

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I
Hämatologie und Onkologie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek

Migration von Mesenchymalen und Hämatopoetischen Stammzellen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Johanna Dinter
aus Bergisch Gladbach

promoviert am 26. Februar 2014

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h.c. Th. Krieg

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. med. P. Staib

2. Berichterstatter: Professor Dr. rer. nat. A. Sachinidis

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten: Privatdozentin Dr. Annette Schmidt, Professor Dr. Timo Schinköthe und Privatdozent Dr. Peter Staib.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln, den

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente und die Erhebung der klinischen Daten sind unter meiner Betreuung und Mithilfe von Frau J. Ick, Frau D. Chrobok, Frau M. Zibulla, Frau S. Hallmann, Herrn C. Leistert und Frau S. Winter durchgeführt worden.

Danksagung

Herrn Universitätsprofessor Dr. M. Hallek danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Klinik unter der Betreuung von Herrn Privatdozent Dr. P. Staib durchführen zu können.

Herrn Privatdozent Dr. P. Staib und Herrn Professor Dr. T. Schinkoethe gebührt mein besonderer Dank für die sachkundige Betreuung und die freundschaftliche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und in der wissenschaftlichen Diskussion. Ihre Anregungen als Wissenschaftler und Betreuer waren mir für die geistige Erstellung dieser Arbeit und für die Versuchsdurchführung besonders hilfreich.

Darüber hinaus bin ich Herrn Professor Dr. W. Bloch dankbar für die Möglichkeit, den Großteil der Experimente in seiner Abteilung durchführen zu können. Die dargestellten Ergebnisse entstanden überwiegend unter der Anleitung von Frau Privatdozentin Dr. A. Schmidt, der ich für die gute Zusammenarbeit danken möchte.

Herzlichst danken möchte ich meiner Mitdotorandin Frau Jennifer Ick für ihre tatkräftige Unterstützung, zahlreichen Anregungen und ihre Inspiration. Des Weiteren gilt mein Dank den Medizinisch Technischen Assistentinnen, Frau D. Chrobok, Frau M. Zibulla, Frau S. Hallmann, Frau M. Pesch und Frau A. Voss für die stets freundschaftlich und konstruktive Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich auch Frau S. Winter und Herrn Privatdozent Dr. med C. Scheid für die freundliche Unterstützung danken.

Abschließend gilt mein Dank allen, die zum Gelingen dieser Arbeit im Labor für Hämatologie und Onkologie der Klinik I für Innere Medizin der Universität zu Köln beigetragen haben.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Stammzelltransplantation	3
1.2	Die beteiligten Zellen	6
1.2.1	Hämatopoetische Stammzellen (HSC)	6
1.2.2	Die hämatopoetische Stammzellnische	7
1.2.3	Homing und Engraftment	8
1.2.4	Mesenchymale Stammzellen	9
1.2.5	Migrationsverhalten der HSC	10
1.2.6	Migrationsverhalten der MSC	12
1.3	Fragestellung	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Materialien	15
2.1.1	Lösungen	15
2.1.2	Patientenmaterial	16
2.1.3	Materialien	16
2.1.4	Geräte	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	Dichtegradientenzentrifugation	17
2.2.2	MACS-Sortierung der HSC	18
2.2.3	Durchflusszytometrie der HSC	18
2.2.4	HSC-Kultivierung	20
2.2.5	Isolation und Kultivierung der MSC	20
2.2.6	Qualitätskontrolle der MSC	21
2.2.7	Kultivierungsversuche der HSC mit MSC-Überstand	22
2.2.8	Kultivierungsversuche der HSC mit MSC	22
2.2.9	Migrationsversuch	23

3	Ergebnisse	27
3.1	Kultivierung.....	27
3.1.1	HSC in serumfreiem Medium.....	27
3.1.2	HSC mit MSC-Überstand.....	28
3.1.3	HSC mit MSC.....	28
3.2	Differenzierung.....	29
3.2.1	HSC in serumfreiem Medium.....	29
3.2.2	HSC in Kokultur mit MSC.....	29
3.3	HSC-Migration.....	30
3.3.1	Migration von HSC/MSC-Überstand.....	30
3.3.2	Migration von HSC/MSC.....	31
3.4	MSC-Migration.....	31
3.4.1	Migration von MSC/HSC.....	31
3.4.2	Migration von MSC/MSC.....	32
3.4.3	Migration von MSC/MSC mit bFGF-Inhibitor.....	33
3.4.4	Migration von MSC/HSC mit bFGF-Inhibitor.....	34
4	Diskussion	37
4.1	Kultivierung.....	37
4.2	Differenzierung.....	40
4.3	HSC-Migration.....	41
4.4	MSC-Migration.....	43
4.5	Klinischer Ausblick.....	45
5	Zusammenfassung	47
6	Literaturverzeichnis	48
7	Lebenslauf	63

1 Einleitung

1.1 Stammzelltransplantation

Die Stammzelltransplantation, bei der hämatopoetische Stammzellen von einem Spender auf einen Empfänger übertragen werden (31), ist zur Zeit eine der wichtigsten therapeutischen Optionen im Kampf gegen schwerwiegende hämatologische Erkrankungen.

Der regelhafte Einsatz der ehemals so genannten „Bluttransplantation“ begann erst Mitte der 1980er Jahre (50). Zunächst bestand das Verfahren der „Bluttransfusion“ aus der klassischen Knochenmarktransplantation. Hier werden die benötigten Blutstammzellen aus Knochenmark-Biopsaten gewonnen. Seit 1993 werden jedoch vor allem periphere Stammzellen in der Stammzelltransplantation genutzt (131). Die Europe Blood and Marrow Transplant Group (EBMT) beschrieb einen von 15% auf 75% gestiegenen Anteil der autologen Stammzelltransplantationen mit peripheren Stammzellen in der Zeit von 1991 bis 1994 in Europa (36). Mitte der 1990er Jahre wurden in einem umfangreichen Review die Vorteile der Transplantation mobilisierter Stammzellen aus dem peripheren Blut gegenüber einer klassischen Knochenmarktransplantation aufgezeigt: 1.) ein schnelleres Engraftment, 2.) Kosteneffektivität und 3.) keine schwere graft-versus-host-disease (GvHD) (131). Engraftment ist als Anwachsen der Stammzellen im Knochenmark und Regeneration der Hämatopoese zu verstehen (20). Ein schnelleres Engraftment bedeutet konsekutiv eine schnellere Regeneration des Knochenmarks und somit eine schnellere Hämatopoese.

Die Stammzelltransplantation wird sowohl autolog als auch allogene durchgeführt. Bei der autologen Stammzelltransplantation sind Spender und Empfänger im Gegensatz zu der allogenen Transplantation ein und dieselbe Person (10). Die autologe Stammzelltransplantation wird z.B. bei hoch-malignen Non-Hodgkin-Lymphomen nach einem Rezidiv, bei niedrig-malignen

Lymphomen, bei Hodgkin-Lymphomen, beim Multiplen Myelom, bei Hodentumoren, bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) und der chronischen lymphatischen Leukämie eingesetzt (109). Dies sind Erkrankungen, die einer Hochdosis-Chemotherapie bedürfen, welche myelotoxisch ist. Um die Blutbildung nach einer stammzelltoxischen Chemotherapie und/oder Strahlentherapie wieder aufzubauen, werden die Patienten anschließend einer autologen Stammzelltransplantation zugeführt (132). Die benötigten Stammzellen werden dem Patienten vor der Chemotherapie entnommen und nach der Chemotherapie retransfundiert (31). Somit ermöglicht die Stammzelltransplantation die zielgerichtete Therapie der Grunderkrankung.

Für eine allogene Stammzelltransplantation, also die Übertragung von hämatopoetischen Stammzellen von einem fremden Spender auf einen Empfänger, ist ein kompatibler Spender erforderlich (142). Um die Kompatibilität prüfen zu können, erfolgt eine sogenannte HLA-Typisierung (HLA=humane Leukozytenantigen) (70). Die allogene Stammzelltransplantation wird z.B. bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL), der akuten myeloischen Leukämie (AML) und myelodysplastischen Syndromen (MDS), der CML, der Osteomyelofibrose (OMF), verschiedenen Lymphomen, dem multiplen Myelom und der schweren aplastischen Anämie (SAA) eingesetzt (109). Bei der allogenen Stammzelltransplantation kann es aufgrund von HLA-Inkompatibilitäten zu einer Abstoßungsreaktion, einer sogenannten Graft-versus-host-disease (Gvhd) kommen (54). Hierbei richten sich Abwehrzellen des Spenders gegen Gewebe des Empfängers (34). Dies kann u.a. zu schweren Hautschädigungen, schweren Enteritiden und Hepatitiden führen (10, 17, 142).

Das International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) zeigte, dass die Anzahl der autologen Stammzelltransplantation die der allogenen Transplantation seit 1990 überschreitet.

Grundlage der peripheren Stammzelltransplantation ist die Mobilisation der Stammzellen aus dem Knochenmark und ihre Ausschwemmung in das periphere Blut. Dieses wird beim Spender durch die Gabe eines

hämatopoetischen Wachstumsfaktors, wie z.B. G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) herbeigeführt. Die Stammzellen werden mittels Leukapherese gewonnen und bis zur Transfusion konserviert. Die hämatopoetischen Stammzellen (HSC) wandern gerichtet über die Blutgefäße ins Knochenmark (22), es findet das sogenannte Homing statt. Diese gezielte Migration ist eine wichtige Voraussetzung für ein erfolgreiches Engraftment (20) und somit für eine erfolgreiche Stammzelltransplantation und das outcome des Patienten. Ziel vieler wissenschaftlicher Bemühungen ist es daher, diesen Vorgang zu optimieren. Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente beleuchten einen möglichen Ansatzpunkt für die Optimierung des Engraftments der hämatopoetischen Stammzellen nach einer Stammzelltransplantation (siehe auch Kapitel 1.3).

1.2 Die beteiligten Zellen

1.2.1 Hämatopoetische Stammzellen (HSC)

Hämatopoetische Stammzellen (HSC) sind pluripotente Zellen. Sie befinden sich im Knochenmark, aber auch im peripheren Blut (peripheral blood stem cells = PBSC). Sie können sowohl sich selbst erneuern als auch in alle zehn verschiedenen Zelllinien des Blutes differenzieren: Erythrozyten, Thrombozyten, Neutrophile, Eosinophile, Basophile, Monozyten, B- und T-Lymphozyten, natürlich Killerzellen und dendritische Zellen (12) (siehe Abbildung 1). Eine HSC kann sich auf zwei verschiedene Arten teilen: symmetrisch und asymmetrisch (12). Eine symmetrische Teilung bedeutet eine selbsterneuernde Produktion von identischen HSC. Bei der asymmetrischen Teilung entsteht sowohl eine identische Tochter-HSC als auch eine HSC, die sich in der Folge weiter differenziert (12).

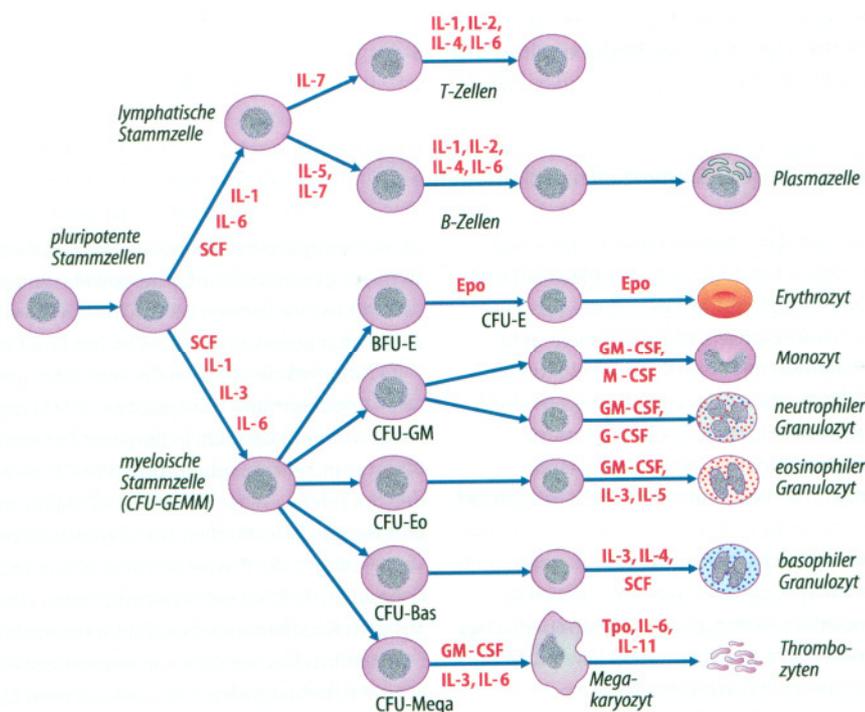


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Hämatopoese (120)

Der Marker zur Isolation der HSC aus dem peripheren Blut ist seit über 15 Jahren CD34 (Cluster of Differentiation 34). Deshalb werden in der Literatur HSC auch als CD34+-Zellen bezeichnet. Hierbei handelt es sich aber um eine äußerst heterotope Zellpopulation (89). So sind zur Isolation aus dem peripheren Blut weitere Oberflächenmarker erforderlich: So CD45 (76), CD10, CD33, CD133 und ein negativer CD38- und CD49-Status (92).

Das klinische Interesse an HSC besteht hauptsächlich in ihrer Verwendung im Rahmen einer Stammzelltransplantation (siehe Kapitel 1.1).

1.2.2 Die hämatopoetische Stammzellnische

Die hämatopoetische Stammzellnische ist die natürliche, direkte Umgebung der HSC im Knochenmark. Hier wird die Entwicklung einer HSC maßgeblich bestimmt (2). Die Stammzellnische besteht aus mehreren verschiedenen Komponenten: den umgebenden anatomischen Strukturen wie z.B. der Substantia spongiosa des Knochens und unterschiedlichen zellulären und nicht-zellulären Anteilen (30). Bestandteile des zellulären Anteils sind die mesenchymalen Stammzellen (MSC), sowie Osteoblasten und Endothelzellen (30). Diese verschiedenen Komponenten bilden die zwei Untereinheiten der Stammzellnische: die endosteale Nische und die perivaskuläre Nische (81). In der endostealen Nische haften die HSC in engem Kontakt an den Osteoblasten an den Knochenbälkchen, wohingegen sie in der perivaskulären Nische nah an den Sinusoiden gefunden werden (81). Sowohl Mechanismen des direkten Zell-Zell-Kontakts, der Kontakt zur extrazellulären Matrix als auch lösliche Faktoren beeinflussen die unterschiedlichen Zellpopulationen (82).

Bisher ist das komplexe Signal-Netzwerk der Stammzellnische bestehend aus Zytokinsekretion, Präsentation von Oberflächenmolekülen, Adhäsion an unterstützende Stromazellen und Verankerung an extrazelluläre Matrix noch nicht abschließend beschrieben (48).

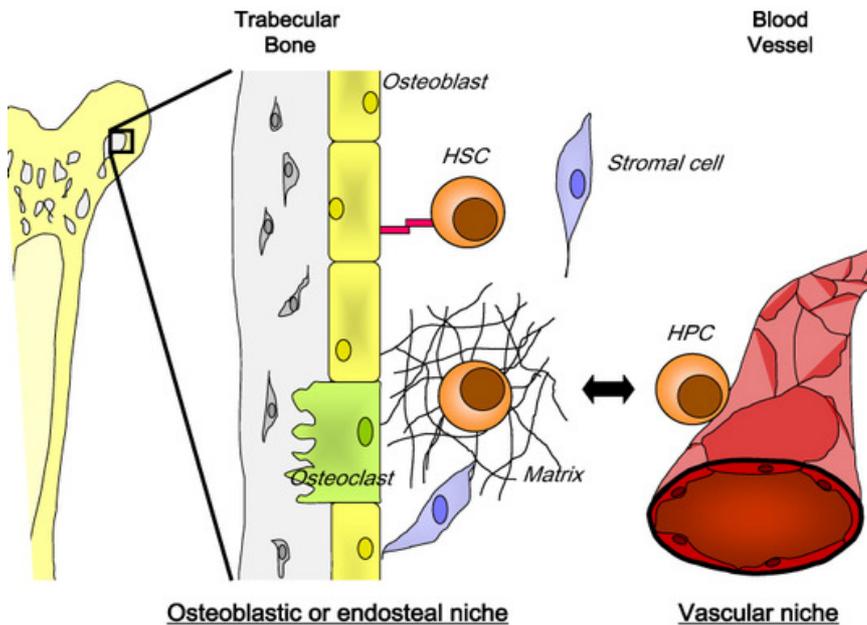


Abbildung 2: Die Hämatopoetische Stammzellnische (53)

1.2.3 Homing und Engraftment

Die Fähigkeit der HSC nach intravenöser Injektion ihren Weg in das Knochenmark zu finden nennt man Homing (siehe auch Kapitel 1.1). Das erfolgreiche Homing gilt als Voraussetzung für ein gutes und rasches Engraftment (18, 90, 113, 136). Für das Homing sind die von endothelialen Knochenmarkszellen exprimierten Selektine von entscheidender Bedeutung, da sie mit den als Integrinen bezeichneten Liganden auf frühen HSC interagieren (51, 77). Auch die transendotheliale Migration und die Chemotaxis spielen in dem Prozess des Engraftment eine entscheidende Rolle (60, 63, 100). Die frühen Phasen des Engraftment sind bereits intensiv erforscht und beschrieben worden (4, 64, 65, 134). Es konnte gezeigt werden, dass HSC das Endothel der Knochenmarkskapillaren erkennen können und transendothelial ins Mark migrieren (112, 113).

