

Identifizierung neuer Oberflächenmarker auf mesenchymalen Stromazellen aus dem Knochenmark

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

vorgelegt von
Svenja Hemmer
aus Lippstadt

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin

Gutachter: Prof. Dr. med. Holger Hackstein

Gutachterin: Prof. Dr. med. Susanne Herold

Tag der Disputation: 08.06.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Stammzellen	1
1.2	Mesenchymale Stromazellen.....	1
1.3	Eigenschaften von MSC	2
1.4	Isolierung von humanen MSC aus Knochenmark.....	4
1.5	MSC exprimieren bestimmte Oberflächenmarker.....	6
1.6	Klinische Anwendung von MSC.....	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	Zusammensetzung der Medien.....	16
2.6	Antikörper.....	17
3	Methoden	19
3.1	Optimierung der Isolationsmethode von MSC.....	19
3.2	Kryokonservierung und Auftauen der MSC.....	20
3.3	Durchflusszytometrische Verfahren	21
3.3.1	Durchflusszytometrie	21
3.3.2	Antikörperfärbung der MSC und Charakterisierung am Durchflusszytometer.....	21
3.4	Isolierung der MSC aus Knochenmarkaspirat.....	25
3.5	Statistik.....	25
4	Ergebnisse.....	27

4.1	Systematische Untersuchung der Expression von Oberflächenmarker auf MSC	27
4.1.1	Validierung.....	28
4.2	Die Expression einiger Oberflächenmarker ist MSC-spezifisch.....	30
4.3	Knochenmarkaspirat als MSC Quelle	33
4.3.1	Spongiosa und Knochenmarkaspirat unterscheiden sich als MSC Quelle nicht hinsichtlich der Oberflächenmarkerexpression.....	35
4.4	Die neuen Oberflächenmarker sind spezifisch für MSC frisch isoliert aus Knochenmarkaspirat.....	36
5	Diskussion.....	41
5.1	Oberflächenmarkerexpression auf MSC im Vergleich	41
5.2	CD 39.....	42
5.3	CD 51.....	44
5.4	CD 81.....	45
5.5	Ausblick.....	46
6	Zusammenfassung.....	48
7	Summary.....	49
8	Abkürzungsverzeichnis.....	50
9	Abbildungsverzeichnis.....	53
10	Tabellenverzeichnis.....	54
11	Literaturverzeichnis.....	55
12	Anhang	71
13	Publikationsverzeichnis.....	83
14	Erklärung zur Dissertation	84
15	Danksagung.....	85

1 Einleitung

1.1 Stammzellen

Als Stammzellen bezeichnet man undifferenzierte Zellen des Körpers, welche die Eigenschaft besitzen, sich mittels asymmetrischer Teilung selbst zu erneuern und dabei eine differenzierte Tochterzelle hervorzubringen (Clevers 2005). Man unterscheidet verschiedene Arten von Stammzellen: totipotente, pluripotente und multipotente. Totipotente Stammzellen sind die Zygotenzellen, welche sich in sämtliches intra- und extraembryonale Gewebe inklusive Keimbahnzellen differenzieren können. Als pluripotent sind embryonale Stammzellen definiert, die sich in alle Zelltypen der drei Keimblätter Endoderm, Mesoderm und Ektoderm sowie Keimzellen differenzieren können. Multipotente Stammzellen, welche in ca. 20 Organen des menschlichen Körpers nachgewiesen wurden, differenzieren sich zu vorher genetisch festgelegtem Gewebe (Young und Black 2004). Zu den multipotenten Stammzellen zählen beispielsweise die Stammzellen der Haut, die hämatopoetischen Stammzellen als Vorreiter der Blutzellen oder die mesenchymalen Stammzellen. 2006 entdeckten japanische Wissenschaftler, dass man eine nicht-pluripotente somatische Zelle durch Reprogrammierung in eine Art Zelle verwandeln kann, welche einer embryonalen Stammzelle ähnlich ist (Takahashi und Yamanaka 2006). Diese Zellen werden induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) genannt.

1.2 Mesenchymale Stromazellen

Mesenchymale Stromazellen sind sich selbst erneuernde, plastikadhärente, multipotente Zellen, welche im Allgemeinen als MSC abgekürzt werden. Sie kommen in verschiedenen Organen verschiedener Spezies vor (Beyer Nardi und da Silva Meirelles 2006). Beim Menschen findet man sie vornehmlich in Knochenmark (Friedenstein et al. 1976; Pittenger 1999) und Fettgewebe (Zuk et al. 2002); jedoch auch in anderen Organen wie zum Beispiel der Lunge, der Milz, der Leber oder auch im Nabelschnurblut von Neugeborenen (da Silva Meirelles et al. 2006). Sie wurden erstmalig von Friedenstein 1974 beschrieben und schon dort wurde auf ihre Fähigkeit hingewiesen, fibroblastenähnliche Kolonien (CFU-Fs) in Kultur bilden zu können (Friedenstein et al. 1974). Phänotypisch werden MSC als spindelförmig bezeichnet (Pittenger 1999). Neben ihrem Wachstumsverhalten werden sie durch die Expression

bestimmter Oberflächenmarker und ihrem Differenzierungspotenzial charakterisiert. Viele Forscher benutzen das Akronym MSC für ihre Zellpopulationen, verwenden jedoch teilweise völlig verschiedene Isolationsmethoden, Quellen und Kultivierungsansätze. Um dieser Misshelligkeit in der Charakterisierung von MSC zu begegnen, verfasste die ISCT (International Society for Cellular Therapy) 2006 folgende minimale Kriterien für die Definition von MSC (Dominici et al. 2006):

1. MSC müssen plastikadhärent sein und ein fibroblastenähnliches Wachstumsmuster in Standardkulturen aufweisen.
2. Sie exprimieren CD73, CD 105 und CD90 und sind negativ für CD14, CD19, CD34, CD45, CD11b, CD79a und HLA-DR.
3. MSC müssen in Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten in vitro differenzierbar sein.

Zudem sollen Zellen nur als mesenchymale Stammzellen bezeichnet werden, wenn sie spezifische Stammzellen-Eigenschaften tragen. Andere fibroblastenähnliche Zellen, welche oben genannte Kriterien erfüllen, sollen ungeachtet ihrer Isolationsquelle mesenchymale Stromazellen genannt werden. Das Akronym MSC gelte für beide (Horwitz et al. 2005).

Seit einiger Zeit wird über eine Änderung der Definition der ISCT diskutiert. So schlägt beispielsweise Keating in einem 2012 erschienenen Artikel der *Cell Press* vor, die Kriterien der ISCT zu überdenken und an die neuen Forschungsergebnisse anzupassen, ohne die ursprünglichen Vorteile der einheitlichen ISCT Definition aus den Augen zu verlieren. Als „[...]größte Hürde“ bezeichnet er „[...]die Abwesenheit eines einzelnen Charakteristikums oder Marker, mit welchen man MSC definieren könne“ (Keating 2012, S. 710).

1.3 Eigenschaften von MSC

Mesenchymale Stromazellen besitzen verschiedene Eigenschaften. Man geht davon aus, dass MSC aufgrund ihres Differenzierungspotenzials in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten die Knochen- und Knorpelregeneration vermitteln können (Jones und Yang 2011). Außerdem stellen sie das Stroma für Wachstum und Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen (HSC) und für die Hämatopoese (Dexter 1979) bereit.

In vitro können MSC je nach Kulturbedingungen und –zusätzen in Muskel-, Herz- und Leberzellen differenzieren (Behfar et al. 2010; Pittenger et al. 2019). Neben ihrer regenerativen Fähigkeiten haben MSC die Möglichkeit, regulatorisch mit Zellen des Immunsystems in Interaktion zu treten (Dorransoro et al. 2013). Derartige Interaktionen wurden sowohl in vitro (Meisel et al. 2004; Zhang et al. 2004) als auch in vivo (Le Blanc et al. 2004; Hackstein et al. 2015) beobachtet.

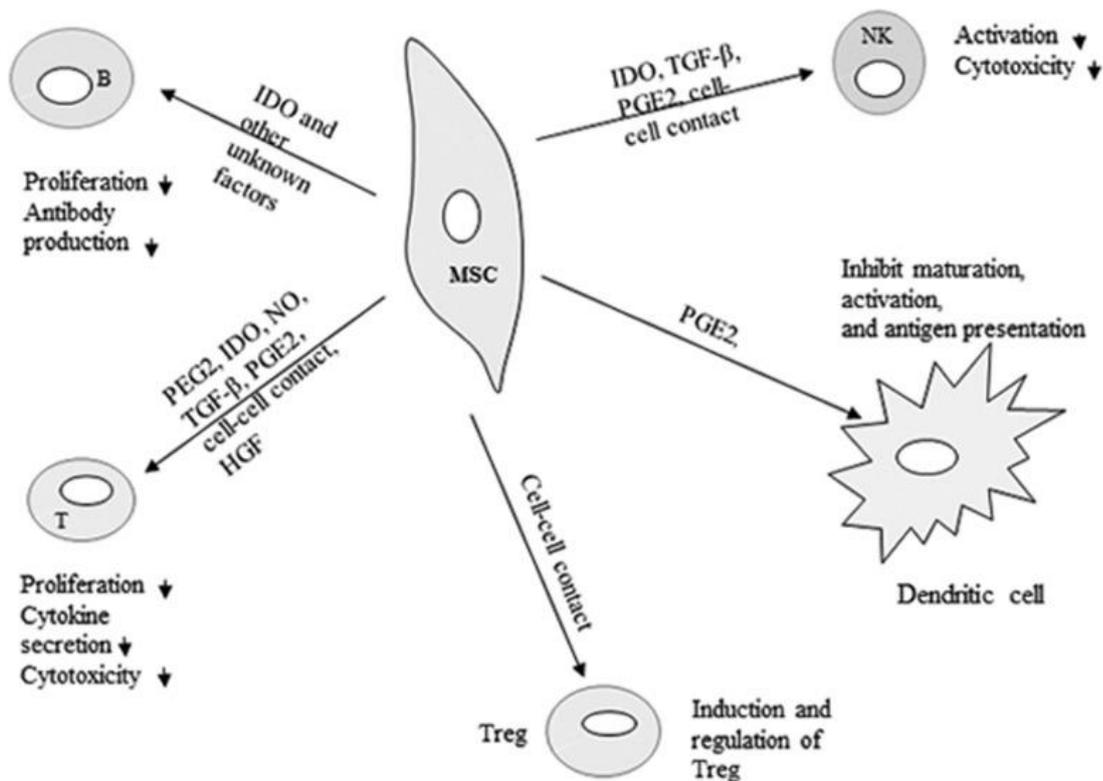


Abbildung 1: Immunmodulatorische Effekte mesenchymaler Stammzellen

Immunmodulatorische Effekte der MSC werden mithilfe von Zell-zu-Zell Kontakt und löslichen Mediatoren vermittelt. Dazu gehören die Suppression der B- und T-Zell Proliferation, die Induktion von regulatorischen T-Zellen, die Unterdrückung der Natürlichen Killerzellen und der dendritischen Zellaktivität. Abbildung übernommen mit Erlaubnis aus „Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospect“s (Gao et al. 2016, Cell Death & Disease 2016, Copyright Open Access Artikel, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4816164/figure/fig1/21.09.21>).

MSC interagieren unter anderem mit T-Zellen mittels Zell-Zell Kontakten (Jiang et al. 2005), aber auch über lösliche Faktoren wie Prostaglandin E2 (PGE2) (Aggarwal und Pittenger 2005), Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) (Meisel et al. 2004), NO (Sato et al. 2007), TGFβ1 und HGP (Di Nicola 2002), welche inhibierend auf die T-Zell Proliferation und deren Zytokinsekretion wirken. Derartige Interaktionen sind am ehesten Wechselwirkungen zwischen den MSC und den T-Zellen sowie den NK Zellen, da die Ausschüttung von INFγ dazu führt, dass die MSC ihre immunsuppressive Wirkung entfalten können (Krampera et al. 2006). Zudem können sie die Funktion regulatorischer T-Zellen beeinflussen (Selmani et al. 2008). MSC wirken immunmodulierend auf B-Zellen, indem sie die Antikörperproduktion beeinträchtigen und die Proliferation der B-Zellen mittels Zellzyklusarretierung inhibieren (Corcione et al. 2006). Außerdem sind sie dazu in der Lage, reversibel die Differenzierung und Reifung dendritischer Zellen zu inhibieren und damit den Beginn einer Immunreaktion zu beeinflussen (Jiang et al. 2005). MSC können somit, je nach Anwesenheit verschiedener Zelltypen und Zytokine, sowohl anti- als auch proinflammatorisch wirken (Li et al. 2012).

1.4 Isolierung von humanen MSC aus Knochenmark

Die gängige Isolationsmethode für MSC verwendet deren Eigenschaft zur Plastikadhärenz. Meist wird Knochenmarksaspirat verwendet und einer Dichtezentrifugation unterzogen, welche die mononukleären Zellen von den restlichen Bestandteilen des Marks (z.B. Blutplasma, Lipide) trennt. Danach wird das Zellgemisch in Plastikflaschen zur Expansion ausplattiert. Nach einiger Zeit bilden die MSC Kolonien, während mehrfache Mediumwechsel dafür sorgen, dass nicht-adhärenente Zellen abgewaschen werden. Viele dieser Schritte, angefangen mit der Quelle der MSC, variieren in ihrer Ausführung von Labor zu Labor (Bara et al. 2014).

Diese Methode begünstigt die Verunreinigung der Zellkulturen mit beispielsweise Osteoblasten, Fettzellen, Makrophagen, Endothelzellen und Zellen der hämatopoetischen Reihe, weswegen eine längere Kultivierungszeit mit vielen Waschschritten nötig ist (Pittenger 1999). Jedoch scheinen in dieser Zeit das Wachstum, das Differenzierungspotenzial und die Fähigkeit zur Zellmigration der MSC abzunehmen (Kim et al. 2009). Daher versuchen Forschergruppen mit Hilfe der

Durchflusszytometrie MSC anhand ihrer Oberflächenantigene aus den verschiedenen Quellen zu isolieren und erst danach zu kultivieren, um reinere Kulturen zu generieren.

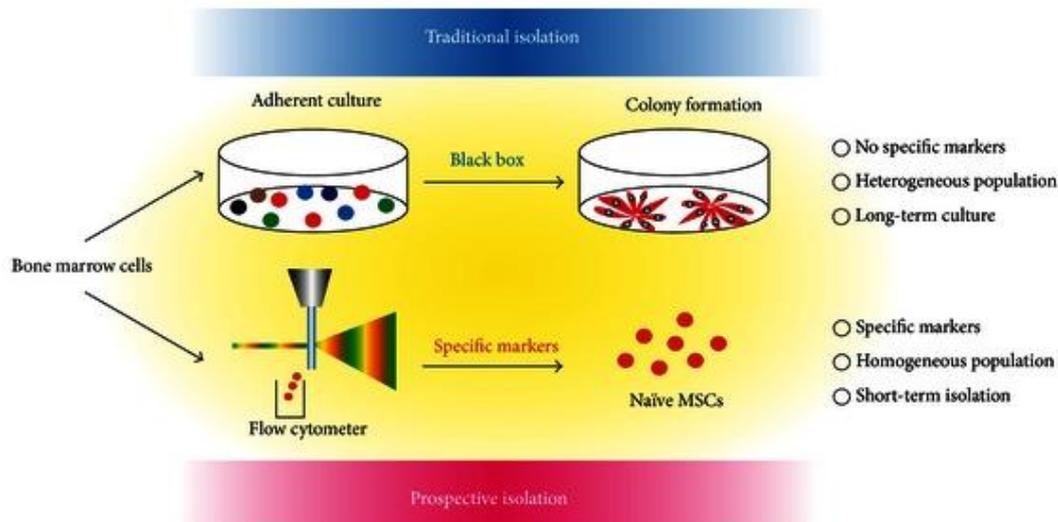


Abbildung 2: Isolationsmethoden

Vergleich zwischen der gängigen (oben) und prospektiven (unten) Isolationsmethode von MSC. Während die traditionelle Methode durch das Auswaschen der kontaminierenden Zellen keine Kontrolle bietet über die Homogenität der MSC Kultur, soll die prospektive Methode der Isolation über spezifische Marker bestenfalls eine reine MSC Kultur hervorbringen. Abbildung übernommen mit Erlaubnis aus "Prospective Isolation of Murine and Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Based on Surface Markers" ((Mabuchi et al. 2013a) Copyright Open Access Artikel (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3673454/figure/fig1/> 21.09.2021))

Neben Knochenmarkspirat können auch kleine Spongiosastücke verwendet werden, welche zuerst mit einem Skalpell und/oder einer Schere zerkleinert und danach mit einer Kollagenase verdaut werden. Ursprünglich als Methode zur Isolation von murinen MSC entwickelt (Zhu et al. 2010; Houlihan et al. 2012), fand sie schnell auch Einsatz bei der Isolation aus humanen Knochenfragmenten und zeigte teilweise bessere Ergebnisse bezüglich ihres Potenzials, Kolonien in Kultur zu bilden (Mabuchi et al. 2013b).

1.5 MSC exprimieren bestimmte Oberflächenmarker

Zelloberflächenmarker sind Moleküle, welche auf der Oberfläche von Zellen exprimiert werden und in den sogenannten „clusters of differentiation“ zur Immunphänotypisierung eingeteilt werden (Chan J.K.C., NG C.S. & Hui P.K 1988). Wie schon in der Definition der MSC durch die ISCT beschrieben, tragen MSC bestimmte Oberflächenmarker. Diese unterscheiden sich jedoch einerseits von Spezies zu Spezies, andererseits auch je nach Isolationsquelle (Uder et al. 2018). Pittenger et al. brachten als Erste CD105 und CD73 als mögliche Marker humaner MSC ein (Pittenger 1999). Mit den Jahren vervielfältigten sich die Forschungsarbeiten zu möglichen Oberflächenmarkern; eine alleinige PubMed Suche bringt über 1300 Ergebnisse (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=MSC+surface+marker>, Website aufgerufen am 21.09.21).

Als etablierte Marker humaner MSC zählen unter anderem Stro-1 (Ning et al. 2011), CD271 (Jones et al. 2006), CD90 (Dominici et al. 2006), CD13 (Jones et al. 2006), CD106 (Yang et al. 2013) und CD146 (Sorrentino et al. 2008). Zudem exprimieren MSC verschiedene Oberflächenantigene nicht, welches man sich als negative Selektion während der Isolation über Durchflusszytometrie zu Nutzen machen kann. Oft werden CD45 als Leukozytenmarker und CD31 als Endothelzellmarker zur negativen Selektion den positiven Markern vorgeschaltet (Jones et al. 2002). Manche Forscher benutzen eine Einteilung für die MSC positiven Marker in „sole marker“ und in „stemness marker“ (Lv et al. 2014). Dabei sei der „sole marker“ ein Oberflächenantigen, welches als alleinige Isolationsmethode die heterogenen MSC aus ihrer *in vivo* Nische identifizieren kann. Ein „stemness marker“ andererseits könne die Teilmenge an MSC identifizieren, welche eher CFU bilden und sich besser in Knorpel, Knochen und Fett ausdifferenzieren. Zudem scheint es Unterschiede in den immunmodulatorischen Fähigkeiten der MSC zu geben, je nachdem, mit welchen Markern die Zellen primär isoliert worden sind (Yang et al. 2013). In den letzten Jahren stellte sich zusätzlich heraus, dass MSC aus verschiedenen Nischen (Endosteum, Stroma und perivaskulärem Gewebe) isoliert unterschiedliche Oberflächenantigene tragen (Rasini et al. 2013).

In den vielen publizierten Studien zu Oberflächenmarkern der MSC gibt es große Unterschiede darin, aus welchem Gewebe die Zellen isoliert und in welchem Zustand

die Zellen betrachtet worden sind. So zeigt ein Review von 2014, dass die Expression verschiedener Oberflächenmarker davon abhängig ist, ob die Zellen *in vivo*, frisch isoliert oder kultiviert untersucht wurden (siehe Tabelle 1).

