

Aus dem Universitären Herzzentrum
des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf

**Experimentelle Untersuchungen zur Abstoßung nach Transplantation von
mesenchymalen Stroma-Zellen**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der *Venia legendi*
für das Fachgebiet Regenerative Veterinärmedizin / Stammzellbiologie und -therapie
an der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

vorgelegt von
Dr. med. vet. Mandy Verona Vienna Stubbendorff
aus Hamburg

Hannover 2015

Tag der nichtöffentlichen wissenschaftlichen Aussprache: 11.12.2017

Der Drang, tätig zu sein, und Wunsch, zu Entstehen.

Der Homunculus.

Faust, der Tragödie zweiter Teil

Für Falk-Florian

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Verzeichnis der Abbildungen	9
Liste der verwendeten Publikationen	10
1. Einleitung	11
2. Fragestellung und Konzeption	20
3. Wissenschaftlicher Hintergrund	22
3.1 Isolierung von MSC aus primären Geweben	22
3.1.1 Isolierung von MSC aus Knochenmark für eigene Studien	22
3.1.2 Isolierung von MSC aus Nabelschnurgewebe	23
3.1.3 Isolierung von MSC aus Nabelschnurblut	23
3.1.4 Isolierung von MSC aus der Plazenta	24
3.1.5 Wharton`s Jelly MSC	24
3.2 Verwendete pluripotente Zellen	24
3.2.1 SCNT Zellen	25
3.2.2 Embryonale Stammzellen	25
3.3 Identifizierung und Charakterisierung von MSC	25
3.3.1 Morphologie	26
3.3.2 FACS Analyse charakteristischer Oberflächenantigene	26
3.3.3 Differenzierung	27
3.4 Proliferation und Migration	28
3.4.1 Proliferation	29
3.4.2 Migration	29
3.5 Adhäsionsmoleküle	30
3.6 IFN γ und TNF α Stimulierung	30
3.6.1 Entzündungsreaktion; IFN γ	31
3.6.2 Entzündungsreaktion; TNF α	31
3.7 Immunogenität, immunologisch relevante Oberflächenantigene	31
3.8 Immunmodulatorische Fähigkeiten	32
3.8.1 HLA-E und HLA-G	32
3.8.2 Indolamin 2,3-Dioxygenase	33
3.8.3 IL-10 und TGF β im ELISPOT	35
3.8.4 IL-10, TGF β und IL-2 im ELISA	35
3.9 Biolumineszenz Bildgebung	35

3.10	Herstellung Luziferase exprimierender MSC	36
3.11	Longitudinales Zellüberleben in der Maus im BLI	38
3.12	Zelluläre Immunantwort	39
3.13	Humorale Immunantwort	40
3.14	Angiogenese	41
3.14.1	Tube formation Assay	41
3.14.2	Chorion Allantios Membran Assay	42
3.14.3	Membran Antikörper Mikroarray	43
3.15	SCNT und mitochondrial getriggerte Abstoßung	43
3.15.1	In vivo Teratom Erzeugung	43
3.16	Heterotope Herztransplantation	44
3.17	Orthotope Aortentransplantation	44
4.	Ergebnisse	46
4.1	Vergleich von MSC aus Knochenmark verschiedenalter Spender	46
4.2	Vergleich von MSC aus Knochenmark mit MSC aus der Nabelschnur	51
4.3	Vergleich von MSC aus verschiedenen Kompartimenten der Extraembryonalen Gewebe	55
4.4	Abstoßung von Zellen mit empfängerfremden Mitochondrien	58
4.5	Abstoßung nach heterotoper Herztransplantation	60
4.6	Modell für abstoßungsassoziierte Transplantat-Vaskulopathie	63
5.	Übergreifende Diskussion	65
6.	Ausblick	76
7.	Zusammenfassung	77
8.	Summary	80
9.	Literaturverzeichnis	82
10.	Erklärung über den eigenen Anteil an den Publikationen	106
11.	Publikationen	110
12.	Anhang	113
12.1	Verwendete Publikationen	113
12.2	Danksagung	119

Abkürzungsverzeichnis

ALCAM	Activated leucocyte cell adhesion molecule
APC	Antigen präsentierende Zelle
ATP	Adenosin Triphosphat
BDF	B6D2F1; C57Bl/6J x DBA F1
BLI	Biolumineszenz Bildgebung (Bioluminescence Imaging)
BM	Knochenmark (bone marrow)
CAM	Chorion Allantois Membran
CB	Cord blood (Nabelschnurblut)
CCD	Charge-coupled Device
CD	Cluster of Differentiation
CFU	Colony forming units
CL	Cord lining (Nabelschnurgewebe)
CMV	Cytomegalovirus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSA	Donorspezifische Antikörper
EC	Endothelzellen
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	Enzyme-linked immunosorbent spot
ESC	Embryonale Stammzellen
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Flurescein isothiocyanate
GRO	Growth related oncogene
GvHD	Graft-versus-Host Disease
HD	High dose
HDL	High density lipoprotein
HLA	Human leucocyte antigen
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule-1
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN γ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin G

IgM	Immunglobulin M
IL4	Interleukin 4
IL10	Interleukin 10
iPS	Induzierte pluripotente Stammzellen
ISCT	International Society for Cellular Therapy
ISHLT	The International Society for Heart & Lung Transplantation
i.p.	intra peritoneal
i.v.	intra venös
JAK	Janus Kinasen
LAD	Left arteria descendens (Arteria descendens anterior sinistra)
LD	Low Dose
LDL	Low density lipoprotein
Luc	Luziferase
luc+	Luziferase transduziert
LVEF	Left ventricular ejection fraction
MHC	Major histocompatibility complex
MLR	Mixed lymphocyte reaction
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
MSC	Mesenchymale Stroma-Zellen
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NT-ESC	Nucleustransfer embryonic stem cells
NK	Natürliche Killerzellen
NOD	None obese diabetic
P	Plazenta
PBMC	Peripheral blood mononuclear Cells
PBS	Phosphate buffered saline
PROMETHEUS	The prospective randomized study of mesenchymal stem cell therapy in patients undergoing cardiac surgery
SCNT	Somatic Cell Nucleus Transfer

SPIO	Supermagnetic iron oxide
TGF β	Transforming growth factor β
T _H	T Helferzellen
Timp2	Tissue metalloproteinase inhibitor 2
TNF α	Tumor Nekrosefaktor α
TVP	Transplantat Vaskulopathie
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WB	Western Blot
WJ	Wharton's Jelly; Wharton Sulze

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1:	Schematische Darstellung der Differenzierung von MSC	27
Abb. 2:	Morphologie und Differenzierung von MSC	28
Abb. 3:	Scratch Assay	30
Abb. 4:	Reaktionsgleichung Oxidation von Tryptophan	33
Abb. 5:	Indolamin-2,3-Dioxygenase Molekül	34
Abb. 6:	Luziferase Virus Map	37
Abb. 7:	Verdünnungsreihe luc+ Zellen	37
Abb. 8:	Balb/C Mäuse im BLI	38
Abb. 9:	Schematische Darstellung ELISPOT	39
Abb. 10:	ELISPOT Assay	40
Abb. 11:	Tube Formation Assay	41
Abb. 12:	CAM Assay	42
Abb. 13:	Membrane Array	43
Abb. 14:	Adhäsions Assay	49
Abb. 15:	Einfluss des Lebensalters auf Stromazellen aus Fettgewebe	67

Liste der verwendeten Publikationen

- 1** **Stubbendorff M**, Neofytou E, Deuse T, Mattutat D, Lange C, Reichenspurner H, Robbins RC, Beygui R, Volk HD, Schrepfer S. Impact of donor age on biological and immunogenic properties of mesenchymal stromal cells. Med Res Arc. 2015 Jul 3; [epub ahead of print]
- 2** Deuse T, **Stubbendorff M**, Tang-Quan K, Phillips N, Kay MA, Eiermann T, Phan TT, Volk HD, Reichenspurner H, Robbins RC, Schrepfer S. Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. Cell Transplant. 2011;20(5):655-67.
- 3** **Stubbendorff M**, Deuse T, Hua X, Phan TT, Bieback K, Atkinson K, Eiermann TH, Velden J, Schröder C, Reichenspurner H, Robbins RC, Volk HD, Schrepfer S. Immunological Properties of Extraembryonic Mesenchymal Stromal Cells Derived from Gastational Tissue. Stem Cells Dev. 2013 Oct 1;22(19):2619-29.
- 4** Deuse T, Wang D, **Stubbendorff M**, Itagaki R, Grabosch A, Greaves LC, Alawi M, Grünewald A, Hu X, Hua X, Velden J, Reichenspurner H, Robbins RC, Jaenisch R, Weissman IL, Schrepfer S. SCNT-derived ESCs with mismatched mitochondria trigger an immune response in allogeneic hosts. Cell Stem Cell. 2015 Jan 8;16(1):33-8.
- 5** Deuse T, Hua X, Taylor V, **Stubbendorff M**, Baluom M, Chen Y, Park G, Velden J, Streichert T, Reichenspurner H, Robbins RC, Schrepfer S. Significant Reduction of acute cardiac allograft rejection by selective Janus Kinase-1/3 inhibition using R507 and R545. Transplantation 2012;94:695-702.
- 6** **Stubbendorff M**, Deuse T, Hammel A, Robbins RC, Reichenspurner H, Schrepfer S. Orthotopic Aortic Transplantation: A Rat Model to Study the Development of chronic Vasculopathy. J Vis Exp. 2010 Dec4;(46)

1. Einleitung

Regenerative, zellbasierte Therapien werden in Zukunft immer mehr an Bedeutung gewinnen, da die durchschnittliche Lebenserwartung der Menschen in den Industrienationen ansteigt und mit höherem Lebensalter Krankheitsbilder zunehmen, die mittels Zelltherapie behandelt oder gar geheilt werden können [Van der Kraan 2013, Sykova und Forostyak 2013]. Über die letzten Dekaden haben mesenchymale Stroma-Zellen (MSC) für regenerative Therapien immer mehr an Relevanz gewonnen [Caplan 2007, De Francesco et al. 2015, McGuirk et al. 2015, Lombardo et al. 2015]. MSC sind über vergleichsweise einfache Verfahren aus einer Vielzahl verschiedener Gewebe zu isolieren. Mit der Erweiterung der Möglichkeiten der Transplantation von Zellen rückt auch die Abstoßung als transplantationsbeeinträchtigender Prozess zunehmend in den Fokus [Ankrum et al. 2014].

Die Einstellung der Menschen in den Industrienationen gegenüber ihren Haustieren wie Hunden, Katzen und auch Pferden verändert sich zeitgleich dahingehend, dass besonders in Großstädten der Hund oder die Katze eine wichtige soziale Rolle bekleiden [Otterstedt 2012]. In den Großstädten der Industrienationen gibt es immer mehr Einpersonenhaushalte [StBA 2014] und die Zahl der „Companion Animals“ wächst. Tiere nehmen oft die soziale Stellung eines guten Freundes ein und werden als Familienmitglieder betrachtet, um die sich bestmöglich gekümmert werden muss [Otterstedt 2003]. Ferner gelten Tiere, im Besonderen Hunde, in einigen Kreisen als Prestigeobjekte und über die Wahl einer bestimmten Hunderasse definieren sich Besitzer nach außen. Diese Entwicklung führt dazu, dass der Tierhalter für die Therapie seines Schützlings humanmedizinische Standards wünscht [Seo et al. 2013, Yeates et al. 2013], das Tier soll die bestmögliche Behandlung erfahren. Das Pferd stellt nach wie vor ein Statussymbol dar, besonders Pferde die im Sport gute Leistungen erbringen, haben einen hohen Wert und dienen nach Ausscheiden aus dem aktiven Sport häufig als Zuchttiere. In absehbarer Zeit werden demgemäß auch Zellbasierte regenerative Therapien weiterhin Einzug in die Veterinärmedizin halten [Carrade und Borjesson 2013]. Ferner wird die weitere Beforschung der Stammzelltherapie in der Veterinärmedizin mittelfristig für neuartige Therapieansätze in der Humanmedizin beispielgebend sein [Muttini et al. 2012]. Die zugrundeliegenden

Mechanismen der Toleranz und Abstoßung sind in den Säugerspezies ähnlich, was eine Übertragbarkeit der Ergebnisse zwischen den Spezies bis zu einem gewissen Grad erlaubt. In der vorliegenden Schrift werden zugrundeliegende immunologische Mechanismen der Abstoßung an menschlichen mesenchymalen Stroma-Zellen und in Tiermodellen diskutiert, die auch in der regenerativen Veterinärmedizin von Relevanz sind. Die immunologischen Mechanismen, die im Organismus des Empfängers während der Abstoßung allogenen, also als Reaktion auf von einem genetisch fremden Spender transplantierte Zellen, ablaufen, entsprechen mechanistisch denen nach Transplantation solider Organe. Die Abstoßung solider Organe wird in einer hier eingefügten Arbeit am Beispiel der heterotopen Herztransplantation in der Ratte diskutiert [Deuse et al. 2012]. Wie die Zellen transplanterter Organe werden auch transplantierte Einzelzellen wie zum Beispiel MSC vom Empfängerorganismus als fremd erkannt und unterliegen einer in der Hauptsache T-Zell vermittelten Abstoßungsreaktion. Die Abstoßung von Zellen, die teilweise dem genetischen Profil des Empfängers entsprechen wird vorliegend in einer Arbeit diskutiert, in der SCNT (somatic cell nucleus transfer) Zellen im Mausmodell appliziert werden und eine T-Zell-basierte Abstoßung provozieren [Deuse et al. 2015]. Dieser Einfluss der T-Zellen in der Abstoßung wird in 5 der vorliegenden Arbeiten in verschiedenen Versuchen beleuchtet.

Da in der klinischen Anwendung ein zellbasierter Therapieansatz mit abstoßungsassoziierten Nebenwirkungen, sowie einer abstoßungsbedingten Funktionsminderung der transplantierten Zellen einhergehen kann, kommt vielfach eine Fremdspende von MSC für eine Therapie nicht in Betracht. Es wird für die Therapie auf eigene, autologe Zellen des zu behandelnden Patienten zurückgegriffen, die aus verschiedenen Kompartimenten des Körpers gewonnen werden können. Mit dem Wissen über die biologischen Eigenschaften dieser Zellen, wie Proliferationsrate, Migrationsfähigkeit und dem angiogenetischen Potential, die in den Vorliegenden Arbeiten als biologische Parameter betrachtet wurden, kann der Therapieansatz entsprechend angepasst und eine Prognose für den Heilungserfolg gestellt werden.

Aus dem Knochenmark gewonnene Stammzellen wurden schon vor mehr als 50 Jahren in regenerativen Therapien angewendet [Mathe et al. 1959]. MSC wurden in der letzten Dekade als vielversprechende Zellpopulation für Gewebereparation und

regenerative Therapien identifiziert [Caplan 2007]. Auch in der Veterinärmedizin erhalten MSC als therapierelevante Zellpopulation Einzug. Es handelt sich bei MSC um multipotente Zellen. Da die Differenzierungsmöglichkeiten multipotenter Zellen sehr begrenzt sind, besteht hier, anders als nach der Transplantation von pluripotenten embryonalen Stammzellen (ESC), keine Gefahr der Tumorbildung durch Entartung der transplantierten MSC. Ein signifikantes Tumorrisiko besteht bei Transplantation von Zellen die pluripotent sind, sich rasch teilen und für das Immunsystem des Empfängers nicht, oder nur begrenzt detektierbar sind. Pluripotente Zellen sind definiert als Zellen, die sich unendlich teilen können, also selbsterneuernd sind, sie müssen pluripotente Stammzell-Marker aufweisen und in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren können [Daley et al. 2009]. Die *in vivo* Entstehung von spezifischen benignen Tumoren, sogenannten Teratomen, nach Applikation in ein Versuchstier ist ein Parameter, welcher zur Charakterisierung von ESC herangezogen wird. Hierdurch soll ihre Pluripotenz nachgewiesen werden. Nach der Applikation von pluripotenten Zellen am Patienten kann demzufolge ein benigner Tumor in Form eines Teratoms auftreten, ein Teratom ist eine tumoröse Entartung, die Zellen aller drei Keimblätter beinhaltet [Tröbs et al. 2008]. Trotz seiner Benignität stellt ein solcher Tumor eine Gefahr für den Patienten dar, da er umliegendes Gewebe verdrängt und vom Empfänger über das Blut versorgt werden muss. Ferner ist eine Entwicklung von hormonell aktiven Zellen innerhalb eines Teratoms denkbar, die hier produzierten Hormone könnten in der Folge im Patienten zu schweren endokrinologischen Störungen führen. Das nicht bestehende Tumorrisiko bei gleichzeitiger Ausübung positiver parakriner Effekte durch MSC macht diese Zellgruppe demgemäß besonders interessant für zellbasierte Therapien.

Um einer Abstoßung der applizierten Zellen vorzubeugen werden zur heutigen Zeit mehrere Ansätze verfolgt, in denen versucht wird empfängereigene Zellpopulationen für eine Transplantation zu generieren. Im Jahr 2012 hat der Japanische Arzt und Stammzellforscher Herr Prof. Shin'ya Yamanaka den Nobelpreis für die Entwicklung einer neuen Zellpopulation, den iPS (induced pluripotent stem cells, induzierte pluripotente Stammzellen) erhalten. Bei iPS handelt es sich um pluripotente Zellen, die in ihren Eigenschaften vergleichbar mit embryonalen Stammzellen sind. IPS entstehen *in vitro* durch eine forcierte Rückentwicklung aus adulten Zellen. Ziel der Generierung von iPS ist die Entwicklung von sich schnell teilenden, pluripotenten Zellen von

Individuen, diese können dann entweder für Therapiezwecke differenziert werden oder *in vitro* für verschiedene Untersuchungen und die Forschung und Entwicklung von Medikamenten genutzt werden [Nakagawa et al. 2008].

Eine weitere Zellpopulation, welche genetisch dem Spender entspricht und pluripotent ist, sind die SCNT Zellen. In der SCNT-Technik ist ein Ziel die Verhinderung erblicher mitochondrialer Aberrationen, indem der Zellkern einer somatischen Zelle in eine fremde Oozyte, aus der der Nukleus zuvor entfernt wurde, verbracht wird. Hierdurch liegt nun eine komplette Zelle mit dem caryontischen Erbgut der Eltern vor, in der jedoch die Mitochondrien von einem gesunden Spender stammen [Reinhardt et al. 2013, Tachibana et al. 2013].

In ihrer Eigenschaft als multipotente Zellen können MSC ausschließlich entlang ihres eigenen Keimblattes, dem Mesoderm, in verschiedene Gewebe differenzieren, die aus demselben Keimblatt hervorgehen. Die Differenzierung in Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten ist für dieses Keimblatt beispielgebend und wird für die Charakterisierung von MSC herangezogen [Da Silva Meirelles et al. 2008, Caplan 2008, Stein und Lian 1993, Kasperk et al. 1995]. Die gezielte *in vitro* Differenzierung wurde auch in den hier diskutierten Arbeiten über MSC für die Charakterisierung durchgeführt.

Die Anwendung von MSC wurde bereits in der Veterinärmedizin für verschiedene Krankheitsbilder als therapeutischer Ansatz genutzt [Schnabel et al. 2013, Quimby und Dow 2015, Marx et al. 2015]. Es besteht eine Vielzahl an Indikationen für regenerative zellbasierte Therapien in der Pferdeklinik, hierbei stehen besonders Verletzungen und Traumata des Bewegungsapparates im Fokus. Es wird beispielsweise versucht die Knochenheilung nach Frakturen zu unterstützen [Carvalho et al. 2013, De Schauwer et al. 2013, Wang et al. 2013], Bänder und Sehnen zu festigen [Smith et al. 2013], Gelenkknorpel zu regenerieren [Bekkers et al. 2013] und eine Muskelheilung ohne Vernarbung herbeizuführen [Sassoli et al. 2012]. Gerade in der Pferdeklinik, in der Schädigungen des Bewegungsapparates als besonders gravierendes medizinisches Problem anzusehen sind und die Diagnose derartiger Verletzungen häufig in Faust ist, können MSC-basierte Therapien vielfach eine letzte therapeutische Alternative darstellen.

Bisher zeigten MSC in der Humanmedizin signifikante Wirksamkeit als Immunmodulatoren in der Graft-versus-Host-Disease (GvHD) [Le Blanc et al. 2004, Le Blanc et al. 2004], bei der Verlängerung des Überlebens von transplantierten Organen [Crop et al. 2011, Dahlke et al. 2009], sowie als Modulatoren bei Autoimmunerkrankungen [Urban et al. 2008]. Ferner wurden MSC zur Linderung verschiedener Herz- und Gefäßveränderungen, wie dem ischämischen Schaden des Herzmuskels nach Herzinfarkt [Mathieu et al. 2012, Lilyanna et al. 2013, Huang et al. 2013, Miettinen et al. 2012, Vela et al. 2009] und peripheren Venenerkrankungen [Lau et al. 2011, Weinberg et al. 2011, Katare et al. 2013, Gupta et al. 2013, Kim et al. 2006] eingesetzt. Besonders ein Einsatz nach einem Myokardinfarkt zur Unterstützung der Geweberegeneration stellt nach bisherigen Erkenntnissen eine vielversprechende Therapieoption in der Humanmedizin dar [Xia et al. 2014, Thakker und Yang 2014, Chou et al. 2014]. Mittels einer gezielten genetischen Veränderung von MSC, hin zu einer Zelle, die vom Empfängerimmunsystem nicht als fremd erkannt wird, versuchen einige Wissenschaftler eine Zellpopulation zu kreieren, die für jeden Empfänger passend ist. Hierzu werden beispielsweise Major Histocompatibility (MHC)-Moleküle herunterreguliert [Bari et al. 2015] oder Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) und andere Zytokine überexprimiert. Darüberhinaus finden ähnlich wie in der Veterinärmedizin, MSC in der Humanmedizin in der Therapie von Verletzungen des Bewegungsapparates ebenfalls Anwendung [Sassoli et al. 2014, Qin et al. 2014].

Eine große Stärke der MSC besteht in ihrer Fähigkeit sich für die Immunzellen des Empfängers zu einem gewissen Maße unsichtbar zu machen [Zimmermann und McDevitt 2013], dies wird in den vorliegenden Arbeiten zu MSC in Form der Messung tolerogener Eigenschaften der untersuchten Zellen gezeigt. Darüber hinaus besitzen MSC Mechanismen das Empfängerimmunsystem lokal zu unterdrücken, dies zeigt in den vorliegenden Arbeiten eindrucksvoll das IDO, welches von den MSC unter Einwirkung von Interferon γ (IFN γ) sezerniert wird. Weiterhin schütten MSC Zytokine aus, die regenerative Prozesse im Patienten unterstützen [Kim et al. 2013, Saether et al. 2013].

Nach bisherigen Erkenntnissen findet die Modulation der Immunantwort durch MSC mechanistisch im Wesentlichen durch die Inhibierung der Aktivierung, Proliferation sowie Funktion der T-Zellen statt [Rasmusson et al. 2005, Rasmusson et al. 2003,

Kampera et al. 2003]. In dem Prozess der Abstoßung applizierter allogener Zellen und transplanterter solider Organe spielen besonders die T-Zellen eine zentrale Rolle [Mehrotra et al. 2014, Emerson et al. 2014]. Die Involvierung der T-Zellen wird in den Vorliegenden, hier zusammengefassten Arbeiten unter Anderem durch die Messung der Ausschüttung der Zytokine IFN γ (T_H1 Antwort) und IL-4 (Interleukin 4, T_H2 Antwort) im Enzyme-Linked Immunosorbent Spot (ELISPOT) Assay visualisiert. Ferner inhibieren MSC die Proliferation der Natürlichen Killer (NK) Zellen sowie deren Zytotoxizität [Sotiropoulou et al. 2006, Pradier et al. 2011] und die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen [Asari et al. 2009]. Darüber hinaus können MSC eine Vielzahl von immunsuppressiven Mechanismen in Gang setzen, die die Bildung regulatorischer T-Zellen induzieren [English et al. 2009] und Dendritische Zellen in Richtung eines tolerogenen Phänotyps dirigieren [Wang et al. 2008]. Es wurde weiterhin ein durch MSC ausgelöster Veto-Effekt auf T-Zellen beschrieben, der in einer Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) *in vitro* nachgewiesen werden kann [Potian et al. 2003, Deuse et al. 2010]. Bei dem beschriebenen Veto-Effekt handelt es sich um einen Mechanismus, in dem unter dem Einfluss von IFN γ zunächst die Ausprägung immunogener Oberflächenmoleküle, besonders des Humanen Leukozyten Antigens ABC (HLA-ABC; HLA I; Major Histocompatibility Complex I; MHC I) und des assoziierten β_2 -Mikroglobulins, ansteigt, um bei einer weiteren Verschärfung des inflammatorischen Milieus unter fortlaufendem Anstieg von IFN γ wieder abzufallen. In einer hier eingeflossenen Arbeit wird der Veto-Effekt von MSC mit Hilfe der Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Analyse zur Bestimmung der Oberflächenantigene auf den MSC vergleichend dargestellt [Deuse et al. 2010]. Gleichzeitig findet unter dem weiteren Anstieg des IFN γ -Milieus eine steigende Ausprägung von tolerogenen Oberflächenmolekülen wie HLA-E und HLA-G statt, was dazu führt, dass der Selbstschutz der MSC in einem entzündlichen Milieu weiter ansteigt. Ein ähnlicher Anstieg vonIDO als tolerogen auf T-Zellen wirkendes Agens konnte unter Anhebung von IFN γ ebenfalls in einer der hier eingebundenen Arbeiten beobachtet werden [Deuse et al. 2010].

Die Anwendbarkeit von allogenen MSC-Therapien für die Gewebe- oder Organregeneration beruht auf dem Konzept, dass MSC eine Immunantwort im Sinne einer Abstoßung aktiv unterdrücken oder diese sogar verhindern [Griffin et al. 2010]. Der Erfolg allogener Zelltherapien stützt sich auf ein verbessertes Verständnis der

Parameter in den MSC - Immunsystem Interaktionen *in vivo* im Patienten [Griffin et al. 2010, Griffin et al. 2013].

Mit iPS und SCNT gelingt der Wissenschaft der Versuch einen Kompromiss für die syngene Anwendung adulter Zellen zu schaffen. Die SCNT-Technik ist nur bei somatischen Zellen möglich, und somit nicht praktikabel bei MSC. Die eingebundene Studie, in der SCNT Zellen im Mausmodell transplantiert werden, dient in der vorliegenden Schrift im Wesentlichen zum Proof of Principle der Abstoßung [Deuse et al. 2015]. Hier wird gezeigt, dass die mitochondriale Desoxyribonukleinsäure (DNA) ebenfalls eine Abstoßungsreaktion hervorruft, wenn diese dem Empfänger fremd ist.

Für allogene Anwendungen und für die Verwahrung autologer MSC in einer Zellbank steht die Ermittlung der am besten für eine Therapie geeigneten MSC-Quelle somit im Fokus. Die hier zusammengefassten Arbeiten befassen sich vergleichend mit der Ermittlung der für eine Transplantation relevanten Parameter von MSC verschiedener Genese [Deuse et al. 2010, Stubbendorff et al. 2013, Stubbendorff et al. 2015]. Bis heute konzentriert sich die Forschung der MSC zumeist auf aus dem Knochenmark isolierte Zellen (Bone Marrow MSC; BM-MSC), welche jedoch nicht zwingend als ideale Zellpopulation für Zellbasierte Therapien anzusehen sind. Die Qualität der BM-MSC kann sich mit steigendem Alter und zunehmender Morbidität des Spenders verringern, ferner nimmt die Anzahl der MSC im Knochenmark mit steigendem Spenderalter ab und ihr regeneratives Potential sinkt signifikant [Rao und Mattson 2001, Ayala-Lugo et al. 2011]. Als alternative Quellen für MSC im adulten Individuum gelten Fettgewebe [Jin et al. 2013, Park et al. 2013, Ong und Sugii 2013], peripheres Blut [Trivanović et al. 2013, Lyahyai et al. 2012], adenoides Gewebe [Lee et al. 2013], Mukosa und Gingiva [Zhang et al. 2012], sowie Leber und Milz [Beltrami et al. 2007, Hegyi et al. 2010].

In den letzten Jahren wurden zunehmend verschiedene Quellen für die Gewinnung von MSC aus schwangerschaftsassozierten Geweben beforscht. MSC wurden in großer Anzahl aus verschiedenen extraembryonalen Geweben wie Plazenta [Barlow et al. 2008], Nabelschnur-Gewebe [Kita et al. 2010, Deuse et al. 2010], Nabelschnur-Blut [Bieback et al. 2004] und Wharton´s Jelly [Wang et al. 2004] generiert, um nur einige zu nennen. Durch das junge chronologische Alter dieser Zellen zum Zeitpunkt der Gewinnung zeigen sie eine sehr geringe Inzidenz von Mutationen, ferner ist ihre

Gewinnung nicht-invasiv und sicher für Mutter und Kind [Bieback und Brinkmann 2010]. Eine nur schwach ausgeprägte Immunogenität der MSC aus schwangerschaftsassozierten Geweben wird zudem postuliert, was in einer der vorliegenden Arbeiten genauere Betrachtung findet [Stubbendorff et al. 2013]. Die postulierte schwache Immunogenität überrascht nicht, da eine Abstoßung des Fetus und der schwangerschaftsassozierten Gewebe nachteilig für das Fortbestehen sämtlicher Säugetierspezies wäre. Die genetischen Informationen der Zellen des Fetus stammen von Vater und Mutter, verschiedene Mechanismen verhindern die Abstoßung des Kindes durch die Mutter. Eine tragende Rolle in der Verhinderung der Abstoßung spielen auch Gewebe, die die Frucht umgeben, wie beispielsweise die Eihäute.

Die vorliegende Habilitationsschrift umfasst eine zusammenfassende Darstellung von Studien zur Charakterisierung des immunologischen, immunmodulatorischen und zellbiologischen Potentials von MSC verschiedener Genese, um eine Eignung für regenerative Therapien einschätzen zu können. Hierbei wurde besonders die Immunogenität und die immunmodulatorische Kapazität der MSC betrachtet, diese Parameter erlauben es, eine Prognose hinsichtlich der immunologischen Abstoßungsreaktion im Empfänger in ihrer Intensität im direkten Vergleich der Zellpopulationen zu stellen. Weiterhin wurden zellbiologische Parameter wie die Proliferation, Migration, Adhäsion und Angiogenese zur Beurteilung der MSC für Transplantationszwecke herangezogen. Ziel der vergleichenden Betrachtung von MSC verschiedener Genese war die Ermittlung der am besten für den Einsatz in regenerativen Therapien geeigneten Zellpopulation. Die MSC Population, welche am wenigsten immunogen, am stärksten immunmodulatorisch aktiv und am besten in ihren zellbiologischen Eigenschaften ist, könnte in der Zukunft genetisch moduliert werden, um ihre positiven Eigenschaften noch weiter zu verstärken. Ferner ist es unter Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse möglich, eine Einschätzung zu treffen, ob sich das Knochenmark als adultes Gewebe für eine autologe Spende von MSC im Kontext einer regenerativen Therapie eignet.

Für eine Komplettierung des Vergleiches der Abstoßung in der vorliegenden Schrift wird in einer weiteren Studie die Abstoßung von SCNT betrachtet, wobei jeweils komplett syngen transplantierte Zellen, Zellen mit syngenen Kern und allogenen

Mitochondrien, Zellen mit allogenen Kern und syngenen Mitochondrien und allogene murine Zellen auf die durch sie ausgelöste Abstoßungsreaktion hin untersucht wurden [Deuse et al. 2015]. SCNT sind pluripotent und daher nicht für regenerative Therapien einsetzbar, an den hier beschriebenen Versuchen lässt sich jedoch eindrucksvoll die Kaskade der Intensität der Abstoßung darstellen.

Da die Mechanismen der Abstoßung von applizierten Zellen, die der T-Zell-vermittelten Abstoßung in besonderem Maße, denen der Abstoßung nach Transplantation solider Organe gleichen, wird hier zusätzlich die Abstoßung von heterotop transplantierten Herzen in der Ratte als Vergleichsmodell beschrieben. Die Abstoßung eines transplantierten Herzen führt bei unzureichender Immunsuppression zu einer sehr starken, im Hauptteil T-Zell-vermittelten Reaktion. Die T-Zellen gelangen über den Blutweg in den Herzmuskel und infiltrieren diesen. Da das Herz als ein Organ mit hohem Sauerstoffbedarf von einer großen Anzahl an Blutgefäßen und fein verästelten Kapillaren durchzogen wird, kommen hier Oberflächenantigene der Zellen des Spenderorgans direkt mit den Empfängerimmunzellen in Kontakt.

Mit der Abstoßung solider Organe, wie hier exemplarisch dem Herzen, gehen starke Veränderungen im Gefäßsystem des Transplantates einher. Im Inneren der Blutgefäße besteht ein direkter Kontakt zu den im Blut befindlichen Akteuren der Abstoßung. So ist als ein Effekt der Abstoßung die Transplantat-Vaskulopathie (TVP) vielfach beschrieben [Hollis et al. 2015, Coutance et al. 2015] und findet in der vorliegenden Schrift in einem Modell der Aortentransplantation der Ratte besondere Erwähnung [Stubbendorff et al. 2010].

2. Fragestellung und Konzeption

In den vorliegend zusammengefassten Arbeiten sollen die von Spenderzellen und Spendergeweben ausgelösten Mechanismen, die zu einer Erkennung und Abstoßung durch das Empfängerimmunsystem nach einer Transplantation von MSC oder soliden Organen führen, beschrieben werden.

Mittels verschiedener Methoden wurden für die zugrundeliegenden Arbeiten MSC aus primären Geweben isoliert, anhand von Morphologie, Adhärenz zu Plastik, Identifikation eines Sets von für MSC relevanten Oberflächenantigenen mittels Durchfluss Zytometrie und Differenzierungsfähigkeit wurde nachgewiesen, dass es sich bei den vorliegenden, in den Studien verwendeten Zellen um MSC nach den Richtlinien der International Society for Cellular Therapy [Dominici et al. 2006] handelt. Anhand von verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Methoden konnten im Folgenden Erkenntnisse über die Immunogenität, immunmodulatorische Fähigkeiten und Abstoßung der MSC nach Transplantation gewonnen werden.