Spezifische Zytokine und Rezeptoren scheinen die HSC für das Erkennen des Knochenmarks zu befähigen. Diese Vermutung ergibt sich aus Ergebnissen, die zeigten, dass undifferenzierte (lineage-negative) HSC eine höhere Affinität zum Knochenmark haben als lineage-positive Zellen (5, 40, 88).

1.2.4 Mesenchymale Stammzellen

Adulte Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind undifferenzierte, pluripotente Zellen. Sie sind gekennzeichnet durch ihre fibroblastenartige Morphologie, adhärentes Wachstum und ihr Potenzial, in Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten zu differenzieren (siehe Abbildung 2). Sie haben die Fähigkeit der Selbsterneuerung. Teilen sich die MSC, entsteht zunächst eine Progenitorzelle und dann beginnt die Differenzierung in den jeweiligen Zelltyp. MSC können sich in verschiedene mesodermale Zellen wie zum Beispiel Osteoblasten, Adipozyten, Chondrozyten, Kardiomyozyten, Skelettmuskelzellen und Endothelzellen differenzieren (13, 94, 111). In der Zellkultur teilen sich die adulten Stammzellen nicht unendlich (47, 103). Dies erklärt sich sowohl durch die asymmetrische Mitose als auch durch die fehlende Möglichkeit, die Stammzellnische in der Zellkultur so exakt nachzustellen, dass eine Differenzierung ausbleibt und erscheint im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen als ein Nachteil (127).

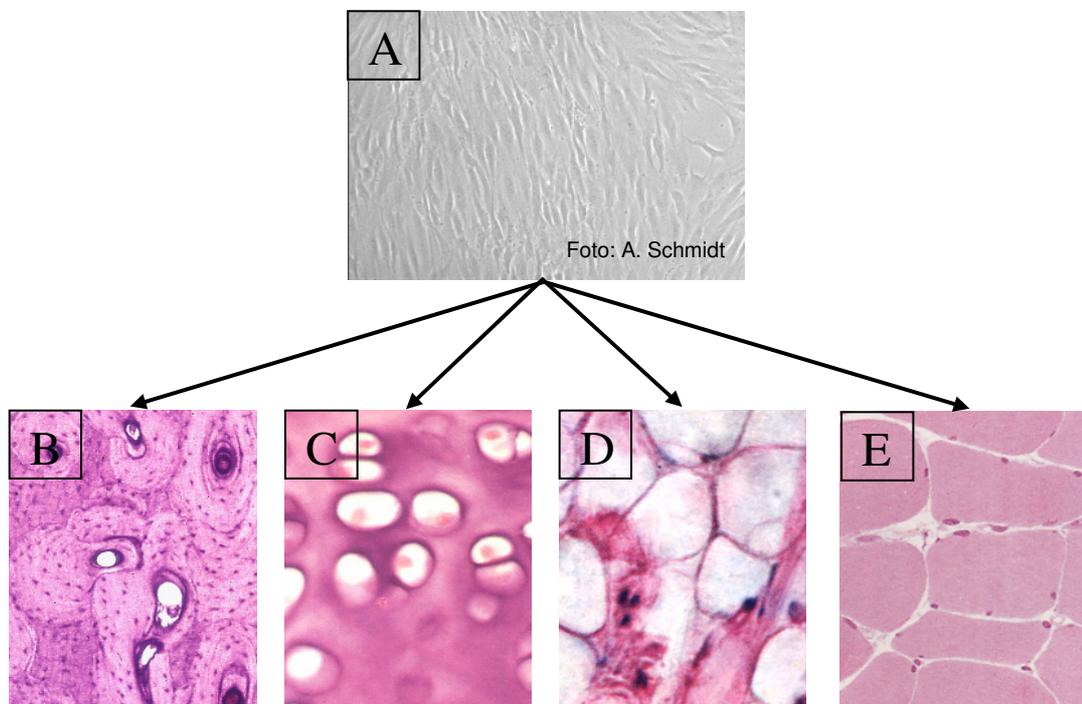


Abbildung 3: (A) MSC und ihre Differenzierung in (B) Knochen-, (C) Knorpel-, (D) Fett- und (E) Muskelzellen (61)

MSC haben mehrere Eigenschaften, welche sie in vielerlei Hinsicht zu dem bevorzugten Stammzellmodell gegenüber den embryonalen Stammzellen erscheinen lassen. Die bisher bekannten Vorzüge sind 1.) die Leichtigkeit der Isolation, 2.) das starke Expansionspotenzial, 3.) ihre genetische Stabilität, 4.) ihre reproduzierbaren Eigenschaften von Isolation zu Isolation, 5.) ihre reproduzierbaren Eigenschaften in unterschiedlichen Laboratorien, 6.) ihre Kompatibilität mit bekannten Zellkulturverfahren und 7.) ihr Potenzial, in geschädigten Kulturen eine Regeneration zu verstärken (37, 49, 72, 85, 106, 127).

Den MSC kommt zunehmend klinisches Interesse zu: Für die autologe Transplantation von MSC konnte bereits im Rahmen eines Mausmodells zur Behandlung von infarziertem Myokard gezeigt werden, dass eine immunsuppressive Behandlung zur Therapie einer GvHD nicht nötig ist (79). Eine Karzinominduktion konnte bisher für MSC im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen nicht beobachtet werden (135).

1.2.5 Migrationsverhalten der HSC

Die Migration der HSC ist ein in der Embryogenese beginnender und bis in den adulten Organismus fortwährender Prozess. An Tag 7 der embryonalen Entwicklung zeigen sich frühe Vorläuferzellen der Erythropoese und Lymphopoese im Dottersack und in der Region des Aorto-Gonaden-Mesonephrons (AGM) (99). An Tag 10.5 sind die Zellen des AGM in der fetalen Leber zu finden, um anschließend im Knochenmark ihre hämatopoetische Funktion weiterzuführen (23, 28, 78). Das Migrationsverhalten der HSC wird durch ein komplexes Zusammenspiel von Zytokinen, Chemokinen, proteolytischen Enzymen und Adhäsionsmolekülen bestimmt (87). So konnten Adhäsionsmoleküle (Cell Adhesion Molecules = CAMs) der HSC wie E-Selectin Ligand (ESL) 1, CD62L, Very Late Antigen-4 (VLA-4), N-Cadherin, CD44, c-Kit, α - und β -Integrine und der Chemokine Receptor-4 (CXCR4) identifiziert werden. Die zugehörigen Stromaliganden sind E-Selectin, P-Selectin Glucoproteine

Ligand-1, Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1), N-Cadherin, Kit-Ligand, Osteopontin und Stromal Derived Factor-1 (SDF-1) (87, 104, 140).

Die Aktivierung proteolytischer Enzyme wie der Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) resultiert in einem Abbau bindender Proteine und verhindert somit eine Migration der HSC von der Osteoblasten-Nische in die vaskuläre Nische (39). Zudem spaltet MMP-9 den HSC mobilisierenden, löslichen Faktor Kit-Ligand von seinem membranassoziierten Teil und baut Osteopontin ab, welches die HSC-Mobilisation positiv beeinflusst (59). Studien haben gezeigt, dass Osteoklasten durch einen Abbau endostealer Komponenten und eine Verminderung der HSC-Adhäsion an Osteoblasten die Migrationsaktivität steigern (56). Ebenso verstärken durch RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) aktivierte Osteoklasten die proteolytische Aktivität von MMP-9 und Cathepsin K und bauen so Komponenten der endostealen Nische, wie Osteopontin und den Membran-gebundenen SCF, ab (56).

Ein weiterer Mechanismus wird von SDF-1 gesteuert. SDF-1 ist ein Chemokin, welches von Stromazellen wie den Osteoblasten, den Endothelzellen und den Fibroblasten gebildet wird (129). In adultem Knochenmark bindet SDF-1 an den CXCR4+ der HSC und wirkt als ein Retentionssignal (122). Diesen Mechanismus macht man sich bei der Mobilisation von HSC vor einer Stammzelltransplantation zu Nutze: Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF), der dem Patienten zur Mobilisation injiziert wird, baut den SDF-1 ab (102). In Transplantationsmodellen kann kein Engraftment der HSC stattfinden, wenn SDF-1 oder der CXCR4+ im Versuchsmodell nicht vorhanden sind (101).

Es konnte sogar gezeigt werden, dass Endothel- und Stromazellen des Knochenmarks in der Lage sind, an CXCR4+gebundenen SDF-1 via Transzytose zu internalisieren. Anschließend erfolgt dann eine Resekretion von funktionell intaktem SDF-1 zurück ins Knochenmark (24). Bei bestimmten physiologischen und pathologischen Vorgängen konnte vermehrt SDF-1 im Knochenmark und auch in anderen Organen gemessen werden: so zum Beispiel bei einer Ischämie (16), einer Entzündung im Rahmen einer Infektion (57) oder auch bei einer Chemotherapie (107). Desweiteren konnte gezeigt

werden, dass ein erhöhter SDF-1 –Spiegel im Knochenmark das Homing CD34-positiver Stammzellen in NOD-SCID-Mäusen kurzfristig verstärken kann (58).

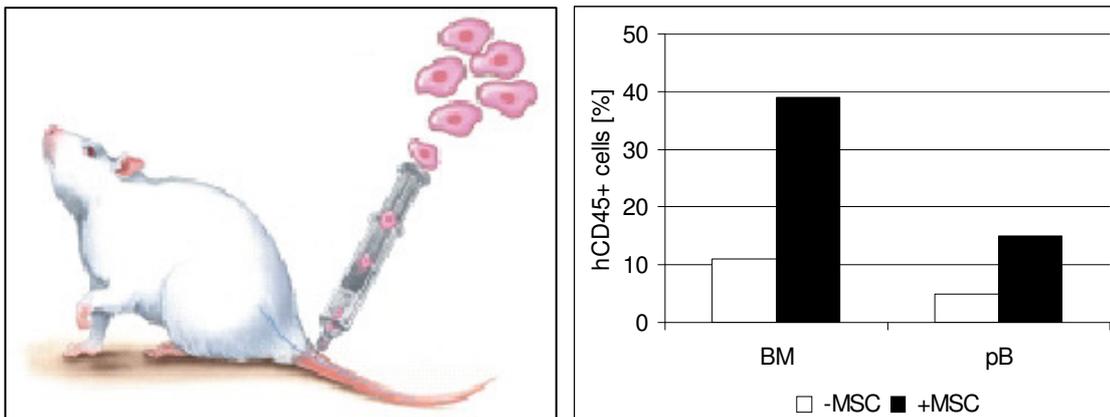
1.2.6 Migrationsverhalten der MSC

Um einen klinischen Einsatz von MSC im Rahmen einer Stammzelltransplantation zu entwickeln, ist die genauere Kenntnis des Migrationsverhaltens der MSC notwendig. Es wurden bereits Chemokine identifiziert, die die Migration der MSC beeinflussen. So konnte der stromal derived factor (SDF-1) als ein die Migration beeinflussender Faktor identifiziert werden (46). SDF-1 und auch der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) können mesenchymale Progenitorzellen in vivo mobilisieren (38, 83). Auch konnte gezeigt werden, dass Erythropoietin (EPO), Interleukin-6 (IL-6), stromal derived factor-1 β (SDF-1 β), VEGF und basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) die migratorische Aktivität der MSC steigern (118).

In den letzten Jahren sind die MSC als eine Therapieoption nach Myokardinfarkt in den Fokus gerückt (42, 45, 93, 95, 96). Da Myozyten nach einer ischämischen Schädigung im Rahmen eines Infarktes keine Regenerationsfähigkeit zeigen (137), wurden unter der Annahme, dass MSC zu einer Regeneration des geschädigten Gewebes führen könnten, verschiedene Applikationswege untersucht: so zum Beispiel die Applikationen der MSC über die systemische Gabe (86), die intrakoronare Applikation mittels Herzkatheter (6), eine intraventrikuläre Injektion (7) und die direkte intramyokardiale Injektion (69, 141). Voraussetzung einer erfolgreichen Transplantation ist vor allem bei der systemischen Applikation und der Applikation über die koronaren Arterien, dass die MSC durch das vaskuläre Endothel zum Zielort gelangen. Es ist also eine transendotheliale Migration erforderlich. Das Überwinden der endothelialen Barriere konnte 2006 für die MSC gezeigt werden (119, 128).

1.3 Fragestellung

Sowohl im Tierversuch als auch beim Menschen konnte beobachtet werden, dass eine Kotransplantation von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) und mesenchymalen Stammzellen (MSC) eine verbesserte Proliferation der HSC hervorruft. Noort et al. konnten 2002 zeigen, dass in NOD/SCID-Mäusen kotransplantierte MSC das Engraftment der HSC verbessern (91). 2004 konnte dies von Bensidhoum et al. bestätigt werden: die Arbeitsgruppe zeigte ebenfalls ein verbessertes Engraftment von HSC nach Kotransplantation mit Stro1⁻ MSC im NOD/SCID-Maus-Model (11).



a)

b)

Abbildung 4: a) Kotransplantation HSC und MSC (1) b) HSC-Ansprechen bei Kotransplantation, bearbeitet nach Noort et al. (91)

Ähnliches konnte für den Menschen gezeigt werden. Erstmals wurden an der Universitätsklinik Cleveland, Ohio von Oktober 1996 bis zum Juli 1998 28 Patientinnen mit einer fortgeschrittenen Brustkrebserkrankung einer Stammzelltransplantation und zusätzlicher MSC-Infusion unterzogen. Dies war die erste Untersuchung einer MSC-Infusion mit einer therapeutischen Absicht. Es konnte zwar noch kein signifikant verbessertes Engraftment nachvollzogen werden, aber es zeigte sich, dass die Methode durchführbar und sicher war (55). Im Jahre 2005 wurde dann erstmals in einer Multicenter Studie an 46

Patienten mit einer malignen hämatologischen Erkrankung eine Kotransplantation von MSC und HSC durchgeführt (68). Auch hier wurde die MSC-Infusion von den Patienten ohne erhebliche zusätzliche Nebenwirkungen vertragen und als sichere Methode eingestuft. Es konnten keine MSC-Infusions-assoziierten Adverse events detektiert werden. Zudem wurde ein vermindertes GvHD-Risiko für die kotransplantierten Patienten gezeigt. Eine spezifische Erklärung möglicher Mechanismen steht zur Zeit noch aus.

Ziel der zugrunde liegenden Arbeit war die Aufklärung parakriner und zellulärer Interaktion zwischen hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen als mögliche Grundlage für eine modifizierte Stammzelltransplantation, da die oben bereits erwähnten möglichen engen Zusammenhänge zwischen Stromazellen und HSC für die MSC bisher nicht beschrieben worden sind. Drei Fragestellungen standen hierbei im Vordergrund: 1.) Kann eine gegenseitige Beeinflussung dieser unterschiedlichen Zellpopulationen in vitro gezeigt werden? 2.) Wie äußert sich diese Beeinflussung? 3.) Ist eine Einflussnahme von außen möglich?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Lösungen

StemPro-34 SFM Complete Medium (Fa. Gibco, Invitrogen Corp.):

Penicillin G 100 U/ml

Streptomycin 100 µg/ml

Nutrient-Supplement

L-Glutamin 200 mmol

CD34 Progenitor Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec):

FcR Blocking Reagent

Hapten-Antibody

Anti-Hapten Microbeads

FACS-Antikörper von Beckman Coulter und Ancell:

CD10-FITC, CD34-PE, CD45-ECD, CD34-PC5, CD33-PC5, CD106-FITC,
CD105-PE, CD14-PC5

MACS-Puffer:

500 ml PBS

2 ml EDTA (Ethylendinitroilotetraessigsäure/ $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$) 0,5 molar

2,5 ml Fetal Calves Serum (FCS)

Alpha Modification Eagles Medium (α -MEM):

385 ml α -MEM (Biochrom)

100 ml FCS (20% von Biowest)

200 µM L-Glutamin (Gibco)

10 ml Pen./Strep. (2%)

Paraformaldehyd (PFA):

4 g Paraformaldehyd

40 ml aqua dest.