Marker	In vivo	Freshly isolated	Post monolayer expansion	Notes
CD44	nb	- (Qian et al. 2012)	+ (Qian et al. 2012) + (Halfon et al. 2011)	Mouse and Human Human
CD73	+ (Rasini et al. 2013)	+ (Jones et al. 2002) + (Qian et al. 2012)	+ (Jones et al. 2002) + (Qian et al. 2012) + (Fekete et al. 2012)	Human, immunohistochemistry Human, previously freeze thawed Mouse and human, ↑ Gene expression with time in culture Human
CD105	nb	+ (Jones et al. 2006) + mouse / low human (Qian et al. 2012)	+ (Jones et al. 2006)	Human, freeze thawed Human, ↑ Gene expression with time in culture

			+ (Fekete et al. 2012)	Human
CD90	nb	nb	+ (Fekete et al. 2012)	Human
CD166	nb	nb	+ (Fekete et al. 2012)	Human
CD271	+/- (Rasini et al. 2013)	- (Raisini et al. 2013) + (Qian et al. 2012) + (Cox et al. 2012)	- (Fekete et al. 2012)	Human, niche location dependant, immunohistochemistry Human Human, ↓ cell surface marker labeling with time in culture
CD146	+/- (Rasini et al. 2013)	+ (Qian et al. 2012) + variable (Jones et al. 2006) +/- (Blocki et al. 2013)	+ (Jones et al. 2006) + (Halfon et al. 2011) + (Blocki et al. 2013)	Human, niche location dependant, immunohistochemistry Human, ↑ Gene expression with time in culture Human, freeze thawed ↓ With time in culture, Initially negative cells acquired expression during culture

CD106	nb	+ variable (Jones et al. 2006) + (Qian et al. 2012)	+ (Jones et al. 2006) + (Halfon et al. 2011)	Human, freeze thawed Mouse and human, ↓ Cell surface marker labeling with time in culture
GD2	+ (Rasini et al. 2013)	 + (Martinez et al. 2007)	 + (Martinez et al. 2007)	Human, niche location dependant, immunohistochemistry Human
SCA1	 + (Morikawa et al. 2009) + (Nakamura et al. 2010)	+ (Qian et al. 2012) + (Morikawa et al. 2009) + (Nakamura et al. 2010)	nb	Mouse Mouse Mouse
Stro-1	nb	+ (Qian et al. 2012)	 + (Simmons und Torok-Storb 1991)	Human Human
Nestin		+ (Qian et al. 2012)	nb	Mouse

	+ (Méndez-Ferrer et al. 2010)	+ (Méndez-Ferrer et al. 2010)		Mouse
PDGFr	nb	+ (Qian et al. 2012)	nb	Mouse

Tabelle 1: Vergleich der Oberflächenmarkerexpression auf naiven, frisch isolierten und kultivierten MSC

Dargestellt wird die Expression verschiedener Oberflächenmarker je nach Zustand der MSCs (in vivo, frisch isoliert und kultiviert). Positiv wird mit (+), negativ mit (-) bezeichnet. Die Abkürzung „nb“ bedeutet „nicht bestimmt“ und gibt an, dass zur Expression dieser Marker in den jeweiligen Gruppen in vivo, frisch isoliert und kultiviert keine Daten vorliegen. Die Expression der Oberflächenantigene wurde von den Forschungsgruppen, sofern nicht anderweitig beschrieben, mit Durchflusszytometrie bestimmt. Die Tabelle wurde formatiert und mit freundlicher Genehmigung von Prof. Martin Stoddart aus „Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Change Phenotype Following In Vitro Culture: Implications for Basic Research and the Clinic“ (Bara et al. 2014)“ übernommen.

Die Arbeit einer Forschergruppe aus Tokio zeigte zuletzt, dass eine alleinige Verwendung der Oberflächenmarker CD 90 und CD 271 zur Isolation aus frischem Knochenmark eine sehr reine Population von potenten humanen MSC generiert (Mabuchi et al. 2013b).

1.6 Klinische Anwendung von MSC

MSC können aufgrund ihrer Fähigkeit, die Regeneration von Gewebe zu unterstützen, und ihren immunmodulatorischen Eigenschaften klinisch beim Menschen angewandt werden. Derzeit sind jedoch weiterhin die Therapie mit hämatopoetischen Stammzellen bei Krankheiten wie Leukämie und Lymphomen die häufigste Anwendung von Stammzellen in der Medizin.

MSC exprimieren ohne spezielle Kulturzugaben weder MHCII, noch andere immun wirksame Oberflächenantigene wie CD80, CD86 und CD40 (Tse et al. 2003; Pittenger 1999). MSC wurden seither, teilweise ungeachtet der HLA Kompatibilität (Le Blanc et al. 2003), sowohl autolog als auch allogene transplantiert (Krampera et al. 2003; Le Blanc et al. 2003).

Schon 1995 wurden MSC in Versuchen am Menschen angewendet (Lazarus et al. 1995). Seither gab es eine große Anzahl an Studien, welche die Wirksamkeit und Sicherheit von MSC testen sollten. Fast 1300 klinische Studien mit MSC als Zelltherapeutikum in den verschiedenen Phasen eins bis vier sind zurzeit auf der größten Website für medizinische klinische Studien registriert (www.clinicaltrials.gov, aufgerufen am 21.09.21). Die Anwendungsgebiete dabei sind vielfältig. Sie reichen von unterstützenden Therapien zur Wundheilung, über die Behandlung von Schlaganfällen und Diabetes und Bekämpfung von Autoimmunkrankheiten bis hin zur Regeneration von verletzten Geweben der Lunge, Leber, Niere und des Herzens (Wang et al. 2012). Im Rahmen der Behandlung der akuten Graft-versus-Host Disease (GVHD, deutsch: Graft-versus-Host-Krankheit), einer Komplikation nach allogener Stammzelltransplantation, bei der sich die transplantierten T-Zellen gegen den Empfängerorganismus richten, wurden MSC in einem Heilversuch von Le Blanc und Kollegen erfolgreich transplantiert (Le Blanc et al. 2004). In Folgestudien (Le Blanc et al. 2008; Kebriaei et al. 2009; Bonin et al. 2009) zeigte sich, dass die Transplantation von MSC bei verschiedenen Schweregraden der GVHD ganz oder teilweise erfolgreich sein kann und somit möglicherweise eine neue erfolgsversprechende Therapie dieser Erkrankung ist (Wang et al. 2012).

Im Bereich der ischämischen Herzerkrankungen werden MSC vermehrt zur kardiovaskulären Regeneration eingesetzt (Wang et al. 2012). So ergibt eine Suche auf www.clinicaltrials.gov nach MSC als Therapie für ischämische Herzerkrankungen 81 Phase II bis IV Studien (Stand 21.09.2021). Beispielsweise verbesserte die intrakoronare Injektion von autologen MSC nach perkutaner koronarer Intervention bei Patienten mit Myokardinfarkt die linksventrikuläre Ejektionsfraktion im Verlauf (Chen et al. 2004). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind nicht abschließend geklärt, da die Fähigkeit der MSC zur Bildung von Kardiomyozyten nicht allein dafür verantwortlich sein könne (Michler 2018).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass den zahlreichen Anwendungen von MSC in klinischen Studien ihre biologischen Eigenschaften zur Differenzierung, Migration an Orte inflammatorischen Geschehens (Rustad und Gurtner 2012), ihre immunmodulatorischen Eigenschaften und die Sekretion verschiedener bioaktiver Moleküle (Parekkadan et al. 2007) zugrunde liegen. Um jedoch neue Erkenntnisse richtig beurteilen zu können, müssen diese zugrundeliegenden Zelleigenschaften besser verstanden werden.

1.7 Ziel der Arbeit

MSC sind Bestandteil einer Vielzahl an klinischen Studien und Heilversuchen (Wang et al. 2012, 2012; Pittenger et al. 2019). In den verschiedenen Studien existiert eine hohe Heterogenität bezüglich der Isolationsquellen und –methoden sowie der Kulturbedingungen (beispielsweise Passagezahl, Kryokonservierung oder Kulturmedien). Um MSC sicher anwenden zu können, ist ein Verständnis ihrer in vivo Identität und den Veränderungen, welche sie während der Kultur und im Empfängerorganismus unterlaufen, unabdingbar. Ohne eine einheitliche Beschreibung des primären MSC Phänotyps können Veränderungen während der Kultur oder im Empfängerorganismus nicht detektiert werden. Ziel dieser Arbeit ist daher eine systematische Beschreibung des Oberflächenphänotyps frisch isolierter humaner MSC aus dem Knochenmark. Dabei sollen neue Erkenntnisse über gängige Oberflächenmarker gewonnen werden sowie neue Marker zur Isolierung von MSC identifiziert werden.

2 Material

2.1 Lösungen und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
RPMI 1640 Flüssigmedium mit L-Glutamin und Phenolrot	Gibco life technologies
DPBS	Pan Biotech GmbH
Fetales Kälberserum	Pan Biotech GmbH
Dimethyle sulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Trypanblau Lösung	Sigma Aldrich
AB Serum	Eigenherstellung Transfusionsmedizin Gießen
Hepes (1M)	Gibco life technologies
Sytox Green	Life technologies
Gamunex	Talecris
Alpha-Mem Eagle	Pan Biotech
Erythrozyten-Lyse pH 7,4	Eigenherstellung Transfusionsmedizin Gießen Rezeptur: 8,2g NH ₄ Cl, 1g KHCO ₃ 3,7mg EDTA-Na-Salz (Titriplex ® III), auf 1 Liter Aqua dest.
ACD-A (Acid-Citrat-Dextrose)	Eigenherstellung Transfusionsmedizin Gießen

	Rezeptur: 7,3g Citronensäure (C ₆ H ₈ O ₇), 22g Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇), 24,5g D-Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆), auf 1 Liter Aqua dest.
--	--

Tabelle 2: Liste der verwendeten Lösungen und Chemikalien und deren Hersteller

2.2 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Zentrifugenröhrchen konisch (15ml, 50ml)	Greiner Bio.One
Pipettenspitzen (0,1-10µl, 2-200µl)	Biosphere
Pipettenspitzen (1000µl)	Sarstedt AG & Co.
FACS Röhrchen (Versuchsröhrchen)	Sarstedt AG & Co.
Falcons (14ml, 50ml)	Greiner Bio-One
Cryo1°C Freezing Container	Nalgene
Zellkulturschalen (35mm, 145mm)	Greiner Bio-One
Mikroreaktionsgefäß (0,5ml, 2ml)	Sarstedt AG & Co.
Kryo Röhrchen (1,8ml, 4,5ml)	Sarstedt AG & Co.
Zellsieb (40µm und 70µm Nylon)	BD Bioscience
Handschuhe Micro-Touch Nitrile	Ansell

Tabelle 3: Liste der Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller

2.3 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Wasserbad	memmert
Vortex-Schüttler	Phoenix Instrument
Mikroskop DM IL LED	Leica
Zentrifuge Rotina 380	Andreas Hettich GmbH & Co. KG
Hämatologieanalysator KX21N	Sysmex
Sicherheitsbank Safe2020 1.2	Thermo Fisher
Gefrierschrank (-20°C)	BOSCH
Zählkammer, Neubauer improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Pipetten (10, 20, 30, 100, 300, 1000 µl)	Eppendorf/Micro One Starlab
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD Bioscience
Laborschüttler "Gyro Twister"	Labnet international

Tabelle 4: Liste der verwendeten Geräte und deren Hersteller

2.4 Verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller
BD FACS DIVA, Version 6.0-8.1	BD Bioscience
GraphPad Prism, Version 8	GraphPad Software, Inc.

Tabelle 5: Verwendete Software

2.5 Zusammensetzung der Medien

Verdaupuffer	
4,98ml	Alpha-Mem (Pan Biontech)
2µl	FKS (Pan Biontech)
5µl	1M Hepes (Gibco life technologies)
5µl	0,3M CaCl ₂
69µl	Kollagenase Wako aus Clostridium histolyticum (Stocklösung bestehend aus 1g Kollagenase in 10 ml HBSS)

Tabelle 6: Zusammensetzung des Verdaupuffers für den Verdau von 700mg Spongiosa

Einfriermedium	
50 Vol.-%	FKS (Pan Biontech)
40 Vol.-%	RPMI (Gibco life technologies)
10 Vol.-%	DMSO (Carl Roth GmbH)

Tabelle 7: Zusammensetzung des Einfriermediums

Auftaumedium	
90 Vol.-%	RPMI 1640 (Gibco life technologies)
10 Vol.-%	ACD-A (Eigenherstellung Transfusionsmedizin)

Tabelle 8: Zusammensetzung des Auftaumediums

2.6 Antikörper

Für die systematische Untersuchung der Oberflächenmarkerexpression auf MSC wurde das BioLegend, LEGENDScreen™ Human Cell Screening (PE) Kit (Catalog Number 7000001) mit 342 Antikörpern inkl. 10 Isotypkontrollen verwendet. Weitere verwendete Antikörper sind in den nachfolgenden Tabellen dargestellt.

Bezeichnung	Klon	Hersteller
CD90/Thy 1 BV421 anti human	5E10	BioLegend
CD45 APC/Cy7 anti human	HI30	BioLegend
CD31 APC/Cy7 anti human	WM59	BioLegend
CD271/NGFR APC anti human	ME204	BioLegend

Tabelle 9: Verwendete Antikörper für die Isolierung von MSC

Bezeichnung	Klon	Isotyp	Hersteller
CD51 PE anti human	NKI-M9	PE Mouse IgG1, κ	BioLegend
CD39 BV 510 anti human	A1	BV Mouse IgG1, κ	BioLegend
CD81 PE/Cy7 anti human	5A6	PE/Cy7 Mouse IgG1, κ	BioLegend
CD13 PerCP/Cy5.5 anti human	WM15	PerCP/Cy5.5 Mouse IgG1, κ	BioLegend

Tabelle 10: Verwendete Antikörper für die Validierung der Oberflächenmarker

3 Methoden

3.1 Optimierung der Isolationsmethode von MSC

Das Zellmaterial wurde aus Spongiosa, die bei Hüftersatzoperationen am UKGM in Marburg anfiel, isoliert. Die Vorgänge wurden vom lokalen Ethikkomitee der Philipps-Universität Marburg (Studien-Nr. 64/01) bewilligt und den Patienten eine schriftliche informierte Einwilligung vorgelegt. Im Folgenden wird die genaue Vorgehensweise zur Isolation von MSC aus Spongiosa beschrieben:

1. Wiegen der Spongiosa
2. Verdaupuffer ansetzen (genaue Herstellerangaben siehe Tabelle 6):
Für 700mg Spongiosa je 5ml alphaMem/10%FKS,
50 µl 1MOL Hepes,
50 µl 0,3MOL CaCl₂ und
69 µl Kollagenase Wako.
3. Wasserbad anschalten, Temperatur auf 36°C einstellen.
4. Spongiosa mit einem Skalpell und/oder einer Knochenschere zerkleinern und in ein 50ml großes Reaktionsgefäß überführen.
5. Erster Waschvorgang: Das Gefäß auf 50ml mit DPBS auffüllen, vorsichtig hin und her bewegen und langsam die Flüssigkeit wieder abkippen.
6. Zweiter Waschvorgang: Auf 50ml mit DPBS auffüllen, dann für 5 min bei Raumtemperatur auf den Schüttler legen, danach die Flüssigkeit wieder abkippen.
7. Die vorher berechnete Menge Verdaupuffer hinzugeben.
8. Für eine Stunde im Wasserbad bei 36° Celsius verdauen lassen, dabei alle 15 min kurz kräftig schütteln.
9. Den kompletten Überstand mit den gewünschten Zellen in ein neues Behältnis überführen, mit DPBS auf 50ml auffüllen und nun zentrifugieren (Zentrifugeneinstellung 200G, 4 Grad, 5min).
10. Den Überstand abkippen, dann 15 ml Erythrozyten-Lyse hinzugeben und 3 min wirken lassen. Lyse stoppen, indem mit DPBS auf 50ml aufgefüllt wird.
11. Mithilfe eines Zellsiebes (Mesh 70 µm) die Probe in ein anderes 50ml Reaktionsgefäß sieben und abermals zentrifugieren (Zentrifugeneinstellung 200G, 4 Grad, 5min).

12. Resuspension des Zellpellets in DPBS, Bestimmung der Gesamtzellzahl mit einem Hämatologieanalysator sowie einer Neubauer-Zählkammer, hierbei Überprüfung der Zellvitalität mittels Trypanblaufärbung der Zellen.

3.2 Kryokonservierung und Auftauen der MSC

Die in 3.1. gewonnenen Zellen wurden im Anschluss kryokonserviert, um genug Zellmaterial für eine große systematische Untersuchung zur Verfügung zu haben. Dabei wurde mit den gewonnenen Zellen wie folgt vorgegangen:

1. Pro 2×10^6 Zellen werden 1ml Einfriermedium hergestellt, 1ml besteht dabei aus 0,5ml FKS, 0,4ml RPMI und 0,1ml DMSO (Herstellerangaben siehe Tabelle 7).
2. Die Zellen zum Einfriermedium hinzugeben und auf die Kryogefäße (5ml) aufteilen.
3. Diese in den -80 Gefrierschrank mit Hilfe des Cryo Freezing Container, der ein Absinken der Temperatur um je ein Grad pro Minute gewährleistet, einfrieren.
4. Überführen der Proben in den Stickstofftank nach 24 Stunden.

Zur Durchführung der Vorversuche, zum Beispiel zur Vitalitätsprüfung nach Kryokonservierung oder zur Kalibrierung des Durchflusszytometers, sowie des systematischen Screenings wurden die kryokonservierten Zellen aufgetaut. Im Folgenden wird die genaue Vorgehensweise dargestellt:

1. Das Wasserbad auf 36°C aufheizen.
2. Pro 1ml der aufzutauenden Zellsuspension wird 10ml Auftaumedium, bestehend aus 9ml RPMI und 1ml ACD-A, in Reaktionsgefäße vorgelegt.
3. Die gewünschte Probenanzahl wird im Wasserbad aufgetaut.
4. Nach Auftauen wird die Zellsuspension langsam im vorgelegten Medium resuspendiert.
5. Zentrifugieren der Proben (Zentrifugeneinstellung 200G, 4 Grad, 5min), Abkippen des Überstandes und bei Bedarf Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels Neubauer-Zählkammer sowie Vitalitätsprüfung mittels Trypanblaufärbung.
6. Die Proben sind nun bereit zur Antikörperfärbung und Verwendung im Durchflusszytometer.

3.3 Durchflusszytometrische Verfahren

3.3.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch FACS genannt, ist ein Verfahren, welches man zur qualitativen und quantitativen Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen nutzt. Das Akronym FACS steht hierbei für „Fluorescence activated cell sorter“. Ein feiner Flüssigkeitsstrahl vereinzelt die zu messenden Zellen, welche dann mit einer hohen Geschwindigkeit an Laserstrahlen vorbei geleitet werden. Dabei streuen die Zellen das Laserlicht. Wenn die Antigene der Zellen vorher mit fluoreszenzhaltigen Antikörpern markiert worden sind, werden diese Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und emittieren Licht in bestimmten Wellenlängen. Detektoren können die Streuung der einzelnen Zellen messen und so Größe und Granulität feststellen. Zudem können sie die Fluoreszenzemission detektieren. Um gleichzeitig mehrere verschiedene Antigene auf den Zellen darstellen zu können, benötigt man Fluorochrome, deren Spektrum das jeweilige Durchflusszytometer unterscheiden kann. Die Durchflusszytometrie erkennt auch intrazelluläre Strukturen; das Fluorochrom Sytox bindet beispielsweise an DNS und kann somit anzeigen, welche Zellen ihre Zellmembranintegrität verloren haben. Zusammenfassend kann die Durchflusszytometrie dazu verwendet werden, die Größe, die Granulität, die Oberflächeneigenschaften und die intrazelluläre Struktur von Zellen zu beschreiben und gegebenenfalls die Zellen nach ihren Eigenschaften zu sortieren.

3.3.2 Antikörperfärbung der MSC und Charakterisierung am Durchflusszytometer

In den Versuchen wurde das Durchflusszytometer FACS Canto II von BD verwendet und die Ergebnisse mittels der FACS Diva Software (Version 6.0 – Version 8) analysiert. Nach Auftauen der Zellen (siehe 3.2) wurden die MSC wie folgt am Durchflusszytometer charakterisiert:

1. Nach letzter Zentrifugation der aufgetauten Zellen werden je 2×10^6 Zellen in 10 μ l RPMI in FACS Versuchsröhrchen suspendiert.
2. Inkubation der Zellsuspension mit IgG (Gamunex) (Menge Gamunex: 10% der zu inkubierenden Zellsuspension, 10 min, 4°C), um die unspezifische Antikörperbindung des FC Rezeptors zu verhindern.

3. Färbung für 45 min bei 4°C im Dunkeln mit Antikörpern gegen CD90 (0,6µl), CD271 (2µl), CD45 (4µl) und CD31 (4µl) (die Antikörpermenge bezieht sich auf je 10µl Zellsuspension, Hersteller siehe Tabelle 9).
4. Hinzugabe von 1µl Sytox pro FACS Versuchsröhrchen vor der Messung am Durchflusszytometer, um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können.
5. Zur Identifizierung der MSC wurde folgende Gating Strategie verwendet:

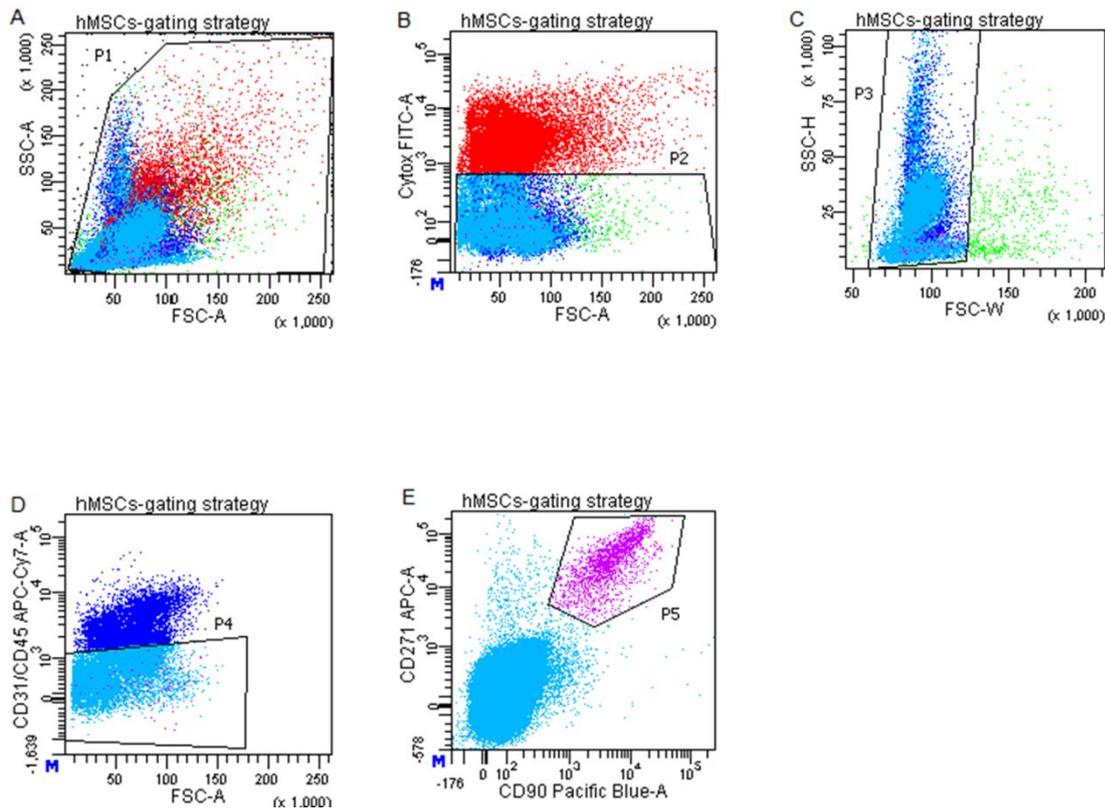


Abbildung 3: Gating Strategie

A) Definieren der Population 1 (P1) mit Forward und Side Scatter als alle gemessenen Zellen. B) Die Lebensfähigkeit wurde durch die Zugabe von Sytox Green determiniert und definiert die Population P2 als lebende Zellen. C) Mit Hilfe von Side Scatter Height (SSC-H) und Forward Scatter Width (FSC-W) wird Population P3 definiert, die keine Doubletten enthält. D) Population P4 wurde CD45/CD31 negativ gated, um Leukozyten und Endothelzellen auszuschließen. E) Die Population P5 zeigt als CD271 und CD90 positive Population die humanen MSC.