Die Ergebnisse, die im Rahmen der hier vorgestellten Studien generiert wurden, ermöglichen eine Aussage hinsichtlich der Eignung von MSC verschiedener Genese für die allogene Transplantation und damit für zellbasierte Therapien. Auch eine Prognose für autologe MSC Spenden kann durch die Ergebnisse der Untersuchung zellbiologischer Parameter in den vorliegenden Arbeiten getroffen werden. Ferner wird hier die Abstoßung von Zellen betrachtet, die nur zu einem Teil fremden Ursprungs sind, um zu demonstrieren, dass auch hier eine im Wesentlichen T-Zell getriebene Abstoßung stattfindet. Abschließend werden einige Mechanismen der Abstoßung transplanteder Zellen denen transplanteder solider Organe am Beispiel der heterotopen Herztransplantation in der Ratte gegenübergestellt. Um diese Abstoßungsreaktion in ihrer mechanistischen Entstehung noch genauer zu betrachten, wird ein Aspekt der Abstoßung solider Organe, die Transplantat-Vaskulopathie im Folgenden noch an einem Tiermodell vorgestellt.

Es wurden in den hier integrierten Publikationen folgende Problemstellungen bearbeitet:

- Isolierung von MSC aus primären Geweben
- Identifizierung und Charakterisierung von mesenchymalen Stroma-Zellen

- Erzeugung und Nutzung von SCNT
- Mitochondrienfärbung
- SCNT Zellkultur
- ES Zellkultur
- Proliferation und Migration
- Adhäsionsmoleküle als biologische Parameter für Extravasationskapazität
- Angiogenese
- IFN γ - und TNF α -Stimulierung zur Nachahmung eines entzündlichen Milieus
- Immunogenität, immunologisch relevante Oberflächenantigene
- Immunmodulatorische Fähigkeiten, tolerogene Oberflächenmoleküle und Zytokine
- Biolumineszenz Bildgebung
- Herstellung Luziferase exprimierender MSC
- Longitudinales Zellüberleben in der Maus in der Biolumineszenz Bildgebung
- Zelluläre Immunantwort
- Humorale Immunantwort
- Heterotope Herztransplantation
- Aortentransplantation

3. Wissenschaftlicher Hintergrund

3.1 Isolierung von MSC aus primären Geweben

MSC liegen in verschiedenen Geweben in unterschiedlicher Zahl vor. Ziel ist es, eine Isolierung möglichst purer MSC-Populationen zu erreichen. Es existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Protokolle zur Isolierung von MSC aus primären Geweben [Schrepfer et al. 2007]. Die Protokolle, in denen MSC aus Blut (z.B.: Nabelschnurblut) [Bieback et al. 2004] oder Knochenmark [Ramakrishnan et al. 2013] isoliert werden, beinhalten zumeist einen Schritt in welchem rote Blutzellen entweder mittels Lysepuffer zerstört oder via Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt werden, worauf ein Ausplattieren in Kulturflaschen folgt. Die weißen Blutzellen und deren Progenitorzellen werden nach und nach in Waschschritten und bei der Passagierung aus den MSC Kulturen entfernt. Bei der Isolierung von MSC aus zusammenhängenden Geweben wie beispielsweise Nabelschnurgewebe [Kita et al. 2010], Whartons Jelly [Batsali et al. 2013] oder Plazenta [Timmins et al. 2012, Ilic et al. 2011, Brooke et al. 2009], findet zunächst eine mechanische Zerkleinerung des betreffenden Gewebes statt, der ein enzymatischer Verdauungsschritt zur Vereinzelung der Zellen folgt. Hiernach werden die Zellen in Kultur gebracht und passagiert. Beschädigte oder tote Zellen werden so sukzessive durch Mediumwechsel und bei der Passagierung aus der Zellkultur entfernt.

3.1.1 Isolierung von MSC aus Knochenmark für eigene Studien

Für die Isolierung von Knochenmark von älteren, multimorbiden Patienten wurde nach einer Sternotomie im Zusammenhang mit einer Bypass-Operation austretendes Knochenmark steril mit einer 10ml Spritze, in der 1ml Kochsalzlösung mit 250 IE Heparin vorgelegt waren, aspiriert. Die Entnahme von austretendem Knochenmark und damit auch Zellen zu Studienzwecken im Rahmen der Operation wurde im Vorfeld durch die Patienten genehmigt und im Aufklärungsgespräch zur Operation gegengezeichnet. Das auf diese Weise gewonnene Knochenmark wurde zur Entfernung der roten Blutkörperchen mit Lysepuffer behandelt. In einem nächsten Schritt wurde die verbleibende Zellfraktion in Medium aufgenommen und in eine mit Gelatine beschichtete Kulturflasche verbracht. Ein Mediumwechsel wurde nach 24h vollzogen, hiernach wurde das Medium alle 48h gewechselt. Durch den

Mediumwechsel und durch das Passagieren der Zellkultur kam es zu einer mechanischen Entfernung der peripheren Blut mononukleären Zellen (PBMC), welche nicht adhärent an Plastik wachsen. Nach etwa zwei Wochen waren erste Kolonien spindelförmiger, an Plastik adhärent wachsender Zellen von MSC typischer Morphologie unter dem Mikroskop erkennbar.

Die Isolierung von MSC aus dem Knochenmark eines gesunden sechs Monate alten Säuglings wurde durch die Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. C. Lange vorgenommen [Lange et al. 2007]. Die Zellen wurden für die Verwendung in der vorliegenden Studie direkt aus der Lagerung in Flüssigstickstoff übernommen, aufgetaut und in Kultur gebracht.

3.1.2 Isolierung von MSC aus Nabelschnurgewebe

MSC aus Nabelschnurgewebe wurden durch Kollaboratoren vom National Institute of Stem Cell Technology in Singapur unter der Gruppenleitung von Herrn Prof. Dr. Phan isoliert [Kita et al. 2010]. Für die MSC-Gewinnung wurden Nabelschnüre von ausgetragenen, voll entwickelten, gesunden Föten im Rahmen der Geburt mit dem Einverständnis der Eltern gewonnen. Es folgte die Reinigung der Nabelschnüre von Blut, die Entfernung der Blutgefäße sowie des Wharton's Jellys. Das verbleibende Gewebe wurde zunächst mechanisch zerkleinert, über ein Verdauungsverfahren auf Enzymbasis wurden hiernach die Zellen vereinzelt. Die Zellen wurden in Kulturflaschen verbracht und mit Medium versorgt. In der Folge wurden die gewonnenen Zellen regelmäßig passagiert und so weiter aufgereinigt. Die Zellen wurden ausplattiert in Kulturflaschen bei 4°C oder in gefrorenem Zustand auf Trockeneis im Rahmen einer Kollaboration nach Hamburg versendet. Vor Ort wurden die Zellen entweder direkt in den Inkubator verbracht und in Kultur gehalten, oder aufgetaut und in Kultur gebracht.

3.1.3 Isolierung von MSC aus Nabelschnurblut

Die Isolierung von MSC aus Nabelschnurblut erfolgte durch die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. K. Bieback [Bieback et al. 2004]. Die Zellen wurden ausplattiert in Kulturflaschen übergeben. Sie wurden in den Inkubator verbracht und ein regelmäßiger Mediumwechsel wurde vorgenommen, durch Passagieren wurden diese dann expandiert.

3.1.4 Isolierung von MSC aus der Plazenta

Die Isolierung von MSC aus der Plazenta wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Atkinson im Mater Medical Research Institut in Australien vorgenommen [Timmins et al. 2012, Ilic et al. 2011, Brooke et al. 2009]. Die Zellen wurden in gefrorenem Zustand auf Trockeneis zu uns gesendet und im hiesigen Labor aufgetaut und in Kultur genommen.

3.1.5 Wharton`s Jelly MSC

Die Wharton`s Jelly MSC wurden von der Firma Lonza käuflich erworben. Die Zellen wurden in Kryomedium in gefrorenem Zustand auf Trockeneis geliefert und nach den Angaben der Firma Lonza aufgetaut und in Kultur gebracht.

3.1.6 MSC Zellkultur

Alle MSC wurden unter der Nutzung eines Basismediums wie z.B. DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium) unter Zugabe von 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Ein kompletter Mediumwechsel wurde alle zwei Tage vorgenommen.

3.2 Verwendete pluripotente Zellen

Embryonale Stammzellen (ESC) liegen in der frühen Embryonalentwicklung innerhalb der Blastocyste in Form einer inneren Zellmasse vor. Diese Zellen sind pluripotent und können zu Zellen aller drei Keimblätter ausdifferenzieren. Für die Gewinnung von ESC werden Zellen aus der inneren Zellmasse der Blastozyste entnommen und kultiviert. Für die Erzeugung von ESC in denen sich die DNA des Zellkerns von der DNA der Mitochondrien unterscheidet, wird der Kern einer Eizelle entnommen und durch den Kern einer somatischen Zelle ersetzt [Noggle et al. 2001]. Eine somatische Zelle ist dadurch charakterisiert, dass im Unterschied zu Zellen aus der Keimbahn keine Gameten, also geschlechtsbestimmende Zellen hervorgehen können. Der so erzeugte Oozyt mit neuem Zellkern wird zur Blastozyste herangereift, aus der nun ESC gewonnen werden können. Bei diesen Zellen handelt es sich um somatic cell nucleus transfer (SCNT) Zellen.

3.2.1 SCNT Zellen

Die Mäuse SCNT-Zellen wurden durch die Mitarbeiter von Herrn Prof. R. Jaenisch erzeugt [Markoulaki et al. 2008] und für die hier integrierte Arbeit zur Verfügung gestellt. Aus Oozyten superovulierter BDF1 (C57Bl/6J x DBA (Dark brown agouti) F1 Generation Hybridmaus) oder von superovulierten BALB/C Mäusen wurde in der Metaphase II der Zellkern entfernt. Zellkerne von BALB/C Mäusezellen wurden in die enukleierten Oozyten transferiert um NT-ESC beziehungsweise isoESC zu erzeugen [Eggan et al.]. Hier konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass allogene Mitochondrien in NT-ESC (nucleus transfer – embryonic stem cells), welche mit dem Empfänger nukleusidentisch sind, eine allogene adaptive Immunantwort hervorrufen. Diese Immunantwort richtet sich gegen die Mitochondrien und ist im Sinne einer Abstoßung zu sehen. In der integrierten Arbeit wurden die Zellen als NT-ESC bezeichnet, dies soll verdeutlichen, dass ein fremder Kern in den Zellen vorliegt.

3.2.2 Embryonale Stammzellen; isoESC

Die in der Studie als Pendant zu der Abstoßung von teilweise dem Empfänger fremden Zellen als Vergleichszellen genutzten ES Zellen von der Maus wurden ebenfalls in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. R. Jaenisch im SCNT Verfahren wie oben beschrieben erzeugt. Hier wurden jedoch isoESC produziert, indem die Eizelle und die somatische Zelle aus der der Kern gewonnen wurde von dem gleichen Inzucht-Mausstamm, der BALB/C Maus, stammen. Mit der Verwendung von isoESC, wurde sichergestellt, dass das Verfahren des SCNT keinen Einfluss auf die ausgelöste Abstoßungsreaktion im Experiment hat. Die isoESC wurden unserem Labor von der Arbeitsgruppe des Herrn Prof. Jaenisch für die Anfertigung der hier angeführten Arbeit [Deuse et al. 2015] zur Verfügung gestellt.

3.3 Identifizierung und Charakterisierung von mesenchymalen Stroma-Zellen

In Cytotherapy wurde 2006 eine Publikation über die Minimalkriterien zur Definition von MSC veröffentlicht [Dominici et al. 2006]. Hier wird von der International Society for Cellular Therapy (ISCT) vorgegeben, dass MSC unter standardisierten Kulturbedingungen adhärent an Plastik sein müssen und eine Spindelform aufweisen sollen. Auf der Zelloberfläche sollen sie Cluster of Differentiation (CD) 105, CD73,

CD44 und CD90 exprimieren, nicht aber CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79α oder CD19 und HLA-DR Moleküle aufweisen. Als weiteres Kriterium gilt die Differenzierungsfähigkeit zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten *in vitro*. Diese Minimalkriterien dienen der Identifikation von Zellen des mesenchymalen stromalen Typs und der besseren Vergleichbarkeit generierter Daten zwischen verschiedenen Laboren weltweit.

3.3.1 Morphologie

Die Zellen, mit denen in den hier zusammengefassten Studien gearbeitet wurde präsentieren sich ausnahmslos als spindelförmig und adhärent an Plastik wachsend. Die Morphologie ist in Abb.2 in der Durchsichtaufnahme (bright field) beispielhaft für aus dem Knochenmark isolierte MSC eines jungen und eines älteren Spenders gezeigt.

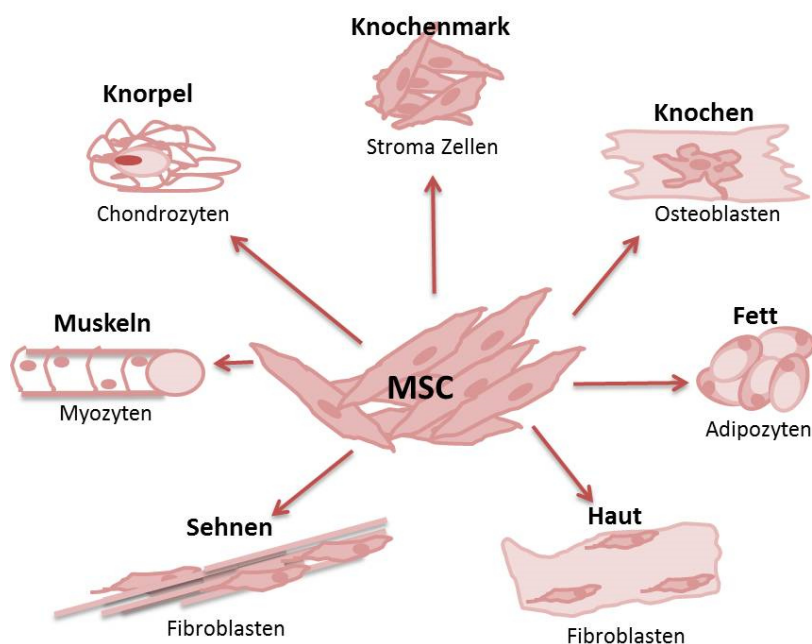
3.3.2 FACS Analyse charakteristischer Oberflächenantigene

Die Fluorescence Activated Cell Sorting (Durchfluss Zytometrie; FACS) Analyse beruht auf der gezielten Bindung konjugierter Antikörper an Zelloberflächenantigene, welche typisch für einen bestimmten Phänotyp sind. Bei diesen Molekülen an der Zelloberfläche handelt es sich unter Anderem um sogenannte Cluster of Differentiation (CD)-Moleküle, die eine Vielzahl an Aufgaben haben können. Im Falle von MSC in den hier zusammengefassten Studien wurde zur Charakterisierung aus den von der ISCT vorgeschlagenen Oberflächenmolekülen ein Set bestimmter Marker herangezogen. Die Zellen müssen dem folgend auf ihrer Oberfläche die MSC Marker CD90 und CD105 exprimieren und dürfen nicht die hämatopoetischen Marker CD34, CD45 und c-kit (CD117) aufweisen. Ferner sollen die MSC negativ für den Endothelzellmarker CD31 und positiv in der Ausprägung des Zell-Zell Interaktionsmoleküls CD44 sein.

Die Durchfluss Zytometrie ist eine laserbasierte biophysikalische Methode, bei der die Zellen in einem kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom an einem Laser vorbeigeführt werden, trifft der Laserstrahl auf Moleküle, welche das Licht emittieren, so wird das entstehende Signal detektiert und gemessen. Die Zellen selber sind nicht in der Lage Licht zu emittieren, ihre Oberflächenmoleküle werden bei dieser Methode spezifisch markiert. Das Laserlicht wird von Farbkonjugierten Antikörpern, welche an die gewünschten Oberflächenantigene auf den Zellen gebunden haben, emittiert.

3.3.3 Differenzierung

Die Differenzierung multipotenter Zellen erfolgt innerhalb ihres eigenen Keimblattes,



dem Mesoderm. Nach bisherigen Erkenntnissen ist eine Differenzierung von MSC nur in Zellpopulationen des Mesoderm möglich.

Abb.1: Exemplarische schematische Darstellung verschiedener Zelltypen in die MSC differenzieren können.

Zu den Zelltypen des Mesoderm zählen Knorpel, Skelettmuskel, Haut, Knochenmark, Fett, Fibroblasten, Sehnen und Bänder, sowie Knochen (Abb.1). Die gängigen Zelltypen, in die MSC zum Zwecke der Charakterisierung differenziert werden sind Osteozyten, Adipozyten und Chondrozyten (Abb.2). Für die Differenzierung gibt es eine Vielzahl verschiedener Protokolle, in denen die Zellen durch Mechanische Reize und/oder Zusatz von Zytokinen dazu gebracht werden zu einem bestimmten Zelltyp zu differenzieren [Stein und Lian 1993, Da Silva Meirelles et al. 2008, Caplan 2008]. Die MSC wurden für die hier zusammengefassten Studien zunächst in einer definierten Anzahl ausplattiert um dann unter dem Einfluss der im Differenzierungsmedium befindlichen Zytokine zu einem bestimmten Zelltyp heranzureifen. Osteozyten sind gekennzeichnet durch ihre Kalzifizierung, die sich mit Alizarin Rot deutlich anfärben lässt [Kasperk et al. 1995]. Chondrozyten liegen in dem angewendeten Protokoll als Sphären vor, die prallelastisch sind und sich im Paraffin-Gewebeschnitt mit Toluidinblau anfärben lassen. Adipozyten bilden charakteristische Fettvakuolen, die sich angefärbt mit Öl Rot O traubenförmig rot in den Zellen darstellen.

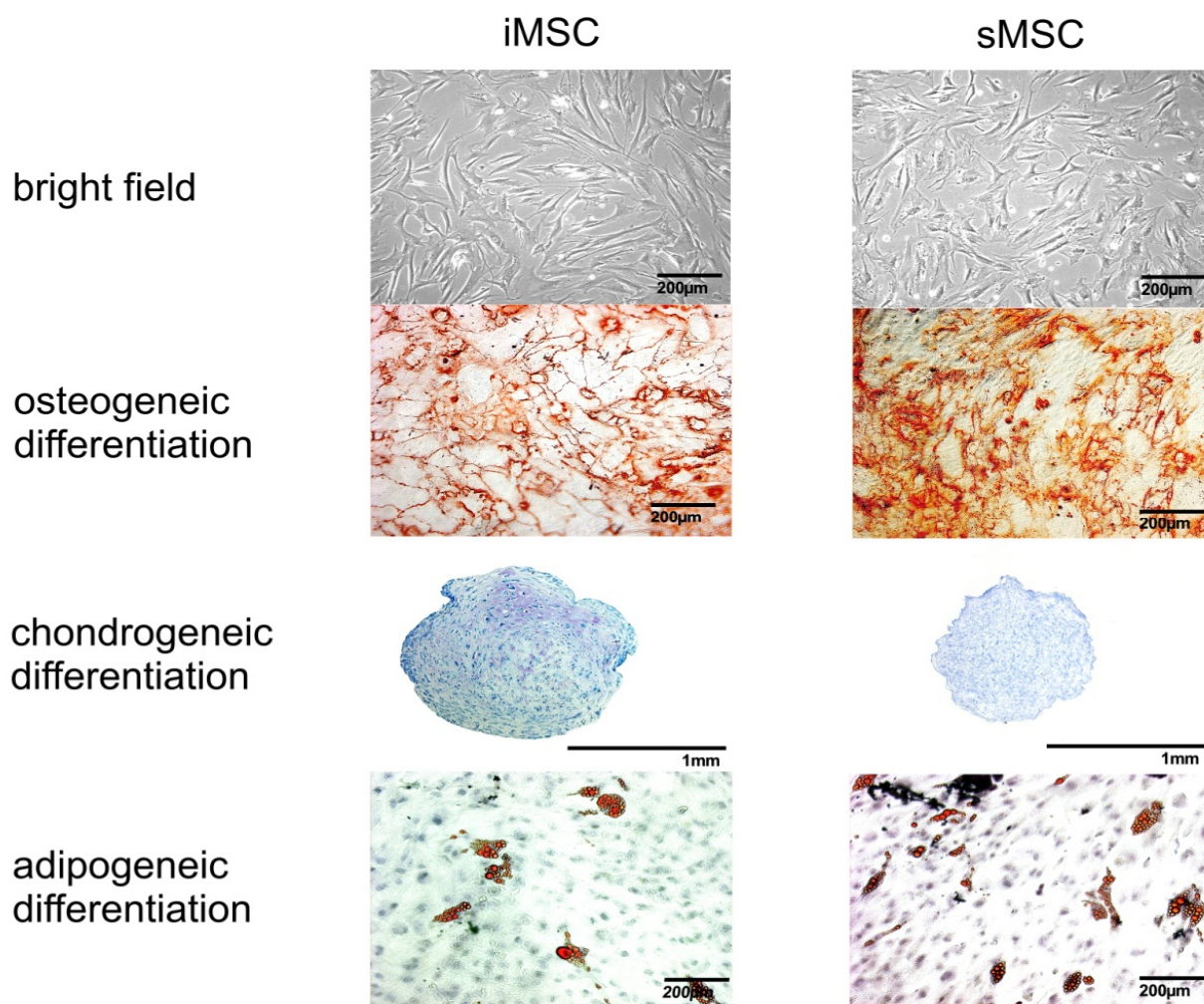


Abb. 2: Morphologie und Differenzierung von MSC (Stubbendorff et al. Medical Research Archives 2015) In der Durchlichtmikroskopischen Ansicht zeigen sich die Zellen in Kultur spindelförmig und adhären an Plastik. Die zu Osteozyten differenzierten Zellen zeigen in einer Alizarin Rot Färbung eine Anfärbung der kalzifizierten Strukturen. Chondrozyten wurden mit Toluidinblau gefärbt. Adipozyten wurden mit Öl Rot O gefärbt, welches die Lipide in den Fettvakuolen der Zellen anfärbt.

3.4 Proliferation und Migration

Sind die Zellen appliziert, wirkt sich eine gute Migrationsfähigkeit positiv auf das Erreichen des Zielgewebes aus, ferner sorgt eine hohe Proliferationsrate dafür, dass abgestorbene Zellen ersetzt werden. Bei einer allogenen Zelltransplantation ohne Immunsuppression wird langfristig das Immunsystem des Empfängers alle applizierten Zellen vernichten.

Nach Applikation der MSC in den Patienten soll für die Wirksamkeit mindestens eine annähernd der applizierten Menge entsprechende Zellzahl möglichst lange vorliegen.

Hierbei ist es wichtig zu beachten, dass schon im Rahmen der Applikation Stress auf die Zellen ausgeübt wird, der zu ihrem direkten Niedergang führen kann. Zum einen erleben die Zellen Stress bei dem Herauslösen aus der Kulturflasche und beim Vereinzeln mit Trypsin, weiterhin führen Scherkräfte, denen die Zellen in der Kanüle während der Applikation mittels Injektion ausgesetzt sind, zu Verlusten. Im Gewebe in das die Zellen appliziert werden herrscht kein optimales Umfeld für die MSC, was ebenfalls zum Absterben von Zellen führt. Die Zellen werden in Flüssigkeit gelöst in das Zielgewebe verbracht, was dazu führt, dass ein direkter Kontakt mit Empfängerzellen im Gewebe zunächst nicht stattfindet, dieser Zell-Zell Kontakt ist jedoch in den ersten Stunden nach Applikation hilfreich um im Gewebe anzuwachsen. Um die hier genannten negativen Einflussfaktoren auf die Zellen zu verringern wird an geeigneten Gerüstsubstanzen zur Co-Transplantation geforscht, die der Zelle ein geeigneteres Milieu geben sollen.

3.4.1 Proliferation

In den hier vorgelegten Studien wurde die Proliferation der MSC mittels MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid) colorimetrisch im ELISA Reader bestimmt. Im MTT Assay wird das MTT durch lebende Zellen zu Formazan verstoffwechselt, welches eine lila Farbe hat, auf diese Weise findet ein messbarer Farbumschlag statt, der proportional zur vorliegenden Anzahl an vitalen Zellen an Intensität zunimmt.

3.4.2 Migration

Um die Migrationsfähigkeit der MSC zu vergleichen, wurde ein sogenannter Scratch Assay durchgeführt. Die Zellen wurden als konfluenter Zellrasen kultiviert, es wurde mittels einer Pipettenspitze eine Kratzwunde zugefügt [Poujade et al. 2007]. Das Medium mit darin enthaltenen frei schwimmenden abgekratzten Zellen wurde durch neues ersetzt, wonach die MSC für eine definierte Zeit im Brutschrank unter Zellkulturbedingungen inkubiert wurden. Vor der Inkubation wurden Bilder von der frisch zugefügten Kratzwunde gemacht (Abb.3 links), welche als Ausgangswert Verwendung fanden. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen erneut fotografiert (Abb. 3 rechts) und die in den Kratzer eingewanderten MSC wurden ausgezählt.

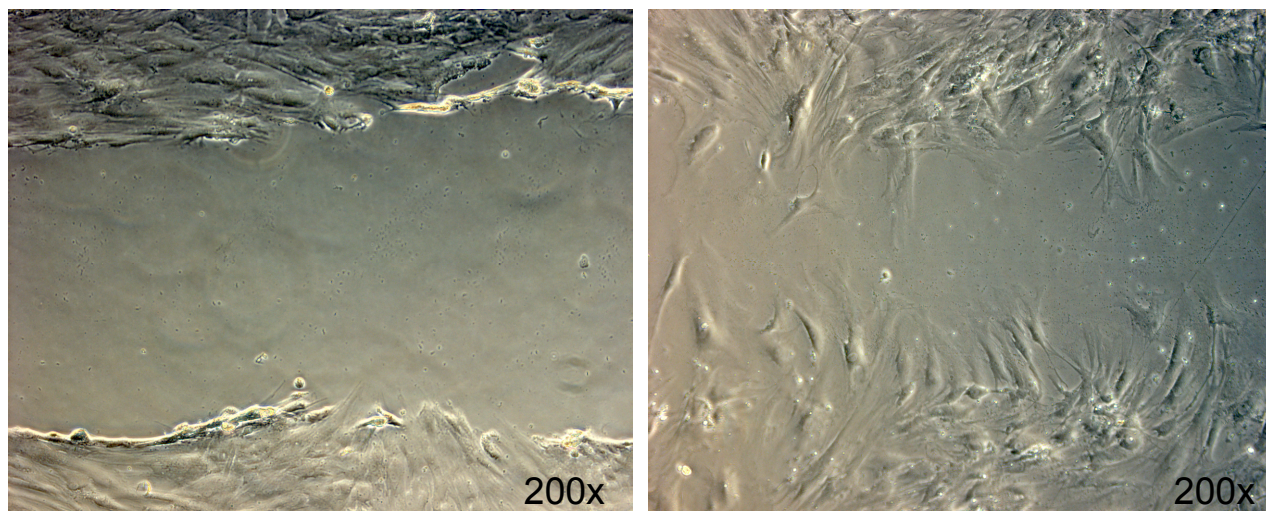


Abb. 3: Scratch Assay. Das linke Bild zeigt die frisch zugefügte Kratzverletzung des konfluenten Zellrasens, auf dem rechten Bild sind in den Kratzer migrierte Zellen nach Ablauf der Beobachtungszeit zu erkennen.

3.5 Adhäsionsmoleküle als biologische Parameter für Extravasationskapazität

Eine gängige Applikationsroute in einer zellbasierten Therapie ist die intra venöse (i.v.) Applikation [Gutiérrez-Fernández et al. 2013, Di et al. 2012], die MSC sollen dann in einem als „Homing“ bezeichneten gezielten Wanderungsprozess ihr Zielgewebe erreichen [Sohni und Verfaillie 2013, Yagi et al. 2010]. Während einer Inflammation werden über Tumor Nekrose Faktor alpha ($\text{TNF}\alpha$) Adhäsionsmoleküle der Gefäßendothelzellen (EC) heraufreguliert, also in höherer Anzahl auf der Zelloberfläche exprimiert und getragen. MSC, die an diese Adhäsionsmoleküle binden, können eine Extravasation durchführen und in das betroffene umliegende Gewebe einwandern. Weiterhin wird im Verlauf einer Entzündungsreaktion durch T-Zellen $\text{IFN}\gamma$ produziert, welches ebenfalls einen erheblichen Einfluss auf die Eigenschaften von MSC hat.

3.6 $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ Stimulierung zur Nachahmung eines entzündlichen Milieus

Während einer Entzündungsreaktion laufen lokal im betroffenen Gewebe viele Prozesse ab, in denen Zellbotenstoffe (Zytokine) produziert werden. Diese Zytokine verändern lokal im Gewebe das Milieu, zu ihnen zählen unter Anderem $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$. Durch gezielte Zugabe von Zytokinen *in vitro* in die Zellkultur kann eine Entzündungsreaktion immittiert werden, die die Zellen zu Reaktionen wie im

entzündlichen Gewebe veranlasst. So werden zum Beispiel verschiedene Stoffe durch die MSC sezerniert.

3.6.1 Entzündungsreaktion; IFN γ

Die Einleitung zellbasierter Therapien findet infolge von Grunderkrankungen statt, die entweder degenerativ oder entzündlich sein können. Auch nach Gewebeschädigung, wie etwa nach einem Trauma, kommt es lokal zu einer Entzündungsreaktion. Die Zellapplikation stellt einen Eingriff dar, der ebenfalls in einer lokalen Entzündungsreaktion münden kann. Im Zuge einer Entzündungsreaktion kommt es lokal zu einem Anstieg von IFN γ , einem Zytokin, welches unter Anderem von T-Zellen produziert wird und empfindliche Veränderungen an allen umliegenden Zellen hervorruft. Die applizierten MSC sehen sich mit einem Anstieg von IFN γ konfrontiert, dieser Zytokineinfluß verändert die immunologischen und immunmodulatorischen Eigenschaften der MSC und ihre Expression von Oberflächenmolekülen messbar. IFN γ lockt zudem verschiedene Lymphozytenpopulationen an den Ort der Gewebedistribution.

3.6.2 Entzündungsreaktion; TNF α

TNF α ist ein Adipokin, welches unter Anderem an systemischen Entzündungsreaktionen beteiligt ist, es gehört zu den Zytokinen, die an der Akute Phase Reaktion mitwirken. TNF α wird hauptsächlich von Makrophagen, aber auch von CD4 $^{+}$ Lymphozyten sowie NK Zellen produziert. Es führt unter Anderem dazu, dass auf Gefäßendothelzellen die Adhäsionsmoleküle heraufreguliert werden, dies vereinfacht eine Anhaftung von Zellen aus dem Blut an Gefäßendothelzellen, was wiederum eine Extravasation dieser Zellen begünstigt.

3.7 Immunogenität, immunologisch relevante Oberflächenantigene

Je weniger immunogen eine Zelle ist, desto besser kann sie den immunologischen, zellvermittelten und humoralen Mechanismen der Abstoßung nach Applikation entkommen. Nach Zellapplikation sind in hohem Maße T-Zellen an der Abstoßungsreaktion beteiligt. Die immunologisch relevanten Oberflächenantigene auf den MSC spielen in ihrem Ausprägungsmuster und ihrer Häufigkeit eine bedeutende Rolle für die Erkennung als fremd durch das Empfängerimmunsystem. Um eine Aussage über die Immunogenität der MSC und eine damit in Verbindung stehende

Intensität der Abstoßungsreaktion treffen zu können, wurde für die hier gezeigten Studien die Expression immunologisch relevanter Zelloberflächenmoleküle bestimmt. Der Immunphänotyp der MSC wurde mittels FACS Analyse ermittelt, hierbei wurde die Ausprägung des MHC I, in humanen Zellen als HLA-ABC oder HLA I bezeichnet und das assoziierte β_2 -Mikroglobulin, betrachtet. MHC I präsentiert den T-Zellen zytosolische Proteinfragmente aus dem Inneren der Zelle nach außen. MHC I und β_2 -Mikroglobulin wurden im ruhenden Zustand und nach Stimulation mit IFN γ zur Nachahmung einer Entzündungsreaktion bestimmt.

Weiterhin wurde auch MHC II, in humanen Zellen als HLA-DR oder HLA II bezeichnet, welches extrazelluläre Antigene präsentiert, auf nativen und mit IFN γ stimulierten MSC bestimmt.

Die untersuchten Costimulatorischen Marker CD40, CD80 und CD86 geben Signale für die T-Zell-Aktivierung und das T-Zell-Überleben. Auch diese Marker wurden naiv und nach IFN γ Stimulierung bestimmt.

3.8 Immunmodulatorische Fähigkeiten, tolerogene Oberflächenmoleküle und Zytokine

Eine Zelle, die im Wesentlichen tolerogene Parameter ausprägt, kann sich vor den Immunzellen des Empfängers verstecken. Ist eine Zelle in der Lage immunmodulatorisch zu agieren, so kann sie sich aktiv gegen die Attacke durch das Empfängerimmunsystem zur Wehr setzen, indem sie Einfluss auf verschiedene Zellen des Empfängerimmunsystems, wie zum Beispiel T-Zellen nimmt und diese hemmt.

3.8.1 HLA-E und HLA-G

Einige tolerogene Oberflächenmoleküle werden auf den MSC exprimiert, hierzu zählen Human Leucocyte Antigen-E (HLA-E) und HLA-G, die beide unter dem Einfluss von IFN γ auf MSC eine Heraufregulierung, also eine höhere Häufigkeit in ihrer Exprimierung pro Zelle, erfahren. HLA-E hat einen inhibitorischen Effekt auf die zytotoxischen Abläufe der NK-Zellen [Braud et al. 1998]. HLA-G hat einen direkten inhibitorischen Effekt auf NK-Zellen [Lash et al. 2010] und über die herabregulierende Wirkung auf HLA-A und HLA-B einen protektiven Effekt gegenüber Zytotoxischen T-Zellen [Iams et al. 2004]. Mittels ihrer tolerogenen Moleküle kann die MSC sich einer Attacke durch NK-Zellen partiell entziehen, indem sie sich für die NK-Zelle annähernd

unsichtbar macht und deren Wirkweise sogar unterdrückt. Die MSC wird so nicht als Bedrohung wahrgenommen und ihre Anwesenheit wird durch die NK-Zelle toleriert.

