeutic Apheresis and Dialysis : Official Peer-Reviewed Journal of the International Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy* 7 (3): 285–91. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12924602.

Keir, Mary E, Manish J Butte, Gordon J Freeman, and Arlene H Sharpe. 2008. “PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity.” *Annual Review of Immunology* 26

(January): 677–704. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.

Ketterl, Nina, Gabriele Brachtl, Cornelia Schuh, Karen Bieback, Katharina Schallmoser, Andreas Reinisch, and Dirk Strunk. 2015. “A Robust Potency Assay Highlights Significant Donor Variation of Human Mesenchymal Stem/progenitor Cell Immune Modulatory Capacity and Extended Radio-Resistance.” *Stem Cell Research & Therapy* 6 (1): 236. doi:10.1186/s13287-015-0233-8.

Krampera, Mauro, Lorenzo Cosmi, Roberta Angeli, Annalisa Pasini, Francesco Liotta, Angelo Andreini, Veronica Santarlasci, et al. 2006. “Role for Interferon-Gamma in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells.” *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 24 (2): 386–98. doi:10.1634/stemcells.2005-0008.

Krampera, Mauro, Sarah Glennie, Julian Dyson, Diane Scott, Ruthline Laylor, Elizabeth Simpson, and Francesco Dazzi. 2003. “Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Response of Naive and Memory Antigen-Specific T Cells to Their Cognate Peptide.” *Blood* 101 (9): 3722–29. doi:10.1182/blood-2002-07-2104.

Krensky, Alan M., Arthur Weiss, Gerald Crabtree, Mark M. Davis, and Peter Parham. 2010. “T-Lymphocyte-Antigen Interactions in Transplant Rejection.” *http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199002223220805*. Massachusetts Medical Society .

Krummel, M F, and J P Allison. 1995. “CD28 and CTLA-4 Have Opposing Effects on the Response of T Cells to Stimulation.” *The Journal of Experimental Medicine* 182 (2): 459–65. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2192127&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Kuhlmann, Ingrid. 1996. “The Prophylactic Use of Antibiotics in Cell Culture.” *Cytotechnology* 19 (2). Kluwer Academic Publishers: 95–105. doi:10.1007/BF00749764.

Latchman, Y, C R Wood, T Chernova, D Chaudhary, M Borde, I Chernova, Y Iwai, et al. 2001. “PD-L2 Is a Second Ligand for PD-1 and Inhibits T Cell Activation.” *Nature Immunology* 2 (3): 261–68. doi:10.1038/85330.

Le Blanc, K, L Tammik, B Sundberg, S E Haynesworth, and O Ringdén. 2003. “Mesenchymal Stem Cells Inhibit and Stimulate Mixed Lymphocyte Cultures and Mitogenic Responses Independently of the Major Histocompatibility Complex.” *Scandinavian Journal of Immunology* 57 (1): 11–20. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12542793.

Le Blanc, Katarina, Francesco Frassoni, Lynne Ball, Franco Locatelli, Helene Roelofs, Ian Lewis, Edoardo Lanino, et al. 2008. “Mesenchymal Stem Cells for Treatment

of Steroid-Resistant, Severe, Acute Graft-versus-Host Disease: A Phase II Study." *Lancet* 371 (9624): 1579–86. doi:10.1016/S0140-6736(08)60690-X.

Le Blanc, Katarina, Ida Rasmusson, Berit Sundberg, Cecilia Götherström, Moustapha Hassan, Mehmet Uzunel, and Olle Ringdén. 2004. "Treatment of Severe Acute Graft-versus-Host Disease with Third Party Haploidentical Mesenchymal Stem Cells." *Lancet* 363 (9419): 1439–41. doi:10.1016/S0140-6736(04)16104-7.

Le Blanc, Katarina, Charlotte Tammik, Kerstin Rosendahl, Eva Zetterberg, and Olle Ringdén. 2003. "HLA Expression and Immunologic Properties of Differentiated and Undifferentiated Mesenchymal Stem Cells." *Experimental Hematology* 31 (10): 890–96. doi:10.1016/S0301-472X(03)00110-3.

Li, W, G Ren, Y Huang, J Su, Y Han, J Li, X Chen, et al. 2012. "Mesenchymal Stem Cells: A Double-Edged Sword in Regulating Immune Responses." *Cell Death and Differentiation* 19 (9): 1505–13. doi:10.1038/cdd.2012.26.