PBS (CaCl₂, MgCl₂) von Gibco

Vectashield, Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories

2.1.2 Patientenmaterial

Leukapherisat G-CSF-mobilisierter Patienten

2.1.3 Materialien

MSC-Kultur:

Falcon tissue culture disk, 100 x 20 mm style, tissue culture treated by vacuum gas plasma, polystyrene von Becton Dickinson

Multiwell, 24 well, flat bottom, low evaporation lid von Becton Dickinson

Fluoro blok inserts, 3 µm und 8 µm

HSC-Kultur:

Multiwell 96 von BD Falcon™

2.1.4 Geräte

Zählkammern: Neubauer-Zählkammer von Optik Labor und Bürker-Zählkammer von Superior

auto-MACS: (Magnetic Associated Cell Sorting) von Miltenyi Biotec
Pre-Separation Filters, Porengröße: 30 µm von Miltenyi Biotec

Mikroskop: Zeiss Axiophot

Zellinkubator: Hera Cell von Heraeus

Durchflusszytometer: FACS-Array von Beckman Coulter

Zentrifuge: Megafuge 1.0 R von Heraeus

2.2 Methoden

2.2.1 Dichtegradientenzentrifugation

Die CD34⁺-HSC wurden aus Leukapherisaten stammzellmobilisierter Patienten gewonnen. Dieses Blut wurde vom Knochenmarkstransplantationslabor der Uniklinik Köln zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um Reste bereits transfundierter Blutmengen, die im Transfusionsbeutel in einer Menge von ca. 1 ml verblieben waren. Diese beinahe leeren Blutbeutel wurden nun zunächst mit MACS-Puffer ausgespült und jeweils 25 ml dieser Zellsuspension auf sechs Falcons (50 ml) verteilt. Jedes dieser Falcons wurde mit MACS-Puffer aufgefüllt und anschließend für 10 min mit 400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 35 ml MACS-Puffer resuspendiert.

Die Trennung der mononukleären Zellen von den übrigen Blutbestandteilen erfolgte über eine Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation. Hierzu wurde Lymphoprep® (1,077 density) genutzt. In jedes Falcon wurden 15 ml der Lösung gegeben und mit 35 ml Zellsuspension aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben 15 min lang bei 300 rpm zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und die Zellschicht in ein neues Falcon überführt. Die Zellsuspension durchlief weitere drei Waschschriffe mit MACS-Puffer. Die gewonnene Zellzahl mononukleärer Zellen wurde ermittelt, indem 10 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau versetzt wurden. Aus diesem Gemisch wurden 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden vier Eckquadrate mit einem Volumen von jeweils 0,1 µl ausgezählt. Die Zellzahl pro ml ergab sich dann aus: $\text{Zellzahl/ml} = \text{gezählte Zellen} \times 10^4 \times 2$ dividiert durch die Anzahl der Großquadrate, also vier. Gezählt wurden nur lebende Zellen; tote Zellen erscheinen blau, da durch die erhöhte Durchlässigkeit der Membran das Trypanblau ins Zytoplasma eindringen konnte. Die isolierten Zellen wurden nun für die FACS-Analyse (s.u.) und die folgende MACS-Sortierung aliquotiert.

2.2.2 MACS-Sortierung der HSC

Mit Hilfe des auto-MACS von Miltenyi Biotec konnten nun die CD34+HSC von den mononukleären Zellen getrennt werden. Hierbei wurden zur Separation die CD34+-Zellen indirekt magnetisch markiert. Ein Hapten Antikörper (QBEND/10. Isotype: mouse IgG1) und ein anti-Hapten Antikörper, welcher an MACS MicroBeads gekoppelt war (magnetische Markierung), bindeten hierfür an die CD34-Rezeptoren. Mittels bestimmter Trennsäulen (Separation columns) konnten die so markierten Zellen magnetisch separiert werden.

Die, wie oben beschrieben, aus dem Leukapherisat getrennten mononukleären Zellen wurden zunächst mittels eines Pre-Separation Filters von größeren Verklumpungen getrennt. Dann begann die magnetische Markierung. Zuerst wurden die Zellen mit einem FcR Blocking Reagent versehen. Es wurden 100 µl FcR Blocking Reagent pro 10^8 Zellen verwendet. Anschließend wurden die Zellen für 15 min mit dem Hapten Antikörper bei 6-12°C inkubiert. Nach einer Waschung mit MACS-Puffer folgte die Inkubation mit den anti-Hapten MicroBeads. Diese erfolgte mit 100 µl anti-Hapten MicroBeads pro 10^8 Zellen ebenfalls für 15 Minuten bei 6-12°C. Nach einer weiteren Waschung wurden die Zellen mit 500 µl MACS-Puffer versehen, um der folgenden Separation zugeführt zu werden.

Das auto-MACS separierte nun die Zellen mittels magnetischer Sortierung. Verwendet wurde das Programm „posseld2“ zur Positivselektion der HSC. Nach erfolgter Separation wurde eine Qualitätskontrolle mittels FACS-Analyse durchgeführt.

2.2.3 Durchflusszytometrie der HSC

Diese Methode diente der Qualitätskontrolle der Zellen nach der Dichtegradientenzentrifugation und anschließenden MACS-Sortierung. Hierbei machte man sich bestimmte Antikörper zu Nutze. Antikörper bestehen aus zwei leichten und zwei schweren Polypeptidketten, die eine Y-förmige Struktur bilden. Die aminoterminalen Enden sowohl der leichten als auch der schweren

Ketten variieren bei verschiedenen Antikörpern erheblich. Man nennt sie deshalb variable Regionen. An den Spitzen der beiden Arme des Y bilden die hypervariablen Schleifen der leichten und der schweren Ketten zwei identische Stellen, die in der Lage sind, Antigene zu erkennen und zu binden. Antigene liegen auf den Oberflächen von Zellen und besitzen spezifische Strukturen, die von einem Antikörper erkannt werden. Man nennt diese Strukturen antigenbindende Determinante oder Epitope. Es entsteht eine nicht-kovalente, d.h. reversible Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper. Bei der Oberflächenmarkierung können Antikörper, die mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind, im Durchflusszytometer das Vorhandensein der zugehörigen Antigene in Zellen oder Geweben anzeigen. Die Zellen wurden dazu in einem Volumen von 100 μ l PBS aufgenommen. In einem FACS-Röhrchen wurden die 100 μ l vorgelegt und dazu 20 μ l des gewünschten Antikörpers pipettiert. Es wurde eine Vier-Farben-Analyse genutzt. Hierbei wurden die Zellen mit CD10-FITC, CD33-PC5, CD34-PE und CD45-ECD gefärbt und in der Durchflusszytometrie auf die entsprechenden Oberflächenmarker untersucht. Im Durchflusszytometer können verschiedene Parameter einer Zelle gemessen werden. Anhand des Vorwärtsstreulichtes (FSC), welches entlang der Achse des einfallenden Lichtes gemessen wird und proportional zur Zelloberfläche ist, kann die Größe der Zelle gemessen werden. Anhand des Seitwärtsstreulichtes (SSC), welches in einem 90°-Winkel zum einfallenden Licht gemessen wird, kann die relative Granularität oder interne Zellkomplexität gemessen werden. Ein Zytometer besteht aus drei kombinierten Komponenten: dem Flüssigkeitssystem, dem optischen System, sowie dem elektronischen System. Die relative Fluoreszenzintensität einer mit einem Fluorochrom beladenen Zelle, kann aufgrund unterschiedlicher Emissionsspektren in verschiedenen Kanälen im Durchflusszytometer gemessen werden. Das emittierte Fluoreszenzlicht ist dabei proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle. Die generierten Daten werden an den angeschlossenen Computer zur Darstellung und Analyse übermittelt.

2.2.4 HSC-Kultivierung

Isolierte CD34+HSC wurden mit einer Zelldichte von 100.000/100 μ l (entspricht 100.000 Zellen/well) in 96-well Platten (BD Falcon™ Multiwell) kultiviert. Zur Kultivierung wurde serumfreies Medium verwendet. Das StemPro-34 SFM Complete Medium wurde lediglich mit StemPro-34 Nutrient Supplement, L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin versehen. Auf den Zusatz von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wurde im Hinblick auf die geplanten Experimente bewusst verzichtet. Mit Hilfe eines Inkubators wurde die für das Überleben der Zellen notwendige Atmosphäre von 37°C mit 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Begasung aufrechterhalten.

2.2.5 Isolation und Kultivierung der MSC

Menschliches Knochenmark wurde innerhalb chirurgischer Eingriffe aus Sternal-, Knie- und Oberschenkelknochen-Punktionen gewonnen. Die Spender des Materials waren nicht an Knochenmarkserkrankungen erkrankt. Alle Patienten gaben ihre schriftliche Einverständniserklärung und das Ethik-Komitee der Universität zu Köln genehmigte das Vorgehen.

Das Knochenmark wurde nach Punktion umgehend mittels einer 70 μ m-Membran (BD bioscience, USA) gefiltert. Anschließend wurden die Zellen mittels Ficoll-Paque und Dichtegradientenzentrifugation (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) aufgetrennt. Die MSC wurden auf Kulturplatten (Falcon, USA) ausplattiert und adhärent. Die Kulturplatten wurden mit einer Dichte von 2000 Zellen/cm² beimpft und anschließend in folgendem Medium kultiviert: alpha-Modified Eagle Medium (α -MEM), 20% fötales Kälber Serum (FCS), 200 μ M L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach zwei Tagen. Die Zellen wurden bei 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Begasung kultiviert. Es wurden Zellen der ersten bis dritten Passage genutzt. Der Mediumwechsel erfolgte zweimal wöchentlich.

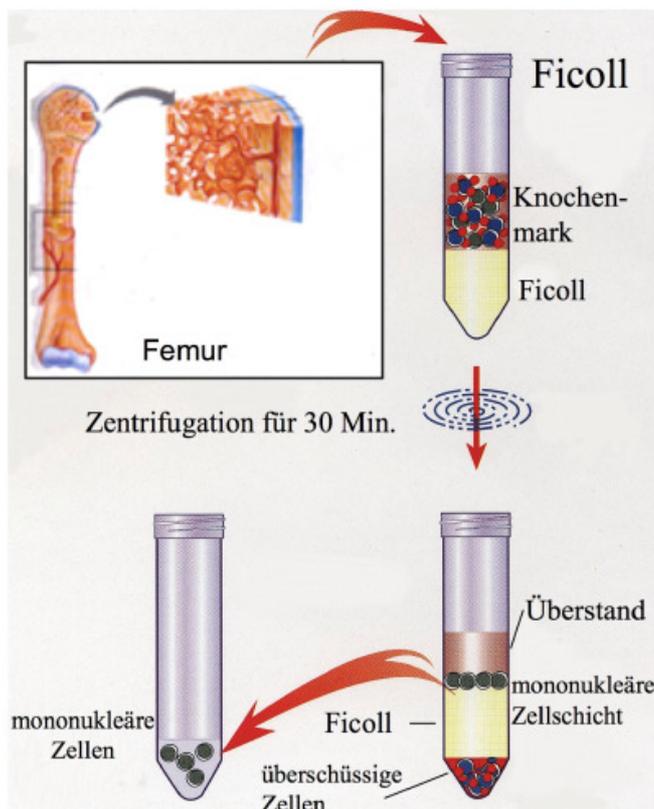


Abbildung 5: Gewinnung von MSC aus Knochenmark mittels Ficoll

2.2.6 Qualitätskontrolle der MSC

Die Qualität der MSC wurde mittels Durchflusszytometrie kontrolliert. Hierzu wurden die Zellen mit dem entsprechenden Antikörper für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, zweimal gewaschen und mit dem Durchflusszytometer Beckmann Coulter Epics XL with Expo 32 software (Beckmann Coulter) analysiert.

Die Zellen wurden mit CD106-FITC, CD105-PE (Ancell), CD45-ECD, CD14-PC5 und CD34-PC5 (Beckmann Coulter) gefärbt. Es konnten bis zu 40.000 Zellen aus der Zellkultur und bis zu 1.000.000 Zellen direkt aus dem Knochenmark pro Test analysiert werden. Alle hämatopoetischen Stammzellen konnten mittels der Antikörper für CD14 (auf Monozyten und Makrophagen exprimiert), CD34 (auf hämatopoetischen Progenitor-Zellen exprimiert) oder CD45 (Leucocyte-common Antigen) unterschieden werden. Am häufigsten

werden Antikörper gegen SH2 und SH3 zur Detektion von MSC herangezogen (105). Die Antikörper erkennen CD105 (Endoglin), beziehungsweise CD73 (ecto-5'-nucleotidase) (8, 9). Beide Antigene sind sowohl auf MSC als auch auf endothelialen Stammzellen exprimiert (3, 35). Aus diesem Grund wurde die Kombination von CD105 und CD106 (VCAM1) als Marker genutzt. CD106 ist auf MSC exprimiert (105), wohingegen normale endotheliale Zellen CD106-negativ sind und erst durch inflammatorische Zytokine exprimiert werden (97). Bei den von uns verwendeten Zellen handelt es sich also um CD14-/CD34-/CD45-/CD105+/CD106+ Zellen. Um das Proliferationspotenzial der kultivierten MSC zu überprüfen, erfolgte der CFU-F-Assay (124). Das Differenzierungspotenzial der MSC wurde nach der Methode von Pittenger kontrolliert, indem die MSC unter den Kulturbedingungen kultiviert wurden, die eine adipogene, chondrogene oder osteogene Differenzierung fördern (105).

2.2.7 Kultivierungsversuche der HSC mit MSC-Überstand

Die HSC wurden mit einer Anfangskonzentration von 100.000 HSC/100 µl in einer 96-well-Platte kultiviert. Die Zellen wurden jeweils im Doppelansatz einerseits in MSC-Überstand und andererseits als Kontrolle in α -MEM kultiviert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mithilfe der Neubauer-Zählkammer an Tag 3, 6, 9, 12. Dieser Versuch wurde in vier repetitiven Ansätzen durchgeführt.

2.2.8 Kultivierungsversuche der HSC mit MSC

Die HSC wurden mit einer Anfangskonzentration von 100.000 HSC/100 µl in einer 96-well-Platte kultiviert. Die Zellen wurden jeweils im Doppelansatz einerseits mit MSC (10.000 MSC/100 µl) und andererseits als Kontrolle in α -MEM kultiviert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mithilfe der Neubauer-Zählkammer an Tag 3, 6, 9, 12. Dieser Versuch wurde in vier repetitiven Ansätzen durchgeführt.

2.2.9 Migrationsversuch

Mit Hilfe dieses Versuchs wurde das Migrationsverhalten von HSC und MSC unter gegenseitiger Beeinflussung getestet. Der Versuchsaufbau entsprach dem Prinzip der Boyden-Chamber. Die Boyden-Chamber wurde im Jahre 1988 von Zigmond zur Untersuchung der Migration von Lymphozyten erstmals beschrieben (144).

Für die Migrationsversuche wurden Migrationsfilter, sog. HTS Fluoro Blok™ Inserts (Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg), verwendet (siehe Abbildung 6). Die aus Polyethylen bestehenden Filter waren in den Versuchsansätzen, in denen HSC getestet wurden, mit 3.0 µm großen Poren und in den Versuchsansätzen, in denen MSC getestet wurden, mit 8 µm großen Poren versehen. Der Filter blockierte > 99% der Lichttransmission in einem Wellenlängenbereich von 490 bis 700 nm. Durch diese Blockierung des Lichts war es nicht möglich, durch die Filter hindurchzusehen. Bei der Betrachtung der Filteroberseite sah man daher nur Zellen, die sich tatsächlich auf der Oberseite der Filter befanden. Das erleichterte die Auswertung des Versuchs und verringerte die Fehlerquote. Wie in der Abbildung 6 dargestellt, wurden Zellen auf die Oberseite des Filters gegeben. Während der Inkubation migrierten die Zellen, wobei sie durch die Poren des Filters wanderten und sich auf der Unterseite des Filters ansiedelten. Durch Einsetzen definierter Zellzahlen und Auszählen der auf der Unterseite befindlichen Zellen konnte das Migrationsverhalten von Zellen unter verschiedenen Versuchsbedingungen miteinander verglichen werden.

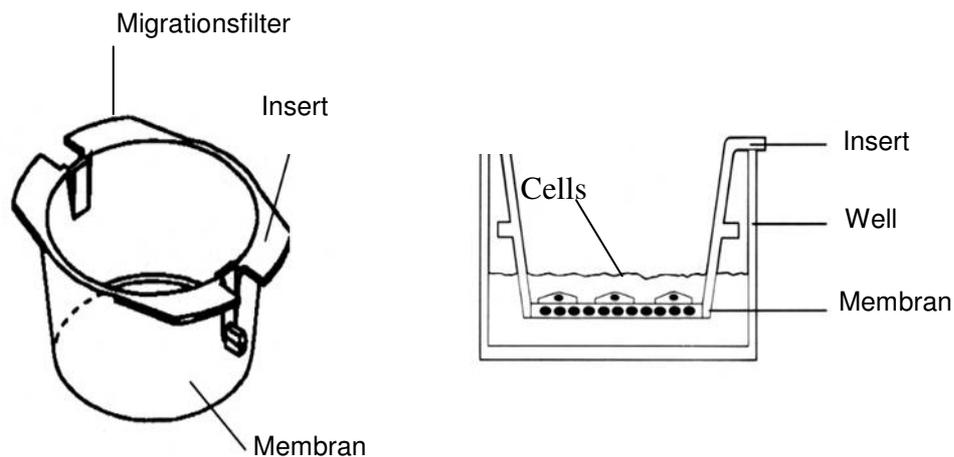


Abbildung 6: (A) Insert, (B) Boyden-Chamber

Die Migrationsfilter wurden in eine 24-Multiwellplatte gehängt. Anschließend füllte man die Migrationskammern unterhalb wie oberhalb des Filters mit 1 ml des entsprechenden Mediums auf. In einer Vorversuchsreihe wurde die optimale Anzahl an Zellen ausgetestet, die zu Versuchsbeginn auf den Filter zu setzen waren. Von den HSC wurden 100.000 Zellen pro Filter und von den MSC 10.000 Zellen pro Filter benötigt.