3.8.2 Indolamin-2,3-Dioxygenase

Ein weiteres relevantes Enzym stellt das Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) dar, es wird in großen Mengen während einer Gravidität von den maternalen Geweben, den Eihäuten sowie dem Fetus selber produziert [Entrican et al. 2009]. Bei einer Trächtigkeit wird der Fetus vom Immunsystem der Mutter als fremd identifiziert da er zu 50% genetisch dem Vater entspricht, welcher immunologisch zur Mutter ein HLA fremder Spender ist. Der Körper der Mutter reagiert nun mit einer massenhaften Entsendung von T-Zellen zum Ort der Trächtigkeit. Diese Entsendung resultiert in einer ubiquitären Häufung von T-Zellen rund um den Fetus. Die entsandten T-Zellen sind noch nicht aktiviert, sie erreichen den Fetus als ruhende Zellen. Für eine Aktivierung der ruhenden T-Zellen wird die Aminosäure Tryptophan essentiell benötigt. IDO oxidiert Tryptophan zu N-Formyl-L-Kinurenin (Abb.4), womit den T-Zellen die Grundlage zur Aktivierung entzogen wird [Lee et al. 2013].

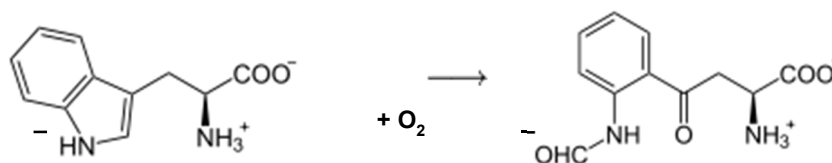


Abb. 4: L-Tryptophan wird durch IDO zu N-Formyl-L-Kinurenin oxidiert.

Die T-Zellen befinden sich nun zwar am Ort des Geschehens, ihnen steht jedoch kein Tryptophan in ausreichender Menge zur Verfügung um aktiviert zu werden. Das Resultat ist ein massenhaftes Vorhandensein von ruhenden T-Zellen, die keine Reaktion im Sinne einer Abstoßung durchführen können. Die Gravidität bleibt trotz der genetischen Unterschiede zwischen Mutter und Vater und damit zwangsläufig auch zwischen Mutter und Fetus, bestehen.

MSC können in einem entzündlichen Milieu mit der Sekretion von IDO reagieren. Hier beruht die Strategie der MSC nicht darauf ignoriert und so in ihrer Anwesenheit toleriert zu werden, sondern in einer Verhinderung der Armierung der T-Zellen. Die MSC unterbrechen mit der lokalen Distribution von IDO die Aktivierung der vor Ort

befindlichen T-Zellen. Die T-Zellen sind zwar lokal im Gewebe vorhanden, befinden sich aber weiterhin in einem ruhenden Zustand und können die MSC nicht abstoßen.

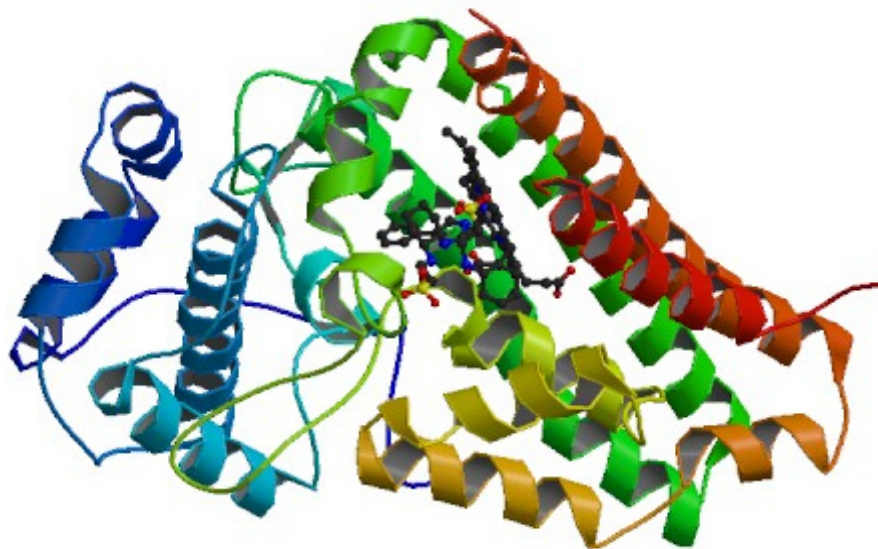


Abb. 5: Struktur des IDO Moleküls, welches von den MSC unter IFN γ Einfluss sezerniert wird. Die Abbildung der IDO Molekülstruktur wurde übernommen von Wikipedia (http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/d/dd/PBB_Protein_INDO_image.jpg)

In einem entzündlichen Milieu, wie es am Ort der Erkrankung bzw. an der Applikationsstelle der Zellen vorherrscht, zeichnen sich MSC durch eine erhöhte Sekretion von IDO aus. Die Sekretion von IDO wird durch IFN γ forciert, wobei eine direkte Korrelation zwischen IFN γ Menge und sezerniertem IDO besteht, solange es sich um physiologische Mengen von IFN γ handelt [Deuse et al. 2010]. Diese Reaktion der MSC ist auch Teil des als Veto-Effekt benannten Vorgangs, bei dem die MSC bei steigendem entzündlichem Milieu eine bessere Toleranz erfahren [Deuse et al. 2010]. Somit schützen sich die MSC in einem entzündlichen Milieu selber in gewissem Maße vor der Abstoßung durch T-Zellen.

Die Sekretion von IDO wurde in den vorliegenden Arbeiten mittels Western Blot (WB) bestimmt. Hierzu wurden zunächst Zellen nativ und für 48h mit IFN γ stimuliert kultiviert, diese wurden dann mittels Trypsin aus den Kulturflaschen gelöst und vereinzelt, um ein Zellpellet zu erhalten wurden die in der Flüssigkeit flotierenden Zellen abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun mit RIPA-Puffer aufgenommen und lysiert, so dass im Überstand freies Protein vorlag. Nach Bestimmung des Gesamtproteins

mittels Pierce Protein Test wurde für jedes zu messende Lysat eine definierte Proteinmenge pro Tasche auf den WB aufgetragen. Unter Verwendung eines spezifischen IDO-Antikörpers konnte dann im WB eine IDO-Bande dargestellt, gemessen und quantifiziert werden.

3.8.3 IL-10 und TGF β im ELISPOT

Im Zusammenhang mit der Zellapplikation kommt es weiterhin zu einer Sekretion von Interleukin 10 (IL-10), welches Zytokine, MHCII Antigene und costimulatorische Moleküle auf Makrophagen herabreguliert. Außerdem wird von verschiedenen Zellen Transforming Growth Factor beta (TGF β) sezerniert, welches unter Anderem die Proliferation und Differenzierung von Zellen kontrolliert. Entzündliche Stimuli steigern die Freisetzung des anti-inflammatorischen Zytokins TGF β .

3.8.4 IL-10, TGF β und IL-2 im ELISA

Für den Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde konditioniertes Medium von unstimulierten und mit IFN γ stimulierten MSC gewonnen. Es wurden ELISA Platten verwendet, die jeweils mit einem Antikörper gegen das gesuchte Zytokin beschichtet waren, diesen wurde das verdünnte konditionierte Medium zugefügt. Nach einer Inkubationsphase wurden mehrere Waschschrte durchgeführt und es wurde ein enzymtragender spezifischer Antikörper zugefügt. Nach einer weiteren Inkubation und weiteren Waschschrten wurde ein Substrat zugefügt, welches durch das Enzym zu einem Farbumschlag gebracht wurde. Die Auslesung des ELISA erfolgte colorimetrisch in einem ELISA Reader.

3.9 Biolumineszenz Bildgebung

Die Biolumineszenz Bildgebung (Bioluminescence imaging; BLI) basiert auf einer hochsensitiven Messung von *in vivo* emittiertem Licht. Das Lichtsignal wird durch transgene Expression lumineszierender Enzyme (Luziferase, Luc) oder passiv durch äußere Anregung fluoreszenter Proteine erzeugt. Mittels einer hochempfindlichen Charge-coupled Device (CCD)-Kamera wird das für das menschliche Auge nicht wahrnehmbare emittierte Lichtsignal detektiert und auf ein Bild des gemessenen Objektes projiziert.

Reporter Gene Imaging ermöglicht *in vivo* die Dokumentation von Anzahl, Lokalisation, Proliferation und Zelltod transplanterter MSC. Hierzu wird der Adenosin Triphosphat (ATP)-Gehalt der Zellen als Photonen pro Sekunde nicht-invasiv mittels eines Luziferase Detektionssystems gemessen. Die Entstehung des Lichtsignals ist ATP-abhängig, somit erlischt das Signal mit dem Absterben der Zelle, es kann nicht auf andere Zellen übergehen. Diese Methode erlaubt eine beliebig häufige Wiederholung der Messungen im gleichen Tier und ist signifikant sensitiver als herkömmliche Methoden wie zum Beispiel die Histologie oder die Nutzung von Eisen Nanopartikeln. Das entstehende Lichtsignal wird maschinell quantifiziert und anschließend als Photonen pro Sekunde (total flux) und als $\text{Log}^{[\text{photons/sec}]}$ dokumentiert.

Die Transduktion der MSC mit Luziferase über einen lentiviralen Vektor ermöglicht ein tatsächliches longitudinales Verfolgen der applizierten Zellen. Anders als bei der Verwendung von Supermagnetic Iron Oxide (SPIO) Nanopartikeln, kann das Signal nicht übertragen aber bei einer Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben werden. Für die Bestimmung der SPIO muss eine Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt werden, hier wird anders als bei dem Luziferase-Lichtsignal keine aktive Beteiligung der Zelle benötigt. Es wird lediglich ein Vorhandensein der Nanopartikel bestätigt. Histologische Untersuchungen nach Applikation der SPIO konnten zeigen, dass diese nach einigen Wochen von gewebeständigen Makrophagen getragen werden, welche die applizierte Zelle aufgenommen hatten [Amsalem et al. 2007, Suzuki et al. 2008]. Dieser Umstand lässt Fehlinterpretationen hinsichtlich des Verbleibs der applizierten Zellen zu, was mit der Nutzung der BLI Technologie nicht vorkommt.

3.10 Herstellung Luziferase-exprimierender MSC

Um longitudinal den Verlauf der Abstoßung beziehungsweise das Absterben nach Transplantation von MSC *in vivo* verfolgen zu können ohne die Empfängertiere zu verschiedenen Zeitpunkten nach MSC Transplantation für histologische Untersuchungen explantieren zu müssen, wurden die MSC mittels eines lentiviralen Vektors stabil mit Luziferase transfiziert. Es ist somit möglich die MSC mittels der Methode der Molekularen Bildgebung (BLI) *in vivo* darzustellen und das Zellüberleben longitudinal und nicht-invasiv zu überwachen [Tanaka et al. 2005, Cao et al. 2005]. Die Produktion des Lichtsignals der Luziferase ist ATP-abhängig und findet nur dann statt,

wenn die merkmals tragende Zelle vital ist. Ferner ist das Merkmal nach der Transfektion durch die Nutzung lentiviraler Vektoren stabil in das Genom der Zelle eingebaut und kann nicht durch Phagozytose auf andere Zellen wie zum Beispiel Makrophagen übergehen. Eine gezielte Weitergabe der Luziferase-Eigenschaft auf Tochterzellen bei einer Zellteilung ist anders als bei der Verwendung von SPIO möglich, was zu einer Zunahme des Lichtsignals im BLI bei einer Proliferation der applizierten Zellen führt [Suzuki et al. 2008].

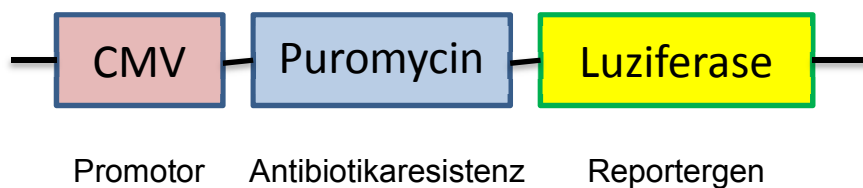


Abb. 6: Luziferase Virus Map mit Cytomegalovirus (CMV) Promotor und Antibiotikaresistenz gegen Puromycin.

Durch den stabilen Einbau in das Genom wird die genetische Information bei jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Zusammen mit dem Luziferase-Gen wurde eine Antibiotikaresistenz gegen Puromycin in die Zellen transfiziert. MSC, die erfolgreich das Luziferase-Genkonstrukt in ihr Genom aufgenommen haben (luc+), tragen nach Verwendung des oben schematisch gezeigten Konstruktes (Abb.6) gleichzeitig eine Puromycin-Resistenz. Eine Selektion unter der Anwendung von Puromycin in der Zellkultur ist dadurch möglich. Unter Puromycin sterben Zellen, die nicht transfiziert wurden und daher empfindlich auf Puromycin reagieren, ab.

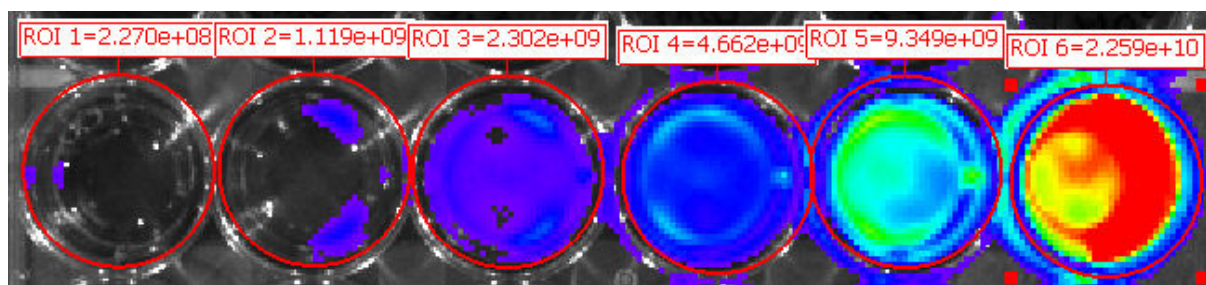


Abb. 7: Luziferase positive MSC in einer Verdünnungsreihe, mit steigender Zellzahl nimmt die Intensität des in p/s gemessenen Lichtsignals zu.

Die Zellen können nun im BLI betrachtet werden, hierzu wird den Zellen Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline; PBS) mit Luziferin zugegeben. Die Luziferase in den Zellen verstoffwechselt das Luziferin ATP-abhängig

und ein messbares Lichtsignal entsteht. Die Intensität des Lichtsignals steht in linearer Korrelation mit der Menge an umgesetztem Luziferin und damit auch mit der vorliegenden Anzahl an vitalen Zellen (Abb.7).

Auch SCNT wurden auf dieselbe Weise mit Luciferase (Luc) transfiziert, Daten aus den Transplantationsstudien mit diesen transfizierten Zellen werden in der vorliegenden Schrift jedoch nicht besprochen.

3.11 Longitudinales Zellüberleben in der Maus im BLI

Mit einer Injektion von 1×10^6 luc+ MSC in den Musculus gastrocnemius einer immunkompetenten BALB/C Maus wurde die Abstoßung longitudinal beobachtet. Die injizierten Tiere wurden an jedem zweiten Tag im BLI untersucht, hierfür wurde ihnen intra peritoneal (i.p.) Luziferin appliziert. Das Luziferin wurde dann von der Luziferase in den transduzierten Zellen ATP-abhängig, wie exemplarisch in der Zellkultur dargestellt (Abb. 7), verstoffwechselt, was wiederum zu einem in Photonen pro Sekunde (p/s) messbaren Lichtsignal führte. Die Intensität des Lichtsignals korreliert auch hier linear mit der Anzahl vitaler, merkmalsstragender MSC. Auf diesem Wege konnte die kontinuierliche Abnahme der Zellzahl *in vivo* in der Maus bestimmt werden (Abb.8).

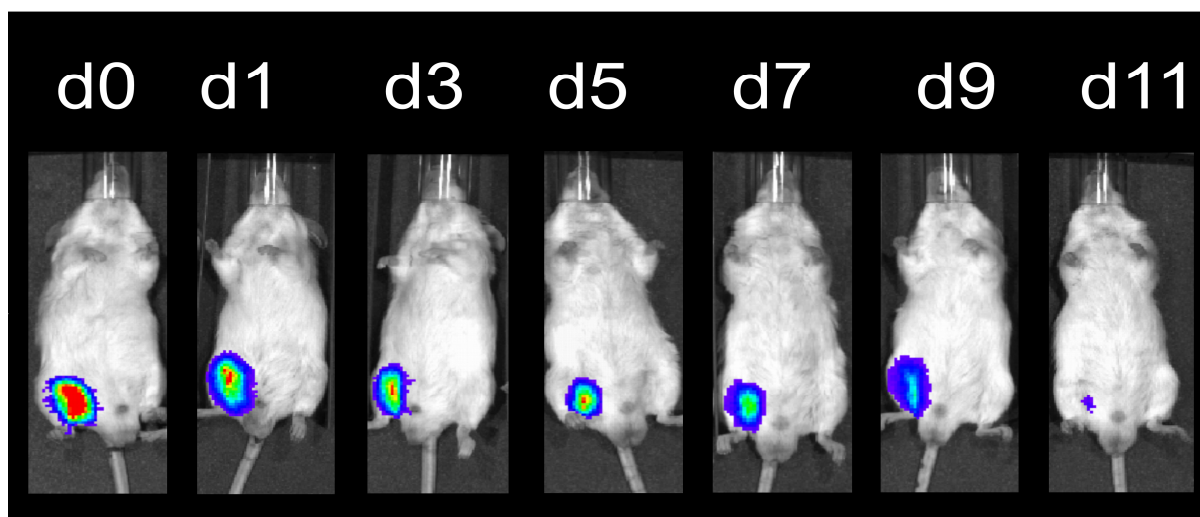
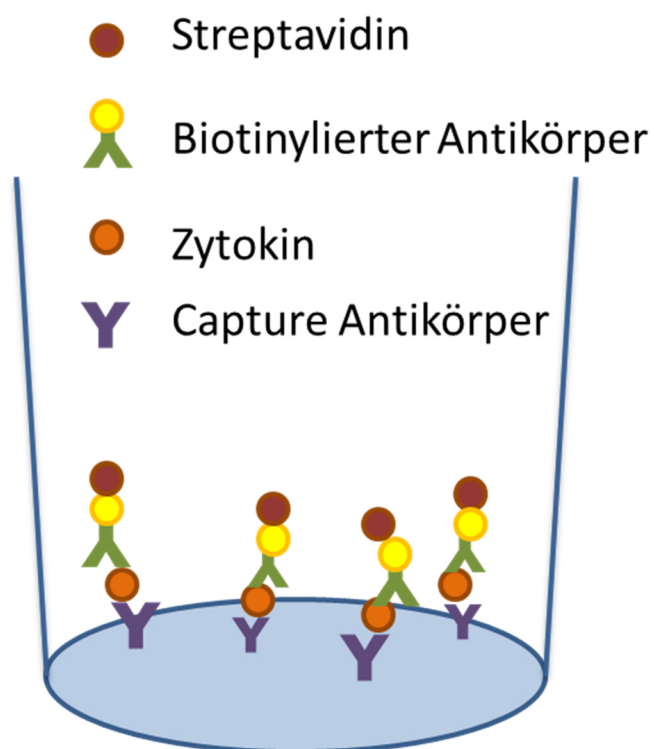


Abb. 8: BALB/C Mäuse im BLI. MSC wurden in den rechten Oberschenkel von immunkompetenten BALB/C Mäusen injiziert, eine Abnahme der Signalstärke im zeitlichen Verlauf zeigt die Abstoßung der Zellen.

Eine Untersuchung der Tiere im BLI fand am Tag der Zellapplikation statt. Die nächste Ermittlung des Luziferase (Luc) Signals wurde an Tag 1 vorgenommen, hiernach folgte eine Untersuchung an jedem zweiten Tag. Die Messungen wurden bis vier Tage nach Erlöschen des Signals fortgeführt. Ein Erlöschen des Signals ist definiert als ein gemessenes Signal, welches dem Messwert einer nicht mit Zellen injizierten Maus des gleichen Mausstammes wie dem genutzten entspricht.

3.12 Zelluläre Immunantwort

Die zelluläre Immunantwort wurde mittels verschiedener *in vitro* und *in vivo* Methoden ermittelt. Hierfür wurde ein ELISPOT Assay durchgeführt (Schema Abb.9). Bei dem ELISPOT handelt es sich um einen sogenannten Single Cell Assay, hier kann also jede einzelne Zelle, die eine Reaktion zeigt, detektiert und gezählt werden. Immunkompetente Mäuse wurden mit MSC in den M. gastrocnemius injiziert, nach 5 Tagen wurde die Milz der Tiere entnommen. In einem mechanischen Homogenisierungsverfahren, gefolgt von einer Lyse der roten Blutkörperchen, wurden mononukleäre Zellen purifiziert und gewonnen, sie werden im Weiteren als Splenozyten bezeichnet. Die so generierten Splenozyten erkennen die zuvor applizierten MSC als fremd. Die Splenozyten wurden nun in einer definierten Anzahl mit inhierten gleichen MSC wie in der Applikation konfrontiert und inkubiert. Dies



geschah in einer Membranplatte, die mit Antikörpern gegen IFN γ für die Darstellung der T_H1-Antwort beziehungsweise Antikörpern gegen IL-4 für die T_H2-Antwort beschichtet war. In der 24-Stündigen Inkubationszeit sezernieren die Splenozyten Zytokine als Antwort auf die Konfrontation mit den MSC. Die Zellen wurden in der Folge durch verschiedene Waschschrte entfernt. Über die Bindung von Antikörpern konnten die

sezernierten Zytokine als Punkte sichtbar gemacht werden.

Abb. 9: Schematische Darstellung ELISPOT. Hier ist schematisch dargestellt, wie in einem ELISPOT Assay die verschiedenen Antikörper, ähnlich des Prinzips eines ELISA aufeinander geschichtet werden.

Eine Auszählung der Punkte (Spots) erfolgte maschinell. Durch das Pipettieren von Vierfachansätzen wurde sichergestellt, dass Wells, die Fehler durch z.B. Verklumpen der Zellen aufwiesen, nicht in die Zählung einbezogen werden mussten.

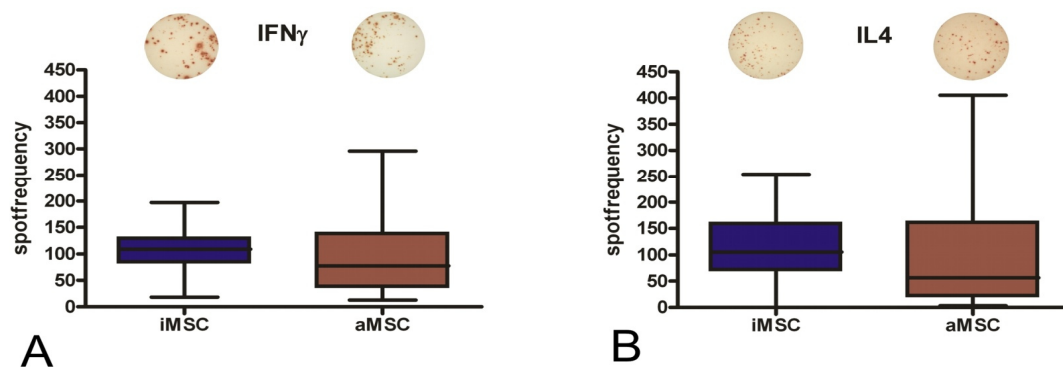


Abb. 10: ELISPOT Assay, jeder Punkt repräsentiert eine Zelle, die IFN γ im Sinne einer T_H1-Antwort (A) beziehungsweise IL-4 für die T_H2-Antwort (B) sezerniert hat (Stubbendorff et al. Medical Research Archives 2015).

3.13 Humorale Immunantwort

Neben der T-Zell-vermittelten Abstoßung sorgen auch andere Mechanismen für ein Absterben der applizierten MSC. Ein wichtiger Aspekt ist auch die humorale, antikörpervermittelte Abstoßung. Im Rahmen einer adaptiven Immunantwort produzieren B-Zellen Antikörper gegen das Fremdanigen. Zunächst werden Immunglobulin M (IgM)-Antikörper produziert, nach einem Isotypenswitch liegen dann Immunglobulin G (IgG)-Antikörper vor. Die Antikörper richten sich gezielt gegen das identifizierte Fremdanigen. Sie binden an die Zellen, welche das Fremdanigen tragen und setzen so eine Kaskade in Gang die über phagozytierende Zellen zur Vernichtung des Antigens beziehungsweise der antigenexprimierenden Zelle, also der MSC führt.

Die humorale Immunantwort wurde in den hier vorgestellten Studien mittels der Messung donorspezifischer Antikörper (DSA) ermittelt. Für die Entstehung von DSA wurden wiederum immunkompetenten Mäusen eine definierte Menge von MSC in den M. gastrocnemius injiziert, nach 5 Tagen wurde das Serum der Tiere gewonnen. In der

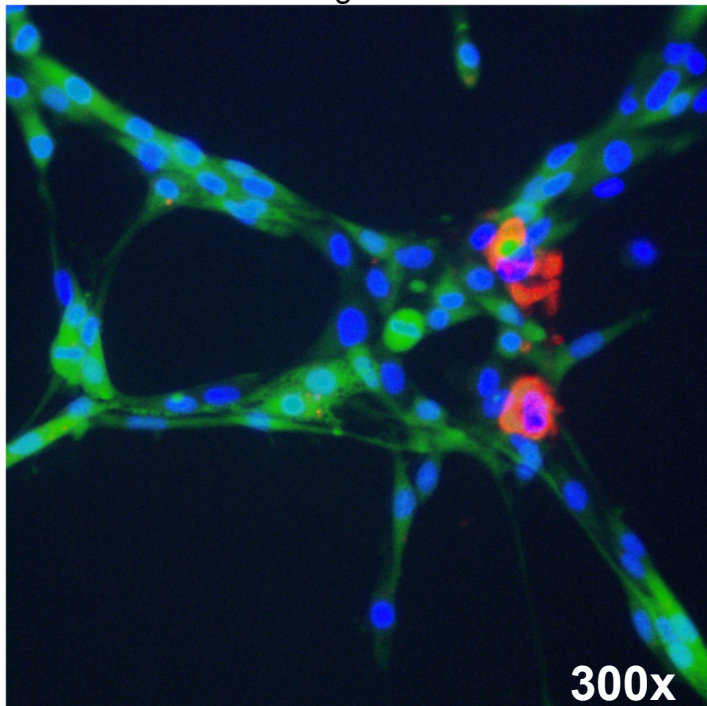
Zwischenzeit hat in der Maus eine B-Zell-Reaktion stattgefunden, in der spezifische Antikörper gegen die injizierten MSC, also spezifisch gegen die Donorzelle, gebildet wurden. Nach 5 Tagen liegen im Tier IgM-Antikörper vor, wenn eine längere Zeit (ca. 14 Tage) vor der Gewinnung des Serums der Maus verstreicht, hat ein Isotypenswitch stattgefunden und es sind IgG-Antikörper im Serum vorhanden. Da die Antikörper mittels FACS-Analyse bestimmt werden sollen, werden als Trägerzellen die MSC genutzt, gegen die die Antikörper gerichtet sind. Um das hitzelabile Komplement, welches zur angeborenen Immunabwehr gehört, sich auch im Serum befindet und mit der Messung der DSA interferieren würde, zu entfernen, wurde das Serum für 30 Minuten auf 56°C erhitzt. Die im Serum befindlichen IgM-Antikörper wurden mit MSC inkubiert, wonach ein mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-konjugierter Anti-Maus IgM-Antikörper zugegeben wurde, der an die zellgebundenen IgM Antikörper bindet und in der FACS-Analyse detektierbar ist.

3.14 Angiogenese

Ein positiver Einfluss auf die Angiogenese ist eine der Eigenschaften, die MSC für zellbasierte Therapien interessant machen. Um die Angiogenesewirkung zu ermitteln wurden drei verschiedene Methoden gewählt, der Tube Formation Assay, der Chorion Allantois Membran Assay und der Angiogenese Membrane Antikörper Mikroarray, welche im Folgenden genauer beschrieben werden.

3.14.1 Tube Formation Assay

Für die Ermittlung der Angiogenese im Tube Formation Assay wurden MSC in Co-Kultur mit EC auf Matrigel kultiviert. Durch die Textur des Matrigels formen die EC ein



morphologisches Muster, sie bilden sogenannte Tubes aus, welche Vorgängerstrukturen von Blutgefäßen darstellen. Auf diese Weise imitieren sie eine beginnende Gefäßeinsprossung [Xu et al. 2008].

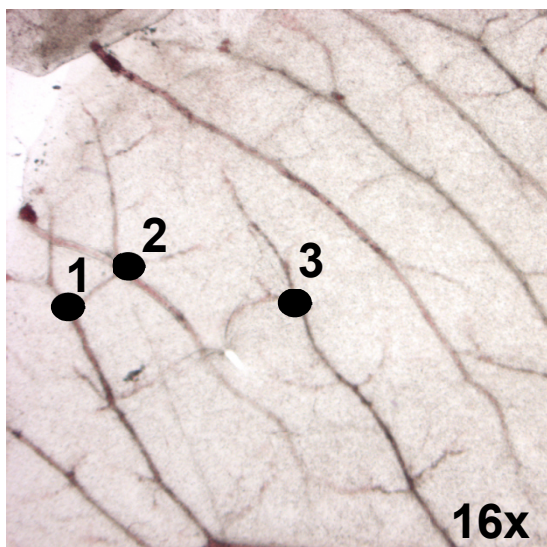
Abb. 11: Tube Formation Assay. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. Endothelzellen sind grün (GFP), MSC sind rot (PKH Färbung) und alle Zellkerne sind blau (Hoechst Färbung) gefärbt.

Ein Tube ist definiert als ein länglicher Zellverbund, der mindestens viermal so lang wie breit ist. Die Verästelung und die Häufigkeit von Abgängen spielt bei der Gefäßneubildung ebenfalls eine wichtige Rolle, es wurden in diesem Versuch somit die Anzahl der Tubes pro Gesichtsfeld, sowie die Gabelungen ausgezählt. In der Co-Kultur mit MSC sollten diese durch Sekretion von Zytokinen in unterschiedlichem Maße die Gefäßneubildung beeinflussen.

3.14.2 Chorion Allantois Membran Assay

Für den Chorion Allantois Membran (CAM) Assay wurden Bruteier von Hühnern genutzt. Die Bruteier wurden zunächst für vier Tage bei 60% Luftfeuchtigkeit und 37°C unter Wenden bebrütet, dann wurde ihre Schale fenestriert, es wurde ein Schwämmchen, welches mit konditioniertem Medium von MSC getränkt war, aufgebracht. Konditioniertes Medium wurde hergestellt, indem eine definierte Zellmenge in eine T25 Zellkulturflasche eingebracht wurde. Es wurden 3ml Medium zugefügt, nach 48h wurde ein Mediumwechsel vollzogen und das entnommene Medium durch Zentrifugation von flotierenden Zellen befreit. Bei dem so gewonnenen Überstand handelt es sich um konditioniertes Medium. Dieses Medium enthält nun sämtliche von den Zellen abgegebenen Stoffe, also auch Zytokine, die das

Gefäßwachstum begünstigen. Nach einer weiteren zweitägigen Bebrütung ohne Wenden bei 60% Luftfeuchtigkeit und 37°C wurde erneut konditioniertes Medium auf

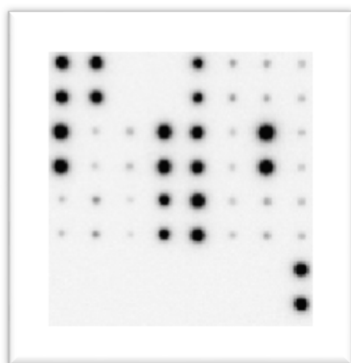


die Schwämmchen aufgebracht. Nach weiterer zweitägiger Bebrütung ohne Wenden bei 60% Luftfeuchtigkeit und 37°C wurde die CAM in dem Bereich, in dem das Schwämmchen mit dem konditionierten Medium appliziert worden war, entnommen. Unter dem Mikroskop wurden die Gabelungen der entstandenen Blutgefäße vergleichend ausgezählt. Dies ist exemplarisch in Abb. 12 dargestellt.

Abb. 12: Lichtmikroskopische Aufnahme einer CAM, jeder Punkt repräsentiert exemplarisch eine gezählte Gabelung.

3.14.3 Membran Antikörper Mikroarray

Bei dem Membran Antikörper Mikroarray handelt es sich um einen Protein Mikroarray, hierbei sind Antikörper gegen bestimmte Proteine punktförmig auf eine kleine Membran aufgebracht. Ferner befinden sich auf jeder Membran Positiv- und Negativkontrollen, die zur Verifizierung der Ergebnisse dienen. Das Set der aufgetragenen Antikörper kann je nach Fragestellung gewählt werden. In der vorliegenden Studie wurde ein Array verwendet, dessen Antikörper gegen



angiogeneserelevante Proteine gerichtet sind. Die Membran wurde mit der zu messenden Probe, einem MSC konditionierten Medium, inkubiert und anschließend ähnlich wie ein Western Blot ausgelesen (Abb. 13). Die Ergebnisse wurden als negative Antwort, bei Abwesenheit eines Signals oder als positive Antwort bei Vorhandensein eines Signals gewertet, wobei auch die Signalstärke bestimmt worden ist.

Abb. 13: Membran Array. BLI Aufnahme eines Angiogenese Membran Array, jeder Punkt repräsentiert einen gebundenen Botenstoff, die Antikörper sind immer in Duplikaten aufgebracht.