Lindsten, T, K P Lee, E S Harris, B Petryniak, N Craighead, P J Reynolds, D B Lombard, G J Freeman, L M Nadler, and G S Gray. 1993. "Characterization of CTLA-4 Structure and Expression on Human T Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 151 (7). American Association of Immunologists: 3489–99. http://www.jimmunol.org/content/151/7/3489.abstract.

Lönne, Maren, Antonina Lavrentieva, Johanna-Gabriela Walter, and Cornelia Kasper. 2013. "Analysis of Oxygen-Dependent Cytokine Expression in Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord." *Cell and Tissue Research* 353 (1): 117–22. doi:10.1007/s00441-013-1597-7.

Luz-Crawford, Patricia, Danièle Noël, Ximena Fernandez, Maroun Khoury, Fernando Figueroa, Flavio Carrión, Christian Jorgensen, and Farida Djouad. 2012. "Mesenchymal Stem Cells Repress Th17 Molecular Program through the PD-1 Pathway." *PloS One* 7 (9): e45272. doi:10.1371/journal.pone.0045272.

Ma, Teng, Warren L Grayson, Mirjam Fröhlich, and Gordana Vunjak-Novakovic. 2016. "Hypoxia and Stem Cell-Based Engineering of Mesenchymal Tissues." *Biotechnology Progress* 25 (1): 32–42. Accessed July 6. doi:10.1002/btpr.128.

Mackenzie, T C, and a W Flake. 2001. "Human Mesenchymal Stem Cells Persist, Demonstrate Site-Specific Multipotential Differentiation, and Are Present in Sites of Wound Healing and Tissue Regeneration after Transplantation into Fetal Sheep." *Blood Cells, Molecules & Diseases* 27 (3): 601–4. doi:10.1006/bcmd.2001.0424.

MacMillan, Margaret L, Daniel J Weisdorf, John E Wagner, Todd E DeFor, Linda J Burns, Norma K C Ramsay, Stella M Davies, and Bruce R Blazar. 2002. "Response of 443 Patients to Steroids as Primary Therapy for Acute Graft-versus-

Host Disease: Comparison of Grading Systems." *Biology of Blood and Marrow Transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 8 (7): 387–94. doi:10.1053/bbmt.2002.v8.pm12171485.

Mamidi, Murali Krishna, Kavitha Ganesan Nathan, Gurbind Singh, Saratha Thevi Thrichelvam, Nurul Ain Nasim Mohd Yusof, Noor Atiqah Fakharuzi, Zubaidah Zakaria, Ramesh Bhonde, Anjan Kumar Das, and Anish Sen Majumdar. 2012. "Comparative Cellular and Molecular Analyses of Pooled Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stromal Cells during Continuous Passaging and after Successive Cryopreservation." *Journal of Cellular Biochemistry* 113 (10): 3153–64. doi:10.1002/jcb.24193.

Martin, P.J., J.P. Uberti, R.J. Soiffer, H. Klingemann, E.K. Waller, A.S. Daly, R.P. Herrmann, and P. Kebriaei. 2010. "Prochymal Improves Response Rates In Patients With Steroid-Refractory Acute Graft Versus Host Disease (SR-GVHD) Involving The Liver And Gut: Results Of A Randomized, Placebo-Controlled, Multicenter Phase III Trial In GVHD." *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 16 (2). Elsevier: S169–70. doi:10.1016/j.bbmt.2009.12.057.

Medicines Agency, European. 2013. "Guideline on the Use of Bovine Serum in the Manufacture of Human Biological Medicinal Products."

Meisel, Roland, Andree Zibert, Maurice Laryea, Ulrich Göbel, Walter Däubener, and Dagmar Dilloo. 2004. "Human Bone Marrow Stromal Cells Inhibit Allogeneic T-Cell Responses by Indoleamine 2,3-Dioxygenase-Mediated Tryptophan Degradation." *Blood* 103 (12): 4619–21. doi:10.1182/blood-2003-11-3909.

Meloan, Susan N., and Holde Puchtler. 1985. "Chemical Mechanisms of Staining Methods: Von Kossa's Technique: What von Kossa Really Wrote and a Modified Reaction for Selective Demonstration of Inorganic Phosphates." *Journal of Histotechnology*. doi:10.1179/014788885794595048.

Moll, Guido, Jessica J Alm, Lindsay C Davies, Lena von Bahr, Nina Heldring, Lillemor Stenbeck-Funke, Osama a Hamad, et al. 2014. "Do Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells Display Impaired Immunomodulatory and Therapeutic Properties?" *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 32 (9): 2430–42. doi:10.1002/stem.1729.

