Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten,
plastische und ästhetische Operationen
des Universitätsklinikums Würzburg
Direktor: Universitäts-Professor Dr. med. Dr. h. c. R. Hagen

# Proliferationsverhalten epithelialer Tumorzellen in Gegenwart von humanen mesenchymalen Stammzellen

**Inaugural – Dissertation**
**zur Erlangung der Doktorwürde der**
**Medizinischen Fakultät**
**der**
**Julius-Maximilian-Universität Würzburg**

vorgelegt von

**Hannah Grein**

aus Dinkelsbühl

Würzburg, Dezember 2019

**Referent/in:** Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser

**Korreferent/in:** Univ.-Prof. Dr. med. Süleyman Ergün

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Haaf

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag des Promotionskolloquiums:** 07.10.2020

Die Promovendin ist Ärztin.

*Es wird fleißig gearbeitet und viel mikroskopiert, aber es müsste mal wieder jemand einen gescheiten Gedanken haben.*

Dr. Rudolf Virchow

Für meine Eltern,
denen ich unglaublich dankbar bin, dass sie immer für mich da sind und an mich glauben.

# INHALTSVERZEICHNIS


**1 EINLEITUNG 1**

**1.1 Plattenepithelkarzinome in Kopf und Hals 1**

**1.2 Definition und Klassifikation von Stammzellen 2**

1.2.1 Der Oberflächenmarker Stro-1 5

1.2.2 Hochproliferative Klone bei Zellaussiedlung mit geringer Dichte 6

**1.3 Interaktion zwischen mesenchymalen Stammzellen und Tumorzellen 7**

1.3.1 Fördernde Einflüsse von mesenchymalen Stammzellen auf Tumorzellen 7

1.3.2 Hemmende Einflüsse von mesenchymalen Stammzellen auf Tumorzellen 11

1.3.3 Klinische Relevanz 12

**1.4 Ziele der Arbeit 14**

**2 MATERIAL UND METHODEN 16**

**2.1 Gewinnung humaner mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark 16**

**2.2 Spender 19**

**2.3 Durchflusszytometrie 20**

2.3.1 Das Prinzip der Durchflusszytometrie 20

2.3.2 Immunphänotypisierung der Bone marrow stem cells anhand ihrer spezifischen Antigene 22

2.3.3 Nachweis der Präsenz des Oberflächenmarkers Stro-1 auf Bone marrow stem cells 24

**2.4 Differenzierungspotenzial der Bone marrow stem cells 25**

2.4.1 Osteogene Differenzierung 25

2.4.2 Adipogene Differenzierung 27

**2.5 Übersicht des Projekts und Versuchsaufbau mit Einteilung der Bone marrow stem cells in drei verschiedenen Ansätze 28**

**2.6 Kultivierung der Zellen 30**

2.6.1 Zellkultur der Bone marrow stem cells 30

2.6.2 Zellkultur der Zelllinie FaDu 31

2.6.3 Ablösung und Passagierung der Zellen 31

2.6.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen 33

**2.7 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität 34**

2.7.1 Automatische Zellzählung mit dem Cell counter and Analyzing System (Casy) 34

2.7.2 Neubauerkammer und Trypanblau-Ausschlussverfahren 36

**2.8 Mikroskopaufnahmen und Fotodokumentation der Bone marrow stem cells 37**

**2.9 Sortierungsvorgang mit dem Magnetic Activated Cell Sorting-Gerät 38**

**2.10 Proliferationsanalyse und Co-Kultur 42**

**2.11 Graphische Darstellung und statistische Auswertung 46**

**3 ERGEBNISSE 49**

**3.1 Verifizierung des Immunphänotyps der Bone marrow stem cells anhand ihrer spezifischen Antigene 49**

**3.2 Präsenz von Stro-1 auf Bone marrow stem cells 51**

**3.3 Differenzierungspotenzial der Bone marrow stem cells 52**

3.3.1 Osteogene Differenzierung 52

3.3.2 Adipogene Differenzierung 53

**3.4 Zellkultur 54**

3.4.1 Generelles Wachstumsverhalten der Bone marrow stem cells und FaDu Zellen 54

3.4.2 Wachstumsverhalten der dünn ausgesäten Bone marrow stem cells 55

**3.5 Magnetische-Zellsortierung nach Stro-1+ Bone marrow stem cells 57**

**3.6 Proliferationsanalyse und Co-Kultur 58**

3.6.1 Proliferationsanalyse für Bone marrow stem cells aller Ansätze und FaDu Zellen für Tag 4 im Überblick 59
3.6.2 Proliferationsvergleich FaDu Monokultur vs. FaDu Co-Kultur für Ansatz 1 61
3.6.3 Proliferationsvergleich FaDu Monokultur vs. FaDu Co-Kultur für Ansatz 2 63
3.6.4 Proliferationsvergleich FaDu Monokultur vs. FaDu Co-Kultur für Ansatz 3 64

**3.7 Reliabilitätsanalyse Casy-Daten vs. Neubauerkammer-Daten 65**

**3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse 69**

**4 DISKUSSION 70**

**4.1 Diskussion der Methodik 70**

4.1.1 Zellkultur-Führung: Ein Standard? 70
4.1.2 Herausforderungen der dünnen Aussaat von Zellen 71
4.1.3 Vorteile der magnetischen Zellseparation 73
4.1.4 Unterschiedliche Zellzählungsmethoden: Reliabilitätsanalyse für die Neubauerkammer und das Casy Zellzählungsgerät 73
4.1.5 Statistik: Nichtparametrischer Test für abhängige Variablen 74

**4.2 Diskussion der Ergebnisse 75**

4.2.1 Verifizierung des Immunphänotyps der Bone marrow stem cells anhand ihrer spezifischen Antigene 75
4.2.2 Ertrag der magnetischen Zellsortierung 79
4.2.3 Kein Verändertes Proliferationsverhalten der FaDu Zellen 81

**4.3 Ausblick 84**

**5 ZUSAMMENFASSUNG 86**

**6 ANHANG 88**

**6.1 Materialien und Geräte im Überblick 88**

6.1.1 Laborgeräte 88
6.1.2 Verbrauchsmaterialien 89

6.1.3 Chemikalien 90
6.1.4 Nährmedium und Zusätze 91
6.1.5 Antikörper und Oberflächenmarker 92

**6.2 Messergebnisse 93**

6.2.1 Spender 1 93
6.2.2 Spender 2 95
6.2.3 Spender 3 96
6.2.4 Spender 4 98
6.2.5 Spender 5 100
6.2.6 Spender 6 101
6.2.7 Spender 7 103
6.2.8 Spender 8 104
6.2.9 Spender 9 106
6.2.10 Spender 10 108
6.2.11 Spender 11 109

**6.3 Ergebnisse und Statistik in Tabellenform 112**

6.3.1 Magnetische-Zellsortierung nach Stro-1+ Bone marrow stem cells 112
6.3.2 Proliferationsvergleich FaDu Monokultur vs. FaDu Co-Kultur 113

**6.4 Abkürzungsverzeichnis 115**

**6.5 Abbildungsverzeichnis & Tabellenverzeichnis 118**

**6.6 Literaturverzeichnis 120**

**Danksagung**

**Lebenslauf**

**Eidesstattliche Erklärung**

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Plattenepithelkarzinome in Kopf und Hals

Plattenepithelkarzinome in Kopf und Hals (Head and neck squamous cell carcinoma = HNSCC) rangieren innerhalb maligner Tumorerkrankungen weltweit an sechster Stelle (Duvvuri and Myers 2009; Chen et al. 2013; Hartmann and Grandis 2016) und machen damit etwa 3 – 4% aus (Gatta et al. 2015). Jährlich sterben 380.000 Patienten weltweit daran (Global Burden of Disease Cancer et al. 2017). Fast 25% der Patienten mit HNSCC sind 70 Jahre und älter (Hartmann and Grandis 2016). Die Karzinome treten u. a. in der Nase, den Nasennebenhöhlen, in der Mundhöhle, den Speicheldrüsen oder auch im Pharynx sowie Larynx auf.

Durch die sogenannte Karzinogenese, die bei weitem noch nicht vollständig verstanden ist, entstehen in einem Organismus aus gesunden Zellen maligne Tumorzellen. Diese Zellen enthalten fehlerhaftes Erbgut, werden aber vom Körper nicht als entartet erkannt und können somit auch nicht eliminiert werden. Es kommt zur phasenhaften Invasion des Gewebes. Im Jahr 2000 postulierten Hanahan et al. sechs Eigenschaften, die tumoröses Gewebe kennzeichnen sollen (Hanahan and Weinberg 2011). Dazu gehören:

1) die Autostimulation durch Wachstumssignale
2) die Unempfindlichkeit gegenüber wachstumsinhibierenden Signalen
3) die Widerstandsfähigkeit bezüglich Apoptose
4) ein Potential zur unendlichen Replikation
5) die Induktionsfähigkeit zur Angiogenese
6) die Invasions- und Metastasierungsfähigkeit

Die malignen Zellen kommunizieren dabei auch rege mit ihrem umgebenden Gewebe, zu dem u. a. auch Zellen gehören sollen, die einen Ursprung in mesenchymalen Knochenmarkstammzellen haben (Quante et al. 2011). Durch

die Ausschüttung von verschiedensten Botenstoffen und Zytokinen suggeriert das Malignom einen chronischen Zustand der Entzündung. Deshalb wird ein Tumor auch als „Wunde, die niemals heilt“ bezeichnet (Dvorak 1986; Albini and Sporn 2007; Schafer and Werner 2008; Arnold et al. 2015; Dvorak 2015).

Es gibt viele unterschiedliche Tumorzellen. Interessanterweise hat man bezüglich der Interaktion zwischen mesenchymalen Stammzellen und Tumorzellen für Tumore epithelialer Herkunft proliferativsteigernde Aktivitäten durch mesenchymale Stammzellen beobachtet, während für neuronale Tumore eine Inhibierung der Proliferation berichtet wurde (Bergfeld et al. 2014).

In dieser Arbeit wurde mit humanen Hypopharynxkarzinomzellen der Linie FaDu gearbeitet, die 1972 erstmals von Rangan beschrieben und isoliert wurden (Rangan 1972). Der Name FaDu leitet sich von dem Patienten ab, bei dem diese Zellen zum ersten Mal entnommen worden sind. Die Zellen haben eine Populationsverdopplungszeit von etwa 50 Stunden und wachsen in Zellklumpen anstatt einzelnen isolierten Zellen. Sie können über mehrere Passagen problemlos kultiviert werden und eignen sich deshalb gut zur Durchführung der hier vorgesehenen Versuche.

## 1.2 Definition und Klassifikation von Stammzellen

Wenn in der Literatur das Wort *Stammzellen* fällt, kann man dieses Thema nicht pauschalisieren. Es gilt eine differenzierte Betrachtung vorzunehmen, denn der Begriff wird vielseitig verwendet.

Ganz allgemein sind Stammzellen Zellen, die entweder keine oder nur eine sehr geringe Differenzierung aufweisen und durch Teilung weitere Stammzellen oder auch differenzierte und spezialisierte Zellen hervorbringen können (Hall and Watt 1989). Sie sind also noch nicht auf eine bestimmte Funktion im Körper festgelegt, können aber dazu beitragen, das vom Körper benötigte spezifische Zellmaterial zu generieren. Dabei muss man zwei grundlegende Stammzell-Gruppen voneinander abgrenzen, die sich in ihrem Vorkommen und Differenzierungsgrad unterscheiden: Die *embryonalen* Stammzellen und die *adulten* Stammzellen. Aus

embryonalen Stammzellen kann sich ein gesamter Organismus entwickeln. Adulte Stammzellen weisen einen geringeren Grad an Differenzierungsfähigkeit auf und sind während der gesamten Lebenszeit eines mehrzelligen Organismus im Körper zu finden, um beispielsweise zugrunde gegangenes Gewebe zu ersetzen.

Im Zusammenhang der Differenzierungsfähigkeit werden Stammzellen weiter unterteilt in:

- **Totipotente / Omnipotente Zellen**: Aus ihnen können alle anderen Zellen und Gewebe eines Organismus entstehen. Dieses Kriterium erfüllen Stammzellen von der befruchteten Eizelle bis zum frühembryonalen 8-Zell-Morulastadium.
- **Pluripotente Zellen**: Aus ihnen können die Zellen aller drei Keimblätter entstehen. Sie können jedoch keinen Gesamtorganismus hervorbringen, da die Fähigkeit eine Plazenta zu bilden, nicht mehr vorhanden ist. Beispiel: Embryonale Stammzelle
- **Multipotente Zellen**: Aus ihnen können sich verschiedene Zellen, verschiedener Keimblätter bilden. Sie können sich dabei nicht mehr in jede Körperzelle entwickeln. Beispiel: Stammzellen der Hämatopoese
- **Oligopotente Zellen**: Aus ihnen können sich wenige verschiedene Zelltypen innerhalb eines Gewebetyps differenzieren. Beispiel: lymphoide Stammzellen

Embryonale Stammzellen können totipotent oder pluripotent sein, während adulte Stammzellen multipotent oder oligopotent sind. Dem gegenüber stehen die unipotenten Zellen, die nur noch den selben Zelltypus, dem sie angehören hervorbringen können wie zum Beispiel Fibroblasten. Das entspricht den normalen, teilungsfähigen Körperzellen (Lüllmann-Rauch 2003).

Adulte Stammzellen finden sich u. a. im Nabelschnurblut (Erices et al. 2000), in der Plazenta (Fukuchi et al. 2004), im peripheren Blut (Zvaifler et al. 2000; Villaron et al. 2004), im Fettgewebe (Zuk et al. 2002), in der Dermis (Toma et al. 2001), im Muskel (Bosch et al. 2000), in Perizyten (Brighton et al. 1992), in der

Synovialmembran (Yoshimura et al. 2007), im Periost (Nakahara et al. 1991), in der Zahnpulpa (Gronthos et al. 2002) oder auch im Knochenmark. Stammzellen des Knochenmarks können sich wiederum zum Beispiel in hämatopoetische, endotheliale oder mesenchymale Stammzellen differenzieren.

In dieser Arbeit wurde mit adulten, multipotenten mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark gearbeitet (*BMSC* = Bone Marrow Stromal / Stem Cells). Mesenchymale Stammzellen (MSC = Mesenchymal Stem Cells) wurden erstmals von Friedenstein et al. in einem Konzept als fibroblastenartige Zellen des Knochenmarks beschrieben und isoliert (Friedenstein et al. 1966; Friedenstein et al. 1970), wobei Cohnheim bereits 1867 die Existenz regenerativer Zellen erwähnte, deren Ursprung er im Knochenmark mutmaßte (Cohnheim 1867). Weitere Forschungsarbeiten fanden im Laufe der Zeit die vielzähligen Differenzierungsmöglichkeiten der BMSC heraus, zu denen u. a. die Differenzierung in die folgenden Gewebe gehört: Knochen (Friedenstein et al. 1987; Beresford 1989; Caplan 1991; Haynesworth et al. 1992; Pittenger et al. 1999), Knorpelgewebe (Friedenstein, Chailakhyan et al. 1987; Cassiede et al. 1996; Kadiyala et al. 1997; Pittenger, Mackay et al. 1999), Adipozyten (Dennis and Caplan 1996; Pittenger, Mackay et al. 1999; Jaiswal et al. 2000), Sehnen und stromales Bindegewebe (Majumdar et al. 1998; Young et al. 1998), Endothelzellen (Reyes et al. 2002; Oswald et al. 2004), Perizyten (Rajantie et al. 2004), Keratinozyten (Sasaki et al. 2008), Skelettmuskeln (Wakitani et al. 1995; Ferrari et al. 1998), Kardiomyozyten (Makino et al. 1999; Fukuda 2001), neuronales Gewebe (Azizi et al. 1998), Neurone (Woodbury et al. 2000), Stromazellen des Thymus (Liechty et al. 2000) oder auch Epithel von Leber, Lunge und Darm (Reyes et al. 2001; Jiang et al. 2002). Letztere lässt einige Forscher wie Jiang et al. mittlerweile sogar von einer Pluripotenz der BMSC ausgehen (Jiang, Jahagirdar et al. 2002).

Die „*International Society for Cellular Therapy*" (ISCT) legte für mesenchymale Stammzellen folgenden Minimalkonsens fest (Dominici et al. 2006):

- Die Zellen müssen unter Standardkulturbedingungen an Plastik adhärieren.

- Über 95% der Zellpopulation müssen die Oberflächenmarker (Cluster of Differentiation = CD) CD73, CD90 und CD105 exprimieren und weniger als 2% dürfen die Oberflächenmarker CD14, CD11b, CD79, CD19, CD34, CD45 und Human Leukocyte Antigen-DR (HLA-DR) aufweisen, die zum Teil typische Oberflächenmarker hämatopoetischer Stammzellen sind.
- Die Zellen müssen die Fähigkeit besitzen, sich *in vitro* unter Standardbedingungen in Osteozyten, Adipozyten und Chondrozyten zu differenzieren.

Spezifische Oberflächenmarker, die nur auf mesenchymalen Stammzellen zu finden sind, wurden bisher jedoch nach wie vor noch nicht gefunden.

Zur besseren Übersichtlichkeit wird im Folgenden nur noch die englische Abkürzung für Knochenmarksstammzellen – BMSC – verwendet, da dies die genauste Bezeichnung für die in dieser Arbeit eingesetzten mesenchymalen Stammzellen ist. Werden diverse Studien mit eingebracht, bei denen die Herkunft aus dem Knochenmark nicht unbedingt vorausgesetzt ist oder es ganz allgemein um adulte, multipotente mesenchymale Stammzellen und ihre Interaktionen geht, so wird von *mesenchymalen Stammzellen* gesprochen.

### 1.2.1 Der Oberflächenmarker Stro-1

Auf der Suche nach einem spezifischen Oberflächenmarker für BMSC beschäftigten sich Simmons und Torok-Storb vor allem mit dem Antikörper Stro-1, der sich vermutlich gegen den Oberflächenmarker CD34 richtet (Simmons and Torok-Storb 1991). Simmons und Torok-Storb konnten zeigen, dass sich die Stro-1+ BMSC (Stro-1 positive BMSC), die mittels Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierung (FACS) aufgegliedert wurden, zum einen ebenfalls in Adipozyten, Muskelzellen und Fibroblasten differenzieren können und dass sie zum anderen *in vitro* hämatopoetische Zellen unterstützen. Stro-1 bindet dabei jedoch nicht an hämatopoetische Vorläuferzellen, auch wenn dies die Bindung an CD34 möglicherweise suggerieren könnte. Die Differenzierung in Osteoblasten wurde ebenfalls bewiesen (Gronthos et al. 1994). Obwohl einige Forschungsarbeiten sich an diesem angenommenen spezifischen

mesenchymalen Stammzellmarker orientierten, ist nach wie vor wenig bekannt über die genaue Herkunft oder Funktion. Ning et al. haben gezeigt, dass Stro-1 ein 75 kDa schweres endotheliales Protein ist und dass es außer in Fettstammzellen und Endothelzellen auch in den Tumorzelllinien PC3, DU145, MCF7 und K562 zu finden ist (Ning et al. 2011). Weiterhin konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass der Marker gehäuft auftritt, wenn die Fettgewebestammzellen über die erste Passage hinaus kultiviert wurden oder wenn sie zur Differenzierung in Endothelzellen angeregt wurden. Dies lässt auf ein möglicherweise induziertes Auftreten des Markers schließen. Der genauere Mechanismus ist dabei jedoch noch nicht verstanden.

Andere Ergebnisse zu diesem Oberflächenprotein legten dar, dass Stro-1+ Zellen im Zusammenhang mit einer größeren Migrations- bzw. Homing-Fähigkeit (Bensidhoum et al. 2004) und einer verstärkten immunsuppressiven Wirkung durch Interaktion mit Immunzellen stehen (Nasef et al. 2009; Zhang et al. 2013). Diese Erkenntnisse machen Stro-1+ BMSC für weitere Untersuchungen sehr interessant. Deshalb spielen diese in der folgenden Arbeit eine zentrale Rolle.

### 1.2.2 Hochproliferative Klone bei Zellaussiedlung mit geringer Dichte

Zahlreiche Forschungsgruppen haben die Entdeckung gemacht, dass bei BMSC, die mit einer sehr geringen Dichte ausgesät wurden, die Entstehung von hochproliferativen Zellklonen zu beobachten ist. Die Auswahl des Dichtegrades war dabei sehr variabel und lag meist zwischen 1 – 3 Zellen / $cm^2$ und 1 – 10 Zellen / $cm^2$ (Kuznetsov et al. 1997; Colter et al. 2000; Colter et al. 2001; Prockop et al. 2001; Sekiya et al. 2002; Haasters et al. 2009).

Die entstehende Population bildet einzelne morphologisch heterogene Kolonien. Es finden sich kleine hochproliferative Zellen (7 µm), spindelig geformte fibroblastenartige Zellen, die sich relativ schnell teilen und große abgeflachte Zellen (20 – 50 µm), die sich eher langsam teilen (Digirolamo et al. 1999; Prockop, Sekiya et al. 2001; Sekiya, Larson et al. 2002; Haasters, Prall et al. 2009). Die Kolonie der hochproliferativen Zellen soll laut Studien gefördert

werden, wenn die Dichte möglichst gering gehalten wird (Prockop, Sekiya et al. 2001). Haasters et al. fanden heraus, dass auch die Oberflächenmarker variieren. Beispielsweise exprimieren die kleinen hochproliferativen Zellen die Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 sehr stark, während die großen abgeflachten Zellen eher eine niedrige Expression der Marker aufweisen und auch einen deutlichen Mangel an CD73 zeigen (Haasters, Prall et al. 2009). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Kolonien beziehen sich also nicht nur auf die Morphologie, sondern auch auf den Immunphänotyp.

Auch für diese Arbeit wurden BMSC mit einer sehr geringen Dichte ausgesät, um hochproliferative Klone zu generieren.

## 1.3 Interaktion zwischen mesenchymalen Stammzellen und Tumorzellen

Die Forschung mit Stammzellen ist in vielerlei Bereichen nach wie vor ein Thema der Grundlagenforschung, was uns auch die teils kontroversen Forschungsergebnisse in der Literatur zeigen. So finden sich sowohl fördernde, als auch hemmende Einflüsse von mesenchymalen Stammzellen auf Tumorzellen. Zwar können die im folgenden Abschnitt beschriebenen Ergebnisse in dieser Arbeit nicht alle genauer beleuchtet werden, jedoch sollen sie einen Überblick über den aktuellen Forschungsstand liefern, um die Hintergründe genauer zu verstehen.

### 1.3.1 Fördernde Einflüsse von mesenchymalen Stammzellen auf Tumorzellen

In zahlreichen Studien (Grieb et al. 2011; Nuschke 2014; Motegi and Ishikawa 2016) hat man herausgefunden, dass mesenchymale Stammzellen zu einer besseren Wundheilung beitragen. Geht man von der Annahme aus, dass ein Tumor als eine Art chronische Entzündung oder „niemals heilende Wunde“ (Dvorak 1986; Arnold, Opdenaker et al. 2015; Dvorak 2015) anzusehen ist, so

erscheint es logisch, dass mesenchymale Stammzellen den Tumor als eine solche chronische Inflammation behandeln und ihn somit indirekt fördern.

Ein wichtiger Punkt hierbei ist das sog. Homing, eine Fähigkeit der mesenchymalen Stammzellen durch Interaktion zu entzündetem Gewebe im Körper zu wandern (Droujinine et al. 2013). Dieselbe Eigenschaft hat man auch für die Migration zu tumorösen Gewebe entdeckt (Kidd et al. 2009; Kang et al. 2012; Spaeth et al. 2012). Eine Vielzahl von Chemokinen, Rezeptoren und anderen Proteinen, wie Zytokinen, Angiogenese- oder Wachstumsfaktoren (IL-6 und -8, Neurotrophin-3 PDGF, EGF, TGF-ß, IL-1ß, TNF-α) (Abarbanell et al. 2009; Kansy et al. 2014) spielen bei dieser „Lockung“ und Wanderung eine Rolle. Tumore synthetisieren die meisten dieser Chemokine (Nakamizo et al. 2005), die wahrscheinlich als Liganden für mesenchymale Stammzellen dienen (Dwyer et al. 2007), um diese anzulocken.

Eine weitere Fähigkeit der mesenchymalen Stammzellen ist die Unterdrückung des Immunsystems durch die Sekretion immunmodulierender Faktoren wie Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) (Meisel et al. 2004; Maby-El Hajjami et al. 2009; Liotta et al. 2015), Nitric oxide (NO) (Sato et al. 2007), Prostaglandin E2 (PGE2) (Aggarwal and Pittenger 2005) oder Interleukin-6 (IL-6) (Djouad et al. 2007). In der Wundheilung dienen diese Prozesse dazu, eine überschießende Entzündung zu unterdrücken, um eine bessere Heilung zu gewährleisten (Motegi and Ishikawa 2016). Im Falle des Tumors kann dieser weniger gehemmt weiterwachsen. Darüber hinaus wurden mesenchymale Stammzellen in Verbindung mit der Rekrutierung von Makrophagen Typ 2 (M2) gebracht, die in der Wundheilung eine Rolle in der Progression der Heilung, Angiogenese und Dämpfung der Inflammation spielen und bei Karzinomen mit Tumorwachstum assoziiert wurden (TAMs = Tumor-associated macrophages) (Zhang et al. 2010; Yamada et al. 2016).

Zahlreiche Forschungsarbeiten haben ergeben, dass mesenchymale Stammzellen die Angiogenese induzieren können. Dabei spielen zum einen von mesenchymalen Stammzellen sezernierte Faktoren wie Vascular-endothelial growth factor (VEGF) (Beckermann et al. 2008), Platelet-derived growth factor

(PDGF), Basic fibroblast growth factor (BFGF), Angiopoietin (Wu et al. 2007), IL-6 und -8, TGF-ß (Galiano et al. 2004) und Fibroblast growth factor 7 (FGF-7) eine Rolle (Hong et al. 2014). Zum anderen wird angenommen, dass sich ein Teil der mesenchymalen Stammzellen direkt in Endothelzellen (Reyes, Dudek et al. 2002; Oswald, Boxberger et al. 2004) oder in Perizyten umwandeln können (Rajantie, Ilmonen et al. 2004). Neuere Theorien gehen sogar von der umgekehrten Annahme aus, dass mesenchymale Stammzellen gar von der Familie der Perizyten abstammen. Dies sollen Untersuchungen einiger Perizyten hinsichtlich Differenzierungsfähigkeit und Oberflächenmarker – ähnlich zu mesenchymalen Stammzellen – beweisen (Crisan et al. 2008; Caplan 2017). Die Ausbildung neuer Blutgefäße fördert das Tumorwachstum in jeglicher Hinsicht: Das Tumorgewebe wird dadurch mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt und der Weg zur Ausbreitung einzelner Karzinomzellen in andere Körperregionen geebnet.