In weiteren Versuchen wurden die MSC der Spongiosa systematisch auf über 342 Oberflächenmarker untersucht:

1. Auftauen der Zellen wie in 3.2 beschrieben
2. Inkubation mit Gamunex (siehe oben) zur Verhinderung der unspezifischen Fc-Rezeptorbindung
3. Kombination der oben beschriebenen Antikörperfärbung (CD90, CD271, CD45 und CD31) mit einem Panel aus PE Antikörpern (LEGENDScreen Human PE Kit), welche 342 verschiedene Oberflächenmarker zum Ziel haben (inkl. der zugehörigen Isotyp Kontrollen).
4. Färbung bei 4°C für 45 min im Dunkeln
5. Im Anschluss Analyse von jeweils 100000 - 400000 Events im Durchflusszytometer.
6. Die Expression der Oberflächenmarker wurde nach folgender Gating Strategie untersucht:

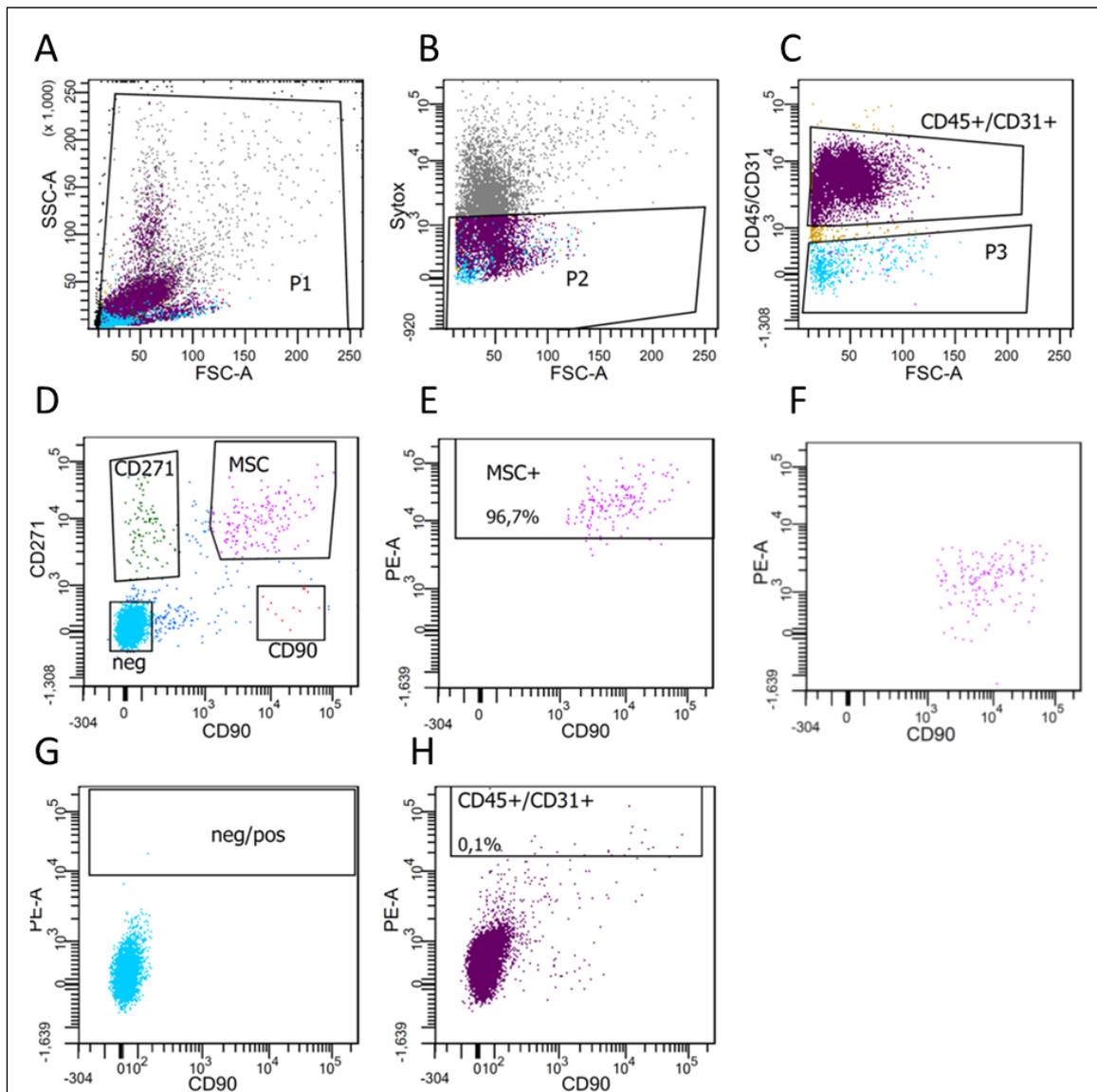


Abbildung 4: Gating Strategie

A) P1 definiert alle gemessenen Zellen mittels FSC und SSC. B) P2 zeigt die lebenden Zellen. C) P3 schließt die CD45/31 positiven Zellen aus. D) Definieren der CD90 und CD271 positiven Zellen als MSCs. E) Die MSC Population wird gegen den PE Antikörper, hier als Beispiel CD51, und CD 90 gegatet. Es zeigt sich, dass 96,7% der MSC CD51 exprimieren. F) Isotyp Kontrolle, in diesem Fall mit Maus IgG 2 ak Antikörper für das PE CD51 Fluorochrome. Hier zeigt sich, dass die in E) definierte Population tatsächlich positiv für den zugehörigen PE Antikörper ist. G) Die CD90/CD271 negativen Zellen werden gegen den PE Antikörper gegatet. In diesem Beispiel sind die CD90/CD271 negativen Zellen auch negativ für CD51. H) Die CD45

und CD 31 positiven Zellen, welche den Großteil der Leukozyten und Endothelzellen darstellen, werden auch gegen den untersuchten PE Antikörper getaget. Hier zeigt sich, dass 0,1% der CD45+CD31+ Zellen den untersuchten Oberflächenmarker CD51 exprimieren.

3.4 Isolierung der MSC aus Knochenmarkaspirat

Das Zellmaterial wurde aus Knochenmarkaspirat, welches bei (knochenmark-) gesunden Patienten am UKGM in Marburg entnommen wurde, isoliert. Die Vorgänge wurden vom lokalen Ethikkomitee der Philipps-Universität Marburg (Studien-Nr. 25/10) bewilligt und den Patienten eine schriftliche informierte Einwilligung vorgelegt. Folgendermaßen wurde dabei vorgegangen:

1. Je 5ml Knochenmarkaspirat Hinzugabe von 30ml Erythrozytenlyse und Schwenken der Suspension für 5 min bei RT.
2. Stoppen der Lyse mit DPBS und Zentrifugation (Einstellungen: 5 min, 300G, 4°C)
3. Abkippen des Überstandes und weitere Lyse mit 20ml Erythrozytenlyse für 3min bei RT, diesmal in Ruhe.
4. Stoppen der Lyse mit DPBS und Zentrifugation (Einstellungen: 5 min, 300G, 4°C)
5. Abkippen des Überstandes, Auffüllen auf 50 ml mit DPBS/10% EDTA und abermals Zenrifugation (Einstellungen: 5 min, 300G, 4°C)
6. Abkippen des Überstandes, Resuspension des Zellpellets in 100µl DPBS
7. Färbung mit fluoreszierenden Antikörpern gegen CD90, CD217, CD31, CD45, CD 51, CD81, CD39 und CD13 sowie den zugehörigen Isotypkontrollen (siehe Tabellen 2.8 und 2.9) für 30 min bei RT im Dunkeln.
8. Messung im Durchflusszytometer

3.5 Statistik

Die Ergebnisse sind als Einzelwerte oder Mittelwerte angegeben. Standardabweichungen und Standardfehler wurden berechnet. Statistische Analysen wurden, je nach Verteilung der Daten, mithilfe des Kruskal-Wallis-Test und nachgeschalteter Dunn-Korrektur oder der einfaktoriellen Varianzanalyse und

nachgeschaltetem Bonferroni-Test der Software GraphPadPrism Version 8 durchgeführt. P-Werte kleiner 0,05, 0,01 und 0,001 wurden als signifikant erachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Systematische Untersuchung der Expression von Oberflächenmarkern auf MSC

Zur genauen Beschreibung des primären MSC Phänotyps wurden frisch isolierte MSC auf über 342 Oberflächenmarker systematisch untersucht. Hierfür wurden die MSC aus Spongiosa isoliert, kryokonserviert und das Zellmaterial aus 21 verschiedenen Probanden gepoolt, um eine ausreichende Anzahl von MSC gleichzeitig untersuchen zu können. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Expression der einzelnen Marker überprüft. Die MSC wurden als CD90+/CD271+/CD45-/CD31- definiert und innerhalb dieser Gruppe wurde die Expression auf zusätzliche Oberflächenmarker analysiert. Als Qualitätskontrolle wurde die Expression von bekannten Markern wie beispielsweise CD13, CD49a, CD63, und CD73 nachgewiesen (siehe Abbildung 3.1 und 3.2). Als Negativkontrolle zeigte sich wie bekannt keine Expression von beispielsweise CD11b oder CD14.

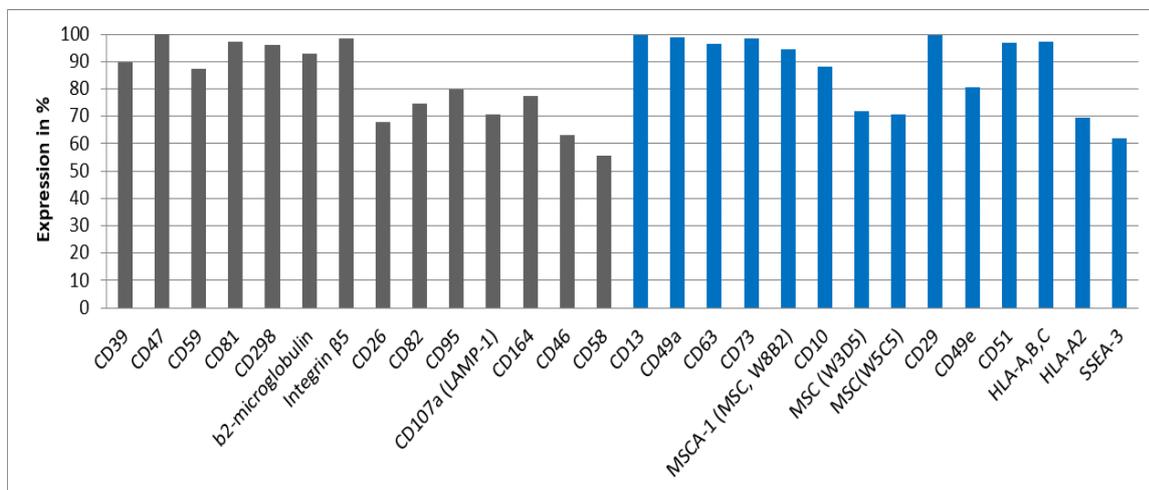


Abbildung 5: Expression von potentiell zusätzlichen Oberflächenmarkern auf MSC

Die Abbildung zeigt, wie viel Prozent der als MSC definierten CD90+/CD271+/CD45-/CD90- Zellen (y-Achse) die untersuchten Oberflächenmarker (x-Achse) exprimieren. Bereits in der Literatur auf MSC nachgewiesene Marker werden durch blaue Säulen angezeigt. Es wurden alle Marker dargestellt, welche von den MSC zu mindestens 50% exprimiert worden sind (Anzahl der Messungen: n=1, Zellmaterial aus 21 Probanden).

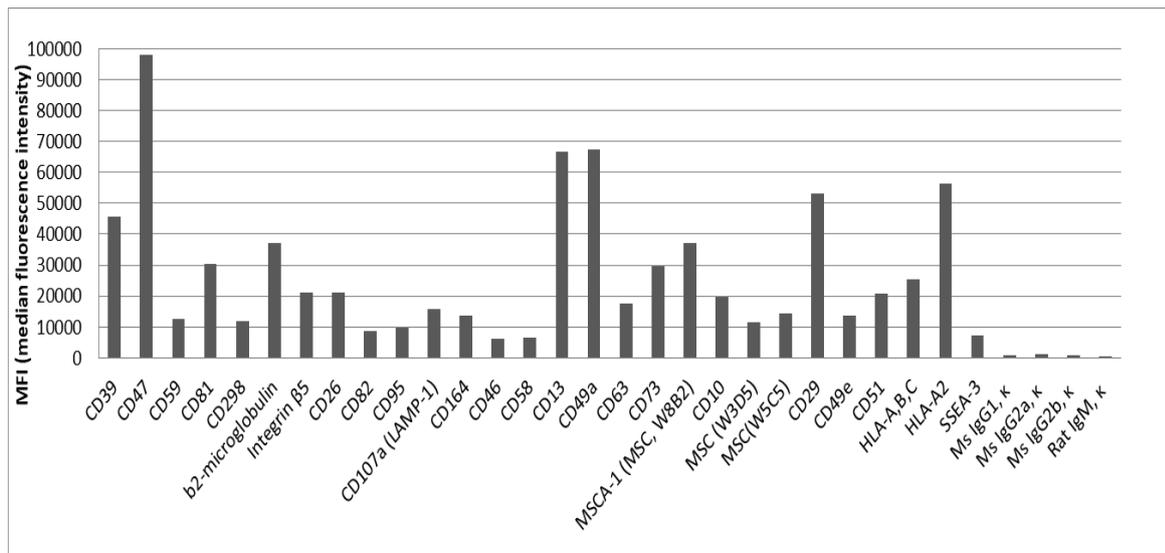


Abbildung 6: Mediane Fluoreszenzintensität der auf MSC nachgewiesenen Oberflächenmarker

Darstellung der MFI (mediane Fluoreszenzintensität) der Oberflächenmarker auf als CD90+/CD271+/CD45-/CD31- definierten MSC inklusive Isotyp Kontrollen (Anzahl der Messungen: n=1, Zellmaterial aus 21 Probanden).

Es wurden 14 potentielle neue MSC Oberflächenmarker in diesem Screening auf den untersuchten Zellen nachgewiesen. Eine Übersicht über die Expression in Prozent aller 342 Marker findet sich im Anhang dieser Arbeit (Tabelle 11).

4.1.1 Validierung

Zur Verifizierung der Expression der Oberflächenmarker, welche in der systematischen Untersuchung auf über 95% der MSC nachgewiesen worden sind, wurden weitere durchflusszytometrische Versuche mit Zellmaterial, isoliert aus Spongiosa von sechs verschiedenen Probanden (Methode siehe 3.1), durchgeführt. In diesen Versuchen wurden zudem die Oberflächenmarker, welche im systematischen Screening aufgrund geringer Zellzahl nicht beurteilt werden konnten, abermals auf ihre Expression durch MSC untersucht. Dabei wurden im Schnitt 500000 Events analysiert.