Mosmann, T R, H Cherwinski, M W Bond, M A Giedlin, and R L Coffman. 1986. "Two Types of Murine Helper T Cell Clone. I. Definition according to Profiles of Lymphokine Activities and Secreted Proteins." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 136 (7). American Association of Immunologists: 2348–57. http://www.jimmunol.org/content/136/7/2348.abstract.

Nardi, N. Beyer, and L. da Silva Meirelles. 2006. *Stem Cells*. Edited by Anna M. Wobus and Kenneth R. Boheler. *Stem Cells*. Vol. 174. Handbook of Experimental

Pharmacology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/3-540-31265-X.

Nauta, Alma J, and Willem E Fibbe. 2007. “Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells.” *Blood* 110 (10): 3499–3506. doi:10.1182/blood-2007-02-069716.

Nicola, Massimo Di, Carmelo Carlo-Stella, Michele Magni, Marco Milanesi, Paolo D. Longoni, Paola Matteucci, Salvatore Grisanti, and Alessandro M. Gianni. 2002. “Human Bone Marrow Stromal Cells Suppress T-Lymphocyte Proliferation Induced by Cellular or Nonspecific Mitogenic Stimuli.” *Blood* 99 (10): 3838–43. doi:10.1182/blood.V99.10.3838.

Nold, Philipp, Cornelia Brendel, Andreas Neubauer, Gregor Bein, and Holger Hackstein. 2013. “Good Manufacturing Practice-Compliant Animal-Free Expansion of Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stroma Cells in a Closed Hollow-Fiber-Based Bioreactor.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 430 (1): 325–30.

Nold, Philipp, Holger Hackstein, Tabea Riedlinger, Cornelia Kasper, Anne Neumann, Marco Mernberger, Christian F??lsch, et al. 2015. “Immunosuppressive Capabilities of Mesenchymal Stromal Cells Are Maintained under Hypoxic Growth Conditions and after Gamma Irradiation.” *Cytotherapy* 17 (2). Elsevier Inc: 152–62. doi:10.1016/j.jcyt.2014.10.004.

Pardoll, Drew M. 2012. “The Blockade of Immune Checkpoints in Cancer Immunotherapy.” *Nature Reviews. Cancer* 12 (4). Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.: 252–64. doi:10.1038/nrc3239.

Pavletic, S Z, S L Carter, N A Kernan, J Henslee-Downey, A M Mendizabal, E Papadopoulos, R Gingrich, J Casper, S Yanovich, and D Weisdorf. 2005. “Influence of T-Cell Depletion on Chronic Graft-versus-Host Disease: Results of a Multicenter Randomized Trial in Unrelated Marrow Donor Transplantation.” *Blood* 106 (9): 3308–13. doi:10.1182/blood-2005-04-1614.

Pittenger, M. F. 1999. “Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells.” *Science* 284 (5411): 143–47. doi:10.1126/science.284.5411.143.

Polchert, David, Justin Sobinsky, Gw Douglas, Martha Kidd, Ada Moadsiri, Eduardo Reina, Kristyn Genrich, et al. 2008. “IFN-Gamma Activation of Mesenchymal Stem Cells for Treatment and Prevention of Graft versus Host Disease.” *European Journal of Immunology* 38 (6): 1745–55. doi:10.1002/eji.200738129.

Riedlinger, Tabea. 2014. “Immunmodulatorische Marker in Mesenchymalen Stammzellen Im Kontext Der GVHD-Behandlung.” Philipps-Universität Marburg.

Ringdén, Olle, Mehmet Uzunel, Ida Rasmusson, Mats Remberger, Berit Sundberg, Helena Lönnies, Hanns-Ulrich Marschall, et al. 2006. “Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Therapy-Resistant Graft-versus-Host Disease.” *Transplantation* 81 (10): 1390–97. doi:10.1097/01.tp.0000214462.63943.14.

Rojewski, Markus T, Natalie Fekete, Stefano Baila, Kim Nguyen, Daniel Fürst, Delbert Antwiler, Julia Dausend, et al. 2013a. “GMP-Compliant Isolation and Expansion of Bone Marrow-Derived MSCs in the Closed , Automated Device Quantum Cell Expansion System” 22: 1981–2000.