3.15 SCNT und mitochondrial getriggerte Abstoßung

Die Generierung von NT-ESC und isoESC wurde in der vorliegenden Schrift bereits unter Punkt 3.2 beschrieben.

3.15.1 In vivo Teratom Erzeugung

Bei der *in vivo* Erzeugung eines Teratoms handelt es sich um einen Assay, mit dessen Hilfe die Pluripotenz von Zellen wie zum Beispiel ESC bewiesen werden kann. Hierzu werden ESC aus der *in vitro* Zellkultur vereinzelt und als Zellsuspension einer immuninkompetenten non obese diabetic (NOD) scid Maus appliziert. Die Applikation kann hierfür in verschiedene Gewebe erfolgen. Für die vorliegende Arbeit [Deuse et al. 2015] wurden 1×10^7 NT-ESC beziehungsweise isoESC in 80 μ l NaCl in den M. gastrocnemius injiziert. Innerhalb von einer Dauer von 4 Wochen konnte eine gewebige Umfangsvermehrung für die histologische Untersuchung explantiert werden. In diesem Tumor ließen sich in der Histologie Zellen aller drei Keimblätter nachweisen, wodurch bewiesen werden konnte, dass es sich um ein Terratom, ausgelöst durch pluripotente Zellen handelte.

3.16 Heterotope Herztransplantation

Die heterotope Herztransplantation im Labornager ist eine Methode zur Darstellung der Abstoßungsreaktion am Herzen als solides transplantiertes Organ.

In der hier exemplarisch gezeigten Studie, die im Gesamtkontext dem Vergleich der Abstoßungsmechanismen dienen soll, wurden Herzen heterotop in der Ratte transplantiert. Das Herz des Spenders wurde unter Abbinden aller venösen Abgänge und Schonung von Aorta und Arteria pulmonalis entnommen. Der Empfänger wurde einer Laparatomie unterzogen, wobei die Aorta abdominalis und die Vena cava caudalis exponiert wurden. Das zu transplantierende Herz wurde in einer End-zu-Seit Anastomose an die großen Bauchgefäße des Empfängers angeschlossen. Die Aorta des Spenderherzes wurde hierbei an die Aorta Abdominalis genäht, während die Arteria pulmonalis mit der Vena cava caudalis des Empfängers verbunden wurde, sodass das transplantierte Herz durch den Empfänger versorgt wird [Tang-Quan et al. 2010, Abbott et al. 1964, Ono und Lindsey 1969]. Das Transplantierte Herz schlägt bei dieser Methode im Abdomen des Empfängers, was täglich mittels Palpation überwacht wurde.

3.17 Orthotope Aortentransplantation

Bei dem hier beschriebenen Modell für Transplantat-Vaskulopathie (TVP) handelt es sich um eine Methode der Darstellung von abstoßungsassoziierter Entstehung von Blutgefäßentzündungen. Gefäßverengung durch Intimahyperplasie ist eine Folge der chronischen Abstoßung. Durch Abstoßung getriggerte Blutgefäßveränderungen in transplantierten Organen führen zu Durchblutungsstörungen in den Transplantaten. Immunzellen im Blut des Empfängers finden im Gefäßendothel Fremdartigen und bekämpfen dieses.

Die Aortentransplantation in der Ratte ist ein Modell mit dem die chronische Abstoßung und damit einhergehende Vaskulopathie in kardiovaskulären Fragestellungen modellhaft dargestellt werden kann [Deuse et al. 2008, Mennander et al. 1991].

Methodisch wird hier ein Stück der Aorta des Spendertieres vorgelegt, dieses wird gespült und von Blut befreit. Das Empfängertier wird einer Laparatomie unter Darstellung der Aorta abdominalis unterzogen, die Aorta wird infrarenal und proximal der Bifurkation abgeklemmt. Ein kurzes Stück der Empfängeraorta wird entnommen, wonach die Spenderaorta mittels End-zu-End Anastomose orthotop transplantiert wird. Durch Öffnen der Gefäßklemmen wird der Blutfluss wieder hergestellt. Das Transplantat verbleibt bis zum Ende der Studie im Empfängertier und ist hier physiologischen Bedingungen ausgesetzt. Nach Explantation kann das Transplantat beispielsweise histologischen Untersuchungen zugeführt werden. Das Transplantat, oder Teile davon kann auch für physiologische Untersuchungen zum Beispiel im Organbad genutzt werden oder für biochemische Untersuchungen weiterverarbeitet werden.

4. Ergebnisse

Es werden in der Folge die Ergebnisse von sechs eigenen Studien zu den Themen immunologische und zellbiologische Eigenschaften von MSC, SCNT Mitochondrien getriggerte Abstoßung in der Maus und Abstoßung nach Herztransplantation am Rattenmodell, sowie Abstoßung am Aortentransplantationsmodell in der Ratte vorgestellt.

4.1 Vergleich von MSC aus Knochenmark verschiedenalter Spender; eigene Studie.

Stubbendorff M, Neofytou E, Deuse T, Mattutat D, Lange C, Reichenspurner H, Robbins RC, Beygui R, Volk HD, Schrepfer S. Impact of donor age on biological and immunogenic properties of mesenchymal stromal cells. Med Res Arc. 2015 No (3).

In einem direkten Vergleich wurden in dieser Studie aus dem Knochenmark isolierte MSC eines gesunden 6 Monate alten Säuglings, infant MSC (iMSC), und von multimorbiden Spendern über 70 Jahren, aged MSC (aMSC), einander gegenübergestellt.

In der Charakterisierung zeigten sich beide Zellpopulationen morphologisch als spindelförmig und an Plastik adhärent wachsend, sie wiesen die für MSC typischen Oberflächenantigene auf und waren negativ für hämatopoetische Marker. Beide Zellgruppen ließen sich gleichermaßen erfolgreich in Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten differenzieren.

Bei der vergleichenden Betrachtung der Proliferationsgeschwindigkeit teilten sich die Zellen des jungen Spenders signifikant schneller als die des Spenders fortgeschrittenen Lebensalters. Die unterschiedliche Proliferationsrate konnte im MTT Assay nachgewiesen werden ($p < 0,001$) und war im Living Cell Imaging über eine Zeitrafferaufnahme, für die über ein Zeitfenster von 48 Stunden in 10 minütigem Abstand je ein Foto gemacht wurde, optisch gut nachvollziehbar. Im Migrationsassay wurde in einem konfluenten Zellrasen mittels einer Pipettenspitze durch Kratzen eine Zusammenhangstrennung beigefügt. Die in den Kratzer eingewanderten Zellen wurden nach einem definierten Zeitfenster von 14 Stunden, in dem eine Inkubation

unter Zellkulturbedingungen stattfand, ausgezählt. Die iMSC migrierten signifikant schneller in die Kratzwunde ($p < 0,001$) als die aMSC.

Um eine Aussage über Unterschiede in der Immunogenität der Zellen treffen zu können, wurde die Expression von MHC I und dem damit assoziiertem β_2 -Mikroglobulin an der Zelloberfläche der nativen sowie mit 25ng/ml IFN γ stimulierten Zellen verglichen. Es wurde hierbei deutlich, dass beide Zellpopulationen nativ eine moderate Ausprägung dieser Oberflächenmoleküle zeigten, welche unter Einfluss von IFN γ gleichermaßen stark heraufreguliert wurde. MHC II war, wie für MSC in den Richtlinien der ISCT beschrieben auf den nativen Zellen nicht ausgeprägt, konnte jedoch unter IFN γ -Stimulierung gleichermaßen in beiden Zelllinien heraufreguliert werden. Die costimulatorischen immunologischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 waren auf der Zelloberfläche beider Zellpopulationen nicht ausgeprägt und ließen sich durch IFN γ nicht heraufregulieren.

Interessanterweise exprimierten beide Zelllinien die Adhäsionsmoleküle CD54 (ICAM-1) und CD166 (ALCAM), die zur Familie der Integrine gehören und eine tragende Rolle in der Transmigration von Zellen spielen. Die Liganden für NK-Zell Aktivierung Hsp70 und MicA/B konnten auf beiden Zellpopulationen in niedrigen Ausprägungen nachgewiesen werden.

Die tolerogenen Marker HLA-E und HLA-G waren auf den ruhenden Zellen nicht detektierbar, wurden unter dem Einfluss von IFN γ jedoch leicht heraufreguliert. Die Werte wurden in der FACS Analyse als Fold Change gegenüber einer zum Antikörper passenden Isotypkontrolle ermittelt.

Die in dieser Studie generierten Messwerte erforderten weitergehende immunaktivierende Versuche, die das Ziel hatten herauszustellen, ob ein altersabhängiger Unterschied in der hervorgerufenen Abstoßungsreaktion besteht, oder dieser nur in den biologischen Parametern ausgeprägt ist.

Um die Zelluläre Abstoßung und eventuelle Unterschiede zwischen den beiden Zellpopulationen zu ermitteln, wurden ein unidirektionaler ELISPOT Assay sowie die Messung von DSA in der Maus durchgeführt. Für diese Versuche wurden immunkompetenten BALB/C Mäusen für die Immunisierung 1×10^6 MSC in den M. gastrocnemius injiziert. Nach 5 Tagen wurden die Milz und das Serum der Tiere gewonnen. Aus der Milz wurden Splenozyten isoliert, welche, wenn sie mit inhibierten MSC konfrontiert wurden, mit einer Sekretion von IFN γ im Rahmen einer T_H1-Antwort

und IL-4 als Botenstoff für eine T_H2 -Antwort reagierten. Die Zytokinsekretion wurde als Spot Frequency computergestützt ausgezählt. Beide MSC Zellpopulationen riefen im ELISPOT Assay eine ähnlich starke Immunantwort hervor. Interessanterweise war die Immunantwort der Zelllinien untereinander nicht signifikant unterschiedlich, im Vergleich der durch andere Zelllinien erfahrungsgemäß ausgelösten Immunantwort jedoch relativ niedrig.

Aus dem im Rahmen der Explantation 5 Tage nach Zellapplikation gewonnenen Serum wurden donorspezifische IgM-Antikörper mittels FACS Analyse bestimmt. Diese wurden als humorale Antwort auf die Konfrontation der Mäuse mit den MSC durch die B-Zellen produziert. Auch in der humoralen Antwort war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden aus Knochenmark isolierten MSC Zelllinien erkennbar.

Es konnte sowohl in der Humanmedizin, als auch in der Veterinärmedizin bereits gezeigt werden, dass MSC immunmodulatorische Fähigkeiten besitzen [Carrade und Borjesson 2010, English und Wood 2013, Nair und Saxena 2013], die unter Anderem auf die Produktion des Enzyms IDO zurückzuführen sind [Yagi et al. 2010]. In einem Western Blot wurde IDO in Zelllysat von nativen MSC und von mit 500ng/ml IFN γ 48h stimulierten MSC ermittelt. Beide MSC Gruppen produzieren im IFN γ - stimulierten Zustand annähernd gleiche Mengen an IDO. Im immunologischen Profil und in der immunmodulatorischen Kapazität bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenalten Zellpopulationen. Es zeigten sich jedoch zellbiologische Unterschiede in Proliferation und Migration, die einen Einfluss auf eine Transplantation von Zellen haben. Der Fokus wurde hiernach auf weitere zellbiologische Parameter wie Adhäsion und Angiogenese gelegt.

Um die Unterschiede in der Adhäsion genauer zu betrachten, und diese in Zusammenhang mit einer Extravasation zu bringen, wurde die Expression von CD29 mittels FACS Analyse untersucht. CD29 stellt den Liganden von CD106 auf EC dar. Die iMSC trugen signifikant mehr CD29 Moleküle auf ihrer Oberfläche als die aMSC. In einem Versuch, der das Adhäsionsverhalten *in vitro* darstellt, adhärten signifikant mehr iMSC. Hierzu wurden die nativen, mit PKH rot angefärbten, MSC auf native oder mit TNF α stimulierte konfluent gewachsene Gefäß-Endothelzellen (EC) aufpipettiert. Auf einem Schüttler wurde der Assay dann bei niedriger Geschwindigkeit für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten mehrere Waschschrte, wonach

eine Auswertung am Fluoreszenzmikroskop vorgenommen wurde. Für die Auswertung wurden die adhärenierten MSC pro Gesichtsfeld vergleichend ausgezählt (Abb. 14).

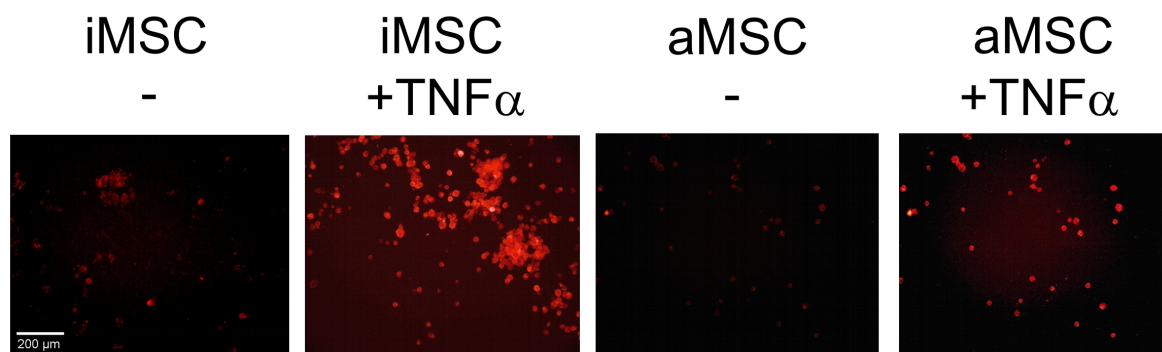


Abb. 14: Adhäsionsassay (Stubbendorff et al. Medical Research Archives 2015). PKH gefärbte, adhärenierte MSC, vergleichende repräsentative Bilder der beiden verschiedenen MSC jeweils auf unstimulierten und auf $\text{TNF}\alpha$ stimulierten EC.

Es existieren viele Publikationen, in denen MSC als vorteilhaft für Angiogenese beschrieben werden [Carrion et al. 2013, Katare et al. 2013]. Ein deutlicher Unterschied zwischen den MSC verschiedenalter Spender in der Beeinflussung der Angiogenese konnte in verschiedenen Assays herausgearbeitet werden. Zunächst fördern die iMSC die Tube Bildung ($p < 0,001$) und die Entstehung von Verästelungen ($p < 0,001$) in Co-Kultur mit EC auf Matrigel, welches als Gerüstsubstanz fungiert, signifikant. Weiterhin konnte auch eine signifikant stärkere Blutgefäßbildung im CAM Assay, gemessen in der Anzahl der Abzweigungen ($p < 0,001$), beobachtet werden, in dem Bruteier zum Einsatz kamen.

Im Angiogenese Membran Array wurden dann die Gründe deutlich, hier wurde eine Membran verwendet, welche Antikörper gegen angiogeneserelevante Zytokine trägt. Signifikante Unterschiede zwischen der Zytokinausschüttung durch die MSC beider Gruppen konnten festgestellt werden. Im konditionierten Medium der iMSC war signifikant mehr Angiogenin ($p = 0,0147$), GRO ($p = 0,0059$), Leptin ($p = 0,0051$), IL-8 ($p = 0,0046$), IL-6 ($p = 0,0131$) und Timp2 ($p = 0,0210$) nachweisbar.

Angiogenin ist eine Aminosäure, die ein potenter Angiogenese-Stimulator ist. Angiogenin ist das Schlüsselprotein in der Gefäßbildung sowohl in physiologischem Wachstum, als auch im Tumorwachstum. Es interagiert mit Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen, was zu Zellmigration, Invasion, Proliferation und der Bildung tubulärer Strukturen führt [Gao und Xu 2008].

Growth related oncogene alpha (GRO; CXCL1) gehört zur CXC Chemokinfamilie, es wird von verschiedenen Zellen wie Makrophagen, Neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen exprimiert und ist regulatorisch an der Angiogenese beteiligt.

Leptin ist ein Proteohormon, welches hauptsächlich in Fettzellen produziert wird. Leptin entkoppelt die Zellatmung von der ATP Synthese [Nelson und Cox 2005], dies führt dazu, dass Zellen selbst unter schwierigen Bedingungen wie Hypoxie nicht zugrunde gehen. Auf diesem Wege werden die an der Gefäßeinsprossung beteiligten Zellen versorgt.

IL-6 erhöht den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und hat so einen positiven Einfluss auf die Angiogenese [Huang et al. 2011, Cohen et al. 1996, Tzeng et al. 2013]. Es stimuliert T-Zellen und B-Zellen und begünstigt chronische Inflammationen [Tilg et al. 1994, Marin et al. 2002, Gabay 2006].

IL-8 steigert direkt das Überleben der Endothelzellen und ihre Proliferation, auf diesem Wege wirkt es regulatorisch bei der Angiogenese [Li et al. 2003, Ning et al. 2011].

Tissue Metallopeptidase Inhibitor 2 (Timp2) ist ein Protein, welches an der Degradierung von extrazellulärer Matrix beteiligt ist. Durch diese Degradierung schafft Timp2 gute Voraussetzungen für eine Gefäßeinsprossung, indem es neuen Zellen ermöglicht in Gewebe einzuwandern. Es kommt so zu einer Umstrukturierung und zu einem Vordringen neuer Blutgefäße.

Aus den Ergebnissen dieser Studie ergibt sich, dass das Spenderalter bei den aus dem Knochenmark gewonnenen MSC keinen Einfluss auf immunologische Parameter hat. Es vollziehen sich jedoch mit steigendem Spenderalter deutliche zellbiologische Veränderungen. Für eine Transplantation von MSC ist es somit von Vorteil, wenn in einem jungen Spenderalter entnommene Zellen verwendet werden können. Junge MSC-Populationen eignen sich aufgrund der Überlegenheit ihrer zellbiologischen Eigenschaften besonders für regenerative Therapien und bringen hierfür deutliche Vorteile mit sich.

4.2 Vergleich von MSC aus Knochenmark mit MSC aus der Nabelschnur; eigene Studie.

Deuse T, **Stubbendorff M**, Tang-Quan K, Phillips N, Kay MA, Eiermann T, Phan TT, Volk HD, Reichenspurner H, Robbins RC, Schrepfer S. Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 2011;20(5):655-67.

Es wird postuliert, dass chronologisch junge MSC aus peripartalen extraembryonalen Geweben gegenüber älteren MSC immunprivilegiert sind, ferner wird von einer Vielzahl an Firmen die Kryokonservierung von Nabelschnur und anderen peripartalen Geweben angeboten. Ein großer Vorteil der Generierung von MSC aus der Nabelschnur gegenüber der Generierung aus dem Knochenmark ist die nichtinvasive Entnahme der erforderlichen Gewebe. Es handelt sich bei Nabelschnüren um einen Rohstoff, der als Nebenprodukt bei Geburten weltweit anfällt. Allein in Deutschland, einem vergleichsweise geburtenschwachen Land, wurden nach Angaben des Statistischen Bundesamtes im Jahr 2013 682.069 Kinder geboren. Nach den meisten Geburten werden die Nabelschnüre verworfen und unschädlich beseitigt. Entschließen sich die Eltern zu einer privat finanzierten Kryokonservierung der Nabelschnur, wie sie inzwischen vielfach von verschiedenen Firmen angeboten wird, ist dies jedoch nicht der Fall. Es stellt sich nun die Frage, ob aus der Nabelschnur gewonnene MSC besser als Spenderzellen geeignet sind, als solche, die aus dem Knochenmark isoliert worden sind.

In dieser Studie zielte die Fragestellung darauf, die transplantationsrelevanten immunologischen Unterschiede zwischen einer chronologisch sehr jungen MSC Population aus Nabelschnurgewebe gesunder ausgetragener Babys (clMSC) und einer MSC Population aus dem Knochenmark von gesunden erwachsenen Spendern (bmMSC) zu ermitteln. Da die Patienten, welche eine MSC basierte regenerative Therapie benötigen häufig ein fortgeschrittenes Lebensalter aufweisen [van der Kraan 2013, Sykova und Forostyak 2013], wurden in der vorliegenden Studie bmMSC von gesunden Personen in einem Alter von über 60 Jahren verwendet.

Es wurden wiederum beide Zellpopulationen hinsichtlich ihres Phänotyps begutachtet, sie waren spindelförmig und wuchsen adhärent an Plastik. Ferner wurde ein Set von

für MSC typischen Oberflächenmarkern im FACS untersucht, die Zellen waren positiv für MSC-Marker und negativ für hämatopoetische Oberflächenmoleküle. Beide Zelllinien ließen sich gleichermaßen einfach in Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten differenzieren. Nach den Mindestanforderungen der ISCT handelt es sich somit nachgewiesen um MSC.

In der Proliferation zeigten sich die cIMSC signifikant stärker ab Tag 3 des MTT Assays ($p < 0,005$). Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen hinsichtlich ihrer Proliferation vergleichend untersucht. An Tag 0 wurde die gleiche Zellzahl an cIMSC und bmMSC vorgelegt, hiernach fand täglich eine colorimetrische Ermittlung der Zellzahl statt. Unterschiede in der Zellzahl stellen sich als Intensitätsunterschiede in der absorption von Licht in der Messung im ELISA Reader dar.

In der FACS Analyse wurden die relevanten Oberflächenmoleküle für Antigenität, costimulatorische Eigenschaften und einige tolerogene Marker in nicht stimuliertem Zustand und entzündlichem Milieu, initiiert durch IFN γ -Stimulierung, bestimmt. Die cIMSC zeigten eine signifikant schwächere Ausprägung von HLA-ABC ($p < 0,001$) und dem damit assoziierten β_2 -Mikroglobulin ($p = 0,001$) im Vergleich mit den bmMSC. Beide MSC waren negativ für HLA-DR und costimulatorische Faktoren CD40, CD80 und CD86. Nach Stimulierung mit 25ng/ml IFN γ stiegen die Expressionen von HLA-ABC, damit assoziiertem β_2 -Mikroglobulin und HLA-DR auf beiden Zellpopulationen signifikant an, während die costimulatorischen Marker negativ blieben. Der tolerogene Marker HLA-E ließ sich auf beiden Zelllinien unter IFN γ signifikant heraufregulieren (cIMSC $p = 0,012$, bmMSC $p = 0,033$). Während die Ausprägung von an der Zelloberfläche befindlichem HLA-G unverändert blieb, ließ sich das intrazelluläre HLA-G unter IFN γ -Einfluss ebenfalls signifikant heraufregulieren (cIMSC $p = 0,005$, bmMSC $p = 0,043$).

Eine IFN γ -Stimulierung mit 25ng/ml wurde als realistisch im Gewebe vorliegender Wert bei einer moderaten Inflammation angenommen. Es konnte für die MSC ein Veto-Effekt gezeigt werden. Dieser Veto-Effekt äußerte sich darin, dass bei weiter angehobenen IFN γ -Stimulierungen bis hin zu einem Wert von 500ng/ml, die Oberflächenexpression von HLA-ABC, damit assoziiertem β_2 -Mikroglobulin und HLA-DR auf beiden Zellpopulationen wieder abnahm. Gleichzeitig kam es jedoch zu einem kontinuierlichen Anstieg der HLA-E und HLA-G Expression.

Die Freisetzung der tolerogenen Zytokine TGF β und IL-10 wurde in ELISPOT Assays ermittelt. In diesen ELISPOT Assays wurden MSC mit und ohne IFN γ Stimulierung verwendet und die Sekretion von TGF β und IL-10 wurde unter Nutzung spezifischer Antikörper ermittelt. Unter nativen Bedingungen produzierten beide Zelllinien TGF β , wobei die durch die cMSC freigesetzten Mengen signifikant höher waren ($p=0.03$) als die der bmMSC. Ausschließlich die cMSC gaben in diesem Assay im nativen Zustand detektierbare Mengen an IL-10 ab (cMSC vs. bmMSC $p<0,001$). Nach Imitation eines entzündlichen Milieus mittels IFN γ -Stimulierung der MSC, sezernierten beide Zelllinien signifikant mehr TGF β und IL-10.

Die Produktion von IDO, ermittelt im Western Blot, war im nativen Zustand auf beiden Zelllinien sehr niedrig, konnte jedoch unter 500ng/ml IFN γ signifikant gesteigert werden (cMSC $p<0,001$, bmMSC $p=0,041$).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass zwischen den cMSC und bmMSC wesentliche Unterschiede in den antigenen Eigenschaften bestehen, wurden beide Zelllinien in einem unidirektionalen ELISPOT verglichen. Hierzu wurden die Zellen in den M. gastrocnemius von immunkompetenten BALB/C Mäusen injiziert, nach 5 Tagen wurde die Milz der Tiere gewonnen. Splenozyten wurden isoliert und mit den gleichen MSC die zuvor den Mäusen injiziert worden waren, inkubiert. Die Splenozyten (T-Zellen) reagierten mit einer Sekretion von IFN γ (T_H1 Antwort) und IL-4 (T_H2 Antwort), welche detektiert wurden. Die bmMSC waren deutlich immunogener als die cMSC. Unterschiede zeigten sich eindrucksvoll in der T_H1 Antwort, die bei den bmMSC 10,8 Fach stärker war als die durch cMSC ($p<0,001$) hervorgerufene, und in der T_H2 Antwort, die 3,4 Fach stärker war als die durch cMSC ($p<0,001$) hervorgerufene (vergleiche Abb. 10).

Beide MSC Linien ließen sich sehr effektiv lentiviral mit Luziferase transfizieren. In der longitudinalen Betrachtung der Abstoßung in immunkompetenten BALB/C Mäusen waren die bmMSC nach $7,2 \pm 0,9$ Tagen, und die cMSC nach $10,9 \pm 1,2$ Tagen nicht mehr detektierbar. Es konnte hier demnach ein signifikant längeres Überleben von cMSC nach Xenotransplantation ($p<0,001$) gezeigt werden.

In immundefizienten SCIDbeige Mäusen, in denen ein Überleben ohne Abstoßung gezeigt werden sollte, waren beide Zelllinien länger (bmMSC $14,7 \pm 2,5$ Tage, cMSC

17,0 ± 2,8 Tage) detektierbar. Die SCIDbeige Maus zeichnet sich durch eine beeinträchtigte T- und B-Zell-Entwicklung aus, was zu einer Immundefizienz der T-Zellen und B-Zellen führt. Diese Mäuse sind nicht in der Lage eine T-Zell-vermittelte Abstoßung durchzuführen, können aber auch keine B-Zell Antikörper produzieren und sind somit auch zur antikörpervermittelten Abstoßung nicht fähig. Unter der Nutzung der immunologisch stark beeinträchtigten (severe combined immunodeficient) SCIDbeige Maus sollte gezeigt werden, dass xenogen applizierte MSC graduell absterben. Sie gehen auch dann zugrunde, wenn sie nicht aktiv vom Immunsystem des Empfängers attackiert werden. Das Absterben der applizierten MSC ist multifaktoriell. Zum Einen haben die Zellen bei der Applikation Stress erfahren, zum Anderen sind sie mit der Applikation in einen Muskel in ein nicht ideales Milieu injiziert worden, in welchem eine adäquate Versorgung mit Nährstoffen nicht gewährleistet werden kann.

In einem allogenen ELISPOT Assay, wurden die MSC mit humanen PBMC inkubiert. Die cMSC aktivierten die T-Zell-Antwort von PBMC nicht signifikant, während die bmMSC die IFN γ Freisetzung (T_H1 Antwort) durch PBMC ($p=0,001$) und auch die IL-2 Freisetzung ($p=0,014$) signifikant anregten. IL-2 ist ein Peptidhormon, welches einen generellen T-Zell Wachstumsfaktor darstellt, es ist notwendig für T-Zell Wachstum, Proliferation und Differenzierung. IL-2 wird während einer Immunantwort durch die T-Zellen selber produziert [Cantrell und Smith 1984, Smith 1988].

In einer MLR wurden humane PBMC von zwei HLA fremden Personen miteinander inkubiert. Die PBMC eines der Spender wurden mit Mitomycin inhibiert, sie stellten die Effektorzellen, die PBMC des Empfängers sezernierten durch den ausgeübten Reiz Zytokine. Die Mixed Lymphocyte Reaktion wurde zusammen mit cMSC, beziehungsweise bmMSC inkubiert. Während beide Zelllinien durch ihre Anwesenheit und ihre ausgeübten parakrinen Effekte die IL-2 Sekretion der PBMC signifikant reduzierten (beide $p<0,001$), waren die cMSC hierbei signifikant potenter als die bmMSC ($p<0,001$).

Die hier erhobenen Daten zeigen eindrucksvoll, dass die cMSC hinsichtlich ihrer Proliferationsgeschwindigkeit, ihrer niedrigeren Immunogenität und ihrer stärkeren immunmodulatorischen Fähigkeiten den bmMSC für eine Transplantation vorzuziehen sind. Chronologisch junge MSC, welche aus der Nabelschnur gewonnen wurden, sind

den Ergebnissen dieser Studie nach für eine Transplantation gegenüber solchen, die aus Knochenmark gewonnen wurden, zu favorisieren.

4.3 Vergleich von MSC aus verschiedenen Kompartimenten der extraembryonalen Gewebe; eigene Studie.

Stubbendorff M, Deuse T, Hua X, Phan TT, Bieback K, Atkinson K, Eiermann TH, Velden J, Schröder C, Reichenspurner H, Robbins RC, Volk HD, Schrepfer S. Immunological Properties of Extraembryonic Mesenchymal Stromal Cells Derived from Gestational Tissue. *Stem Cells Dev.* 2013 Oct 1;22(19):2619-29.

Nachdem sich die MSC aus der Nabelschnur in der vorherigen Studie gegenüber aus Knochenmark generierten MSC als zu bevorzugende Population herausgestellt haben, sollen hier eventuelle Unterschiede zwischen Zellen aus verschiedenen Kompartimenten peripartaler extraembryonaler Gewebe erarbeitet werden. Es soll die Frage beantwortet werden, ob sämtliche MSC aus peripartalen Geweben aufgrund ihrer immunmodulatorischen Aufgaben während der Schwangerschaft und wegen ihres jungen chronologischen Alters gleichermaßen immunprivilegiert sind und gleiche biologische Parameter aufweisen.

In dieser Studie wurden als repräsentative Zellpopulationen aus peripartalen Geweben MSC aus vier deutlich voneinander abgrenzbaren Regionen ausgewählt. MSC aus Nabelschnurgewebe (CL-MSC), Nabelschnurblut (CB-MSC), Plazenta (P-MSC) und Wharton's Jelly (WJ-MSC) wurden einem direkten Vergleich hinsichtlich ihrer zellbiologischen Eigenschaften, ihrer Immunogenität und ihrer immunmodulatorischen Fähigkeiten unterzogen.

Alle vier Zelllinien zeigten sich morphologisch spindelförmig und wuchsen an Plastik adhärent. Die für MSC charakteristischen Oberflächenmoleküle konnten in den 4 gewählten MSC Populationen gleichermaßen nachgewiesen werden und die Zellen zeigten sich negativ für hämatopoetische Marker. Die Differenzierung in Osteozyten und Chondrozyten gelang für alle vier Zelllinien, wobei sich mit dem gewählten Differenzierungsprotokoll ausschließlich die CL-MSC in Adipozyten differenzieren ließen.

Zusammengefasst erfüllten somit nur die CL-MSC alle Kriterien für MSC der International Society for Cellular Therapy [Dominici et al. 2006]. Für den weiteren Fortgang der Studie wurden danach alle 4 MSC Populationen ungeachtet des Ergebnisses für die Differenzierung zu Adipozyten gleichermaßen betrachtet und als MSC angesehen und in den Versuchen einander gegenübergestellt.

Um Unterschiede in der Proliferationsgeschwindigkeit zu ermitteln, wurden alle vier MSC Zelllinien in einem MTT Assay verglichen. Im MTT Assay zeigten die CL-MSC signifikant höhere Proliferationsraten als die P-MSC und WJ-MSC ($p < 0,01$). Im Scratch Assay, in dem die Migrationsfähigkeit der Zellen betrachtet wurde, konnten die CL-MSC signifikant schneller in die Kratzwunde einwandern als CB-MSC, P-MSC und WJ-MSC ($p < 0,001$).

Hinsichtlich der Immunogenität zeigten die CL-MSC die niedrigste HLA-ABC, β_2 -Mikroglobulin und HLA-DR Expression und zudem die niedrigste Heraufregulierung der genannten Oberflächenmoleküle nach 48h Stimulierung mit 25ng/ml IFN γ . Hinsichtlich der costimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Zellgruppen beobachtet werden. Alle getesteten costimulatorischen Moleküle waren auf den nativen MSC negativ in ihrer Ausprägung und konnten unter dem Einfluss von IFN γ nicht heraufreguliert werden.

Die 4 MSC Populationen wurden mit Luziferase transfiziert und das im BLI detektierte Signal der Zellen korrelierte mit der Zellzahl. Um die Abstoßung zu betrachten, wurden 1×10^6 MSC xenogen immunkompetenten BALB/C Mäusen in den M. gastrocnemius injiziert. Eine Untersuchung der injizierten Tiere im BLI zeigte, dass CL-MSC nach 11 Tagen vollständig abgestoßen worden waren, und somit signifikant länger in der Maus vorlagen als die anderen 3 MSC Populationen ($p < 0,01$). Die Abstoßung der P-MSC ist nach 7 Tagen, die der CB-MSC und WJ-MSC nach 8 Tagen erfolgt.

Um zu ermitteln, ob die Unterschiede im Zellüberleben dadurch zustande kamen, dass die MSC eine unterschiedliche T_H1 beziehungsweise T_H2 Antwort provozieren, wurden unidirektionale ELISPOT Assays durchgeführt. Hierzu wurden MSC in den M. gastrocnemius immunkompetenter BALB/C Mäuse injiziert und nach 5 Tagen wurden die Splenozyten der Tiere für den ELISPOT gewonnen. Die CL-MSC riefen hierbei im

direkten Vergleich aller 4 MSC Zelllinien die geringste Immunantwort sowohl in den T_H1 als auch in den T_H2 Zellen hervor.

In einem ELISPOT, in dem humane allogene PBMC als Responder fungierten, provozierten CB-MSC und WJ-MSC eine starke T_H1 Antwort. CL-MSC und P-MSC riefen eine geringe T_H1 Antwort hervor. Überraschenderweise war der HLA-Diskrepanz der CL-MSC zu den PBMC von allen 4 extraembryonalen MSC Linien am größten.