Es wurden sechs Migrationsversuche durchgeführt. Zwei Versuchsansätze testeten das Migrationsverhalten von HSC, die anderen vier das von MSC. Im ersten Versuchsansatz wurde das Migrationsverhalten von HSC in von MSC konditioniertem α -MEM getestet. Hierfür wurde die Boyden-Chamber mit 1 ml MSC-Überstand befüllt. Als Kontrolle fungierte das α -MEM. Der Versuch wurde viermal im Doppelansatz durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob MSC ohne jeglichen Reiz in Kultur lösliche Faktoren produzieren, die HSC zur Migration bewegen könnten, oder nicht. Die Kontrolle schloss aus, dass in dem α -MEM selbst solche Faktoren enthalten waren.

Der zweite Versuch testete das Migrationsverhalten von HSC in Anwesenheit von MSC. Hierzu wurden 10.000 MSC pro Kammer 24 Stunden zuvor ausplattiert und die Kammer mit α -MEM aufgefüllt. Am nächsten Tag wurde dann der Filter mit den HSC eingehängt und der Versuch konnte durchgeführt werden. Als Kontrolle diente wieder das α -MEM. Der Versuch wurde viermal im Doppelansatz durchgeführt.

Im dritten Versuchsansatz wurde das Migrationsverhalten von MSC in Anwesenheit von HSC getestet. Dazu wurden jeweils 1.000.000 HSC in eine Kammer gegeben. Anschließend wurde der Filter mit den MSC eingehängt. Als Kontrolle diente auch hier das α -MEM. Der vierte Versuchsansatz testete MSC in Anwesenheit von MSC. Es wurden wiederum 24 Stunden zuvor 10.000 MSC pro Kammer ausplattiert und mit α -MEM bedeckt. Als Kontrolle fungierte wieder das α -MEM. Der Versuchsaufbau wurde viermal im Doppelansatz durchgeführt. Der fünfte und sechste Versuchsansatz testete nun die Beeinflussbarkeit des Migrationsverhaltens von MSC durch den bFGF-Inhibitor. Der fünfte Versuchsansatz bestand aus drei Anteilen: 1.) MSC oberhalb des Filters und MSC mit bFGF-Inhibitor unterhalb des Filters, 2.) MSC oberhalb des Filters und α -MEM mit bFGF-Inhibitor unterhalb des Filters und 3.) MSC oberhalb des Filters und α -MEM unterhalb des Filters als Kontrolle.

Es wurden wiederum 24 Stunden zuvor 10.000 MSC pro Kammer ausplattiert und mit α -MEM bedeckt. Als Kontrolle fungierte wieder das α -MEM. Dieser Versuchsaufbau wurde zweimal im Doppelansatz durchgeführt.

Auch der sechste Versuchsansatz bestand aus drei Teilen: 1.) MSC oberhalb des Filters und HSC unterhalb des Filters, 2.) MSC oberhalb des Filters und HSC mit bFGF-Inhibitor unterhalb des Filters und 3.) MSC oberhalb des Filters und α -MEM unterhalb des Filters als Kontrolle. Auch hier wurde wieder die Anzahl von 1.000.000 HSC gewählt und der Versuch wurde zweimal im Doppelansatz durchgeführt.

Versuch	Versuchsaufbau		Kontrolle
	oberhalb der Membran	unterhalb der Membran	
1	HSC	MSC konditioniertes α -MEM	α -MEM
2	HSC	MSC	α -MEM
3	MSC	HSC	α -MEM
4	MSC	MSC	α -MEM
5 a	MSC	MSC + bFGF-Inhibitor	α -MEM
5 b	MSC	α -MEM + bFGF-Inhibitor	α -MEM
6 a	MSC	HSC	α -MEM
6 b	MSC	HSC + bFGF-Inhibitor	α -MEM

Tabelle 1: Zusammenfassung Migrationsversuche

Da die MSC in Kultur in engem Zell-Zell-Kontakt am Boden der Kulturplatten haften, mussten sie, um für die Versuche genutzt werden zu können, zunächst mit dem Enzym Accutase (PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich) gelöst werden. Die Zellen wurden dissoziiert und resuspendiert, um eine homogene Zellsuspension zu erhalten. Nach dem Pelletieren der Zellen wurden sie in 1 ml α -MEM resuspendiert und in einer Zählkammer (Bürker) ausgezählt. Jeder der sechs Versuchsansätze durchlief eine Inkubationszeit von acht Stunden bei 37°C und 5% CO₂. Anschließend wurden die Migrationsfilter mit 0.1 M PBS gewaschen und die Zellen mit 4% PFA fixiert (30 min.). Um die migrierten Zellen sichtbar und somit zählbar machen zu können, wurden die Zellen mit 4',6-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI, Vectashield, Vector Laboratories) eingedeckt. DAPI bindet an DNA und RNA. Es absorbierte blau-violettes Licht mit einer Wellenlänge von 360 nm und emittierte blaues Licht mit einer Wellenlänge von 460 nm. Zur Auswertung der Versuche bestimmte man die Zellzahl auf den Unterseiten der Filter mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops. Diese Zellzahlen wurden dann mit den Zellzahlen der jeweiligen Kontrollen verglichen. Zu Beginn der Versuche war eine definierte Anzahl an Zellen eingesetzt worden. Da die Zellzahl auf der Oberseite der Migrationsfilter bekannt war und eine genauere Angabe zu dem Zeitpunkt keine entscheidende Aussage geliefert hätte, wurden nur die Zellen auf der Unterseite der Filter ausgezählt.

3 Ergebnisse

3.1 Kultivierung

3.1.1 HSC in serumfreiem Medium

Während des 12 tägigen Beobachtungszeitraums kam es zu einem kontinuierlichen Zellzahlabfall bis auf < 10.000 Zellen. Nach vier Tagen waren bereits mehr als die Hälfte der Zellen abgestorben. Nach 12 Tagen konnten keine lebenden Zellen mehr beobachtet werden (siehe Abbildung 7).

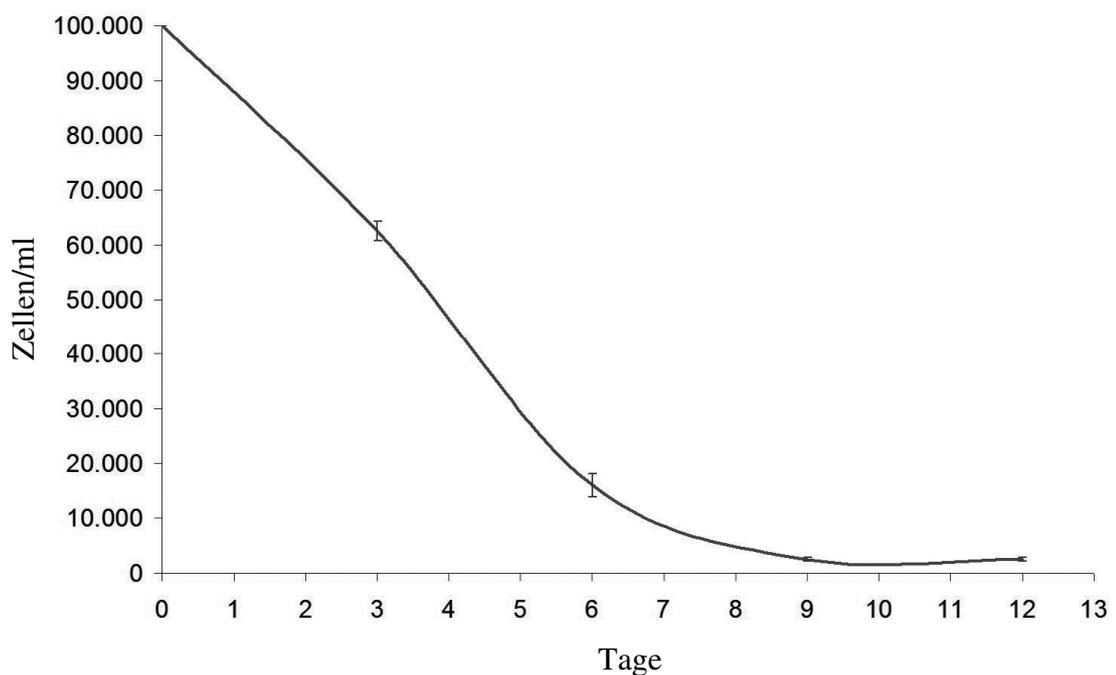


Abbildung 7: HSC in serumfreiem Medium ohne Zytokine

3.1.2 HSC mit MSC-Überstand

Die Zellzahl der in MSC-Überstand kultivierten HSC war konstant höher als die Zellzahl der in α -MEM kultivierten HSC. Dennoch fiel im Laufe der Kultivierung die Zellzahl der HSC in beiden Ansätzen, Versuch und Kontrolle, stetig ab, ohne dass es im Verlauf zu einer Erholung der Zellzahl kam (ohne Abbildung).

3.1.3 HSC mit MSC

Die Zellzahl der mit MSC kultivierten HSC war konstant höher als die Zellzahl der in α -MEM kultivierten HSC. Im Laufe der Kultivierung fiel die Zellzahl an HSC ab, wobei sie in der Kokultivierung mit MSC ihr Minimum um Tag 9 mit einer Zellzahl von < 35.000 Zellen erreichte und bis zum Ende der Kultivierung an Tag 12 wieder auf bis zu > 50.000 Zellen anstieg (siehe Abbildung 8 oberer Graph). Im Gegensatz hierzu kam es in der Kontrolle zu einem kontinuierlichen Zelltod (siehe Abbildung 8, unterer Graph).

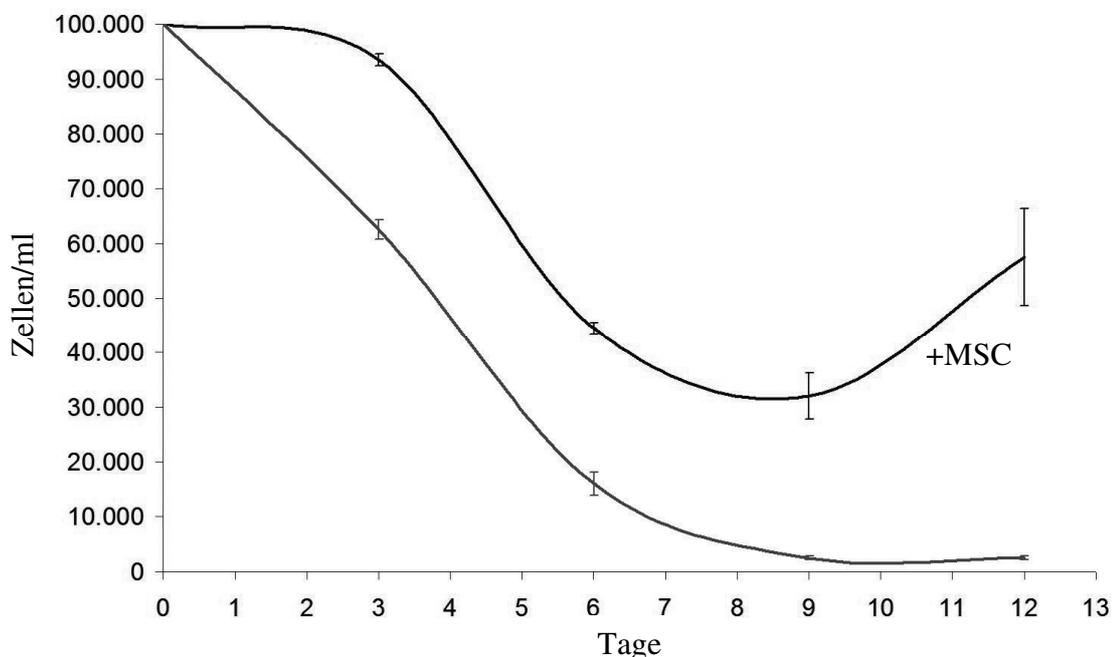


Abbildung 8: HSC in der Kokultur mit MSC

3.2 Differenzierung

3.2.1 HSC in serumfreiem Medium

Es wurden an Tag 0, an Tag 3 und an Tag 6 FACS-Kontrollen zur Messung des Differenzierungsstadiums durchgeführt. Die FACS-Analyse an Tag 0 bestätigte eine homogene HSC Population, sichtbar an der geringen Granulation, dargestellt im Side-Scatter (siehe Abbildung 9 Tag 0, Side Scatter = SS Lin, y-Achse). Zudem konnte gezeigt werden, dass bei den in serumfreiem Medium kultivierten HSC an Tag 3 und 6 die Granulopoese begann (siehe Abbildung 9 Tag 3 und Tag 6).

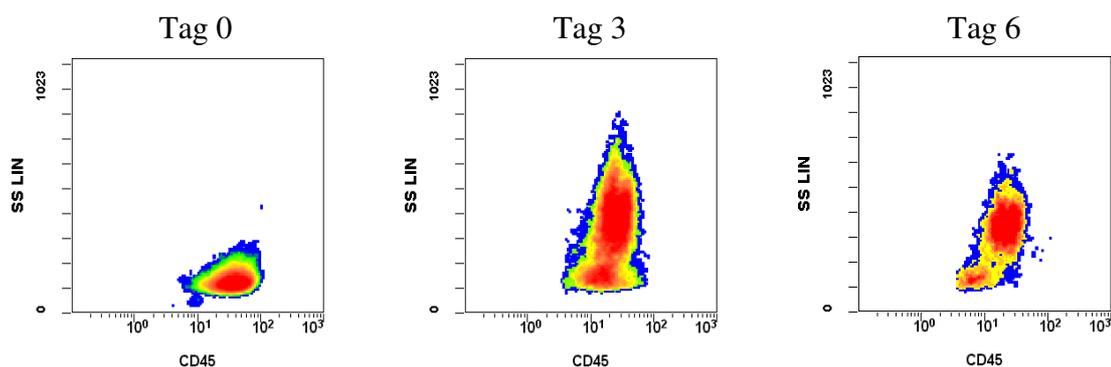


Abbildung 9: HSC-Differenzierung an Tag 0, 3, 6

3.2.2 HSC in Kokultur mit MSC

In diesem Versuchsansatz wurde an Tag 0, Tag 3 und Tag 6 mittels FACS-Analyse der Reifungsgrad der HSC bestimmt. Am Tag 0 zeigte sich erneut eine homogene HSC Population (siehe Abbildung 10 Tag 0, vergleiche auch Abbildung 9 Tag 0). Im Gegensatz zu der Kultivierung in serumfreiem Medium, bei dem es an den Tagen 3 und 6 zur Granulopoese, erkennbar an einer

Zunahme der Granularität kam (siehe Abbildung 9 Tag 3 und Tag 6), war diese Differenzierung in der Kokultur mit MSC weniger ausgeprägt (siehe Abbildung 10 Tag 3 und Tag 6).