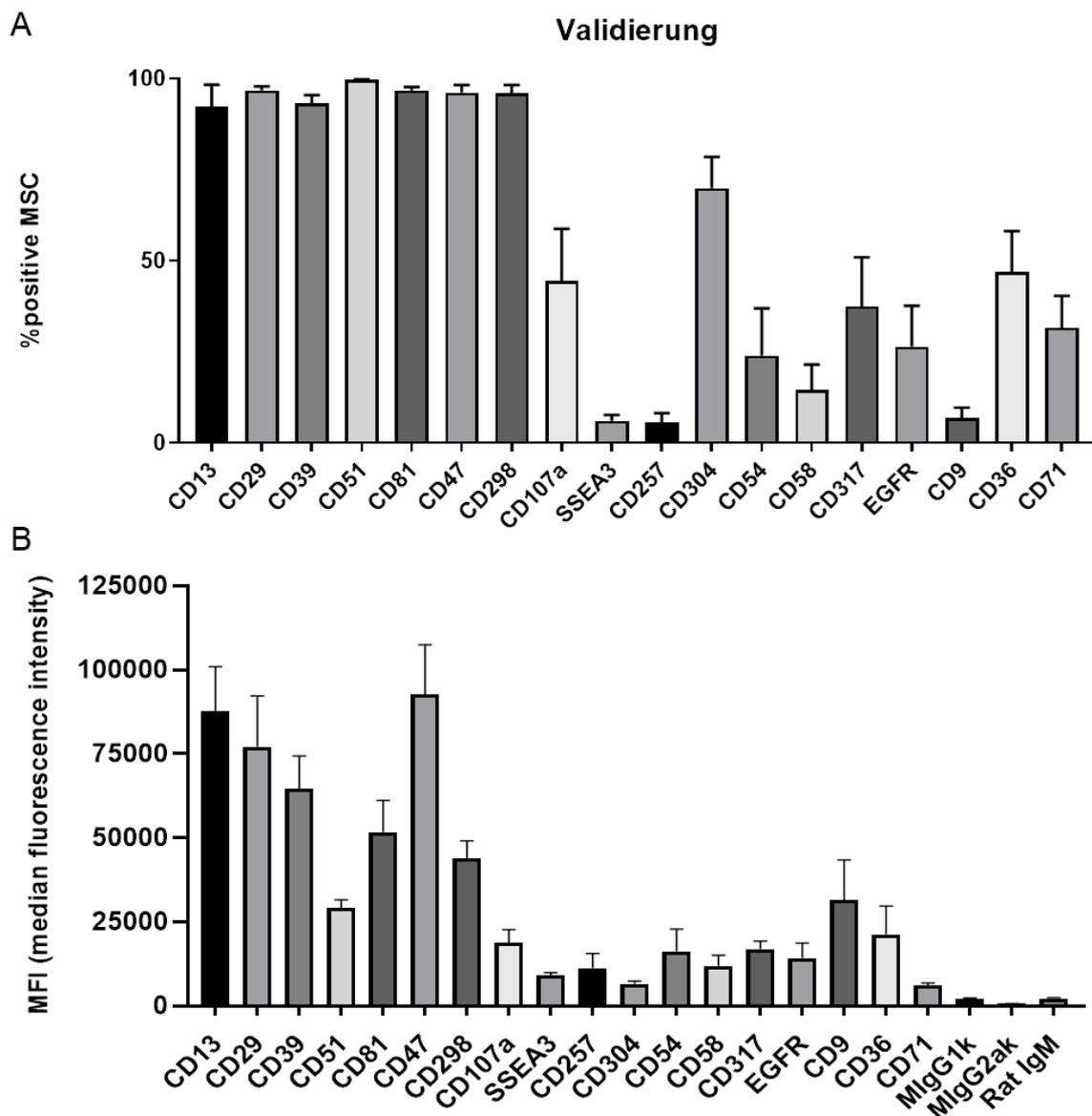


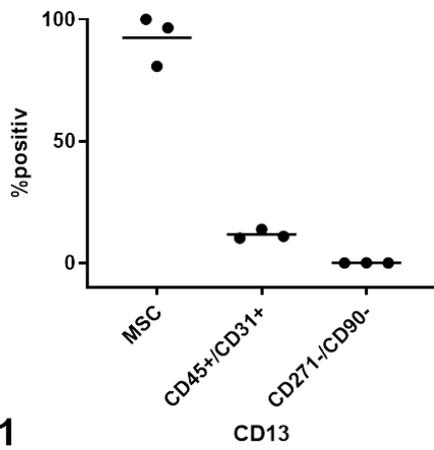
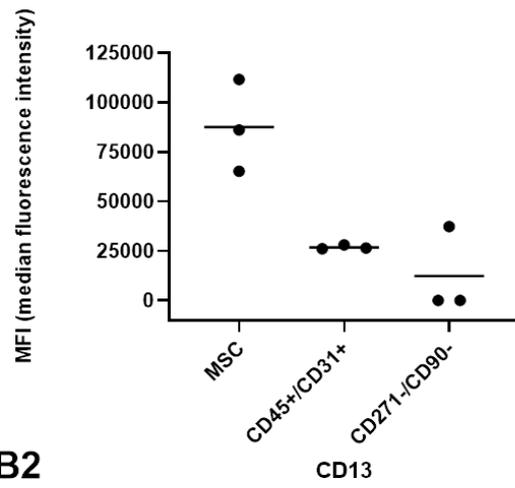
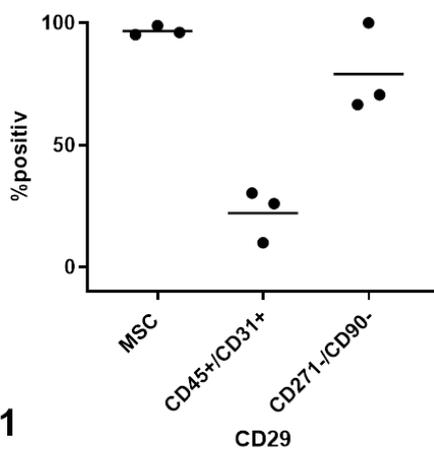
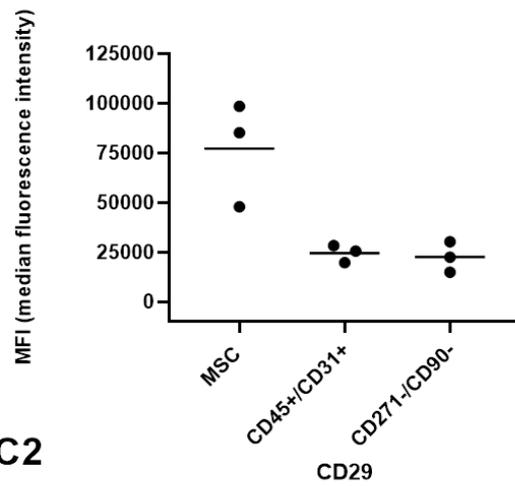
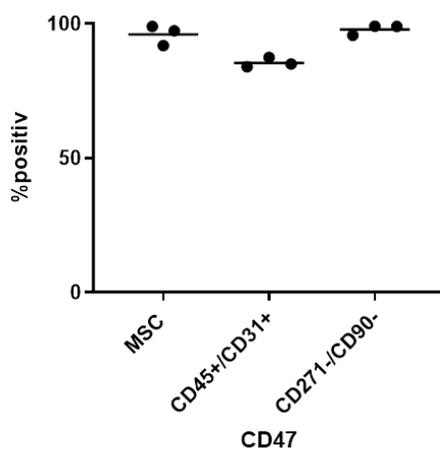
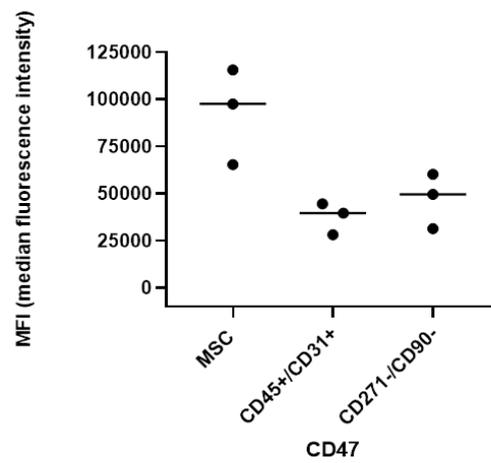
Abbildung 7: Expression der Oberflächenmarker auf MSC

A: Anteil in Prozent der als CD90+/CD271+/CD45-/CD31- definierten MSC, welche die untersuchten Oberflächenmarker exprimieren. B: MFI der Oberflächenmarker auf den MSC mit den zugehörigen Isotypkontrollen. (Anzahl der Messungen: n=3, Zellmaterial aus 6 Probanden, dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler).

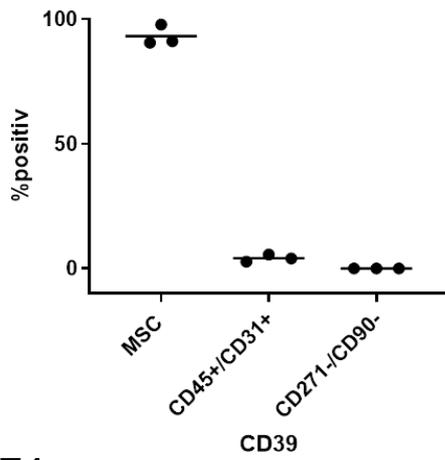
CD13, CD29, CD39, CD51, CD81, CD47 und CD298 werden in hoher Intensität von MSC exprimiert.

4.2 Die Expression einiger Oberflächenmarker ist MSC-spezifisch

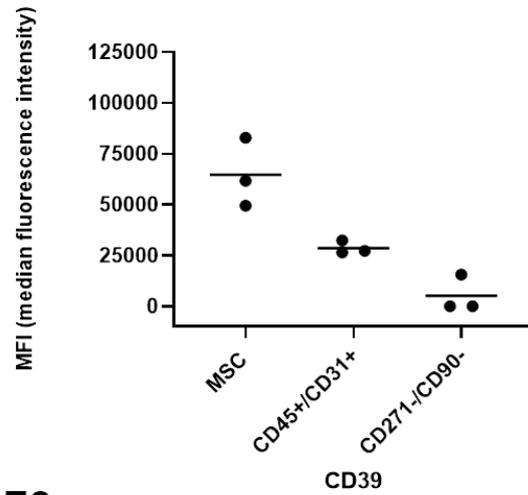
Um eine reine Population von MSC zur Kultivierung und Nutzung als Zelltherapeutikum zu generieren, müssen zur prospektiven Isolation Oberflächenmarker gefunden werden, welche spezifisch nur von den MSC exprimiert werden. Daher wurde geprüft, inwiefern die auch in der Zellsuspension vorkommenden Zellen wie Leukozyten und Endothelzellen sowie die als CD271-/CD90- definierten non-MSC besagte Oberflächenmarker exprimieren. Abbildung 8 zeigt die Expression der Marker innerhalb dieser Populationen. Als Qualitätskontrolle wurde wie zuvor CD 13 als in der Literatur bekannter Marker verwendet.

A1**A2****B1****B2****C1****C2**

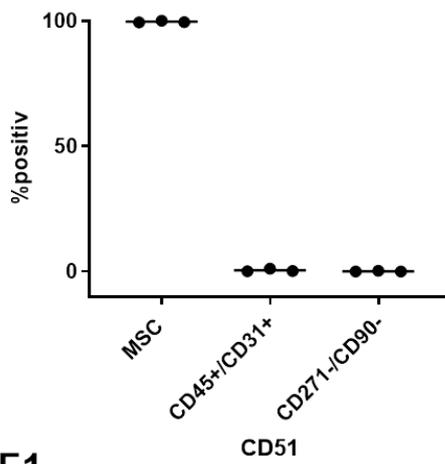
D1



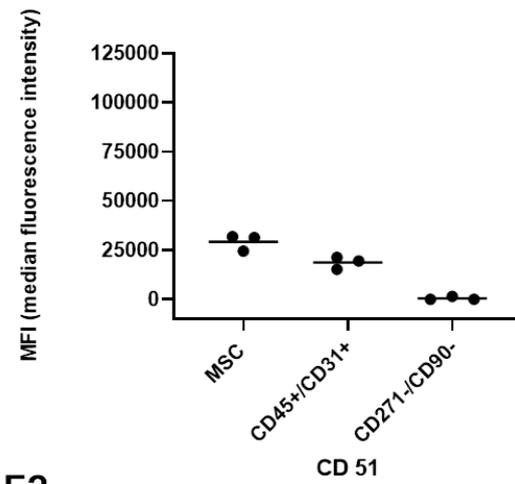
D2



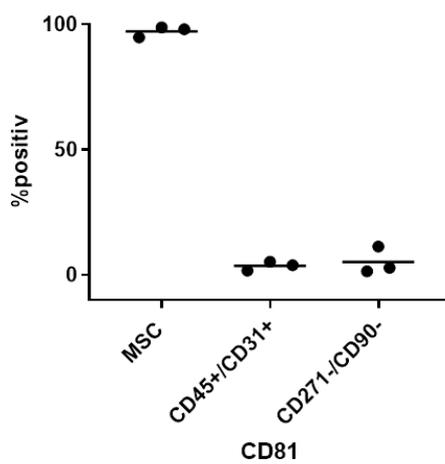
E1



E2



F1



F2

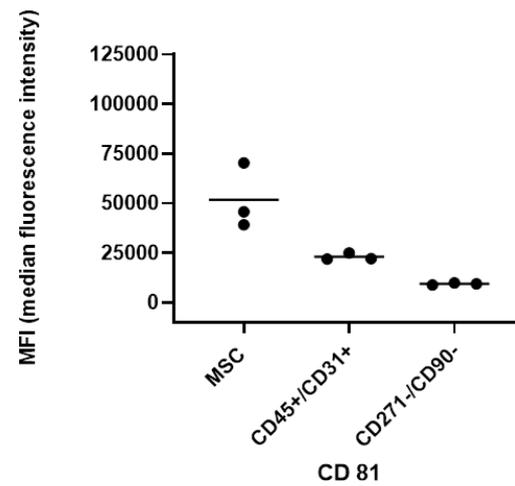


Abbildung 8: Expression neuer MSC-Marker im Vergleich zwischen MSC, leukozytären CD45+/CD31+ Zellen und Non-MSC CD271-/CD90- Zellen

Links wird der prozentuale Anteil der drei Zellpopulationen (MSC, CD45+/CD31+ und CD270-/CD90-) dargestellt, welche die untersuchten Marker CD13 (A1), CD29 (B1), CD47 (C1), CD39 (D1), CD51(E1) und CD81 (F1) exprimieren. Rechts wird korrespondierend dazu die mediane Fluoreszenzintensität der jeweiligen Marker (A2 - F2) auf den drei Populationen angegeben. Anzahl der Messungen: n=3, Zellmaterial aus 6 Probanden. Dargestellt sind die Einzelwerte, der Strich kennzeichnet den Mittelwert.

Hier wird deutlich, dass der Marker CD47 (C) sowohl von den MSC, als auch von den CD31+CD45+ Zellen relativ hoch exprimiert wird. CD47 gehört zu den Zelladhäsionsmolekülen und wird ubiquitär auf menschlichen Zellen exprimiert (Sick et al. 2012). Im Vergleich dazu werden die Oberflächenmarker CD51 (E), CD81 (F), CD39 (D) und CD13 (A) wenig bis gar nicht von den CD31+CD45+ Zellen, also den Leukozyten und Endothelzellen, exprimiert und können somit als spezifische MSC-Marker bezeichnet werden. CD29 (B) scheint zwar nicht von Endothelzellen und Leukozyten exprimiert zu werden, jedoch weisen die non-MSC (CD271-/CD90-) CD29 als Oberflächenmarker auf.

4.3 Knochenmarkaspirat als MSC Quelle

In den oben beschriebenen Versuchen arbeitete man zunächst mit Spongiosa als humane MSC Quelle, da der Anteil von MSC an Zellsuspensionen aus Spongiosa deutlich höher ist als an Knochenmarkaspirat (siehe Abb. 9).

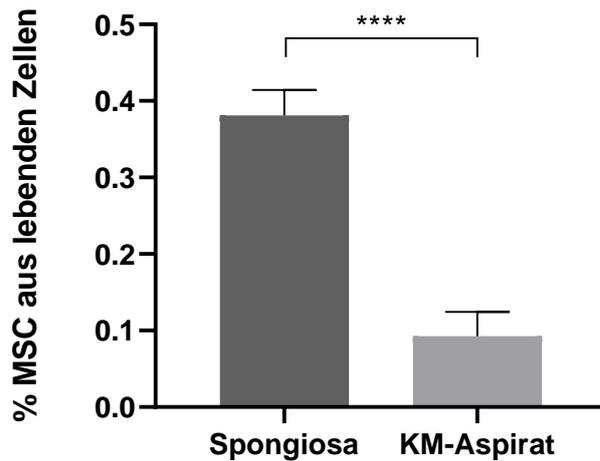


Abbildung 9: Höhe des MSC-Anteils in Spongiosa- und Knochenmarkaspirat

*Vergleich des prozentualen Anteils von MSC, definiert als CD90+/CD271+/CD31-/CD45-, an den lebenden Zellen aus Spongiosa (n=57) mit lebenden Zellen aus Knochenmarkaspirat (n=18). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler; ****p<0,0001.*

Dieser Vorteil von Spongiosa wurde jedoch nur am prozentualen Anteil von MSC an den lebenden Zellen deutlich. Absolut betrachtet isolierte man ca. 96000 Zellen pro Milligramm Spongiosa, davon ca. 340 MSC. Durchschnittlich waren die Spongiosaprobe 2,5 g schwer. Verwendete man hingegen Knochenmarkaspirat, werden Gesamtzellzahlen von 1000000 Zellen pro Milliliter Aspirat gemessen, wobei das Volumen einer Aspiratsprobe im Schnitt 5ml betrug.

Zudem wies die Membranintegrität als Maß für die Vitalität der Zellen aus den verschiedenen Quellen Unterschiede auf. Durch die Hinzugabe von Sytox vor der Messung im Durchflusszytometer konnte der Anteil an Zellen mit unbeeinträchtigt Membranintegrität (Sytox^{neg}) in den Proben aus Spongiosa und Knochenmarkaspirat bestimmt werden (siehe Abbildungen 3 und 4). Circa 40% der Zellen aus Spongiosa isoliert waren nach Kryokonservierung Sytox^{neg}. Die Zellen aus Knochenmarkaspirat waren im Schnitt bis zu 80% vital. Aufgrund der besseren Verfügbarkeit und der hohen vitalen Gesamtzellzahl wurden im weiteren Verlauf der Experimente die MSC frisch isoliert aus Knochenmarkaspirat verwendet.

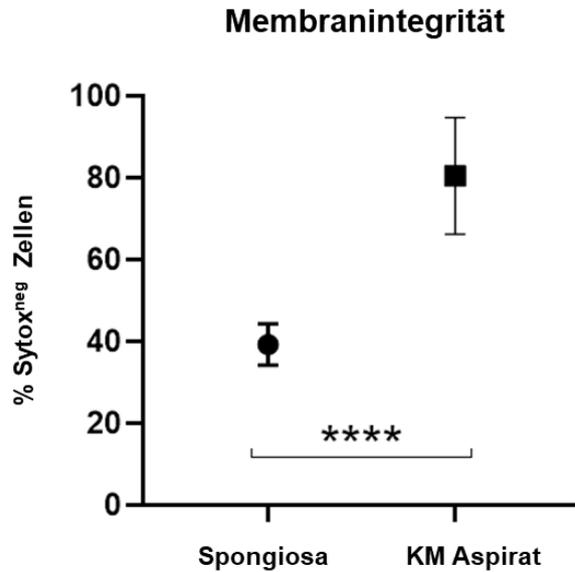


Abbildung 10: Vergleich der Membranintegrität zwischen kryokonservierter Spongiosa und frisch isolierten Knochenmarkaspirat

*Die y-Achse zeigt den Anteil der Sytox negativen Zellen in Prozent an allen gemessenen Zellen. Dargestellt ist auf der x-Achse der Vergleich der Membranintegrität von Zellen aus kryokonservierter Spongiosa (n=57) mit Zellen frisch isoliert aus Knochenmarkaspirat (n=18). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung; ****p<0,0001.*

4.3.1 Spongiosa und Knochenmarkaspirat unterscheiden sich als MSC Quelle nicht hinsichtlich der Oberflächenmarkerexpression

MSC aus Knochenmarkaspirat isoliert exprimieren die gleichen Marker wie MSC aus Spongiosa. In Abbildung 11 zeigen repräsentative Histogramme, dass beide Knochenmarkquellen und ihre jeweiligen Isolationsverfahren zu vergleichbarer Markerexpression führen.

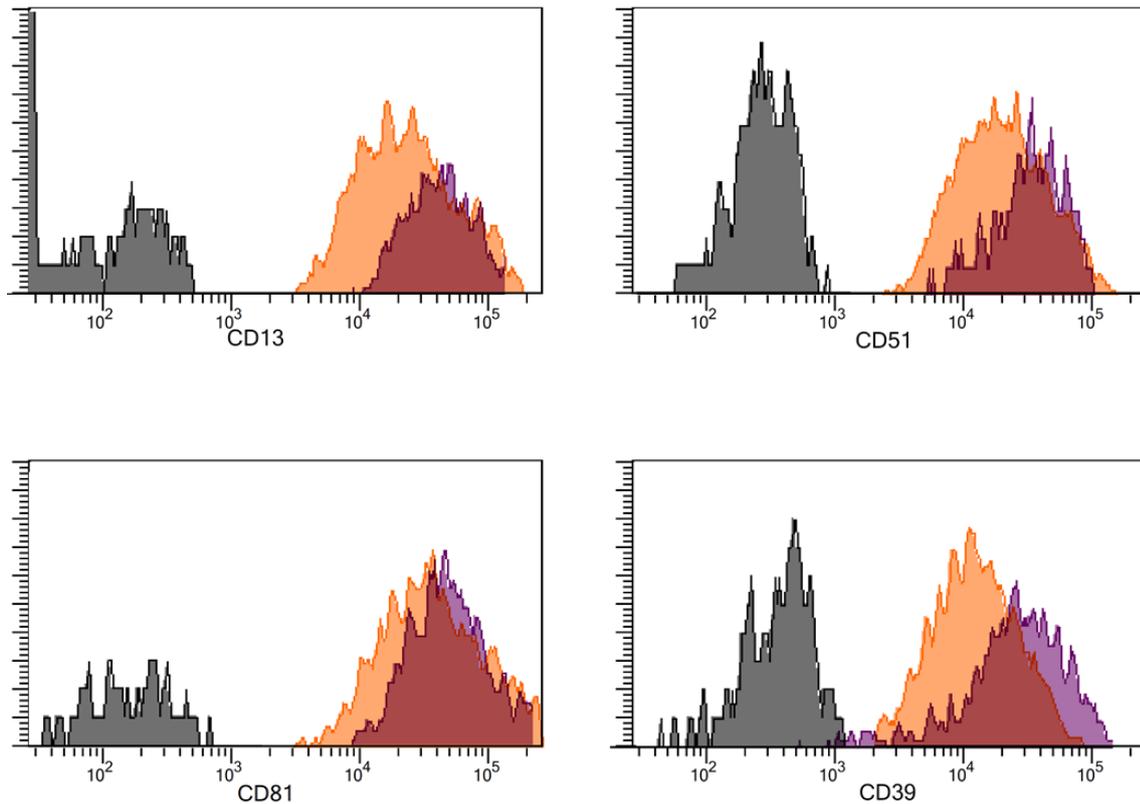


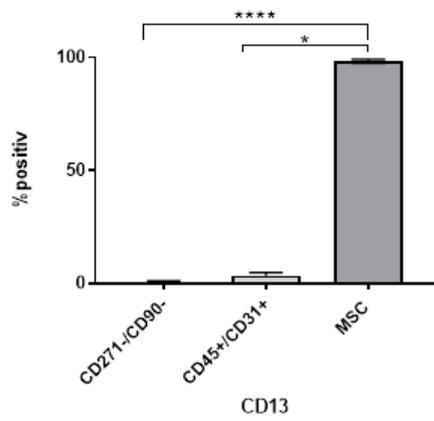
Abbildung 11: Oberflächenmarkerexpression der MSC aus Knochenmarkaspirat und Spongiosa

Repräsentative FACS-Histogramme der untersuchten Oberflächenmarker. Grau=Isotypkontrolle, Orange=Knochenmarkaspirat, Lila=Spongiosa.

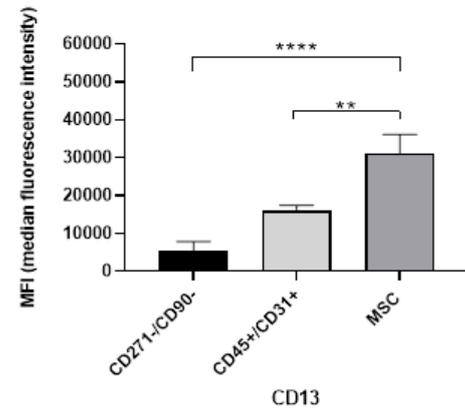
4.4 Die neuen Oberflächenmarker sind spezifisch für MSC frisch isoliert aus Knochenmarkaspirat

In neun durchflusszytometrischen Messungen zeigte sich, dass sowohl der bekannte humane MSC Marker CD 13, als auch die neuen Oberflächenmarker CD51, CD39 und CD81 auf frisch isolierten MSC exprimiert werden. Zudem werden sie sowohl von den als CD31+/CD45+ definierten Leukozyten und Endothelzellen, als auch von den als CD271-/CD90- non-MSC nicht exprimiert, was sie zu spezifischen Oberflächenmarkern für MSC macht.