Die immunmodulatorischen Fähigkeiten wurden als Expression von HLA-E und HLA-G sowie als IDO, IL-2, IL-10 und TGFβ Sekretion untersucht.

Der NK-Zell-Ligand HLA-E erfuhr eine Heraufregulierung unter 25ng/ml IFNγ, welche jedoch nur bei den CB-MSC signifikant war. Die Heraufregulierung des HLA-G, welches mit dem immunsuppressiven Phänotyp der MSC assoziiert ist, unter 25ng/ml IFNγ Stimulierung war ebenfalls nur für die CB-MSC signifikant.

Die Produktion von IDO war bei den nativen Zellen nicht detektierbar und wurde unter dem Einfluss von IFNγ in allen 4 MSC Populationen gleichermaßen stark angehoben.

Interessanterweise konnte im ELISA bei allen 4 MSC Populationen kein IL-2 oder IL-10 detektiert werden, jedoch wurde eine TGFβ Produktion nachgewiesen. Die P-MSC zeichneten sich durch eine signifikant höhere TGFβ Sekretion aus als alle anderen untersuchten MSC Populationen (p<0,05).

Hinsichtlich der 4 verglichenen peripartalen extraembryonalen MSC Populationen zeigten sich die CL-MSC als am vielversprechendsten für weitere Forschung zur Anwendung in zellbasierten Therapien. Es ist bei der Auswahl peripartaler Gewebe für eine Transplantation und zellbasierte Therapien wichtig zu beachten welches peripartale Gewebe zur Gewinnung der Zellen genutzt wird.

4.4 Abstoßung von Zellen mit empfängerfremden Mitochondrien; eigene Studie.

Deuse T, Wang D, **Stubbendorff M**, Itagaki R, Grabosch A, Greaves LC, Alawi M, Grünewald A, Hu X, Hua X, Velden J, Reichenspurner H, Robbins RC, Jaenisch R, Weissman IL, Schrepfer S. SCNT-derived ESCs with mismatched mitochondria trigger an immune response in allogeneic hosts. *Cell Stem Cell*. 2015 Jan 8;16(1):33-8.

In der hier angeführten Studie handelt es sich um eine Vergleichsstudie hinsichtlich der Abstoßung unter Nutzung einer Methode, mit der Spenderzellen erzeugt und hierbei so prozessiert werden, dass sie dem Empfänger teilweise fremd sind. Die applizierten Zellen unterscheiden sich in ihren Mitochondrien von dem Empfänger. Die Zellen wurden durch somatischen Nukleustransfer erzeugt.

Die Erzeugung genetisch veränderter pluripotenter Zellen mittels SCNT kann in Mauszellen durchgeführt werden [Sato et al. 2005]. Für die vorliegend angeführte Studie wurde der SCNT wie bereits in der Literatur beschrieben durchgeführt [Kirak et al. 2010]. Bei der Methode des SCNT wird der Nukleus eines Fibroblasten in eine somatische Zelle, genauer eine Oozyte, aus der zuvor der Kern entfernt worden ist, verbracht [Noggle et al. 2011]. Unter Nutzung des SCNT Verfahrens sollen autologe pluripotente Stammzellen für spezifisch an den individuellen Patienten angepasste Therapien erzeugt werden.

Embryonale Stammzellen mit Nukleus Transfer (NT-ESC) konnten erfolgreich von der Maus erzeugt werden [Munsie et al. 2000]. Es ist bekannt, dass es zur Erzeugung gesunder NT-ESC notwendig ist, die Genexpression zwischen mitochondrialem und nukleärem Genom aufeinander abzustimmen [Woodson und Chory 2008, Innocenti et al. 2011].

Die vorliegende Studie wurde unter Nutzung von ESC der Maus, welche durch Nukleustransfer innerhalb der gleichen Mauslinie erzeugt wurden, sogenannten isoESC, und NT-ESC der Maus durchgeführt. Verglichen wurde hierbei die ausgelöste Abstoßungsreaktion, die die Zellen nach Applikation hervorriefen. Die Zellen wurden in verschiedenen Spender-Empfänger Kombinationen Mäusen appliziert. Es wurde unter Anderem die Applikation von empfängeridentischen isoESC, mit mitochondrial fremden NT-ESC, mit kernfremden NT-ESC und mit komplett fremden isoESC oder NT-ESC durchgeführt.

In der angeführten Arbeit konnte gezeigt werden, dass allogene Mitochondrien in murinen NT-ESC eine adaptive Immunantwort hervorrufen können, welche das Überleben von NT-ESC Grafts beeinträchtigt. Die genutzten NT-ESC wurden wie in der Literatur beschrieben [Kirak et al. 2010] erzeugt, indem der Zellkern aus B6D2F1 Oozyten entfernt wurde, wonach der Nukleus eines Fibroblasten von einer Balb/C Maus eingebracht wurde. Hieraus wurden dann in der Folge ESC erzeugt (NT-ESC). Als Vergleichszellen wurden in der Studie isoESC von BALB/C Mäusen genutzt.

Die Pluripotenz beider verwendeter Zelllinien wurde über die Detektierung von Pluripotenzmarkern auf der Zelloberfläche in der FACS Analyse und mittels Teratombildung in immuninkompetenten Mäusen nachgewiesen. In ELISPOT Assays konnte eine unterschiedlich starke Abstoßungsreaktion, welche in ihrer Ausprägung im Zusammenhang mit dem Haplotypunterschied zwischen dem Donor und dem Empfänger steht, nachgewiesen werden.

Um die Unterschiede in der zellulären Abstoßung darzustellen wurden unter der Verwendung von ganzen NT-ESC und isoESC ELISPOT Assays durchgeführt, in denen verschiedene Spender-Empfänger Konstellationen Betrachtung fanden.

Für die Darstellung der T_H1 - und T_H2 -Antwort auf Zellbestandteile (Mitochondrien und Zytosol) wurden Mitochondrien und Zytosol von einer definierten Zellzahl isoliert und als Stimulator-Agentien sowohl für die Injektion in die Maus, als auch im ELISPOT Assay selber verwendet.

In Anlehnung an die Medawar Experimente [Ribatti 2015] wurden neonatale Mäuse mit Mitomycin inhibierten NT-ESC injiziert um dann als erwachsene Tiere für die Durchführung eines ELISPOT Assays mit diesen Zellen re-injiziert zu werden. Eine Immuntoleranz auf die NT-ESC konnte auf diese Weise erreicht werden.

Zusammenfassend konnte innerhalb der hier angeführten Studie gezeigt werden, dass dem Empfänger fremde Mitochondrien in NT-ESC eine Alloantigenität besitzen, welche eine Abstoßungsreaktion auslöst. Die Alloimmunantwort des Empfängers gegen NT-ESC mit fremden Mitochondrien ist schwächer als die gegen gänzlich MHC fremde ESC. Ferner ist die Immunantwort adaptiv, sie ist gegen die Mitochondrien gerichtet und eine Toleranz kann induziert werden.

4.5 Abstoßung nach heterotoper Herztransplantation; eigene Studie.

Deuse T, Hua X, Taylor V, **Stubbendorff M**, Baluom M, Chen Y, Park G, Velden J, Streichert T, Reichenspurner H, Robbins RC, Schrepfer S. Significant Reduction of acute cardiac allograft rejection by selective Janus Kinase-1/3 inhibition using R507 and R545. *Transplantation* 2012;94:695-702.

Immunsupprimierende Medikamente erhöhen die Morbidität und Mortalität der Patienten, die einer Herztransplantation unterzogen wurden signifikant [Stehlik et al. 2010]. Neue Medikamente sollen durch ihre hohe Spezifität nebenwirkungsärmer sein, sie wirken an verschiedenen Punkten der Antigen präsentierenden Zelle (APC) - T Zell Interaktion [Halloran 2004]. Die Zielstrukturen dieser Medikamente schließen verschiedene Moleküle ein, wie zum Beispiel Thyrosinkinase, Mitogen-aktivierte Proteinkinase [Wang et al. 2007], Phosphoinositid-3-Kinase [Haidinger et al. 2011], sowie Chemokin-Rezeptoren [Li et al. 2011]. Bedauerlicherweise wurden trotz intensiver Forschung in der letzten Dekade keine neuen Medikamente zur Immunsupprimierung entwickelt, die Marktreife erlangt haben [Vincenti und Kirk 2008]. In Präklinischen Studien vielversprechende Substanzen wie FTY720 [Hoitsma et al. 2011] und FK778 [Guasch et al. 2010] versagten in klinischen Tests [Zeng et al. 2005, Pan et al. 2006]. Neue Zielmoleküle für die Immunsupprimierung stellen die im Zytoplasma vorliegenden Janus Kinasen (JAK) dar. Die JAK spielen in den Signalkaskaden vieler Zelloberflächenmoleküle, besonders bei Zytokinrezeptoren, eine wichtige Rolle [O'Shea et al. 2004]. Immunsuppressive Effektivität konnte für eine Vielzahl von JAK Inhibitoren gezeigt werden [Behbod et al. 2001, Borie et al. 2005, Deuse et al. 2008, Higuchi et al. 2005, Stepkowski et al. 2001, Velotta et al. 2009, Wang et al. 1999]. Die gesteigerte Selektivität für JAK1/3 und die Vermeidung der Beeinflussung von JAK2 stellt weiterhin eine Herausforderung in der Medikamentenentwicklung dar [Vincenti und Kirk 2008].

In dieser Studie wurden im Rattenmodell heterotop Herzen transplantiert um die Abstoßung nach Transplantation und die Beteiligung der T-Zellen zu beurteilen. Es wurden Herzen von Brown Norway Ratten in die Bauchhöhle von Lewis Ratten transplantiert. Bei der Transplantation von Brown Norway Ratten auf Lewis Ratten handelt es sich um eine High Responder Kombination, die Ratten weisen genetisch

hinsichtlich ihrer MHC Moleküle deutliche Unterschiede auf. Bei der hier gewählten Rattenstamm-Kombination handelt es sich um ein Modell für die akute Abstoßung, in der besonders die akut-zelluläre Abstoßung eine tragende Rolle spielt.

Eine Behandlung der Tiere wurde mit zwei neuen selektiven JAK1/3 Inhibitoren durchgeführt. Die Vergleichsgruppe wurde mit Tacrolimus, einem Calcineurininhibitor behandelt. Tacrolimus gilt momentan als Goldstandard unter den gegen T-Zellen gerichteten Immunsuppressiva nach Herztransplantation und andern Transplantationen solider Organe. Die beiden neuen JAK1/3 Inhibitoren tragen die Namen R507 und R545. Die neuen JAK1/3 Inhibitoren wurden unserer Arbeitsgruppe von dem Pharmakonzern Rigel zur Verfügung gestellt, woraus sich der Präfix „R“ ergibt, die darauf folgenden Nummern wurden den verschiedenen Ansätzen der Medikamente bei Rigel fortlaufend zugeteilt.

Um die Abstoßung beurteilen zu können, wurden die Tiere in eine 5-Tages-Studie und eine Survival-Gruppe eingeteilt. Die Tiere in den beiden Übergruppen wurden noch einmal in je 8 Untergruppen eingeteilt, wobei es eine Syngene Gruppe mit Transplantationen von Lewis zu Lewis Ratte gab, und sieben allogene in denen das Herz von einer Brown Norway Ratte in eine Lewis Ratte transplantiert wurde. Die allogenen transplantierten Tiere wurden wie folgt randomisiert in sieben Gruppen eingeteilt: keine Medikation, Tacrolimus Low Dose (LD), Tacrolimus High Dose (HD), R507 LD, R507 HD, R545 LD, R545 HD. Die Medikamentenapplikation erfolgte einmal täglich für Tacrolimus und zweimal täglich im Abstand von 12 Stunden im Falle der Rigel Präparate, gewichtsadaptiert oral mittels direkter Applikation in den Magen über eine Knopfkanüle.

Die Herztransplantate der Tiere mit 5 Tagen Beobachtungszeit wurden entnommen und für histologische Schnitte aufbereitet. Histologisch waren an HE gefärbten Paraffinschnitten der Herzen aus der 5-Tages Gruppe deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen. Mittels einer Bewertungsskala der International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) kann eine Klassifizierung des Grades der Abstoßung erfolgen [Maleszewski et al. 2011]. Das ISHLT Scoring zeigte, dass die Tiere, welche mit dem JAK1/3 Inhibitor R545 HD behandelt wurden die geringsten Myokardschäden im Sinne einer Abstoßung aufwiesen. In der allogenen, unbehandelten Gruppe wiesen die transplantierten Herzen an Tag 5 massive pathologische Anzeichen für eine akute Abstoßung auf. Das Myokard war zerstört, es

lag eine massenhafte Gewebeeinfiltration durch mononukleäre Zellen im Myokard vor, begleitet von Einblutungen und Ödembildung sowie Zeichen für eine Vaskulitis. Alle Behandlungsgruppen zeigten in ihrem ISHLT Scoring einen dosisabhängigen Effekt. Bei den HD Tieren aller Behandlungsgruppen waren die Effekte der Abstoßung deutlich geringer ausgeprägt.

Verglichen mit der unbehandelten Gruppe, in der es als Antwort auf die Donorantigene zu einer starken IFN γ , IL-4 und IL-17 Freisetzung durch Lymphozyten kam, konnte die IFN γ und IL-4 Freisetzung in allen Behandlungsgruppen signifikant verringert werden ($p < 0,001$), bei IL-17 gab es nur geringe Veränderungen. Diese systemische Abstoßungsreaktion wurde mittels ELISPOT Assay nachgewiesen.

In der Survival-Gruppe verlängerten alle drei Medikamentengruppen das Transplantatüberleben gleichermaßen signifikant verglichen mit der Gruppe ohne Behandlung von ($p < 0,05$). Die HD Gruppen ließen zudem ein signifikant längeres Transplantatüberleben verglichen mit den LD Gruppen zu ($p < 0,002$). Das Transplantatüberleben, in den survival Gruppen palpatorisch ermittelt als Herzschlag des Transplantates, konnte von 8 Tagen in der nicht behandelten allogenen Gruppe auf bis zu 25 Tage in der mit HD R507 behandelten Gruppe gesteigert werden.

In einem weiteren Versuch mit einer kombinierten Behandlung von R507 LD bzw. R545 LD mit Tacrolimus LD konnte das Transplantatüberleben sogar auf bis zu 30 Tage angehoben werden.

Die behandelten Tiere zeigten während des Behandlungszeitraumes keine äußerlichen Anzeichen von Nebenwirkungen wie Unwohlsein, gastrointestinalen Symptomen oder neurologischen Ausfallerscheinungen. In Blutaussstrichen konnten bei den R507 und R545 behandelten Tieren keine Veränderungen der Erythrozytenlevels, wie es für JAK-Inhibitoren beschrieben ist, beobachtet werden. Die Hämoglobinwerte bewegten sich ebenfalls im Normbereich. In allen drei HD Gruppen konnten jedoch Erhöhungen in den High Density Lipoprotein-Werten (HDL) und ein Absinken der Low Density Lipoproteine (LDL) beobachtet werden.

Eine Kombination von R507 LD bzw. R545 LD mit Tacrolimus LD verringerte die Nebenwirkungen und verlängerte das Transplantatüberleben auf bis zu 30 Tage. Die in den HD Gruppen auftretenden Verschiebungen in den Blutwerten konnten in den Kombinations-Gruppen nicht beobachtet werden.

Die Abstoßung der transplantierten Herzen ist in besonderem Maße T-Zell basiert, eine Abschwächung oder Unterdrückung der T-Zell-Reaktion verringert die Abstoßung signifikant. Die in dieser Studie verwendeten JAK1/3 Inhibitoren zeigen im Vergleich zu gängig angewendeten Immunsuppressiva in der vorliegenden Studie nur geringe Nebenwirkungen.

4.6 Modell für abstoßungsassoziierte Transplantat Vaskulopathie (TVP); Eigene Studie

Stubbendorff M, Deuse T, Hammel A, Robbins RC, Reichenspurner H, Schrepfer S. Orthotopic aortic transplantation: a rat model to study the development of chronic vasculopathy. J Vis Exp. 2010 Dec 4;(46).

In dieser Studie wird ein Modell beschrieben, in dem durch Transplantation der Aorta in Ratten eine T-Zell getriggerte Transplantat Vaskulopathie (TVP) entsteht. In Abhängigkeit der Wahl von Spender- und Empfängerstamm kann bei in Ratten durchgeführten Transplantationsstudien eine akute oder chronische Abstoßung immittiert werden. Bei Rattenstämmen, die als sogenannte High Responder Kombinationen bezeichnet werden, unterscheidet sich der MHC Typ stark, was zu einer starken Abstoßungsreaktion (akut) des präsentierten Spenderantigens führt. In sogenannten Low Responder Kombinationen besteht ein weniger stark ausgeprägter MHC Typ Unterschied, woraus ein milderer Verlauf der Abstoßung (chronisch) resultiert.

Das Modell der Aortentransplantation lässt die Untersuchung von abstoßungsassoziierten Vaskulopathien zu. Die orthotope Aortentransplantation wird hier als End-zu-End Anastomose durchgeführt. Die Möglichkeit die Vaskulopathie an einem isolierten Blutgefäß zu betrachten gibt dem Wissenschaftler eine hohe Vergleichbarkeit bei guter histologischer Auswertbarkeit.

Das Modell eignet sich vornehmlich für die Darstellung der Vaskulopathie wie sie in der chronischen Abstoßung nach Transplantation im Patienten manifest wird [Mennander et al. 1991]. Durch die funktionelle Transplantation der Aorta des Spenders in die Position eines Abschnitts der abdominalen Aorta des Empfängers ist hier ein physiologischer Blutdruck gegeben. Das Empfängerblut, welches post

Transplantationem durch die Spenderaorta fließt, beinhaltet alle an einer potentiellen Abstoßung beteiligten Zellen. Es kommen PBMC, die physiologisch an der Abwehr von Fremdartigen jeglicher Genese beteiligt sind, direkt mit dem Spendergewebe in Kontakt. An der Oberfläche der Zellen des Spenderblutgefäßes sind Moleküle exprimiert, die von den PBMC erkannt werden und einigen Zellpopulationen die Extravasation ermöglichen. Durch Extravasation gelangen so Immunzellen des Empfängers in die tieferen Schichten der Wand der Spendergefäßes, hier wird ein inflammatorischer Prozess in Gang gesetzt, welcher im Zusammenhang mit einer Abstoßung zu erwarten ist. Diese Infiltration von Empfängerimmunzellen in die Gefäßwand kann nach Explantation der Spenderaorta in histologischen Schnitten dargestellt und in seiner Intensität bewertet werden.

5 Übergreifende Diskussion

Mesenchymale Stroma Zellen haben in den letzten zwei Dekaden an Bedeutung für regenerative Therapien [Caplan 2007], als Immunmodulatoren in der Graft-versus-Host-Disease [Le Blanc et al. 2004, Le Blanc et al. 2004] sowie in der Therapie von Autoimmunerkrankungen [Urban et al. 2008] gewonnen. Verschiedene Stammzelleffekte werden auch für ihre kardioprotektive und kardioregenerative Wirkung verantwortlich gemacht, was diese Zellgruppe für den Einsatz in der Therapie des Herzens interessant macht. Mesenchymale und hämatopoetische Stammzellen vermitteln parakrine Effekte, dies geschieht durch die Produktion von Zytokinen [Burchfield und Dimmeler 2008]. MSC unterstützen über Angiogenesefaktoren die Revaskularisierung ischämischer Areale, stabilisieren die Extrazellulärmatrix und reduzieren das ventrikuläre Remodeling [Badorff und Dimmeler 2006]. Antiapoptotische Mediatoren werden von MSC sezerniert [Westenfelder und Togel 2011, Li et al. 2009].

In den vorliegenden Arbeiten wurden immunologische, immunmodulatorische und zellbiologische Parameter betrachtet. Diese Eigenschaften haben Relevanz für die Eignung von MSC verschiedener Genese zum Einsatz für regenerative zellbasierte Therapien.

Die Fähigkeit antiapoptotische Mediatoren zu sezernieren konnte in den vorliegenden Studien an der Sekretion von IDO, IL-10, TGF β sowie anderen Zytokinen gezeigt werden. Die gemessenen Daten bestätigen die Ergebnisse in der Literatur [Westenfelder und Togel 2011, Soulez et al. 2010, Li et al. 2009]. Besonders mittels der Steigerung der Produktion von IDO im entzündlichen Milieu, welches durch Zugabe von IFN γ *in vitro* initiiert wurde, sind MSC in der Lage T-Zellen, die eine Abstoßung applizierter Zellen bedingen, in ihrem inaktiven Zustand zu halten. Die negative Wirkung von Zytokinen auf die T-Zell Aktivierung konnte vielfach gezeigt werden [Jaronen und Quintana 2014, Holtzhausen et al. 2014], diese wird in der Literatur kontrovers im Zusammenhang mit verschiedenen Tumorerkrankungen diskutiert.

Die MSC sollen durch parakrine Effekte bei regenerativen Therapien auch das geschädigte Gewebe des Empfängers vor dem Niedergang bewahren. So kann die

Stammzelltransplantation beispielsweise über eine Aktivierung von ortsansässigen kardialen Stammzellen die endogene Myokardregeneration unterstützen [Engelmann und Franz 2006]. Durch die vielen benefiziellen Eigenschaften von MSC auf ischämisches Gewebe besteht ein großes wissenschaftliches Interesse in der Erforschung von therapeutischen Anwendungen nach einem Infarkt. Nach einer Ischämie kommt es zum Untergang von Zellen in dem betroffenen ischämischen Gewebe. Dies ist auch der Fall wenn eine Reperfusion stattgefunden hat. Je länger die Ischämie angedauert hat, bevor es wieder zur Reperfusion gekommen ist, desto höher ist die Zahl geschädigter Zellen. Der Herzinfarkt ist ein klassisches Beispiel für einen Ischämischen Schaden, beziehungsweise wenn es zu einer Wiedereröffnung der Blutgefäße durch Katheterisierung oder Wiederdurchblutung des Areals durch Bypass kam, ein klassisches Beispiel für Ischämie-Reperfusion. Herzmuskelzellen, die die funktionalen Zellen des Myokards darstellen, können sich nur sehr bedingt alleine regenerieren. Bei den Untersuchungen des kardialen Ischämie-Reperfusionsschadens kommen verschiedene Tiermodelle zum Einsatz. Die Ligation der Left Ventricular Arteria Descendens (LAD) ist hierbei ein gängiges Krankheitsmodell für die Untersuchung von Myokardinfarkten und wird an verschiedenen Spezies durchgeführt. Zu den gängigsten für die LAD Ligation verwendeten Labortieren gehören die Maus [Kolk et al. 2009, Xu et al. 2014, Van der Bogt et al. 2008], die Ratte [Jaquet et al. 2005, Joung et al 2007, Martinez et al. 2013] und das Schwein [Zhang et al. 2013, De Jung et al. 2014]. Es wurden in der Humanmedizin verschiedene kleine Studien mit MSC basierten Therapieansätzen durchgeführt [Rodrigo et al. 2013]. Aus den erhobenen, vielversprechenden Daten wuchs in der Folge der Ansatz einer Multi-Center Studie, dem PROMETHEUS Trial (The Prospective Randomized Study of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Patients Undergoing Cardiac Surgery) [Karantalis et al. 2014]. Im Rahmen des PROMETHEUS Trial wurden in verschiedenen Krankenhäusern weltweit mesenchymale Stroma-Zellen am Humanpatienten angewendet um die oben genannten Effekte für die Heilung zu nutzen. Autologe MSC wurden hierbei nach Myokardinfarkt und Reperfusion durch Wiederherstellung der Blutversorgung intramyokardial in die Infarktzone appliziert. Die MSC basierte Therapie in dem PROMETHEUS Trial bestätigt eine signifikant verbesserte Heilung, die sich in höherer LVEF (left ventricular ejection fraction), verringerter Narbengröße, verbesserter Durchblutung und

Kontraktilität im Vergleich zu Patienten die keine MSC Applikation erfahren haben zeigt [Karantalis et al. 2014]. Die Ergebnisse aus dem PROMETHEUS Trial bestätigen die MSC applikation als regenerative Therapie nach ischämischen Myokardschaden als erfolgversprechenden Ansatz. Mechanistisch machen gerade ihre antiapoptotischen Effekte die Stammzelltransplantation interessant für einen Einsatz in der Akuttherapie von Organen mit einer vergleichsweise niedrigen Zellerneuerungsrate, wie dem Herzen. Hier können MSC appliziert werden um nach Herzinfarkt ischämische Kardiomyozyten vor der Apoptose zu bewahren und die Größe der Infarkt Narbe so einzugrenzen [Chou et al. 2014].

Durch Verwendung von autologen, patienteneigenen unselektionierten mononukleären Knochenmarkszellen, welche auch MSC beinhalten, wird eine Immunreaktion gegen die transplantierten Zellen verhindert [Pileggi et al. 2013, Murphy et al. 2013]. Der Ansatz der autologen MSC Spende hat jedoch erhebliche Nachteile. Die zellbiologischen Eigenschaften der gewonnenen MSC können individuell sehr großen Schwankungen unterliegen und hängen unter Anderem vom Alter des Patienten, dessen Grunderkrankungen, und dem Gewinnungsverfahren ab.

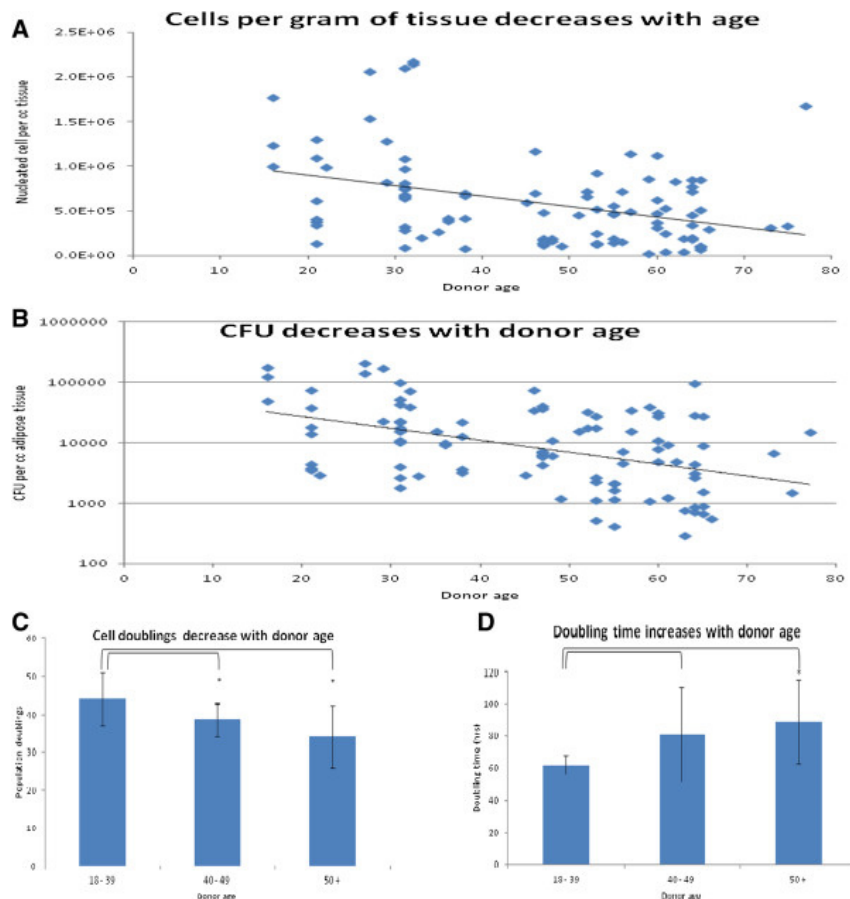


Abb. 15: Einfluss des Lebensalters auf Stroma Zellen aus Fettgewebe. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation [Choudhery et al. 2014]

A Zellzahl pro Gramm Gewebe sinkt mit steigendem Alter; **B** Koloniebildende Einheiten (CFU) sinken mit steigendem Spenderalter; **C** Zelldopplungsrate sinkt mit steigendem Spenderalter; **D** Zelldopplungszeit steigt mit steigendem Spenderalter

Die altersbedingten zellbiologischen Unterschiede zeigten sich eindrucksvoll in der hier eingebundenen Arbeit zum Vergleich von MSC aus dem Knochenmark eines Säuglings und denen von Patienten in einem Lebensalter von über 70 Jahren [Stubbendorff et al. 2015]. Die Proliferation und Migrationsgeschwindigkeit sinken mit steigendem Spenderalter signifikant, was sich nachteilig auf eine zellbasierte Therapie auswirken kann. Dies kann auch bei MSC Populationen aus anderen Spendergeweben als Knochenmark nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass sogar die Zahl an MSC im Fettgewebe mit steigendem Spenderalter abnimmt [Choudhery et al. 2014] (Abb. 15).

Ferner kann die Gewinnung von aufgereinigten Kulturen von MSC sehr zeitaufwändig sein, was die Verwendung in einer Akuttherapie mit autologen MSC bei plötzlich einsetzenden Krankheitszuständen, wie beispielsweise einem Myokardinfarkt, erschwert oder gar unmöglich macht.

Mesenchymale Stroma-Zellen (MSC) sind in der Lage das Immunsystem zu modulieren [Uccelli et al. 2006, Ren et al. 2012]. Diese Modulation geschieht über verschiedene Mechanismen, durch Hemmung der T-Zell Aktivierung, Proliferation und Funktion [Rasmusson et al. 2003, Rasmusson et al. 2005, Kampera et al. 2003, Bartholomew et al. 2002, Glennie et al. 2005], Hemmung der NK-Zell Proliferation und Zytotoxizität [Sotiropoulou et al. 2006], sowie der B-Zell Proliferation und Differenzierung [Asari et al. 2009]. Darüber hinaus können MSC verschiedene immunsuppressive Mechanismen auslösen, dies geschieht zum Beispiel durch Induktion regulatorischer T-Zellen [English und Wood 2009] oder die Leitung der Dendritischen Zellen in einen immunsuppressiven Phänotyp [Wang et al. 2008]. Ein Veto-Effekt auf T-Zellen in einer MLR konnte demonstriert werden [Potian et al. 2003, Deuse et al. 2010]. Die Zahl der sich im Knochenmark befindenden MSC und ihr Potenzial zur Selbsterneuerung sinken jedoch mit steigendem Spenderalter [Rao und Mattson 2001]. Die Wirkung auf T-Zellen wurde in den vorliegenden Arbeiten in verschiedenen Assays wie beispielsweise dem ELISPOT betrachtet.

Das Spenderalter bedingt bei den aus Knochenmark isolierten Zellen im Wesentlichen zellbiologische Veränderungen. Immunologische oder immunmodulatorische Verschlechterungen sind altersbedingt nicht detektierbar, wie in der hier vorgestellten Studie bei dem Vergleich von aus Knochenmark erzeugten MSC eines gesunden

Säuglings mit denen multimorbider Patienten fortgeschrittenen Lebensalters gezeigt werden konnte. Der Verlust, beziehungsweise die Abschwächung von Proliferationsfähigkeit, Migrationsfähigkeit, Adhäsion und angiogenetischer Kapazität mit fortgeschrittenem Spenderalter konnte hier in verschiedenen Versuchen eindrucksvoll dargestellt werden [Stubbendorff et al. 2015].

In einem direkten Vergleich von aus dem Knochenmark isolierten MSC mit aus Nabelschnurgewebe gewonnenen MSC zeigte sich, dass Zellen aus dem Nabelschnurgewebe immunprivilegiert sind. In der von uns durchgeführten Studie [Deuse et al. 2010] konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die aus der Nabelschnur isolierten MSC weniger immunogen und stärker immunmodulatorisch aktiv sind, als die aus dem Knochenmark isolierten MSC. In den *in vivo* Versuchen konnte dies durch die von den Nabelschnurzellen hervorgerufene schwächere Reaktion der T-Zellen und die dadurch bedingte längere Überlebensdauer im immunkompetenten Empfängertier verifiziert werden. Den vorliegenden Ergebnissen zufolge ergibt sich die Hypothese, dass sich Zellpopulationen genetisch junger Quellen besser für eine Applikation in zellbasierten regenerativen Therapien eignen als solche älterer, multimorbider Spender. Durch die niedrigere Ausprägung immunologisch relevanter Oberflächenantigene bei gleichzeitig stärkeren immunmodulatorischen Fähigkeiten eignen sich nach den hier gewonnenen Erkenntnissen die aus der Nabelschnur generierten MSC besser für eine Fremdspeise als die anderen in dieser Arbeit betrachteten Zellen.

Die Nabelschnur setzt sich aus verschiedenen Geweben zusammen, die in engem Kontakt mit weiteren peripartalen Geweben, wie den Eihäuten und der Plazenta stehen [Salge et al. 2013]. Aufgrund der Funktion der peripartalen extraembryonalen Gewebe liegt die Vermutung nahe, dass all diese Gewebe in ähnlichem Maße immunprivilegiert sind um eine Gravidität vor dem Immunsystem der Mutter zu schützen. Die MSC, welche in der durchgeführten vergleichenden Studie untersucht wurden, wurden nach unterschiedlichen Protokollen gewonnen, was einen Einfluss auf ihre Eigenschaften haben kann [Keck et al 2014, Busser et al. 2014, Zachar et al. 2011]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es sich bei MSC um keine homogene Zellgruppe handelt, sondern diese je nach Ausgangsmaterial aus dem sie isoliert wurden deutliche

Unterschiede aufweisen [Kern et al. 2006, Hegyi et al. 2010, Da Silva Meirelles et al. 2008].

In der hier beschriebenen Studie konnte gezeigt werden, dass alle verglichenen extraembryonalen MSC Populationen nativ und IFN γ stimuliert moderate Ausprägung von HLA-ABC aufwiesen, niedrige Ausprägung von HLA-DR und keine costimulatorischen Marker trugen, dies war jedoch bei den CL-MSC am deutlichsten. In der *in vivo* xenogenen Immunantwort in der Maus riefen die CL-MSC ebenso die schwächste Antwort hervor. Die Expression tolerogener Faktoren war bei den CL-MSC am prominentesten.