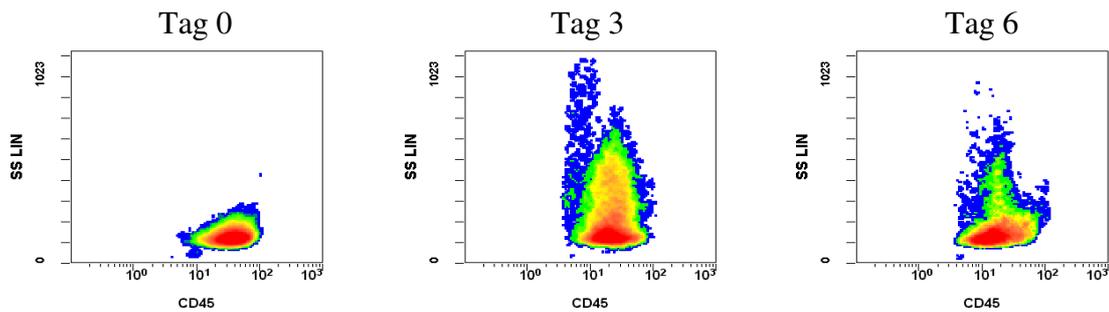
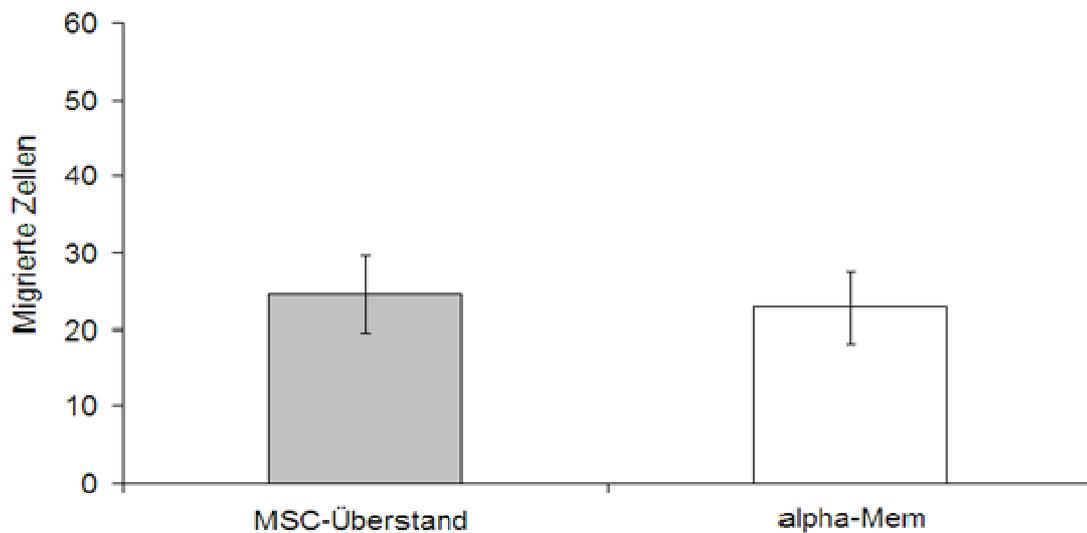


Abbildung 10: HSC-Differenzierung in Kokultur mit MSC

3.3 HSC-Migration

3.3.1 Migration von HSC/MSC-Überstand

In dem ersten Migrationsversuch (vergleiche auch Tabelle 1, Seite 27) wurde beobachtet, dass HSC eine geringe Migrationsrate haben. Sowohl in der Kontrolle, als auch im Versuch mit MSC-Überstand migrierten durchschnittlich < 25 Zellen durch die Membran. MSC-Überstand hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Migrationsverhalten der HSC ($24,62 \pm 4,95$ vs. $22,87 \pm 4,70$, $p = 0,32$, siehe Abbildung 11).

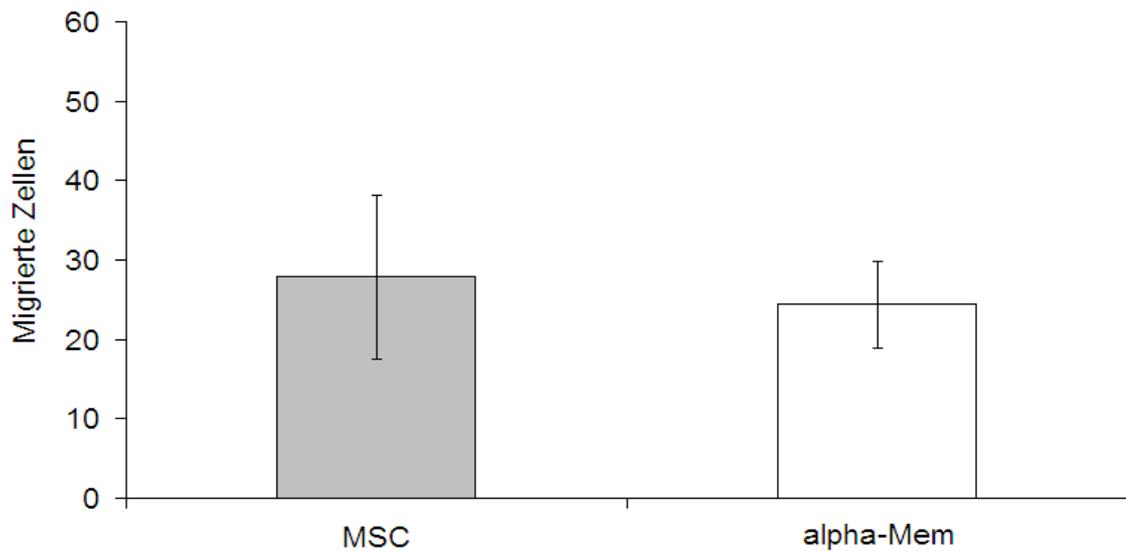


	Versuch	Kontrolle
\bar{x}	24,62	22,87
Sta.:	4,95	4,70
p:	0,32	-

Abbildung 11: HSC-Migration in α -MEM

3.3.2 Migration von HSC/MSC

Wie in Abbildung 12 dargestellt ist, hatte auch die Anwesenheit von MSC keinen signifikanten Einfluss auf das Migrationsverhalten der HSC ($p = 0,175$). In der Kontrolle migrierten durchschnittlich $24,38 \pm 5,45$ Zellen. Bei Anwesenheit von MSC konnten durchschnittlich $27,88 \pm 10,36$ Zellen am Filter detektiert werden.



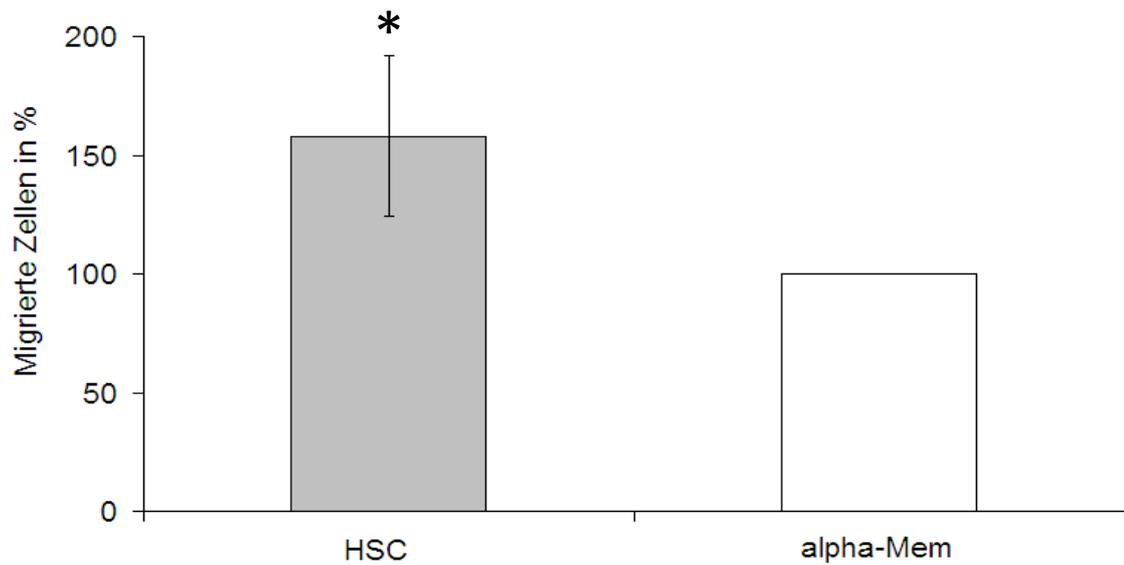
	Versuch	Kontrolle
Ø	27,88	24,38
Sta.:	10,36	5,45
p:	0,175	-

Abbildung 12: HSC-Migration in MSC-Anwesenheit

3.4 MSC-Migration

3.4.1 Migration von MSC/HSC

HSC erhöhten die Migrationsrate der MSC im Vergleich zur Kontrolle signifikant ($p = 0,042$, siehe Abbildung 13). Es zeigten sich durchschnittlich $158 \pm 34,01$ MSC bei Anwesenheit von HSC. Im Vergleich hierzu konnten in der Kontrolle mit α -MEM nur 100 ± 0 Zellen am Filter detektiert werden.

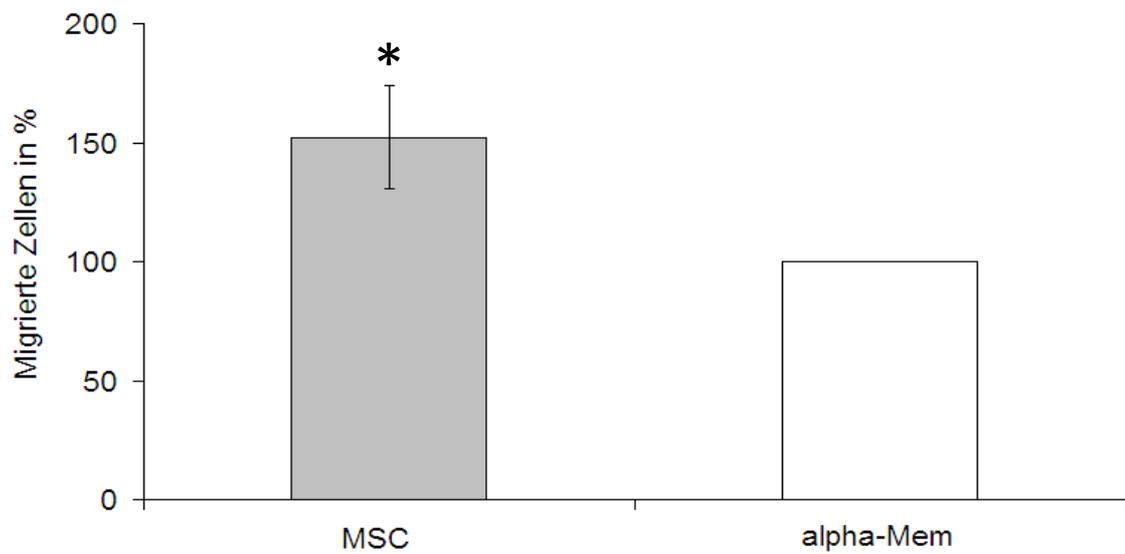


	Versuch	Kontrolle
Ø	158,00	100,00
Sta.:	34,01	0,00
p:	0,042	-

Abbildung 13. MSC-Migration in HSC-Anwesenheit

3.4.2 Migration von MSC/MSC

Zusätzlich zeigten MSC in Anwesenheit weiterer MSC unterhalb des Filters eine höhere Migrationrate als in der Kontrolle. ($152,25 \pm 21,46$ vs. 100 ± 0 , $p = 0,024$, siehe Abbildung 14).

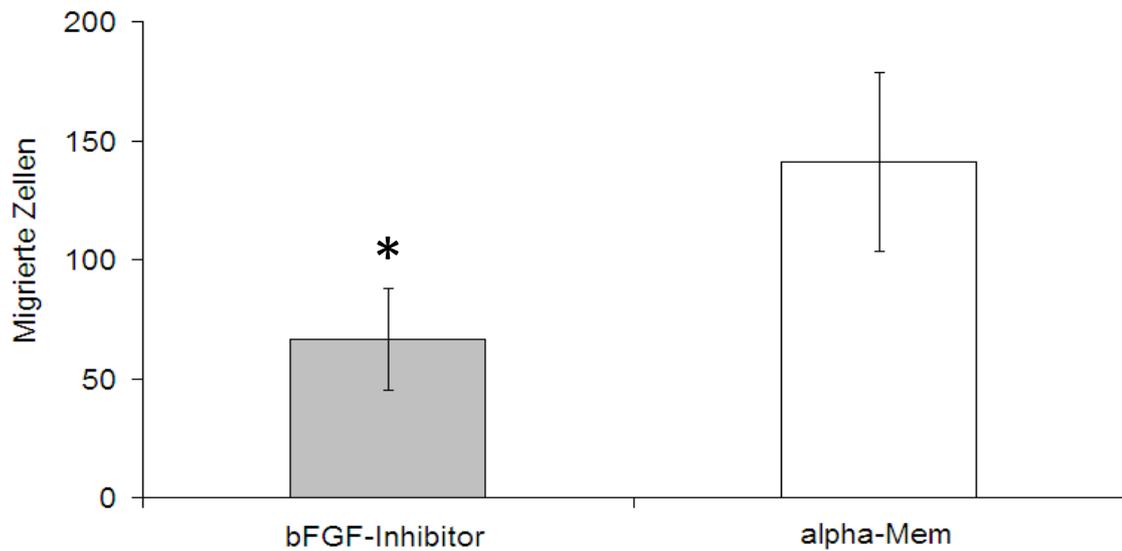


	Versuch	Kontrolle
Ø	152,25	100,00
Sta.:	21,46	0,00
p:	0,024	-

Abbildung 14: MSC-Migration in MSC-Anwesenheit

3.4.3 Migration von MSC/MSC mit bFGF-Inhibitor

In den Migrationsversuchen von MSC/MSC mit bFGF-Inhibitor zeigte sich, dass der Inhibitor einen signifikant hemmenden Einfluss auf die migratorische Aktivität der MSC hat (vergleiche auch Abbildung 14). Im Versuchsansatz mit bFGF-Inhibitor konnten nur $66,5 \pm 21,22$ Zellen nachgewiesen werden, während in der Kontrolle $141 \pm 37,74$ Zellen migrierten ($p = 0,030$, siehe Abbildung 15).

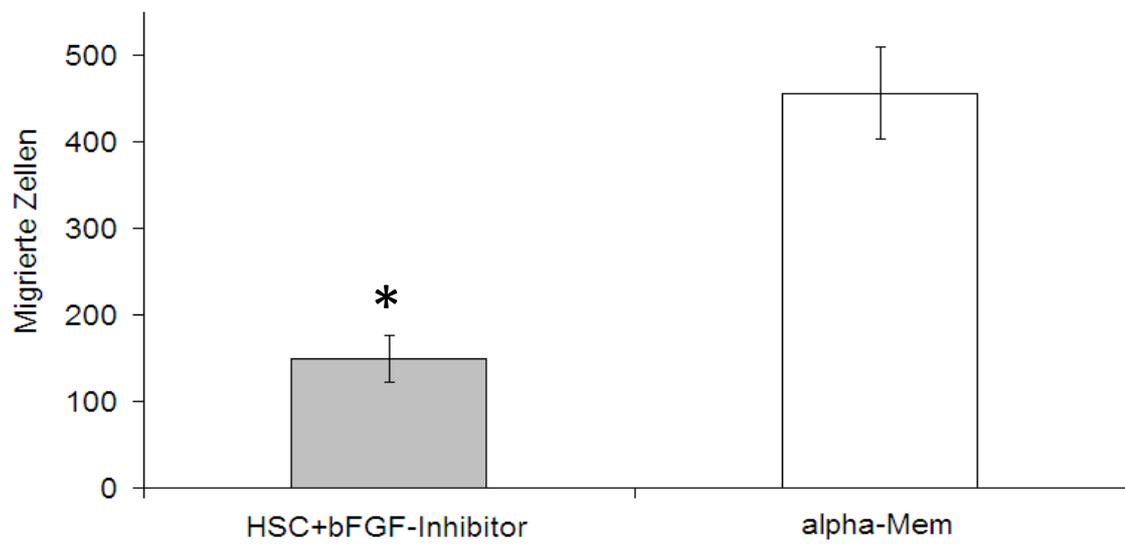


	Versuch	Kontrolle
Ø	66,50	141,00
Sta.:	21,22	37,74
p:	0,030	-

Abbildung 15: MSC-Migration mit bFGF-Inhibitor

3.4.4 Migration von MSC/HSC mit bFGF-Inhibitor

Die durch HSC gesteigerte Migration von MSC (vergleiche auch Abbildung 13) wurde durch bFGF-Inhibitor vermindert. Es zeigte sich eine deutlich geringere Migrationsaktivität als in der Kontrolle mit α -MEM ($149,50 \pm 27,58$ vs. $457 \pm 53,74$, $p = 0,038$, siehe Abbildung 16).



	Versuch	Kontrolle
Ø	149,50	457,00
Sta.:	27,58	53,74
p:	0,038	-

Abbildung 16: MSC-Migration in Anwesenheit von HSC und bFGF-Inhibitor

4 Diskussion

4.1 Kultivierung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das Wachstumsverhalten der HSC untersucht. Die Kultivierungsversuche haben gezeigt, dass HSC in einem serumfreien Medium ohne Wachstumsfaktoren nicht überlebensfähig sind. Am Tag 12 der Kultivierungsreihen zeigten sich keine lebenden HSC mehr. Die initiale Zellzahl betrug 100.000 pro Well.

In der Kokultivierung der HSC mit MSC zeigte sich ein signifikant verbessertes Überleben. Im Laufe der Kultivierung fiel die HSC-Zellzahl zunächst ab, wobei sie in der Kokultivierung mit MSC zum Ende der Kultivierung wieder anstieg, im Gegensatz zur Kontrolle, bei der die Zellzahl weiter abfiel.

Diese Beobachtung zeigte zunächst, dass die Proliferation der HSC entweder vom direkten Zell-Zell-Kontakt mit MSC bestimmt wird oder aber von löslichen Faktoren, die durch die MSC sezerniert werden. Faktoren, die selektiv zur Expansion von HSC z.B. vor einer Knochenmarkstransplantation eingesetzt werden können, sind bisher nicht bekannt.