———. 2013b. “GMP-Compliant Isolation and Expansion of Bone Marrow-Derived MSCs in the Closed, Automated Device Quantum Cell Expansion System.” *Cell Transplantation* 22 (11): 1981–2000. doi:10.3727/096368912X657990.

Romieu-Mourez, Raphaelle, Daniel L Coutu, and Jacques Galipeau. 2012. “The Immune Plasticity of Mesenchymal Stromal Cells from Mice and Men: Concordances and Discrepancies.” *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)* 4: 824–37. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22201917.

Ryan, J. M., F. Barry, J. M. Murphy, and B. P. Mahon. 2007. “Interferon-γ Does Not Break, but Promotes the Immunosuppressive Capacity of Adult Human Mesenchymal Stem Cells.” *Clinical and Experimental Immunology* 149: 353–63. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03422.x.

Samuelsson, H, O Ringdén, H Lönnies, and K Le Blanc. 2009. “Optimizing in Vitro Conditions for Immunomodulation and Expansion of Mesenchymal Stromal Cells.” *Cytotherapy* 11 (2): 129–36. doi:10.1080/14653240802684194.

Schallmoser, Katharina, Christina Bartmann, Eva Rohde, Andreas Reinisch, Karl Kashofer, Elke Stadelmeyer, Camilla Drexler, Gerhard Lanzer, Werner Linkesch, and Dirk Strunk. 2007. “Human Platelet Lysate Can Replace Fetal Bovine Serum for Clinical-Scale Expansion of Functional Mesenchymal Stromal Cells.” *Transfusion* 47 (8): 1436–46. doi:10.1111/j.1537-2995.2007.01220.x.

Schallmoser, Katharina, and Dirk Strunk. 2009. “Preparation of Pooled Human Platelet Lysate (pHPL) as an Efficient Supplement for Animal Serum-Free Human Stem Cell Cultures.” *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, no. 32(January): 20–23. doi:10.3791/1523.

Schellenberg, Anne, Qiong Lin, Herdit Schüler, Carmen M. Koch, Sylvia Joussen, Bernd Denecke, Gudrun Walenda, et al. 2011. “Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells Causes DNA-Methylation Changes Which Correlate with Repressive Histone Marks.” *Aging* 3 (9): 873–88. doi:100391 [pii].

Schellenberg, Anne, Thomas Stiehl, Patrick Horn, Sylvia Joussen, Norbert Pallua, Anthony D Ho, and Wolfgang Wagner. 2012. “Population Dynamics of

Mesenchymal Stromal Cells during Culture Expansion." *Cytotherapy* 14 (4): 401–11. doi:10.3109/14653249.2011.640669.

Schindler, Christian, David E. Levy, and Thomas Decker. 2007. "JAK-STAT Signaling: From Interferons to Cytokines." *Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.R700016200.

Senseb??, L., M. Krampera, H. Schrezenmeier, P. Bourin, and R. Giordano. 2010. "Mesenchymal Stem Cells for Clinical Application." *Vox Sanguinis*. doi:10.1111/j.1423-0410.2009.01227.x.

Sensebé, Luc. 2008. "Clinical Grade Production of Mesenchymal Stem Cells." *Bio-Medical Materials and Engineering* 18 (s1). IOS Press: 3–10.

Sensebé, Luc, Mélanie Gadelorge, and Sandrine Fleury-Cappellesso. 2013. "Production of Mesenchymal Stromal/stem Cells according to Good Manufacturing Practices: A Review." *Stem Cell Research & Therapy* 4 (3): 66. doi:10.1186/scrt217.

Sharma, Padmanee, Klaus Wagner, Jedd D Wolchok, and James P Allison. 2011. "Novel Cancer Immunotherapy Agents with Survival Benefit: Recent Successes and next Steps." *Nature Reviews. Cancer* 11 (11): 805–12. doi:10.1038/nrc3153.

Shi, M., Z.-W. Liu, and F.-S. Wang. 2011. "Immunomodulatory Properties and Therapeutic Application of Mesenchymal Stem Cells." *Clinical & Experimental Immunology* 164 (1): 1–8. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04327.x.

Slaper-Cortenbach, Ineke C M. 2008. "Current Regulations for the Production of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for Clinical Application." *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 35 (4): 295–98. doi:10.1159/000144043.

Slavin, S, A Nagler, E Naparstek, Y Kapelushnik, M Aker, G Cividalli, G Varadi, et al. 1998. "Nonmyeloablative Stem Cell Transplantation and Cell Therapy as an Alternative to Conventional Bone Marrow Transplantation with Lethal Cytoreduction for the Treatment of Malignant and Nonmalignant Hematologic Diseases." *Blood* 91 (3): 756–63. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9446633.