Ein anderer Schlüsselfaktor zur Metastasierung ist die Erlangung der Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT), durch die die Zellen ihre Morphologie und Polarität verlieren und mobil werden können (Chen, Zimmermann et al. 2013). Typische epithelartige Eigenschaften wie stabile Zell-Zell-Kontakte oder die Expression von Zytoskelettprotein-Mustern werden während der Transition abgelegt, sodass sich mesenchymartige Zellen bilden. Dies ermöglicht eine verbesserte Migration, Invasivität, erhöhte Resistenz der Apoptose und erhöhte Ausschüttung von Extrazellulärmatrix (Kalluri and Neilson 2003). Während der Organogenese in der embryologischen Entwicklung oder der Wundheilung ist EMT von enormer Bedeutung. Doch auch für diverse Tumore wurde dieses Phänomen beschrieben. Martin et al. haben in einer Studie über Brustkrebszellen in Co-Kultur mit mesenchymalen Stammzellen eine signifikante Erhöhung EMT-spezifischer Gene für die Proteine N-cadherin, vimentin, twist und snail, und eine Verminderung von Epithel spezifischen Genen für das Protein E-cadherin herausgefunden (Martin et al. 2010). Auch andere Forschungsgruppen konnten solche Beobachtungen bestätigen (Jouppila-Matto et al. 2011; Yu et al. 2012). Scherzad et al. verzeichneten in einem Co-Kultur-Modell zwischen der Tumorzelllinie HLaC78 und mesenchymalen Stammzellen eine verbesserte

Zellmotilität und Invasionsfähigkeit (Scherzad et al. 2013). Dies scheint u. a. in Zusammenhang mit einer erhöhten Sekretion von IL-6 zu stehen (Scherzad et al. 2015). Unabhängig davon konnten in einer anderen Arbeit sogar Assoziationen mit erhöhter Tumoraggressivität und vermehrten Lymphknotenmetastasen festgestellt werden (Mandal et al. 2008). Somit besteht der dringende Verdacht, dass mesenchymale Stammzellen die Fähigkeit haben, ihre spezifischen Eigenschaften an ihr Umgebungsgewebe abzugeben. Böhrnsen et al. haben jedoch mit Kopf-Hals-Plattenepitelkarzinomzellen der Zelllinie PCI-13 eine gegenteilige Entdeckung machen können: Drei von vier EMT-Markern (Wnt3, MMP14, ß-catenin) sind während einer Co-Kultur zwischen PCI-13 Zellen und mesenchymaler Stammzellen herunterreguliert worden, sodass eine Epithelial-Mesenchymale Transition in den Tumorzellen supprimiert wurde (Böhrnsen et al. 2015). Gerade anhand dieser Forschungsergebnisse, bei denen mit sehr ähnlichen Tumorzelllinien gearbeitet wurde, wird die Widersprüchlichkeit der Interaktion sehr deutlich.

Eine tragende Rolle in der Förderung seines Wachstums hat vor allem auch das umgebende Milieu und Gewebe eines Tumors (Koontongkaew 2013). Dieses besteht vorwiegend aus Tumor-assoziierten Fibroblasten (Cancer-associated fibroblasts = CAFs), endothelialen Zellen, Perizyten, Adipozyten und Immunzellen (Albini and Sporn 2007) sowie Krebsstammzellen (Hanahan and Weinberg 2011). Quante et al. fanden heraus, dass mesenchymale Stammzellen in der Lage sind, sich zu Tumor-assoziierten Fibroblasten oder Myofibroblasten zu differenzieren. Mindestens 20% der CAFs in einem Magenkarzinom eines Mausmodells hätten den Ursprung mesenchymaler Knochenmarkstammzellen. Durch Sekretion von TGF-ß und SDF-1α seitens des Tumors werden sie rekrutiert und tragen ihrerseits durch Ausschüttung von IL-6, Wnt5α und BMP4 direkt zum Tumorwachstum bei (Quante, Tu et al. 2011). Neben anderen ausgeschütteten Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren wurde die Stimulation des Wachstums durch SDF-1α dabei auch in anderen Studien vermehrt beschrieben (Orimo et al. 2005; Kansy, Dißmann et al. 2014). Bestätigende Ergebnisse zu Knochenmarkstammzellursprüngen im Tumor-Stroma fanden Forscher unter anderem auch während Untersuchungen

an Tumor-assoziierten Fibroblasten in Brust- und Ovarialkarzinomen im Mausmodell (Kidd et al. 2012) sowie auch in Plattenepithelkarzinomen in Kopf und Hals (Kansy, Dißmann et al. 2014; Liotta, Querci et al. 2015). Liotta et al. beschreiben sogar eine direkte Korrelation zwischen der Frequenz des Wachstums des tumorassoziierten Gewebes und des Tumors selbst (Liotta, Querci et al. 2015). Andererseits entdeckten Li et al. einen Unterschied bezüglich der Tumorprogression zwischen mesenchymalen Stammzellen im unmittelbaren Tumorumgebungsgewebe von Magenkarzinomen und mesenchymalen Stammzellen direkt aus dem Knochenmark, die vor den Versuchen kein Bestandteil des Tumorumgebungsmilieus waren. Die mesenchymalen Stammzellen aus dem direkten Tumorumgebungsgewebe trugen zu einem effizienteren Wachstum bei, während die mesenchymalen Stammzellen direkt aus dem Knochenmark offenbar zu einer verminderten Proliferation führten (Li et al. 2015).

### 1.3.2 Hemmende Einflüsse von mesenchymalen Stammzellen auf Tumorzellen

Die bisherigen Erkenntnisse von Tumorzell-Inhibierung beruhen im Wesentlichen auf der Herunterregulierung zweier überlebenswichtiger Signalwege mit Assoziation zu mesenchymalen Stammzellen: Dem Wingless-type- und dem Akt-Weg.

Wingless-type (Wnt) Proteine spielen eine Rolle in der Zellproliferation, -migration und -polarität und in der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen und Tumorzellen (Rao and Kuhl 2010). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine Inhibition der Tumorproliferation oder auch Verminderung von Metastasen durch mesenchymale Stammzellen mit der Herunterregulierung der Wnt-Signal-Gene korrelieren (Qiao et al. 2008a; Qiao et al. 2008b; Zhu et al. 2009; Meleshina et al. 2015).

Die Serin-Threonin-Kinase Akt oder auch Protein-Kinase B (PKB) genannt, ist bedeutend für die Zellzyklus-Progression, für das Überleben sowie für die Migration und den Metabolismus der Zelle (Kandel and Hay 1999). In

verschiedenen Forschungsmodellen wurden Herunterregulierungen des Akt-Signalweges und dadurch zustande kommende Apoptose und antitumoröse Effekte durch mesenchymale Stammzellen beschrieben (Khakoo et al. 2006; Ma et al. 2012; Liu et al. 2013).

Neben der Beeinflussung und Tumorhemmung über die beiden oben beschriebenen Signalwege wurde eine Tumorhemmung durch mesenchymale Stammzellen jedoch auch anderweitig beschrieben. Eine mögliche Erklärung sei auch noch die Stammzell-induzierte Herunterregulierung des Transkriptionsfaktors NF-κB, der u. a. für Zellproliferation, Karzinogenese und den Zelltod mit beteiligt ist (Qiao et al. 2008c).

### 1.3.3 Klinische Relevanz

Mesenchymale Stammzellen sind Gegenstand von vielerlei klinischen Forschungsprojekten aufgrund ihrer zahlreichen Fähigkeiten, wie die Differenzierung in verschiedene Gewebe, die Beeinflussung des Immunsystems und die Migration zu verletztem oder entzündetem Gewebe mit Förderung der Wundheilung. So wurden sie unter anderem bereits zur Findung von Therapieansätzen durch Tissue Engineering bei Rückenmarksverletzungen (Kim et al. 2013a), kardiovaskulären Erkrankungen (Carvalho et al. 2013) oder Knochen- (Di Bella et al. 2008) und Knorpelschäden (Bulman et al. 2013) benutzt. Aber auch im Hinblick auf Immunerkrankungen (Cipriani et al. 2013) und Graft-versus-Host-Reaktion während Knochenmarkstransplantationen (Kim et al. 2013b) spielen mesenchymale Stammzellen eine wichtige Rolle.

Krebs ist nach wie vor einer der häufigsten Todesursachen in Deutschland nach Herzkreislauferkrankungen. Plattenepithelkarzinome von Kopf und Hals stehen an sechster Stelle der häufigsten Krebsarten weltweit. Als Therapieoptionen stehen im Wesentlichen die chirurgische Entfernung, Chemotherapie und Bestrahlung zur Verfügung, wobei die Chemotherapie allein nur einen palliativen Stellenwert hat und keine heilende Wirkung. Trotzdem kommt es bei 40 – 60% der Patienten zu lokalen Rezidiven oder Fernmetastasen (Prestwich et al. 2011). Nicht nur diese geringe Erfolgsrate, sondern auch die Nebenwirkungen

bisheriger Behandlungsmethoden sind eine Motivation, dringend nach alternativen Therapien zu suchen, die den Tumor im besten Falle auch spezifischer angreifen. Ein möglicher Ansatz zu diesen Überlegungen ist eine zellbasierte zielgerichtet und selektive Freisetzung von Pharmaka. Um solch ein Ziel umsetzen zu können, benötigt man Zellen, die über ein hohes Maß an Affinität zum entsprechenden Zielgewebe verfügen. Dieses Maß scheinen mesenchymale Stammzellen aufgrund ihres Tumortropismus zu bieten (Kidd, Spaeth et al. 2009). Sie scheinen sogar die Fähigkeit zu haben, sich direkt in tumoröses Gewebe zu integrieren (Kidd et al. 2010).

Eine wichtige Rolle spielen die von mesenchymalen Stammzellen ausgeschütteten Exosome, deren Inhalt die metabolische Aktivität des Tumors und seine Umgebung verändern kann (Yang et al. 2015a; Yang et al. 2015b). Shi et al. beobachteten eine Expression von EMT-Markern auf nasopharyngealen Tumorzellen nach Inkubation mit von mesenchymalen Stammzellen stammenden Exosomen (Shi et al. 2016). Dieses Phänomen könnte man sich zu Nutze machen, um gezielt mit Medikamenten den Tumor zu unterdrücken.

Eine weitere Möglichkeit ist die Transferierung vektorbasierter Gensequenzen bestimmter antitumoröser Proteine in mesenchymalen Stammzellen. Beispielsweise wurde in einem Mausmodell über einen Vektor die humane IFN-ß-Kodierungssequenz den mesenchymalen Stammzellen zugeführt und anschließend die Zellen in an Prostatakarzinom leidenden Mäusen übertragen. Es konnte eine verringerte Tumorgröße und -zellproliferation sowie eine erhöhte Tumorzell-Apoptoserate und Aktivität der natürlichen Killerzellen beobachtet werden (Ren et al. 2008). Ähnliche Ergebnisse gibt es auch für das Zytokin TRAIL, ein Protein, das zu der TNF-Familie (Tumor Nekrose Faktor) gehört (Loebinger et al. 2009) und für IL-12 (Chen et al. 2006).

Andere Ideen beziehen sich auf die pharmakologische Unterdrückung der von mesenchymalen Stammzellen vermittelten Immunregulation, entweder in Form von gezielter Inhibierung der Immunsystemsuppression und dadurch folgender Inhibierung der Tumorproliferationsförderung, oder in spezifischer Abtötung von

tumorassoziierten Stammzellen und Umgebungsgewebe, oder in einer Umkehr von Immununterdrückung in Immunstimulation (Poggi and Giuliani 2016).

Bevor solche Schritte jedoch geplant werden, muss zunächst das Basiswissen über mesenchymale Stammzellen erarbeitet werden, d. h. unter anderem wie BMSC sich in Gegenwart von Krebszellen verhalten.

## 1.4 Ziele der Arbeit

Die Forschung an der Interaktion zwischen mesenchymalen Stammzellen und Tumorzellen ist noch lange nicht ausgereift und weist erhebliche Widersprüche auf. So war das hauptsächliche Ziel dieser Arbeit herauszufinden, woran diese Kontradiktionen liegen könnten. Eine Überlegung dabei war, dass unterschiedliche Passagen (P) und Oberflächenmarker von Knochenmarksstammzellen (Bone marrow stem cells = BMSC) eine Rolle in der variablen Beeinflussung von Tumorzellen spielen könnten. Für die Umsetzung wurden drei unterschiedliche Stammzellansätze mit mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark kreiert, die anschließend mit den Tumorzellen epithelialer Herkunft (FaDu-Linie) in einem Proliferationsassay mit einer Co-Kultur untersucht wurden. Der erste Ansatz umfasste BMSC der ersten Passage (P1), die besonders dünn ausgesät wurden, der zweite enthielt magnetisch sortierte Stro-1+ BMSC und der dritte enthielt BMSC der Passage 2 (P2).

Der Gedankenansatz, der hinter diesen drei Ansätzen stand, war folgender: Verschiedene Forschungsgruppen haben gezeigt, dass die dünne Aussaat von BMSC mit 1 – 10 Zellen pro $cm^2$ vermeintlich hochproliferative Klone generiert (Digirolamo, Stokes et al. 1999; Colter, Sekiya et al. 2001; Sekiya, Larson et al. 2002). Somit war die Überlegung für den ersten Ansatz, FaDu Zellen mit solchen dünn ausgesäten BMSC zu kultivieren, um zu überprüfen, ob das hochproliferative Verhalten sich möglicherweise auf die FaDu Zellen überträgt.

Zhang et al. haben für Stro-1+ BMSC die Beobachtung gemacht, dass diese – injiziert in Labormäusen – zu einem längeren Überleben von allogenen

Hauttransplantaten führen (Zhang, Zhao et al. 2013). Dies spricht für eine verminderte Immunabwehr des Körpers gegen das Transplantat im Zusammenhang mit Stro-1+ BMSC. Basierend auf diesem Hintergrund war das Ziel vom zweiten Ansatz, eine homogene Gruppe Stro-1+ BMSC zu schaffen, mit der Frage, ob möglicherweise auch ohne Beisein von Immunzellen proliferativ fördernde Wirkungen auf die FaDu Zellen übertragen werden. Folglich wurde der zweite Ansatz mit Stro-1+ BMSC durchgeführt.

Der dritte Ansatz, die Analyse und Co-Kultur mit BMSC der P2, sollte zum einen eine Referenz für die anderen beiden Ansätze darstellen und zum anderen zeigen, ob möglicherweise die Passage (Digirolamo, Stokes et al. 1999) der BMSC zum Zeitpunkt der Versuche eine Rolle in der widersprüchlichen Beeinflussung der FaDu Zellen spielt.

Damit werden Aspekte wie unterschiedliche Passagen, Oberflächenmarker oder vermeintlich hochproliferative Klone mit in die Theorie eingeschlossen.

Nun stellen sich folgende Fragen:

- Haben die unterschiedlichen BMSC generell einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der FaDu Zellen?
- Wenn ja, gibt es Unterschiede hinsichtlich der verschiedenen Merkmale der BMSC (P1 dünn ausgesät, Stro-1+, P2)?

- Wie groß ist die Ausbeute Stro-1+ BMSC nach der Auftrennung einer BMSC-Population?
- Kann die Existenz vermeintlich hochproliferativer Zellen nach dünner Aussaat bestätigt werden?
- Gibt es wesentliche Messunterschiede zwischen den zwei Zählmethoden Casy Zellzählungsgerät und Neubauerkammer?

# 2 MATERIAL UND METHODEN

Im folgenden Kapitel werden die Materialien und Methoden in chronologischer Reihenfolge aufgeführt. Zunächst gilt es die BMSC aus dem Knochen zu isolieren und anschließend zu verifizieren. Ist diese Voraussetzung gegeben, so folgt eine Übersicht des Hauptprojekts mit allen sich anschließenden und zeitlich geordneten weiteren Versuchen. Eine Aufstellung mit allen verwendeten Materialien ist im Anhang zu finden.

## 2.1 Gewinnung humaner mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark

Die Innovation der in dieser Arbeit verwendeten Methode zur Isolierung von BMSC geht auf Haynesworth (Haynesworth, Goshima et al. 1992) zurück und wurde mehrfach modifiziert (Nöth et al. 2002; Schütze et al. 2005). Die mesenchymalen Stammzellen wurden aus dem menschlichen Hüftkopf isoliert, der aus verschiedensten Gründen entfernt wurde. Zu nennen sei hier überwiegend der prothetische Hüftkopfersatz als Folge von Arthrose. Das Forschungsprojekt wurde von der Ethikkommission der Universität Würzburg mit der Genehmigungsnummer 72 / 06 genehmigt.

Nach der operativen Entfernung des Hüftkopfes wurde die extrahierte Spongiosa mit dem angrenzenden Markraum unter sterilen Bedingungen im wissenschaftlichen Labor der Kollegen des König-Ludwig-Hauses der Universitätsklinik Würzburg (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. M. Rudert), aufgearbeitet. Zunächst erfolgte die Überführung der Spongiosa in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland), wobei diese nur maximal bis zur Hälfte befüllt werden sollten. Anschließend wurde jedes Röhrchen auf 50 ml DMEM / Ham's F12 (mit L-Glutamin, ohne weitere Zusätze) (Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 Nutrient Mixture (Ham) (DMEM/F-12)) der Firma Gibco® by life technologies™ GmbH (Darmstadt, Deutschland) für den Waschvorgang aufgefüllt und manuell kräftig geschüttelt, bevor es in der Zentrifuge (Rotina 380 R, Hettich GmbH & Co KG,

Tuttlingen, Deutschland) bei 1200 rpm (Runden pro Minute) für 5 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert wurde. Dabei blieben die BMSC unten haften, während sich die Erythrozyten, Leukozyten sowie weiter hämatopoetische Zellen in dem Gemisch verteilten, sodass der in Phasen aufgebaute Überstand – d. h. zunächst das Fett oben, dann das restliche Medium mittig – mit einer sterilen Serological 10 ml Pipette (Cellstar, Greiner Bio-One GmbH) abgesaugt werden konnte. Nun wurde erneut mit je 50 ml DMEM / Ham's F12 aufgefüllt und geschüttelt, um die Knochen- und Bindegewebsreste sedimentieren zu lassen. Die Zellen befanden sich nun im Überstand. Die Zellsuspension wurde in je ein frisches 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und die letzten beiden Schritte zwei- bis dreimal wiederholt, bis die Spongiosa nicht mehr rot sondern weiß war und die Zellen somit ausgewaschen waren. Die gesammelte Zellsuspension wurde bei 1200 rpm für 5 min abzentrifugiert und der Überstand erneut abgesaugt. Die daraus entstandenen Zellpellets konnten dann in insgesamt 10 – 50 ml Vollmedium DMEM / Ham's F12, versetzt mit 10% FCS (Bio & Sell, Feucht / Nürnberg, Deutschland), 1% Pen Strep (Gibco® by life technologies™ GmbH) und 50 µg / ml Medium L-Ascorbic acid 2-phosphate (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) resuspendiert werden. Das Volumen des Mediums war abhängig von der Größe und der Anzahl der Pellets. Sodann wurden die aufgelösten Pellets in ein Röhrchen vereinigt und nochmals resuspendiert. Aus dem so gereinigten und pelletierten Zellmaterial wurde ein Aliquot Zellsuspension von ca. 200 µl mit einer Abimed Pipette (Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld, Deutschland) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gegeben und eine 1:1000 Verdünnung hergestellt. Hierfür wurden 99 µl PBS (PBS Dulbecco, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) vorgelegt, 1 µl Zellsuspension zugegeben und durch Intervertieren vermischt. Es entstand zunächst eine 1:100 Verdünnung. In ein weiteres 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 50 µl Trypanblau (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und 40 µl PBS vorlegt. Nun mussten 10 µl der 1:100 Verdünnung zugeben und resuspendiert werden, sodass eine 1:1000 Verdünnung entstand. Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Hämozytometers (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, Deutschland) bestimmt

und berechnete sich für 10 µl der 1:1000 Verdünnung in einer Kammer des Hämozytometers wie folgt:

Zellzahl / ml = [Mittelwert aus 3 – 4 Quadraten] x [$10^4$ (Kammerfaktor)] x [$10^3$ (Verdünnungsfaktor)]

Gesamtzellzahl = [Zellzahl / ml] x [Volumen der Zellsuspension]

Idealerweise sollten 1 x $10^9$ Zellen pro 175 $cm^2$ Zellkulturflasche (Greiner Bio-One GmbH) in Vollmedium DMEM / Ham's F12, versetzt mit den Zusätzen, wie oben im Text beschrieben, ausgesät werden. Dafür wurde ein Gesamtvolumen von 27 ml pro 175 $cm^2$ Zellkulturflasche angestrebt. Die Inkubation im Brutschrank F (Heracell™ 240i, Thermo Fisher Scientific Company, Waltham, USA) erfolgte bei 37°C und 5%igen $CO_2$ Anteil. Nach 3 – 4 Tagen wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen (ca. 15 ml pro 175 $cm^2$ Flasche) und mit frischem Vollmedium versetzt. Diese primären gewonnenen BMSC werden als Passage 0 (P0) bezeichnet und wurden solange weiterkultiviert, bis der Inhalt der Flasche eine entsprechende Dichte aufwies. Dies dauerte im Schnitt 2 – 3 Wochen. Anschließend wurden die Zellen im frischen Zustand für die geplanten Versuche weiterverarbeitet, ohne zwischenzeitliche Konservierung im Stickstofftank. Hierfür wurden die Zellen bevorzugt erst ab der P1 eingesetzt, um Verunreinigungen mit anderen Zellsorten zu vermeiden. Das verwendete Medium für die folgenden Versuchsabläufe variiert von dem hier verwendeten Medium.

*Abbildung 1: Hüftkopfknochen unmittelbar aus dem OP*

*Abbildung 2: Aufgesägter Hüftkopf nach dem Auswaschen*

## 2.2 Spender

Die Spender für die geplanten Versuche charakterisierten sich wie folgt: Eingeschlossen waren 6 männliche Spender sowie 5 weibliche Spenderinnen im Alter von 46 bis 76 Jahren. Das Alter bezieht sich auf das Entnahmedatum der BMSC. Die Patienten wurden im Rahmen ihrer Hüft-Erkrankung im König-Ludwig-Haus der Universitätsklinik Würzburg operiert und stimmten nach Aufklärung einer Stammzellspende zu Forschungszwecken zu. Die Einverständniserklärung erfolgte schriftlich.

Die isolierten Zellen wurden auf HIV, Hepatitis B (HBs-Antigen sowie Anti-HBc) und Hepatitis C (Anti-HCV) untersucht. Nur wenn alle Ergebnisse negativ waren sowie auch keine weiteren hämatologisch oder serologisch nachweisbaren Erkrankungen, wie beispielsweise Leukämien oder Autoimmunerkrankungen vorlagen, wurden die BMSC für die Versuche freigegeben. Auch Spender mit Einnahme von Pharmazeutika, die den Knochenmetabolismus betreffen, wurde ausgeschlossen.

*Tabelle 1: Einschlusskriterien: Patientenalter zum Entnahmezeitpunkt und Geschlecht (♂ männlich, ♀ weiblich)*

| Spender | Geschlecht | Alter (in J.) |
|---|---|---|
| 1 | ♂ | 67 |
| 2 | ♀ | 69 |
| 3 | ♂ | 70 |
| 4 | ♀ | 59 |
| 5 | ♂ | 52 |
| 6 | ♀ | 76 |
| 7 | ♂ | 55 |
| 8 | ♀ | 55 |
| 9 | ♀ | 64 |
| 10 | ♂ | 46 |
| 11 | ♂ | 69 |

## 2.3 Durchflusszytometrie

### 2.3.1 Das Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung (FACS-Analyse) genannt erlaubt die Zellen in ihren physikalischen und chemischen Strukturen quantitativ zu vermessen, zu zählen und ggf. auch zu sortieren. Dieses Verfahren ist laserbasiert und beruht auf folgender Theorie: Eine Einzelzellsuspension, markiert mit einem vorgegebenen spezifischen Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper, wandert in Form eines Strahls durch eine hochpräzise Küvette aus Glas oder Quarz mit Detektionsapparat, sodass jede Zelle einzeln und nacheinander den Weg durch das Röhrchen und einen dabei ausgesendeten Laserstrahl passiert. Die maximale Geschwindigkeit ist bis zu tausend Partikel pro Sekunde. Zellen mit einem Durchmesser von 0,2 bis 150 µm streuen dabei Licht, dessen Menge je nach Größe und Komplexität der Zellen variiert. Diese Emission von optischen Signalen beim Passieren des Laserstrahls wird von Detektoren des FACS-Gerätes, angeordnet in verschiedenen Winkeln, aufgenommen. Ein Detektor ist in Richtung des ursprünglichen Laserstrahls ausgerichtet, sodass er das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter = FSC), ein Maß für die Beugung des Lichtes im flachen Winkel, abhängig vom Volumen der Zelle aufnimmt. Ein anderer Detektor misst das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter = SSC) bzw. die Brechung des Lichtes im rechten Winkel und liegt somit auch rechtwinklig zum ursprünglichen Strahl. Diese Brechung wird beeinflusst von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkernes und der Menge der enthaltenen Vesikel. Die Daten werden an ein Auswertungsprogramm weitergeleitet und in Diagrammen dargestellt.

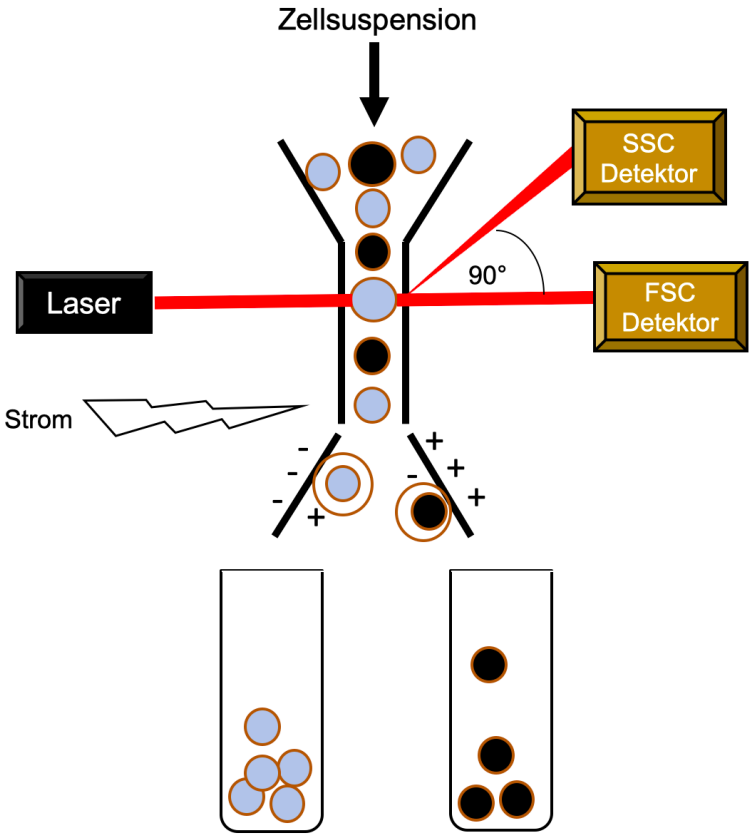



*Abbildung 3: Aufbau eines FACS-Gerätes*
*Mikrokanalküvette mit vereinzelten Zellen (verschiedene Zellen gekennzeichnet durch verschiedene Farben: schwarz, graublau), Laserquelle, Vorwärts (FSC)- und Seitwärtsdetektor (SSC) orthogonal zueinander angeordnet, Stromquelle, elektrisches Feld.*
*Der Laserstrahl trifft auf die mit Fluorochrom besetzen Zellen. Die Emission wird von Detektoren (FSC, SSC) aufgenommen und an ein Auswertungsprogramm weitergeleitet. Somit lassen sich Aussagen über Zelleigenschaften treffen. Gegebenenfalls ist ein elektrostatischer Sortierer angeschlossen, der die Zellen durch einen ladungsversehenen Flüssigkeitstropfen entsprechend auftrennt.*

Um ein optimales Ergebnis zu erzielen, sind sogenannte Fluorochrome von zentraler Bedeutung. Dies sind spezifische Marker von Oberflächenproteinen, die eingestrahlte Energie in Form von Fluoreszenzlicht wieder abgeben. Sie können z. B. über spezifische Antikörper an Proteine angelagert oder kovalent an bestimmte Aminosäuren gekoppelt werden. Außerdem können sie durch Hydrophobizität in Membranen eingelagert oder durch Interkalation an DNA oder doppelsträngige RNA gebunden werden. Jedes Fluorochrom hat charakteristische Wellenlängen. Zu den Standardfluoreszenzfarben gehört

Fluoreszeinisothiozyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridin Chlorophyll (PerCP) und Allophycocyanin (APC).