Es ist bereits bekannt, dass MSC das Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1/JE) produzieren, welches einen günstigen Einfluss auf die Proliferation der HSC zu haben scheint (139). Eine 20-30%ige Steigerung der Proliferation konnte beobachtet werden. Frühe MSC sezernieren durch einen proinflammatorischen Reiz durch LPS, IL1- α , IFN- γ und TNF- α einen erhöhten Anteil an MCP-1/JE. Es wurde zunächst angenommen, dass MCP-1/JE auch einen günstigen Einfluss auf das Migrationsverhalten der HSC hat. Dies ließ sich jedoch in unseren Versuchen nicht bestätigen.

Als ein weiteres unterstützendes Zytokin wurde das Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) identifiziert. Es konnte anhand von human brain microvascular endothelial cells (HBMVEC) das für IGFBP-3 codierende Gen identifiziert werden. HBMVEC, die dieses Gen tragen und somit IGFBP-3 bilden

haben einen günstigen Einfluss auf die HSC-Proliferation (71). In einem weiteren Schritt konnte sogar gezeigt werden, dass isoliert zur HSC-Zellkultur hinzugefügtes IGFBP-3 die Proliferation von HSC steigert (71).

Eines der wichtigsten Zytokine im Rahmen des HSC-Überlebens ist der Vascular endothelial growth factor (VEGF). Er wirkt über den Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2), welcher von HSC exprimiert wird und unterstützt so das Überleben von HSC (66). VEGF und seine beiden Rezeptoren, VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2, sind die Schlüsselregulatoren in der vaskulären und hämatopoetischen Entwicklung (14, 15, 116). Die genauen Mechanismen sind bisher unklar. Obwohl VEGFR-2 für die Bildung endothelialer und hämatopoetischer Zellen in vivo mit verantwortlich ist (123), können diese Zellen in vitro aus embryonalen Zellen entstehen, welchen der VEGFR-2 fehlt (41, 121). Dies hat zu der Hypothese geführt, dass VEGFR-2 vor allem unterstützende Wirkung auf das Überleben, die Proliferation und Migration des Hämangioblasten, dem Vorläufer der hämatopoetischen und endothelialen Zelllinien, hat und sich weniger auf die Differenzierung desselben auswirkt (121). Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass VEGF die Proliferation und das Überleben endothelialer Zellen vor allem über den VEGFR-2 günstig beeinflusst (32). Es konnte gezeigt werden, dass VEGF das Überleben adulter HSC unterstützt (29, 33).

Die Proliferation von HSC wird ebenfalls durch Leptin stimuliert (133). Leptin, Produkt des obese-Gens, ist ein Protein, welches von Adipozyten produziert wird und den Metabolismus reguliert (143). Der das Leptin erkennende Rezeptor, der sog. obese-receptor, konnte auf HSC identifiziert werden (19). Zu in serumfreiem Medium kultivierten HSC hinzugesetztes Leptin stimuliert deren Proliferation. Dieses Ergebnis wurde in vitro herbeigeführt. Die physiologische Rolle des Leptins in der Hämatopoese ist bisher nicht geklärt. Dieses Zytokin könnte bei der Verbesserung der HSC-Expansion im Rahmen einer Stammzelltransplantation an Bedeutung gewinnen.

Es konnte auch gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression und Produktion von SDF-1 (CXCL12) durch Endothelzellen die Proliferation von HSC steigert (43). Mittels eines adenoviralen Vektors in human umbilical vein endothelial

cells (HUVEC/AdeSDF-1) wurde in jener Arbeit in endothelialen Zellen eine Überexpression des SDF-1-Gens ausgelöst. Anschließend wurde das Proliferations- und Migrationsverhalten von HSC in Kokultur analysiert. Es konnten sowohl eine gesteigerte Migration wie auch eine verbesserte Expansion und eine reduzierte Apoptose beobachtet werden.

Es ist allerdings nicht von einer alleinigen Verantwortlichkeit des SDF-1 hierfür auszugehen. Vielmehr wurde bisher der proliferationssteigernde Effekt für den SDF-1 in Synergie mit anderen verschiedenen Zytokinen beobachtet (67, 73). Auch in der oben beschriebenen Arbeit ist von einer Sekretion zusätzlicher hämatopoetischer Wachstumsfaktoren (HGF) durch die HUVEC auszugehen.

Im Gegensatz zu diesen proliferationssteigernden Zytokinen ist auch ein proliferationsminderndes Zytokin beschrieben worden. Osteoprotegerin inhibiert die Proliferation von HSC (114). Das Osteoprotegerin ist ein lösliches Mitglied der Tumor Necrosis Factor Receptor-Familie. Die Tatsache, dass es frei in der Blutbahn zirkuliert, war Anstoß zur Untersuchung des Effekts auf HSC. Die Mechanismen sind allerdings ungeklärt. Es wurde zunächst von einem Zusammenhang mit Receptor Activator of NF- κ B (RANK) und receptor activator of NF- κ B-Ligand (RANKL) ausgegangen. In der Einleitung wurde bereits im Zusammenhang mit dem Migrationsverhalten der HSC auf diesen Komplex hingewiesen. Der Rezeptor befindet sich auf der Oberfläche von Osteoklasten, welche sich in der Stammzellnische in direkter Nachbarschaft zu den HSC befinden. Über RANKL-aktivierte Osteoklasten steigern die migratorische Aktivität der HSC.

Der proliferationssteigernden Wirkung der MSC auf die HSC konnte bisher kein zugrundeliegender Mechanismus zugeordnet werden. Die oben beschriebenen Zytokine sind als proliferationssteigernd beschrieben worden. Dies wurde bisher allerdings nicht in direktem Zusammenhang mit MSC demonstriert. Da es sich bei den bisher durchgeführten Versuchen um Zellen mesenchymalen Ursprungs handelte, liegt eine Einflussnahme über dieselben oder modifizierte Mechanismen durch die MSC nahe.

4.2 Differenzierung

Die Ergebnisse der Differenzierungsbeobachtungen mittels FACS-Analyse haben gezeigt, dass MSC die HSC-Differenzierung hemmen. HSC in Monokultur differenzieren bereits nach drei Tagen in granulopoetische Zellen, während HSC in Kokultur mit MSC ihren ursprünglichen Status bewahren.

In diesem Zusammenhang ist erneut der VEGF zu nennen. Es wurde beschrieben, dass der VEGF die Aktivierung von NF- κ B bei HSC inhibiert und somit deren Differenzierung in dendritische Zellen verhindert (98). Auf diesen Zusammenhang stieß man in einer Untersuchung, die sich mit der Reifung von HSC zu dendritischen Zellen bei Karzinomen beschäftigte. Tumorzellen bilden unter anderem auch VEGF. So vermutet man, dass die Bildung von VEGF eine Reifung der HSC zu dendritischen Zellen verhindern soll, was als Vorteil für die malignen Zellen anzusehen ist.

Es gilt nun zu zeigen, ob auch die MSC über diesen Mechanismus des VEGF eine Differenzierung der HSC verhindern. Die Rezeptoren für VEGF (VEGFR1 und VEGFR-2) konnten jedenfalls auf den HSC nachgewiesen werden (33). Es ist noch nicht vollständig geklärt, welcher Mechanismus die MSC ihrerseits veranlasst, die HSC von einer Differenzierung abzuhalten, zu vermuten ist hier jedoch eine entscheidende Rolle der gemeinsamen Stammzellnische.

Des Weiteren ist es interessant zu erwähnen, dass die Anzahl exprimierter CD99-Rezeptoren auf HSC mit der Differenzierung zu B-Zellen korreliert (44). Untersucht wurde der CD99-Rezeptor bei HSC, weil er bei Leukozyten eine große Rolle für die transendotheliale Migration spielt. Das Migrationsverhalten der Leukozyten wurde in jedem Schritt molekularbiologisch verstanden und man erhofft sich, Parallelen zum Verhalten der HSC entdecken zu können. Es stellte sich heraus, dass der CD99-Rezeptor ebenfalls von HSC exprimiert wird. Die Dichte an CD99-Rezeptoren korreliert mit der Anzahl an Zellen, in welche sich die HSC differenzieren. Die Dichte der Rezeptoren bestimmt auch, ob sich die HSC zu B-Zellen differenzieren. Außerdem führt eine Blockade des Rezeptors zu einer verminderten transendothelialen Migration. Welche Mechanismen zu einer vermehrten Expression des CD99-Rezeptors führen, ist unklar.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass MSC auf noch ungeklärte Weise eine Differenzierung von HSC verhindern können. Dies erscheint wertvoll, wenn man von der MSC als einer regulierenden Zelle für die HSC vor dem Hintergrund der Stammzellnische ausgeht.

4.3 HSC-Migration

Die HSC-Migration ist essentieller Bestandteil eines raschen Engraftments und somit auch wichtiger Bestandteil einer erfolgreichen Stammzelltransplantation (siehe Kapitel 1.3). Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse haben gezeigt, dass HSC in einem serumfreien Medium eine sehr geringe migratorische Aktivität zeigen. Ein die Migration stimulierender Reiz ist die gleichzeitige Anwesenheit von MSC. Es konnte eine gesteigerte Migrationsrate beobachtet werden, allerdings war diese nicht signifikant.

Wie lässt sich die gesteigerte Migrationsaktivität der HSC bei gleichzeitiger Anwesenheit von MSC nun erklären? Sind es lösliche Faktoren oder ein direkter Zell-Zell-Kontakt? Die Beobachtungen, die bisher gemacht wurden, gehen von einer bedeutenden Rolle der löslichen Faktoren aus: So konnte beobachtet werden, dass eine vermehrte Chemotaxis und ein verbessertes Engraftment von HSC durch SDF-1 hervorgerufen werden können (75). Dies wurde im Rahmen einer Studie beobachtet, die zeigen konnte, dass ein verbessertes Engraftment nicht von der Zellzahl transplanteder HSC abhängig ist, sondern auf einer hohen migratorischen Kapazität der jeweiligen Zellpopulation beruht. Bisher galt die transplantierte Dosis an HSC als wichtigster Faktor für ein rasches Engraftment. Es ist hieraus jedoch keine direkte Korrelation zu ziehen, sondern ein indirekter kompensatorischer Effekt zu konstatieren: Eine spontane Zellmigration und SDF-1-gesteuerte Chemotaxis der CD34⁺-Zellen scheinen nicht unmittelbar mit dem Engraftment der Neutrophilen zu korrelieren, aber CD34⁺-Zellen mit CXCR4 und einer hohen chemotaktischen Aktivität scheinen eine verminderte Zellzahl transplanteder Zellen kompensieren zu können (75). Diese Beobachtung legt nahe, vor einer Stammzelltransplantation CD34⁺-Zellen auf die Dichte der

CXCR4, dem Rezeptor für SDF-1 mittels FACS zu analysieren. HSC, die schneller auf einen bestimmten SDF-1-Gradienten antworteten, zeigten eine höhere migratorische Aktivität und eine höhere CXCR4-Dichte. Diese Zellen haben also eine bessere Voraussetzung für ein erfolgreiches Engraftment.

Die migrationsstimulierende Wirkung der SDF-1-/CXCR4-Achse konnte in weiteren Arbeiten bestätigt werden: Die SDF-1/CXCR4-Interaktionen zwischen HSC und Stromazellen des Knochenmarks regulieren die Migration und Entwicklung von HSC in NOD/SCID-Mäusen (25).

Auch eine vermehrte Expression und Produktion von SDF-1 durch Endothelzellen erhöhen die migratorische Aktivität von HSC (43). Und die migratorische Aktivität, die Proliferation und das Überleben von Endothelzellen wiederum werden durch MSC unterstützt (110). Hier zeigte sich in Beobachtungen der unterschiedlichen Zellpopulationen der Stammzellnische, dass eine gegenseitige Beeinflussung sämtlicher Zellfunktionen, wie Migration, Proliferation und Überleben gegeben ist.

Das in dieser Arbeit erhobene Ergebnis der verbesserten migratorischen Aktivität der HSC durch die Anwesenheit von MSC wurde in unserem Labor durch Analyse des MSC-Medium-Überstandes auf 120 Zytokine durch meine Kollegin Jennifer Ick untersucht. Hier zeigten sich vor allem hohe Spiegel für IGFBP3, MCP-1, bFGF, Angiopoetin-2 und sechs weitere Faktoren. Andere Zytokine wurden verbraucht oder zeigten keinen signifikanten Nachweis. IGFBP-3 und MCP-1 sind wie oben beschrieben zwei die Proliferation der HSC steigernde Zytokine. Über deren Einflussnahme auf die Migrationsaktivität ist noch nicht berichtet worden. Hier gilt es, weitere Anstrengungen zur Erforschung dieser beiden Zytokine in diesem speziellen Zusammenhang anzustellen. Auch Angiopoetin-2 könnte, wie es für seinen Verwandten, das Angiopoetin-1 bereits beschrieben ist (siehe Einleitung), einen migrationssteigernden Effekt haben. Das Setting der Boyden-Chamber lässt eine selektive Testung dieser Faktoren zu.

4.4 MSC-Migration

Die Migration ist einer der Schlüsselprozesse in der Funktion der MSC. Nahezu jeglicher klinische Einsatz basiert auf der Kompetenz zur Migration (6, 7, 45). So konnte bereits nach einer intravenösen MSC-Applikation eine MSC-Migration zu geschädigtem Gewebe wie Gehirn (46), infarziertem Myokard (7) (117), Skelettmuskel (26) und Nierengewebe (84) gezeigt werden. In vivo ist die Migration ein Vorgang, der aus verschiedenen einzelnen Schritten besteht. Die Zellen müssen ihre gewohnte Umgebung, das Knochenmark, verlassen. Sie müssen den Transferweg, nämlich das Blutgefäß, erreichen, die Barriere des Endothels überwinden und ihr Zielgebiet erreichen (63).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass HSC die Migrationsrate der MSC signifikant im Vergleich zur Kontrolle erhöhen. Diese Beobachtung war bisher nicht beschrieben worden und der Mechanismus ist bisher ungeklärt. Es ist beschrieben, dass die Migration von MSC von einer großen Anzahl von Wachstumsfaktoren und Chemokinen abhängig ist: So konnten Sordi et al. berichten, dass MSC Chemokinrezeptoren, nämlich CXCR4, CX3CR1, CXCR6, CCR1 und CCR7 exprimieren und diese Expression einen Einfluss auf die migratorische Aktivität der MSC zu Inselzellen hat (126).

SDF-1/CXCR4 und der Hepatocyte growth factor (HGF) erhöhen die migratorische Aktivität der MSC über MMP zu geschädigtem Gewebe (125). Die migrationssteigernde Wirkung des SDF-1 wurde bereits für die HSC erwähnt. Auch die migratorische Aktivität der MSC wird durch die SDF-1/CXCR4-Achse mitbestimmt (138) (24). So konnte 2009 im Mausmodell gezeigt werden, dass die migratorische Aktivität der MSC zu geschädigten Knochenstrukturen vom SDF1-CXCR4-Signaling abhängig ist (52). Zusätzlich zur Regulation der SDF1-CXCR4-Achse konnte an Ratten sogar eine zeitliche Abhängigkeit der myokardialen SDF1-Expression und der migratorischen Aktivität der intravenös applizierten MSC gezeigt werden (74). Diese Beobachtungen lassen die Spekulation über ein therapeutisches Fenster bei der Applikation von MSC zu.

Ein weiterer migrationsstimulierender Faktor ist TNF- α : er erhöht die Expression von CCR2, CCR3 und CCR4, was eine erhöhte migratorische Aktivität der MSC

hervorrufen (108). In diesem Zusammenhang gilt es, eine mögliche Sekretion von TNF- α seitens der HSC im Setting der Kokultur und Migrationsversuche nachzuweisen. Das gelang bisher nicht. Mittels der bereits oben erwähnten Zytokin-Analyse der HSC- und MSC-Zellkultur-Überstände konnte ein Verbrauch an TNF- α im Analysat festgestellt werden, jedoch ist hierbei keine Aussage über eine Sekretion seitens der HSC zu treffen. Dies sollte in Zukunft weiter erforscht werden, da TNF- α als einer der wichtigen Stimulatoren für die Migrationsaktivität der MSC anzusehen ist.

Bisher identifizierte weitere Stimulanzien der MSC-Migration sind in ihrer Anzahl überschaubar. In unterschiedlichen Versuchen konnten folgende Beobachtungen gemacht werden:

CXCL8 (Interleukin-8) stimuliert die MSC in ihrer migratorischen Aktivität (115). Dies geschieht durch Bindung an den CXCR1/CXCR2. Die Familie der CXCR-Rezeptoren ist im Rahmen der Erläuterungen der CXCR4/SDF-1-Achse bereits genannt worden.

TNF- α , IFN- γ , IFN- β und Copaxone regulieren die Expression von Chemokinrezeptoren, die u.a. für die Migration der MSC verantwortlich sind (21). Die Rezeptoren selbst sind unabhängig von einer Stimulation obligat exprimiert.