Soiffer, Robert J., ed. 2004. *Stem Cell Transplantation for Hematologic Malignancies*. Totowa, NJ: Humana Press. doi:10.1007/978-1-59259-733-8.

Son, B R, L A Marquez-Curtis, M Kucia, M Wysoczynski, A R Turner, J Ratajczak, M Z Ratajczak, and A Janowska-Wieczorek. 2006. "Migration of Bone Marrow and Cord Blood Mesenchymal Stem Cells in Vitro Is Regulated by SDF-1-CXCR4 and HGF-c-Met Axes and Involves Matrix Metalloproteinases." *Stem Cells*. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16410389.

Sotiropoulou, Panagiota a, Sonia a Perez, Angelos D Gritzapis, Constantin N

Baxevanis, and Michael Papamichail. 2006. “Interactions between Human Mesenchymal Stem Cells and Natural Killer Cells.” *Stem Cells* 24 (1): 74–85. doi:10.1634/stemcells.2004-0359.

Spoerl, Silvia, Nimitha R. Mathew, Michael Bscheider, Annette Schmitt-Graeff, Sophia Chen, Tony Mueller, Mareike Verbeek, et al. 2014. “Activity of Therapeutic JAK 1/2 Blockade in Graft-versus-Host Disease.” *Blood* 123 (24): 3832–42. doi:10.1182/blood-2013-12-543736.

Startz, Thomas, Boah Vang, and Stefano Baila. 2012. “CELL EXPANSION SYSTEM Automated Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells from Precultured Cells Using the Quantum Cell Expansion System.”

Subbanna, Prasanna Kumar T. 2007. “Mesenchymal Stem Cells for Treating GVHD: In-Vivo Fate and Optimal Dose.” *Medical Hypotheses* 69 (2): 469–70. doi:10.1016/j.mehy.2006.12.016.

Tsai, Chih-Chien, Yann-Jang Chen, Tu-Lai Yew, Ling-Lan Chen, Jir-You Wang, Chao-Hua Chiu, and Shih-Chieh Hung. 2011. “Hypoxia Inhibits Senescence and Maintains Mesenchymal Stem Cell Properties through down-Regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST.” *Blood* 117 (2). American Society of Hematology: 459–69. doi:10.1182/blood-2010-05-287508.

Tse, William T, John D Pendleton, Wendy M Beyer, Matthew C Egalka, and Eva C Guinan. 2003. “Suppression of Allogeneic T-Cell Proliferation by Human Marrow Stromal Cells: Implications in Transplantation.” *Transplantation* 75 (3): 389–97. doi:10.1097/01.TP.0000045055.63901.A9.

Uccelli, Antonio, Lorenzo Moretta, and Vito Pistoia. 2008. “Mesenchymal Stem Cells in Health and Disease.” *Nature Reviews. Immunology* 8 (9): 726–36. doi:10.1038/nri2395.

Verstovsek, Srdan, Ruben a. Mesa, Jason Gotlib, Richard S. Levy, Vikas Gupta, John F. DiPersio, John V. Catalano, et al. 2012. “A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Ruxolitinib for Myelofibrosis.” *New England Journal of Medicine* 366 (9): 799–807. doi:10.1056/NEJMoa1110557.

von Bahr, L, I Batsis, G Moll, M Hägg, A Szakos, B Sundberg, M Uzunel, O Ringden, and K Le Blanc. 2012. “Analysis of Tissues Following Mesenchymal Stromal Cell Therapy in Humans Indicates Limited Long-Term Engraftment and No Ectopic Tissue Formation.” *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 30 (7): 1575–78. doi:10.1002/stem.1118.

von Bonin, M, F Stölzel, a Goedecke, K Richter, N Wuschek, K Hölig, U Platzbecker, et al. 2009. “Treatment of Refractory Acute GVHD with Third-Party MSC Expanded in Platelet Lysate-Containing Medium.” *Bone Marrow Transplantation* 43 (3): 245–

51. doi:10.1038/bmt.2008.316.

Wagner, Wolfgang, Anthony D Ho, and Martin Zenke. 2010. “Different Facets of Aging in Human Mesenchymal Stem Cells.” *Tissue Engineering. Part B, Reviews* 16 (4). Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA: 445–53. doi:10.1089/ten.TEB.2009.0825.