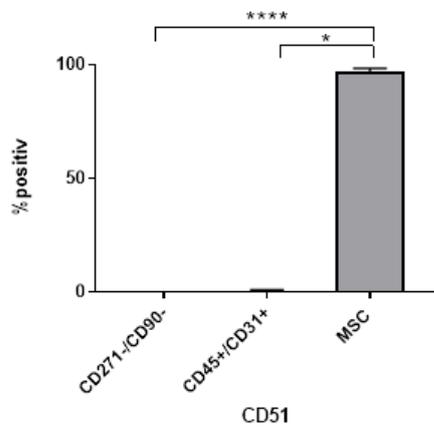
A1



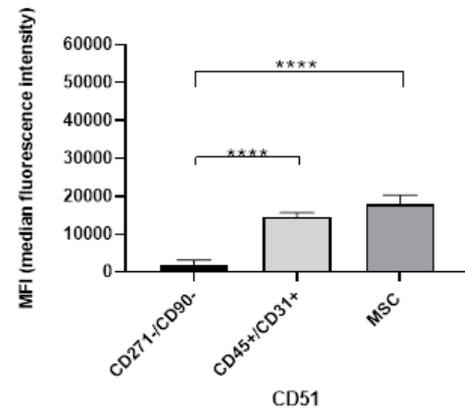
A2



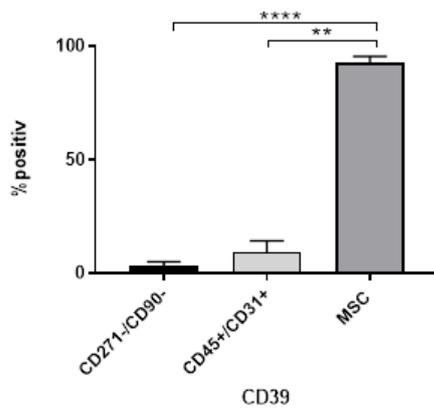
B1



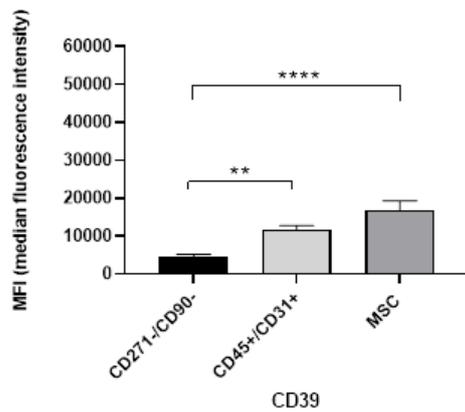
B2



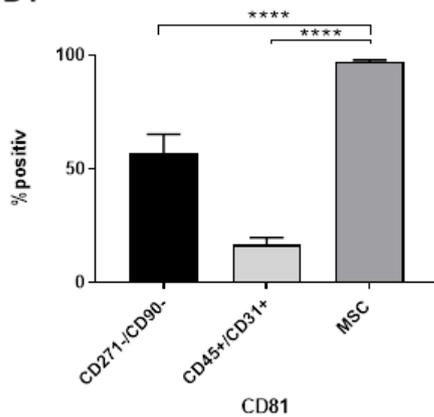
C1



C2



D1



D2

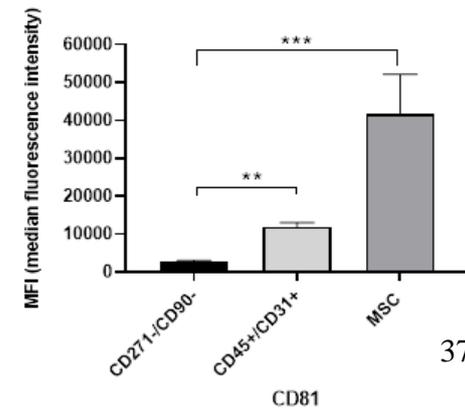


Abbildung 12: Expression der neuen Marker im Vergleich zwischen MSC, CD45+/CD31+ Zellen und CD271-/CD90- Zellen aus Knochenmarkaspirat

*Links dargestellt ist die Expression von CD13 (A), CD51 (B), CD39 (C) und CD81 (D). y-Achse: Markerexpression in Prozent. x-Achse: Die erste Gruppe stellen die non-MSC, die als CD271-/CD90- definiert sind, dar. Die zweite Gruppe zeigt die CD45+/CD31+ Zellen wie Endothelzellen und Leukozyten. Als MSC sind die zuvor als CD90+/CD271+ mesenchymalen Stromazellen definiert. Reihe 2 zeigt die korrespondierende mediane Fluoreszenzintensität der Markerexpression auf den drei Zellpopulationen. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=9) und Standardfehler. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, **** $p < 0,0001$.*

Aufgrund ihrer MSC-Spezifität sind CD13, CD51, CD 39 und CD81 ideale Oberflächenmarker, um die prospektive Isolation von MSC aus dem Knochenmark zu erleichtern und somit reinere Populationen an MSC für therapeutische Zwecke zu generieren. CD81 weist zudem eine hohe mediane Fluoreszenzintensität auf MSC auf. Abbildung 13 und 14 stellt die Expression der Marker auf MSC bildlich dar und zeigt, dass in Zukunft mithilfe dieser neuen Marker MSC genauer charakterisiert werden können.

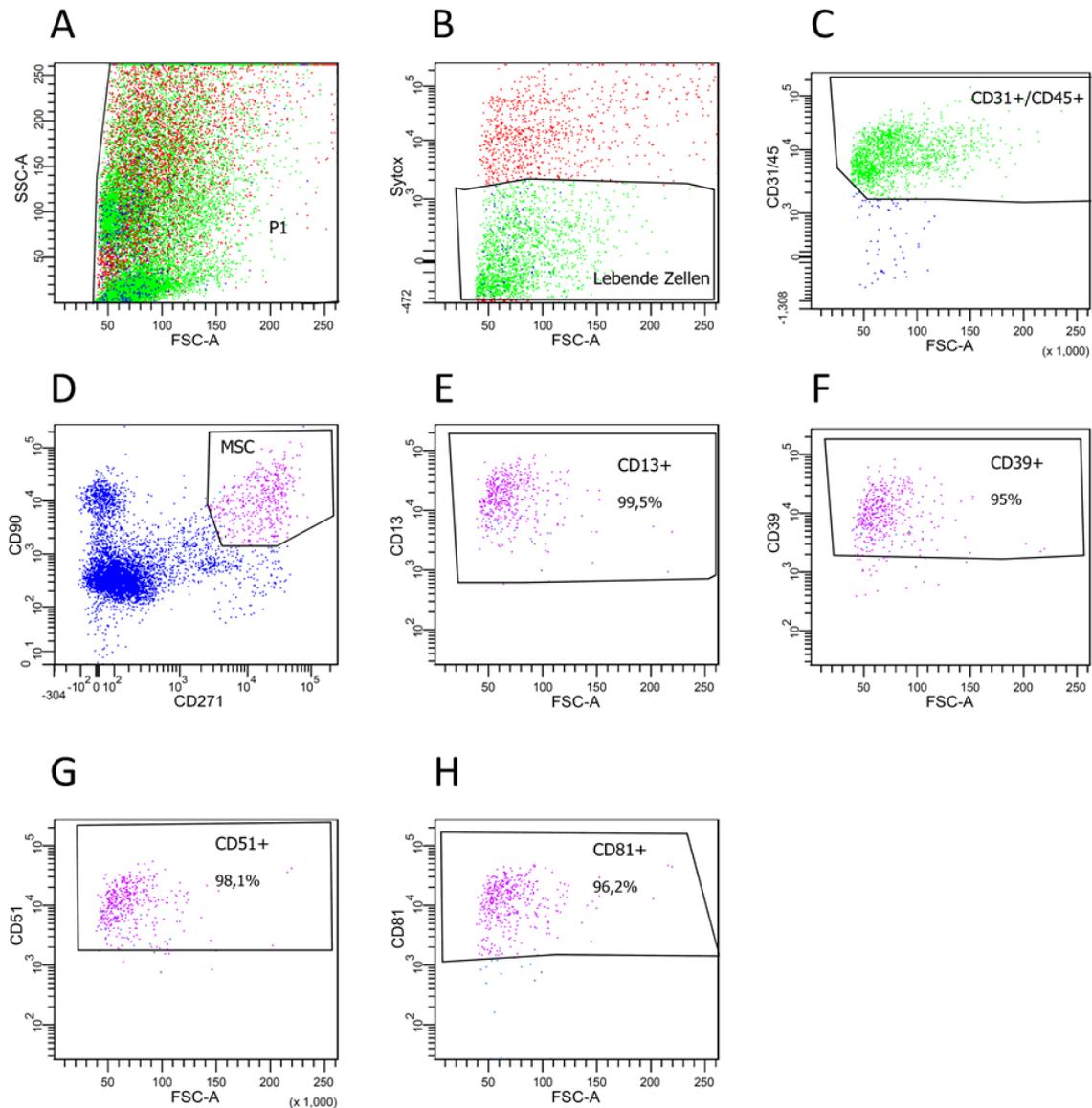


Abbildung 13: Oberflächenmarkerexpression von MSC aus Knochenmarkaspirat

Dargestellt wird ein Teil der Gating Strategie zur Bestimmung der Expression der Oberflächenmarker CD13, CD39, CD51 und CD81 auf MSC. A) Definition der Zellpopulation P1 mittels Forward und Sideward Scatter. B) Darstellung der Sytox-negativen Zellen als lebende Zellen. C) Definition der Leukozyten und Endothelzellen als CD31+CD45+ Zellen. D) Darstellung der CD31-/CD45- Zellen. MSC sind definiert als CD90+/CD271+Zellen. E) CD13 als bekannter Marker wird von den MSC zu 99,5% exprimiert. F) CD39 wird zu 95% auf MSC exprimiert. G) CD51 wird zu 98,1% auf MSC exprimiert. H) CD81 wird zu 96,2% auf MSC exprimiert.

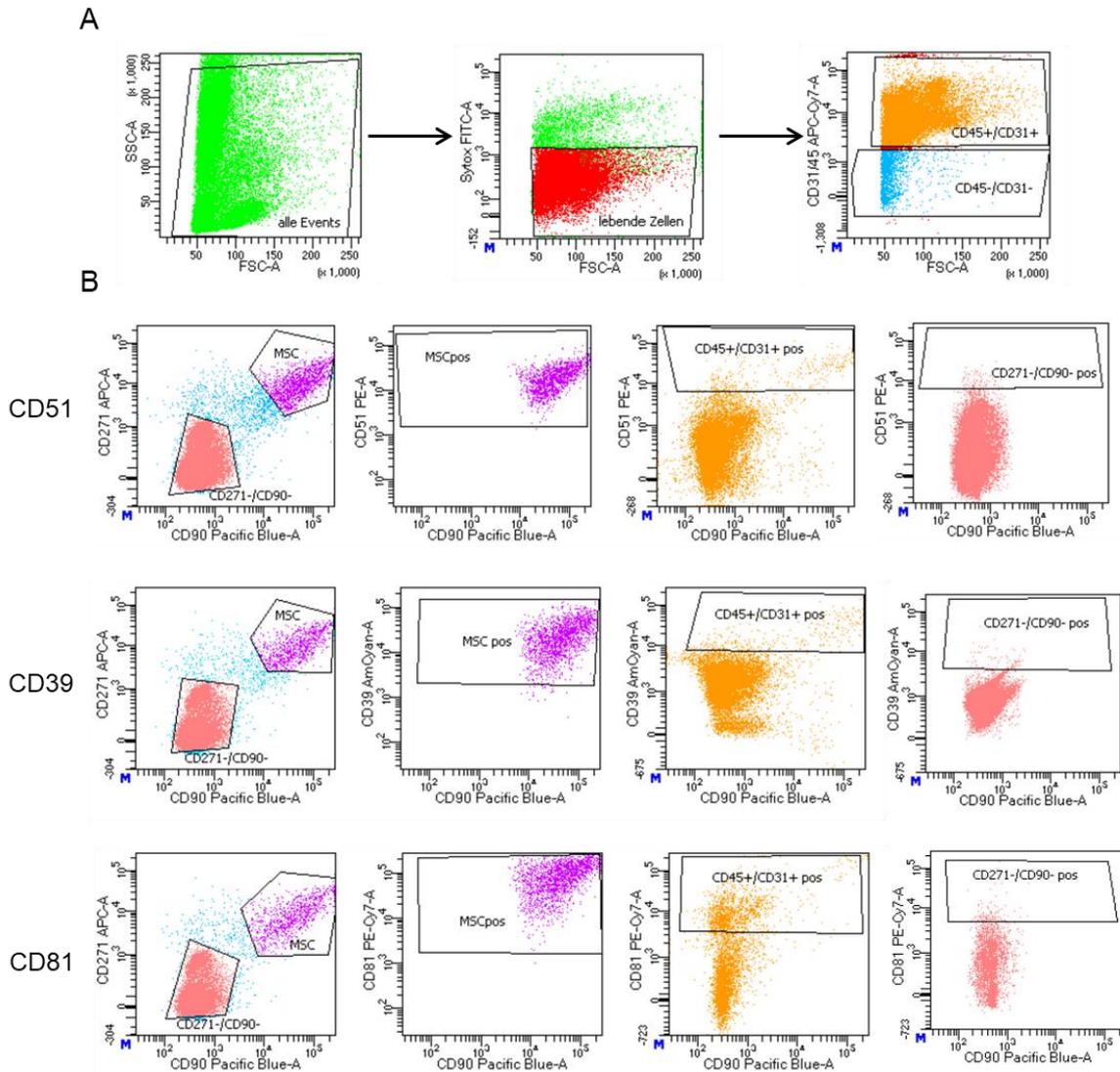


Abbildung 14: Expression der neuen Marker im Vergleich

Dargestellt werden repräsentative Dotplots, welche die Expression der neuen Marker CD51, CD39 und CD81 auf unterschiedlichen Zellpopulationen zeigen. A: Bekannte vorgeschaltete Gating Strategie über FSC und SSC, Definition der lebenden Zellen als Sytox negativ sowie Festlegung der CD45+/CD31+ Population. B: Im Anschluss an A zeigen die Dotplots von links nach rechts zunächst die Definition der MSC als CD90+/CD271+ sowie die Festlegung der non-MSC als CD90-/CD271-. Darstellung der Expression der jeweiligen Marker CD 51, CD39 und CD81 nun auf den MSC, den CD45+/CD31+ Zellen sowie den CD90-/CD271- Zellen.

5 Diskussion

Aufgrund ihrer außergewöhnlichen regenerativen und immunmodulatorischen Eigenschaften sind MSC von äußerstem wissenschaftlichen Interesse und werden intensiv in präklinischen wie klinischen Studien untersucht (Wang et al. 2012; Pittenger et al. 2019). Es gibt zahlreiche Arbeiten über ihr *in vitro* Verhalten und ihre Kultivierbarkeit und schon neue Methoden, ihre Herstellung als Zelltherapeutikum im Bioreaktor zu standardisieren (Nold et al. 2013). Auch in der Isolationsmethode von MSC scheint ein Paradigmenwechsel weg von der traditionellen Methode mittels Plastikadhärenz hin zur prospektiven Isolation mithilfe von spezifischen Oberflächenmarker stattgefunden zu haben (Mabuchi et al. 2013a). Aufgrund des geringen prozentualen Anteils von MSC an ihren Quellen wird ihr Phänotyp jedoch weiterhin vor allen Dingen nach Kultur beschrieben und ihr *in vivo* Phänotyp bleibt unbekannt (Bara et al. 2014). Der Prozess zur Herstellung eines sicheren Zelltherapeutikums beginnt im ersten Schritt mit der Isolation. Um eine sichere, standardisierte Anwendung von MSC als Zelltherapeutikum gewährleisten zu können, ist die Kenntnis ihres Phänotyps nach frischer Isolation unabdingbar. Daher wurden in dieser Arbeit MSC frisch isoliert aus dem Knochenmark erstmals systematisch auf ihre gesamte Oberflächenexpression untersucht. Hiermit sollten neue, hochspezifische Marker gefunden werden, welche die prospektive Isolation von MSC mittels Durchflusszytometrie erleichtern.

5.1 Oberflächenmarkerexpression auf MSC im Vergleich

Diese Untersuchung des Oberflächenprofils frisch aus Spongiosa isolierter MSC bestätigte die Expression bereits bekannter Marker. So konnte gezeigt werden, dass unter anderem CD13 (Jones et al. 2006), CD 49a (Boiret et al. 2005), CD73 (Rasini et al. 2013), CD49e, CD 10, CD29 (Rojewski et al. 2008), SSEA-3, W8B2, W3D5, W5C5 (Buhring et al. 2007), CD 63 (McBride et al. 2017), HLA-A2 und HLA - A, B, C (Majumdar et al. 2003) auf frisch isolierten MSC zu über 95% exprimiert wird. Im Gegensatz zu den meisten Übersichtsarbeiten zur Expression von Oberflächenmarker auf MSC wurde die Expression der Marker hier systematisch und standardisiert untersucht. Betrachtet man beispielsweise Rojewski's Übersichtsarbeit aus 2008 wird schnell deutlich, dass aufgrund der verschiedenen Methoden und Isolationsquellen

häufig widersprüchliche Aussagen bezüglich der Expression einiger Oberflächenmarker entstehen. So werden MSC von (Wagner et al. 2005) als CD10 negativ bezeichnet, während andere die Expression von CD10 nachgewiesen (Jones et al. 2002) haben. Wirft man dann einen Blick auf die Quelle der untersuchten MSC in beiden Arbeiten zeigt sich, dass Jones und Kollegen die MSC in vivo charakterisiert haben, während die Arbeitsgruppe von Wagner zuvor kultivierte MSC aus verschiedenen Quellen mit dem Durchflusszytometer untersuchten. Hier zeigt sich deutlich, dass diese Arbeit Missverständnisse bezüglich des MSC Phänotyps beseitigen kann.

Im Gegensatz zur weithin verbreiteten Definition als CD105 positive Zellen, exprimierten in unserer standardisierten Untersuchung nur ein Teil (ca. 16%) der als CD90+/CD271+ definierten MSC CD105. Dies kann damit zusammenhängen, dass die MSC-Definition der ISCT (International Society for Cellular Therapy) von zuvor kultivierten Zellen ausgeht. Einige Arbeiten zu MSC aus Fettgewebe zeigen, dass frisch isoliert CD105 nur teilweise exprimiert und die Expression im Laufe der Kultur hochreguliert wird (Varma et al. 2007; Yoshimura et al. 2006). CD105 scheint daher ein guter Oberflächenmarker für kultivierte MSC zu sein, jedoch muss seine Expression in vivo oder auch frisch isoliert genauer untersucht werden. Zudem scheint die Expression vom CD105 kein Garant für MSC spezifische Eigenschaften zu sein. Cleary et al. zeigten 2016, dass es keinen Unterschied in der chondrogenen Differenzierungskapazität von CD105 positiven und CD105 negativen MSC aus dem Knochenmark gibt (Cleary et al. 2016). Eine kürzlich erschienene Arbeit schreibt zudem CD105 negativen MSC weitaus größere immunmodulative Fähigkeiten zu als CD105 positiven MSC (Pham et al. 2019) . Weitere Arbeiten, welche frisch isolierte MSC aus dem Knochenmark in CD105 positive und negative Subpopulationen unterteilen und deren immunmodulative Fähigkeiten und Differenzierungskapazitäten untersuchen, werden in Zukunft Licht in die Rolle dieses Oberflächenmarkers auf MSC bringen. Als alleiniger Marker zur Isolation von frischen MSC aus dem Knochenmark ist er nicht geeignet.

5.2 CD 39

In dieser Arbeit wurde jedoch nicht nur das Fehlen oder Vorhandensein bekannter Marker systematisch untersucht, sondern auch nach noch unbekanntem Oberflächenantigenen auf MSC aus Knochenmark gesucht. Hier zeigt sich CD39 als

vielversprechend. CD 39, auch als Ektonukleosidtriphosphatdiphosphohydrolase1 (ENTPD1) bekannt, gehört zur Gruppe der Ektonukleotidasen, welche als extrazelluläre Membranmoleküle Tri- oder Diphosphate hydrolisieren (Robson et al. 2006). Zusammen mit CD73 (5'Nukleotidase) bildet CD 39 Teil des extrazellulären Signalwegs, der Adenosin bildet (Antonioli et al. 2013).



Abbildung 15: „Purinergic signalling“

Adenosintriphosphat bzw. Adenosindiphosphat wird durch CD39 zu Adenosinmonophosphat hydrolisiert. AMP wird daraufhin von CD73 zu Adenosin umgewandelt.

Exprimiert wird CD39 vorwiegend durch Lungen-, Thymus-, Milz- und Plazentagewebe (Zimmermann 1999; Enjyoji et al. 1999) und dort vor allen Dingen durch Immunzellen wie B-Zellen, regulatorische T-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen (Dwyer et al. 2007). Zudem exprimieren einige solide Tumore, beispielweise kolorektale oder Pankreaskarzinome, vermehrt CD39, weswegen dieses Oberflächenmolekül als mögliches Ziel neuer Therapien in der Onkologie gilt (Bastid et al. 2013). In seiner Funktion als Ektonukleotidase kann CD 39 mithilfe von CD73 für die vermehrte Freisetzung von Adenosin sorgen, welches antiinflammatorisch wirkt (Antonioli et al. 2019). Die erhöhte Expression von CD 39 auf regulatorischen T-Zellen kann somit deren immunsupprimierende Funktion als Wächter der Immuntoleranz erklären (Ernst et al. 2010). Dabei exprimieren regulatorische T-Zellen CD 39 nicht dauerhaft, sondern vor allen Dingen im aktivierten Zustand (Borsellino et al. 2007).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CD 39 sowohl durch MSC frisch isoliert aus Spongiosa als auch aus Knochenmarkspirat exprimiert wird. Darüber hinaus ist die Expression von CD39 auf den als CD45+/CD31+ definierten Leukozyten und Endothelzellen sowie den non-MSC (CD271-/CD90-) sehr gering (siehe Abb. 12), was ihn als Oberflächenmarker zur positiven Selektion bei der Isolation von MSC aus Knochenmark interessant macht. In der Literatur gibt es zur Expression von CD39

durch MSC keine einheitlichen Informationen. Lee et al. stellten fest, dass kultivierte MSC einer mesenchymalen Stammzelllinie gewonnen aus fetalem Knochenmark (Nagai et al. 2007) in hohem Maße CD39 exprimieren und damit die Zellproliferation von Th17 Zellen (einer Art T-Helferzellen) inhibieren (Lee et al. 2014).