Sphingosine-1-Phosphat induziert über die Extracellulär-Signal-Reguliert-Kinase (ERK), die Rho-Kinase (ROCK) und die Matrix-Metalloproteinasen (MMP) die Migration von MSC (80). Dieses Erkenntnis wurde im Rahmen einer Untersuchung vor dem Hintergrund einer regenerativen Therapie bei neurodegenerativen Erkrankungen gewonnen.

Faktoren wie Fibronectin, Vitronectin und Collagen1 induzieren ebenfalls die Migration von MSC (130). Dies lag nahe, da diese Zytokine eine bedeutende Rolle im Wundheilungsprozess spielen.

Desweiteren wurde für die MSC-Migration durch das Knochenmarksendothel ein Regulationsmechanismus über die MMP-2 und den TIMP-3 (27) identifiziert.

MSC selbst sekretieren lösliche Faktoren, die die NO- und Calcium-Spiegel endothelialer Zellen verändern und so eine transendotheliale Migration der MSC ermöglichen (62).

Durch unsere Migrationsversuche konnte auch gezeigt werden, dass MSC andere MSC anziehen. Auch hierfür kommen die oben genannten Mechanismen ebenso als mögliche Erklärung in Frage.

Nach Identifikation der erhöhten Konzentration an bFGF in den Zellkultur-Überständen der MSC, wurde dieses Zytokin durch uns auf seine migrationsbeeinflussende Aktivität getestet. Der bFGF wurde bisher als ein die MSC-Migration betreffend ambivalentes Zytokin beschrieben: Niedrige Konzentrationen an bFGF fördern die Migration, wohingegen hohe Konzentrationen die Migration senken (118). Hier konnte gezeigt werden, dass der bFGF-Inhibitor einen hemmenden Einfluss auf die Migrationsrate von MSC hat. Auch konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass der bFGF-Inhibitor einen hemmenden Effekt auf die durch HSC induzierte Migration von MSC hat. So ist also der positive Effekt der HSC auf das Migrationsverhalten der MSC nicht auf eine vermehrte bFGF-Sekretion zurückzuführen.

In Zusammenschau der Ausführungen ist die Erforschung des Sekretionsprofils von HSC unabdingbar. In einem bereits von meiner Kollegin Jennifer Ick durchgeführten Zytokin-Array zur Analyse des HSC-Sekretionsprofils konnte bisher kein positiver Nachweis stimulierender Zytokine vollzogen werden. Es sollte in Zukunft besonderes Augenmerk auf die Zytokine Interleukin-8 (CXCL8), TNF- α , SDF-1, IFN- γ , IFN- β , Copaxone, Fibronectin, Vitronectin und Collagen1, Hepatocyte growth factor (HGF) und die NO- und Calcium-Spiegel gelegt werden.

4.5 Klinischer Ausblick

Bereits in der Vergangenheit konnte beobachtet werden, dass sowohl im Tierversuch als auch in einer klinischen Studie das HSC-Engraftment von einer Kotransplantation mit MSC profitiert. Dies kann durch die hier erhobenen Ergebnisse unterstützt werden. Es gilt die genaue Identifizierung der zugrunde

liegenden Mechanismen im Einzelnen zu verstehen, um durch eine Kotransplantation oder möglicherweise sogar selektive Gabe von einzelnen Zytokinen ein verbessertes Engraftment im Rahmen einer Stammzelltransplantation hervorrufen zu können. Der Nachteil einer Kotransplantation besteht leider in der bisher noch nicht ausreichend erforschten Biologie der MSC. Der selektive Einsatz eines oder mehrerer Zytokine z.B. zur Aktivierung der MSC-Migration, um ein verbessertes HSC-Engraftment hervorzurufen könnte somit möglicherweise praktikabler und sicherer als eine Kotransplantation sein.

5 Zusammenfassung

HINTERGRUND: MSC rückten in den letzten Jahren als eine neue therapeutische Option bei Stammzelltransplantationen in den Blickpunkt. Es konnte im Jahre 2005 ein verbessertes Ansprechen der Hämatopoese durch eine simultane Transplantation von MSC und HSC gezeigt werden (91). So lag es nahe die Interaktion der HSC und MSC näher zu untersuchen und zu beleuchten. **FRAGESTELLUNG:** Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung parakriner und zellulärer Interaktion zwischen HSC und MSC als mögliche Grundlage für eine modifizierte Stammzelltransplantation. Drei Fragestellungen standen hierbei im Vordergrund: 1.) Beeinflussen sich diese unterschiedlichen Zellpopulationen? 2.) Wie beeinflussen sie sich? 3.) Ist eine Einflussnahme von außen möglich? **METHODEN UND ERGEBNISSE:** Zunächst wurde das Verhalten der HSC und MSC in Kokultur beobachtet. Hier konnte ein erheblich verbessertes Wachstum und Überleben der HSC in Kokultur gezeigt werden. Anschließend wurden die migratorischen Eigenschaften der HSC mittels der Boyden-Chamber getestet. Es zeigte sich eine migratorische Aktivität, so dass eine Versuchsreihe zur Untersuchung der Migration in An- bzw. Abwesenheit von MSC durchgeführt wurde. Hier führte die Anwesenheit von MSC nicht zu einer verstärkten migratorischen Aktivität der HSC. Die migratorische Aktivität der MSC war bereits vorbeschrieben worden, deshalb untersuchten wir das Migrationsverhalten von MSC in Anwesenheit von HSC. Die migratorische Aktivität der MSC konnte durch die HSC signifikant gesteigert werden. Da die migratorische Aktivität sogar lediglich durch einen Zellüberstand angeregt werden konnte, erfolgte die Untersuchung der Migration nach Hinzugabe von bFGF-Inhibitor, welches einen hemmenden Einfluss auf die Migrationsrate von MSC hat. **SCHLUSSFOLGERUNG:** 1.) Bezüglich Wachstum und Überleben existiert eine günstige Interaktion zwischen HSC und MSC. 2.) HSC erhöhen die migratorische Aktivität von MSC. 3.) Lösliche Faktoren scheinen hierfür die entscheidende Rolle zu spielen.

6 Literaturverzeichnis

1. What are the potential uses of human stem cells and the obstacles that must be overcome before these potential uses will be realized? [world wide website]. National Institute of health, U.S. Department of Health and human services. <http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics6.aspx>. [April 17, 2013].
2. **Adams GB, and Scadden DT.** The hematopoietic stem cell in its place. *Nat Immunol* 7: 333-337, 2006.
3. **Airas L, Hellman J, Salmi M, Bono P, Puurunen T, Smith DJ, and Jalkanen S.** CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *J Exp Med* 182: 1603-1608, 1995.
4. **Aizawa S, and Tavassoli M.** Molecular basis of the recognition of intravenously transplanted hemopoietic cells by bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 3180-3183, 1988.
5. **Askenasy N, and Farkas DL.** In vivo imaging studies of the effect of recipient conditioning, donor cell phenotype and antigen disparity on homing of haematopoietic cells to the bone marrow. *Br J Haematol* 120: 505-515, 2003.
6. **Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, and Zeiher AM.** Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 106: 3009-3017, 2002.
7. **Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, Miller L, Guetta E, Zipori D, Kedes LH, Kloner RA, and Leor J.** Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 108: 863-868, 2003.
8. **Barry F, Boynton R, Murphy M, Haynesworth S, and Zaia J.** The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 519-524, 2001.
9. **Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, and Zaia J.** The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun* 265: 134-139, 1999.

10. **Begemann M.** *Praktische Hämatologie*. Georg Thieme Verlag, 1999.
11. **Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, Demarquay C, Mazurier C, Fouillard L, Bouchet S, Bertho JM, Gourmelon P, Aigueperse J, Charbord P, Gorin NC, Thierry D, and Lopez M.** Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood* 103: 3313-3319, 2004.
12. **Blank U, Karlsson G, and Karlsson S.** Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood* 111: 492-503, 2008.
13. **Caplan AI.** Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9: 641-650, 1991.
14. **Carmeliet P, and Collen D.** Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol* 237: 133-158, 1999.
15. **Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, and Nagy A.** Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380: 435-439, 1996.
16. **Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, and Gurtner GC.** Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 10: 858-864, 2004.
17. **Champlin R.** Separation of graft-vs.-host disease and graft-vs.-leukemia effect against chronic myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 23: 1148-1151, 1995.
18. **Chavakis E, Urbich C, and Dimmeler S.** Homing and engraftment of progenitor cells: a prerequisite for cell therapy. *J Mol Cell Cardiol* 45: 514-522, 2008.
19. **Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, Smith-Gbur J, Mikhail A, Platika D, and Snodgrass HR.** Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat Med* 2: 585-589, 1996.
20. **Craddock C.** Haemopoietic stem-cell transplantation: recent progress and future promise. *Lancet Oncol* 1: 227-234, 2000.
21. **Croituru-Lamoury J, Lamoury FM, Zauanders JJ, Veas LA, and Brew BJ.** Human mesenchymal stem cells constitutively express chemokines and chemokine receptors that can be upregulated by cytokines, IFN-beta, and Copaxone. *J Interferon Cytokine Res* 27: 53-64, 2007.

22. **Cui J, Wahl RL, Shen T, Fisher SJ, Recker E, Ginsburg D, and Long MW.** Bone marrow cell trafficking following intravenous administration. *Br J Haematol* 107: 895-902, 1999.
23. **Cumano A, Ferraz JC, Klaine M, Di Santo JP, and Godin I.** Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution. *Immunity* 15: 477-485, 2001.
24. **Dar A, Goichberg P, Shinder V, Kalinkovich A, Kollet O, Netzer N, Margalit R, Zsak M, Nagler A, Hardan I, Resnick I, Rot A, and Lapidot T.** Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells. *Nat Immunol* 6: 1038-1046, 2005.
25. **Dar A, Kollet O, and Lapidot T.** Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. *Exp Hematol* 34: 967-975, 2006.
26. **De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, and Luyten FP.** Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol* 160: 909-918, 2003.
27. **De Becker A, Van Hummelen P, Bakkus M, Vande Broek I, De Wever J, De Waele M, and Van Riet I.** Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Haematologica* 92: 440-449, 2007.
28. **de Bruijn MF, Speck NA, Peeters MC, and Dzierzak E.** Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *Embo J* 19: 2465-2474, 2000.
29. **Dias S, Choy M, Alitalo K, and Rafii S.** Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C signaling through FLT-4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy. *Blood* 99: 2179-2184, 2002.
30. **Dorshkind K.** Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu Rev Immunol* 8: 111-137, 1990.
31. **Engelhardt M, Kaul, F., Waller, C.F.** *Das rote Buch, Hämatologie und internistische Onkologie: Autologe Stammzelltransplantation.* . 2010, p. 436-441.
32. **Ferrara N.** Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 77: 527-543, 1999.

33. **Gerber HP, Malik AK, Solar GP, Sherman D, Liang XH, Meng G, Hong K, Marsters JC, and Ferrara N.** VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 417: 954-958, 2002.
34. **Ghayur T, Seemayer TA, Kongshavn PA, Gartner JG, and Lapp WS.** Graft-versus-host reactions in the beige mouse. An investigation of the role of host and donor natural killer cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Transplantation* 44: 261-267, 1987.
35. **Gougos A, and Letarte M.** Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol* 141: 1925-1933, 1988.
36. **Gratwohl A, Hermans J, and Baldomero H.** Hematopoietic precursor cell transplants in Europe: activity in 1994. Report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant* 17: 137-148, 1996.
37. **Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortesisidis A, and Simmons PJ.** Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 116: 1827-1835, 2003.
38. **Heil M, Mitnacht-Krauss R, Issbrucker K, van den Heuvel J, Dehio C, Schaper W, Clauss M, and Weich HA.** An engineered heparin-binding form of VEGF-E (hbVEGF-E). Biological effects in vitro and mobilization of precursor cells. *Angiogenesis* 6: 201-211, 2003.
39. **Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, and Rafii S.** Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109: 625-637, 2002.
40. **Hendriks PJ, Martens CM, Hagenbeek A, Keij JF, and Visser JW.** Homing of fluorescently labeled murine hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 24: 129-140, 1996.
41. **Hidaka M, Stanford WL, and Bernstein A.** Conditional requirement for the Flk-1 receptor in the in vitro generation of early hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7370-7375, 1999.
42. **Huttmann A, Duhrsen U, Stypmann J, Noppeney R, Nuckel H, Neumann T, Gutersohn A, Nikol S, and Erbel R.** Granulocyte colony-stimulating factor-induced blood stem cell mobilisation in patients with chronic heart failure--Feasibility,

safety and effects on exercise tolerance and cardiac function. *Basic Res Cardiol* 101: 78-86, 2006.

43. **Hwang JH, Kim SW, Park SE, Yun HJ, Lee Y, Kim S, and Jo DY.** Overexpression of stromal cell-derived factor-1 enhances endothelium-supported transmigration, maintenance, and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells Dev* 15: 260-268, 2006.

44. **Imbert AM, Belaaloui G, Bardin F, Tonnelle C, Lopez M, and Chabannon C.** CD99 expressed on human mobilized peripheral blood CD34+ cells is involved in transendothelial migration. *Blood* 108: 2578-2586, 2006.

45. **Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, and Goodell MA.** Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107: 1395-1402, 2001.

46. **Ji JF, He BP, Dheen ST, and Tay SS.** Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem Cells* 22: 415-427, 2004.

47. **Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, and Verfaillie CM.** Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418: 41-49, 2002.

48. **Jones DL, and Wagers AJ.** No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 11-21, 2008.

49. **Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, Markham AF, Jack A, Emery P, and McGonagle D.** Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum* 46: 3349-3360, 2002.

50. **Juttner CA, To LB, Haylock DN, Branford A, and Kimber RJ.** Circulating autologous stem cells collected in very early remission from acute non-lymphoblastic leukaemia produce prompt but incomplete haemopoietic reconstitution after high dose melphalan or supralethal chemoradiotherapy. *Br J Haematol* 61: 739-745, 1985.

51. **Katayama Y, Hidalgo A, Furie BC, Vestweber D, Furie B, and Frenette PS.** PSGL-1 participates in E-selectin-mediated progenitor homing to bone marrow:

evidence for cooperation between E-selectin ligands and alpha4 integrin. *Blood* 102: 2060-2067, 2003.

52. **Kitaori T, Ito H, Schwarz EM, Tsutsumi R, Yoshitomi H, Oishi S, Nakano M, Fujii N, Nagasawa T, and Nakamura T.** Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis Rheum* 60: 813-823, 2009.

53. **Klein G.** [website]. Unklinik Tübingen. regmed.uni-tuebingen.de. [28.05.2013.

54. **Klingebliel T, and Schlegel PG.** GVHD: overview on pathophysiology, incidence, clinical and biological features. *Bone Marrow Transplant* 21 Suppl 2: S45-49, 1998.

55. **Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, and Lazarus HM.** Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 18: 307-316, 2000.

56. **Kollet O, Dar A, Shivtiel S, Kalinkovich A, Lapid K, Sztainberg Y, Tesio M, Samstein RM, Goichberg P, Spiegel A, Elson A, and Lapidot T.** Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med* 12: 657-664, 2006.

57. **Kollet O, Shivtiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, and Lapidot T.** HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 112: 160-169, 2003.

58. **Kollet O, Spiegel A, Peled A, Petit I, Byk T, Hershkovich R, Guetta E, Barkai G, Nagler A, and Lapidot T.** Rapid and efficient homing of human CD34(+)CD38(-/low)CXCR4(+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Blood* 97: 3283-3291, 2001.

59. **Kopp HG, Ramos CA, and Rafii S.** Contribution of endothelial progenitors and proangiogenic hematopoietic cells to vascularization of tumor and ischemic tissue. *Curr Opin Hematol* 13: 175-181, 2006.

60. **Kucia M, Reza R, Miekus K, Wanzek J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, and Ratajczak MZ.** Trafficking of normal stem cells and

metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells* 23: 879-894, 2005.

61. **Kühnel W.** *Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie.* Thieme Verlag, 1999.

62. **Ladage D, Brixius K, Steingen C, Mehlhorn U, Schwinger RH, Bloch W, and Schmidt A.** Mesenchymal stem cells induce endothelial activation via paracrine mechanisms. *Endothelium* 14: 53-63, 2007.

63. **Lapidot T, Dar A, and Kollet O.** How do stem cells find their way home? *Blood* 106: 1901-1910, 2005.

64. **Lapidot T, and Kollet O.** The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia* 16: 1992-2003, 2002.

65. **Lapidot T, and Petit I.** Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol* 30: 973-981, 2002.

66. **Larrivee B, Lane DR, Pollet I, Olive PL, Humphries RK, and Karsan A.** Vascular endothelial growth factor receptor-2 induces survival of hematopoietic progenitor cells. *J Biol Chem* 278: 22006-22013, 2003.

67. **Lataillade JJ, Clay D, Dupuy C, Rigal S, Jasmin C, Bourin P, and Le Bousse-Kerdiles MC.** Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood* 95: 756-768, 2000.