Walunas, Theresa L., Deborah J. Lenschow, Christina Y. Bakker, Peter S. Linsley, Gordon J. Freeman, Jonathan M. Green, Craig B. Thompson, and Jeffrey A. Bluestone. 1994. “CTLA-4 Can Function as a Negative Regulator of T Cell Activation.” *Immunity* 1 (5): 405–13. doi:10.1016/1074-7613(94)90071-X.

Wang, Shihua, Xuebin Qu, and Robert Zhao. 2012. “Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells.” *Journal of Hematology & Oncology* 5 (1). BioMed Central Ltd: 19. doi:10.1186/1756-8722-5-19.

Wing, Kajsa, and Shimon Sakaguchi. 2010. “Regulatory T Cells Exert Checks and Balances on Self Tolerance and Autoimmunity.” *Nature Immunology* 11 (1). Nature Publishing Group: 7–13. doi:10.1038/ni.1818.

Wuchter, Patrick, Karen Bieback, Hubert Schrezenmeier, Martin Bornhäuser, Lutz P Müller, Halvard Bönig, Wolfgang Wagner, et al. 2014. “Standardization of Good Manufacturing Practice-Compliant Production of Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stromal Cells for Immunotherapeutic Applications.” *Cytotherapy*, no. April (May). Elsevier Inc. doi:10.1016/j.jcyt.2014.04.002.

Wysham, Nicholas G., Donald R. Sullivan, and Gopal Allada. 2013. “An Opportunistic Infection Associated with Ruxolitinib, a Novel Janus Kinase 1,2 Inhibitor.” *Chest* 143 (5): 1478–79. doi:10.1378/chest.12-1604.

Young, Henry E, and Asa C Black. 2004. “Adult Stem Cells.” *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 276 (1): 75–102. doi:10.1002/ar.a.10134.

Zafranskaya, Marina M, Darya B Nizheharodova, Mariya Yu Yurkevich, Natallia V Lamouskaya, Yana M Motuzova, Svetlana S Bagatka, Halina I Ivanchik, and Alexander S Fedulov. 2013. “In Vitro Assessment of Mesenchymal Stem Cells Immunosuppressive Potential in Multiple Sclerosis Patients.” *Immunology Letters* 149 (1–2). Elsevier B.V.: 9–18. doi:10.1016/j.imlet.2012.10.010.

Zappia, E., S. Casazza, E. Pedemonte, F. Benvenuto, I. Bonanni, E. Gerdoni, D. Giunti, et al. 2005. “Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Inducing T Cell Anergy.” *Blood* 106 (5): 1755–61. doi:10.1182/blood-2005-04-1496.

Zhang, Wei, Wei Ge, Changhong Li, Shengguo You, Lianming Liao, Qin Han, Weimin Deng, and Robert C H Zhao. 2004. “Effects of Mesenchymal Stem Cells on

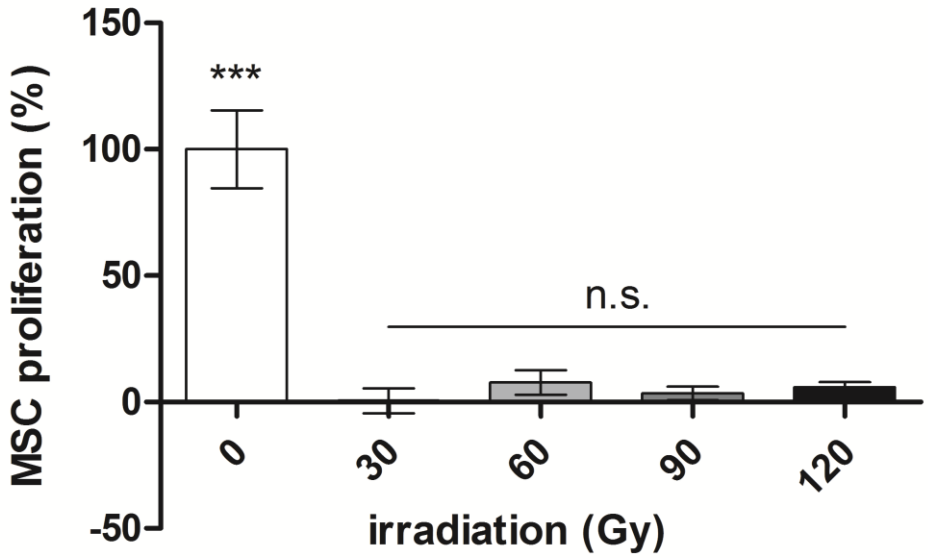
Differentiation, Maturation, and Function of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells." *Stem Cells and Development* 13 (3): 263–71. doi:10.1089/154732804323099190.