Neben dem Einsatz in der Grundlagenforschung hat das Prinzip der Durchflusszytometrie vor allem in der Hämatologie, Immunologie und Infektiologie auch klinische Relevanz.

Wie bereits erwähnt sind bestimmte FACS-Geräte auch in der Lage mit Fluorochromen gekoppelte Zellen elektrostatisch zu sortieren. Nach Durchlaufen des Laserstrahls werden die Zellen durch Vibration in kleine Flüssigkeitstropfen verpackt, sodass gerade eine Zelle in einen Tropfen passt. Diese Tropfen sind mit positiven bzw. negativen Ladungen versehen. Ein elektrisches Feld am Ende der Küvette polarisiert die Zellen entsprechend und trennt sie auf (Biosciences 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Identifikation spezifischer Oberflächenmarker mesenchymaler Stammzellen, sog. Cluster of Differentiation (CD) und dem Oberflächenprotein Stro-1 genutzt.

### 2.3.2 Immunphänotypisierung der Bone marrow stem cells anhand ihrer spezifischen Antigene

Da mesenchymale Stammzellen das grundlegende Zellmaterial für diese Arbeit waren, sollten sie zu Beginn auch als solche durch ihre in der Literatur beschriebenen spezifischen Oberflächenmarker charakterisiert werden.

Als Analysegerät stand ein BD FACSCanto™ II flow cytometer (BD Biosiences, Franklin Lakes, NJ, USA) zur Verfügung. Die Berechnungen und Diagramme wurden mit der Software FACSDiva™ (BD Biosciences) Version 5.0.3 erstellt. Das FACS-Gerät inkludiert drei Argonlaser der Wellenlänge 488 nm bis 650 nm. Zur Verifizierung wurden die von der ISCT festgelegten Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 auf eine positive Reaktion überprüft und CD34 und CD45 auf eine negative Reaktion.

*Tabelle 2: Verwendete Antikörper zur Verifizierung der BMSC im FACS-Gerät*

| Antigen | Klon | Isotyp | Fluorchrom | Firma |
|---|---|---|---|---|
| **CD73** Ecto-5'-nucleotidase (NT5E) | AD2 | Mouse IgG1 | PE | BD Biosciences Pharmingen™ |
| **CD90** Thymocyte-1 membrane glycoprotein (THY1) | 5E10 | Mouse IgG1 | APC | BD Biosciences Pharmingen™ |
| **CD105** TGF-ß1receptor complex, Endoglin | 266 | Mouse IgG1 | FITC | BD Biosciences Pharmingen™ |
| **CD34** Hämatopoetischer Stammzellmarker | RAM34 | Rat IgG2a | PE | BD Biosciences Pharmingen™ |
| **CD45** Leukocyte common antigen (LCA) | 30-F11 | Rat IgG2b | FITC | BD Biosciences Pharmingen™ |

Die BMSC wurden zu Beginn mit PBS (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) gewaschen, mit Trypsin (Gibco® by life technologies™ GmbH) vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, mit Medium abgestoppt (DMEM 1x high glucose, Gibco® by life technologies™ GmbH) und im Casy Zellzählungsgerät (Innovatis AG, Reutlingen, Deutschland) gezählt. Pro Probe wurden 2 x $10^5$ Zellen in ein FACS-Röhrchen gegeben (Sarstedt AG & Co, Nürmbrecht, Deutschland) und bei 1400 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge). Durch Dekantieren wurde das flüssige Medium von dem Zellpellet entfernt und eine Mischung aus 1 x PBS und 10%-igem FCS (Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland) zugegeben, die mit dem Pellet gut resuspendiert wurde. Es schließt sich eine einstündige Inkubation auf Eis an. Nun wurde erneut bei 1400 rpm 5 min zentrifugiert und dekantiert. Die Antikörpermenge entsprach den Angaben der Hersteller. Die entsprechende Konzentration der jeweiligen Antikörper wurde in einem Verhältnis von 1:100 mit einer 0,05%-igen Triton X-100 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) angereicherten 1 x PBS Lösung verdünnt. Davon wurden 500 µl zu dem Zellpellet gegeben, resuspendiert und eine Stunde auf Eis inkubiert. Für den Antikörper CD105

schloss sich ein Zwischenschritt ein, da dieser noch nicht FITC-konjugiert war und einen Zweitantikörper (FITC, Alexa Fluor® 488 Goat anti-Mouse IgG, 1:1000, Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) benötigte. Deshalb wurde das Zellpellet hierfür mit PBS gewaschen, zentrifugiert, dekantiert, in 500 µl des 1:100 verdünnten FITC-konjugierten Zweitantikörper resuspendiert und danach noch mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Nach der letzten Inkubation wurden alle Proben mit PBS gewaschen, anschließend zentrifugiert, die Überstände verworfen und das Pellet in 500 µl FACS-Lösung (Cell-Wash, BD Biosciences) resuspendiert. Als Negativkontrolle dienten ungefärbte BMSC. Die Auswertung erfolgte mit den oben genannten technischen Gerätschaften und Programm mit den Einstellungen FSC (250V), SSC (400 V), PE (307 V), APC (500 V), FITC (291 V).

### 2.3.3 Nachweis der Präsenz des Oberflächenmarkers Stro-1 auf Bone marrow stem cells

Eine weitere relevante Anwendung fand das FACS-Gerät im Nachweis der Präsenz des Oberflächenmoleküls Stro-1 auf den in dieser Arbeit verwendeten BMSC. Es wurde getestet, ob der Marker überhaupt in der isolierten Stammzellpopulation vorhanden ist. Dies wurde im Vorfeld mit dem BD FACSCanto™ II flow cytometer für BMSC aus der P1, die nach der Isolierung ganz frisch kultiviert wurden, einmalig geprüft. Der PE-konjugierte monoklonale Antikörper Stro-1, der sich gegen CD34 mesenchymaler Knochenmarkstammzellen richtet, stammte von der Firma Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland). Pro 1 x $10^6$ Zellen wurden 5 µl des Antikörpers hinzugefügt. Ungefärbte Zellen dienten als Negativkontrolle. Die Färbung wurde nach der Methode, die in Kapitel 2.3.2 beschrieben wurde, durchgeführt.

*Tabelle 3: Steckbrief des verwendeter Antikörpers Stro-1*

| Antigen | Klon | Isotyp | Fluorchrom | Firma |
|---|---|---|---|---|
| **CD34**<br>Stro-1 (75 kDa Endothelial Antigen) | Stro-1 | Mouse IgM | PE | Santa Cruz Biotechnology |

## 2.4 Differenzierungspotenzial der Bone marrow stem cells

Mesenchymale Stammzellen sind in der Lage, sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren. Laut der ISCT ist ein Kriterium die Differenzierungsfähigkeit in Knochen-, Fett- und Knorpelgewebe. In der vorliegenden Arbeit wurden die aus dem Knochenmark isolierten mesenchymalen Stammzellen auf die Differenzierungsfähigkeit in Knochen- und Fettgewebe untersucht. Für die Zellkultivierung, -ablösung und -zählung gelten die Vorgehensweisen, die in den jeweiligen Kapiteln im weiterführenden Text beschrieben sind. Die Differenzierungsversuche wurden mit BMSC der P3 durchgeführt. Als erster Schritt zur Vorbereitung der Färbungen wurden die BMSC abgelöst und gezählt. Es wurden jeweils 2 x $10^4$ Zellen auf die Mulden einer 4-Wellplatte (Greiner Bio-One GmbH) verteilt und mit 100 µl adipogenen oder osteogenen Differenzierungsmedium kultiviert (Tabelle 4, Tabelle 5). Die Zusammensetzung der Medien basiert auf einem Protokoll, das von der Forschungsgruppe Pittenger et al. (Pittenger, Mackay et al. 1999) beschrieben wurde. Pro Differenzierung in adipogene bzw. osteogene Zellen wurde je eine 4-Wellplatte vorbereitet. Als Negativkontrolle wurden undifferenzierte Zellen auf eine 4-Wellplatte verteilt und in normalem Expansionsmedium (DMEM) kultiviert.

### 2.4.1 Osteogene Differenzierung

Nach der Verteilung der BMSC auf die 4-Wellplatte wurde zur Induktion der Differenzierung nach einem Tag je 100 µl eines speziell zusammengesetzten Mediums (Tabelle 4) zur Kultivierung zugefügt und im Brutschrank ($CO_2$ Inkubator NU5500E, NuAire INC., Plymouth, MA, USA) bei 37°C und 5% $CO_2$ inkubiert. Die Stimulierung erfolgte über einen Zeitraum von 28 Tagen, wobei das Medium jeden zweiten Tag gewechselt wurde.

*Tabelle 4: Zusammensetzung des Osteogenen Differenzierungsmediums*

| Komponenten des Differenzierungsmediums | Endkonzentration |
|---|---|
| DMEM High Glucose (4,5 g/l)<br>FCS<br>Penicillin / Streptomycin | 89%<br>10%<br>1% |
| Dexamethason | 100 nM |
| ß-Glycerophosphat | 10 mM |
| L-Ascorbinsäure-2-phosphat | 50 µg/ml |

Nach Ablauf des Zeitraums wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 100 µl 4%-igem Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) zur Aufbereitung für den histologischen Nachweis von Knochenbildung fixiert. Dies gelang mit Hilfe der Von Kossa-Färbung, die Kalziumablagerungen schwarz anfärbt und sich aus 1% Silbernitratlösung ($AgNO_3$), 5% Natriumthiosulfat und 0,1% Kernechtrot-Lösung zusammensetzt. Das Prinzip dieser Färbemethode beruht auf dem Austausch der im Gewebe bzw. in der Probe vorkommenden Kalziumionen, die an Phosphat gebunden sind, durch Silberionen. Unter der Einwirkung von UV-Licht werden die neu entstandenen Silberphosphate fotochemisch abgebaut, sodass sich metallische Silberniederschläge beobachten lassen, die dann als braun-schwarze Ablagerungen zu erkennen sind. Zur Hervorhebung der Zellkerne wird eine Gegenfärbung mit Kernechtrot vorgenommen. Nun erscheinen Kerne rot, das Zytoplasma rosa und Kalziumablagerungen schwarz.

Demzufolge wurde das fixierte Präparat zunächst mit 1%-iger Silbernitratlösung (Carl Roth GmbH + Co KG Karlsruhe, Deutschland) bedeckt und unter der UV-Lampe (Desaga, Heidelberg, Deutschland) 30 min inkubiert. Im Anschluss wurde mit destilliertem Wasser gewaschen und für 5 min mit dem 5%-igen Natriumthiosulfat (Merck) fixiert. Sodann erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit 0,1%-igem Kernechtrot. Diese wurde aus 5 g Aluminiumsulfat (Merck) gelöst in 100 ml erhitztem destilliertem Wasser und 0,1 g Kernechtrot (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) hergestellt. Zuletzt wurden die gefärbten Zellen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (EtOH) (70%, 90% und 100%) für 2 min dehydriert und mit Entellan (Merck) eingedeckelt.

### 2.4.2 Adipogene Differenzierung

Auch der Ansatz für die adipogene Differenzierung wurde nach einem Tag mit einem speziellen Medium versetzt (Tabelle 5). Die stimulierende Kultivierung (37°C, 5% $CO_2$) zog sich über einen Zeitraum von 14 Tagen. Der Mediumwechsel erfolgte ebenfalls jeden zweiten Tag.

*Tabelle 5: Zusammensetzung des Adipogenen Differenzierungsmediums*

| Komponenten des Differenzierungsmediums | Endkonzentration |
|---|---|
| DMEM High Glucose (4,5 g/l)<br>FCS<br>Penicillin / Streptomycin | 89%<br>10%<br>1% |
| Dexamethason | 1 µM |
| 3-Methyl-1-Isobutylxanthin | 500 µM |
| Indomethacin | 100 µM |
| Insulin | 1 µg/ml |

Nach 14 Tagen wurden die BMSC zunächst mit Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit der Oil Red O-Färbung angefärbt. Der Farbstoff gehört zu den fettlöslichen Azofarbstoffen mit rötlicher Färbung und wird vorwiegend zur Darstellung von Triglyzeriden eingesetzt. Für die Herstellung der 0,5%-igen Oil Red O-Lösung werden 0,5 g Oil Red O (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in 100 ml Propylenglycol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) bei 95°C erhitzt und anschließend filtriert. Vor der Färbung wurde die Lösung auf 60°C erwärmt. Es folgten drei Waschgänge der Zellen mit destilliertem Wasser und anschließend eine 5-minütige Einwirkung mit 100%-igem Propylenglycol, das auf das Präparat geträufelt wurde. Dieses wurde nach abgelaufener Zeit mit der auf 60°C erwärmten Oil Red O-Lösung ersetzt und das Präparat zur 10-minütigen Anfärbung bei ebenfalls 60°C in den Inkubator gestellt. Danach wurden die Zellen mit 85%-igem Propylenglycol (85 ml Propylenglycol und 15 ml destilliertes Wasser) beträufelt und dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Gegenfärbung der Kerne wurde für 30 s Mayers-Hematoxylin-Lösung (Merck) zugegeben. Damit die Schnitte nicht trocknen und dadurch die Lipide platzen könnten, wurde ein letztes Mal PBS hinzugefügt. Die Lipide erscheinen nun rot und die Zellkerne blau.

## 2.5 Übersicht des Projekts und Versuchsaufbau mit Einteilung der Bone marrow stem cells in drei verschiedenen Ansätze

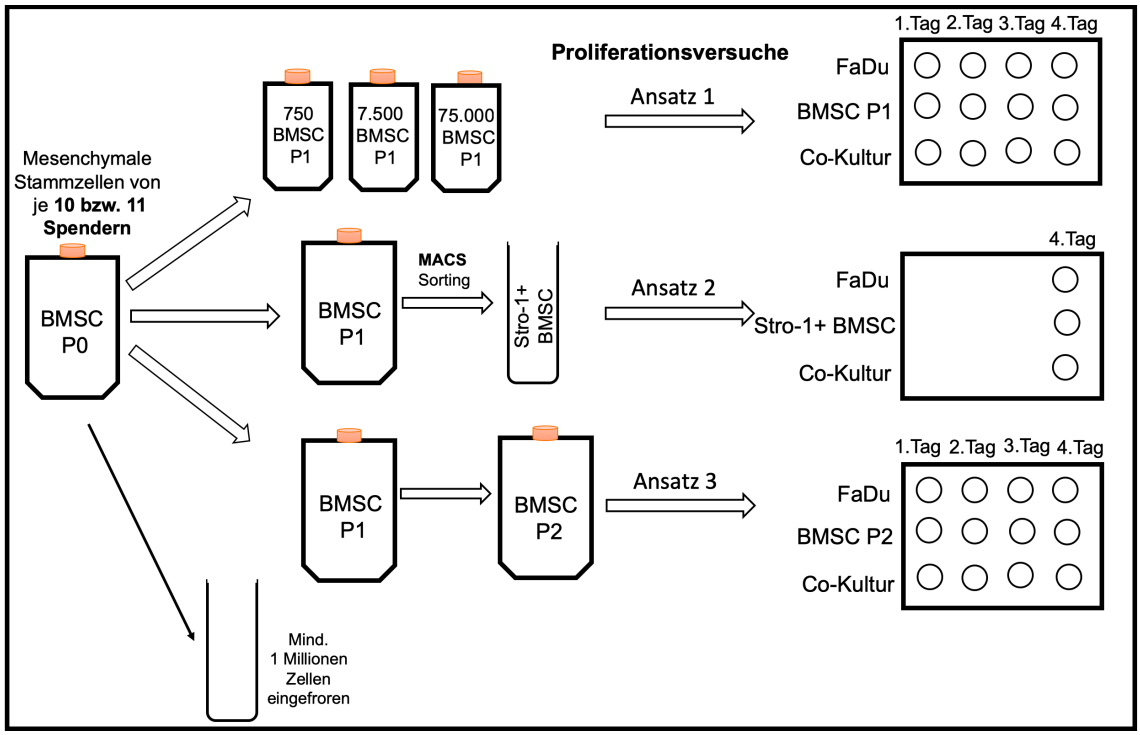



*Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes*
*Die BMSC, die von je 10 – 11 Spendern aus dem Knochenmark isoliert und expandiert wurden (P0), wurden auf 3 verschiedene Versuchsansätze mit unterschiedlichen Voraussetzungen aufgeteilt und anschließend in Proliferationsversuche zusammen mit epithelialen Tumorzellen des Hypopharynx (FaDu) auf 12-Wellplatten eingeschleust.*

Nachdem die BMSC aus dem Knochenmark isoliert wurden, wurden sie zunächst in der P0 weiter kultiviert und expandiert, bis die Flasche eine gewisse Konfluenz aufwies. Anschließend wurden die Zellen abgelöst und auf drei verschiedene Ansätze verteilt. Daneben wurde der überbleibende Rest der Zellen im Stickstofftank (-196°Grad, Air liquide Division Materiel Cryogenique, Marne-la-Vallée, Frankreich) kryokonserviert.

In einem ersten Ansatz wurde ein Teil der abgelösten Zellen in 75 $cm^2$ Kulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH) besonders dünn ausgesät. Nach Digirolamo et al. wären mesenchymale Stammzellen, die mit einer Dichte von 10 Zellen / $cm^2$ ausgesät werden, hochproliferativ (Digirolamo, Stokes et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Gedanke durch drei

unterschiedliche Dichtegrade, die sich jeweils um eine Zehnerpotenz unterscheiden, ausgeweitet. Demnach wurde je eine Flasche mittlerer Größe mit 750, mit 7.500 und mit 75.000 ausgesäten Zellen zur primären Beobachtung angefertigt. Die Flasche, die die beste Zellkonfluenz aufwies, wurde anschließend für den weiteren Versuch eingesetzt. Dabei lag die Präferenz immer auf der möglichst am dünnsten ausgesäten Flasche, sofern die Zellen eine vielversprechende Konfluenz aufwiesen. Dies wurde mittels Mikroskop (Fluoreszenzmikroskop Leica, Typ DMI 4000 B, Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) regelmäßig registriert und dokumentiert. Die BMSC dieses Ansatzes wurden in P1 kultiviert, bis sie für den folgenden Versuch eingesetzt wurden.

In einem nächsten Schritt erfolgte eine Proliferationsanalyse. Hierfür wurden die Zellen abgelöst und mittels zwei verschiedener Methoden gezählt. Die erste Zählung erfolgte unter Verwendung des automatisierten Zellzählungsgerätes Casy (Innovatis AG), die zweite via Neubauerkammer (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG). Anschließend wurden die BMSC auf 12-Wellplatten der Firma Corning Incorporated zusammen mit humanen Hypopharynxkarzinomzellen (FaDu, ATCC® HTB-43™, LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland) verteilt. Die FaDu Zellen wurden auf die gleichen beiden Weisen gezählt wie die BMSC. In der ersten Viererreihe der Wellplatte wurden je 20.000 FaDu Zellen pipettiert, in der zweiten Viererreihe je 20.000 BMSC und in der letzten Reihe wurde eine Co-Kultur ausgesät. Dafür wurden je 20.000 FaDu Zellen auf die Grundplatte gegeben und 20.000 BMSC auf ein hinzugefügtes Transwell. Die Mengenberechnung der Zellaussaat richtete sich nach den Zählsummen der Neubauerkammerwerte. Nun wurden die Zellen in den einzelnen Wells täglich von Tag 1 bis Tag 4 nach der Aussaat gezählt. Diese Proliferationsanalyse erfolgte ebenfalls mit den bereits genannten zwei verschiedenen Zählmethoden.

Im zweiten Ansatz wurde ein weiterer Teil der abgelösten Zellen (500.000 Zellen) der Ursprungsflasche in eine große Zellkulturflasche (175 $cm^2$) (Greiner Bio-One GmbH) überführt und kultiviert. Bei entsprechender Dichte wurden diese Zellen abgelöst, mit Neubauerkammer und Casy Zellzählungsgerät gezählt und

schließlich mit Hilfe einer magnetischen Zellsortierung (MACS) nach dem Oberflächenmarker Stro-1 aufgetrennt. Die Stro-1+ BMSC wurden auf ähnliche Vorgehensweise mit FaDu Zellen in den Proliferationsversuch eingeschleust und anschließend ausgewertet, wie bereits für den ersten Ansatz beschrieben. Eine entscheidende Ausnahme stellte die einmalige Zählung dar, die an Tag 4 nach der Aussaat stattfand, da aufgrund des geringen Ertrags von Stro-1+ BMSC nach dem Sortieren für eine tägliche Zählung nicht genügend Zellen zur Verfügung standen.

Für den dritten Ansatz wurden erneut 500.000 BMSC aus der Ursprungsflasche in eine 175 $cm^2$ Zellkulturflasche ausgesät und bis zur P2 weiterkultiviert. Im Anschluss erfolgte die Proliferationsanalyse mit FaDu Zellen wie oben im Text für Ansatz 1 beschrieben.

Im Weiteren wird nun nur noch von den Ansätzen 1 – 3 geschrieben.

Die Versuche wurden für Ansatz 1 und 3 jeweils mit BMSC von 11 verschiedenen Spendern und für Ansatz 2 mit BMSC von 10 verschiedenen Spendern durchgeführt. Die Plattenepithelkarzinomzellen wurden im Stickstofftank kryokonserviert, für die Versuche aufgetaut und über mehrere Passagen kultiviert. Somit variierte die Passage der FaDu Zellen je nach Versuch stark.

## 2.6 Kultivierung der Zellen

### 2.6.1 Zellkultur der Bone marrow stem cells

Die BMSC wurden in belüfteten, aus Polysterol gefertigten Monolayer-Zellkulturflaschen der Größen 75 $cm^2$ und 175 $cm^2$ angezüchtet und expandiert. Dabei wurden für die Ansätze mit der benötigten Ausgangsdichte von 500.000 Zellen die größeren Flaschen (175 $cm^2$) gewählt, während für den dünn ausgesäten Ansatz mit 750-, 7.500-, und 75.000 ausgesäten Zellen die mittlere Flasche (75 $cm^2$) bevorzugt wurde. Die Züchtung fand in einem Brutschrank bei 37°C in einer 5%igen $CO_2$-Atmosphäre und 100% Luftfeuchtigkeit statt. Als Nährmedium, das je nach Flaschengröße ein Gesamtvolumen von 12 ml bzw.

22 ml ausmachte, diente Dulbecco's Modified Eagle Medium 1x high glucose (DMEM). Diesem wurde 10%iges fötales Kälberserum (FCS, Linaris) sowie 1% Penicillin und 1% Streptomycin (Biochrom AG) zugefügt. Ferner wurden die BMSC in regelmäßigen Abständen mikroskopisch (Mikroskop, DMIL LED, Leica Microsystems GmbH) auf Zellproliferation, Konfluenz und Kontamination untersucht. Zweimal wöchentlich fand ein Wechsel des Expansionsmediums statt, das vor dem Einsatz im Wasserbad (Typ: WNB 22, Memmert GmbH + Co KG, Schwabach, Deutschland) auf etwa 37°C erwärmt wurde. Nicht adhärente Zellen und Detritus wurden dabei abgesaugt. Es wurde stets mit frischen BMSC gearbeitet, die direkt aus dem Knochenmark isoliert wurden und keine zwischenzeitliche Konservierung im Stickstoff erfahren hatten.

### 2.6.2 Zellkultur der Zelllinie FaDu

Die FaDu Zellen wurden nach dem Auftauen in 75 $cm^2$ großen Monolayer-Kulturflaschen mit variierend ausgesäten Zellzahlen expandiert. Der Inkubator gleicht dem der BMSC (2.4.1). Das verwendete Medium RPMI 1640 mit stabilem Glutamin, versetzt mit 10% FCS (Linaris) sowie je 1% Penicillin, Streptomycin, Pyruvat und Nicht-essentielle Aminosäuren (alle Biochrom AG), von dem 12 ml pro Flasche hinzugefügt wurde, stammte von der Firma Biochrom AG. Es wurde dreimal pro Woche gewechselt.

### 2.6.3 Ablösung und Passagierung der Zellen

Nach der Isolierung aus dem Ursprungsgewebe und anschließender Anzucht in Kulturflaschen, befinden sich die Zellen in P0. Erst nach Ablösung und erneuter Aussaat setzen sich die Passagen fort. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Hauptversuche innerhalb der BMSC Zelllinie mit niedrigen Passagen gearbeitet, die nicht über die P2 hinausreichten, während die Passagen der FaDu-Zelllinie im Bereich von P23 bis P68 variierten.

Wiesen die Zellen eine ausreichende Konfluenz von ca. 80% auf, so wurden sie nach Entfernung des alten Mediums mit Hilfe von Pasteurpipetten (Brand GmbH + Co, Wertheim, Deutschland) (Absaugpumpe, A. Hartenstein GmbH,

Würzburg, Deutschland) mit ca. 5 ml PBS gespült, um alle Mediumreste zu entfernen. Im Anschluss wurden 3 bzw. 4 ml – je nach Flaschengröße – 0,25%iges Trypsin mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Gibco® by life technologiesTM GmbH) hinzugefügt und die Kultur für 5 min im Brutschrank bei 37°C und 5% CO2 zur Ablösung der Zellen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die enzymatische Wirkung des Trypsins mit 10 ml Expansionsmedium abgestoppt und gründlich resuspendiert, bevor die entstandene Zellsuspension in ein 15 ml Falcon-Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH) überführt wurde. Nun gab es zwei verschiedene Vorgehensweisen zur Vorbereitung der Zellzählung, je nachdem welcher Versuchsschritt als nächstes folgte.

Im Falle einer Passagierung wurde aus der Zellsuspension bei BMSC 100 µl, bei FaDu Zellen wegen der hohen Dichte nur 50 µl, mit einer Pipette zur Zellzählung entnommen und in 10 ml Casy Ton-Lösung (Innovatis AG) hinein pipettiert. Es folgte die automatisierte Zählung. Die errechnete und gewünschte Zellsuspensionsmenge plus je nach Flaschengröße 12 bis 22 ml des Expansionsmediums wurden sodann in eine neue Monolayer Zellkulturflasche gegeben und geschwenkt, sodass der Boden genügend bedeckt war.

Wurden die Zellen für eine anschließende Proliferationsanalyse benötigt, so wurden sie zunächst in einer Eppendorf Zentrifuge (5810 R) bei RT und 1600 rpm 10 min lang zentrifugiert und das daraus entstandene Pellet in 1 – 4 ml Medium suspendiert. Dabei wurden die BMSC überwiegend in 1 bis max. 2 ml Medium aufgenommen, während die FaDu Zellen je nach Pelletgröße in etwas mehr Medium vermengt wurden. Aus diesem kleineren Volumen wurde dann wieder 50 bzw. 100 µl Suspension für die Zählung in Casy Zellzählungsgerät entnommen sowie 10 µl für die Zählung in der Neubauerkammer.

Dieses im Text oben beschriebene Vorgehen zum Splitten der Zellen wurde in dieser Versuchsreihe zum einen dafür verwendet, um die FaDu Zellen und auch BMSC bei Bedarf weiter zu passagieren, und zum anderen, um die BMSC der P0 auf die verschiedenen Ansätze für die weiterführenden Versuche zu verteilen. Dabei wurden im ersten Ansatz drei mittlere Kulturflaschen mit variierenden

Dichteabstufungen besonders dünn ausgesät, im zweiten Ansatz eine große Flasche für die nachstehende Zellsortierung angefertigt und im dritten Ansatz wurde eine große Flasche zur weiteren Passagierung bis P2 vorbereitet.