Die peripartalen extraembryonalen MSC zeigen in der hier beschriebenen Studie [Stubbendorff et al. 2013] ein unterschiedliches Potential der Empfänger-Immunantwort zu entkommen. Die HLA Moleküle spielen in besonderem Maße eine tragende Rolle in der Abstoßung und sollten daher bei der Auswahl einer für eine Transplantation geeigneten Zellpopulation auf der nativen und der IFN γ Stimulierten Zelle besonderes Augenmerk erfahren.

Für eine allogene Transplantation sollten die Zellen möglichst wenig immunogen sein um dem Empfängerimmunsystem zu entkommen. Die immunmodulatorischen Fähigkeiten spielen hierbei eine entscheidende Rolle im Sinne eines Selbstschutzes der transplantierten Zellen vor den Immunzellen des Empfängers und sollten daher idealerweise besonders stark ausgeprägt sein. Eine hohe Proliferationsrate der Zellen ist für eine effektive zellbasierte Therapie von Vorteil, da diese dafür sorgt, dass die applizierten Zellen länger im Empfänger vorliegen. Migratorische Fähigkeiten erleichtern ein Einwandern und eine gute Verteilung im Zielgewebe. Proliferation und Migration beeinflussen den Verlauf der Therapie in der Behandlung mit allogenen und autologen Spenderzellen gleichermaßen.

Eine hohe Anzahl von Adhäsionsmolekülen ist vorteilhaft für eine Extravasation der transplantierten MSC. Viele Therapien basieren auf einer Applikation von Zellen in die Blutbahn [Avritscher et al. 2013, Kim et al. 2013], die Zellen müssen demnach zunächst aus den Blutgefäßen in das Zielgewebe einwandern. Wie in den hier vorliegenden Arbeiten gezeigt, erhöht das Vorhandensein eines entzündlichen Milieus

die Ausprägung von Oberflächenmolekülen, die an der Adhäsion und somit an der Extravasation beteiligt sind.

Viele regenerative zellbasierte Therapien haben eine Wiederdurchblutung ischämisch geschädigten Gewebes zum Ziel [Duffy und Herron 2013, Qin et al. 2013]. Für eine dauerhafte Wiederdurchblutung ist eine Angiogenese getriggert durch MSC therapiebegünstigend. MSC unterstützen die Angiogenese und helfen so bei der Wiederdurchblutung kleiner ischämischer Areale.

MSC erfüllen zusätzlich die Funktion eines Vehikels, welches durch die temporäre Anwesenheit lokal Zytokine ausschüttet, die ihrerseits beispielsweise Herzmuskelzellen, die im Untergang begriffen sind, am Leben erhalten und so die Größe der Infarktnarbe verringern [Deuse et al. 2009]. Die Verringerung der Größe der Infarktnarbe führt zu einer besseren Pumpfunktion des Herzes was auch nach der Applikation am Humanpatienten beobachtet werden konnte [Deuse et al. 2009, Karantalis et al. 2014].

Die MSC befinden sich nach Applikation in einem Milieu, welches für ihr Überleben nicht optimal ist, dies führt dazu, dass sie im Falle einer allogenen Spende sehr schnell abgestoßen werden [Deuse et al. 2010]. Im Falle einer autologen Spende, in der die MSC keiner zellvermittelten oder antikörpervermittelten Abstoßung unterliegen, gehen sie massenhaft zugrunde [Deuse et al. 2010]. Dies konnte in der Applikation von MSC in SCIDbeige Mäuse gezeigt werden, in der es trotz Abwesenheit der maßgeblich an der Abstoßung beteiligten Zellpopulationen zu einem graduellen Absterben der MSC kam. In der kurzen Zeit, in der die Zellen vorliegen, üben sie jedoch schon einen positiven parakrinen Effekt auf die Gewebeheilung aus [Deuse et al. 2009].

Werden MSC im Sinne einer allogenen Knochenmarkspende zum Beispiel im Rahmen einer therapeutischen Behandlung einer Leukämie appliziert, so wurde zuvor das Immunsystem des Empfängers medikamentös und durch Bestrahlung unwiederbringlich entfernt. Durch diese Entfernung kommt es hier nicht zu einer Abstoßung durch die Immunzellen des Empfängers. Als Vorbereitung auf eine Knochenmarkspende ist der Empfänger maximal immunsupprimiert, somit können die MSC, beziehungsweise das Spenderknochenmark in die Knochen des Empfängers einwandern [Benyamini und Rowe 2013]. Dieses Verhalten wird auch als Homing

bezeichnet, die Spenderzellen finden im Empfänger die Nische, in der sie die bestmöglichen Überlebensbedingungen vorfinden [Yagi et al. 2010]. Da die MSC hier optimale Bedingungen für ein Überleben vorfinden, wachsen sie an und differenzieren teilweise in Blutzellprogenitoren. Unterscheidet sich das gespendete Knochenmark in seinem HLA Typ von seinem Empfänger, werden dessen Körperzellen durch die neu entstehende Lymphozytenpopulation als fremd erkannt und abgestoßen, dieser Vorgang wird als Graft-versus-Host Disease (GvHD) bezeichnet [Machaczka et al. 2013].

Bei zellbasierten Therapien ohne vorherige Immunsuppression, wie sie als regenerativer Therapieansatz durchgeführt werden, kommt es nicht zu einer GvHD. Die applizierten MSC verrichten ihre parakrinen Effekte und werden dann graduell durch die Zellen des Empfängerimmunsystems entfernt. Schon nach kurzer Zeit können in einem solchen Fall keine verbliebenen Spender MSC mehr nachgewiesen werden, obschon eine verbesserte Gewebeheilung messbar ist, welche auf parakrine Effekte der Zelltherapie zurückzuführen ist.

Die an einer Abstoßungsreaktion bei allogener MSC Applikation ohne vorherige Entfernung des Empfängerimmunsystems und auch bei solider Organtransplantation maßgeblich beteiligte Zellpopulation sind die T-Zellen des Empfängers [Aoyama et al. 2013]. Die an der Abstoßung bei der GvHD beteiligten T-Zellen sind die des Spenders. T-Zellen stellen eine Untergruppe der weißen Blutzellen dar, die der Immunabwehr dient und gehören gemeinsam mit den B-Zellen zum erworbenen Immunsystem. Demzufolge lernen T-Zellen gegen welche Agentien sich ihre Aktivität richten soll. T-Zellen erkennen körperfremde Stoffe, wenn deren Antigene auf der Oberfläche anderer Zellen an deren MHC gebunden sind. Freie Antigene werden dann erkannt, wenn sie von antigenpräsentierenden Zellen gezeigt werden.

Im Rahmen einer Transplantation von soliden Organen wird eine medikamentöse Immunsupprimierung vorgenommen, die dazu dient die T-Zell vermittelte Abstoßung des Transplantates zu unterdrücken. Exemplarisch ist hier die heterotope Herztransplantation im Rattenmodell angeführt. Die gängigen Immunsuppressiva haben besonders in der Langzeiteinnahme erhebliche Nebenwirkungen zur Folge [Hetzer und Delmo 2013, Zarrinpar und Busuttill 2013]. Zu den gängigsten Immunsuppressiva gehören Ciclosporin, Tacrolimus und Sirolimus. Ciclosporin wirkt

über die Unterdrückung von Calcineurin, hierüber wird die IL-2 Produktion und die Aktivierung von TGF β herabgesetzt, was wiederum zu einer Verminderung in der T-Zell Antwort führt. Tacrolimus ist ein Makrolid, das ebenfalls zur Wirkstoffgruppe der Calcineurininhibitoren gehört, es ist jedoch potenter als Ciclosporin und ruft weniger Nebenwirkungen hervor. Bei Sirolimus (Rapamycin) und Everolimus handelt es sich ebenfalls um Makrolide, sie gehören zu den mammalian Target Of Rapamycin (mTOR)-Inhibitoren und unterdrücken gezielt die T-Zell Vermehrung. Zu den durch Calcineurininhibitoren hervorgerufenen Nebenwirkungen zählen Nierenschäden, Veränderungen der Blutwerte, Hautveränderungen, Myelosuppression und viele mehr [Issa et al. 2013, Bumbacea und Ghiordanescu 2013]. Zum Nebenwirkungsprofil der mTOR-Inhibitoren zählen Stomatitis, Hautausschläge, Abgeschlagenheit, Hyperlipidämie und Myelosuppression sowie kardiovaskuläre Schäden [Paplomata et al. 2013, Holdaas et al. 2012]. Nach Transplantation solider Organe im Erwachsenenalter ist eine starke Immunsuppression unverzichtbar um durch T-Zellen hervorgerufene Transplantatschäden zu verringern. Aufgrund der Nebenwirkungsprofile gängiger immunsuppressiv wirkender Präparate wird an neuen Medikamenten mit neuen spezifischeren Wirkmechanismen geforscht. Ziel ist hier eine weitere Verbesserung des Transplantatüberlebens bei Reduzierung der Nebenwirkungen. Eine neue Substanzklasse, die Janus Kinase 1/3 (JAK1/3) Inhibitoren wird in einer der hier eingebundenen Arbeiten am Modell der heterotopen Herztransplantation der Ratte untersucht [Deuse et al. 2012]. Diese Studie soll die Mechanismen der Abstoßung solider Organe verdeutlichen und veranschaulichen, dass transplantierte Zellen auf gleiche Weise abgestoßen werden. Ferner wird im Rattenmodell der TVP der Ablauf einer Abstoßung am Blutgefäß demonstriert.

Anders als bei Eingriffen wie zum Beispiel einer Knochenmarksspende, bei der es sich um eine Lebendspende ohne Folgeschäden für den Donor handelt und bei der versucht wird, einen genetischen Zwilling zu identifizieren, ist das genetische Matching bei der Transplantation solider Organe nicht in diesem Umfang möglich. Nach der soliden Organtransplantation ist eine starke Immunsupprimierung des Patienten unumgänglich.

Eine Stammzelltherapie zur Geweberegeneration, beziehungsweise eine lokale Behandlung mit MSC würde hinsichtlich ihres Therapieerfolges eine

Immunsupprimierung nicht rechtfertigen. Eine Behandlung mit hoch dosierten Immunsuppressiva wäre nach einem schweren Eingriff wie beispielsweise einer Bypass Operation kontraindiziert. Eine Behandlung mit solch nebenwirkungsbehafteten Präparaten würde den Patienten erheblichen zusätzlichen Risiken wie schweren Infektionen aussetzen, wobei die Nebenwirkungen in ihrer Manifestation vermutlich den positiven Effekt der MSC übersteigen würden. Eine Abstoßung der MSC könnte mittels des Einsatzes von Immunsuppressiva verringert werden, dennoch würden die applizierten MSC graduell absterben, da sie sich nach Applikation nicht in einem idealen Milieu befinden.

In den hier gezeigten Studien wurden MSC insbesondere hinsichtlich ihrer Immunogenität sowie ihrer immunmodulatorischen Kapazität betrachtet, die Zellpopulation, welche am wenigsten immunogen und am effektivsten immunmodulatorisch tätig ist, wäre die am besten geeignete MSC für die allogene Anwendung und für weitere Alterationen hin zur universellen Donorzelle.

Neben den MSC wurden in der vorliegenden Arbeit SCNT diskutiert, die hier zum Proof of Principle zeigen, dass selbst eine Zelle, die dem Empfänger nur teilweise fremd ist, eine Abstoßungsreaktion auslöst. Zellen, die dem Empfänger nur in ihren Mitochondrien fremd sind, werden nach den vorliegenden Ergebnissen ebenfalls T-Zell basiert abgestoßen.

Zukünftige Strategien könnten genetische Veränderungen an den Spenderzellen sein, die dazu führen würden, dass diese nicht durch die T-Zellen des Empfängers erkannt würden. Hierzu wäre eine Option die Unterdrückung der HLA I Expression auf der Zelloberfläche [Beyer et al. 2004, Deuse et al. 2011, Gonzales et al. 2005].

Eine weitere Strategie wäre eine Veränderung der Spenderzelle hin zu einer Überexpression immunmodulatorischer Eigenschaften. Eine Zelle, die in verstärktem Maße immunmodulatorisch tätig ist würde ihren eigenen Schutz gegen die T-Zellen des Empfängers bei sich tragen und könnte so einer Abstoßung entkommen. Ein interessantes Enzym für diesen Selbstschutz wäre das IDO, es wird von den Zellen selber als Reaktion auf IFN γ , welches bei einer Entzündungsreaktion lokal vorliegt, sezerniert. IDO ist in der Lage Tryptophan zu oxidieren und so den T-Zellen den nötigen Nährstoff für eine Aktivierung zu entziehen, als Folge liegen zwar T-Zellen vor,

diese ruhen jedoch und können nicht im Sinne einer Abstoßung aktiv werden [Orabona und Grohmann 2011, Orabona et al. 2012, Braun et al. 2005].

Momentan ist eine autologe Spende als effizienteste Möglichkeit anzusehen, einer immunologisch vermittelten Abstoßung der MSC zu entkommen und gleichzeitig hierdurch über einen längeren Zeitraum von den parakrinen Effekten der MSC zu partizipieren. Wird eine universell applizierbare MSC entwickelt, so könnte diese in unvorhersehbaren Erkrankungen, die einer Akuttherapie bedürfen, zum Einsatz kommen. Ein Beispiel für einen solchen Einsatz einer universellen Spenderzelle wäre die Akuttherapie nach Myokardinfarkt, wie sie mit autologen Zellen bereits erfolgreich durchgeführt wird [Karantalis et al. 2014].

Für die Anwendung in der Veterinärmedizin wäre zum jetzigen Zeitpunkt eine autologe Spende das Mittel der Wahl. Wie im Vergleich von MSC aus dem Knochenmark verschieden alter Spender gezeigt werden konnte, sind die zellbiologischen Parameter der MSC älterer Spender zwar abgeschwächt im Vergleich zu sehr jungen Spendern, dennoch sind sie vorhanden und begünstigen eine Heilung bei regenerativen Therapien.

6 Ausblick

Zukünftig wird der Trend in der Veterinärmedizin Tiere nach Humanstandards zu behandeln weiter zunehmen. Schon jetzt werden in der Humanmedizin verschiedene Erkrankungen mit MSC erfolgreich therapiert [Karantalis et al. 2014]. Einige der mit MSC therapierbaren Erkrankungen kommen auch bei den Haustieren vor und bilden demzufolge neue Therapiefelder in der Veterinärmedizin [Kim et al. 2013, Ryu et al. 2012, Webster et al. 2012].

In der Pferdemedizin kommen MSC schon zur Behandlung von Traumata des Bewegungsapparates zum Einsatz [De Schauwer et al. 2013, De Schauwer 2015, Radtke et al. 2013]. Bei den MSC basierten Therapien handelt es sich noch um einzelne Studien mit nur kleinen Behandlungsgruppen, dennoch ist gerade dieser Einsatz aufgrund seiner wirtschaftlichen Bedeutung zukunftsweisend [Stewart 2011, Taylor und Clegg 2011]. So könnten beispielshalber Sportpferde mit wertvollem genetischem Hintergrund nach einem Sturz mit Verletzungen des Bewegungsapparates schneller wieder für eine Nutzung als Zuchttier zur Verfügung stehen. Bei weiterer Verbesserung der Rahmenbedingungen zellbasierter regenerativer Therapien zum Beispiel durch Entwicklung von Matrices, in denen MSC appliziert werden, wird es zukünftig zu einer gänzlichen Heilung verschiedener Erkrankungen des Bewegungsapparates in der Pferdemedizin kommen. Eine vollständige Genesung ermöglicht dann einen Wiedereinsatz von therapierten Pferden im Sport.

In der Humanmedizin wird an einer Vielzahl von Indikationen wie beispielsweise an der Einsetzbarkeit von MSC für eine schnellere Wundheilung nach großflächigen Hautverlusten geforscht [Xue et al. 2013, Shohara et al. 2012, Kim et al. 2013]. Die Indikation der Wundheilung kann auch in der Kleintierklinik aufgrund verschiedener Erkrankungen und Traumata gegeben sein.

Ein Einsatz autologer MSC könnte in der Veterinärmedizin in naher Zukunft regelhaft als Therapie in Frage kommen [Webster et al. 2012].

7. Zusammenfassung

Mesenchymale Stroma Zellen (MSC) haben in der letzten Dekade an Bedeutung für regenerative zellbasierte Therapien gewonnen. Zusammengefasst zeigen die hier präsentierten Studien, dass MSC verschiedener Genese sich in ihren immunologischen, immunmodulatorischen und zellbiologischen Eigenschaften unterscheiden. Die hier diskutierten Studien beleuchten die immunologischen, immunmodulatorischen und zellbiologischen Fähigkeiten von MSC verschiedener Genese hinsichtlich ihrer Eignung für zellbasierte Therapien. Die Ergebnisse lassen die Identifizierung der aus dem Nabelschnurgewebe gewonnenen MSC (cIMSC, CL-MSC) als die am besten für eine allogene Transplantation für regenerative Therapien geeigneten Zellen zu.

Die Eigenschaften von MSC aus Knochenmark junger Spender, Spender fortgeschrittenen Lebensalters und älterer multimorbider Spender wurde betrachtet, ferner wurden MSC aus peripartalen Geweben wie Nabelschnurgewebe, Wharton's Sulze, Nabelschnurblut und Plazenta untersucht.

Zunächst wurden alle Zellen nach den Vorgaben der International Society for Cellular Therapy [Dominici et al. 2006] hinsichtlich der minimalen Anforderungen für MSC Charakterisiert. Außerdem wurden der Phänotyp, die Proliferationsrate, die Migrationsfähigkeit und die Adhäsion an Endothelzellen, Immunogenität und immunmodulatorische Fähigkeiten und auch die xenogene *in vivo* Immunaktivierung, untersucht.

Unter allen untersuchten MSC zeigten die cIMSC eine signifikant niedrigere HLA-ABC Expression, eine stärkere Produktion der tolerogenen Zytokine TGF β und IL-10 und zeigten darüber hinaus eine signifikant schnellere Proliferation. Die *in vitro* Aktivierung von Lymphozyten und die xenogene *in vivo* Immunaktivierung durch die cIMSC war signifikant schwächer.

Die Stimulierung mit 25ng/ml IFN γ verstärkte die immunogenen Eigenschaften der cIMSC, durch Erhöhung von HLA-ABC und HLA-DR, hob jedoch gleichzeitig die tolerogenen Eigenschaften mit an. Die Expression von HLA-E und HLA-G wurde verstärkt, es wurde mehr TGF β und IL-10 ausgeschüttet und gleichzeitig kam es zu einem Anstieg von IDO. Höhere Konzentrationen von IFN γ (>50ng/ml) verstärkten

diesen tolerogenen Effekt noch und gleichzeitig verringerte sich die Expression der immunogenen Oberflächenmoleküle. Der Veto-Effekt von MSC wird durch steigende IFN γ Mengen angehoben.

Unterschiede zwischen den in den verschiedenen Studien untersuchten MSC konnten in der Differenzierungsfähigkeit, der Proliferation, sowie der Migration festgestellt werden, wobei die cMSC die höchsten Raten aller getesteten MSC Populationen aufwiesen. Darüber hinaus zeigte sich bei den cMSC das größte longitudinale Überleben nach xenogener Transplantation, was im Zusammenhang mit der niedrigen ausgelösten T_H1 und T_H2 Antwort steht.

Im Vergleich zeigen die cMSC die besten Charakteristika für die Anwendung in zellbasierten Therapien, sie sind hypoimmunogen und proliferieren und migrieren gut. Zusätzlich haben die cMSC eine gute immunmodulatorische Kapazität.

Eine genauere Betrachtung der Abstoßung wurde bei der Applikation von Zellen, die dem Empfänger nur in Teilen fremd waren vorgenommen. Hier wurden Zellen, die dem Empfänger gänzlich fremd waren, solche mit einem fremden Zellkern, Zellen mit fremden Mitochondrien und mit dem Empfänger identische Zellen nach Applikation untersucht. Die Erzeugung von Zellen mit unterschiedlicher mitochondrialer DNA war durch Verwendung der SCNT Technik möglich.

Die Prozesse der Abstoßung von transplantierten MSC entsprechen mechanistisch denen der soliden Organtransplantation, um dies zu verdeutlichen wurde eine Studie zur Abstoßung nach Herztransplantation in diese Arbeit aufgenommen. Ferner wurde mit dem Aortentransplantations-Modell in der Ratte eine Möglichkeit der Untersuchung der Transplantatvaskulopathie eingebracht. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass immunologisch viele Parallelen in der Abstoßung von soliden Organen und Einzelzellen bestehen, können für beide Therapiefelder ähnliche Lösungsansätze beforscht werden.

Zusammenfassend zeigen die aus Nabelschnurgewebe isolierten MSC ein besseres immunogenes Profil und stärkeres immunsuppressives Potential als aus Knochenmark isolierte MSC. Unter den aus peripartalen Geweben isolierten MSC zeigten sich die MSC aus Nabelschnurgewebe als die vielversprechendsten Zellen für zellbasierte Therapien. Überraschenderweise haben bei den aus Knochenmark isolierten MSC

Spenderalter und Spendermorbidity keinen Einfluss auf die immunologische und immunmodulatorische Kapazität, aber auf die zellbiologischen Eigenschaften wie Proliferation und Migration, Angiogenese und Adhäsion. Aufgrund der hier angeführten Ergebnisse kann postuliert werden, dass die MSC aus Nabelschnurgewebe die vielversprechendsten MSC für Zellbasierte Therapien sind, dennoch werden aus dem Knochenmark isolierte MSC weiterhin die Zellen der ersten Wahl für autologe Zelltherapien bleiben, es sei denn die Nabelschnur des Patienten wurde zum Zeitpunkt seiner Geburt bereits kryokonserviert.

8. Summary

Mesenchymal stromal cells (MSC) have gained attention for regenerative therapies over the past decade. The studies presented here display that in MSC of different origin the immunological and biological criteria can be very different. These findings are leading to the identification of the cord lining derived MSC (cIMSC, CL-MSC) as the MSC source yielding the most suitable cells for allogeneic transplantation for regenerative therapies.

Here an immunologic comparison for properties and suitability for cell based therapies between human MSC derived from bone marrow of young, elderly and multi-morbid elderly patients, as well as gestational extra embryonic tissues such as cord lining material, Wharton's jelly, cord blood and placenta is presented.

At first all cells were characterized to meet the minimal criteria of MSC, which were defined in a position statement of the International Society for Cellular Therapy [Dominici et al. 2006]. Furthermore the phenotype, proliferation rate, migration capacity, adhesion to endothelial cells, immunogenicity and immunomodulatory capabilities as well as xenogeneic *in vivo* immune activation were tested.

Among the MSC populations tested, cIMSC had significantly lower HLA-ABC expression, higher production of tolerogenic TGF β and IL-10, and showed significantly faster proliferation. *In vitro* activation of allogeneic lymphocytes and xenogeneic *in vivo* immune activation was significantly weaker.

IFN γ at 25 ng/ml increased both immunogenicity by upregulation of HLA-ABC / HLA-DR expression and tolerogenicity by increasing HLA-G and HLA-E expression, augmenting TGF β and IL-10 release, and inducing IDO expression. Higher concentrations of IFN γ (>50 ng/ml) further enhanced the immunosuppressive phenotype of cIMSCs, more strongly downregulating HLA-DR expression and further increasing IDO production. The veto function of MSC is enhanced in escalating IFN γ environments.

Differences were noted in differentiation, proliferation, and migration, with cIMSCs showing the highest proliferation and migration rates resulting in all MSC lines tested. Moreover, CL-MSCs showed a prolongation in survival in xenogeneic Balb/C mice, which was attributed to their ability to dampen T_H1 and T_H2 responses.

In summary, cIMSCs showed the best characteristics for cell-based therapeutic strategies, as they are hypo-immunogenic and show high proliferation and migration rates. In addition, cIMSC have measurable immunomodulatory effectiveness.

A more detailed picture of rejection was given in a study in which the recipient was injected with cells that were only partially different from his own. Here cells were injected that were completely unknown to the recipient, others that had a foreign nucleus, another group of cells had foreign mitochondria and the last group was autologous. To create cells carrying foreign mitochondrial DNA the SCNT technique was used.

The mechanisms of rejection after MSC transplantation are comparable to those after solid organ transplantation, to highlight this, a study about rejection after cardiac transplantation was integrated. Moreover via the aortic transplantation model in the rat a technique was introduced to evaluate transplantation vasculopathy. Taking into consideration that there are many common immunological mechanisms in the rejection after solid organ transplantation and single cell application, for both therapeutical fields common solutions to overcome rejection can be searched for.

In conclusion, cord lining derived MSC show a more beneficial immunogenic profile and stronger overall immunosuppressive potential than bone marrow derived MSC. Among the extraembryonic tissue derived MSC the cord lining derived MSC seem to be the most promising candidates for cell based therapies. Surprisingly among the bone marrow derived MSC the donor age and morbidity do not have an impact on the immunological and immunomodulatory capacity, but on proliferation and migration capability as well as angiogenesis and adhesion. In consequence of the findings one can postulate that the cord lining derived MSC are the most promising cells for cell based therapies, nevertheless bone marrow derived MSC are the recommended cells for autologous cell therapies if no umbilical cord of the patient has been cryo preserved.

9. Literaturverzeichnis

Abbott CP, Lindsey ES, Oscar Creech J, De Witt CW (1964) A Technique for heart transplantation in the rat. *Surgery* 89:645-52.

Amsalem Y, Mardor Y, Feinberg MS, Landa N, Miller L, Daniels D, Ocherashvili A, Holbova R, Yosef O, Barbash IM, Leor J (2007) Iron-oxide labeling and outcome of transplanted mesenchymal stem cells in the infarcted myocardium. *Circulation*. 116(11):138-45.

Ankrum JA, Ong JF, Karp JM (2014) Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol*. 32(3):252-60.

Aoyama K, Saha A, Tolar J, Riddle MJ, Veenstra RG, Taylor PA, Blomhoff R, Panoskaltsis-Mortari A, Klebanoff CA, Socié G, Munn DH, Murphy WJ, Serody JS, Fulton LM, Teshima T, Chandraratna RA, Dmitrovsky E, Guo Y, Noelle RJ, Blazar BR (2013) Inhibiting retinoic acid signaling ameliorates graft-versus-host disease by modifying T-cell differentiation and intestinal migration. *Blood*. 122(12):2125-34.

Asari S, Itakura S, Ferreri K, Liu CP, Kuroda Y, Kandeel F, Mullen Y (2009) Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Exp Hematol* 37(5):604-15.

Avritscher R, Abdelsalam ME, Javadi S, Ensor J, Wallace MJ, Alt E, Madoff DC, Vykoukal JV (2013) Percutaneous Intraportal Application of Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells Using a Balloon Occlusion Catheter in a Porcine Model of Liver Fibrosis. *J Vasc Interv Radiol*. 24(12):1871-8.

Ayala-Lugo A, Tavares AM, Paz AH, Alegretti A, Miquelito L, Bock H, Giuliani R, Clausell N, Cirne-Lima E, Rohde LE (2011) Age-dependent availability and functionality of bone marrow stem cells in an experimental model of acute and chronic myocardial infarction. *Cell Transplant* 20(3):407-19.

Badoff C, Dimmler S (2006) Neovascularization and cardiac repair by bone marrow-derived stem cells. *Handb Exp Pharmacol* (174):283-98.

Bari R, Hartford C, Keung Chan W, Vong Q, Li Y, Gan K, Zhou Y, Cheng C, Kang G, Shurtleff S, Turner V, Pui CH, Downing JR, Leung W. (2015) Genome-wide single-nucleotide polymorphism analysis revealed SUFU suppression of acute graft-versus-host disease through downregulation of HLA-DR expression in recipient dendritic cells. *Sci Rep*. 5:11098.

Barlow S, Brooke G, Chatterjee K, Price G, Pelekanos R, Rossetti T, Doody M, Venter D, Pain S, Gilshenan K, Atkinson K (2008) Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 17(6):1095-107.

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

Batsali AK, Kastrinaki MC, Papadaki HA, Pontikoglou C (2013) Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. *Curr Stem Cell Res Ther.* 8(2):144-55.

Behbod F, Erwin-Cohen RA, Wang ME, Trawick BW, Qu X, Verani R, Kahan BD, Stepkowski SM, Kirken RA (2001) Concomitant inhibition of janus kinase 3 and calcium-dependent signaling pathways synergistically prolongs the survival of rat heart allografts. *J Immunol* 166(6):3724-32.

Bekkers JE, Tsuchida AI, van Rijen MJ, Vonk LA, Dhert WJ, Creemers LB, Saris DB (2013) Single-stage cell-based cartilage regeneration using a combination of chondrons and mesenchymal stromal cells: comparison with microfracture. *Am J Sports Med* 41(9):258-66.

Beltrami AP, Cesselli D, Bergamin N, Marcon P, Rigo S, Puppato E, D'Áurizio F, Verardo R, Piazza S, Pignatelli A, Poz A, Baccarani U, Damiani D, Fanin R, Mariuzzi L, Finato N, Masolini P, Burelli S, Belluzzi O, Schneider C, Beltrami CA (2007) Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood.* 110(9):3438-46.

Benyamini N, Rowe JM (2013) Is there a role for allogeneic transplantation in chronic myeloid leukemia? *Expert Rev Hematol.* 6(6):759-65.

Beyer F, Doebe C, Busch A, Ritter T, Mhashilkar A, Marasco WM, Laube H, Volk HD, Seifert M (2004) Decline the surface MHC I by adenoviral gene transfer of anti-MHC I intrabodies in human endothelial cells – new perspectives for the generation of universal donor cells for tissue transplantation. *J Gene Med.* 6(6):616-23.

Bieback K, Brinkmann I (2010) Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: from biology to cell therapy. *World J Stem Cells* 2(4):81-92.

Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H (2004) Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 22(4):625-34.

Borie DC, Changelian PS, Larson MJ, Si MS, Panagua R, Higgins JP, Helm B, Campbell A, Lau M, Zhang S, Flores MG, Rousvoal G, Hawkins J, Ball DA, Kudlacz EM, Brisette WH, Elliott EA, Reitz BA, Morris RE (2005) Immunosuppression by the JAK3 inhibitor CP-690,550 delays rejection and significantly prolongs kidney allograft survival in nonhuman primates. *Transplantation* 79(7):791-801.

Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Söderström K, D'Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, Lanier LL, McMichael AJ (1998) HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391(6669): 795–9.

Braun D, Longman RS, Albert ML (2005) A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood* 106(7):2375-81.

Brooke G, Rossetti T, Pelekanos R, Ilic N, Murray P, Hancock S, Antoneans V, Huang G, Gottlieb D, Bradstock K, Atkinson K (2009) Manufacturing of human placenta-derived mesenchymal stem cells for clinical trials. *Br J Haematol.* 144(4):571-9.

Bumbacea RS, Ghiordanescu I (2013) Atopic dermatitis induced by systemic immunosuppression with tacrolimus – case report. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 45(3):109-10.

Burchfield JS, Dimmeler S (2008) Role of paracrine factors in stem and progenitor cell mediated cardiac repair and tissue fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 1(1):4.

Busser H, De Bruyn C, Urban F, Najjar M, Pieters K, Raicevic G, Meuleman N, Bron D, Lagneaux L (2014) Isolation of adipose-derived stromal cells without enzymatic treatment: expansion, phenotypical, and functional characterization. *Stem Cells Dev.* 23(19):2390-400.

Cantrell DA, Smith KA (1984) The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. *Science*. 224(4655):1312-6.

Cao YA, Bachmann MH, Beilhack A, Yang Y, Tanaka M, Swijnenburg RJ, Reeves R, Taylor-Edwards C, Schulz S, Doyle TC, Fathman CG, Robbins RC, Herzenberg LA, Negrin RS, Contag CH (2005) Molecular imaging using labeled donor tissues reveals patterns of engraftment, rejection, and survival in transplantation. *Transplantation*. 80(1):134-9.

Caplan AI (2007) Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 213(2):341-7.

Caplan AI (2008) All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell* 3(3):229-30.

Carrade DD, Borjesson DL (2013) Immunomodulation by mesenchymal stem cells in veterinary species. *Comp Med* 63(3):207-17.

Carrion B, Kong YP, Kaigler D, Putnam AJ (2013) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhance angiogenesis via their $\alpha 6 \beta 1$ integrin receptor. *Exp Cell Res*. 319(19):2964-76.

Carvalho AM, Yamada AL, Golim MA, Alvarez LE, Hussni CA, Alves AL (2014) Evaluation of mesenchymal stem cell migration after equine tendonitis therapy. *Equine Vet J*. 46(5):635-8.

Chou SH, Lin SZ, Kuo WW, Pai P, Lin JY, Lai CH, Kuo CH, Lin KH, Tsai FJ, Huang CY (2014) Mesenchymal stem cell insights: prospects in cardiovascular therapy. *Cell Transplant*. 23(4-5):513-29.

Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. (2014) Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med*. 12:18.

Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ (1996) Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 1996 271(2):736-41.

Coutance G, Ouldamar S, Rouvier P, Saheb S, Suberbielle C, Bréchet N, Hariri S, Lebreton G, Leprince P, Varnous S (2015) Late antibody-mediated rejection after heart transplantation: Mortality, graft function, and fulminant cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant*. S1053-2498(15)01098-0.

Crop MJ, Kroevaar SS, de Kuiper R, Ijzermans JN, van Besouw NM, Baan CC, Weimar W, Hoogduin MJ (2011) Human mesenchymal stem cells are susceptible to lysis by CD8⁺ T-cells and NK cells. *Cell Transplant* 20(10):1547-59.

Dahlke MH, Hoogduijn M, Eggenhofer E, Popp FC, Renner P, Slowik P, Rosenauer A, Piso P, Geissler EK, Lange C, Chabannes D, Mazzant S, Bertolino P, Kunter U, Introna M, Rambaldi A, Capelli C, Peroco N, Casirgahi F, Noris M, Gotti E, Seifert M, Saccardi R, Verspaget HW, van Hoek B, Bartholomew A, Wekerle T, Volk HD, Remuzzi G, Deans R, Lazarus H, Schlitt HJ, Baan CC, MISOT Study Group (2009) Toward MSC in solid organ transplantation: 2008 position paper of the MISOT study group. *Transplantation* 88(5):614-9.