Eine finnische Studie zwei Jahre später beschrieb jedoch die CD39 Expression durch zuvor kultivierte MSC aus dem Knochenmark als gering und zeigte, dass MSC in Kokultur mit T-Zellen deren CD39 Expression hochregulieren und somit nur gemeinsam über den purinergen Signalweg mittels Adenosinproduktion antiinflammatorisch wirken (Kerkelä et al. 2016). Am wahrscheinlichsten ist auch hier, dass die Expression von CD39 einerseits von der Quelle des MSC Gewebes (Schuler und Brandau 2017; Saldanha-Araujo et al. 2011), als auch von dem Zustand der Zellen (in vivo, in vitro und frisch isoliert) abhängig ist. Neueste Daten suggerieren, dass MSC aus Knochenmark eine hohe Expression von CD39 aufweisen und diese Expression im Verlauf ihrer Entwicklung zu Chondrozyten verlieren (Jeske et al. 2020). Dies unterstützt unsere Daten zur hohen Expression von CD39 auf frisch isolierten MSC. In der Zukunft werden neue Untersuchungen benötigt, welche MSC aus Knochenmark aufgrund ihrer CD39 Expression isolieren und deren immunmodulatorisches Potential mit herkömmlich isolierten MSC vergleicht.

5.3 CD 51

Als weiterer interessanter neu identifizierter MSC Oberflächenmarker stellte sich die hohe Expression von CD51 durch aus Knochenmark frisch isolierten MSC heraus. CD 51, auch bekannt als Integrin α -V, gehört als Integrin zu den Transmembranproteinen unserer Zellen. Integrine verbinden Zellen mit anderen Zellen und der Extrazellulärmatrix und können darüber Signale übermitteln (Sosnoski et al. 1988). Zusammen mit anderen Integrinuntertypen, meist beta-Ketten, bildet Integrin α -V einen heterodimeren Rezeptor von u.a. Vitronectin, Fibronectin, Fibrinogen, Laminin, Matrix-Metalloproteinase-2, Osteopontin, Prothrombin und vWF (von-Willebrand-Faktor) (Bax et al. 2003; Friggeri et al. 2010; Lee et al. 2012; van Agthoven et al. 2014). CD51 wird als Oberflächenprotein zur Isolation von murinen MSC verwendet (Mabuchi et al. 2013a) und scheint eine Subpopulation von MSC zu definieren, welche eine außerordentliche Kapazität zur Zellmigration und zur Regeneration von murinem myokardialen Gewebe aufweist (Xie et al. 2019). Als typischer Oberflächenmarker zur

Charakterisierung und Isolation von humanen MSC ist CD51 jedoch nicht weit verbreitet. Es gibt ältere Arbeiten, welche eine geringe Expression von CD51 auf humanen, aus Knochenmark stammenden MSC nachweisen (Majumdar et al. 2003; Conget und Minguell 1999). 2013 zeigte zuletzt eine amerikanische Arbeit (Pinho et al. 2013) die Coexpression von CD51 und PDGFR α auf murinen und humanen MSC als Marker für eine Untergruppe von MSC, welche die Zellnische für die Expansion von hämatopoetischen Progenitorzellen bilden würden. In neueren Übersichtsarbeiten wird CD51 als eines von acht Integrinen aufgelistet, welche auf humanen MSC exprimiert werden (Pittenger et al. 2019). Durch die in dieser Arbeit nachgewiesene geringe Expression auf den anderen untersuchten Zellpopulationen (Leukozyten, Endothelzellen und non-MSC) ist CD51 wie zuvor CD39 als neuer Marker zur prospektiven Isolation von humanen MSC geeignet. Zudem scheint CD51 aufgrund der neueren Erkenntnisse aus Versuchen mit murinen MSC eine interessante Rolle in der Zellmigration, Zellregeneration und Expansion von hämatopoetischen Stammzellen zu spielen und bedarf in Zukunft gewiss einer genaueren Betrachtung.

5.4 CD 81

Auch CD81 erwies sich als neuer Kandidat zur prospektiven Isolation von MSC. Wie CD39 und CD51 wird CD81 wenig bis gar nicht von Endothelzellen, Leukozyten und von den als CD90-/CD271- definierten non-MSC exprimiert. CD81 gehört als Oberflächenprotein zur Gruppe der Tetraspanine, welche sich, namensgebend, durch vier Transmembrandomänen auszeichnen und an unterschiedlichsten Prozessen von Zelladhäsion über Motilität und Signalübermittlung bis hin zur Proliferation beteiligt sind (Hemler 2005). Im Zusammenhang mit MSC ist CD81 vor allen Dingen als Oberflächenprotein auf von MSC gebildeten Exosomen, einer Untergruppe von extrazellulären Vesikeln, bekannt (Lai et al. 2010). CD81 ist neben CD9 und den endosomalen Markern ALIX and TSG101 ein bekannter Exosomenmarker (Qiu et al. 2019; L Ramos et al. 2016). 2010 zeigten Lai und Kollegen im Mausmodell, dass der festgestellte kardioprotektive Effekt der MSC parakrin über die Abgabe von Exosomen vermittelt wird. Seither haben sich die Daten über die parakrinen Effekte von MSC vervielfältigt und es wird angenommen, dass zahlreiche Fähigkeiten der MSC wie Regeneration und Differenzierung hauptsächlich auf deren parakrine Prozesse beruhen (Witwer et al. 2019). So sollen von MSC stammende Exosomen therapeutisch wirksam

bei Extremitätenischämien (Hu et al. 2015), Leberfibrose (Li et al. 2013) und inflammatorischen Hirnschädigungen von Frühgeborenen (Drommelschmidt et al. 2017) sein und eine wichtige Rolle bei der Wundheilung (Zhang et al. 2015) sowie bei der Regeneration von Knochen- und Knorpelschäden (Furuta et al. 2016; Zhang et al. 2018) einnehmen. Auch in der bekannten Therapie der Graf-versus-host-disease nimmt die Verwendung von MSC-Exosomen ihren Einzug (Kordelas et al. 2014). Der Vorteil eines zellfreien Therapeutikums, welches die vielfältigen Wirkungen von MSC aufweist und keine Risiken wie den Verschluss von kleinen Gefäßen (Furlani et al. 2009) oder die Umwandlung in neue, unerwünschte Zelltypen oder sogar Krebszellen (Jeong et al. 2011) birgt, liegt auf der Hand. Mithilfe der Anwendung von CD81 als Marker zur prospektiven Isolation könnten MSC mit einem hohen Maß an möglich therapeutisch wirksamen Exosomen isoliert werden.

Neben CD 39, CD51 und CD81 konnte auch von zwei weiteren Markern, CD29 und CD298, eine hohe Expression durch MSC festgestellt werden. CD 29, ein Integrin, ist schon länger als MSC Marker bekannt und in zahlreichen Publikationen aufgelistet (Rojewski et al. 2008; Pittenger 1999; Majumdar et al. 2003). Da in dieser Arbeit jedoch CD29 auch auf non-MSC nachgewiesen wurde, eignet sich dieses Protein nicht als Oberflächenmarker zur prospektiven Isolation. Auch CD298 ist nicht zur Isolation von MSC geeignet, da das Protein als beta-3 Untereinheit der Natrium-Kalium-ATPase in sehr vielen unterschiedlichen Zellen zu finden ist (Malik et al. 1996).

5.5 Ausblick

Diese Arbeit hat eine systematische Untersuchung des Oberflächenprofils frisch isolierter MSC aus Knochenmark durchgeführt mit dem Ziel neue, hochspezifische Oberflächenmarker zu identifizieren und mit CD39, CD51 und CD81 neue Oberflächenmarker zur prospektiven Isolation von MSC aufgezeigt. Mit viel Aufwand aufgrund des geringen Anteils von MSC an ihrer Isolationsquelle Knochenmark, welcher mit 0,001 – 0,02 % (Alvarez-Viejo et al. 2013) angegeben wird, konnte so erstmals eine Übersicht über alle Oberflächenmarker erstellt werden, die von frisch isolierten humanen MSC exprimiert werden. Dabei wurde deutlich, dass nicht alle in der Literatur etablierten Marker, welche nach Kultur MSC-spezifisch sind, auch direkt nach Isolation in hohem Maße auf den Zellen vorhanden sind und man hiermit der *in vivo* Identität der MSC einen Schritt näher gekommen ist.

Mehr über die Natur der heterogenen Population der MSC zu erfahren ist wichtiger denn je, da ein rasanter Zuwachs an klinischen Anwendungen im Rahmen von Zelltherapien mit MSC zu verzeichnen ist. Selbst im Rahmen der aktuellen Pandemie durch das neue Coronavirus Sars-CoV-2 wurden Patienten in Studien mit hMSC Infusionen behandelt (Shetty 2020; Leng et al. 2020). Eine große Rolle in der Charakterisierung der MSC neben der Bestimmung ihres *in vitro* und *in vivo* Phänotyps spielen Untersuchungen ihres Genotyps. Schon jetzt gibt es zahlreiche Forschergruppen, die sich mit der Beschreibung des MSC-Transkriptoms und den Veränderungen, welche die Zellen im Empfängerorganismus durchlaufen, beschäftigen (Tremain et al. 2001; Ren et al. 2011; Billing et al. 2016). Man wird versuchen müssen, Informationen über die genetische Herkunft der MSC mit ihrem Phänotyp *in vivo*, *in vitro* und im Empfängerorganismus zu vereinen. Die heterogene Natur und Variabilität humaner MSC, welche sie zu einem der wertvollsten Zelltherapeutika machen, bedarf weiterer intensiver Forschung, um verstanden zu werden und um in Zukunft noch sicherer Anwendung zu finden.

6 Zusammenfassung

Mesenchymale Stammzellen (MSC) werden als nicht-hämatopoetische, plastikadhärente, sich selbst erneuernde Zellen definiert. Sie sind in der Lage, sich in Fett, Knochen und Knorpel zu differenzieren und besitzen vielfältige immunmodulierende Eigenschaften. Daher sind sie von äußerstem klinischem Interesse im Rahmen von zellbasierten Therapien und im Bereich des "Tissue engineering". Die meisten Informationen über MSC stammen aus Untersuchungen von mittels Plastikadhärenz isolierten, zuvor kultivierten Zellen, jedoch sind Studien, die die in vivo-Eigenschaften von MSC erforschen, auf dem Vormarsch. Noch immer ist wenig über den Phänotyp frisch isolierter MSC bekannt, da sie insgesamt nur einen sehr geringen Anteil der z.B. aus Knochenmark isolierten Zellen ausmachen. In Kultur verändert sich die Expression unterschiedlicher MSC Marker, auch abhängig davon, welches Protokoll jedes einzelne Labor verwendet. In dieser Arbeit wurde daher der Phänotyp von naiven, frisch isolierten, aus menschlichem Knochenmark gewonnenen MSC systematisch untersucht, um neue Oberflächenmarker zu identifizieren, welche eine prospektive Isolation und Charakterisierung von MSC in Zukunft erleichtern. Die Isolation humaner MSC mittels Kollagenaseverdau zerkleinerter Spongiosa wurde standardisiert und mit der herkömmlichen Isolation von MSC aus Knochenmarkaspirat verglichen. Das Vorhandensein bereits bekannter MSC-Marker wie z.B. CD71, CD49a und CD13 wurde bestätigt. Zusätzlich wurde gezeigt, dass frisch aus humanem Knochenmark gewonnene MSC neue Marker wie CD39, CD51 und CD81 exprimieren. Die Expression dieser Marker könnte die prospektive Isolation von MSC signifikant erleichtern, da sie von anderen Knochenmarkzellen wie Leukozyten oder Endothelzellen nicht exprimiert werden. Darüber hinaus kann die Expression von CD39, CD51 und CD81 neue Erkenntnisse über die Eigenschaften von MSC hinsichtlich ihrer entzündungshemmenden Wirkung, ihrer Rolle bei der Zellmigration und Expansion hämatopoetischer Stammzellen oder ihrer Freisetzung therapeutisch wirksamer Exosomen liefern. Zusammenfassend verdeutlicht diese Arbeit durch die Untersuchung des komplexen Phänotyps frisch isolierter humaner MSC aus dem Knochenmark die Veränderungen, die MSC bei der Anwendung in zellbasierten Therapien durchlaufen, und trägt so weiter zum Verständnis der Natur dieser heterogenen Zellpopulation bei.

7 Summary

Human mesenchymal stem cells (MSC) are defined as nonhematopoietic, plastic adherent, self-renewing cells. They are able to differentiate into fat, bone and cartilage and are known to have multiple immunomodulatory properties. Therefore, they are of immense clinical interest in tissue engineering and cell-based therapies. Most information about MSC results from cultured mixtures of heterogeneous progenitor cells after plastic adherence, but studies investigating their *in vivo* characteristics are on the rise. Still, little is known about the phenotype of freshly isolated MSC, as they represent only a very little proportion of cells isolated from e.g. bone marrow in total. While in culture, MSC are known to undergo changes in their surface marker profile, also depending on the protocol of each individual laboratory. In the current work, we have systematically investigated the phenotype of naïve, freshly isolated human bone marrow derived MSC to identify novel surface markers facilitating prospective isolation, characterization and purification of MSC. Isolating human MSC via collagenase digestion of crushed bone was standardized and compared to isolating MSC from bone marrow aspirate. The presence of already known MSC markers such as e.g. CD71, CD49a and CD13 was confirmed. Additionally, it was shown that freshly isolated human bone marrow derived MSC express novel markers such as CD39, CD51 and CD81. The expression of these markers may facilitate prospective isolation of MSC as they have not been expressed by other bone marrow cells such as leucocytes or endothelial cells. Furthermore, the expression of CD39, CD51 and CD81 may provide new insights into MSC properties regarding their anti-inflammatory effects, their role in cell migration and expansion of hematopoietic stem cells or their release of therapeutically effective exosomes. In summary, by investigating the complex phenotype of freshly isolated human bone marrow derived MSC this work may clarify the changes MSC go through while used in cell-based therapies and will further help to understand the nature of this heterogeneous cell population.

8 Abkürzungsverzeichnis

ACD	<i>acid-citrat-dextrose</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adosintriphosphat
CaCl	Calciumchlorid
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFU-Fs	<i>colony-forming units fibroblasts</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENTPD1	Ektonukleosidtriphosphatdiphosphohydrolase 1
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FKS	Fetales Kälber Serum
GD2	<i>neural ganglioside 2</i>
GvHD	<i>Graft-versus-Host-Disease</i> (Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HLA	humanes Leukozytenantigen

HSC	Hämatopoetische Stammzellen
IDO	Indoleamine 2,3-Dioxygenase
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon Gamma
iPS	induzierte pluripotente Stammzelle
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
KM Aspirat	Knochenmarksaspirat
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MSC	Mesenchymale Stromazellen bzw. mesenchymale Stammzellen
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	<i>nitric oxide</i> (Stickstoffmonoxid)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDGFr	<i>platelet-derived growth factor-1 receptor</i>
PGE2	Prostaglandin E2
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Zellkulturmedium)
RT	Raumtemperatur
Sars-CoV-2	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
SCA-1	<i>stem cell antigen-1</i>
STRO-1	<i>stromal-derived factor-1</i>

TGFβ1	<i>transforming growth factor beta 1</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
Treg	regulatorische T-Zellen
UKGM	Universitätsklinikum Gießen und Marburg

9 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Immunmodulatorische Effekte mesenchymaler Stammzellen.....	3
Abbildung 2: Isolationsmethoden	5
Abbildung 3: Gating Strategie.....	22
Abbildung 4: Gating Strategie.....	24
Abbildung 5: Expression von potentiell zusätzlichen Oberflächenmarkern auf MSC ...	27
Abbildung 6: Mediane Fluoreszenzintensität der auf MSC nachgewiesenen Oberflächenmarker.....	28
Abbildung 7: Expression der Oberflächenmarker auf MSC	29
Abbildung 8: Expression neuer MSC-Marker im Vergleich zwischen MSC, leukozytären CD45+/CD31+ Zellen und Non-MSC CD271-/CD90- Zellen.....	32
Abbildung 9: Höhe des MSC-Anteils in Spongiosa- und Knochenmarkaspirat	34
Abbildung 10: Vergleich der Membranintegrität zwischen kryokonservierter Spongiosa und frisch isolierten Knochenmakaspirat	35
Abbildung 11: Oberflächenmarkerexpression der MSC aus Knochenmarkaspirat und Spongiosa	36
Abbildung 12: Expression der neuen Marker im Vergleich zwischen MSC, CD45+/CD31+ Zellen und CD271-/CD90- Zellen aus Knochenmarkaspirat	38
Abbildung 13: Oberflächenmarkerexpression von MSC aus Knochenmarkaspirat	39
Abbildung 14: Expression der neuen Marker im Vergleich	40
Abbildung 15: „Purinergic signalling“	43

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der Oberflächenmarkerexpression auf naiven, frisch isolierten und kultivierten MSC	10
Tabelle 2: Liste der verwendeten Lösungen und Chemikalien und deren Hersteller	14
Tabelle 3: Liste der Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller	14
Tabelle 4: Liste der verwendeten Geräte und deren Hersteller	15
Tabelle 5: Verwendete Software	15
Tabelle 6: Zusammensetzung des Verdaupuffers für den Verdau von 700mg Spongiosa	16
Tabelle 7: Zusammensetzung des Einfriermediums	16
Tabelle 8: Zusammensetzung des Auftaumediums.....	17
Tabelle 9: Verwendete Antikörper für die Isolierung von MSC.....	17
Tabelle 10: Verwendete Antikörper für die Validierung der Oberflächenmarker	18
Tabelle 11: Übersicht Expression verschiedener Oberflächenmarker auf MSC.....	71

11 Literaturverzeichnis

Aggarwal, Sudeepta; Pittenger, Mark F. (2005): Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. In: *Blood* 105 (4), S. 1815–1822. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1559.

Alvarez-Viejo, M.; Menendez-Menendez, Y.; Blanco-Gelaz, M. A.; Ferrero-Gutierrez, A.; Fernandez-Rodriguez, M. A.; Gala, J.; Otero-Hernandez, J. (2013): Quantifying mesenchymal stem cells in the mononuclear cell fraction of bone marrow samples obtained for cell therapy. In: *Transplantation proceedings* 45 (1), S. 434–439. DOI: 10.1016/j.transproceed.2012.05.091.

Antonioli, L.; Fornai, M.; Blandizzi, C.; Pacher, P.; Haskó, G. (2019): Adenosine signaling and the immune system: When a lot could be too much. In: *Immunology letters* 205. DOI: 10.1016/j.imlet.2018.04.006.

Antonioli, Luca; Pacher, Pál; Vizi, E. Sylvester; Haskó, György (2013): CD39 and CD73 in immunity and inflammation. In: *Trends in molecular medicine* 19 (6), S. 355–367. DOI: 10.1016/j.molmed.2013.03.005.

Bara, Jennifer J.; Richards, R. Geoff; Alini, Mauro; Stoddart, Martin J. (2014): Concise review: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 32 (7), S. 1713–1723. DOI: 10.1002/stem.1649.

Bastid, J.; Cottalorda-Regairaz, A.; Alberici, G.; Bonnefoy, N.; Eliaou, J. F.; Bensussan, A. (2013): ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. In: *Oncogene* 32 (14). DOI: 10.1038/onc.2012.269.

Bax, Daniel V.; Bernard, Sarah E.; Lomas, Amanda; Morgan, Amanda; Humphries, Jon; Shuttleworth, C. Adrian et al. (2003): Cell adhesion to fibrillin-1 molecules and microfibrils is mediated by alpha 5 beta 1 and alpha v beta 3 integrins. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (36), S. 34605–34616. DOI: 10.1074/jbc.M303159200.

Behfar, Atta; Yamada, Satsuki; Crespo-Diaz, Ruben; Nesbitt, Jonathan J.; Rowe, Lois A.; Perez-Terzic, Carmen et al. (2010): Guided cardiopoiesis enhances therapeutic benefit of bone marrow human mesenchymal stem cells in chronic myocardial infarction. In: *Journal of the American College of Cardiology* 56 (9), S. 721–734. DOI: 10.1016/j.jacc.2010.03.066.

Beyer Nardi, N.; da Silva Meirelles, L. (2006): Mesenchymal stem cells. Isolation, in vitro expansion and characterization. In: *Handbook of experimental pharmacology* (174), S. 249–282.

Billing, Anja M.; Ben Hamidane, Hisham; Dib, Shaima S.; Cotton, Richard J.; Bhagwat, Aditya M.; Kumar, Pankaj et al. (2016): Comprehensive transcriptomic and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells reveals source specific cellular markers. In: *Sci Rep* 6 (1), S. 21507. DOI: 10.1038/srep21507.