Die grundlegende Methode des Ablösens fand zudem u. a. vor der Aussaat der Zellen auf 12-Wellplatten und vor der Auszählung der Proliferation regelmäßigen Einsatz.

### 2.6.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die nach der Verteilung auf die drei Ansätze übrig gebliebenen Zellen aus der Flasche der unmittelbar isolierten und expandierten BMSC (P0), wurden in flüssigem Stickstoff bei -196°C haltbar aufbewahrt. Die epithelialen Tumorzellen wurden dort ebenfalls konserviert und bei Bedarf aufgetaut. Voraussetzung für diese Kryokonservierung war zunächst das Ablösen und Zählen der Zellen, wie in den oberen Kapiteln beschrieben (2.6.3). Pro Einfrierröhrchen wurden 1 x $10^6$ Zellen in einem Milliliter Einfriermedium aufgelöst. Diese Menge an Zellen wurde in ein steriles 15 ml Falconröhrchen überführt und zentrifugiert (1600 rpm, RT, 10 min). Der Überstand wurde abgesaugt und das verbliebene Sediment in einem Milliliter eines Einfriergemisches aus FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) aufgenommen. Anschließend wurde die Suspension in ein Kryoröhrchen (Nalgene® Labware, Roskilde, Dänemark) pipettiert, das in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter (Nalgene® Labware) für die nächsten 24 Stunden bei -80°C (Modell ProfiLine ECU 5085-5, National Lab GmbH, Mölln, Deutschland) gelagert wird. Nach einem Tag wurde das Kryoröhrchen in den Stickstofftank (Air liquide Division Materiel Cryogenique) überführt.

DMSO dient als Gefrierschutzmittel während des Einfrierprozesses, indem es die Bildung von Eiskristallen verhindert. Ein weiteres Hilfsmittel hinsichtlich dieses Aspektes ist das schrittweise und kontrollierte Einfrieren der Zellen zunächst bei -80°C und in einem Behälter, der mit Isopropanol gefüllt ist. Es ermöglicht einen konstanten Temperaturabfall von 1° Grad pro Minute und verhindert ebenso die Bildung zellschädigender Eiskristalle.

Für das Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen kurz im 37°C warmen Wasserbad erwärmt und in 1 ml, den Zellen entsprechendem Medium, aufgenommen. Auch hier galt RPMI für FaDu und DMEM für BMSC. Damit wurden die Zellen dann in je ein 15 ml Röhrchen, das mit 10 ml Medium versehen ist, pipettiert. Es erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 1600 rpm und RT. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 5 – 10 ml Medium, je nach Pelletgröße aufgelöst und in eine entsprechend große Zellkulturflasche mit entsprechend vorgelegter Medium-Menge hinein pipettiert (2.6).

## 2.7 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Die Zellzählung und Vitalitätsbestimmung für diese Arbeit stützte sich auf zwei wesentliche Methoden: Die Zählung mit dem automatisierten Zellzählgerät Casy und mit der Neubauerkammer inklusive des Trypanblauversuches unter dem Mikroskop. Wurde eine Kultur neu passagiert und auf neue Flaschen verteilt, oder war beispielsweise vor dem Versuch der Zellseparation zur Gewinnung Stro-1+ BMSC eine Zählung zur Bestimmung der Ausgangssituation notwendig, so wurden die Zellen immer mit dem Casy Zellzählungsgerät gezählt. Dagegen wurde sowohl die Zählung in der Neubauerkammer als auch mit dem Casy Zellzählungsgerät vorgenommen, wenn die Zellen für den Proliferationstest ausgesät bzw. geerntet wurden. Für spezielle Fälle sei auf die entsprechenden Kapitel im Methodenteil verwiesen.

### 2.7.1 Automatische Zellzählung mit dem Cell counter and Analyzing System (Casy)

Das automatisierte Zellzählungsgerät der Firma Innovatis AG basiert auf einer elektrischen Erfassung von Zellen durch Pulsflächenanalyse beim Durchtritt durch eine im Gerät integrierte Messpore (Glauner 2006). Während vitale Zellen den ausgesendeten Strom ausschließen und somit mit ihrem ganzen Zellkörpervolumen erfasst werden, haben tote Zellen eine geschädigte Zellmembran. Dadurch wird der zytoplasmatische Raum leitfähig und es wird lediglich das Volumen ihres Zellkerns erfasst.

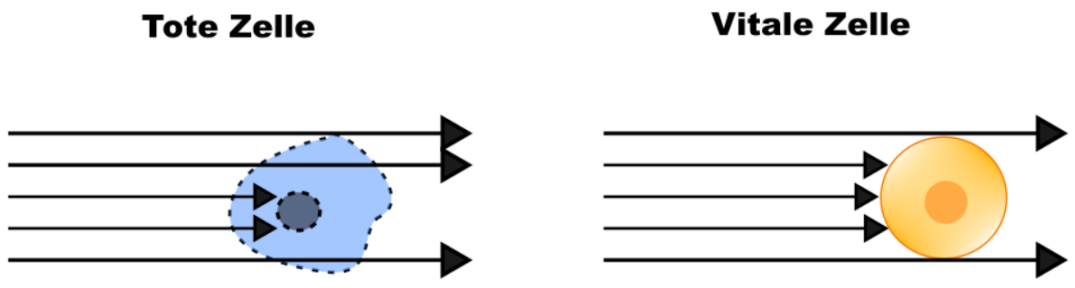



*Abbildung 5: Visualisierung des Stromausschlussverfahrens des automatisierten Zellzählgerätes Casy*
*Die geschädigte Membran toter Zellen (blau) führt zur Durchlässigkeit für den aus dem Gerät ausgesendeten Strom, weshalb nur die Größe des Zellkerns erfasst wird. Vitale Zellen (gelb) werden mit ihrer ganzen Größe erfasst.*

Für die Zählung wurden die Zellen nach dem Ablösen in 15 ml Falconröhrchen übertragen und aus der gründlich resuspendierten Zelllösung 100 µl für BMSC bzw. 50 µl für FaDu Zellen in eine mit 10 ml steril filtrierte, schwache Elektrolytlösung (Casy Ton, Innovatis AG) pipettiert. Da die FaDu Zellen eine sehr große Dichte aufweisen, wurde hiervon mit 50 µl weniger Volumen für die Zählung genommen als für die BMSC, um Ungenauigkeiten des automatisierten Zellzählungsgerätes zu vermeiden. Nach der Durchmischung entnahm das Gerät drei hintereinander folgende Stichproben von je 400 µl aus dem befüllten Casy Gefäß (Casy Cup, Innovatis AG) und bildete daraus einen Messmittelwert. Abgelesen und dokumentiert wurde jeweils die Anzahl der lebenden Zellen pro ml und die Vitalität in Prozent. Da für die FaDu Zellen nur 50 µl Zellsuspension zur Messung entnommen wurden, muss dies beim angezeigten Ergebnis noch entsprechend korrigiert und angepasst werden. Deshalb wurde die Zellzahl pro ml mit dem Faktor 2 multipliziert. Die Gesamtzellzahl wurde dann aus den Werten entsprechend der Volumenmenge hochgerechnet.

### 2.7.2 Neubauerkammer und Trypanblau-Ausschlussverfahren

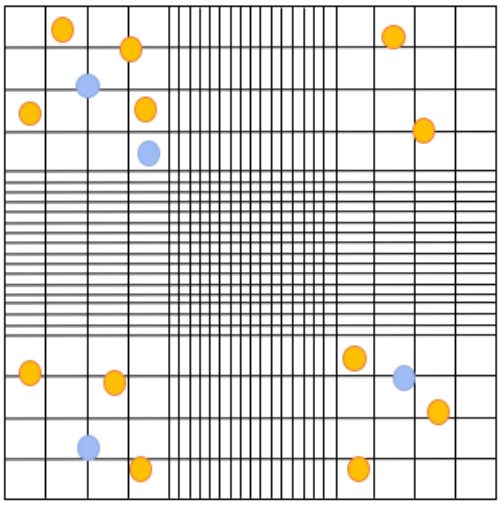


*Abbildung 6: Exemplarische Darstellung einer Neubauerkammer*
*Mit 4 Großquadraten und je 16 Kleinquadrate. Die vitalen Zellen sind gelb, die avitalen Zellen blau dargestellt.*

Eine Zählkammer, auch Hämozytometer genannt, dient zur lichtmikroskopischen Zählung. Dafür wurde eine Neubauerkammer (Neubauer Improved, Bright-Line) der Firma Assistent® Germany (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG) verwendet. Sie inkludiert vier Großquadrate mit je 16 Kleinquadraten, die auf einem Objektträger aufgezeichnet sind. Jedes der vier Quadrate hat eine Fläche von 1 $mm^2$ und eine Höhe von 0,1 mm. Somit ist das Volumen in jedem dieser Quadrate 1 $mm^2$ x 0,1 mm = 0,1 $mm^3$ (= 0,1 µl). Diese Angabe ist relevant, um später die Zellzahl pro Volumen bestimmen zu können.

Trypanblau ist ein zelltoxischer Stoff. Seinen Einsatz findet er bei der Vitalitätsanalyse. Nekrotische Zellen haben eine durchlässige Membran, weshalb toxische Stoffe in die Zelle eindringen können. Unter dem Mikroskop erscheint die Zelle blau und wird somit als abgestorben einkategorisiert. Für lebende Zellen gilt dies nicht. Ihre Zellmembranen sind intakt und sie erscheinen hell und ungefärbt.

Wurde mit dem Hämozytometer lichtmikroskopisch gezählt, so wurden nach Ablösung und Resuspendierung der Zellen 10 µl entnommen und mit 10 µl

Trypanblauer Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in einem 500 µl Reaktionsgefäß (A. Hartenstein GmbH) vermischt. Aus dieser Verdünnung wurden dann erneut 10 µl entnommen und auf eine mit Deckglas versehene Neubauerkammer aufgetragen. Die Kammer und das zugehörige Deckglas wurden vor und nach jedem Gebrauch gründlich mit 70%igen Ethanol (Carl Roth GmbH + Co KG) gereinigt. Die Zellen wurden sodann unter dem Lichtmikroskop (Axiolab, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) bei 100facher Vergrößerung begutachtet. Die Zellen eines jeden Großquadrates wurden erfasst, wobei die Regel galt, dass alle Zellen auf der oberen und auf der linken Trennlinie jedes Großquadrates mitgezählt wurden, Zellen auf der unteren und rechten Linie nicht. Blaue, also avitale Zellen, und farblose, also vitale Zellen, wurden in zwei getrennten Durchgängen gezählt. Anschließend wurde die jeweils ermittelte Zahl durch 4 geteilt, um die Zellzahl von einem dieser Großquadrate zu erhalten. Dieses Ergebnis wurde wiederum mit 2 wegen des Verdünnungsfaktors und schließlich mit $1 \times 10^4$ multipliziert. Die errechnete Zellzahl entsprach dann der Anzahl der lebenden bzw. toten Zellen pro ml.

$$\text{Zellen / ml} = [\text{Gesamtzellzahl / Anzahl der gezählten Quadrate}] \times 2 \times 10^4$$

## 2.8 Mikroskopaufnahmen und Fotodokumentation der Bone marrow stem cells

Um das Wachstum des Inhaltes der unterschiedlich dicht besetzten Flaschen von Ansatz 1 zu beobachten, wurden diese bis zu ihrem Einsatz regelmäßig fotodokumentiert. Das dafür benötigte Fluoreszenzmikroskop stammte von der Firma Leica (Typ DMI 4000 B). Nach der Aussaat der Zellen auf die drei dichteabgestuften Flaschen, wurde im Schnitt nach etwa 10 Tagen, je nach Wachstumspotenzial, eine potentiell stark proliferative Stelle ausfindig gemacht, die dann möglichst wöchentlich mit einer Vergrößerung von 500 µm im Hellfeld aufgenommen wurde.

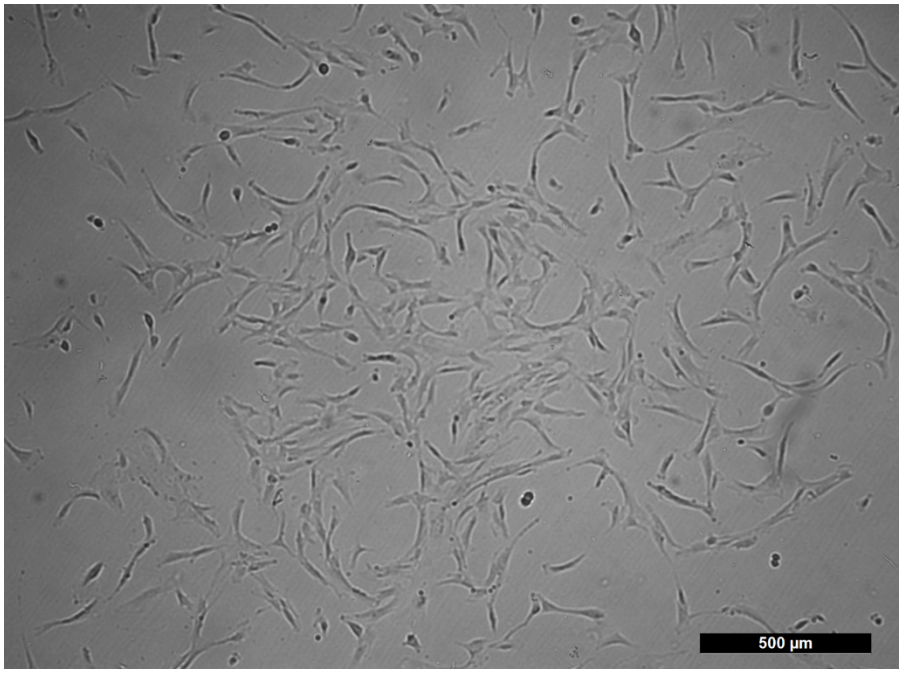



*Abbildung 7: Exemplarisches Foto der BMSC*
*Aufgenommen mit dem Mikroskop Leica im Hellfeld, 500 µm, Graustufe.*

## 2.9 Sortierungsvorgang mit dem Magnetic Activated Cell Sorting-Gerät

Die Methode Magnetic Activated Cell Sorting (=MACS) basiert auf dem Prinzip der magnetischen Zellsortierung. Das Verfahren wurde laut Rücksprache mit der Firma Miltenyi Biotec GmbH im Jahr 1988 von Stefan Miltenyi entwickelt (Persönliche Mitteilung von Wolfgang Bywalez der Firma Miltenyi 2017) und wird seither weltweit erfolgreich zur Zellseparation im Forschungs- wie im klinischen Alltag eingesetzt (Abts et al. 1989; Miltenyi et al. 1990). Durch die Kopplung der Zellen mit magnetpartikelbesetzten Antikörpern und anschließendem Durchlaufen des Zellgemisches durch eine Säule aus Stahlwollmatrix in einem magnetischen Feld gelingt eine spezifische Trennung der Zellen. Diese Magnetpartikel, genannt Microbeads, weisen eine Größe von 50 nm auf. Sie bestehen aus einem Eisenoxid, umhüllt von einem Polysaccharid, was somit einerseits durch das Eisen die magnetische Aktivität bedingt und andererseits einen raschen biologischen Abbau der Microbeads nach der Separation gewährleistet. Während des Durchflusses der Zellsuspension durch die

magnetische Säule werden die mit Microbeads markierten Zellen zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen durchgespült werden. Wird die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt, so können auch die markierten Zellen durch Spülen gewonnen werden (Abbildung 8). Je nach gewünschten Zielzellen durch den Sortierungsvorgang unterscheidet man verschiedene Termini: Sind die markierten Zellen auch die angestrebten Zielzellen, so spricht man von „*positiver Selektion*“. Geht es jedoch vorwiegend um die abgetrennte Population, also die unmarkierten Zellen, so nennt man das Verfahren „*Abreicherung*“.

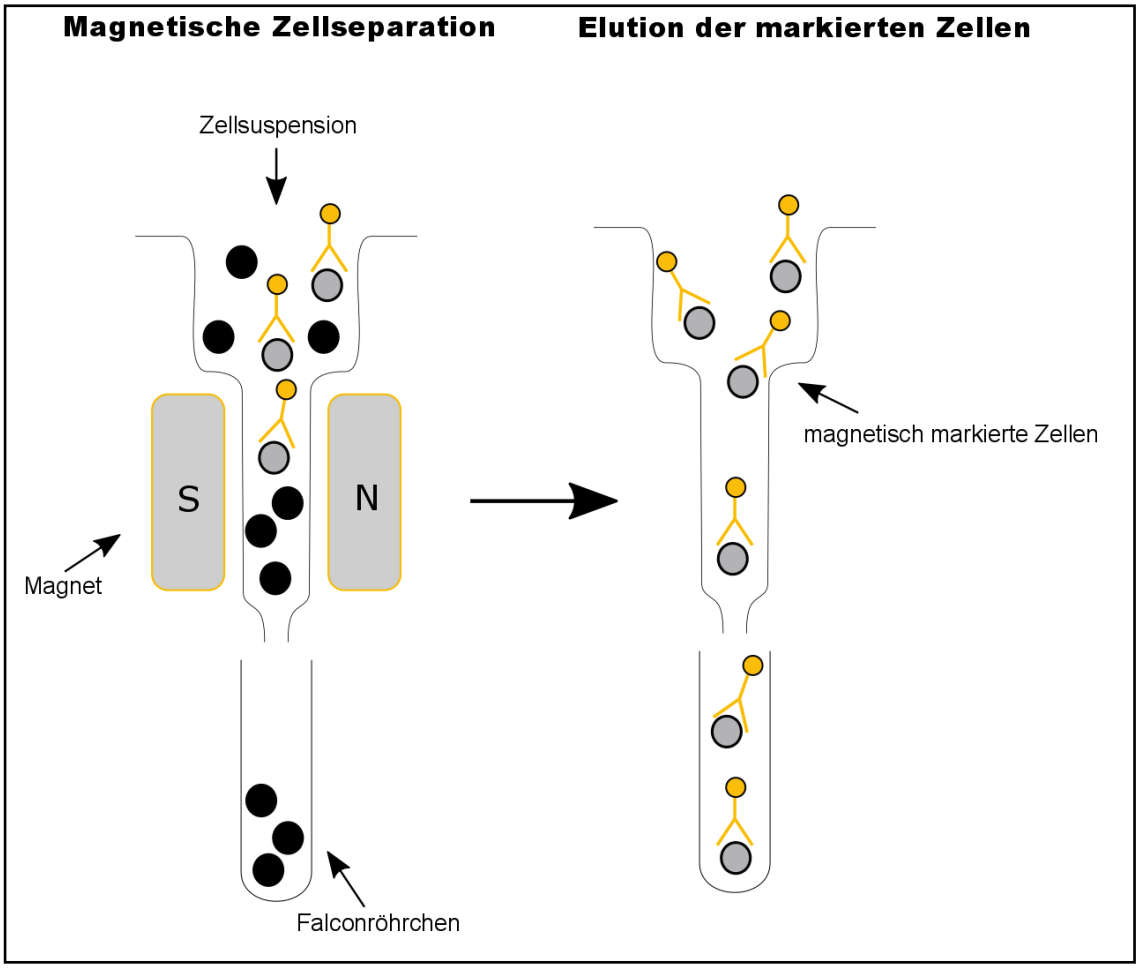



*Abbildung 8: Schematische Ausführung einer positiven Selektion mit Hilfe der magnetischen Zellseparation*
*Die mit magnetischen Partikeln (Microbeads, hier orange) markierten Zellen (grau) im Zellgemisch bleiben im magnetischen Feld der aus Stahlwollmatrix bestehenden Säule hängen, während die unmarkierten Zellen (schwarz) ungehindert passieren können. Anschließend wird die Säule aus dem Magnetfeld entnommen und die markierten Zellen eluiert.*

Für die Zellseparation in dieser Arbeit war eine positive Selektion gewünscht. Zielpopulation war eine reine Stro-1+ BMSC-Kultur. Nachdem der Oberflächenmarker Stro-1 nicht als direkte Kopplung mit Microbeads zur Verfügung stand, wurde ein Phycoerythrin-konjugierter (PE-konjugierter) Stro-1 Primär-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology) mit einem gegen PE gerichteten Microbead Sekundär-Antikörper (Anti-PE MicroBeads UltraPure, Miltenyi Biotec GmbH) gewählt (Abbildung 9).

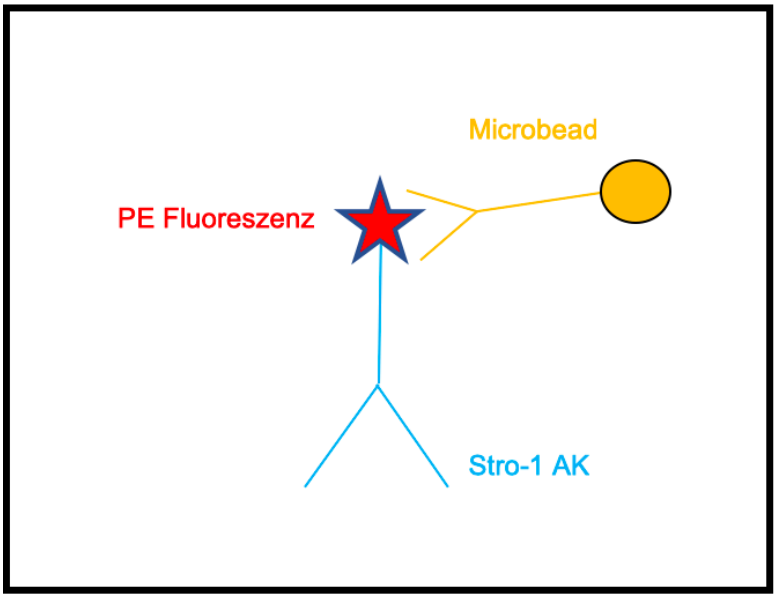



*Abbildung 9: Veranschaulichung der in dieser Arbeit verwendeten indirekten Kopplung der Microbeads an die Zellen*
*Der PE-konjugierte Stro-1 AK (blau) fungiert als Primärantikörper, der ggf. an die Zelle andockt. Die Microbeads (orange) richten sich in diesem Fall als Sekundärantikörper gegen den Fluoreszenzfarbstoff PE (rot).*

Für die Durchführung wurde der MiniMACS™ Separator mit dem MACS MultiStand von der Firma Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet. Im Vorfeld musste für einen reibungslosen Versuchsablauf ein sog. MACS-Puffer von 10 ml aus PBS, 0,5% Bovines Serum Albumin (BSA, Carl Roth GmbH + Co KG) und 2 mM EDTA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) hergestellt werden. BSA und EDTA wurden mit einer Feinwaage der Firma Kern (Albstadt, Deutschland) abgemessen. Dieser Puffer wurde im Kühlschrank (Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Würzburg, Deutschland) bei 4°C gelagert und innerhalb von zwei Tagen aufgebraucht. Während der Benutzung wurde er auf Eis zwischengelagert. Die eingesetzten

BMSC entstammten alle der P1 und wurden in einer großen Zellkulturflasche kultiviert (2.6.1). Im ersten Schritt wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und in ca. 10 ml Medium aufgenommen, um sie schließlich mit dem Casy Zellzählungsgerät zu zählen. Sodann wurden sie 5 min lang bei 1600 rpm und 4°C zentrifugiert. Es folgte die Färbung für 15 min im Kühlschrank bei 4°C mit dem PE-konjugierten Primärantikörper mit 5 µl pro 1 x $10^6$ Zellen. Da die Zellzahl stets sehr klein war, wurde lediglich in dem Antikörpervolumen gefärbt ohne Beimengung einer zusätzlichen Lösung. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden die Zellen mit 1 ml des vorher hergestellten MACS-Puffers gewaschen und erneut bei 1600 rpm, 4°C und 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das zurückbleibende Zell-Sediment mit dem Sekundärantikörper gefärbt. Hierfür wurden die Zellen in 80 µl MACS-Puffer aufgenommen (80 µl pro 1 x $10^7$ Zellen), 20 µl der Microbeads (20 µl pro 1 x $10^7$ Zellen) dazugegeben und gründlich resuspendiert. Abermals wurden die Zellen für 15 min in den Kühlschrank gegeben. In der Zwischenzeit wurde die MACS-Tafel (MACS MultiStand) mit der zugehörigen steril verpackten Säule und dem MiniMACS™ Separator vorbereitet. Weiterhin wurde je ein 15 ml Falconröhrchen für die unmarkierten, negativen Zellen und eines für den anfallenden Abfall sowie ein 15 ml Falconröhrchen für die Zielpopulation Stro-1+ BMSC beschriftet und bereitgestellt. Nach 15-minütiger Färbezeit wurden die Zellen mit 1 ml MACS-Puffer resuspendiert und anschließend zentrifugiert (5 min, RT, 1600 rpm). Unterdessen konnte die Säule bereits mit 500 µl Puffer benetzt werden. Hierfür wurde das für den Abfall vorgesehene Röhrchen unter die Säule gestellt und der Puffer hinein pipettiert. Die Flüssigkeit muss vor Benutzung der Säule vollständig durchgelaufen sein. Anschließend wurde das Röhrchen für die negative Zellpopulation unter die Säule gestellt. Der Überstand der unterdessen zentrifugierten Zellen wurde abgesaugt und das Pellet in 500 µl Puffer aufgenommen und resuspendiert, um es schließlich in die Säule einzufüllen. War alles durchlaufen, so wurde die Säule insgesamt dreimal mit je 500 µl Puffer gespült. Auch hier galt, erst nach Durchlaufen der ersten 500 µl Puffer, wurden die nächsten dazu gefügt. Nun wurde 1 ml Puffer in die Säule gegeben und das Konstrukt mitsamt dem vorbereiteten Röhrchen für die positiven Zellen aus dem

magnetischen Feld entnommen. Ein steril verpackter Stempel wurde verwendet, um den restlichen Flüssigkeitsanteil darin durchzudrücken. Somit wurden die markierten Zellen in das 15 ml Falconröhrchen gespült. Abschließend nach dem Sortiervorgang wurden die so gewonnen Zellen ein letztes Mal zentrifugiert und in 1 ml DMEM Medium aufgenommen. Danach wurden sie sowohl mit dem Casy Zellzählungsgerät, als auch mit der Neubauerkammer gezählt, bevor sie für den Proliferationsversuch weiterverwendet wurden. Zur Verifizierung wurde einmalig das Vorhandensein des Antikörpers Stro-1 auch mittels FACS-Gerät inspiziert. Dies wurde mit frischen und unsortierten BMSC der P1 zu Beginn der Versuchsreihe vorgenommen (2.3.3).

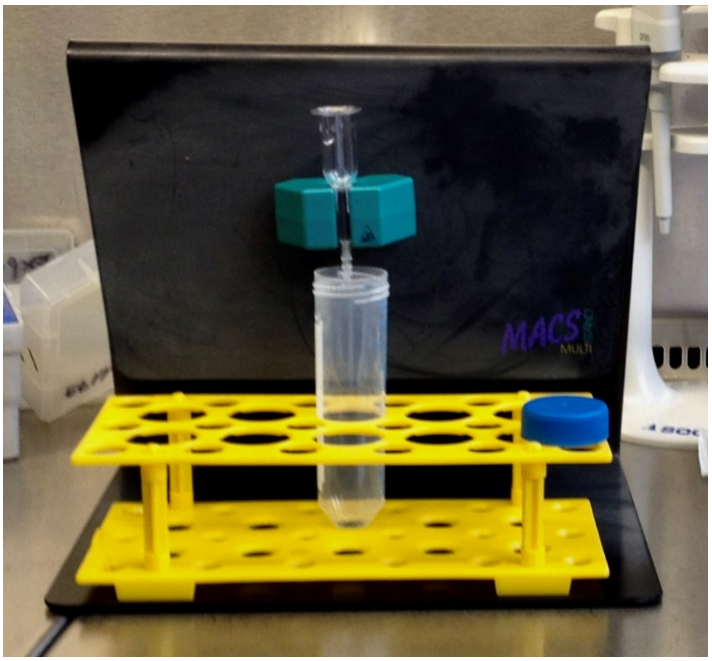



*Abbildung 10: Versuchsaufbau mit dem Magnetic Activated Cell Sorting*
*schwarze Magnettafel = MACS MultiStand,*
*türkise Halterung = MiniMACS™ Separator, Säule, Falconröhrchen*

## 2.10 Proliferationsanalyse und Co-Kultur

Um Aussagen über das proliferative Verhalten der in dieser Arbeit untersuchten Zellen – insbesondere der FaDu Zellen in Gegenwart der BMSC, treffen zu können, wurde eine Proliferationsanalyse in Kombination mit einer Co-Kultur (CoK) aus BMSC und FaDu Zellen mit allen drei BMSC-Ansätzen gemacht.