Zuk, Patricia A, Min Zhu, Peter Ashjian, Daniel A De Ugarte, Jerry I Huang, Hiroshi Mizuno, Zeni C Alfonso, John K Fraser, Prosper Benhaim, and Marc H Hedrick. 2002. "Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells." *Molecular Biology of the Cell* 13 (12): 4279–95. doi:10.1091/mbc.E02-02-0105.

Anhang

Anhang Tabelle 1 PBMC-Spenderabhängigkeit des immunsuppressiven Potentials von MSC.
Aufgelistet sind drei verschiedene Ansätze, d.h. die Spender A, B, C bzw. D, E, F und G, H, I sind in Ansatz 1, 2 und 3 für alle in den jeweiligen Ansätzen verwendeten MSC-Chargen jeweils identisch. Die Proliferation ist als % der Positiv-Kontrolle angegeben. Adaptiert aus: Riedlinger, 2014

Ansatz	MSC-Charge	Spender	$CD4^+$ Proliferation (%)	$CD8^+$ Proliferation (%)
1	5713 P6	A	56,79	73,18
		B	69,16	53,41
		C	8,66	32,53
	4913 P7	A	75,72	82,51
		B	36,60	20,28
		C	46,07	78,16
2	7413 P10	D	40,02	40,93
		E	92,85	90,34
		F	50,01	53,99
	6513 P11	D	43,22	39,32
		E	85,73	79,21
		F	52,83	59,78
	114 P2	D	68,76	76,09
		E	91,36	90,06
		F	69,59	79,58
	314 P2	D	42,76	45,72
		E	85,93	84,13
		F	71,74	83,41
3	6913 P2	G	88,93	98,19
		H	88,30	90,71
		I	85,25	88,30
	6613 P4	G	94,42	99,25
		H	99,21	99,67
		I	95,88	99,22



Anhang Abbildung 1 Proliferation von MSC nach γ-Bestrahlung mit angegeben Dosen. Eine Dosis von 30 Gray führt zu einem signifikanten Proliferations-Stopp, Die Ergebnisse wurden auf die Proliferation von unbestrahlten MSC normalisiert, n=4. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen; ***p < 0,001.

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten mit Erstautorenschaft

P. Nold, M. C. Killer, K. Henkenius, L. Fritz, T. Riedlinger, C. Barckhausen, M. Frech, H. Hackstein, A. Neubauer, and C. Brendel, “Immunosuppressive capacity of mesenchymal stem cells correlates with metabolic activity and can be enhanced by valproic acid,” *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 8, no. 1, p. 100, 2017.

P. Nold, R. Hartmann, N. Feliu, K. Kantner, M. Gamal, B. Pelaz, J. Hühn, X. Sun, P. Jungebluth, P. Pino, H. Hackstein, P. Macchiarini, W. J. Parak, and C. Brendel, “Optimizing conditions for labeling of mesenchymal stromal cells (MSCs) with gold nanoparticles : a prerequisite for in vivo tracking of MSCs,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 15, no. 1, p. 24, Mar. 2017.

P. Nold, H. Hackstein, T. Riedlinger, C. Kasper, A. Neumann, M. Mernberger, C. Fölsch, J. A. N. Schmitt, S. Fuchs-Winkelmann, C. Barckhausen, M. Killer, A. Neubauer, and C. Brendel, “Immunosuppressive capabilities of mesenchymal stromal cells are maintained under hypoxic growth conditions and after gamma irradiation,” *Cytotherapy*, vol. 17, no. October, pp. 152–162, 2015.

P. Nold, C. Brendel, A. Neubauer, G. Bein, and H. Hackstein, “Good manufacturing practice-compliant animal-free expansion of human bone marrow derived mesenchymal stroma cells in a closed hollow-fiber-based bioreactor,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 430, no. 1, pp. 325–330, 2013.

Originalarbeiten mit Koautorenschaft

H. Hackstein, I. Tschipakow, G. Bein, **P. Nold**, C. Brendel, and N. Baal, “Contact-dependent abrogation of bone marrow-derived plasmacytoid dendritic cell differentiation by murine mesenchymal stem cells.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, May 2016.