Blocki, Anna; Wang, Yingting; Koch, Maria; Peh, Priscilla; Beyer, Sebastian; Law, Ping et al. (2013): Not All MSCs Can Act as Pericytes: Functional In Vitro Assays to Distinguish Pericytes from Other Mesenchymal Stem Cells in Angiogenesis. In: *Stem cells and development* 22 (17), S. 2347–2355. DOI: 10.1089/scd.2012.0415.

Boiret, Nathalie; Rapatel, Chantal; Veyrat-Masson, Richard; Guillouard, Laurent; Guérin, Jean-Jacques; Pigeon, Pascale et al. (2005): Characterization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow. In: *Experimental hematology* 33 (2), S. 219–225. DOI: 10.1016/j.exphem.2004.11.001.

Bonin, M. von; Stölzel, F.; Goedecke, A.; Richter, K.; Wuschek, N.; Hölig, K. et al. (2009): Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. In: *Bone marrow transplantation* 43 (3), S. 245–251. DOI: 10.1038/bmt.2008.316.

Borsellino, G.; Kleinewietfeld, M.; Di, Mitri D.; Sternjak, A.; Diamantini, A.; Giometto, R. et al. (2007): Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. In: *Blood* 110 (4). DOI: 10.1182/blood-2006-12-064527.

Buhring, Hans-Jorg; Battula, Venkata Lokesh; Treml, Sabrina; Schewe, Bernhard; Kanz, Lothar; Vogel, Wichard (2007): Novel markers for the prospective isolation of human MSC. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1106, S. 262–271. DOI: 10.1196/annals.1392.000.

Chan J.K.C., NG C.S. & Hui P.K 1988: A simple guide to the terminology and application of leucocyte monoclonal antibodies. In: *Histopathology* 1988 (12), S. 461–480.

Chen, Shao-liang; Fang, Wu-wang; Ye, Fei; Liu, Yu-Hao; Qian, Jun; Shan, Shou-jie et al. (2004): Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. In: *The American journal of cardiology* 94 (1), S. 92–95. DOI: 10.1016/j.amjcard.2004.03.034.

Cleary, M. A.; Narcisi, R.; Focke, K.; van der Linden, R.; Brama, P.A.J.; van Osch, G.J.V.M. (2016): Expression of CD105 on expanded mesenchymal stem cells does not predict their chondrogenic potential. In: *Osteoarthritis and cartilage* 24 (5), S. 868–872. DOI: 10.1016/j.joca.2015.11.018.

Clevers, Hans (2005): Stem cells, asymmetric division and cancer. In: *Nature genetics* 37 (10), S. 1027–1028. DOI: 10.1038/ng1005-1027.

Conget, P. A.; Minguell, J. J. (1999): Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. In: *Journal of cellular physiology* 181 (1), S. 67–73. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(199910)181:1<67::AID-JCP7>3.0.CO;2-C.

Corcione, Anna; Benvenuto, Federica; Ferretti, Elisa; Giunti, Debora; Cappiello, Valentina; Cazzanti, Francesco et al. (2006): Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. In: *Blood* 107 (1), S. 367–372. DOI: 10.1182/blood-2005-07-2657.

Cox, George; Boxall, Sally A.; Giannoudis, Peter V.; Buckley, Conor T.; Roshdy, Tarek; Churchman, Sarah M. et al. (2012): High abundance of CD271(+) multipotential stromal cells (MSCs) in intramedullary cavities of long bones. In: *Bone* 50 (2), S. 510–517. DOI: 10.1016/j.bone.2011.07.016.

da Silva Meirelles, Lindolfo; Chagastelles, Pedro Cesar; Nardi, Nance Beyer (2006): Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. In: *Journal of cell science* 119 (Pt 11), S. 2204–2213. DOI: 10.1242/jcs.02932.

Dexter, T. M. (1979): Haemopoiesis in long-term bone marrow cultures. A review. In: *Acta haematologica* 62 (5-6), S. 299–305. DOI: 10.1159/000207593.

Di Nicola, M. (2002): Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. In: *Blood* 99 (10), S. 3838–3843. DOI: 10.1182/blood.V99.10.3838.

Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, Fc; Krause, Ds et al. (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The

International Society for Cellular Therapy position statement. In: *Cytotherapy* 8 (4), S. 315–317. DOI: 10.1080/14653240600855905.

Dorronsoro, Akaitz; Fernández-Rueda, Jon; Fechter, Karoline; Ferrin, Izaskun; Salcedo, Juan Manuel; Jakobsson, Emma; Trigueros, César (2013): Human mesenchymal stromal cell-mediated immunoregulation: mechanisms of action and clinical applications. In: *Bone marrow research* 2013, S. 203643. DOI: 10.1155/2013/203643.

Drommelschmidt, Karla; Serdar, Meray; Bendix, Ivo; Herz, Josephine; Bertling, Frederik; Prager, Sebastian et al. (2017): Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles ameliorate inflammation-induced preterm brain injury. In: *Brain, Behavior, and Immunity* 60, S. 220–232. DOI: 10.1016/j.bbi.2016.11.011.

Dwyer, Karen M.; Deaglio, Silvia; Gao, Wenda; Friedman, David; Strom, Terry B.; Robson, Simon C. (2007): CD39 and control of cellular immune responses. In: *Purinergic signalling* 3 (1-2), S. 171–180. DOI: 10.1007/s11302-006-9050-y.

Enjyoji, K.; Sévigny, J.; Lin, Y.; Frenette, P. S.; Christie, P. D.; Esch, J. S. et al. (1999): Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. In: *Nature Medicine* 5 (9). DOI: 10.1038/12447.

Ernst, Peter B.; Garrison, James C.; Thompson, Linda F. (2010): Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185 (4), S. 1993–1998. DOI: 10.4049/jimmunol.1000108.

Fekete, Natalie; Rojewski, Markus T.; Fürst, Daniel; Kreja, Ludwika; Ignatius, Anita; Dausend, Julia; Schrezenmeier, Hubert (2012): GMP-Compliant Isolation and Large-Scale Expansion of Bone Marrow-Derived MSC. In: *PloS one* 7 (8). DOI: 10.1371/journal.pone.0043255.

Friedenstein, A. J.; Chailakhyan, R. K.; Latsinik, N. V.; Panasyuk, A. F.; Keiliss-Borok, I. V. (1974): Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. In: *Transplantation* 17 (4), S. 331–340.

Friedenstein, A. J.; Gorskaja, J. F.; Kulagina, N. N. (1976): Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. In: *Experimental hematology* 4 (5), S. 267–274.

Friggeri, Arnaud; Yang, Yanping; Banerjee, Sami; Park, Yong-Jun; Liu, Gang; Abraham, Edward (2010): HMGB1 inhibits macrophage activity in efferocytosis through binding to the α v β 3-integrin. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 299 (6), C1267-76. DOI: 10.1152/ajpcell.00152.2010.

Furlani, Dario; Ugurlucan, Murat; Ong, LeeLee; Bieback, Karen; Pittermann, Erik; Westien, Ingeborg et al. (2009): Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. In: *Microvascular Research* 77 (3), S. 370–376. DOI: 10.1016/j.mvr.2009.02.001.

Furuta, Taisuke; Miyaki, Shigeru; Ishitobi, Hiroyuki; Ogura, Toshihiko; Kato, Yoshio; Kamei, Naosuke et al. (2016): Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promote Fracture Healing in a Mouse Model. In: *Stem cells translational medicine* 5 (12), S. 1620–1630. DOI: 10.5966/sctm.2015-0285.

Hackstein, Holger; Lippitsch, Anne; Krug, Philipp; Schevtschenko, Inna; Kranz, Sabine; Hecker, Matthias et al. (2015): Prospectively defined murine mesenchymal stem cells inhibit *Klebsiella pneumoniae*-induced acute lung injury and improve pneumonia survival. In: *Respiratory research* 16, S. 123. DOI: 10.1186/s12931-015-0288-1.

Halfon, Svetlana; Abramov, Natalie; Grinblat, Borislava; Ginis, Irene (2011): Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. In: *Stem cells and development* 20 (1), S. 53–66. DOI: 10.1089/scd.2010.0040.

Hemler, Martin E. (2005): Tetraspanin functions and associated microdomains. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 6 (10), S. 801–811. DOI: 10.1038/nrm1736.

Horwitz, E. M.; Le Blanc, K.; Dominici, M.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F. C. et al. (2005): Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. In: *Cytotherapy* 7 (5), S. 393–395. DOI: 10.1080/14653240500319234.

Houlihan, Diarmaid D.; Mabuchi, Yo; Morikawa, Satoru; Niibe, Kunimichi; Araki, Daisuke; Suzuki, Sadafumi et al. (2012): Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR- α . In: *Nature protocols* 7 (12), S. 2103–2111. DOI: 10.1038/nprot.2012.125.

Hu, Guo-wen; Li, Qing; Niu, Xin; Hu, Bin; Liu, Juan; Zhou, Shu-min et al. (2015): Exosomes secreted by human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells attenuate limb ischemia by promoting angiogenesis in mice. In: *Stem Cell Res Ther* 6 (1), S. 10. DOI: 10.1186/s12934-015-0254-6.

Jeong, Jin-Ok; Han, Ji Woong; Kim, Jin-Man; Cho, Hyun-Jai; Park, Changwon; Lee, Namho et al. (2011): Malignant tumor formation after transplantation of short-term cultured bone marrow mesenchymal stem cells in experimental myocardial infarction and diabetic neuropathy. In: *Circulation research* 108 (11), S. 1340–1347. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.239848.

Jeske, S. S.; Theodoraki, M. N.; Boelke, E.; Laban, S.; Brunner, C.; Rotter, N. et al. (2020): Adenosinproduktion in mesenchymalen Stromazellen in Bezug auf deren Entwicklungsstatus. In: *HNO* 68 (2), S. 87–93. DOI: 10.1007/s00106-019-00805-z.

Jiang, Xiao-Xia; Zhang, Yi; Liu, Bing; Zhang, Shuang-Xi; Wu, Ying; Yu, Xiao-Dan; Mao, Ning (2005): Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. In: *Blood* 105 (10), S. 4120–4126. DOI: 10.1182/blood-2004-02-0586.

Jones, Elena; Yang, Xuebin (2011): Mesenchymal stem cells and bone regeneration: current status. In: *Injury* 42 (6), S. 562–568. DOI: 10.1016/j.injury.2011.03.030.

Jones, Elena A.; English, Anne; Kinsey, Sally E.; Straszynski, Liz; Emery, Paul; Ponchel, Frederique; McGonagle, Dennis (2006): Optimization of a flow cytometry-based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow. In: *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* 70 (6), S. 391–399. DOI: 10.1002/cyto.b.20118.

Jones, Elena A.; Kinsey, Sally E.; English, Anne; Jones, Richard A.; Straszynski, Liz; Meredith, David M. et al. (2002): Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. In: *Arthritis and rheumatism* 46 (12), S. 3349–3360. DOI: 10.1002/art.10696.

Keating, Armand (2012): Mesenchymal stromal cells: new directions. In: *Cell stem cell* 10 (6), S. 709–716. DOI: 10.1016/j.stem.2012.05.015.

Kebriaei, Partow; Isola, Luis; Bahceci, Erkut; Holland, Kent; Rowley, Scott; McGuirk, Joseph et al. (2009): Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid

therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 15 (7), S. 804–811. DOI: 10.1016/j.bbmt.2008.03.012.

Kerkelä, Erja; Laitinen, Anita; Råbinä, Jarkko; Valkonen, Sami; Takatalo, Maarit; Larjo, Antti et al. (2016): Adenosinergic Immunosuppression by Human Mesenchymal Stromal Cells Requires Co-Operation with T cells. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 34 (3), S. 781–790. DOI: 10.1002/stem.2280.

Kim, Jiseon; Kang, Jin Wook; Park, Jae Hyun; Choi, Youngju; Choi, Kyung Suk; Park, Ki Dae et al. (2009): Biological characterization of long-term cultured human mesenchymal stem cells. In: *Archives of pharmacal research* 32 (1), S. 117–126. DOI: 10.1007/s12272-009-1125-1.

Kordelas, L.; Rebmann, V.; Ludwig, A-K; Radtke, S.; Ruesing, J.; Doeppner, T. R. et al. (2014): MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. In: *Leukemia* 28 (4), S. 970–973. DOI: 10.1038/leu.2014.41.

Krampera, Mauro; Cosmi, Lorenzo; Angeli, Roberta; Pasini, Annalisa; Liotta, Francesco; Andreini, Angelo et al. (2006): Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24 (2), S. 386–398. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0008.

Krampera, Mauro; Glennie, Sarah; Dyson, Julian; Scott, Diane; Laylor, Ruthline; Simpson, Elizabeth; Dazzi, Francesco (2003): Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. In: *Blood* 101 (9), S. 3722–3729. DOI: 10.1182/blood-2002-07-2104.

L Ramos, Teresa; Sánchez-Abarca, Luis Ignacio; Muntión, Sandra; Preciado, Silvia; Puig, Noemí; López-Ruano, Guillermo et al. (2016): MSC surface markers (CD44, CD73, and CD90) can identify human MSC-derived extracellular vesicles by conventional flow cytometry. In: *Cell communication and signaling : CCS* 14, S. 2. DOI: 10.1186/s12964-015-0124-8.

Lai, R. C.; Arslan, F.; Lee, M. M.; Sze, N. S.; Choo, A.; Chen, T. S. et al. (2010): Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. In: *Stem cell research* 4 (3). DOI: 10.1016/j.scr.2009.12.003.

Lazarus, H. M.; Haynesworth, S. E.; Gerson, S. L.; Rosenthal, N. S.; Caplan, A. I. (1995): Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. In: *Bone marrow transplantation* 16 (4), S. 557–564.

Le Blanc, Katarina; Frassoni, Francesco; Ball, Lynne; Locatelli, Franco; Roelofs, Helene; Lewis, Ian et al. (2008): Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. In: *The Lancet* 371 (9624), S. 1579–1586. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60690-X.

Le Blanc, Katarina; Rasmusson, Ida; Sundberg, Berit; Götherström, Cecilia; Hassan, Moustapha; Uzunel, Mehmet; Ringdén, Olle (2004): Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. In: *The Lancet* 363 (9419), S. 1439–1441. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16104-7.

Le Blanc, Katarina; Tammik, Charlotte; Rosendahl, Kerstin; Zetterberg, Eva; Ringdén, Olle (2003): HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. In: *Experimental hematology* 31 (10), S. 890–896. DOI: 10.1016/S0301-472X(03)00110-3.

Lee, Hee Doo; Koo, Bon-Hun; Kim, Yeon Hyang; Jeon, Ok-Hee; Kim, Doo-Sik (2012): Exosome release of ADAM15 and the functional implications of human macrophage-derived ADAM15 exosomes. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26 (7), S. 3084–3095. DOI: 10.1096/fj.11-201681.

Lee, Jong Joo; Jeong, Hyun Jeong; Kim, Mee Kum; Wee, Won Ryang; Lee, Won Woo; Kim, Seung U. et al. (2014): CD39-mediated effect of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on the human Th17 cell function. In: *Purinergic signalling* 10 (2), S. 357–365. DOI: 10.1007/s11302-013-9385-0.

Leng, Zikuan; Zhu, Rongjia; Hou, Wei; Feng, Yingmei; Yang, Yanlei; Han, Qin et al. (2020): Transplantation of ACE2- Mesenchymal Stem Cells Improves the Outcome of Patients with COVID-19 Pneumonia. In: *Aging and disease* 11 (2), S. 216–228. DOI: 10.14336/AD.2020.0228.

Li, Tingfen; Yan, Yongmin; Wang, Bingying; Qian, Hui; Zhang, Xu; Li Shen et al. (2013): Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate

liver fibrosis. In: *Stem cells and development* 22 (6), S. 845–854. DOI: 10.1089/scd.2012.0395.

Li, W.; Ren, G.; Huang, Y.; Su, J.; Han, Y.; Li, J. et al. (2012): Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. In: *Cell death and differentiation* 19 (9), S. 1505–1513. DOI: 10.1038/cdd.2012.26.

Lv, Feng-Juan; Tuan, Rocky S.; Cheung, Kenneth M. C.; Leung, Victor Y. L. (2014): Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 32 (6), S. 1408–1419. DOI: 10.1002/stem.1681.

Mabuchi, Yo; Houlihan, Diarmaid D.; Akazawa, Chihiro; Okano, Hideyuki; Matsuzaki, Yumi (2013a): Prospective isolation of murine and human bone marrow mesenchymal stem cells based on surface markers. In: *Stem cells international* 2013, S. 507301. DOI: 10.1155/2013/507301.

Mabuchi, Yo; Morikawa, Satoru; Harada, Seiko; Niibe, Kunimichi; Suzuki, Sadafumi; Renault-Mihara, Francois et al. (2013b): LNGFR(+)THY-1(+)VCAM-1(hi+) cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells. In: *Stem cell reports* 1 (2), S. 152–165. DOI: 10.1016/j.stemcr.2013.06.001.

Majumdar, Manas K.; Keane-Moore, Michele; Buyaner, Diana; Hardy, Wayne B.; Moorman, Mark A.; McIntosh, Kevin R.; Mosca, Joseph D. (2003): Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. In: *Journal of biomedical science* 10 (2), S. 228–241. DOI: 10.1007/BF02256058.

Malik, N.; Canfield, V. A.; Beckers, M. C.; Gros, P.; Levenson, R. (1996): Identification of the mammalian Na,K-ATPase 3 subunit. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (37), S. 22754–22758. DOI: 10.1074/jbc.271.37.22754.

Martinez, Caridad; Hofmann, Ted J.; Marino, Roberta; Dominici, Massimo; Horwitz, Edwin M. (2007): Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. In: *Blood* 109 (10), S. 4245–4248. DOI: 10.1182/blood-2006-08-039347.

McBride, Jeffrey D.; Rodriguez-Menocal, Luis; Guzman, Wellington; Candanedo, Ambar; Garcia-Contreras, Marta; Badiavas, Evangelos V. (2017): Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived CD63+ Exosomes Transport Wnt3a Exteriorly and

Enhance Dermal Fibroblast Proliferation, Migration, and Angiogenesis In Vitro. In: *Stem cells and development* 26 (19), S. 1384–1398. DOI: 10.1089/scd.2017.0087.

Meisel, Roland; Zibert, Andree; Laryea, Maurice; Göbel, Ulrich; Däubener, Walter; Dilloo, Dagmar (2004): Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. In: *Blood* 103 (12), S. 4619–4621. DOI: 10.1182/blood-2003-11-3909.

Méndez-Ferrer, Simón; Michurina, Tatyana V.; Ferraro, Francesca; Mazloom, Amin R.; Macarthur, Ben D.; Lira, Sergio A. et al. (2010): Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. In: *Nature* 466 (7308), S. 829–834. DOI: 10.1038/nature09262.

Michler, Robert E. (2018): The current status of stem cell therapy in ischemic heart disease. In: *Journal of cardiac surgery* 33 (9), S. 520–531. DOI: 10.1111/jocs.13789.

Morikawa, Satoru; Mabuchi, Yo; Kubota, Yoshiaki; Nagai, Yasuo; Niibe, Kunimichi; Hiratsu, Emi et al. (2009): Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. In: *The Journal of experimental medicine* 206 (11), S. 2483–2496. DOI: 10.1084/jem.20091046.

Nagai, Atsushi; Kim, Woo K.; Lee, Hong J.; Jeong, Han S.; Kim, Kwang S.; Hong, Seok H. et al. (2007): Multilineage potential of stable human mesenchymal stem cell line derived from fetal marrow. In: *PloS one* 2 (12), e1272. DOI: 10.1371/journal.pone.0001272.

Nakamura, Yuka; Arai, Fumio; Iwasaki, Hiroko; Hosokawa, Kentaro; Kobayashi, Isao; Gomei, Yumiko et al. (2010): Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells. In: *Blood* 116 (9), S. 1422–1432. DOI: 10.1182/blood-2009-08-239194.

Ning, Hongxiu; Lin, Guiting; Lue, Tom F.; Lin, Ching-Shwun (2011): Mesenchymal stem cell marker Stro-1 is a 75 kd endothelial antigen. In: *Biochemical and biophysical research communications* 413 (2), S. 353–357. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.08.104.

Nold, Philipp; Brendel, Cornelia; Neubauer, Andreas; Bein, Gregor; Hackstein, Holger (2013): Good manufacturing practice-compliant animal-free expansion of human bone marrow derived mesenchymal stroma cells in a closed hollow-fiber-based bioreactor.

In: *Biochemical and biophysical research communications* 430 (1), S. 325–330. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.11.001.

Parekkadan, Biju; van Poll, Daan; Suganuma, Kazuhiro; Carter, Edward A.; Berthiaume, François; Tilles, Arno W.; Yarmush, Martin L. (2007): Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. In: *PloS one* 2 (9), e941. DOI: 10.1371/journal.pone.0000941.

Pham, Liem Hieu; Vu, Ngoc Bich; van Pham, Phuc (2019): The subpopulation of CD105 negative mesenchymal stem cells show strong immunomodulation capacity compared to CD105 positive mesenchymal stem cells. In: *Biomed. Res. Ther.* 6 (4), S. 3131–3140. DOI: 10.15419/bmrat.v6i4.538.

Pinho, Sandra; Lacombe, Julie; Hanoun, Maher; Mizoguchi, Toshihide; Bruns, Ingmar; Kunisaki, Yuya; Frenette, Paul S. (2013): PDGFRalpha and CD51 mark human nestin+ sphere-forming mesenchymal stem cells capable of hematopoietic progenitor cell expansion. In: *The Journal of experimental medicine* 210 (7), S. 1351–1367. DOI: 10.1084/jem.20122252.