Konkret hieß dies jeweils eine Analyse mit BMSC der P1, die in einer mittleren Kulturflasche sehr dünn ausgesät worden waren, eine Analyse mit nach dem Oberflächenmarker Stro-1 sortierten BMSC und eine weitere mit BMSC der P2, inklusive FaDu Zellen für alle drei Versuchsansätze (2.5).

Hierfür wurden die entsprechenden BMSC- und FaDu-Zellkulturflaschen bei erreichter Konfluenz wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben mit PBS gewaschen, abgelöst und in 15 ml Falconröhrchen aufgenommen. Im Anschluss wurden die Zellen bei 1600 rpm und RT 10 min zentrifugiert und die Überstände jeweils abgesaugt. Das BMSC-Pellet wurde in 1 ml Medium aufgenommen, das FaDu Zell-Pellet je nach Größe in 2 – 4 ml Medium (in beiden Fällen DMEM 1x). Es folgte die Zellzählung mit dem Casy Zellzählungsgerät und der Neubauerkammer (2.7), um die Ausgangssituation vor dem Versuch festzuhalten. Anhand der Messwerte der Neubauerkammer wurde nun die Verteilung aller Zellen auf eine 12-Wellplatte aus Polystyren (Corning Incorporated Costar®, Kennebunk, ME, USA) errechnet. Dies gliederte sich wie folgt auf: In die erste der drei Viererreihen kamen 20.000 FaDu Zellen pro Well, die sich in je 1,5 ml Medium befinden. In die zweite Viererreihe kamen je 20.000 BMSC, ebenfalls in je 1,5 ml Medium aufgelöst. Und in der dritten Viererreihe befand sich die Co-Kultur mit je 20.000 FaDu Zellen und 1,5 ml Medium in einem unteren Kompartiment und 20.000 BMSC mit 500 µl in einem oberen Kompartiment.

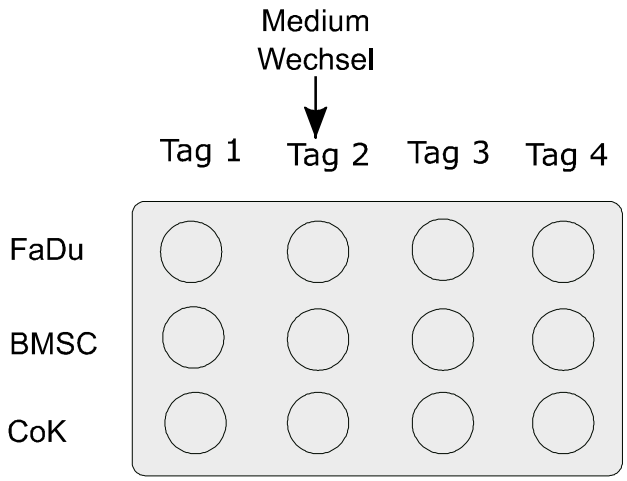



*Abbildung 11: Darstellung einer 12-Wellplatte für die Zellzählung an Tag 1 – 4 mit je einer Reihe FaDu Zellen, BMSC und Co-Kultur (CoK). An Tag 0 werden je 20.000 Zellen pro Well und pro Transwell (in der CoK) ausgesät. An Tag 2 findet ein Mediumwechsel statt.*

Das Prinzip der Co-Kultur besteht auf der einen Seite in der Schaffung eines gemeinsamen Raumes der beiden Zellarten und somit Nutzung des gleichen Nährmediums, und auf der anderen Seite in einer gleichzeitigen Abtrennung durch eine permeable Membran mit Mikroporen (Transwell, Corning Incorporated Costar®) in ein oberes und ein unteres Kompartiment, was ein direktes Durchmischen der Zellen und des Mediums verhindert. Der Durchmesser des verwendeten Transwell-Einsatzes für eine 12-Wellplatte betrug 12 mm, die Wachstumsfläche der Zellen 1,12 $cm^2$. Die Membran wies dabei eine Porengröße von 0,4 µm pro Pore auf und bestand aus Polyethylenterephthalat (PET), was eine bessere Zellsichtbarkeit unter dem Mikroskop fördern soll. Sie umfasste eine Porendichte von 4 x $10^6$ Poren / $cm^2$. Die Membrandicke war 10 µm. Während eine Migration von Zellen somit unmöglich war, war eine Kommunikation über die parakrin sezernierten Zytokine und Wachstumsfaktoren hingegen möglich.

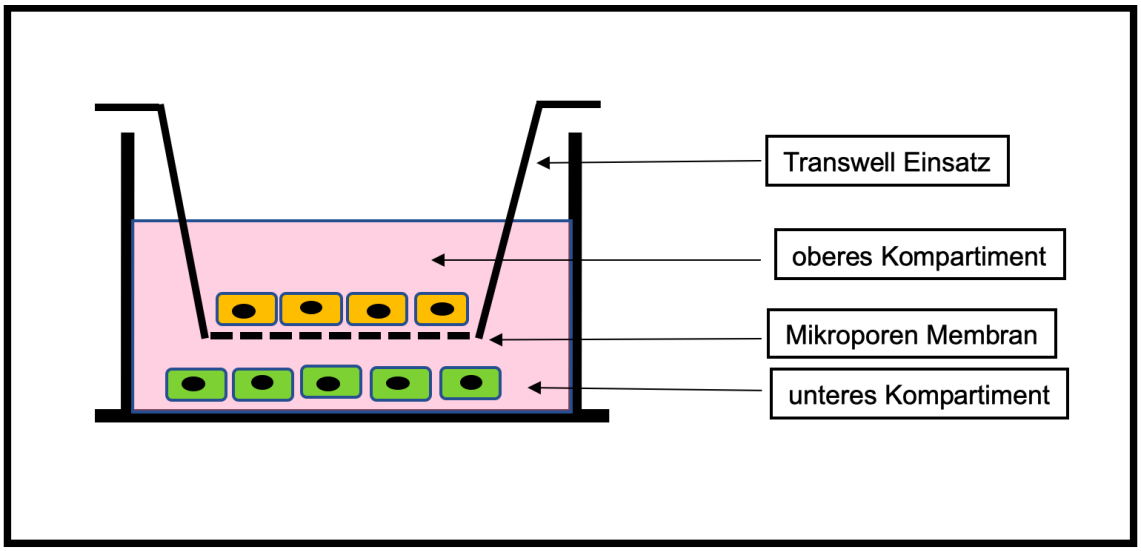



*Abbildung 12: Darstellung eines Transwell-Einsatzes mit Abtrennung durch eine mikroporöse Membran in ein oberes- und ein unteres Kompartiment. Zu sehen sind in grün die FaDu Zellen im unteren Teil, in orange die BMSC im Transwell-Einsatz, die sich im Medium (rosa) befinden.*

Der Tag der Aussaat wurde als Tag 0 definiert. Von Tag 1 bis 4 wurden die Zellen jeweils gezählt und das Wachstum unter dem Mikroskop verfolgt. Dazwischen wurden sie bei 37°C und 5%igen $CO_2$ Anteil im Inkubator kultiviert. Für die Vorbereitung der Zellzählung wurde das Medium in den entsprechenden Wells

abgesaugt und die Rückstände mit je 500 µl PBS pro Well und Transwell gewaschen. Als nächstes wurden 400 µl Trypsin pro Well und 200 µl Trypsin pro Transwell hinzugefügt und die Zellen zur Inkubation 5 min in den Brutschrank (37°C, 5% $CO_2$) gestellt, um die Zellen abzulösen. Mit 600 µl Medium pro Well und 300 µl DMEM Medium pro Transwell wurde die enzymatische Ablösung durch das Trypsin gehemmt und die Zellen in der zugefügten Flüssigkeit gründlich resuspendiert. Somit wurden sie in 1 ml Flüssigkeit in 1,5 ml Tubes (Sarstedt AG & Co) aufgenommen. Für die BMSC der Transwells wurde noch 500 µl Medium dazugegeben, um auf 1 ml aufzufüllen. Es folgte die Auswertung der Proliferation mit dem Casy Zellzählungsgerät und der Neubauerkammer inklusive Trypanblau-Ausschlussverfahren (2.7).

Eine Ausnahme bildete der Proliferationsversuch mit den Stro-1+ BMSC des Ansatzes 2. Da hier die Zellausbeute nach dem Sortierungsvorgang sehr gering war, wurde zum einen lediglich die gewonnene Zellmenge eingesetzt, die zur Verfügung stand – auch wenn der Erlös unter 40.000 Zellen (je einmal 20.000 für Monokultur und Co-Kultur) lag. Und zum anderen wurde dementsprechend nur einmalig, und zwar am Tag 4 nach der Aussaat gezählt. Die eingesetzte FaDu Zellzahl blieb mit 20.000 Zellen pro Well gleich.

Innerhalb der vier Tage Proliferationsauswertung nach Aussaat wurde das Medium einmalig am Tag 2 für alle verbliebenen Wells gewechselt. Dabei wurde den einzelnen Wells nach Absaugen des alten Mediums jeweils 1,5 ml frisches Medium zugeführt, während bei der Co-Kultur dem unteren Kompartiment mit den FaDu Zellen 1 ml zupipettiert wurde, dem oberen dagegen 500 µl.

## 2.11 Graphische Darstellung und statistische Auswertung

Eine statistische Begutachtung wurde für die folgenden Daten vorgenommen:

- Mittelwerte der Ausgangszellzahl der BMSC vor der Aufteilung auf die Ansätze
- Mittelwerte der erhaltenen Stro-1+ BMSC nach der Sortierung sowie für die Ausgangszellzahl vor der Sortierung
- Reliabilitätsanalyse der unterschiedlichen Messverfahren zur Zellzählung mittels Casy Zellzählungsgerät vs. Neubauerkammer
- Vergleich der Proliferation von vitalen FaDu Zellen mit vitalen FaDu Zellen in der Co-Kultur an Tag 4 für je alle drei Ansätze anhand der Messwerte der Neubauerkammer (Wilcoxon Test)

Alle statistischen Verfahren wurden mit dem Institut für klinische Epidemiologie und Biometrie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg abgesprochen.

Aufgrund zweier verschieden angewendeter Messverfahren in der Arbeit, nämlich einerseits der Zellzählung mit dem Casy Zellzählungsgerät und andererseits mit der Neubauerkammer, wurde anhand einer Reliabilitätsanalyse mit dem Statistik Programm IBM® SPSS® Statistics, Version 21 (International Business Machines Corporation, IBM, Armonk, NY, USA) die Verlässlichkeit der verschiedenen Datenwerte überprüft. Die Reliabilität ist ein Teil der Varianz und durch tatsächliche Unterschiede in den Messungen gekennzeichnet und nicht durch Messfehler erklärbar. Das heißt, sie ist eine Angabe, ob ein Messergebnis bei einer erneuten Messung unter gleichen Rahmenbedingungen stabil ist. Ist dies der Fall, so sind die Ergebnisse hoch reliabel. Weichen die Messergebnisse zu stark voneinander ab, so sind sie niedrig reliabel. Die Reliabilität ist neben der Validität und Objektivität ein wichtiges Testgütekriterium.

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Messmethoden für jeweils alle Proliferationsansätze sowohl für die FaDu (vital) Messwerte, als auch für die Co-Kultur FaDu (vital) Messwerte miteinander verglichen. Dafür wurde eine Intra-Klassen-Korrelation (ICC) nach dem Modell *ICC (3,1), two-way mixed,*

*single measure* (*zweifach gemischt, Einzelwert)* durchgeführt. Die ICC kann Werte von -1 bis +1 annehmen. In den Einstellungen wurde auf Cronbachs Alpha gestellt und das Konfidenzintervall (CI) auf 95% (Wahrscheinlichkeit, dass eines der Intervalle den Erwartungswert tatsächlich enthält) festgelegt. Die Werte wurden direkt miteinander verglichen (Einstellungsformat: *Agreement*) und nicht justiert. Statistiker und Forschungsgruppen haben sich in verschiedenen Veröffentlichungen darauf geeinigt, dass ICC-Werte >0,9 exzellent, zwischen 0,75 – 0,9 gut, zwischen 0,5 – 0,75 moderat und <0,5 schlecht sind (Cicchetti 1994; Portney LG 2000; Koo and Li 2016).

Mittelwerts-Berechnungen sowie Balkendiagramme zur Analyse des Erwerbes Stro-1+ Zellen nach dem Sortieren, oder auch um andere Mittelwerte, beispielsweise in der Zellkultur, anzugeben, wurden mit dem Programm GraphpadPRISM® Version 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) berechnet.

Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Proliferation von FaDu Zellen und Co-Kultur FaDu Zellen kam ebenfalls das Programm GraphpadPRISM® Version 6.0 zur Anwendung. Das Signifikanzniveau wurde standardmäßig mit $p \leq 0{,}05$ festgelegt. Als Testverfahren der nicht normalverteilten Werte wurde der Wilcoxon Test, auch Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest genannt, durchgeführt. Dies ist ein nicht-parametrisches Testverfahren für abhängige Stichproben. Nicht-parametrische Testverfahren sind nicht an festgelegte Parameter gebunden und eignen sich beispielsweise auch für nicht normalverteilte Werte. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest überprüft, ob die zentrale Tendenz zweier abhängiger Stichproben verschieden ist.

Die Nullhypothese geht in diesem Fall davon aus, dass es keine relevanten Proliferationsunterschiede gibt, je nachdem, ob die FaDu Zellen alleine oder in einer Co-Kultur mit BMSC wachsen. Die Alternativhypothese besagt, dass es einen Unterschied gibt.

Die graphische Darstellung der Proliferation erfolgte in Form von sog. Boxplots. Boxplots liefern einen Überblick über die Streuung der gemessenen Daten. Sie stellen sich in Form einer Box dar, deren obere Begrenzung die 75. Perzentile

angibt und die untere die 25. Perzentile. Das heißt, 25% aller Werte sind größer bzw. kleiner als die 50% der Werte, die innerhalb der Box liegen (Interquartilsabstand, IQR). Die waagrechte Linie in der Box bezeichnet den Median. Er teilt alle Stichproben in zwei gleich große Hälften, in denen jeweils 50% der Daten liegen. Darüber hinaus werden die Werte, die außerhalb der Box liegen, durch die T-förmigen Whisker ober- und unterhalb der Box dargestellt, die sich jeweils maximal über eine Länge von 1,5 x der Seitenlänge der Box erstrecken (max. 1,5 x IQR). Werte im Bereich von 1,5 bis 3 x IQR werden als Ausreißer bezeichnet. Werte, die 3 x IQR überschreiten werden Extremwerte genannt.

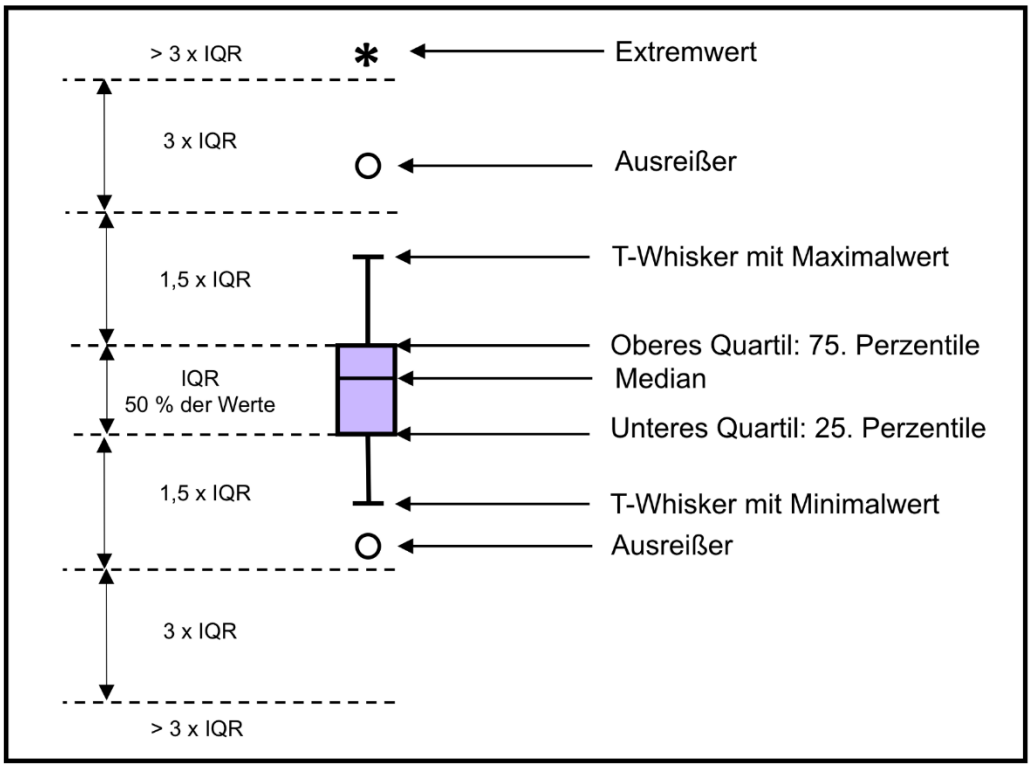


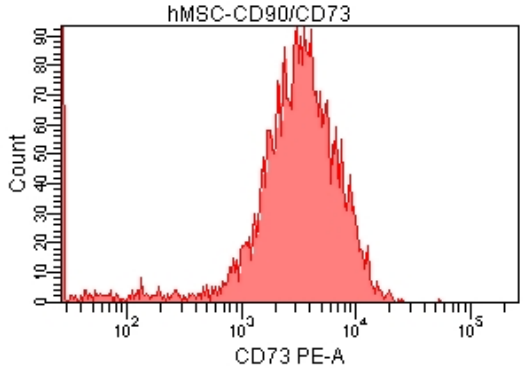

*Abbildung 13: Übersicht einer Boxplot-Darstellung mit Box, Median, T-Whiskern, Quartilen, Ausreißern und Extremwerten. IQR = Interquartile Range (Interquartilsabstand)*

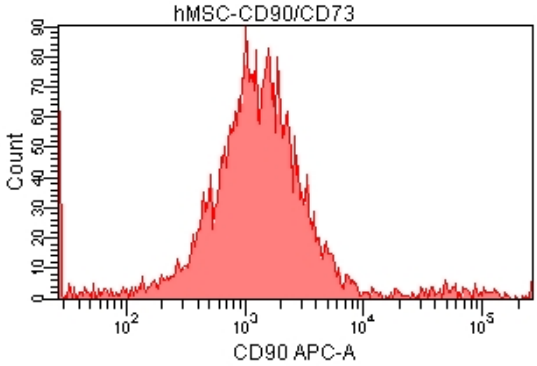
# 3 ERGEBNISSE

Im folgenden Teil werden die Ergebnisse der Fragestellungen zur Verifizierung der mesenchymalen Knochenmarksstammzellen, der Zellkultur, der Sortierung nach Stro-1, der einzelnen Proliferationsanalysen und der Reliabilitätsanalyse der Messmethoden vorgestellt. Die Stichprobengröße der durchgeführten Versuche richtete sich nach der Anzahl der Stammzellspender und betrug in diesem Fall für die Versuche des ersten und des dritten Ansatzes jeweils n=11 und für den Versuch des zweiten Ansatzes n=10. Aufgrund eines Methodischen Fehlers, musste ein Spender aus der Analyse für Ansatz 2 ausgeschlossen werden. Grund dafür war, dass im Proliferationsversuch mit BMSC aus Ansatz 2 zu viele FaDu Zellen ausgesät wurden, weshalb dieser Versuch am Ende nicht verwertbar war und ausgeschlossen wurde. Die anderen Ansätze blieben davon unbeeinflusst.

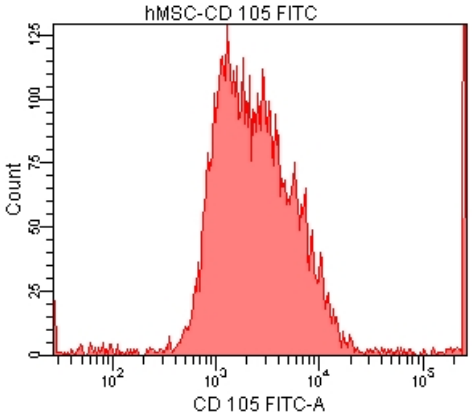
## 3.1 Verifizierung des Immunphänotyps der Bone marrow stem cells anhand ihrer spezifischen Antigene

Die Verifizierung des Immunphänotyps der BMSC mit den von der ISCT festgelegten Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 wurde einmalig mittels Durchflusszytometrie zur Beweisführung durchgeführt. Zu sehen war ein positives Ergebnis der drei Marker mit einem Fluoreszenzsignal $>10^3$ (Abbildung 14).



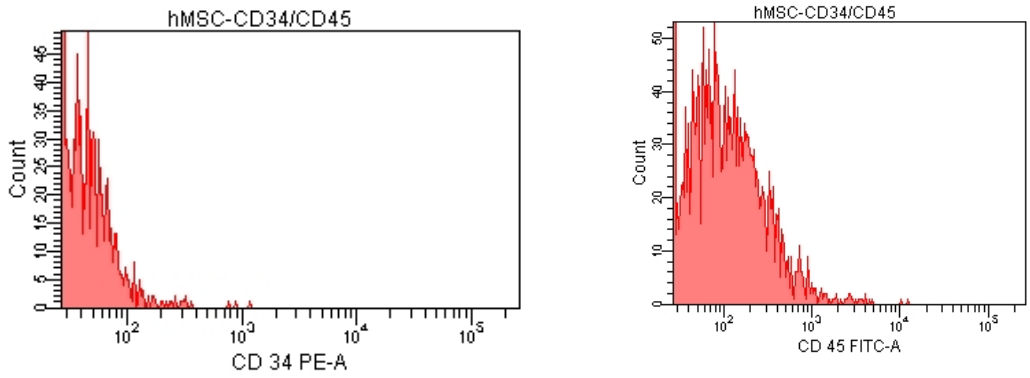

**PE-konjugiert CD73** **APC-konjugiert CD90**




**FITC-konjugiert CD105**

*Abbildung 14: Verifizierung des Immunphänotyps der BMSC: positive Marker Darstellung der Expression der von der ISCT festgelegten Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 für mesenchymale Stammzellen mittels FACS, die in den Diagrammen alle positiv nachgewiesen sind. Die x-Achse spiegelt die Intensität der Fluoreszenzsignale wider. Die y-Achse gibt die Zellzahl bzw. Anzahl der gemessenen Ereignisse an.*

Ebenso wurden die typisch hämatopoetischen Marker CD34 und CD45 auf Negativität überprüft. Dies war der Fall mit einem Peak der Fluoreszenz $<10^3$ (Abbildung 15).

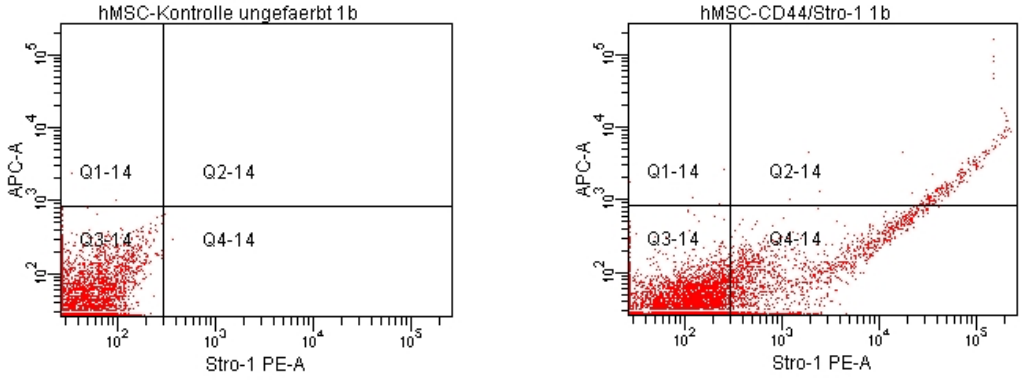



**PE-konjugiert CD34** **FITC-konjugiert CD45**

*Abbildung 15: Verifizierung des Immunphänotyps der BMSC: negative Marker Darstellung typisch hämatopoetischer Cluster of Differentiation (CD), die in der FACS Analyse eine negative Expression auf den mesenchymalen Stammzellen zeigen. Die x-Achse spiegelt die Intensität der Fluoreszenzsignale wider. Die y-Achse gibt die Zellzahl bzw. Anzahl der gemessenen Ereignisse an.*

## 3.2 Präsenz von Stro-1 auf Bone marrow stem cells

Um die für diese Arbeit isolierten BMSC auf ihre Tauglichkeit für die Sortierung nach dem Oberflächenmarker Stro-1 zu testen, wurde zunächst einmalig via Durchflusszytometrie überprüft, ob der Marker in der Gesamtpopulation vorhanden ist. Es war mit 13,5% ein positives, wenn auch schwaches Ergebnis für das Vorhandensein des Markers in der Population, die sich in P1 befand, zu verzeichnen (Abbildung 16).




**Ungefärbte Kontrolle** **PE-konjugiert Stro-1**

*Abbildung 16: Stro-1 Präsenz in einer aus dem Knochenmark isolierten mesenchymalen Stammzellkultur der P1*
*Das Dotplot-Diagramm zeigt das Vorhandensein des Oberflächenmarkers Stro-1 in der unsortierten Gesamtkultur für einen geringen Anteil der Zellen in dem Feld Q4-14 mit einem Fluoreszenzsignal von >$10^3$. Die ungefärbte Kontrollgruppe bildet sich in einem Bereich <$10^3$ ab (Q3-14) und ist somit als negativ für den Marker Stro-1 zu werten. Die x-Achse spiegelt die Intensität der Fluoreszenzsignale für PE wider. Die y-Achse gibt die Intensität der Fluoreszenzsignale für eine Kontrollfluoreszenz APC wider.*

## 3.3 Differenzierungspotenzial der Bone marrow stem cells

Für den allgemeingültigen Nachweis, dass es sich bei den verwendeten BMSC tatsächlich auch um mesenchymale Stammzellen handelte, wurde gemäß des Konsens der ISCT die Differenzierungsfähigkeit auf Knochen- und Fettgewebe untersucht. Dies konnte beide Male mittels spezifischer histologischer Färbungen bestätigt werden.

### 3.3.1 Osteogene Differenzierung

Nach 28-tägiger Inkubation und Durchführung der Von Kossa-Färbung war es möglich, Kalziumablagerungen in der Extrazellulärmatrix des Präparats lichtmikroskopisch nachzuweisen. Die Kerne erschienen rot, das Zytoplasma rosa und Kalziumablagerungen schwarz (Abbildung 17). Damit war eine osteogene Differenzierung nachgewiesen.