Daley GQ, Lensch MW, Jaenisch R, Meissner A, Plath K, Yamanaka S (2009) Broader implications of defining standards for the pluripotency of iPSCs. *Cell Stem Cell*. 4(3):200-1.

Da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB (2008) In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 26(9):2287-99.

De Francesco F, Ricci G, D'Andrea F, Nicoletti GF, Ferraro GA (2015) Human Adipose Stem Cells: From Bench to Bed-Side. *Tissue Eng Part B Rev*. Jun 17 [Epub ahead of print].

De Jong R, van Hout GP, Houtgraaf JH, Kazemi K, Wallrapp C, Lewis A, Pasterkamp G, Hoefer IE, Duckers HJ (2014) Intracoronary infusion of encapsulated glucagon-like peptide-1-eluting mesenchymal stem cells preserves left ventricular function in a porcine model of acute myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Interv*. 7(5):673-83.

De Schauwer C (2015) Stem cell therapy in the horse: from laboratory to clinic. *Vet J*. 203(2):137.

De Schauwer C, Van de Walle GR, Van Soom A, Meyer E (2013) Mesenchymal stem cell therapy in horses: useful beyond orthopedic injuries? *Vet Q*. 33(4):234-41.

Deuse T, Wang D, Stubbendorff M, Itagaki R, Grabosch A, Greaves LC, Alawi M, Grünewald A, Hua X, Velden J, Robbins RC, Jaenisch R, Weissmann

IL, Schrepfer S (2015) The alloantigenicity in somatic cell nucleus transfer-derived stem cells. *Cell Stem Cell*. 16(1):33-8.

Deuse T, Hua X, Taylor V, Stubbendorff M, Baluom M, Chen Y, Park G, Velden J, Streichert T, Reichenspurner H, Robbins RC, Schrepfer S (2012) Significant Reduction of Acute Cardiac Allograft Rejection by Selective Janus Kinase-1/3 Inhibition Using R507 and R545. *Transplantation*. 94(7):695-702.

Deuse T, Seifert M, Phillips N, Fire A, Tyan D, Kay M, Tsao PS, Hua X, Velden J, Eiermann T, Volk HD, Reichenspurner H, Robbins RC, Schrepfer S (2011) Human leukocyte antigen I knock down human embryonic stem cells induce host ignorance and achieve prolonged xenogeneic survival. *Circulation* 124(11):3-9.

Deuse T, Stubbendorff M, Tang-Quan K, Phillips N, Kay MA, Eiermann T, Phan TT, Volk HD, Reichenspurner H, Robbins RC, Schrepfer S (2010) Immunogenicity and immunological properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* 20(5):655-67.

Deuse T, Peter C, Fedak PW, Doyle T, Reichenspurner H, Zimmermann WH, Eschenhagen T, Stein W, Wu JC, Robbins RC, Schrepfer S (2009) Hepatocyte growth factor or vascular endothelial growth factor gene transfer maximizes mesenchymal stem cell-based myocardial salvage after acute myocardial infarction. *Circulation* 120(11):247-54.

Deuse T, Velotte JB, Hoyt G, Govaert JA, Taylor V, Masuda E, Herlaar G, Park G, Carroll D, Pelletier MP, Robbins RC, Schrepfer S (2008) Novel immunosuppression: R348, a JAK3- and Syk-inhibitor attenuates acute cardiac allograft rejection. *Transplantation* 85(6):885-92.

Di GH, Jiang S, Li FQ, Sun JZ, Wu CT, Hu X, Duan HF (2012) Human umbilical cord mesenchymal stromal cells migrate chemotherapy-associated tissue injury in a pre-clinical mouse model. *Cytotherapy* 14(4):412-22.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4):315-7.

Duffy GP, Herron CC (2013) Mesenchymal stem cells to augment therapeutic angiogenesis in hind-limb ischemia models: how important is their source? *Stem Cell Res Ther.* 4(5):131.

Eggan K, Akutsu H, Loring J, Jackson-Grusby L, Klemm M, Rideout WM, Yanagimachi R, Jaenisch R (2001) Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98,6209-6214.

Emerson RO, Mathew JM, Konieczne IM, Robins HS, Leventhal JR (2014) Defining the alloreactive T cell repertoire using high-throughput sequencing of mixed lymphocyte reaction culture. *PLoS One.* 9(11): e111943.

Engelmann MG, Franz WM (2006) Stem cell therapy after myocardial infarction: ready for clinical application? *Curr Opin Mol Ther* 8(5):396-414.

English K, Wood KJ (2013) Mesenchymal stromal cells in transplantation rejection and tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 3(5):a015560.

English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP (2009) Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+ CD35(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol* 156(1):149-60.

Entrican G, Wattegedera S, Rocci M, Wheelhouse N (2009) Pregnancy, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and chlamydial abortion: an unresolved paradox. *Vet Microbiol.* 135(1-2):98-102.

Gabay C (2006) Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther.* 8 Suppl 2:S3.

Gao X, Xu Z (2008) Mechanisms of action of angiogenin. *Acta Biochim Biophys Sin.* 40(7):619-24.

Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F (2005) Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 105(7):2821-27.

Gonzalez S, Castanotto D, Li H, Olivares S, Jensen MC, Forman SJ, Rossi JJ, Cooper LJ (2005) Amplification of RNAi – targeting HLA mRNAs. *Mol Ther* 11:811-8.

Griffin MD, Ryan AE, Alagesan S, Lohan P, Treacy O, Ritter T (2013) Anti-donor immune responses elicited by allogeneic mesenchymal stem cells: what have we learned so far? *Immunol Cell Biol* 91(1):40-51.

Griffin MD, Ritter T, Mahn BP (2010) Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies. *Hum Gen Ther* 21(12):1641-55.

Guasch A, Roy-Chaudhury P, Woodle ES, Fitzsimmons W, Hollman J, First MR (2010) Assessment of efficacy and safety of FK778 in comparison with standard care in renal transplant recipients with untreated BK nephropathy. *Transplantation* 90(8):891-7.

Gupta PK, Chullikana A, Parakh R, Desai S, Das A, Gottopamula S, Krishnamurthy S, Anthony N, Pherwani A, Majumdar AS (2013) A double blind randomized placebo controlled phase I/II study assessing the safety and efficacy of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stem cell in critical limb ischemia. *J Transl Med.* 10;11:143.

Gutiérrez-Fernández M, Rodríguez-Frutos B, Ramos-Cejudo J, Teresa Vallejo-Cremades M, Fuentes B, Cerdán S, Díez-Tejedor E (2013) Effects of intravenous administration of allogeneic bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on functional recovery and brain repair markers in experimental ischemic stroke. *Stem Cell Res Ther.* 28;4(1):11.

Haidinger M, Werzowa J, Weichhart T, Säemann MD (2011) Targeting the dysregulated mammalian target of rapamycin pathway in organ transplantation: killing 2 birds with 1 stone (2011) *Transplant Rev* 25(4):145-53.

Halloran PF (2004) Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 352(10):1056.

Hegyí B, Sági B, Kovács J, Kiss J, Urbán VS, Mészáros G, Monostori E, Uher F (2010) Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall. *Int Immunol.* 22(7):551-9.

Hetzer R, Delmo W (2013) Trends and Outcomes in heart transplantation: the Berlin experience. *HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth.* 5(2):76-80.

Higuchi T, Shiraishi T, Shirakusa T, Hirayama S, Shibaguchi H, Kuroki M, Hiratuka M, Yamamoto S, Iwasaki A, Kurchi M (2005) Prevention of acute

lung allograft rejection in rat by the janus kinase 3 inhibitor, tyrphostin AG490. *J Heart Lung Transplant* 24(10):1557-64.

Hoitsma AJ, Woodle ES, Abramowicz D, Proot P, Vanrenterghem Y (2011) FTY720 Phase II Transplant Study Group. FTY720 combined with tacrolimus in de novo renal transplantation: 1-year, multicenter, open-label randomized study. *Nephrol Dial Transplant* 26(11):3802-805.

Holdaas H, Midtvedt K, Asberg A (2012) A drug safety evaluation of everolimus in kidney transplantation. *Expert Opin Drug Saf* 11(6):1013-22.

Hollis IB, Reed BN, Moranville MP (2015) Medication management of cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation. *35(5):489-501*.

Holtzhausen A, Zhao F, Evans KS, Hanks BA (2014) Early Carcinogenesis Involves the Establishment of Immune Privilege via Intrinsic and Extrinsic Regulation of Indoleamine 2,3-dioxygenase-1: Translational Implications in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 5:438.

Huang CC; Tsai HW, Lee WY, Lin WW, Chen DY, Hung YW, Chen JW, Hwang SM, Chang Y, Sung HW (2013) A translational approach in using cell sheet fragments of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cellular cardiomyoplasty in a porcine model. *Biomaterials*. 34(19):4582-91.

Huang SP, Wu MS, Shun CT, Wang HP, Lin MT, Kuo ML, Lin JT (2011) Interleukin-6 increases vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastric carcinoma. *J Biomed Sci*. 11(4):517-27.

Iams J, Creasy RK, Reznik R (2004) *Maternal-fetal medicine*. W.B. Saunders Co. pp. 31–32.

Ilic N, Brooke G, Murray P, Barlow S, Rossetti T, Pelekanos R, Hancock S, Atkinson K (2011) Manufacture of clinical grade human placenta-derived multipotent mesenchymal stromal cells. *Methods Mol Biol*. 698:89-106.

Innocenti P, Morrow EH, Dowling DK (2011) Experimental evidence supports a sex-specific selective sieve in mitochondrial genome evolution. *Science*. 332(6031):845-8.

Issa N, Kulka A, Ibrahim HN (2013) Calcineurin Inhibitor nephrotoxicity: a review and perspective of the evidence. *Am J Nephrol* 37(6):602-12.

Jaquet K, Krause KT, Denschel J, Faessler P, Nauerz M, Geidel S, Boczor S, Lange C, Stute N, Zander A, Kuck KH (2005) Reduction of myocardial

scar size after implantation of mesenchymal stem cells in rats: what is the mechanism? *Stem Cells Dev* 14(3):299-309.

Jaronen M, Quintana FJ (2014) Immunological Relevance of the Coevolution of IDO1 and AHR. *Front Immunol*. 5:521.

Jin HJ, Bae YK, Kim M, Kwon SJ, Jeon HB, Choi SJ, Kim SW, Yang YS, Oh W, Chang JW (2013) Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *Int J Mol Sci*. 3;14(9):17986-8001.

Joung B, Kim IK, Lee MH, Yoo KJ, Kim SS (2007) Bone marrow mononuclear stem cells transplanted in rat infarct myocardium improved the electrical conduction without evidence of proarrhythmic effects. 48(5):754-64.

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

Karantalis V, DiFede DL, Gerstenblith G, Pham S, Symes J, Zambrano JP, Fishman J, Pattany P, McNiece I, Conte J, Schulman S, Wu K, Shah A, Breton E, Davis-Sproul J, Schwarz R, Feigenbaum G, Mushtaq M, Suncion VY, Lardo AC, Borrello I, Mendizabal A, Karas TZ, Byrnes J, Lowery M, Heldman AW, Hare JM (2014) Autologous mesenchymal stem cells produce concordant improvements in regional function, tissue perfusion, and fibrotic burden when administered to patients undergoing coronary artery bypass grafting: The Prospective Randomized Study of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Patients Undergoing Cardiac Surgery (PROMETHEUS) trial. *Circ Res*. 11;114(8):1302-10.

Kasperk C, Wergedal J, Strong D, Farley J, Wangerin K, Gropp H, Ziegler R, Baylink DJ (1995) Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin. *J Clin Endocrinol Metab*. 80(8):2511-7.

Katare R, Riu F, Rowlinson J, Lewis A, Holden R, Meloni M, Reni C, Wallrapp C, Emanuelli C, Madeddu P (2013) Perivascular delivery of encapsulated mesenchymal stem cells improves postischemic angiogenesis via paracrine activation of VEGF-A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 33(8):1872-80.

Keck M, Kober J, Riedl O, Kitzinger HB, Wolf S, Stulnig TM, Zeyda M, Gugerell A (2014) Power assisted liposuction to obtain adipose-derived stem

cells: impact on viability and differentiation to adipocytes in comparison to manual aspiration. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 67(1):e1-8.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 24(5):1294-301.

Kim J, Lee JH, Yeo SM, Chung HM, Chae JI (2014) Stem cell recruitment factors secreted from cord blood-derived stem cells that are not secreted from mature endothelial cells enhance wound healing. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 50(2):146-54.

Kim JW, Lee JH, Lyoo YS, Jung DI, Park HM (2013) The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. *Vet Dermatol.* 24(2):242-e53.

Kim SJ, Moon GJ, Chang WH, Kim YH, Bang OY; STARTING-2 (STem cell Application Researches and Trials In NeuroloGy-2) collaborators (2013) Intravenous transplantation of mesenchymal stem cells preconditioned with early phase stroke serum: current evidence and study protocol for a randomized trial. *Trials.* 14(1):317.

Kim SW, Han H, Chae GT, Lee SH, Bo S, Yoon JH, Lee YS, Lee KS, Park HK, Kang KS (2006) Successful stem cell therapy using umbilical cord blood-derived multipotent stem cells for Buerger's disease and ischemic limb disease animal model. *Stem Cells.* 24(6):1620-6.

Kirak O, Frickel EM, Grotenberg GM, Suh H, Jaenisch R, Ploegh HL (2010) Transnuclear mice with predefined T cell receptor specificities against *Toxoplasma gondii* obtained via SCNT. *Science.* 328(5975):243-8

Kita K, Gauglitz GG, Phan TT, Herndon DN, Jeschke MG (2010) Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the sub-amnionic human umbilical cord lining membrane. *Stem Cells Dev* 19(4):491-502.

Kolk MV, Meyberg D, Deuse T, Tang-Quan KR, Robbins RC, Reichenspurner H, Schrepfer S (2009) LAD-ligation: a murine model of myocardial infarction. *J Vis Exp.* (32).

Lange C, Cakiroglu F, Spiess AN, Capallo-Obermann H, Dierlamm J, Zander AR (2007) Accelerated and safe expansion of human mesenchymal

stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 213(1):18-26.

Lash G, Robson S, Bulmer J (2010) Review: Functional role of uterine natural killer (uNK) cells in human early pregnancy decidua. *Placenta* 31(S): 87–92.

Lau JF, Weinberg MD, Olin JW (2011) Peripheral artery disease. Part 1: clinical evaluation and noninvasive diagnosis. *Nat Rev Cardiol.* 8(7):405-18.

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

Le Blanc K, Frassoni F, Ball L (2004) Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II Study. *Lancet* 371:1579-86.

Lee WS, Lee SM, Kim MK, Park SG, Choi IW, Choi I, Joo YD, Park SJ, Kang SW, Seo SK (2013) The tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid suppresses T cell responses by inhibiting dendritic cell activation. *Int Immunopharmacol.* 17(3):721-6.

Lee YS, Lee JE, Park HY, Lim YS, Lee JC, Wang SG, Lee BJ (2013) Isolation of mesenchymal stromal cells (MSCs) from human adenoid tissue. *Cell Physiol Biochem.* 31(4-5):513-24.

Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK (2003) L-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol.* 170(6):3369-76.

Li H, Malhotra D, Yeh CC, Tu R, Zhu BQ, Birger N, Wisneski A, Cha J, Karliner JS, Mann MJ (2009) Myocardial survival signaling in response to stem cell transplantation. *J Am Coll Surg.* 208(4):607-13.

Li J, Chen G, Ye P, Wang S, Zhang K, Chen W, Stepkowski SM, Li J, Zhong S, Xia J (2011) CCR5 blockade in combination with cyclosporine increased cardiac graft survival and generated alternatively activated macrophages in primates. *J Immunol* 191(6):3478.

Lilyanna S, Martinez EC, Vu TD, Ling LH, Gan SU, Tan AL, Phan TT, Kofidis T (2013) Cord lining-mesenchymal stem cells graft supplemented with

an omental flap induces myocardial revascularization and ameliorates cardiac dysfunction in a rat model of chronic ischemic heart failure. *Tissue Eng Part A*. 2013 Jun;19(11-12):1303-15.

Lombardo E, Van der Poll T, DelaRosa O, Dalemans W (2015) Mesenchymal stem cells as a therapeutic tool to treat sepsis. *World J Stem Cells*. 7(2):368-79.

Lyahyai J, Mediano DR, Ranera B, Sanz A, Remacha AR, Bolea R, Zaragoza P, Rodellar C, Martín-Burriel I (2012) Isolation and characterization of ovine mesenchymal stem cells derived from peripheral blood. *BMC Vet Res*. 8:169.

Machaczka M, Johansson JE, Remberger M, Hallböök H, Lazarevic VLj, Wahlin BE, Omar H, Wahlin A, Juliusson G, Kimby E, Hägglund H (2013) High incidence of chronic graft-versus-host disease after myeloablative allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia in Sweden: graft-versus-leukemia effect protects against relapse. *Med Oncol*. 30(4):762.

Maleszewski JJ, Kucirka LM, Segev DL, Halushka MK (2011) Survey of current practice related to grading of rejection in cardiac transplant recipients in North America. *Cardiovasc Pathol*. 20(5):261-5.

Mao Q1, Lin C, Gao J, Liang X, Gao W, Shen L, Kang L, Xu B (2014) Mesenchymal stem cells overexpressing integrin-linked kinase attenuate left ventricular remodeling and improve cardiac function after myocardial infarction. *Mol Cell Biochem*. 397(1-2):203-14.

Marin V, Montero-Julian F, Grès S, Bongrand P, Farnarier C, Kaplanski G (2002) Chemotactic agents induce IL-6Ralpha shedding from polymorphonuclear cells: involvement of a metalloproteinase of the TNF-alpha-converting enzyme (TACE) type. *Eur J Immunol*. 32(10):2965-70.

Martinez EC, Vu DT, Wang J, Lilyanna S, Ling LH, Gan SU, Tan AL, Phan TT, Lee CN, Kofidis T (2013) Grafts Enriched with Subamniotic Cord-Lining Mesenchymal Stem Cell Angiogenic Spheroids Induce Post-Ischemic Myocardial Revascularization and Preserve Cardiac Function in Failing Rat Hearts. *Stem Cells Dev*. 22(23):3087-99.

Markoulaki S, Meissner A, Jaenisch R (2008) Somatic cell nuclear transfer and derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Methods*. 45(2):101-14.

Marx C, Silveira MD, Beyer Nardi N (2015) Adipose-derived stem cells in veterinary medicine: characterization and therapeutic applications. *Stem Cells Dev*. 24(7):241-6.

Mathe G, Jamnet H, Pedic B, Schwarzenberg L, Duplan JF, Maupin B, Latarjet R, Larrieu MJ, Kalic D, Djukic Z (1959) Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation. *Rev Fr Etud Clin Biol* 4(3):226-388.

Mathieu E, Lamirault G, Toquet C, Lhommet P, Rederstorff E, Sourice S, Biteau K, Hulin P, Forest V, Weiss P, Guicheux J, Lemarchand P (2012) Intramyocardial delivery of mesenchymal stem cell-seeded hydrogel preserves cardiac function and attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction. *PLoS One*. 7(12):e51991.

McGuirk JP, Smith JR, Divine CL, Zuniga M, Weiss ML (2015) Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stromal Cells as Promising Cellular Therapeutic Strategy for the Management of Graft-versus-Host Disease. *Pharmaceuticals* 8(2):368-79.

Mehrotra A, Leventhal J, Purroy C, Cravedi P (2014) Monitoring T cell alloreactivity. *Transplant Rev*. 29(2):53-9.

Mennander A, Tiisala S, Halttunen J, Yilmaz S, Paavonen T, Hayry P (1991) Chronic rejection in rat allografts. An experimental model for transplant arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 11:671-80.

Miettinen JA, Salonen RJ, Ylitalo K, Niemelä M, Kervinen K, Säily M, Koistinen P, Savolainen ER, Mäkitallio TH, Huikuri HV, Lehenkari P (2012) The effect of bone marrow microenvironment on the functional properties of the therapeutic bone marrow-derived cells in patients with acute myocardial infarction. *J Transl Med*. 10:66.

Munsie MJ, Michalska AE, O'Brien CM, Trounson AO, Pera MF, Mountford PS (2000) Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. *Curr Biol*. 10(16):989-92.

Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI (2013) Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med*. 45:e54.

Muttini A, Salini V, Valbonetti L, Abate M (2012) Stem cell therapy of tendinopathies: suggestions from veterinary medicine. *Muscles Ligaments Tendons J* 16;2(3):187-92.

Nair M, Saxena P (2013) Recent patents on mesenchymal stem cell mediated therapy in inflammatory diseases. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 7(2):105-13.

Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka Y (2008) *Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts*. *Nature Biotechnology* 26(1):101-6.

Nelson D, Cox M (2005) *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4. Ausgabe W.H. Freeman, New York.

Ning Y, Manegold PC, Hong YK, Zhang W, Pohl A, Lurje G, Winder T, Yang D, LaBonte MJ, Wilson PM, Ladner RD, Lenz HJ (2011) Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. *Int J Cancer*. 128(9):2038-49.

Noggle S, Fung HL, Gore A, Martinez H, Satriani KC, Prosser R, Oum K, Paull D, Druckenmiller S, Freeby M, Greenberg E, Zhang K, Goland R, Sauer MV, Leibel RL, Egli D (2011) Human oocytes reprogram somatic cells to pluripotent state. *Nature* 478, 70-75.

Ong WK, Sugii S (2013) Adipose-derived stem cells: fatty potentials for therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 45(6):1083-6.

Ono K, Lindsey ES (1969) Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 57(2):5.

Orabona C, Grohmann U (2011) Indoleamine 2,3-dioxygenase and regulatory function: tryptophan starvation and beyond. *Methods Mol Biol* 677:269-80.

Orabona C, Pallotta MT, Grohmann U (2012) Different partners, opposite outcomes: a new perspective of the immunobiology of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Mol Med* 18:834-42.

O'Shea JJ, Pesu M, Borie DC (2004) A new modality for immunosuppression: targeting the JAK/STAT pathway. *Nat Rev Drug Discov* 3(7):555-64.

Otterstedt C (2003) Kultur- und religionsphilosophische Gedanken zur Mensch-Tier_Besziehung, in: Erhard Olbrich/dies. (Hrsg.) *Menschen brauchen Tiere. Grundlagen und Praxis der tiergestützten Pädagogik und Therapie*. S. 15-31.

Otterstedt C (2012) Bedeutung des Tieres für unsere Gesellschaft. Bundeszentrale für politische Bildung; Politik und Zeitgeschichte.

Pan S, Mi Y, Pally C, Beerli C, Chen A, Guerini D, Hinterding K, Nuesslein-Hildesheim B, Tuntland T, Lefebvre S, Liu Y, Gao W, Chu A, Brinkmann V, Bruns C, Streiff M, Canret C, Coche N, Gray N (2006) A monoselective sphingosine-1-phosphate receptor-1 agonist prevents allograft rejection in a stringent rat heart transplantation model. *Chem Biol* 13(11):1227-34.

Paplomata E, Zelnak A, O'Regan R (2013) Everolimus: side effect profile and management of toxicities in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 140(3):453-62.

Park SA, Reilly CM, Wood JA, Chung DJ, Carrade DD, Deremer SL, Seraphin RL, Clark KC, Zwingenberger AL, Borjesson DL, Hayashi K, Russell P, Murphy CJ (2013) Safety and immunomodulatory effects of allogeneic canine adipose-derived mesenchymal stromal cells transplanted into the region of the lacrimal gland, the gland of the third eyelid and the knee joint. *Cytotherapy*. 15(12):1498-510.

Pileggi A, Xu X, Tan J, Ricordi C (2013) Mesenchymal stromal (stem) cells to improve solid organ transplant outcome: lessons from the initial clinical trials. *Curr Opin Organ Transplant*. 18(6):672-81.

Potian JA, Aviv H, Ponzio NM, Harrison JS, Rameshwar P (2003) Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. *J Immunol* 171(7):3426-34.

Poujade M, Grasland-Mongrain E, Hertzog A, Jouanneau J, Chavrier P, Ladoux B, Buguin A (2007) Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound. *PNAS*. 104(41):15988-93.

Pradier A, Passweg J, Villard J, Kindler V (2011) Human bone marrow stromal cells and skin fibroblasts inhibit natural killer cell proliferation and cytotoxic activity. *Cell Transplant* 20(5):681-91.

Quimby JM, Dow SW (2015) Novel treatment strategies for feline chronic kidney disease: A critical look at the potential of mesenchymal stem cell therapy. *Vet J*. 204(3):241-6.

Qin Y, Guan J, Zhang C (2014) Mesenchymal stem cells: mechanisms and role in bone regeneration. *Postgrad Med J*. 90(1069):643-7.

Qin Y, Zhou P, Zhou C, Li J, Gao WQ (2013) The Adipose-Derived Lineage-Negative Cells Are Enriched Mesenchymal Stem Cells and Promote Limb Ischemia Recovery in Mice. *Stem Cells Dev*. 23(4):363-71.

Radtke CL, Nino-Fong R, Esparza Gonzalez BP, Stryhn H, McDuffee LA (2013) Characterization and osteogenic potential of equine muscle tissue- and periosteal tissue-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res*. 74(5):790-800.

Rao MS, Mattson MP (2001) Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev* 122(7):713-734.

Ramakrishnan A, Torok-Storb B, Pillai MM (2013) Primary marrow derived Stromal cells: isolation and manipulation. *Methods Mol Biol* 1035:75-101.

Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K (2005) Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res* 305(1):33-41.

Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K (2003) Mesenchymal Stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 76(8):1208-13.

Reinhardt K, Dowling DK, Morrow EH (2013) Medicine. Mitochondrial replacement, evolution, and the clinic. *Science*. 341(6152):1345-6.

Ren G, Chen X, Dong F, Li W, Ren X, Zhang Y, Shi Y (2012) Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues. *Stem Cells Transl Med.* 1(1):51-8.

Ribatti D (2015) Peter Brian Medawar and the discovery of acquired immunological tolerance. *Immunol Lett.* 167(2):63-66.

Rodrigo SF, van Ramshorst J, Hoogslag GE, Boden H, Velders MA, Cannegieter SC, Roelofs H, Al Younis I, Dibbets-Schneider P, Fibbe WE, Zwaginga JJ, Bax JJ, Schalij MJ, Beeres SL, Atsma DE (2013) Intramyocardial injection of autologous bone marrow-derived ex vivo expanded mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction patients is feasible and safe up to 5 years of follow-up. *J Cardiovasc Transl Res.* 6(5):816-25.

Ryu HH, Kang BJ, Park SS, Kim Y, Sung GJ, Woo HM, Kim WH, Kweon OK (2012) Comparison of mesenchymal stem cells derived from fat, bone marrow, Wharton's jelly, and umbilical cord blood for treating spinal cord injuries in dogs. *J Vet Med Sci.* 74(12):1617-30.

Saether EE, Chamberlain CS, Leiferman EM, Kondratko-Mitnacht JR, Li WJ, Brickson SL, Vanderby R (2013) Enhanced Medial Collateral Ligament Healing Using Mesenchymal Stem Cells: Dosage Effects on Cellular Response and Cytokine Profile. *Stem Cell Rev.* 10(1):86-96.

Salge AK, Xavier RM, Ramalho WS, Rocha EL, Coelho AS, Guimarães JV, Siqueira KM, Abdalla DR, Michelin MA, Murta EF (2013) Placental and umbilical cord macroscopic changes associated with fetal and maternal events in the hypertensive disorders of pregnancy. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 40(2):198-202.

Sassoli C, Frati A, Tani A, Anderloni G, Pierucci F, Matteini F, Chellini F, Zecchi Orlandini S, Formigli L, Meacci E (2014) Mesenchymal stromal cell secreted sphingosine 1-phosphate (S1P) exerts a stimulatory effect on skeletal myoblast proliferation. *PLoS One.* 9(9):e108662.

Sassoli C, Pini A, Chellini F, Mazzanti B, Nistri S, Nosi D, Saccardi R, Quercioli F, Zecchi-Orlandini S, Formigli L (2012) Bone marrow mesenchymal stromal cells stimulate skeletal myoblast proliferation through the paracrine release of VEGF. *PLoS One* 7(7):e37512.

Sato A, Kono T, Nakada K, Ishikawa K, Inoue S, Yonekawa H, Hayashi J (2005) Gene therapy for progeny of mito-mice carrying pathogenic mtDNA by nuclear transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(46):16765-70.

Schnabel LV, Fortier LA, Wayne McIlwraith C, Norbert KM (2013) Therapeutic use of stem cells in horses: Which type, how, and when? *Vet J* 197(3):570-7.

Schrepfer S, Deuse T, Lange C, Katzenberg S, Reichenspurner H, Robbins RC, Pelletier MP (2007) Simplified protocol to isolate, purify, and expand mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 16(1):105-7.

Seo MS, Park SB, Kim HS, Kang JG, Chane JS, Kang KS (2013) Isolation and characterization of equine amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells. *J Vet Sci* 14(2):151-9.

Shohara R, Yamamoto A, Takikawa S, Iwase A, Hibi H, Kikkawa F, Ueda M (2012) Mesenchymal stromal cells of human umbilical cord Wharton's jelly accelerate wound healing by paracrine mechanisms. *Cytotherapy*. 14(10):1171-81.

Smith KA (1988) Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science*. 240(4856):1169-76.

Smith RK, Werling NJ, Dakin SG, Alam R, Goodship AE, Dudhia J (2013) Beneficial effects of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in naturally occurring tendinopathy. *PLoS One* 8(9):e75697

Sohni A, Verfaillie CM (2013) Mesenchymal Stem Cells Migration Homing and Tracking. *Stem Cells Int*. 2013:130763.

Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M (2006) Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 24(1):74-85.

Soulez M, Sirois I, Brassard N, Raymond MA, Nicodème F, Noiseux N, Durocher Y, Pshezhetsky AV, Hébert MJ (2010) Epidermal growth factor and perlecan fragments produced by apoptotic endothelial cells co-ordinately activate ERK1/2-dependent antiapoptotic pathways in mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 28(4):810-20.

StBA (2014) Mehr als ein Drittel aller Haushalte in Deutschland sind Singlehaushalte. Statistisches Bundesamt Pressemitteilung 185/14.

Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya, Aurora P, Christie JD, Kirk R, Dobbels F, Rahmal AO, Hertz MI (2010) The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-seventh official adult heart transplant report _ 2010. *J Heart Lung Transplant* 29(10):1089-103.

Stein GS, Lian JB (1993) Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev.* 14(4):424-42.

Stepkowski SM, Nagy ZS, Wang ME, Behbod F, Erwin-Cohen R, Kahan BD, Kirken RA (2001) PNU156804 inhibits Jak3 tyrosine kinase and rat heart allograft rejection. *Transplant Proc* 33(7-8):3272-73.

Stewart MC (2011) Cell-based therapies: current issues and future directions. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 27(2):393-9.

Stubbendorff M, Neofytou E, Deuse T, Mattutat D, Lange C, Reichenspurner H, Robbins RC, Beygui R, Volk HD, Schrepfer S (2015) Impact of donor age on biological and immunogenic properties of mesenchymal stromal cell. *Med Res Arc.* [epub ahead of print]

Stubbendorff M, Deuse T, Hua X, Phan TT, Bieback K, Atkinson K, Eiermann TH, Velden J, Schröder C, Reichenspurner H, Robbins RC, Volk HD, Schrepfer S (2013) Immunological Properties of Extraembryonic Mesenchymal Stromal Cells Derived from Gastrational Tissue. *Stem Cells Dev.* 22(19):2619-29.

Stubbendorff M, Deuse T, Hammel A, Robbins RC, Reichenspurner H, Schrepfer S (2010) Orthotopic Aortic Transplantation: A Rat Model to Study the Development of chronic Vasculopathy. *J Vis Exp.*4;(46).

Suzuki Y, Cunningham CH, Noguchi K, Chen IY, Weissman IL, Yeung AC, Robbins RC, Yang PC (2008) In vivo serial evaluation of superparamagnetic iron-oxide labeled stem cells by off-resonance positive contrast. *Magn Reson Med.* 60(6):1269-75.

Sykova E, Forostyak S (2013) Stem cells in regenerative medicine. *Laser Ther* 22(2):87-92.

Tachibana M, Amato P, Sparman M, Gutierrez NM, Tippner-Hedges R, Ma H, Kang E, Fulati A, Lee HS, Sirtanandomchai H, Masterson K, Larson J, Eaton D, Sadler-Fredd K, Bataglia D, Lee D, Wu D, Jensen J, Patton P, Gokhale

S, Stouffer RL, Wolf D, Mitalipov S (2013) Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* 153, 1228-1238.

Tanaka M, Swijnenburg RJ, Gunawan F, Cao YA, Yang Y, Caffarelli AD, de Bruin JL, Contag CH, Robbins RC (2005) In vivo visualization of cardiac allograft rejection and trafficking passenger leukocytes using bioluminescence imaging. *Circulation*. 112(9):1105-10.

Tang-Quan KR, Bartos J, Deuse T, Churchill E, Schäfer H, Reichenspurner H, Mochly-Rosen D, Robbins RC, Schrepfer S (2010) Non-volume-loaded heart provides a more relevant heterotopic transplantation model. *Transpl Immunol*. 23(1-2):65-70.

Taylor SE, Clegg PD (2011) Collection and propagation methods for mesenchymal stromal cells. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 27(2):263-74.

Thakker R, Yang P (2014) Mesenchymal stem cell therapy for cardiac repair. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 16(7):323.

Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW (1994) Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood*. 1994 83(1):113-8.

Timmins NE, Kiel M, Günther M, Heazlewood C, Doran MR, Brooke G, Atkinson K (2012) Closed system isolation and scalable expansion of human placental mesenchymal stem cells. *Biotechnol Bioeng*. 109(7):1817-26.

Trivanović D, Kocić J, Mojsilović S, Krstić A, Ilić V, Djordjević IO, Santibanez JF, Jovčić G, Terzić M, Bugarski D (2013) Mesenchymal stem cells isolated from peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly. *Srp Arh Celok Lek*. 141(3-4):178-86.