68. **Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK, Shpall EJ, McCarthy P, Atkinson K, Cooper BW, Gerson SL, Laughlin MJ, Loberiza FR, Jr., Moseley AB, and Bacigalupo A.** Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 11: 389-398, 2005.

69. **Li TS, Hayashi M, Ito H, Furutani A, Murata T, Matsuzaki M, and Hamano K.** Regeneration of infarcted myocardium by intramyocardial implantation of ex vivo transforming growth factor-beta-preprogrammed bone marrow stem cells. *Circulation* 111: 2438-2445, 2005.

70. **Link H, Kolb HJ, Ebell W, Hossfeld DK, Zander A, Niethammer D, Wandt H, Grosse-Wilde H, and Schaefer UW.** [Transplantation of hematopoietic stem cells. I: Definitions, principle indications, complications]. *Med Klin (Munich)* 92: 480-491, 505, 1997.
71. **Liu LQ, Sposato M, Liu HY, Vaudrain T, Shi MJ, Rider K, Stevens Z, Visser J, Deng HK, and Kraus M.** Functional cloning of IGFBP-3 from human microvascular endothelial cells reveals its novel role in promoting proliferation of primitive CD34⁺CD38⁻ hematopoietic cells in vitro. *Oncol Res* 13: 359-371, 2003.
72. **Lodie TA, Blickarz CE, Devarakonda TJ, He C, Dash AB, Clarke J, Gleneck K, Shihabuddin L, and Tubo R.** Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction. *Tissue Eng* 8: 739-751, 2002.
73. **Lum LG, Fok H, Sievers R, Abedi M, Quesenberry PJ, and Lee RJ.** Targeting of Lin-Sca⁺ hematopoietic stem cells with bispecific antibodies to injured myocardium. *Blood Cells Mol Dis* 32: 82-87, 2004.
74. **Ma J, Ge J, Zhang S, Sun A, Shen J, Chen L, Wang K, and Zou Y.** Time course of myocardial stromal cell-derived factor 1 expression and beneficial effects of intravenously administered bone marrow stem cells in rats with experimental myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 100: 217-223, 2005.
75. **Marquez-Curtis LA, Turner AR, Larratt LM, Letcher B, Lee SF, and Janowska-Wieczorek A.** CD34⁺ cell responsiveness to stromal cell-derived factor-1alpha underlies rate of engraftment after peripheral blood stem cell transplantation. *Transfusion* 49: 161-169, 2009.
76. **Mayani H, Dragowska W, and Lansdorp PM.** Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34⁺ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines. *Blood* 82: 2664-2672, 1993.
77. **Mazo IB, Gutierrez-Ramos JC, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD, and von Andrian UH.** Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med* 188: 465-474, 1998.
78. **Medvinsky AL, and Dzierzak EA.** Development of the definitive hematopoietic hierarchy in the mouse. *Dev Comp Immunol* 22: 289-301, 1998.
79. **Menard C, Hagege AA, Agbulut O, Barro M, Morichetti MC, Bresselet C, Bel A, Messas E, Bissery A, Bruneval P, Desnos M, Puceat M, and Menasche P.**

Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet* 366: 1005-1012, 2005.

80. **Meriane M, Duhamel S, Lejeune L, Galipeau J, and Annabi B.** Cooperation of matrix metalloproteinases with the RhoA/Rho kinase and mitogen-activated protein kinase kinase-1/extracellular signal-regulated kinase signaling pathways is required for the sphingosine-1-phosphate-induced mobilization of marrow-derived stromal cells. *Stem Cells* 24: 2557-2565, 2006.
81. **Mitsiadis TA, Barrandon O, Rochat A, Barrandon Y, and De Bari C.** Stem cell niches in mammals. *Exp Cell Res* 313: 3377-3385, 2007.
82. **Moore KA, and Lemischka IR.** Stem cells and their niches. *Science* 311: 1880-1885, 2006.
83. **Moore MA, Hattori K, Heissig B, Shieh JH, Dias S, Crystal RG, and Rafii S.** Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1. *Ann N Y Acad Sci* 938: 36-45; discussion 45-37, 2001.
84. **Morigi M, Imberti B, Zoja C, Corna D, Tomasoni S, Abbate M, Rottoli D, Angioletti S, Benigni A, Perico N, Alison M, and Remuzzi G.** Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 15: 1794-1804, 2004.
85. **Muraglia A, Cancedda R, and Quarto R.** Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 113 (Pt 7): 1161-1166, 2000.
86. **Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H, Miyatake K, and Kitamura S.** Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 112: 1128-1135, 2005.
87. **Nervi B, Link DC, and DiPersio JF.** Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *J Cell Biochem* 99: 690-705, 2006.
88. **Nibley WE, and Spangrude GJ.** Primitive stem cells alone mediate rapid marrow recovery and multilineage engraftment after transplantation. *Bone Marrow Transplant* 21: 345-354, 1998.
89. **Nielsen JS, and McNagny KM.** Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci* 121: 3683-3692, 2008.

90. **Nilsson SK, and Simmons PJ.** Transplantable stem cells: home to specific niches. *Curr Opin Hematol* 11: 102-106, 2004.
91. **Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS, Kruger M, van Bezooijen RL, de Paus RA, Heemskerk MH, Lowik CW, Falkenburg JH, Willemze R, and Fibbe WE.** Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 30: 870-878, 2002.
92. **Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poeppl A, Jurisica I, and Dick JE.** Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science* 333: 218-221.
93. **Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, Taneera J, Fleischmann BK, and Jacobsen SE.** Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 10: 494-501, 2004.
94. **Ohgushi H, and Caplan AI.** Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res* 48: 913-927, 1999.
95. **Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, and Anversa P.** Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410: 701-705, 2001.
96. **Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, and Anversa P.** Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10344-10349, 2001.
97. **Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyj S, Chi-Rosso G, and Lobb R.** Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 59: 1203-1211, 1989.
98. **Oyama T, Ran S, Ishida T, Nadaf S, Kerr L, Carbone DP, and Gabrilovich DI.** Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 160: 1224-1232, 1998.
99. **Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, and Keller G.** Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 126: 5073-5084, 1999.

100. **Papayannopoulou T.** Bone marrow homing: the players, the playfield, and their evolving roles. *Curr Opin Hematol* 10: 214-219, 2003.
101. **Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, and Lapidot T.** Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 283: 845-848, 1999.
102. **Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, Sandbank J, Zipori D, and Lapidot T.** G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 3: 687-694, 2002.
103. **Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, and Prockop DJ.** Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem* 72: 570-585, 1999.
104. **Pilarski LM, Pruski E, Wizniak J, Paine D, Seeberger K, Mant MJ, Brown CB, and Belch AR.** Potential role for hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM in mobilization and trafficking of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 93: 2918-2927, 1999.
105. **Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, and Marshak DR.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147, 1999.
106. **Pittenger MF, and Martin BJ.** Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 95: 9-20, 2004.
107. **Ponomaryov T, Peled A, Petit I, Taichman RS, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Magerus A, Caruz A, Fujii N, Nagler A, Lahav M, Szyper-Kravitz M, Zipori D, and Lapidot T.** Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest* 106: 1331-1339, 2000.
108. **Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonne A, Delorme B, Herault O, Charbord P, and Domenech J.** The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 25: 1737-1745, 2007.
109. **Possinger K, Regierer, A.C.** *Facharzt Hämatologie Onkologie*. 2011.
110. **Potapova IA, Gaudette GR, Brink PR, Robinson RB, Rosen MR, Cohen IS, and Doronin SV.** Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix

- invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 25: 1761-1768, 2007.
111. **Prockop DJ**. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276: 71-74, 1997.
112. **Quesenberry PJ, and Becker PS**. Stem cell homing: rolling, crawling, and nesting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15155-15157, 1998.
113. **Quesenberry PJ, Colvin G, and Abedi M**. Perspective: fundamental and clinical concepts on stem cell homing and engraftment: a journey to niches and beyond. *Exp Hematol* 33: 9-19, 2005.
114. **Ra JS, Broxmeyer HE, Kim MW, Han IS, Choi SW, and Kwon BS**. Osteoprotegerin inhibits proliferation of myeloid progenitor cells. *J Hematother Stem Cell Res* 12: 33-38, 2003.
115. **Ringe J, Strassburg S, Neumann K, Endres M, Notter M, Burmester GR, Kaps C, and Sitterling M**. Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem* 101: 135-146, 2007.
116. **Risau W, and Flamme I**. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 73-91, 1995.
117. **Schenk S, Mal N, Finan A, Zhang M, Kiedrowski M, Popovic Z, McCarthy PM, and Penn MS**. Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor. *Stem Cells* 25: 245-251, 2007.
118. **Schmidt A, Ladage D, Schinkothe T, Klausmann U, Ulrichs C, Klinz FJ, Brixius K, Arnhold S, Desai B, Mehlhorn U, Schwinger RH, Staib P, Addicks K, and Bloch W**. Basic fibroblast growth factor controls migration in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24: 1750-1758, 2006.
119. **Schmidt A, Ladage D, Steingen C, Brixius K, Schinkothe T, Klinz FJ, Schwinger RH, Mehlhorn U, and Bloch W**. Mesenchymal stem cells transmigrate over the endothelial barrier. *Eur J Cell Biol* 85: 1179-1188, 2006.
120. **Schmidt R LF**. *Physiologie des Menschen*. Springer, 2007.
121. **Schuh AC, Faloon P, Hu QL, Bhimani M, and Choi K**. In vitro hematopoietic and endothelial potential of flk-1(-/-) embryonic stem cells and embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2159-2164, 1999.
122. **Semerad CL, Christopher MJ, Liu F, Short B, Simmons PJ, Winkler I, Levesque JP, Chappel J, Ross FP, and Link DC**. G-CSF potently inhibits

osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood* 106: 3020-3027, 2005.

123. **Shalaby F, Ho J, Stanford WL, Fischer KD, Schuh AC, Schwartz L, Bernstein A, and Rossant J.** A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 89: 981-990, 1997.

124. **Shur I, Reish O, Ezra E, and Benayahu D.** Analysis of mesenchymal cells derived from an chondrodysplasia punctuate patient and donors. *J Cell Biochem* 93: 112-119, 2004.

125. **Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M, Wysoczynski M, Turner AR, Ratajczak J, Ratajczak MZ, and Janowska-Wieczorek A.** Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells* 24: 1254-1264, 2006.

126. **Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, Mercalli A, Melzi R, Giordano T, Belmonte N, Ferrari G, Leone BE, Bertuzzi F, Zerbini G, Allavena P, Bonifacio E, and Piemonti L.** Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood* 106: 419-427, 2005.

127. **Sottile V, Halleux C, Bassilana F, Keller H, and Seuwen K.** Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone* 30: 699-704, 2002.

128. **Steingen C, Brenig F, Baumgartner L, Schmidt J, Schmidt A, and Bloch W.** Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells. *J Mol Cell Cardiol* 44: 1072-1084, 2008.

129. **Sugiyama T, Kohara H, Noda M, and Nagasawa T.** Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 25: 977-988, 2006.

130. **Thibault MM, Hoemann CD, and Buschmann MD.** Fibronectin, vitronectin, and collagen I induce chemotaxis and haptotaxis of human and rabbit mesenchymal stem cells in a standardized transmembrane assay. *Stem Cells Dev* 16: 489-502, 2007.

131. **To LB, Haylock DN, Simmons PJ, and Juttner CA.** The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 89: 2233-2258, 1997.

132. **Tomblyn MB, Arora M, Baker KS, Blazar BR, Brunstein CG, Burns LJ, DeFor TE, Dusenbery KE, Kaufman DS, Kersey JH, MacMillan ML, McGlave PB,**

- Miller JS, Orchard PJ, Slungaard A, Tomblyn MR, Vercellotti GM, Verneris MR, Wagner JE, and Weisdorf DJ.** Myeloablative hematopoietic cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia: analysis of graft sources and long-term outcome. *J Clin Oncol* 27: 3634-3641, 2009.
133. **Umamoto Y, Tsuji K, Yang FC, Ebihara Y, Kaneko A, Furukawa S, and Nakahata T.** Leptin stimulates the proliferation of murine myelocytic and primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* 90: 3438-3443, 1997.
134. **Voermans C, van Hennik PB, and van der Schoot CE.** Homing of human hematopoietic stem and progenitor cells: new insights, new challenges? *J Hematother Stem Cell Res* 10: 725-738, 2001.
135. **Wakitani S, Takaoka K, Hattori T, Miyazawa N, Iwanaga T, Takeda S, Watanabe TK, and Tanigami A.** Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint. *Rheumatology (Oxford)* 42: 162-165, 2003.
136. **Weidt C, Niggemann B, Kasenda B, Drell TL, Zanker KS, and Dittmar T.** Stem cell migration: a quintessential stepping stone to successful therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 2: 89-103, 2007.
137. **Wollert KC, and Drexler H.** Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res* 96: 151-163, 2005.
138. **Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE, Fairbairn LJ, and Bellantuono I.** A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood* 104: 2643-2645, 2004.
139. **Xu YX, Talati BR, Janakiraman N, Chapman RA, and Gautam SC.** Growth Factors: Production of Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1/JE) by Bone Marrow Stromal Cells: Effect on the Migration and Proliferation of Hematopoietic Progenitor Cells. *Hematology* 4: 345-356, 1999.
140. **Yin T, and Li L.** The stem cell niches in bone. *J Clin Invest* 116: 1195-1201, 2006.
141. **Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, Hanley A, Scadova H, Qin G, Cha DH, Johnson KL, Aikawa R, Asahara T, and Losordo DW.** Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 115: 326-338, 2005.

-
142. **Zeiser R, Marks, R., Finke, J.** *Das Rote Buch Hämatologie und Internistische Onkologie: Allogene Stammzelltransplantation.* 2010, p. 442-450.
143. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, and Friedman JM.** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432, 1994.
144. **Zigmond SH.** Orientation chamber in chemotaxis. *Methods Enzymol* 162: 65-72,1988.

7 Lebenslauf

Allgemeine Daten

- Name: Johanna Dinter
- Geburtsdatum/ -ort: 19.07.1981, Bergisch Gladbach
- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Konfession: evangelisch

Schulbildung

- 07.1987 – 06.1991 Katholische Grundschule Köln- Stammheim
- 08.1991 – 06.2000 Hölderlin Gymnasium Köln- Mülheim
Abschluss: Abitur

Studium

- WS 2000 Beginn des Humanmedizinstudiums an der Universität zu Köln
- 09.2002 Ärztliche Vorprüfung
- 08.2003 1. Staatsexamen
- 03.2006 2. Staatsexamen
- 06.2007 3. Staatsexamen

Praktisches Jahr

- 04.2006 Innere Medizin, Klinikum Holweide, Köln
- 08.2006 Viszeralchirurgie, Hopital de la croix-rousse, Lyon, Frankreich
- 12.2006 Hals-, Nasen-, Ohren- Heilkunde, Klinikum Holweide, Köln

Dissertation

- 01.11.2003 Beginn der Promotionsarbeit im Labor für molekulare Hämatologie und Onkologie der Klinik I für Innere Medizin der Universität zu Köln (Leiter: Priv.- Doz. Dr. med. P. Staib)

Berufliche Laufbahn

- 01.10.2007 Beginn der Arbeitstätigkeit als Assistenzärztin in der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie der Universität zu Köln (Leiter: Prof. Dr. med. T. Goeser)
- 23.01.2013 Facharzt für Innere Medizin, Ärztekammer Düsseldorf

Kongressbeiträge im Rahmen der Dissertation

- A. Schmidt, J. Ick, **J. Dinter**, B. Desai, U. Mehlhorn, W. Bloch, P. Staib, T. Schinkoethe, *Interaction of mesenchymal and haematopoietic stem cells*, 100th Annual Meeting Anatomische Gesellschaft, Leipzig, Germany, März 2005
- **J. Dinter**, J. Ick, A. Schmidt, W. Bloch, T. Schinkoethe, P. Staib, *Secretion profile of mesenchymal and hematopoietic stem cells*, Onkologie, Supplement 3, Band 28, Oktober 2005
- J. Ick, **J. Dinter**, A. Schmidt, W. Bloch, P. Staib, T. Schinkoethe, *Crosstalk between mesenchymal and hematopoietic stem cells*, Onkologie, Supplement 3, Band 28, Oktober 2005

Weitere Veröffentlichungen

- Schramm C, **Dinter J**, Demir M, Lengerli K, Töx U, Steffen H-M; *Hypertonie-Prävalenz und antihypertensive Behandlungsmodalitäten bei Patienten mit biotisch gesicherter nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung*; Journal für Hypertonie – Austrian Journal of Hypertension 2010; 14 (4): 21 – 25.

- Quasdorff M, Mertens J, Dinter J, Steffen HM. *Recurrent hypomagnesemia with proton-pump inhibitor rechallenge*; Ann Intern Med. 2011 Sep 20;155(6):405-7
- Kaasch AJ, Dinter J, Goeser T, Plum G, Seifert H. *Yersinia pseudotuberculosis bloodstream infection and septic arthritis: case report and review of the literature*. Infection. 2011 Jul 26.