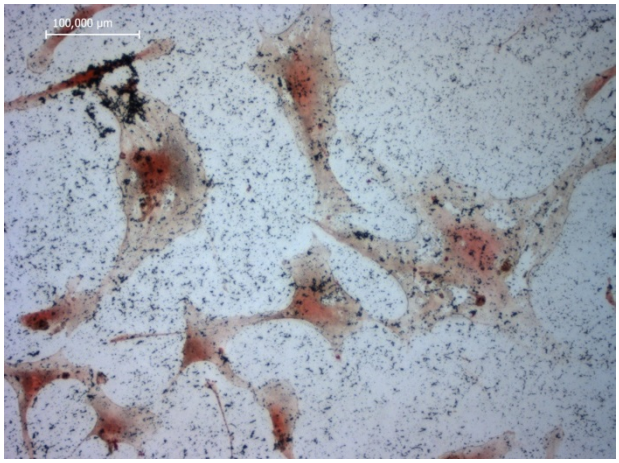



*Abbildung 17: Von Kossa-Färbung als histologischer Nachweis der osteogenen Differenzierung*
*In der Extrazellulärmatrix lassen sich schwarz gefärbte Kalkspuren nachweisen. Die Zellkerne dagegen sind rot angefärbt. Maßstab: 100 µm*

### 3.3.2 Adipogene Differenzierung

Für den Nachweis der adipogenen Differenzierung wurden die BMSC 14 Tage inkubiert und anschließend mit der Oil Red O-Färbung gefärbt. Im Lichtmikroskop ließen sich rötliche Lipidvakuolen nachweisen sowie durch Mayers-Hematoxylin blau angefärbte Kerne (Abbildung 18). Somit wurde eine adipogene Differenzierung belegt.

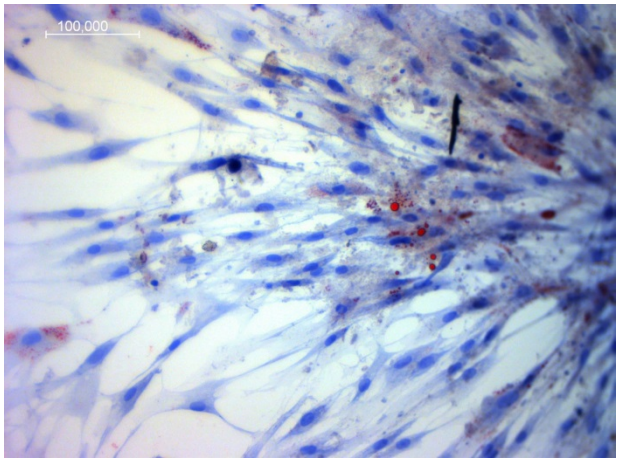



*Abbildung 18: Oil Red O-Färbung als histologischer Nachweis der adipogenen Differenzierung*
*Die nachzuweisenden Lipidvakuolen nehmen eine rote Färbung an. Die Kerne erscheinen blau. Maßstab: 100 µm*

## 3.4 Zellkultur

### 3.4.1 Generelles Wachstumsverhalten der Bone marrow stem cells und FaDu Zellen

Die BMSC besaßen die Fähigkeit, nach der Isolierung am Plastikboden einer Monolayer Zellkulturflasche anzuwachsen. Nach 3 – 5 Wochen in P0 wiesen sie eine ausreichende Konfluenz (etwa 80%) auf, um sie für die geplanten Versuchsansätze auf die entsprechenden Kulturflaschen zu verteilen. Die Wachstumsgeschwindigkeit und entsprechend resultierende Zellzahl nach dieser Zeit war variabel und brachte im Schnitt, ausgezählt mit dem Casy Zellzählungsgerät, einen Wert von 4.906.000 Zellen pro 175 $cm^2$ Kulturflasche (Abbildung 19) mit einer durchschnittlichen Vitalität von 78,78%.

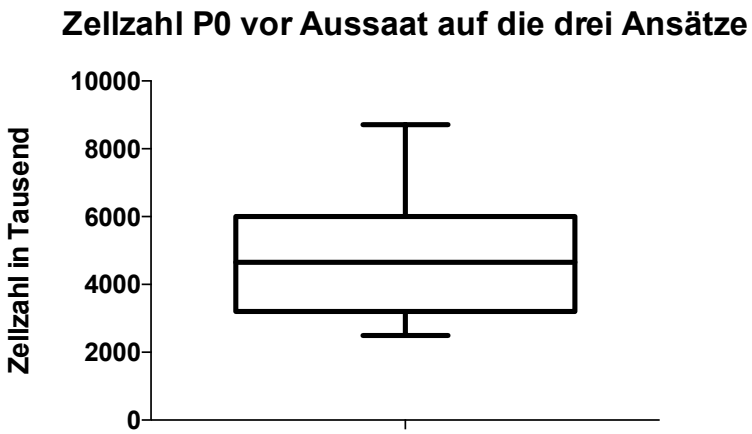


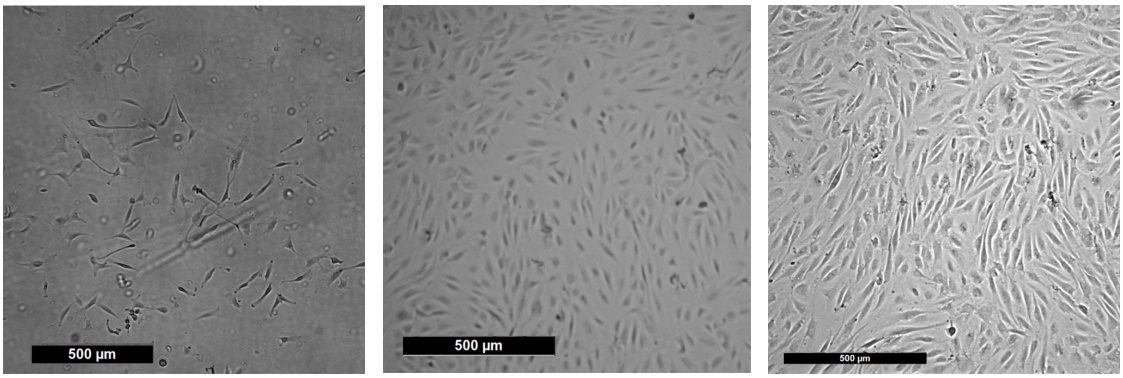

*Abbildung 19: Boxplot für die BMSC-Zahl vor der Aussaat auf die drei Ansätze*
*Der Boxplot zeigt die genauere Analyse der Zellzahl der BMSC vor der Verteilung auf die drei Ansätze. Die Zellzahl im Diagramm ist in Tausend angegeben.*
*Mittelwert: 4.906.000 Zellen*
*Median: 4.652.000 Zellen*
*Maximum: 8.716.000 Zellen*
*Minimum: 2.499.000 Zellen*

Die FaDu Zellen dagegen zeigten insgesamt ein wesentlich schnelleres Wachstumsverhalten mit relativ gesehen höheren Proliferationsraten, sodass ein regelmäßiges und frühzeitiges Splitten notwendig war. In 75 $cm^2$

Zellkulturflaschen wiesen sie ein durchschnittliches Wachstum von 4.573.553 Zellen auf. Sie mussten mindestens einmal pro Woche gesplittet werden. Die Vitalität lag im Schnitt bei 96,5%.

### 3.4.2 Wachstumsverhalten der dünn ausgesäten Bone marrow stem cells

Die Proliferation der BMSC, ausgesät mit geringer Dichte, war zum Teil sehr gering. In der 75 $cm^2$ Zellkulturflasche mit 750 ausgesäten Zellen war in n=11 Versuchen nur zweimal ein eindeutig hochproliferativer Klon mit der typischen Morphologie zu finden, wobei davon einmal die Zellzahl für einen Proliferationsversuch trotzdem zu gering war und auf eine dichter ausgesäte Flasche zurückgegriffen werden musste (Abbildung 20).

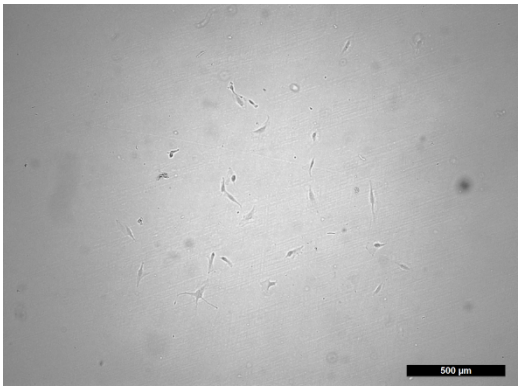



12 Tage nach Aussaat 20 Tage nach Aussaat 25 Tage nach Aussaat

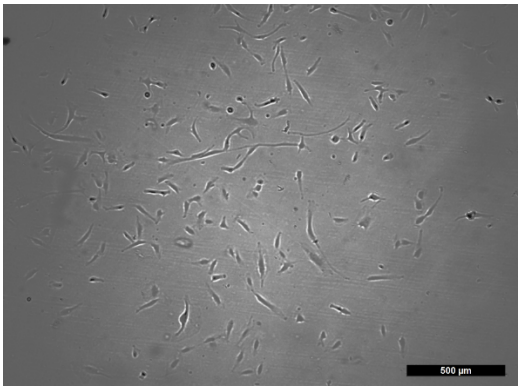
*Abbildung 20: Lichtmikroskopische Dokumentation kleiner, hochproliferativer BMSC Klone aus einer 75 $cm^2$ Monolayer Kulturflasche mit initial 750 (10 Zellen pro $cm^2$) ausgesäten Zellen – 12, 20 und 25 Tage nach der Aussaat. Der Maßstab beträgt 500 µm. Zu erkennen sind die sehr dicht zu einander liegenden und sehr kleinen Zellen.*

Insgesamt wuchsen die BMSC in der 75 $cm^2$ Flasche mit 75.000 Zellen (1.000 Zellen pro $cm^2$) am besten. Von 11 Versuchen wurde insgesamt siebenmal die Population aus den 75.000 ausgesäten Zellen (1.000 Zellen pro $cm^2$) für die Proliferationsversuche des ersten Ansatzes gewählt, dreimal die Population aus den 7.500 ausgesäten Zellen (100 Zellen pro $cm^2$) und einmal die Population aus den 750 ausgesäten Zellen (10 Zellen pro $cm^2$). Die heterogene Morphologie der

einzelnen Zellkolonien innerhalb einer Flasche konnte bestätigt werden. Zumeist waren spindelig geformte fibroblastenartige Zellen mit vereinzelten größeren abgeflachten Zellen zu erkennen. Die nachfolgenden ausgewählten Abbildungen, aufgenommen mit dem Lichtmikroskop, dienen der exemplarischen Veranschaulichung des Wachstums zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit unterschiedlicher Dichte (Abbildung 21, Abbildung 22, Abbildung 23).

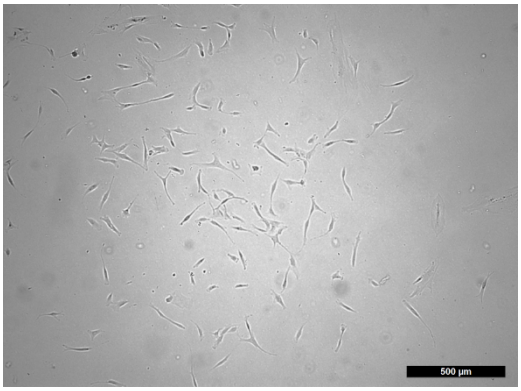



10 Tage nach Aussaat

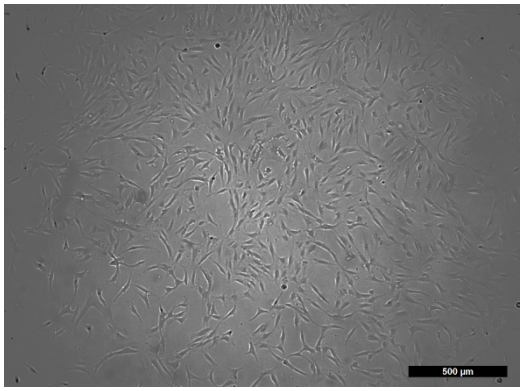



16 Tage nach Aussaat

*Abbildung 21: Ursprünglich ausgesäte Dichte von **10 Zellen pro cm²** (750 Zellen) Lichtmikroskopische Aufnahme der BMSC Proliferation nach 10 und nach 16 Tagen. Maßstab 500 µm. Hier zu sehen sind eher spindelig geformte fibroblastenartige vereinzelte Zellen.*

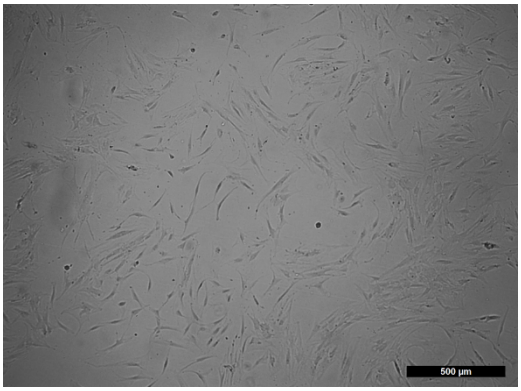



10 Tage nach Aussaat

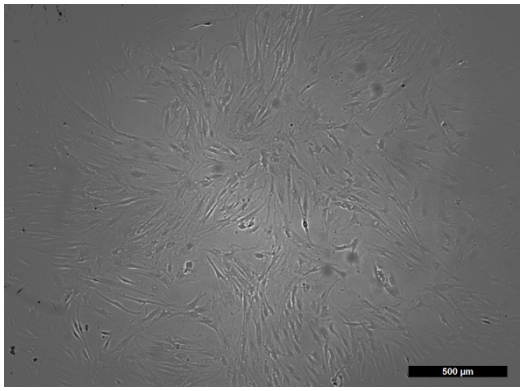



16 Tage nach Aussaat

*Abbildung 22: Ursprünglich ausgesäte Dichte von **100 Zellen pro cm²** (7.500 Zellen) Lichtmikroskopische Aufnahme der BMSC Proliferation nach 10 und nach 16 Tagen. Maßstab 500 µm. Hier zu sehen sind eher spindelig geformte fibroblastenartige Zellen mit vereinzelten größeren abgeflachten Zellen.*




10 Tage nach Aussaat




16 Tage nach Aussaat

*Abbildung 23: Ursprünglich ausgesäte Dichte von **1.000 Zellen pro cm²** (75.000 Zellen)*
*Lichtmikroskopische Aufnahme der BMSC Proliferation nach 10 und nach 16 Tagen. Maßstab 500 µm. Hier zu sehen sind eher größere abgeflachte Zellen, die sich langsamer teilen und weniger dicht zueinander liegen, wobei diese Morphologie in einer noch dichter ausgesäten Zellkulturflasche noch ausgeprägter ist, wie an dieser Stelle.*

## 3.5 Magnetische-Zellsortierung nach Stro-1+ Bone marrow stem cells

Für den zweiten Proliferations-Ansatz wurden die BMSC der P1 zunächst nach dem Oberflächenmarker Stro-1 mittels magnetischer Zellsortierung aufgetrennt. Bei einer durchschnittlichen Ausgangszellzahl von 4.092.550 (gezählt mit dem Casy Zellzählungsgerät), konnte ein Ertrag von durchschnittlich 54.060 Zellen (gezählt mit der Neubauerkammer) bzw. 93.503 Zellen (gezählt mit dem Casy Zellzählungsgerät) erreicht werden. Das entspricht nach Berechnung aus den Mittelwerten etwa 1,32% (Neubauerkammer) bzw. 2,28% (Casy Zellzählungsgerät) an Ausbeute. Abbildung 24 gibt einen Gesamtüberblick der Zellzahlen jeweils vor und nach der Sortierung.

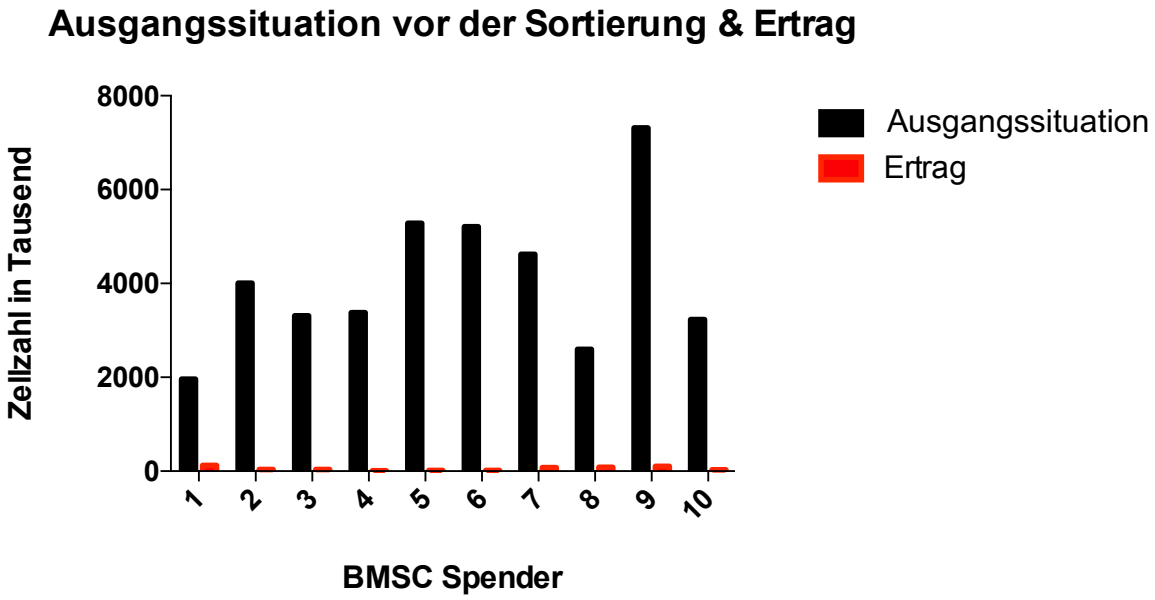



*Abbildung 24: Überblick der BMSC-Zellzahl vor und nach der Sortierung für den Marker Stro-1*
*Darstellung in einem Balkendiagramm. Die schwarzen Balken spiegeln die Zellzahlen vor der magnetischen Sortierung wieder und wurden mit dem Casy Zellzählungsgerät gemessen. Die roten Balken zeigen den Ertrag der Stro-1+ BMSC nach der Sortierung. Die Zellzahl ist in Tausend angegeben.*

## 3.6 Proliferationsanalyse und Co-Kultur

Der Proliferationsversuch ermöglicht einen direkten Vergleich des Wachstumsverhaltens der FaDu Zellen, die einzeln gewachsen sind, mit denen der Co-Kultur. In einem Proliferationsmodell wurde dies für jeweils drei verschiedene Ansätze geprüft, wobei sich die Voraussetzungen der BMSC, mit denen co-kultiviert wurde, jeweils unterscheiden. Für Ansatz 1 mit den dünn ausgesäten BMSC und für Ansatz 3 mit BMSC aus der P2, wurde jeweils eine 12-Wellplatte mit einer Viererreihe FaDu Zellen, einer weiteren mit BMSC und einer letzten mit einer Co-Kultur aus beiden Zellarten befüllt (Tag 0) und an vier Tagen jeweils die einzelnen Reihen gezählt. Für Ansatz 2 mit den Stro-1+ BMSC wurden jeweils nur einmal FaDu Zellen, Stro-1+ BMSC und eine Co-Kultur aus beiden ausgesät (Tag 0) und somit auch nur einmal – am 4. Tag – gezählt. Die gesamten Datensätze der Proliferationsversuche sind im Anhang zu finden (6.2).

### 3.6.1 Proliferationsanalyse für Bone marrow stem cells aller Ansätze und FaDu Zellen für Tag 4 im Überblick

Insgesamt zeigte sich auch in der Proliferationsanalyse ein deutlich schnelleres Wachstum der FaDu Zellen und ein vermindertes Wachstum der BMSC. Zusätzlich zeigte sich eine Tendenz, dass die BMSC der Co-Kultur schlechter proliferiert sind, als die der Monokultur. In den folgenden Boxplot Darstellungen sind die mit der Neubauerkammer ausgewerteten Zellzahlen an Zähltag 4 für jeweils alle drei Ansätze zu sehen (Abbildung 25, Abbildung 26, Abbildung 27).

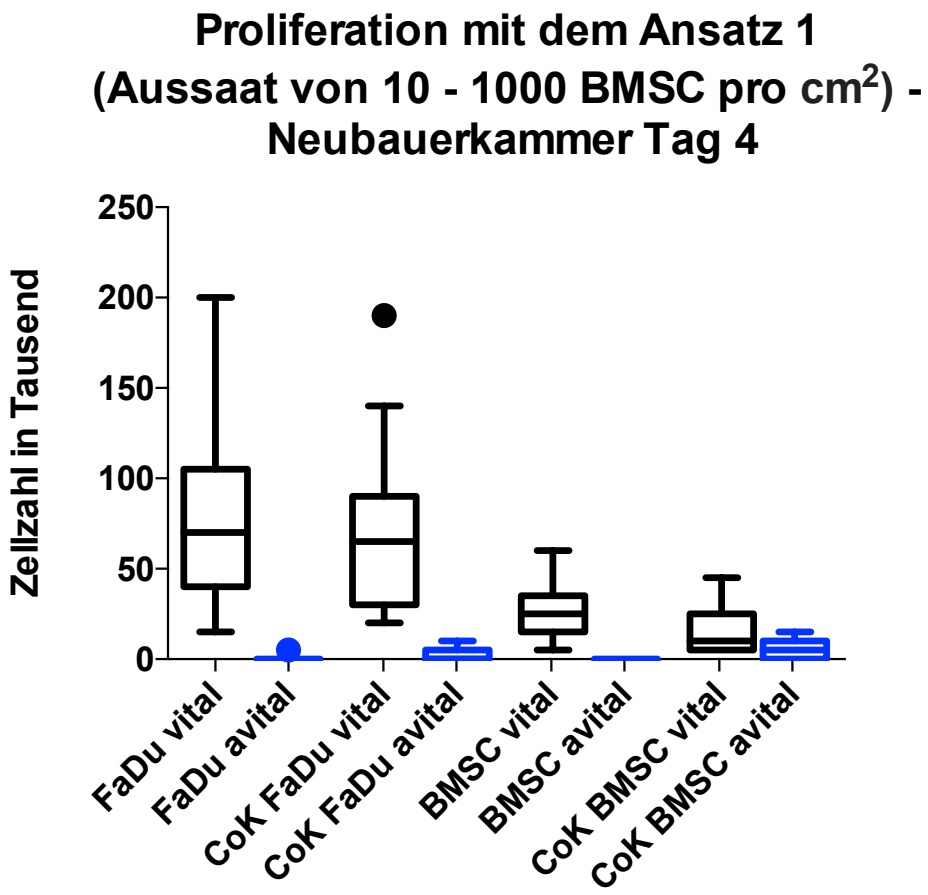



*Abbildung 25: Proliferation mit dem BMSC **Ansatz 1** an Tag 4 ausgewertet mit den Zähldaten aus der Neubauerkammer am 4. Zähltag, nach Aussaat mit den BMSC aus Ansatz 1 (ursprünglich ausgesät mit geringer Dichte von 10 – 1000 Zellen pro cm²). FaDu und BMSC Proliferation sind dargestellt in einem Boxplot: Die schwarzen Boxen stehen für die Werte der vitalen Zellen, die blauen Boxen stehen für die Werte der avitalen Zellen. Die Zellzahl ist in Tausend angegeben.*

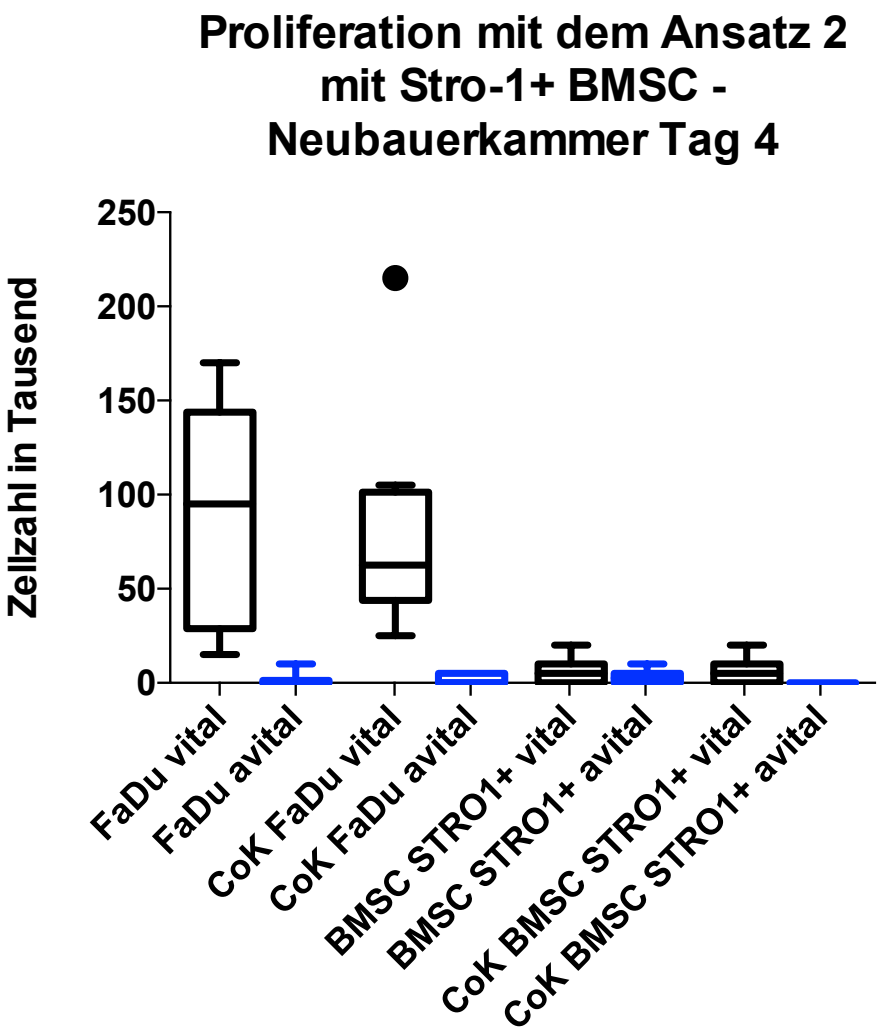



*Abbildung 26: Proliferation mit dem BMSC **Ansatz 2** an Tag 4 ausgewertet mit den Zähldaten aus der Neubauerkammer am 4. Zähltag, nach Aussaat mit den BMSC aus Ansatz 2 (mit Stro-1+ BMSC). FaDu und BMSC Proliferation sind dargestellt in einem Boxplot: Die schwarzen Boxen stehen für die Werte der vitalen Zellen, die blauen Boxen stehen für die Werte der avitalen Zellen. Die Zellzahl ist in Tausend angegeben.*

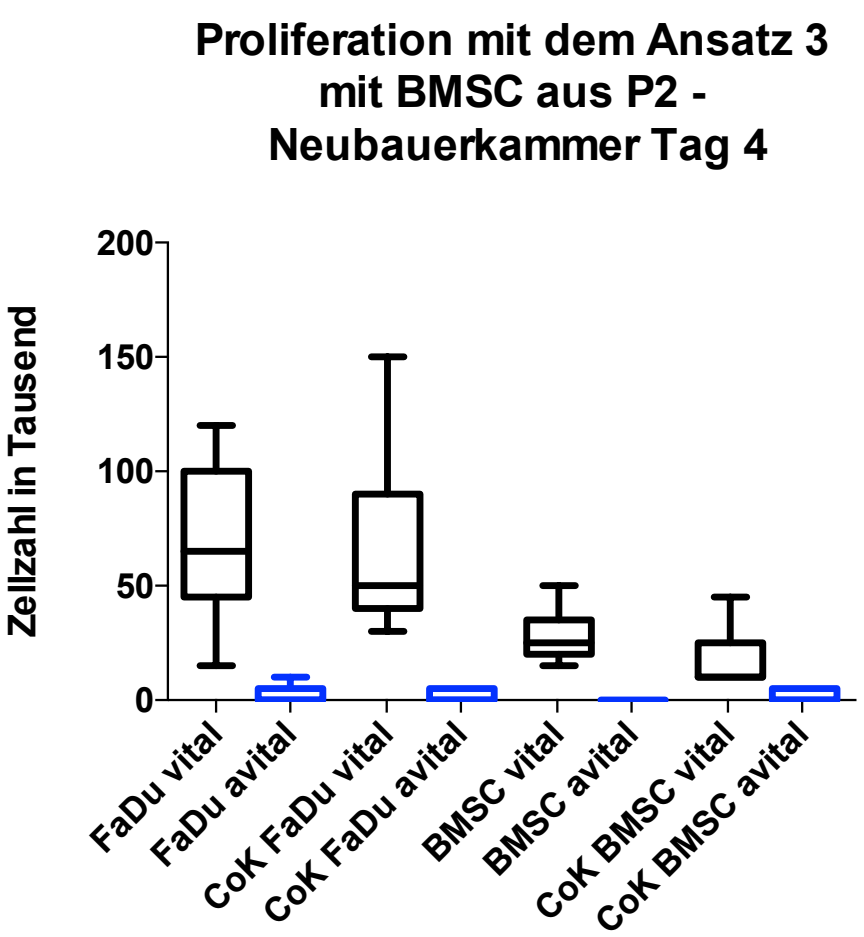



*Abbildung 27: Proliferation mit dem BMSC **Ansatz 3** an Tag 4 ausgewertet mit den Zähldaten aus der Neubauerkammer am 4. Zähltag, nach Aussaat mit den BMSC aus Ansatz 3 (ursprünglich BMSC der P2). FaDu und BMSC Proliferation sind dargestellt in einem Boxplot: Die schwarzen Boxen stehen für die Werte der vitalen Zellen, die blauen Boxen stehen für die Werte der avitalen Zellen. Die Zellzahl ist in Tausend angegeben.*

### 3.6.2 Proliferationsvergleich FaDu Monokultur vs. FaDu Co-Kultur für Ansatz 1

Für den ersten Ansatz wurden BMSC besonders dünn ausgesät, mit dem Ziel hochproliferative Klone zu erzeugen. Dies wurde für 10 Zellen pro $cm^2$, 100 Zellen pro $cm^2$ und 1000 Zellen pro $cm^2$ angesetzt. Die Population, die am besten gewachsen war, wurde anschließend für den Proliferationsversuch mit FaDu Zellen verwendet. Abbildung 28 zeigt eine Gesamtübersicht der Proliferation der FaDu Zellen der Monokultur verglichen mit den FaDu Zellen der Co-Kultur im zeitlichen Verlauf aus den Werten der Neubauerkammer. Bei der

Auswertung mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest zeigten sich keine signifikanten Proliferationsunterschiede bei einem P-Wert von 0,6426 für den letzten Zähltag (Tag 4). Ergänzende Zahlenwerte finden sich in tabellarischer Form im Anhang. Auch die FaDu Proliferation in der Co-Kultur mit den einzigen eindeutig hochproliferativen BMSC Klonen aus ursprünglich 10 ausgesäten BMSC pro $cm^2$ zeigte im Vergleich kein verstärktes Wachstum (6.2.7, Spender 7, Ansatz 1).