C. Barckhausen, B. Rice, S. Baila, L. Sensebé, H. Schrezenmeier, **P. Nold**, H. Hackstein, and M. T. Rojewski, “GMP-Compliant Expansion of Clinical-Grade Human Mesenchymal Stromal/Stem Cells Using a Closed Hollow Fiber Bioreactor.,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 1416, pp. 389–412, 2016..

Patentanmeldung

Brendel C, Hackstein H, **Nold P** (2014), Method for manufacturing of a composition comprising ex vivo expanded human mesenchymal stromal cells. European Patent Office. Application No. 14186449.6 – 1403.

Vorträge

Nold P, Killer M, Henkenius K, Fritz L, Riedlinger T, Barckhausen C, Frech M, Hackstein H, Neubauer A, Brendel C: Die metabolische Aktivität von mesenchymalen Stromazellen korreliert mit der immunsuppressiven Kapazität im T-Zell Proliferations-Assay" *Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO)* 14 – 18 Oktober 2016 in Leipzig

Posterpräsentationen

Nold P, Hartmann R, Kantner K, Parak WJ, Brendel C, Hackstein H: Gold nanoparticle labeling of bioreactor expanded human mesenchymal stem cells. *Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO)* 10 – 14 Oktober 2014 in Hamburg

Nold P, Brendel C, Neubauer A, Bein G, Hackstein H: Good manufacturing practice-compliant animal-free expansion of human bone marrow derived mesenchymal stroma cells in a closed hollow-fiber-based bioreactor. *47th Annual meeting of the German Society for Transfusion Medicine and Immunohematology (DGTI)* 09 - 12 September 2014 in Dresden

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

_____ _____

Ort, Datum Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht haben. Ich danke recht herzlich Herrn Prof. Dr. Holger Hackstein für die Überlassung des Promotionsthemas sowie seine Betreuung. Sein fachlicher Rat und sein offenes Ohr für Fragen ermöglichten es mir, am Thema zu wachsen und neue Hürden zu meistern. Herrn Prof. Dr. Andreas Neubauer danke ich für die Möglichkeit, die Dissertation an seinem Institut anzufertigen. Herzlichen Dank an Frau PD. Dr. Cornelia Brendel, die mir es ermöglichte die Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Ihre ständige Bereitschaft zu anregenden Diskussionen und ihr Enthusiasmus waren ein großer Antrieb bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Neubauer, Burchert und Brendel für ein angenehmes Arbeitsklima und offenes Ohr für sämtliche Lebenslagen. Insbesondere danke ich Herrn Gavin Giel, der mich bei unzähligen durchflusszytometrischen Messungen angeleitet hat. Frau Kathleen Stabla, Frau Sonja Tajstra und Frau Larissa Greif gebührt mein Dank für ihre nette und fachkundige Hilfe bei sämtlichen Laborfragen. Dem Team der Strahlentherapie und Radioonkologie, insbesondere Frau Dr. Andrea Arenz, spreche ich meinen Dank aus für die Zurverfügungstellung der Röntgenröhre. Vielen Dank auch an die Mitarbeiter des Stammzelllabors. Im Besonderen an Frau Cordula Loechelt und Almut Wachtel, die mich mit ihrem großen Erfahrungsschatz das Arbeiten unter GMP-Bedingungen lehrten. Ebenso danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Hackstein, die mir immer mit Rat und Tat zu Seite standen. Insbesondere Frau Gabriela Michel, die mit ihrer Hilfsbereitschaft und Kompetenz manches Experiment erst möglich machte. Danke auch an Herrn Andreas Wachtendorf für seine unkomplizierte Hilfe.

Frau Prof. Dr. Cornelia Kasper und ihrer Arbeitsgruppe am Institut für Biotechnologie in Wien danke ich für die Kooperation, die mir die Experimente zur hypoxischen MSC-Kultur ermöglicht hat. Frau Prof. Dr. Susanne Fuchs-Winkelmann, Herrn Prof. Thomas Heyse und den Mitarbeitern der Orthopädie des Uniklinikums Marburg danke ich für die Bereitstellung von Spongiosa zur MSC-generierung. Danke an Herrn Dr. Brent Rice und Dr. Stefano Baila für die fachliche Beratung zur MSC-Expansion im Bioreaktor und zu ATMPs.

Mein großer Dank geht an meine Frau Verena, die mich stets auf neue Ideen brachte und mir neuen Mut machte. Meiner Familie, vor allem meinen Eltern, danke ich von ganzem Herzen für die Unterstützung, die mich immer getragen hat.

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.