Tröbs RB, Geyer C, Hirsch W, Tannapfel A (2008) Surgical anatomy of large retroperitoneal teratomas in infants: report of two cases. *Clin Med Case Rep*. 1:107-11.

Tzeng HE, Tsai CH, Chang ZL, Su CM, Wang SW, Hwang WL, Tang CH (2013) Interleukin-6 induces vascular endothelial growth factor expression and promotes angiogenesis through apoptosis signal-regulating kinase 1 in human osteosarcoma. *Biochem Pharmacol*. 85(4):531-40.

Uccelli A, Moretta L, Pistoia V (2006) Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 36(10):2566-73.

Urban VS, Kiss J, Kovascs J, Gocza E, Vas V, Monostori E, Uher F (2008) Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells* 26(1):244-253.

Van der Bogt KE, Sheikh AY, Schrepfer S, Hoyt G, Cao F, Ransohoff KJ, Swijnenburg RJ, Pearl J, Lee A, Fischbein M, Contag CH, Robbins RC, Wu JC (2008) Comparison of different adult stem cell types for treatment of myocardial ischemia. *Circulation*. 118(14 Suppl):S121-9.

Van der Kraan PM (2013) Stem cell therapy in osteoarthritis: a step too far? *Bio Drugs* 27(3):175-80.

Vela DC, Silva GV, Assad JA, Sousa AL, Coulter S, Fernandes MR, Perin EC, Willerson JT, Buja LM (2009) Histopathological study of healing after allogenic mesenchymal stem cell delivery in myocardial infarction in dogs. *J Histochem Cytochem*. 57(2):167-76.

Velotta JB, Deuse T, Haddad M, Masuda E, Park G, Carroll D, Taylor V, Robbins RC, Schrepfer S (2009) A novel JAK3 inhibitor, R348, attenuates chronic airway allograft rejection. *Transplantation* 87(5):653-659.

Vincenti F, Kirk AD (2008) What's next in the pipeline. *Am J Transplant* 8(19):1972-81.

Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC (2004) Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 22(7):1330-1337.

Wang LH, Kirken RA, Erwin RA, Yu CR, Farrar WL (1999) JAK3, Stat and MAPK signaling pathways as novel molecular targets for the tyrphostin AG-490 regulation of IL-2-mediated T cell response. *J Immunol* 162(7):3897-904.

Wang Q, Sun B, Wang D, Ji Y, Kong Q, Wang G, Wang J, Zhao W, Jin L, Li H (2008) Murine bone marrow mesenchymal stem cells cause mature dendritic cells to promote T-cell tolerance. *Scand J Immunol* 68(6):607-615.

Wang S, Guan Q, Diao H, Lian D, Zhong R, Jevnikar AM, Du C (2007) Prolongation of cardiac allograft survival by inhibition of ERK1/2 signaling in a mouse model. *Transplantation* 83(3):323-332.

Wang X, Wang Y, Gou W, Lu Q, Peng J, Lu S (2013) Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. *Int Orthop*. 37(12):2491-8.

Webster RA, Blaber SP, Herbert BR, Wilkins MR, Vesey G (2012) The role of mesenchymal stem cells in veterinary therapeutics - a review. *N Z Vet J*. 60(5):265-72.

Weinberg MD, Lau JF, Rosenfield K, Olin JW (2011) Peripheral artery disease. Part 2: medical and endovascular treatment. *Nat Rev Cardiol*. 14;8(8):429-41.

Westenfelder C, Togel FE (2011) Protective actions of administered mesenchymal stem cells in acute kidney injury: relevance to clinical trials. *Kidney Int Suppl*. 1(3):103-106.

Woodson JD, Chory J (2008) Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat Rev Genet*. 9(5):383-95.

Wu X, He L, Chen F, He X, Cai Y, Zhang G, Yi Q, He M, Luo J (2014) Impaired autophagy contributes to adverse cardiac remodeling in acute myocardial infarction. *PLoS One*. 19;9(11):e112891.

Xia Y, Zhu K, Lai H, Lang M, Xiao Y, Lian S, Guo C, Wang C (2015) Enhanced infarct myocardium repair mediated by thermosensitive copolymer hydrogel-based stem cell transplantation. *Exp Biol Med (Maywood)*. 240(5):593-600.

Xu H, Czerwinski P, Hortmann M, Sohn HY, Förstermann U, Li H (2008) Protein kinase C alpha promotes angiogenic activity of human endothelial cells via induction of vascular endothelial growth factor. *Cardiovasc Res*. 78(2):349-55.

Xu Z, Alloush J, Beck E, Weisleder N (2014) A murine model of myocardial ischemia-reperfusion injury through ligation of the left anterior descending artery. *J Vis Exp*. 10;(86).

Xue L, Xu YB, Xie JL, Tang JM, Shu B, Chen L, Qi SH, Liu XS (2013) Effects of human bone marrow mesenchymal stem cells on burn injury healing in a mouse model. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013 Jun 15;6(7):1327-36.

Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG , Kobayashi N, Yarmush ML (2010) Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant.* 19(6):667-79.

Yeates J, Everitt S, Innes JF, Day MJ (2013) Ethical and evidential considerations on the use of novel therapies in veterinary practice. *J Small Anim Pract.* 54(3):119-23.

Zachar V, Rasmussen JG, Fink T (2011) Isolation and growth of adipose tissue-derived stem cells. *Methods Mol Biol.* 698:37-49.

Zarrinpar A, Busuttil RW (2013) Liver transplantation: past, present and future. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 10(7):434-40.

Zeng H, Waldmann WJ, Yin DP, Knight DA, Shen J, Ma L, Meister GT, Chong AS, Williams JW (2005) Mechanistic study of malononitrileamide FK778 in cardiac transplant and CMV infection in rats. *Transplantation* 79(1):17-22.

Zhang QZ, Nguyen AL, Yu WH, Le AD (2012) Human oral mucosa and gingiva: a unique reservoir for mesenchymal stem cells. *J Dent Res.* 91(11):1011-8.

Zhang W, Liu XC, Yang L, Zhu DL, Zhang YD, Chen Y, Zhang HY (2013) Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells promote myocardial regeneration and cardiac repair after miniswine acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis.* 24(7):549-58.

Zimmermann JA, McDevitt TC (2013) Pre-conditioning mesenchymal stromal cell spheroids for immunomodulatory paracrine factor secretion. *Cytotherapy.* S1465-3249(13)00711-1.

10. Erklärung über den eigenen Anteil an den verwendeten Publikationen

Der Anteil der beteiligten Autorinnen und Autoren an den Publikationen 1-6 wird nach folgenden Kriterien aufgestellt:

1. Idee, Versuchsplanung:
2. Versuchsdurchführung:
3. Auswertung der Ergebnisse:
4. Erstellen des Manuskriptes:
5. Wissenschaftlicher Beitrag:
6. Korrespondierender Autor:
7. Institutionen:

Publikation 1:

Stubbendorff M, Neofytou E, Deuse T, Mattutat D, Lange C, Reichenspurner H, Robbins RC, Beygui R, Volk HD, Schrepfer S. Impact of donor age on biological and immunogenic properties of mesenchymal stromal cells. Med Res Arc. 2015 No (3).

Folgende Personen und Institutionen waren in Kooperation beteiligt:

- | | |
|--------------------------------|---|
| 1. Idee, Versuchsplanung: | Dr. M. Stubbendorff, Prof. Dr. S. Schrepfer |
| 2. Versuchsdurchführung: | Dr. M. Stubbendorff, D. Mattutat |
| 3. Auswertung der Ergebnisse: | Dr. M. Stubbendorff, D. Mattutat |
| 4. Erstellen des Manuskriptes: | E. Neofytou, Dr. M. Stubbendorff |
| 5. Wissenschaftlicher Beitrag: | Prof. Dr. T. Deuse, PD Dr. C. Lange, Dr. R. C. Robbins, Dr. R. Beygui, Prof. Dr. H. D. Volk |
| 6. Korrespondierender Autor: | Prof. Dr. S. Schrepfer |
| 7. Institutionen: | Herzchirurgie, Universitäres Herzzentrum Hamburg; Falk Cardiovascular research Center, Stanford; Humangenetisches Institut, Universitätsklinikum Hamburg, Institut für medizinische Immunologie und Berlin-Brandenburg Zentrum für regenerative Therapien |

Publikation 2:

Deuse T, **Stubbendorff M**, Tang-Quan K, Phillips N, Kay MA, Eiermann T, Phan TT, Volk HD, Reichenspurner H, Robbins RC, Schrepfer S. Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. Cell Transplant. 2011;20(5):655-67.

Folgende Personen und Institutionen waren in Kooperation beteiligt:

- | | |
|--------------------------------|--|
| 1. Idee, Versuchsplanung: | Prof. Dr. S. Schrepfer, PD Dr. T. Deuse |
| 2. Versuchsdurchführung: | Dr. M. Stubbendorff, K. Tan-Quan |
| 3. Auswertung der Ergebnisse: | Dr. M. Stubbendorff, K. Tan-Quan, Prof. Dr. S. Schrepfer |
| 4. Erstellen des Manuskriptes: | Prof. Dr. T. Deuse, Dr. M. Stubbendorff |
| 5. Wissenschaftlicher Beitrag: | Dr. N. Phillips, Dr. M. A. Kay, Prof. Dr. T. T. Phan, Dr. R. C. Robbins, Prof. Dr. H. D. Volk, Prof. Dr. H. Reichenspurner |
| 6. Korrespondierender Autor: | Prof. Dr. S. Schrepfer |
| 7. Institutionen: | Herzchirurgie, Universitäres Herzzentrum Hamburg; Falk Cardiovascular research Center, Stanford |

Publikation 3:

Stubbendorff M, Deuse T, Hua X, Phan TT, Bieback K, Atkinson K, Eiermann TH, Velden J, Schröder C, Reichenspurner H, Robbins RC, Volk HD, Schrepfer S. Immunological Properties of Extraembryonic Mesenchymal Stromal Cells Derived from Gastational Tissue. Stem Cells Dev. 2013 Oct 1;22(19):2619-29.

Folgende Personen und Institutionen waren in Kooperation beteiligt:

- | | |
|--------------------------------|--|
| 1. Idee, Versuchsplanung: | Dr. M. Stubbendorff, Prof. Dr. S. Schrepfer |
| 2. Versuchsdurchführung: | Dr. M. Stubbendorff |
| 3. Auswertung der Ergebnisse: | Dr. M. Stubbendorff |
| 4. Erstellen des Manuskriptes: | Dr. M. Stubbendorff, Prof. Dr. T. Deuse |
| 5. Wissenschaftlicher Beitrag: | Dr. X. Hua, PD Dr. K. Bieback, Prof. Dr. T. T. |

- Phan, Dr. K. Atkinson, Dr. J. Velden, Prof. Dr. C. Schröder, Dr. R. C. Robbins, Prof. Dr. H. D. Volk, Prof. Dr. H. Reichenspurner
6. Korrespondierender Autor: Prof. Dr. S. Schrepfer
7. Institutionen: Herzchirurgie, Universitäres Herzzentrum Hamburg; Falk Cardiovascular research Center, Stanford; Humangenetisches Institut, Universitätsklinikum Hamburg, Institut für medizinische Immunologie und Berlin-Brandenburg Zentrum für regenerative Therapien

Publikation 4:

Deuse T, Wang D, **Stubbendorff M**, Itagaki R, Grabosch A, Greaves LC, Alawi M, Grünewald A, Hu X, Hua X, Velden J, Reichenspurner H, Robbins RC, Jaenisch R, Weissman IL, Schrepfer S. SCNT-derived ESCs with mismatched mitochondria trigger an immune response in allogeneic hosts. Cell Stem Cell. 2015 Jan 8;16(1):33-8.

Folgende Personen und Institutionen waren in Kooperation beteiligt:

1. Idee, Versuchsplanung: Prof. Dr. S. Schrepfer
2. Versuchsdurchführung: Dr. M. Stubbendorff, Dr. Antje Grabosch, MD Ryo Itagaki
3. Auswertung der Ergebnisse: Dr. M. Stubbendorff, Dr. Antje Grabosch, Prof. Dr. S. Schrepfer
4. Erstellen des Manuskriptes: Prof. Dr. S. Schrepfer, PD Dr. T. Deuse
5. Wissenschaftlicher Beitrag: Prof. Dr. T. Deuse, Dr. R. C. Robbins, Prof. Dr. H. Reichenspurner, Prof. Dr. R. Jaenisch
6. Korrespondierender Autor: Prof. Dr. S. Schrepfer
7. Institutionen: Herzchirurgie, Universitäres Herzzentrum Hamburg, Newcastle University, University Hospital Erlangen, Whitehead Institute MIT, Stanford University

Publikation 5:

Deuse T, Hua X, Taylor V, **Stubbendorff M**, Baluom M, Chen Y, Park G, Velden J, Streichert T, Reichenspurner H, Robbins RC, Schrepfer S. Significant Reduction of

acute cardiac allograft rejection by selective Janus Kinase-1/3 inhibition using R507 and R545. Transplantation 2012;94:695-702.

Folgende Personen und Institutionen waren in Kooperation beteiligt:

1. Idee, Versuchsplanung: Prof. Dr. S. Schrepfer, Prof. Dr. T. Deuse
2. Versuchsdurchführung: Dr. X. Hua, Dr. M. Stubbendorff, V. Taylor
3. Auswertung der Ergebnisse: Dr. X. Hua, Dr. M. Stubbendorff
4. Erstellen des Manuskriptes: Prof. Dr. T. Deuse, Prof. Dr. S. Schrepfer, Dr. M. Stubbendorff
5. Wissenschaftlicher Beitrag: Dr. V. Taylor, Dr. M. Baluom, Dr. Y. Chen, Dr. G. Park, Dr. J. Velden, Prof. Dr. T. Streichert, Dr. R. C. Robbins, Prof. Dr. H. Reichenspurner
6. Korrespondierender Autor: Prof. Dr. S. Schrepfer
7. Institutionen: Herzchirurgie, Universitäres Herzzentrum Hamburg; Falk Cardiovascular research Center, Stanford

Publikation 6

Stubbendorff M, Deuse T, Hammel A, Robbins RC, Reichenspurner H, Schrepfer S. Orthotopic Aortic Transplantation: A Rat Model to Study the Development of chronic Vasculopathy. J Vis Exp. 2010 Dec4;(46).

Folgende Personen und Institutionen waren in Kooperation beteiligt:

1. Idee, Versuchsplanung: Prof. Dr. S. Schrepfer, Prof. Dr. T. Deuse
2. Versuchsdurchführung: Dr. M. Stubbendorff, A. Hammel
3. Auswertung der Ergebnisse: Dr. M. Stubbendorff, Prof. Dr. T. Deuse
4. Erstellen des Manuskriptes: Dr. M. Stubbendorff, Prof. Dr. S. Schrepfer
5. Wissenschaftlicher Beitrag: Dr. M. Stubbendorff, Prof. Dr. T. Deuse Dr. R. C. Robbins, Prof. Dr. H. Reichenspurner
6. Korrespondierender Autor: Prof. Dr. S. Schrepfer
7. Institutionen: Herzchirurgie, Universitäres Herzzentrum Hamburg; Falk Cardiovascular research Center, Stanford;

11. Publikationen

1. Harting T, **Stubbendorff M**, Willenbrock S, Wagner S, Schadzek P, Ngezahayo A, Murua Escobar H, Nolte I. The Effect of Dichloroacetate in Canine Prostate Adenocarcinomas and Transitional Cell Carcinomas in vitro. *Int J Oncol*. 2016 Oct 5. 49:2341-2350.
2. Guihaire J, Itagaki R, **Stubbendorff M**, Hua X, Deuse T, Ullrich S, Fadel E, Dorfmueller P, Robbins RC, Reichenspurner H, Schumacher U, Schrepfer S. Expression of S100A4 protein is T cell-mediated in a Humanized Model of Chronic Obliterative Airway Disorder after Orthotopic Tracheal Transplantation. *Transpl Int*. 2016 Sep 10.
3. Deuse T, Hua X, **Stubbendorff M**, Taylor V, Chen Y, Park G, Fink J, Renne T, Reichenspurner H, Robbins RC, Schrepfer S. The selective JAK1/3- inhibitor R507 mitigates obliterative airway disease both with systemic administration and aerosol inhalation. *Transplantation*. 2016 May;100(5):1022-31.
4. **Stubbendorff M**, Neofytou E, Deuse T, Mattutat D, Lange C, Reichenspurner H, Robbins RC, Beygui R, Volk HD, Schrepfer S. Impact of donor age on biological properties of mesenchymal stromal cells. *Med Res Arc*. 2015 No (3).
5. Wang D, Deuse T, **Stubbendorff M**, Chernogubova E, Erben RG, Eken SM, Jin H, Heeger CH, Behnisch B, Reichenspurner H, Robbins RC, Tsao PS, Schrepfer S, Maegdefessel L. Local microRNA modulation is feasible: A novel anti-miR-21-eluting stent prevents in-stent restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015 Sep;35(9):1945-53.
6. Deuse T, Wang D, **Stubbendorff M**, Itagaki R, Grabosch A, Greaves LC, Alawi M, Grünewald A, Hua X, Velden J, Robbins RC, Jaenisch R, Weissmann IL, Schrepfer S. The alloantigenicity in somatic cell nucleus transfer-derived stem cells. *Cell Stem Cell* 2015 Jan 8;16(1):33-8.

7. Deuse T, Hua X, Wang D, Maegdefessel L, Heeren J, Scheja L, Bolanos JP, Rakovic A, Spin JM, **Stubbendorff M**, Ikeno F, Länger F, Zeller T, Schulte-Uentrop L, Stöhr A, Itagaki R, Haddad F, Eschenhagen T, Blankenberg S, Kiefmann R, Reichenspurner H, Velden J, Klein C, Yeung A, Robbins RC, Tsao PS, Schrepfer S. Vascular smooth muscle cells mimic neoplastic growth characteristics during myointima formation. *Nature*. 2014 May 29;509(7502):641-4.
8. **Stubbendorff M**, Deuse T, Hua X, Ali Z, Reichenspurner H, Maegdefessel L, Robbins RC, Schrepfer S. Inducing myointimal hyperplasia versus atherosclerosis in mice: an introduction of two valid models. *J Vis Exp*. 2014 May 14;(87).
9. **Stubbendorff M**, Deuse T, Hua X, Phan TT, Bieback K, Atkinson K, Eiermann TH, Velden J, Schröder C, Reichenspurner H, Robbins RC, Volk HD, Schrepfer S. Immunological Properties of Extraembryonic Mesenchymal Stromal Cells Derived from Gastational Tissue. *Stem Cells Dev*. 2013 Oct 1;22(19):2619-29.
10. De Raet JM, Arroyo J, Büchner S, Siregard S, Andreas M, Halvorsen F, Grabosch A, **Stubbendorff M**. How to build your own coronary anastomosis simulator from scratch. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2013 Jun;16(6):772-6.
11. Hua X, Deuse T, Chen YJ, Wulff H, **Stubbendorff M**, Köhler R, Miura H, Länger F, Reichenspurner H, Robbins RC, Schrepfer S. The potassium channel KCa3.1 as new therapeutic target for the prevention of obliterative airway disease. *Transplantation*. 2013 Jan 27;95(2):285-92.
12. Deuse T, Hua X, Taylor V, **Stubbendorff M**, Baluom M, Chen Y, Park G, Velden J, Streichert T, Reichenspurner H, Robbins RC, Schrepfer S. Significant Reduction of Acute Cardiac Allograft Rejection by Selective Janus Kinase-1/3 Inhibition Using R507 and R545. *Transplantation*. 2012 Oct 15;94(7):695-702.

13. Weinberger F, Mehrkens D, Friedrich FW, **Stubbendorff M**, Hua X, Müller JC, Schrepfer S, Evans SM, Carrier L, Eschenhagen T. Localization of Islet-1-positive cells in the healthy and infarcted adult murine heart. *Circ Res*. 2012 May 11;110(10):1303-10.
14. Deuse T, **Stubbendorff M**, Tang-Quan K, Phillips N, Kay MA, Eiermann T, Phan TT, Volk HD, Reichenspurner H, Robbins RC, Schrepfer S. Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2011;20(5):655-67.
15. Rudolph TK, Wipper S, Reiter B, Rudolph V, Coym A, Detter C, Lau D, Klinke A, Friedrichs K, Rau T, Pekarova M, Russ D, Knöll K, **Kolk M**, Schroeder B, Wegscheider K, Andresen H, Schwedhelm E, Boeger R, Ehmke H, Baldus S. Myeloperoxidase deficiency preserves vasomotor function in humans. *Eur Heart J*. 2011 Jun 30.
16. **Stubbendorff M**, Deuse T, Hammel A, Robbins RC, Reichenspurner H, Schrepfer S. Orthotopic Aortic Transplantation: A Rat Model to Study the Development of chronic Vasculopathy. *J Vis Exp*. 2010 Dec4;(46).
17. **Kolk MV**, Meyberg D, Deuse T, Tang-Quan KR, Robbins RC, Reichenspurner H, Schrepfer S. LAD-ligation: a murine model of myocardial infarction. *J Vis Exp*. 2009 Oct 14;(32).

12. Anhang

12.1 Publikationen die in dieser Arbeit verwendet wurden

12.1.1

Med Res Arc. 2015 No (3).

IMPACT OF DONOR AGE ON BIOLOGICAL AND IMMUNOGENIC PROPERTIES OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS

Mandy Stubbendorff, Evgenios Neofytou, Tobias Deuse, Daniel Mattutat, Claudia Lange, Hermann Reichensperner, Robert C. Robbins, Ramin E. Beygui, Hans-Dieter Volk, Sonja Schrepfer

Abstract

Over the last decades, mesenchymal stromal cells MSC have emerged as a promising therapeutic tool for cell-based therapies. However, their biological characteristics and beneficial potential may decline with patients' age. Because most patients amenable for regenerative medicine have increased age, this could dramatically limit the autologous use of MSCs. We therefore sought to characterize the biological, immunological, and angiogenetic capacities of infant (iMSCs) versus aged MSCs (aMSCs). Both iMSCs and aMSCs showed typical spindle-shaped morphology, plastic adherence, and the same potential to differentiate into osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages. iMSCs and aMSCs expressed MSC-typical surface markers such as CD90 and CD105 and were negative for CD45, CD34, CD31 and CD117. iMSCs showed faster in vitro proliferation ($p < 0.001$), migration ($p < 0.001$), and stronger endothelial adhesion ($p = 0.018$) than aMSC. There were no differences in HLA class I, $\beta 2$ microglobulin, HLA class II, and co-stimulatory molecule expression between iMSCs and aMSCs. Both immunogenic HLA class II and CD54 and tolerogenic HLA-E expression were upregulated by IFN γ . iMSCs showed significantly higher CD29 signals and stronger endothelial adhesion than aMSCs. Interestingly, iMSCs outperformed aMSCs in different angiogenesis parameters. If not used in an autologous setting, iMSCs and aMSCs similarly provoked TH1 and T H2 responses in unidirectional ELISPOT assays and donor-specific IgM antibody production. Our results thus suggest that donor age does not affect immunogenicity and immunomodulatory properties, but markedly reduces biological properties of proliferation, migration, adhesion, and limits their angiogenic effects.

12.1.2

Cell Transplant. 2011;20(5):655-67. doi: 10.3727/096368910X536473. Epub 2010 Nov 5.

Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells.

Deuse T, Stubbendorff M, Tang-Quan K, Phillips N, Kay MA, Eiermann T, Phan TT, Volk HD, Reichenspurner H, Robbins RC, Schrepfer S.

Abstract

We here present an immunologic head-to-head comparison between human umbilical cord lining mesenchymal stem cells (cIMSCs) and adult bone marrow MSCs (bmMSCs) from patients >65 years of age. cIMSCs had significantly lower HLA class I expression, higher production of tolerogenic TGF- β and IL-10, and showed significantly faster proliferation. In vitro activation of allogeneic lymphocytes and xenogeneic in vivo immune activation was significantly stronger with bmMSCs, whereas immune recognition of cIMSCs was significantly weaker. Thus, bmMSCs were more quickly rejected in immunocompetent mice. IFN- γ at 25 ng/ml increased both immunogenicity by upregulation of HLA class I/ HLA-DR expression and tolerogenicity by increasing intracellular HLA-G and surface HLA-E expression, augmenting TGF- β and IL-10 release, and inducing indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression. Higher concentrations of IFN- γ (>50 ng/ml) further enhanced the immunosuppressive phenotype of cIMSCs, more strongly downregulating HLA-DR expression and further increasing IDO production (at 500 ng/ml). The net functional immunosuppressive efficacy of MSCs was tested in mixed lymphocyte cultures. Although both cIMSCs and bmMSCs significantly reduced in vitro immune activation, cIMSCs were significantly more effective than bmMSCs. The veto function of both MSC lines was enhanced in escalating IFN- γ environments. In conclusion, cIMSCs show a more beneficial immunogeneic profile and stronger overall immunosuppressive potential than aged bmMSCs.

PMID: 21054940

DOI: [10.3727/096368910X536473](https://doi.org/10.3727/096368910X536473)

12.1.3

Stem Cells Dev. 2013 Oct 1;22(19):2619-29. doi: 10.1089/scd.2013.0043. Epub 2013 Jun 29.

Immunological properties of extraembryonic human mesenchymal stromal cells derived from gestational tissue.

Stubbendorff M¹, Deuse T, Hua X, Phan TT, Bieback K, Atkinson K, Eiermann TH, Velden J, Schröder C, Reichenspurner H, Robbins RC, Volk HD, Schrepfer S.

Abstract

Mesenchymal stromal cells (MSCs) have been isolated from many tissues, including gestational tissue. To date, a study comparing the properties and suitability of these cells in cell-based therapies is lacking. In this study, we compared the phenotype, proliferation rate, migration, immunogenicity, and immunomodulatory capabilities of human MSCs derived from umbilical cord lining (CL-MSCs), umbilical cord blood (CB-MSCs), placenta (P-MSCs), and Wharton's jelly (WJ-MSCs). Differences were noted in differentiation, proliferation, and migration, with CL-MSCs showing the highest proliferation and migration rates resulting in prolonged survival in immunodeficient mice. Moreover, CL-MSCs showed a prolongation in survival in xenogeneic BALB/c mice, which was attributed to their ability to dampen TH1 and TH2 responses. Weaker human cellular immune responses were detected against CL-MSCs and P-MSCs, which were correlated with their lower HLA I expression. Furthermore, HLA II was upregulated less substantially by CL-MSCs and CB-MSCs after IFN- γ stimulation. MSC types did not differ in indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression after IFN- γ stimulation. Despite their lower IDO, HLA-G, and TGF- β 1 expression, only CL-MSCs were able to reduce the release of IFN- γ by lymphocytes in a mixed lymphocyte reaction. In summary, CL-MSCs showed the best characteristics for cell-based strategies, as they are hypo-immunogenic and show high proliferation and migration rates. In addition, these studies show for the first time that although immunomodulatory molecules HLA-G, HLA-E, and TGF- β play an important role in MSC immune evasion, basal and induced HLA expression seems to be decisive in determining the immunogenicity of MSCs.

PMID: 23711207

DOI: [10.1089/scd.2013.0043](https://doi.org/10.1089/scd.2013.0043)

12.1.4

Cell Stem Cell. 2015 Jan 8;16(1):33-8. doi: 10.1016/j.stem.2014.11.003. Epub 2014 Nov 20.

SCNT-derived ESCs with mismatched mitochondria trigger an immune response in allogeneic hosts.

Deuse T¹, Wang D², Stubbendorff M², Itagaki R², Grabosch A², Greaves LC³, Alawi M⁴, Grünewald A⁵, Hu X², Hua X², Velden J⁶, Reichenspurner H⁷, Robbins RC⁸, Jaenisch R⁹, Weissman IL¹⁰, Schrepfer S¹¹.

Abstract

The generation of pluripotent stem cells by somatic cell nuclear transfer (SCNT) has recently been achieved in human cells and sparked new interest in this technology. The authors reporting this methodical breakthrough speculated that SCNT would allow the creation of patient-matched embryonic stem cells, even in patients with hereditary mitochondrial diseases. However, herein we show that mismatched mitochondria in nuclear-transfer-derived embryonic stem cells (NT-ESCs) possess alloantigenicity and are subject to immune rejection. In a murine transplantation setup, we demonstrate that allogeneic mitochondria in NT-ESCs, which are nucleus-identical to the recipient, may trigger an adaptive alloimmune response that impairs the survival of NT-ESC grafts. The immune response is adaptive, directed against mitochondrial content, and amenable for tolerance induction. Mitochondrial alloantigenicity should therefore be considered when developing therapeutic SCNT-based strategies.

PMID: 25465116

DOI: [10.1016/j.stem.2014.11.003](https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.11.003)

12.1.5

Transplantation. 2012 Oct 15;94(7):695-702. doi: 10.1097/TP.0b013e3182660496.

Significant reduction of acute cardiac allograft rejection by selective janus kinase-1/3 inhibition using R507 and R545.

Deuse T¹, Hua X, Taylor V, Stubbendorff M, Baluom M, Chen Y, Park G, Velden J, Streichert T, Reichenspurner H, Robbins RC, Schrepfer S.

Abstract

BACKGROUND:

Selective inhibition of lymphocyte activation through abrogation of signal 3-cytokine transduction emerges as a new strategy for immunosuppression. This is the first report on the novel Janus kinase (JAK)1/3 inhibitors R507 and R545 for prevention of acute allograft rejection.

METHODS:

Pharmacokinetic and in vitro enzyme inhibition assays were performed to characterize the drugs. Heterotopic Brown Norway-Lewis heart transplantations were performed to study acute cardiac allograft rejection, graft survival, suppression of cellular host responsiveness, and antibody production. Therapeutic and subtherapeutic doses of R507 (60 and 15 mg/kg 2 times per day) and R545 (20 and 5 mg/kg 2 times per day) were compared with those of tacrolimus (Tac; 4 and 1 mg/kg once per day).

RESULTS:

Plasma levels of R507 and R545 were sustained high for several hours. Cell-based enzyme assays showed selective inhibition of JAK1/3-dependent pathways with 20-fold or greater selectivity over JAK2 and Tyrosine kinase 2 kinases. After heart transplantation, both JAK1/3 inhibitors reduced early mononuclear graft infiltration, even significantly more potent than Tac. Intragraft interferon- γ release was significantly reduced by R507 and R545, and for interleukin-10 suppression, they were even significantly more potent than Tac. Both JAK1/3 inhibitors and Tac were similarly effective in reducing the host Th1 and Th2, but not Th17, responsiveness and similarly prevented donor-specific immunoglobulin M antibody production. Subtherapeutic and therapeutic R507 and R545 doses prolonged the mean graft survival and were similarly effective as 1 and 4 mg/kg Tac, respectively. In combination regimens, however, only R507 showed highly beneficial synergistic drug interactions with Tac.

CONCLUSIONS:

Both R507 and R545 are potent novel immunosuppressants with favorable pharmacokinetics and high JAK1/3 selectivity, but only R507 synergistically interacts with Tac.

PMID: 22971540

DOI: [10.1097/TP.0b013e3182660496](https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3182660496)

12.1.6

J Vis Exp. 2010 Dec 4;(46). pii: 1989. doi: 10.3791/1989.

Orthotopic aortic transplantation: a rat model to study the development of chronic vasculopathy.

Stubbendorff M¹, Deuse T, Hammel A, Robbins RC, Reichenspurner H, Schrepfer S.

Abstract

Research models of chronic rejection are essential to investigate pathobiological and pathophysiological processes during the development of transplant vasculopathy (TVP). The commonly used animal model for cardiovascular chronic rejection studies is the heterotopic heart transplant model performed in laboratory rodents. This model is used widely in experiments since Ono and Lindsey published their technique. To analyze the findings in the blood vessels, the heart has to be sectioned and all vessels have to be measured. Another method to investigate chronic rejection in cardiovascular questionings is the aortic transplant model. In the orthotopic aortic transplant model, the aorta can easily be histologically evaluated. The PVG-to-ACI model is especially useful for CAV studies, since acute vascular rejection is not a major confounding factor and Cyclosporin A (CsA) treatment does not prevent the development of CAV, similar to what we find in the clinical setting. A 7-day period of CsA is required in this model to prevent acute rejection and to achieve long-term survival with the development of TVP. This model can also be used to investigate acute cellular rejection and media necrosis in xenogeneic models.

PMID: 21178963

PMCID: PMC3278333

DOI: 10.3791/1989

12.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Frau Prof. Schrepfer für die Unterstützung bei der Durchführung der in dieser Arbeit eingebundenen Studien danken. Meine Motivation für diese Arbeit wurde durch den mir gewährten Freiraum in der Umsetzung gefördert. Ferner gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Reichenspurner, dem Leiter der Herzchirurgie am Universitären Herzzentrum Hamburg, der stets ein großes Interesse und eine große Affinität zur Forschung bewiesen hat.

Herrn Prof. Detter und seiner damaligen Arbeitsgruppe am Universitären Herz Zentrum Hamburg und besonders Herrn Prof. Bernd Schröder aus dem Physiologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover möchte ich für die Betreuung und Förderung meiner Promotion danken. Diese Dissertation bestärkte und motivierte mich in meinem Streben auf diesem Gebiet weiterzuarbeiten.

Ein besonderer Dank geht an alle Mitarbeiter des TSI Labors von Frau Prof. Schrepfer. Weiterhin möchte ich allen Kollaboratoren danken, die durch Bereitstellung von Zellen oder mit ihrer Expertise in umfangreichen Gesprächen zum Gelingen der hier verwendeten Studien beigetragen haben.

An dieser Stelle möchte ich auch Herrn Prof. Steinberg und Herrn Prof. Niemann für ihre Hilfe und ihren Rat beim Aufsetzen der vorliegenden Schrift und für die Übernahme einer Mentorenfunktion für mich danken.

Für die Motivation und viele gute Gespräche möchte ich den Teilnehmerinnen der Mentoring Gruppe des UKE danken und meiner Mentorin Frau Prof. Lucie Carrier.

Für die Geduld und die Unterstützung über die vergangenen Jahre hinweg möchte ich ferner meiner Familie herzlich danken.

In besonderem Maße möchte ich meinem Ehemann Falk-Florian für sein Verständnis, seine innere Ruhe und seine Unterstützung danken.