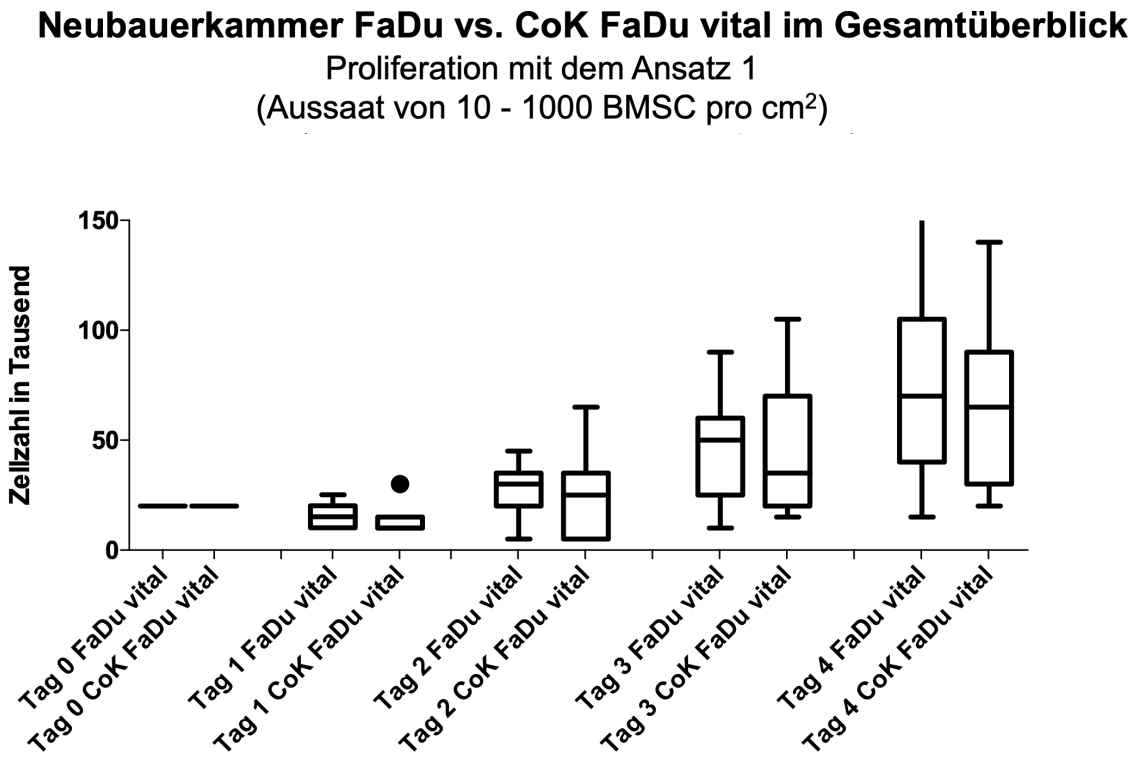



*Abbildung 28: FaDu Proliferation mit dem BMSC **Ansatz 1** im zeitlichen Verlauf Proliferationsvergleich zwischen den vitalen FaDu Zellen und den vitalen FaDu Zellen der Co-Kultur im Verlauf von Tag 1 – 4, nach Aussaat mit BMSC der P1 aus Ansatz 1 (ursprünglich ausgesät mit 10 – 1000 Zellen pro $cm^2$) anhand der Werte der Neubauerkammer. Ein T-Whisker mit Maximalwert (Y=200) der FaDu Zellen an Tag 4 sowie ein Ausreißer (Y=190) der CoK FaDu Zellen an Tag 4 wurden zur besseren Skalierung abgeschnitten. Zellzahl in Tausend.*

### 3.6.3 Proliferationsvergleich FaDu Monokultur vs. FaDu Co-Kultur für Ansatz 2

Im zweiten Ansatz wurden BMSC mittels MACS-Methode nach dem Oberflächenmarker Stro-1 sortiert. Der Ertrag wurde jeweils für einen Proliferationsversuch mit FaDu Zellen eingesetzt (Tag 0) und an Tag 4 gezählt. Abbildung 29 zeigt die graphischen Ergebnisse der Proliferation der FaDu Zellen in der Monokultur im Gegensatz zu den FaDu Zellen der Co-Kultur anhand der Werte der Neubauerkammer. Es konnte im Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest kein signifikantes Ergebnis mit einem P-Wert von 0,3828 festgestellt werden. Ergänzende Zahlenwerte finden sich in tabellarischer Form im Anhang.

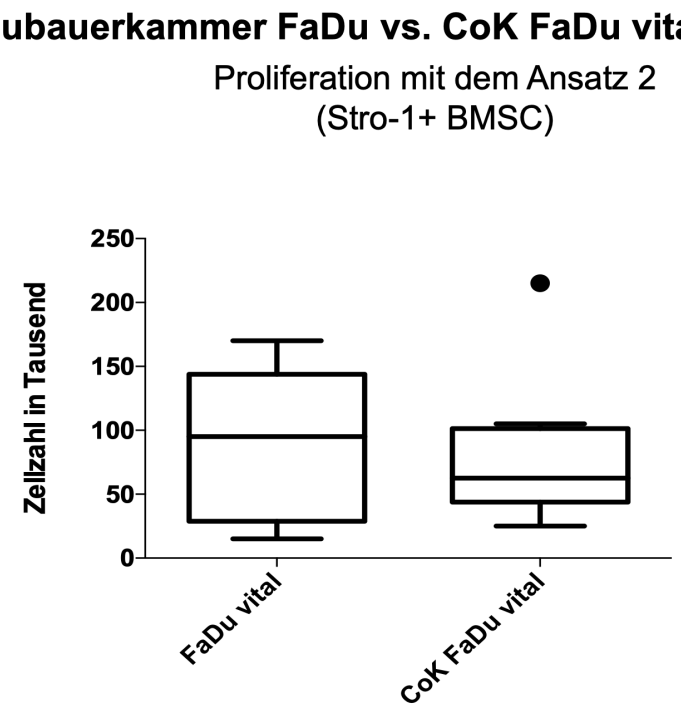



*Abbildung 29: FaDu Proliferation mit dem BMSC **Ansatz 2***
*Proliferationsvergleich zwischen den vitalen FaDu Zellen und den vitalen FaDu Zellen der Co-Kultur an Zähltag 4, nach Aussaat mit Stro-1+ BMSC aus Ansatz 2 anhand der Werte der Neubauerkammer. Zellzahl in Tausend.*

### 3.6.4 Proliferationsvergleich FaDu Monokultur vs. FaDu Co-Kultur für Ansatz 3

Der dritte Ansatz umfasste BMSC, die bis zur P2 kultiviert wurden, um sie sodann für den Proliferationsversuch mit den FaDu Zellen auszusäen. In Abbildung 30 ist die Proliferation der FaDu Monokultur-Zellen und FaDu Co-Kultur-Zellen im zeitlichen Verlauf aus den Werten der Neubauerkammer zu sehen. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest erbrachte für Tag 4 keine signifikanten Proliferationsunterschiede bei einem P-Wert von 0,7070. Ergänzende Zahlenwerte finden sich in tabellarischer Form im Anhang.

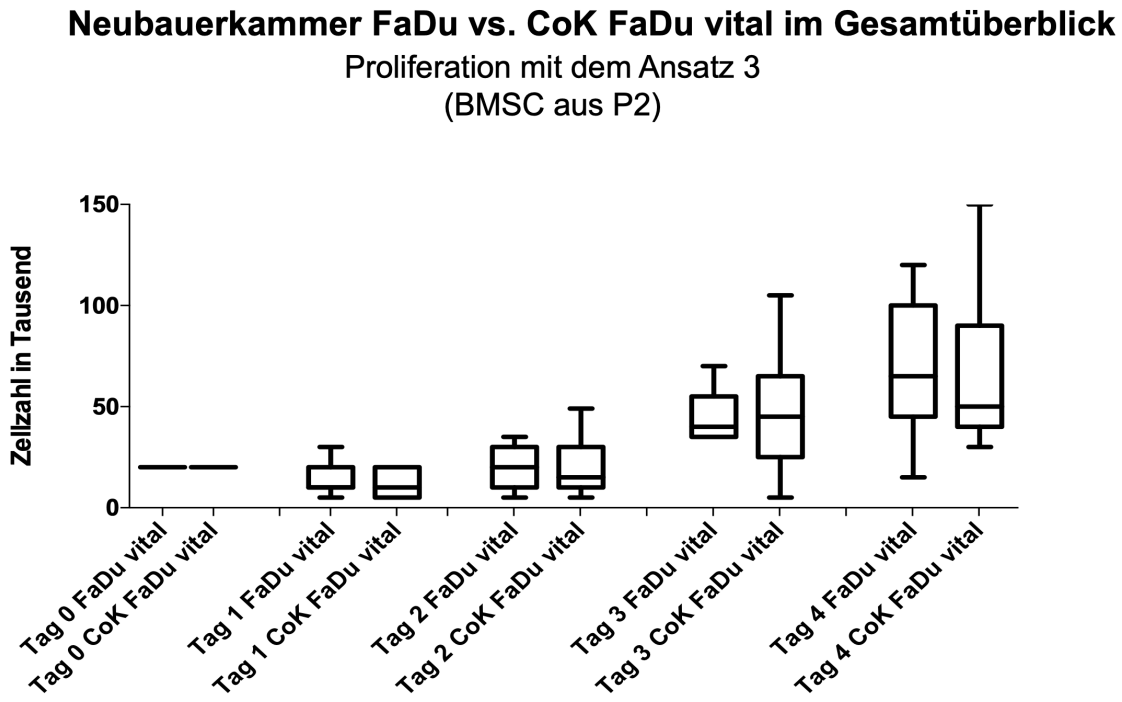



*Abbildung 30: FaDu Proliferation mit dem BMSC **Ansatz 3** im zeitlichen Verlauf Proliferationsvergleich zwischen den vitalen FaDu Zellen und den vitalen FaDu Zellen der Co-Kultur im Verlauf von Tag 1 – 4, nach Aussaat mit den BMSC der P2 aus Ansatz 3 anhand der Werte der Neubauerkammer. Zellzahl in Tausend.*

## 3.7 Reliabilitätsanalyse Casy-Daten vs. Neubauerkammer-Daten

Aufgrund der unterschiedlichen Zählmethoden bei der Zellzählung der Proliferationsversuche mit der Neubauerkammer und dem Casy Zellzählungsgerät und der Diskrepanz der Ergebnisse (Stro-1 BMSC Ertrag 1,3% vs. 2,3%; siehe auch Kapitel 3.5), soll an dieser Stelle eine Reliabilitätsanalyse anhand einer Intra-Klassen-Korrelation (ICC) folgen, die die beiden Messmethoden auf ihre Zuverlässigkeit prüft. Hierfür werden die unterschiedlich gemessenen Zellzahlen von den vitalen FaDu Zellen und den vitalen FaDu Zellen der Co-Kultur jeweils für alle Ansätze miteinander verglichen.

Von sechs Intra-Klassen-Korrelationsvergleichen fielen vier mit Werten im Bereich zwischen 0,75 – 0,9 aus, einer mit >0,9 und einer zwischen 0,5 – 0,75. Das 95%-Konfidenzintervalle (CI) für die ICC Werte hat eine große Breite (Abbildung 31, Abbildung 32, Abbildung 33).

| | Ansatz 1 (mit 10 – 1000 ausgesäten BMSC pro cm²) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | FaDu Monokultur | | FaDu CoKultur | |
| | *Neubauerkammer vs. Casy* | | *Neubauerkammer vs. Casy* | |
| **ICC** | 0,868 | | 0,939 | |
| **CI 95% -** *lower value* | 0,512 | | 0,156 | |
| **CI 95% -** *upper value* | 0,964 | | 0,988 | |
| **BMSC Spender 01** | 30.000 | 49.630 | 20.000 | 46.250 |
| **BMSC Spender 02** | 95.000 | 145.700 | 140.000 | 148.900 |
| **BMSC Spender 03** | 95.000 | 89.220 | 50.000 | 76.000 |
| **BMSC Spender 04** | 200.000 | 184.800 | 190.000 | 214.300 |
| **BMSC Spender 05** | 105.000 | 116.500 | 80.000 | 104.900 |
| **BMSC Spender 06** | 120.000 | 88.520 | 50.000 | 103.400 |
| **BMSC Spender 07** | 55.000 | 39.500 | 25.000 | 35.510 |
| **BMSC Spender 08** | 15.000 | 28.930 | 30.000 | 33.170 |
| **BMSC Spender 09** | 40.000 | 65.920 | 90.000 | 123.300 |
| **BMSC Spender 10** | 55.000 | 69.380 | 65.000 | 63.230 |
| **BMSC Spender 11** | 70.000 | 84.710 | 70.000 | 99.350 |

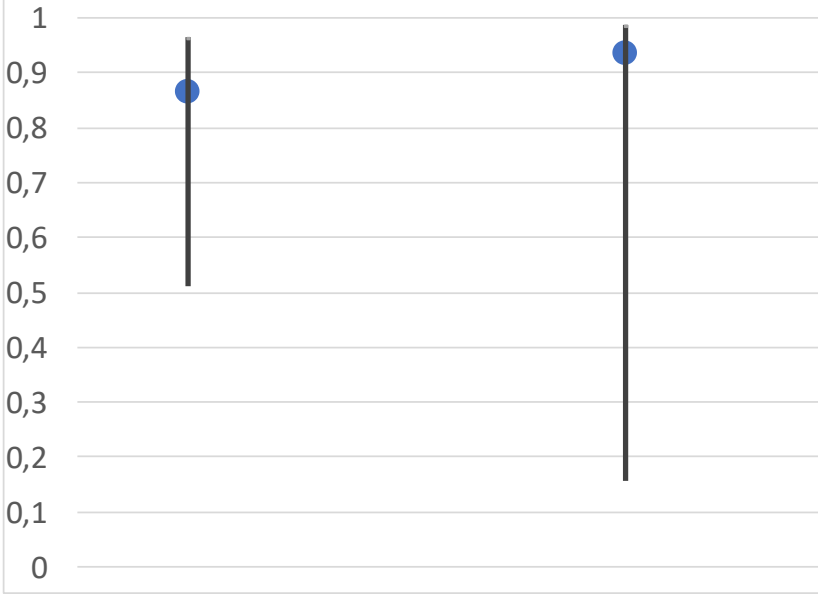



*Abbildung 31: Neubauerkammer vs. Casy Zellzählungsgerät: ICC Analyse mit herangezogenen Werten der FaDu Proliferation mit* ***Ansatz 1***
*Aus allen Zähldaten des 4. Tages der Proliferationsanalyse der vitalen FaDu Monokultur Zellen und Co-Kultur FaDu Zellen wurde eine ICC Analyse durchgeführt, um die beiden Messmethoden auf ihre Zuverlässigkeit zu prüfen. (dunkelgrün: Werte exzellent (>0,9); hellgrün: Werte gut (0,75 – 0,9); rot: Werte moderat (0,5 – 0,75)). CIs als schwarze Linien begrenzt, ICC als blaue Punkte dargestellt. Die CI werden mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% angegeben.*

| | Ansatz 2 (mit Stro-1+ BMSC) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **FaDu Monokultur** *Neubauerkammer vs. Casy* | | **FaDu CoKultur** *Neubauerkammer vs. Casy* | |
| **ICC** | 0,528 | | 0,826 | |
| **CI 95% -** *lower value* | -1,236 | | 0,359 | |
| **CI 95% -** *upper value* | 0,887 | | 0,956 | |
| **BMSC Spender 01** | 15.000 | 103.700 | 55.000 | 104.800 |
| **BMSC Spender 02** | 25.000 | 106.500 | 25.000 | 111.400 |
| **BMSC Spender 03** | 155.000 | 176.000 | 215.000 | 188.400 |
| **BMSC Spender 04** | 85.000 | 122.300 | 70.000 | 113.900 |
| **BMSC Spender 05** | 140.000 | 92.680 | 100.000 | 92.070 |
| **BMSC Spender 06** | 170.000 | 105.000 | 105.000 | 95.710 |
| **BMSC Spender 07** | | | | |
| **BMSC Spender 08** | 125.000 | 79.950 | 55.000 | 64.010 |
| **BMSC Spender 09** | 30.000 | 56.470 | 40.000 | 54.140 |
| **BMSC Spender 10** | 105.000 | 55.430 | 45.000 | 66.700 |
| **BMSC Spender 11** | 60.000 | 45.650 | 75.000 | 54.920 |

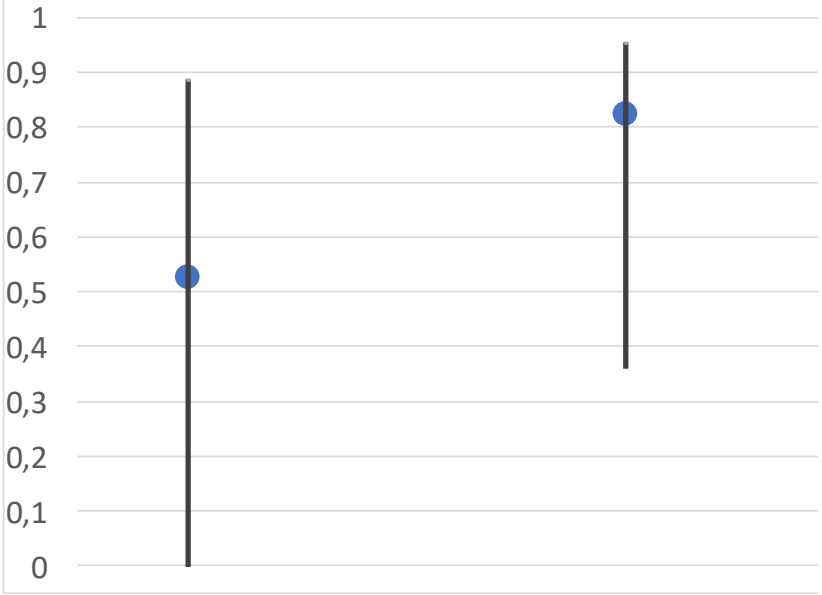



*Abbildung 32: Neubauerkammer vs. Casy Zellzählungsgerät: ICC Analyse mit herangezogenen Werten der FaDu Proliferation mit* ***Ansatz 2***
*Aus allen Zähldaten des 4. Tages der Proliferationsanalyse der vitalen FaDu Monokultur Zellen und Co-Kultur FaDu Zellen wurde eine ICC Analyse durchgeführt, um die beiden Messmethoden auf ihre Zuverlässigkeit zu prüfen. (dunkelgrün: Werte exzellent (>0,9); hellgrün: Werte gut (0,75 – 0,9); rot: Werte moderat (0,5 – 0,75)). CIs als schwarze Linien begrenzt, ICC als blaue Punkte dargestellt. Die CI werden mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% angegeben. Spender 7 wurde aufgrund eines methodischen Fehlers ausgeschlossen.*

| | Ansatz 3 (mit BMSC in P2) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **FaDu Monokultur** *Neubauerkammer vs. Casy* | | **FaDu CoKultur** *Neubauerkammer vs. Casy* | |
| **ICC** | 0,888 | | 0,848 | |
| **CI 95% -** *lower value* | 0,609 | | 0,448 | |
| **CI 95% -** *upper value* | 0,969 | | 0,959 | |
| **BMSC Spender 01** | 20.000 | 48.680 | 40.000 | 59.680 |
| **BMSC Spender 02** | 120.000 | 159.600 | 90.000 | 142.100 |
| **BMSC Spender 03** | 15.000 | 33.780 | 30.000 | 38.020 |
| **BMSC Spender 04** | 100.000 | 113.600 | 150.000 | 117.600 |
| **BMSC Spender 05** | 80.000 | 69.640 | 115.000 | 76.740 |
| **BMSC Spender 06** | 45.000 | 62.230 | 30.000 | 56.730 |
| **BMSC Spender 07** | 100.000 | 95.370 | 90.000 | 85.400 |
| **BMSC Spender 08** | 85.000 | 40.620 | 50.000 | 38.460 |
| **BMSC Spender 09** | 50.000 | 63.750 | 50.000 | 55.690 |
| **BMSC Spender 10** | 45.000 | 46.510 | 40.000 | 58.030 |
| **BMSC Spender 11** | 65.000 | 76.480 | 75.000 | 98.830 |

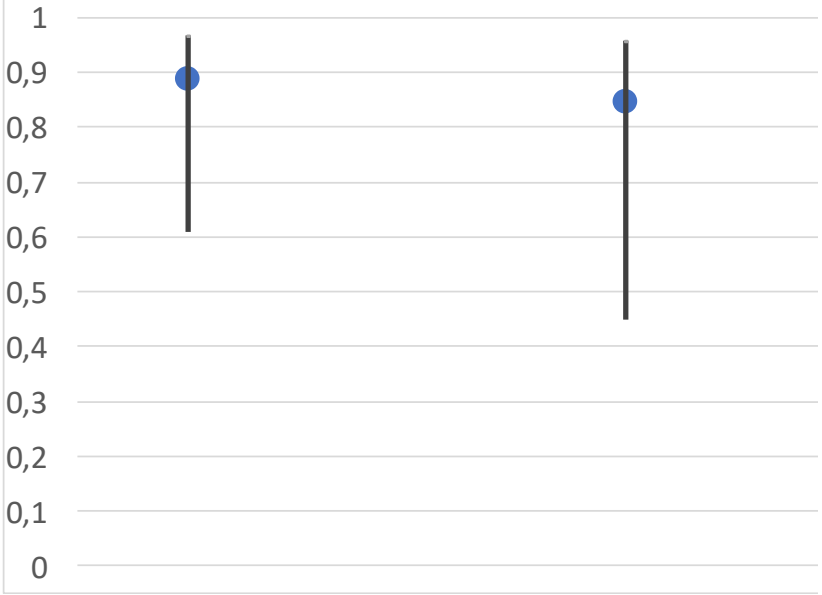



*Abbildung 33: Neubauerkammer vs. Casy Zellzählungsgerät: ICC Analyse mit herangezogenen Werten der FaDu Proliferation mit* ***Ansatz 3***
*Aus allen Zähldaten des 4. Tages der Proliferationsanalyse der vitalen FaDu Monokultur Zellen und Co-Kultur FaDu Zellen wurde eine ICC Analyse durchgeführt, um die beiden Messmethoden auf ihre Zuverlässigkeit zu prüfen. (dunkelgrün: Werte exzellent (>0,9); hellgrün: Werte gut (0,75 – 0,9); rot: Werte moderat (0,5 – 0,75)). CIs als schwarze Linien begrenzt, ICC als blaue Punkte dargestellt. Die CI werden mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% angegeben.*

## 3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mittels Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass die BMSC positiv für die Marker CD73, CD90 und CD105 sind und negativ für CD34 und CD45. Es konnte ein positives Ergebnis für den Stro-1 Marker verzeichnet werden. In der Zellkultur zeigte sich die Fähigkeit des Wachstums in Zellkulturflaschen am Plastikboden. Ebenso wurde eine Differenzierungsfähigkeit in Knochen- und Fettgewebe bewiesen. Die BMSC wiesen eine teils sehr heterogene Morphologie innerhalb einer Population auf und ein insgesamt eher langsames Wachstum im Vergleich zu den FaDu Zellen. Eine Generierung hochproliferativer Klone nach Aussäen der Zellen mit geringem Dichtegrad konnte nicht bestätigt werden. Von 11 Versuchen waren in der am dünnsten ausgesäten Flasche (10 Zellen pro $cm^2$) nur insgesamt zweimal eine eindeutig hochproliferative Kolonie zu sehen. Diese wies jedoch auch jeweils die typischen morphologischen Eigenschaften auf.

Die magnetische Sortierung der BMSC nach dem Oberflächenmarker Stro-1 fiel quantitativ gering aus. Ausgehend von der Ausgangszellzahl, gezählt mit dem Casy Zellzählungsgerät, konnte im Schnitt ein durchschnittlicher Ertrag von 1,32% (Neubauerkammer) bzw. 2,28% (Casy Zellzählungsgerät) erzielt werden. Trotzdem wurden die sortierten Zellen jedes Mal für den anschließenden Proliferationsversuch mit den FaDu Zellen eingesetzt.

Die Proliferationsanalysen mit den drei verschiedenen BMSC-Ansätzen brachten in ihrem Vergleich zwischen FaDu Zellen und FaDu Zellen der Co-Kultur keine Unterschiede. Die Varianzen der Proliferationsdaten sind sehr groß. Generell proliferieren die BMSC in der Co-Kultur schlechter, als die der Monokultur.