Pittenger, M. F. (1999): Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. In: *Science* 284 (5411), S. 143–147. DOI: 10.1126/science.284.5411.143.

Pittenger, Mark F.; Discher, Dennis E.; Péault, Bruno M.; Phinney, Donald G.; Hare, Joshua M.; Caplan, Arnold I. (2019): Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. In: *NPJ Regenerative medicine* 4, S. 22. DOI: 10.1038/s41536-019-0083-6.

Qian, Hong; Le Blanc, Katarina; Sigvardsson, Mikael (2012): Primary mesenchymal stem and progenitor cells from bone marrow lack expression of CD44 protein. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (31), S. 25795–25807. DOI: 10.1074/jbc.M112.339622.

Qiu, Guanguan; Zheng, Guoping; Ge, Menghua; Wang, Jiangmei; Huang, Ruoqiong; Shu, Qiang; Xu, Jianguo (2019): Functional proteins of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. In: *Stem cell research & therapy* 10. DOI: 10.1186/s13287-019-1484-6.

Rasini, Valeria; Dominici, Massimo; Kluba, Torsten; Siegel, Georg; Lusenti, Giulia; Northoff, Hinnak et al. (2013): Mesenchymal stromal/stem cells markers in the human bone marrow. In: *Cytotherapy* 15 (3), S. 292–306. DOI: 10.1016/j.jcyt.2012.11.009.

Ren, Jiaqiang; Jin, Ping; Sabatino, Marianna; Balakumaran, Arun; Feng, Ji; Kuznetsov, Sergei A. et al. (2011): Global transcriptome analysis of human bone marrow stromal cells (BMSC) reveals proliferative, mobile and interactive cells that produce abundant extracellular matrix proteins, some of which may affect BMSC potency. In: *Cytotherapy* 13 (6), S. 661–674. DOI: 10.3109/14653249.2010.548379.

Robson, Simon C.; Sévigny, Jean; Zimmermann, Herbert (2006): The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. In: *Purinergic signalling* 2 (2), S. 409–430. DOI: 10.1007/s11302-006-9003-5.

Rojewski, Markus Thomas; Weber, Barbara Maria; Schrezenmeier, Hubert (2008): Phenotypic Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Various Tissues. In: *Transfusion medicine and hemotherapy : offzielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* 35 (3), S. 168–184. DOI: 10.1159/000129013.

Rustad, Kristine C.; Gurtner, Geoffrey C. (2012): Mesenchymal Stem Cells Home to Sites of Injury and Inflammation. In: *Advances in wound care* 1 (4), S. 147–152. DOI: 10.1089/wound.2011.0314.

Saldanha-Araujo, Felipe; Ferreira, Flavia I. S.; Palma, Patricia V.; Araujo, Amelia G.; Queiroz, Regina H. C.; Covas, Dimas T. et al. (2011): Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. In: *Stem cell research* 7 (1), S. 66–74. DOI: 10.1016/j.scr.2011.04.001.

Sato, Kazuya; Ozaki, Katsutoshi; Oh, Iekuni; Meguro, Akiko; Hatanaka, Keiko; Nagai, Tadashi et al. (2007): Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. In: *Blood* 109 (1), S. 228–234. DOI: 10.1182/blood-2006-02-002246.

Schuler, Patrick J.; Brandau, Sven (2017): Adenosine Producing Mesenchymal Stem Cells. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 35 (6), S. 1647–1648. DOI: 10.1002/stem.2532.

Selmani, Zohair; Naji, Abderrahim; Zidi, Ines; Favier, Benoit; Gaiffe, Emilie; Obert, Laurent et al. (2008): Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26 (1), S. 212–222. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0554.

Shetty, Ashok K. (2020): Mesenchymal Stem Cell Infusion Shows Promise for Combating Coronavirus (COVID-19)- Induced Pneumonia. In: *Aging and disease* 11 (2), S. 462–464. DOI: 10.14336/AD.2020.0301.

Sick, E.; Jeanne, A.; Schneider, C.; Dedieu, S.; Takeda, K.; Martiny, L. (2012): CD47 update: a multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest. In: *British journal of pharmacology* 167 (7), S. 1415–1430. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.02099.x.

Simmons, P. J.; Torok-Storb, B. (1991): Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. In: *Blood* 78 (1), S. 55–62.

Sorrentino, Antonio; Ferracin, Manuela; Castelli, Germana; Biffoni, Mauro; Tomaselli, Giada; Baiocchi, Marta et al. (2008): Isolation and characterization of CD146⁺ multipotent mesenchymal stromal cells. In: *Experimental hematology* 36 (8), S. 1035–1046. DOI: 10.1016/j.exphem.2008.03.004.

Sosnoski, D. M.; Emanuel, B. S.; Hawkins, A. L.; van Tuinen, P.; Ledbetter, D. H.; Nussbaum, R. L. et al. (1988): Chromosomal localization of the genes for the vitronectin and fibronectin receptors alpha subunits and for platelet glycoproteins IIb and IIIa. In: *Journal of Clinical Investigation* 81 (6), S. 1993–1998.

Takahashi, Kazutoshi; Yamanaka, Shinya (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. In: *Cell* 126 (4), S. 663–676. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024.

Tremain, N.; Korkko, J.; Ibberson, D.; Kopen, G. C.; DiGirolamo, C.; Phinney, D. G. (2001): MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 19 (5), S. 408–418. DOI: 10.1634/stemcells.19-5-408.

Tse, William T.; Pendleton, John D.; Beyer, Wendy M.; Egalka, Matthew C.; Guinan, Eva C. (2003): Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. In: *Transplantation* 75 (3), S. 389–397. DOI: 10.1097/01.TP.0000045055.63901.A9.

Uder, Christiane; Brückner, Sandra; Winkler, Sandra; Tautenhahn, Hans-Michael; Christ, Bruno (2018): Mammalian MSC from selected species: Features and applications. In: *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 93 (1), S. 32–49. DOI: 10.1002/cyto.a.23239.

van Agthoven, Johannes F.; Xiong, Jian-Ping; Alonso, José Luis; Rui, Xianliang; Adair, Brian D.; Goodman, Simon L.; Arnaout, M. Amin (2014): Structural basis for pure antagonism of integrin $\alpha V\beta 3$ by a high-affinity form of fibronectin. In: *Nature structural & molecular biology* 21 (4), S. 383–388. DOI: 10.1038/nsmb.2797.

Varma, Maikel J. Oedayrajsingh; Breuls, Roel G. M.; Schouten, Tabitha E.; Jurgens, Wouter J. F. M.; Bontkes, Hetty J.; Schuurhuis, Gerrit J. et al. (2007): Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. In: *Stem cells and development* 16 (1), S. 91–104. DOI: 10.1089/scd.2006.0026.

Wagner, Wolfgang; Wein, Frederik; Seckinger, Anja; Frankhauser, Maria; Wirkner, Ute; Krause, Ulf et al. (2005): Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. In: *Experimental hematology* 33 (11), S. 1402–1416. DOI: 10.1016/j.exphem.2005.07.003.

Wang, Shihua; Qu, Xuebin; Zhao, Robert Chunhua (2012): Clinical applications of mesenchymal stem cells. In: *Journal of hematology & oncology* 5, S. 19. DOI: 10.1186/1756-8722-5-19.

Witwer, Kenneth W.; van Balkom, Bas W.M.; Bruno, Stefania; Choo, Andre; Dominici, Massimo; Gimona, Mario et al. (2019): Defining mesenchymal stromal cell (MSC)-derived small extracellular vesicles for therapeutic applications. In: *Journal of Extracellular Vesicles* 8 (1). DOI: 10.1080/20013078.2019.1609206.

Xie, Dong-Mei; Li, Yuan-Long; Li, Jie; Li, Qinglang; Lu, Guihua; Zhai, Yuansheng et al. (2019): CD51 distinguishes a subpopulation of bone marrow mesenchymal stem cells with distinct migratory potential: a novel cell-based strategy to treat acute

myocardial infarction in mice. In: *Stem cell research & therapy* 10 (1), S. 331. DOI: 10.1186/s13287-019-1439-y.

Yang, Zhou Xin; Han, Zhi-Bo; Ji, Yue Ru; Wang, You Wei; Liang, Lu; Chi, Ying et al. (2013): CD106 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells with unique immunomodulatory properties. In: *PloS one* 8 (3), e59354. DOI: 10.1371/journal.pone.0059354.

Yoshimura, Kotaro; Shigeura, Tomokuni; Matsumoto, Daisuke; Sato, Takahiro; Takaki, Yasuyuki; Aiba-Kojima, Emiko et al. (2006): Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. In: *Journal of cellular physiology* 208 (1), S. 64–76. DOI: 10.1002/jcp.20636.

Young, Henry E.; Black, Asa C. (2004): Adult stem cells. In: *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 276 (1), S. 75–102. DOI: 10.1002/ar.a.10134.

Zhang, Jieyuan; Guan, Junjie; Niu, Xin; Hu, Guowen; Guo, Shangchun; Li, Qing et al. (2015): Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis. In: *J Transl Med* 13 (1), S. 49. DOI: 10.1186/s12967-015-0417-0.

Zhang, Shipin; Chuah, Shang Jiunn; Lai, Ruenn Chai; Hui, James Hoi Po; Lim, Sai Kiang; Toh, Wei Seong (2018): MSC exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity. In: *Biomaterials* 156, S. 16–27. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.11.028.

Zhang, Wei; Ge, Wei; Li, Changhong; You, Shengguo; Liao, Lianming; Han, Qin et al. (2004): Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. In: *Stem cells and development* 13 (3), S. 263–271. DOI: 10.1089/154732804323099190.

Zhu, Heng; Guo, Zi-Kuan; Jiang, Xiao-Xia; Li, Hong; Wang, Xiao-Yan; Yao, Hui-Yu et al. (2010): A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. In: *Nature protocols* 5 (3), S. 550–560. DOI: 10.1038/nprot.2009.238.

Zimmermann, Herbert (1999): Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20(6), 231-236. DOI: 10.1016/S0165-6147(99)01293-6.

Zuk, Patricia A.; Zhu, Min; Ashjian, Peter; Ugarte, Daniel A. de; Huang, Jerry I.; Mizuno, Hiroshi et al. (2002): Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells^{SD}. In: *Molecular Biology of the Cell* 13 (12), S. 4279–4295. DOI: 10.1091/mbc.E02-02-0105.

12 Anhang

Tabelle 11: Übersicht Expression verschiedener Oberflächenmarker auf MSC

CD-Marker	% positive MSC	CD-Marker	% positive MSC
CD1a	0	CD183	34,4
CD1b	0,5	CD184 (CXCR4)	0
CD1c	0	CD193 (CCR3)	0
CD1d	0	CD195 (CCR5)	6,6
CD2	0	CD196	0
CD3	0	CD197 (CCR7)	0
CD4	0	CD200 (OX2)	39,2
CD5	0,3	CD200 R	0
CD6	0	CD201 (EPCR)	6,6
CD7	0	CD202b (Tie2/Tek)	0
CD8a	0	CD203c (E-NPP3)	0
CD9	13,9	CD205 (DEC-205)	0

CD10	88	CD206 (MMR)	0
CD11a	0	CD207 (Langerin)	0
CD11b	0,8	CD209 (CD-SIGN)	0
CD11b (activated)	0	CD210 (IL-10 R)	0
CD11c	0,8	CD213a	0
CD13	99,5	CD215 (IL-15Ra)	0
CD14	0	CD218a (IL-18Ra)	0
CD15 (SSEA-1)	0,3	CD220	0
CD16	0,6	CD221 (IGF-1R)	0
CD18	0,9	CD226 (DNAM-1)	0
CD19	0	CD229 (Ly-9)	0
CD20	0	CD231(TALLA)	6,2
CD21	0	CD235ab	5,1
CD22	0	CD243	0
CD23	0	CD244 (2B4)	0
CD24	0,6	CD245 (p220/240)	36,2

CD25	0	CD252 (OX40L)	0
CD26	67,7	CD253 (Trail)	0
CD27	0	CD254	0
CD28	0	CD255 (TWEAK)	0
CD29	99,5	CD257 (BAFF,BLYS)	18,7
CD30	0	CD258 (LIGHT)	0
CD31	0,6	CD261 (DR4, TRAIL-R1)	0
CD32	0	CD262 (DR5, TRAIL-R2)	0
CD33	0	CD263 (DcR1, TRAIL-R3)	0
CD34	4,6	CD266 (Fn14, TWEAK Receptor)	0
CD35	0	CD267 (TACI)	0
CD36	21,9	CD268 (BAFF-R)	0
CD38	0,5	CD270 (HVEM)	0
CD39	89,9	CD271	92,1

CD40	0	CD273 (B7-DC, PD-L2)	0
CD41	4,7	CD274 (B7-H1, PD-L1)	26,8
CD42b	0	CD275 (B7-H2, B7-RP1, ICOSL)	0
CD43	11,3	CD276	12,6
CD44	35,8	CD277	14,1
CD45	0	CD278 (ICOS)	0
CD45RA	0	CD279 (PD-1)	0
CD45RB	0	CD282 (TLR2)	0
CD45RO	0,6	CD284 (TLR4)	5,5
CD46	63,1	CD286 (TLR6)	0
CD47	100	CD290	0
CD48	0	CD294	0
CD49a	98,7	CD298	96,2
CD49c	4,9	CD300e (IREM-2)	0
CD49d	0	CD300F	0

CD49e	80,5	CD301	0
CD49f	4,1	CD303	0
CD50 (ICAM-3)	0	CD304	18,8
CD51	96,7	CD307	0
CD51/61	11,9	CD307d (FcRL4)	0
CD52	0	CD314 (NKG2D)	0
CD53	3,3	CD317	45,5
CD54	36,7	CD318 (CDCP1)	0
CD55	1,9	CD319 (CRACC)	0
CD56 (NCAM)	2,2	CD324 (E-Cadherin)	0
CD57	0	CD325	0
CD58	55,6	CD326 (Ep-CAM)	0
CD59	87,2	CD328 (Siglec-7)	0
CD61	0	CD334 (FGFR4)	0
CD62E	0	CD335 (NKp64)	0
CD62L	0	CD336 (NKp44)	0

CD62P (P-Selectin)	0	CD337 (NKp30)	0
CD63	96,6	CD338 (ABCG2)	0
CD64	0	CD340 (erbB2/HER-2)	0
CD66a/c/e	2,1	CD344 (Frizzeld-4)	0
CD66b	0	CD351	0
CD69	0	CD352 (NTB-A)	0
CD70	0	CD354 (TREM-1)	0
CD71	11,9	CD355 (CRTAM)	0
CD73	98,4	CD357 (GITR)	8,8
CD74	0,8	CD360 (IL-21R)	0
CD79b	2,9	b2-microglobulin	93,1
CD80	1,1	BTLA	0
CD81	97,4	C3AR	0
CD82	74,7	C5L2	21,1
CD83	9,7	CCR10	0
CD84	0	CLEC12A	0

CD85a (ILT5)	0	CLEC9A	0
CD85d (ILT4)	0	CX3CR1	0
CD85g (ILT7)	0	CXCR7	0
CD85h (ILT1)	0	d-Opiod Receptor	0
CD85j (ILT2)	0	DLL1	0
CD85k (ILT3)	0	DLL4	0
CD86	0	DR3 (TRAMP)	0
CD87	0	EGFR	45,9
CD88	0	erbB3/HER-3	0
CD89	0	FcεRIa	0
CD90 (thy1)	100	FcRL6	0
CD93	0	Galectin-9	0
CD94	0	GARP (LRRC32)	0
CD95	79,7	HLA-A,B,C	97,3
CD96	0	HLA-A2	69,3
CD97	0	HLA-DQ	0

CD99	0	HLA-DR	0
CD100	0	HLA-E	0
CD101 (BB27)	0	HLA-G	0
CD102	0	IFN-g R b chain	6
CD103	0	Ig light chain κ	0
CD104	0	Ig light chain λ	0
CD105	15,7	IgD	0
CD106	0	IgM	0
CD107a (LAMP-1)	70,7	IL-28RA	0
CD108	0	Integrin $\alpha 9\beta 1$	24
CD109	0	Integrin $\beta 5$	98,6
CD111	0	Integrin $\beta 7$	0
CD112 (Nectin-2)	21,5	Jagged 2	0
CD114	0	LAP	0
CD115	0	Lymphotoxin b Receptor	0
CD116	0	Mac-2 (Galectin-3)	0

CD117 (c-kit)	6,1	MAIR-II	0
CD119 (IFN-g Ra chain)	0	MICA/MICB	0
CD122	0	MSC (W3D5)	71,7
CD123	0	MSC(W5C5)	70,8
CD124	0	MSC (W7C6)	0
CD126 (IL-6Ra)	0	MSC and NPC (W4A5)	28,6
CD127 (IL-7Ra)	0	MSCA-1 (MSC, W8B2)	94,3
CD129 (IL-9R)	0	NKp80	0
CD131	0	Notch1	0
CD132	0	Notch2	0
CD134	0	Notch3	0
CD135	0	Notch4	0
CD137 (4-1BB)	0	NPC (57D2)	10,2
CD137L (4-1BB Ligand)	7,8	Podoplanin	0
CD138	0	Pre-BCR	0
CD140a	0	PSMA	0

CD140b	6,5	Siglec-10	0
CD141	0	Siglec-8	0
CD143	7,5	Siglec-9	0
CD144	0	SSEA-1	0
CD146	48,5	SSEA-3	62
CD148		SSEA-4	0
CD150 (SLAM)	0	SSEA-5	0
CD152	0	TCR g/d	0
CD154	0	TCR V β 13.2	0
CD155 (PVR)	0	TCR V β 23	0
CD156c (ADAM10)	24,1	TCR V β 8	0
CD158a/h	0	TCR V β 9	0
CD158b (KIR2DL2/L3,NKAT2)	0	TCR V δ 2	0
CD158d	0	TCR Vg9	0
CD158e1 (KIR3DL1, NKB1)	0	TCR V α 24-J α 18	0

CD158f	0	TCR V α 7.2	0
CD161	0	TCR α/β	0
CD162	0	Tim-1	0
CD163	0	Tim-3	0
CD164	77,4	Tim-4	0
CD165	0	TLT-2	0
CD166	0	TRA-1-60-R	0
CD167a (DDR1)	0	TRA-1-81	0
CD169	0	TSLPR	0
CD170 (Siglec-5)	0	Ms IgG1, κ (ITCL)	0
CD172a (SIRPa)	0	Ms IgG2a, κ (ITCL)	0
CD172b(SIRPb)	0	Ms IgG2b, κ (ITCL)	0
CD172g(SIRPg)	0	Ms IgG3, κ (ITCL)	0
CD178 (Fas-L)	0	Ms IgM, κ (ITCL)	0
CD179a	12,6	Rat IgG1, κ (ITCL)	0
CD179b	0	Rat IgG2a, κ (ITCL)	0

CD180 (RP105)	0	Rat IgG2b, κ (ITCL)	0
CD181 (CXCR1)	0	Rat IgM, κ (ITCL)	0
CD182 (CXCR2)	0	AH IgG (ITCL)	0

13 Publikationsverzeichnis

Svenja Hemmer, Nelli Baal, Gregor Bein, Philipp Nold, Cornelia Brendel, Holger Hackstein: „Identification of novel surface markers on naïve, freshly isolated human bone marrow-derived mesenchymal stem cells”
Jahrestagung des Excellence Cluster Cardiopulmonary System (ECCPS), 7-8 Juli 2016 in Bad Nauheim, Posterpräsentation

14 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 nachstehendspezifiziert. 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

15 Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben. Zunächst möchte ich mich natürlich bei Herrn Prof. Dr. Holger Hackstein für die Überlassung des Themas und die Aufnahme als Doktorandin bedanken. Stets mit neuen Ideen und konstruktiver Kritik förderte er maßgeblich meinen wissenschaftlichen Sachverstand.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau Dr. Nelli Baal bedanken, die mich während dieser Arbeit wissenschaftlich sehr kompetent betreute und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Durch unser freundschaftliches Verhältnis waren die langen Stunden im Labor stets eine Bereicherung.

Auch herzlich bedanken möchte ich mich bei Gabriela Michel, die immer den Überblick über alle Vorgänge im Labor und jederzeit für Fragen ein offenes Ohr hatte.

Ein Dankeschön geht nach Marburg an Dr.biol.hom. Philipp Nold für die Unterstützung bei der Versorgung mit Probenmaterial und den wissenschaftlichen Austausch, sowie an Gavin Giel, der im Verlauf die Versendung der Proben mit großer Flexibilität übernahm.

Allen anderen Mitarbeiterinnen- und Mitarbeitern des Instituts für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin Gießen sowie den Mitdoktorandinnen und –doktoranden möchte ich ein großes Dankeschön für die Unterstützung und den Erfahrungsaustausch in der langen Zeit aussprechen, namentlich Anne Lippitsch und Yuri Chukovetskyi.

Ich danke meinen Eltern, dass sie mir mein Studium ermöglicht und mich bei allen meinen Entscheidungen unterstützt haben und widme diese Arbeit Ihnen, meiner Schwester und meinen Freunden.

Zuletzt ein großes Dankeschön an meinen Partner Chen Cen; sein Humor, seine Geduld und Motivation in der Schreibphase haben die Erstellung dieser Arbeit vorangetrieben.