Die Reliabilitätsanalyse für die beiden Zellzählmessmethoden Neubauerkammer und Casy Zellzählungsgerät zeigte keine wesentlichen Unterschiede in den entsprechenden Datensätzen. Die ICC Werte nahmen überwiegend einen Wert von >0,75 an.

# 4 DISKUSSION

Um mesenchymale Stammzellen zukünftig als Therapieoption zur spezifischen Behandlung von Tumorerkrankungen zum Beispiel in Form von zellbasierter selektiver Chemotherapie einsetzen zu können, müssen zunächst die grundlegenden Interaktionen zwischen Stammzellen und Tumorzellen verstanden werden. In der vorliegenden Arbeit wurde vor allem das Proliferationsverhalten der FaDu Zellen unter verschiedenen Voraussetzungen, in Co-Kultur mit BMSC untersucht, mit dem Ziel mögliche Gründe für die in der Literatur kontrovers diskutierten Interaktionen zwischen mesenchymalen Stammzellen und Tumorzellen zu finden. Im Folgenden sollen Methodik und Ergebnisse diskutiert werden.

## 4.1 Diskussion der Methodik

### 4.1.1 Zellkultur-Führung: Ein Standard?

Für diese Studie wurde ausschließlich mit frischen und nicht kryokonservierten BMSC gearbeitet. Spender mit hämatopoetischen Erkrankungen wurden ausgeschlossen. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen war stark abhängig vom jeweiligen Spender und folgte keinem erkennbaren Muster. Es konnte die starke Heterogenität der BMSC in ihrer Morphologie (3.4.2), wie in der mehrfach aufgeführten Literatur beschrieben (1.2.2), bestätigt werden. Die Methode der Zellkultivierung ist zwar etabliert, jedoch gibt es zahlreiche Unterschiede in Isolierung und Kultivierung (Stute et al. 2004). Bartmann et al. wählte beispielsweise die Isolierungsmethode durch Knochenmarksaspiration (Bartmann et al. 2007). Bei der Zusammensetzung des Mediums wird in manchen Studien beispielsweise das FCS durch autologes Serum ersetzt (Stute, Holtz et al. 2004; Jung et al. 2012). Hintergrund hierbei ist, dass man mesenchymale Stammzellen tauglicher für die zellbasierte Therapie machen möchte, ohne auf tierische Zusätze angewiesen zu sein. Die Frage ist, ob dies Einfluss auf die Proliferation und Entwicklung der Zellen nimmt und ob diese

Versuche, dann noch mit anderen Studien mit BMSC Kulturen basierend auf einem FCS-haltigen Medium vergleichbar sind.

### 4.1.2 Herausforderungen der dünnen Aussaat von Zellen

Mesenchymale Stammzellen stellen eine breit gefächerte Zellpopulation dar. Rein morphologisch sind drei Subpopulationen innerhalb einer angesetzten Kultur abgrenzbar: Kleine hochproliferative Zellen, spindelig geformte Zellen und große abgeflachte Zellen (Digirolamo, Stokes et al. 1999; Colter, Class et al. 2000; Prockop, Sekiya et al. 2001; Sekiya, Larson et al. 2002). Kleine, hochproliferative Zellen zeigen die höchste Fähigkeit zur Multipotenz, während spindelig geformte Zellen das größte Potenzial zeigen, sich in Knorpel zu differenzieren (Sekiya, Larson et al. 2002). Haasters et al. bestätigten 2009, dass die Unterschiede nicht nur morphologischer Art, sondern auch immunhistochemisch manifestiert sind (Haasters, Prall et al. 2009) (1.2.2).

Dieses in der oben genannten Literatur beschriebene häufige Auftreten hochproliferativer Klone nach einer Aussaat mit geringer Dichte konnte in dieser Arbeit jedoch nicht festgestellt werden. Die Zellen wuchsen zumeist deutlich schneller bei dichterer Aussaat und engerem Zellkontakt. Die stark variierende Morphologie einzelner Kolonien in den Flaschen mit spindelförmigen dünnen, großen abgeflachten und hin und wieder hochproliferativen kleinen Zellen konnte bestätigt werden. Dieses Phänomen wurde auch in allen drei Dichtestufen beobachtet, wobei mit zunehmend dichter ausgesäten Zellen, die Morphologie mit großen abgeflachten BMSC dominierte.

Die verwendeten Stammzellen, die in den benannten Studien zu diesem Thema beschrieben werden, sind meist, ebenso wie in dieser Arbeit, mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark. Nun stellt sich also die Frage, warum das Phänomen der kleinen hochproliferativen BMSC in dieser Studie nicht immer zum Vorschein kam? Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass nicht in jeder Zellkulturflasche mit 10 ausgesäten Zellen pro $cm^2$ ein hochproliferativer Klon aus der Ursprungsflasche war, da das Volumen für die Überführung und Aussaat nur sehr gering ist. Weiterhin gab es in den einzelnen aufgeführten Studien

unterschiedliche Isolationsmethoden der mesenchymalen Stammzellen, die möglicherweise Einfluss auf die Reinheit der Zellen hat. Digirolamo et al. isolierten das Knochenmark per Aspiration am Beckenkamm (Digirolamo, Stokes et al. 1999), während die BMSC in dieser Arbeit aus dem entnommenen Hüftkopf nach einer modifizierten Methode von Haynesworth et al. isoliert wurden (Haynesworth, Goshima et al. 1992). Die ausgewählten Spender der Arbeitsgruppe Haasters et al. waren beispielsweise alle zwischen 18 und 25 Jahre alt (Haasters, Prall et al. 2009) – die Spender in dieser Arbeit jedoch deutlich älter (Tabelle 1). Überdies arbeiteten Haasters et al. auch mit Passagen zwischen P4 und P7 (Haasters, Prall et al. 2009). Mets und Verdonk demonstrierten 1980, dass mesenchymale Stammzellen niedrigerer Passagen noch sehr heterogen sind mit großen, sich langsam teilenden Zellen und spindelförmigen kleinen Zellen, während höhere Passagen homogener sind mit lediglich großen, langsam proliferierenden Zellen. Allerdings wurde ab der 11. Passage eine Abnahme der Wachstumsrate und Zelldichte festgestellt und ab P17 ein Wachstumsstopp (Mets and Verdonk 1981). In dieser Studie wurde mit Zellen der P1 experimentiert. Eventuell werden doch geringfügig höhergradige Passagen benötigt, um den Effekt der hochproliferativen Klone zu erzielen.

Fast unmöglich war die Anforderung, eine Konfluenz von maximal 50% nicht zu überschreiten, um Differenzierungen zu vermeiden, da eine gewisse Zellzahl für die darauffolgenden Versuche benötigt wurde. Dies führte auch dazu, dass die erste Flasche mit einem hochproliferativen Klon zu wenig BMSC für die Proliferationsversuche beinhaltet, weshalb an dieser Stelle auf eine Flasche mit dichter ausgesäten Zellen zurückgegriffen werden musste. Zwar zeigte sich in dieser Kultur die typische Morphologie kleiner homogener Klone, die rasch konfluierten. Jedoch war die Gesamtanzahl immer noch zu gering, um ausreichend Zellen für den nachfolgenden Versuch zu haben. In den überwiegenden Fällen war die Konfluenz der Zellkulturflasche größer als 50%.

### 4.1.3 Vorteile der magnetischen Zellseparation

Für eine reine Stro-1+ BMSC Kultur wurde mit einer magnetischen Zellseparation gearbeitet. Durch die säulenbasierte magnetische Zellseparation wird das Magnetfeld, welches auf die Microbeads an den Zellen wirkt, extrem stark amplifiziert. Dies ermöglicht ein optimales Sortierungsergebnis auch bei geringeren Zellmengen und kleinsten Größen der Microbeads. Die in diesen Versuchen verwendeten Microbeads wiesen eine Größe im Nanobereich (50 nm) auf. Säulenfreie Methoden benötigen größere Microbeads, die möglicherweise Einfluss auf die Zellen nehmen könnten und beispielsweise zu unspezifische Bindungen oder Crosslinking von Rezeptoren führen könnten (Mucci et al. 2009). Da für diese Arbeit eine Methode benötigt wurde, die auch für sehr geringe Zellmengen geeignet ist und trotzdem den größtmöglichen Ertrag ohne große Verluste liefert, zudem noch relativ schnell und effektiv durchzuführen ist, wurde die Methode der magnetischen Zellsortierung gewählt.

### 4.1.4 Unterschiedliche Zellzählungsmethoden: Reliabilitätsanalyse für die Neubauerkammer und das Casy Zellzählungsgerät

Die Prüfung auf Vergleichbarkeit bzw. Zuverlässigkeit der unterschiedlichen Zellzählungsmethoden erbrachte keine signifikanten Differenzen. Wie im Material und Methoden Teil bereits erwähnt (2.11), gibt es einen allgemeinen Konsens, dass Werte im Bereich von >0,9 exzellent, zwischen 0,75 – 0,9 gut, zwischen 0,5 – 0,75 moderat und <0,5 schlecht sind (Cicchetti 1994; Portney LG 2000; Koo and Li 2016). Demnach sind vier Werte als gut einzustufen (0,75 – 0,9), einer als exzellent (>0,9) und einer als moderat (0,5 – 0,75). Das heißt, die ICC Werte waren überwiegend gut (0,75 – 0,9) und nur ein Wert war auffallend schlechter bzw. moderat (0,5 – 0,75), was aber wahrscheinlich auf einzelne Messfehler zurückzuführen ist. Werden die maximalen und minimalen 95%-CI mit einbezogen, so weisen die Ergebnisse der Analyse auch einige schlechte Werte (<0,5) auf. Die große Breite der CI rührt daher, dass mit einer sehr kleinen Stichprobengröße gearbeitet wurde und der großen Variabilität der Grundgesamtheit. Hier liegt auch die Begründung für die schlechteren Werte.

Laut Koo et al. wäre idealerweise eine Stichprobengröße von mind. 30 für eine valide ICC-Interpretation zu wählen (Koo and Li 2016). Die Prüfung der Reliabilität dieser beiden Messmethoden wurde jedoch trotz kleiner Stichprobengröße in Absprache mit dem Institut für klinische Epidemiologie und Biometrie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg vollzogen.

Über beide Methoden wird ein Mittelwert errechnet, der jeweils die genaue Zellzahl widerspiegeln soll. Das Casy Zellzählungsgerät wertet insgesamt drei Zellproben aus. In der Neubauerkammer werden vier Kammern ausgezählt, die einen Mittelwert bilden. Beide Methoden sind auch auf ihre Art störanfällig, sodass es bei der Neubauerkammer durch menschliche Fehlerquellen, wie beispielsweise fehlende Resuspension vor der Zählung, falsches Pipettieren oder Verzählen zu falschen Messdaten kommen kann. Bei dem Casy Zellzählungsgerät können zum Beispiel durch Bedienungsfehler oder eventuell auch durch falsch registrierte Partikel Fehler entstehen. Dies wurde selbstverständlich durch sauberes und exaktes Arbeiten versucht zu vermeiden.

Schwierigkeiten ergaben sich in der vorliegenden Studie vor allem, wenn die Zellzahl sehr gering war, sodass man mit der Neubauerkammer teils gar keine Ergebnisse erhielt, während das Casy Zellzählungsgerät noch eine Zellzahl erfassen konnte. Nichtsdestotrotz haben beide Methoden ihre Berechtigung und scheinen sich in ihrer Zuverlässigkeit anzugleichen.

### 4.1.5 Statistik: Nichtparametrischer Test für abhängige Variablen

Zur Prüfung von Proliferationsunterschieden auf Signifikanz ($p \leq 0{,}05$) zwischen FaDu Zellen, die allein gewachsen sind, und FaDu Zellen, die in einer Co-Kultur mit BMSC gewachsen sind, wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest gewählt, da die Werte keiner Normalverteilung entsprachen. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest ist ein nichtparametrischer Test für abhängige Variablen. Abhängig sind die Stichproben in dieser Arbeit deshalb, da innerhalb eines jeden Ansatzes mit FaDu Zellen der gleichen Herkunft gearbeitet wurde und anschließend jeweils

verglichen wurde, ob sie mit oder ohne BMSC besser oder schlechter wachsen. Der Test erbrachte eindeutige Ergebnisse im nicht signifikanten Bereich.

Für die graphische Darstellung der Proliferations-Ergebnisse fiel die Entscheidung bewusst auf das Boxplot Schema, da die Messwerte sehr große Streuungen und Varianzen aufweisen und der Boxplot solche Daten sehr gut verbildlichen kann.

Aufgrund der kleinen Fallzahlen gab es natürlich auch methodische Limitationen der Arbeit. So war es nicht möglich eine Gegenüberstellung der Ergebnisse bezüglich Alter oder Geschlecht vorzunehmen, da sich die Stichproben dadurch noch mehr verkleinert hätten und die Vorrausetzungen für eine statistisch aussagekräftige Analyse nicht mehr gegeben wären.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1 Verifizierung des Immunphänotyps der Bone marrow stem cells anhand ihrer spezifischen Antigene

Die BMSC, mit denen in dieser Arbeit geforscht wurde, wurden anhand ihrer Oberflächenmarker nach den Kriterien der ISCT identifiziert. Das morphologische Aussehen unter dem Mikroskop (Digirolamo, Stokes et al. 1999) und das Wachstumsverhalten (Friedenstein, Chailakhjan et al. 1970), spiegeln größtenteils die Ergebnisse aus der Literatur wider. Auch die Plastikadhärenz konnte bestätigt werden sowie die Differenzierungsfähigkeit in Knochen- und Fettgewebe.

Eine der Hauptfragen, die diese Arbeit vorangetrieben hat, war, warum es so große Differenzen der Ergebnisse in der Stammzellforschung, vor allem auch im Hinblick auf die Interaktion mit Tumorzellen gibt. Deshalb seien an dieser Stelle, die bewusst unter dieser Überschrift gewählt ist, einige grundlegende Kritikpunkte genannt, die die Vergleichbarkeit der Studien untereinander erheblich erschweren.

Eines der großen Probleme in der Stammzellforschung ist, dass es keine eindeutig identifizierenden Kriterien für Stammzellen gibt (Ridge et al. 2017). Zwar hat die ISCT einen Minimalkonsens festgelegt, dennoch ist das eine sehr oberflächliche Definition für mesenchymale Stammzellen, sodass es schwierig bleibt, existierende Untersuchungen miteinander zu vergleichen. Die Unterschiede der vielen Experimente liegen in:

- dem Fehlen von spezifischen Oberflächenmarkern (Sekiya, Larson et al. 2002; Mafi et al. 2011) und dem dadurch resultierenden variablen Umgang der einzelnen Forschungsgruppen hinsichtlich der gewählten Kriterien, die die Stammzellen erfüllen müssen (Ridge, Sullivan et al. 2017).
- der Terminologie der verwendeten mesenchymalen Stammzellen. Die einen nennen sie „mesenchymale Stroma Zellen“, die anderen „mesenchymale Stammzellen“. Problematisch ist auch der fließende Übergang der Stromazellen und der Stammzellen im Isolationsgewebe, wie beispielsweise im Knochenmark. Das fibroblastenartige Aussehen zeigt sich oft bei beiden Zelltypen (Owen 1988; Kuznetsov, Krebsbach et al. 1997; Majumdar, Thiede et al. 1998).
- der unterschiedlichen Herkunft der mesenchymalen Stammzellen bezüglich menschlicher Spender oder Tiermodelle (Digirolamo, Stokes et al. 1999; Poggi et al. 2014).
- dem Isolierungsort der mesenchymalen Stammzellen, da es zahlreiche Entnahmeorte für mesenchymale Stammzellen gibt. Mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe könnten sich anders verhalten als mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark – auch wenn sie in der Lage sind, sich bei entsprechenden Bedingungen in beides zu differenzieren. Riekstina et al. fanden heraus, dass mesenchymale Stammzellen je nach Ursprungsgewebe unterschiedliche pluripotente Marker exprimieren (Riekstina et al. 2009). Darüber hinaus werden selbst Zellen, die aus tumorumgebendem Gewebe entnommen worden sind und als ursprüngliche mesenchymale Stammzellen identifiziert wurden, in den

entsprechenden Arbeiten häufig schlichtweg als „Stammzellen“ bezeichnet (Kansy, Dißmann et al. 2014).

- der Isolierungsmethode und Zellkultur. Allein für Knochenmarkstammzellen gibt es beispielsweise die Möglichkeit der Knochenmarkaspiration oder Isolierung nach Hüftkopfentnahme, die in dieser Arbeit gewählt wurde. Genauso gibt es anschließend Unterschiede in der Zellkultur mit verschiedenen Zusammensetzungen des Mediums (Simmons and Torok-Storb 1991; Haynesworth, Goshima et al. 1992; Pittenger, Mackay et al. 1999; Colter, Class et al. 2000; Stute, Holtz et al. 2004). Stute et al. beobachteten beispielsweise einen Unterschied im Wachstums- und Differenzierungsverhalten von BMSC je nach Zusammensetzung der verschiedenen Mediumkomponenten FCS vs. Autologes Serum. Je nach Mengenverhältnis des Autologen Serums wuchsen und differenzierten sich die BMSC besser bzw. schlechter (Stute, Holtz et al. 2004).
- der äußeren Gestalt. Bereits mesenchymale Knochenmarkstammzellen weisen nicht nur bei Aussaat mit geringer Dichte verschiedene Kolonien mit heterogener Morphologie auf. Es gibt Unterschiede zwischen kleinen hochproliferativen Zellen, spindelig geformten Zellen und großen abgeflachten Zellen (Digirolamo, Stokes et al. 1999; Haasters, Prall et al. 2009).
- dem Differenzierungsstadium. Oftmals ist nicht ganz klar, ob eine höhere Passage einer mesenchymalen Stammzellkultur möglicherweise doch schon zu viele Differenzierungen durchlaufen hat und die Zellen nicht mehr ihre ursprünglichen Eigenschaften besitzen. Höhere Passagen haben geringere Proliferationsraten und mehr Verlust in der Multipotenzierungsfähigkeit (Digirolamo, Stokes et al. 1999; Sekiya et al. 2001). Forschungsgruppen arbeiten mit einer sehr variierenden Passagen-Spannbreite.
- *in vitro*- vs. *in vivo*-Modellen. Dies ist zweifelsfrei ein Problem in vielen Studien. Während *in vitro* der Fokus auf ausgewählte Zellen und

Interaktionen liegt, gibt es *in vivo* noch so viel mehr Austausch zwischen verschiedensten Zellen und dem umgebenden Milieu.

Selbst intraindividuelle Unterschiede sind festzustellen, zum einen möglicherweise abhängig vom Alter der Spender (Majors et al. 1997) und zum anderen gibt es selbst Unterschiede in verschiedenen Knochenmarkaspiraten von ein und denselben Spendern (Digirolamo, Stokes et al. 1999).

Mittlerweile wird sogar in Frage gestellt, ob wir es wirklich mit „echten“ adulten mesenchymalen Stammzellen zu tun haben. Allein die Tatsache, dass man mensenchymale Stammzellen mittlerweile aus fast jedem Gewebe des Körpers isolieren konnte, wirft neue Fragen auf. Wie in der Einleitung bereits beschrieben (1.3.1) gehen einige Forscher sogar davon aus, dass es sich möglicherweise um Perizyten handelt bzw. mesenchymale Stammzellen von diesen abstammen (Crisan, Yap et al. 2008; Caplan 2017). Bemerkenswert ist dabei, dass einer davon der Stammzellforscher Caplan ist, der vor vielen Jahren das Stammzellkonzept mitbegründet hat und nun davor warnt, dieses weiterhin zu akzeptieren. Crisan et al. fand in seinen Untersuchungen an Perizyten heraus, dass diese alle klassischen Marker besaßen (CD105, CD90, CD73), die erstmals für mesenchymale Stammzellen beschrieben wurden und ein osteogenes, chondrogenes und adipogenes Differenzierungspotential besaßen (Crisan, Yap et al. 2008). Caplan legt aufgrund der Funktionen der vermeintlichen mesenchymalen Stammzellen nahe, dass sie mit großer Wahrscheinlichkeit gar keine Stammzellen sind. Er berichtet, dass sich bei einer Entzündung oder Verletzung eines Gefäßes die Perizyten in mesenchymale Stammzellen differenzieren, die anschließend durch Hemmung einer überschießenden Immunreaktion, Stimulation der Angiogenese und weiteren entsprechenden Mediatoren und Reaktionen dafür sorgen, dass das verletzte Gefäß wieder regeneriert (Caplan and Correa 2011; Caplan 2017). Deshalb schlägt er vor, die mesenchymalen Stammzellen in Medicinal Signaling Cell umzubenennen, um weiterhin die Abkürzung MSC gebrauchen zu können. Als neues Stammzellkonzept erwägt er die Existenz einer universellen Stammzellnische, bestehend aus gewebespezifischen Stammzellen, vaskulären Endothelzellen

und gewebe- und ortsspezifischen pMSC (Perizyten MSC), die alle in Kontakt miteinander stehen.

Es stellt sich die Frage, ob diese Erschütterung der Stammzell-Definition überhaupt eine Rolle spielt in den Überlegungen bezüglich der Interaktionen mit Tumorzellen. Das Hauptproblem bleibt die mangelnde Vergleichbarkeit der verschiedenen Forschungsergebnisse, die gleichzeitig die zahlreichen Kontradiktionen erklären kann. Die neuen Erkenntnisse bestätigen jedenfalls einige Reaktionen, die den Tropismus und die Förderung der Tumorzellen angehen (siehe 1.3.1). Weiterhin lässt sich daraus schließen, dass mesenchymale Stammzellen oder auch Perizyten kein vorgegebenes Programm in ihrem Zellzyklus durchlaufen, sondern vielmehr immer abhängig von ihrem Umgebungsmilieu agieren, verschiedene Oberflächenmarker exprimieren und sich entsprechend differenzieren. Auf die Umgebung kommt es an. Dies wird unterstützt durch verschiedene Untersuchungen, die zeigten, dass mesenchymale Stammzellen verschiedene Phänotypen und Oberflächenmarker besaßen, je nachdem in welchen Kulturbedingungen sie angesetzt wurden oder wie dicht sie konfluierten (Lee et al. 2009; Suila et al. 2011; Lv et al. 2014).

Bianco warnt davor, dass das Akronym MSC mittlerweile viel zu breit verwendet wird. Er postuliert, dass endlich eine Trennung der Begrifflichkeiten von statten gehen sollte und Knochenmarkstammzellen nicht mit Gewebestammzellen verglichen werden sollten (Bianco 2014). Es bleibt also abzuwarten, ob es die einheitlich kategorisierten mesenchymalen Stammzellen, die alle Erwartungen der Wissenschaft erfüllen und einen standardisierten Ablauf zeigen, überhaupt gibt.

### 4.2.2 Ertrag der magnetischen Zellsortierung

Der Ertrag Stro-1+ gefilterter BMSC fiel insgesamt sehr gering aus, was aber den vorrausgehenden Nachweis mittels FACS-Methode auf das generelle Vorhandensein des Markers in einer BMSC-Population bestätigt, da auch hier nur sehr wenige BMSC mit dem Marker detektiert wurden. Nach wie vor existiert keine einheitliche Meinung darüber, ob Stro-1 ein spezifischer mesenchymaler

Stammzellmarker ist. Ning et al. beobachteten beispielsweise bei Fettgewebsstammzellen eine vermehrte Expression von Stro-1 erst in höheren Passagen (Ning, Lin et al. 2011). Es stellt sich auch die Frage, ob es möglicherweise Unterschiede zwischen den einzelnen mesenchymalen Stammzellen in Abhängigkeit ihres Isolationsgewebes gibt.

Auch die Verknüpfung zu dem Antigen CD34 bleibt fraglich. Lin et al. konnten zum einen nur 0,74% Stro-1+ BMSC nach Extraktion aus dem Femur von Ratten feststellen. Zum anderen fanden sie heraus, dass nur 8,7% von auf CD34 untersuchten Zellen den Oberflächenmarker Stro-1 exprimieren, während umgekehrt 78,6% Stro-1+ Zellen den Marker CD34 aufweisen. Im Fettgewebe wurde Stro-1 in manchen, jedoch nicht in allen venösen Endothelien gefunden und auch in anderen Geweben konnte man eine endotheliale Expression von Stro-1 finden (Lin et al. 2011). Es bleibt also ein sehr vager Kenntnisstand zu dem Marker und bedarf weitere Untersuchungen, um seine genaue Funktion und Lokalisation zu identifizieren. Jedoch bleibt nach allen – einschließlich den eigenen – Ergebnissen die Frage, ob Stro-1 wirklich ein spezifischer und kennzeichnender Marker für mesenchymale Stammzellen ist. Möglicherweise lässt sich die geringe Ausbeute auch durch die Überlegung von Ning et al. erklären, dass das Auftreten des Oberflächenmarkers vielmehr je nach Umgebungsgewebe induziert wird (Ning, Lin et al. 2011).

Nachdem in der vorliegenden Arbeit kein eindeutig vermindertes oder vermehrtes Wachstum der FaDu Zellen in Co-Kultur mit BMSC aufgetreten ist, wäre ein möglicher weiterer Ansatz, der mit der Idee der immunsuppressiven Wirkung und dadurch verstärkten Proliferation der FaDu Zellen einhergeht, ein mögliches *in vivo*-Modell. Denn hier wirken in einem mehrdimensionalen Konstrukt – dem Körper – auch immunmodulierende Zellen mit und nicht nur zwei ausgewählte Zelllinien. Es scheint, als spielten die Zellen des Immunsystems doch eine entscheidende Rolle und würden von Stro-1+ BMSC nur gehemmt werden, ohne, dass Stro-1+ BMSC selbst einen direkten immunsuppressiven Einfluss oder eine proliferationsfördernde Wirkung hätten.

Zudem muss erwähnt werden, dass es durch die variable und meist doch sehr geringe Ausbeute der sortierten BMSC schwierig war, eine einheitliche Versuchsreihe zu untersuchen. War die Ausbeute der Stro-1+ BMSC geringer als die laut dem Versuchsprotokoll benötigte, so wurden die vorhandenen Zellen trotzdem mit der vorgesehenen FaDu Zellzahl ausgesät und untersucht.

Auch der Zeitraum der Untersuchung könnte eine Rolle spielen, da die BMSC oftmals in ihrer Zellzahl entsprechend des Zeitpunktes der Aussaat für die Proliferationsanalyse stagnierten und möglicherweise bei längerer Beobachtung oder auch zunächst alleiniger Kultivierung nach der Sortierung und anschließenden Co-Kultivierung Unterschiede aufgetreten wären.

Individuell sind Beeinflussungen der Proliferation von FaDu Zellen durch Stro-1+ BMSC jedoch nicht ausgeschlossen. Einige Einzeldaten zeigen deutliche Unterschiede – jedoch auch hier, sowohl in die eine, als auch in die andere Richtung mit verstärkter oder verminderter Proliferation (6.2).

Alternative Überlegungen für weiterführende Untersuchungen wären also zum Beispiel die Untersuchung des Stro-1 Oberflächenmarkers auf anderen Stammzellen wie Fettgewebsstammzellen, die Wahl einer höhergradigen Passage oder gar P0 vor der Sortierung von Stro-1+ mesenchymalen Stammzellen oder auch eine vorerst alleinige Weiterkultivierung der sortierten Zellen vor der Proliferationsanalyse mit einer Co-Kultur. Möglich wäre auch die Untersuchung des Markers im Umgebungsgewebe eines Tumors sowie die Umsetzung eines *in vivo*-Modells.

### 4.2.3 Kein Verändertes Proliferationsverhalten der FaDu Zellen

Die Proliferationsanalyse stellt die Methode der Wahl dar, die die Hauptfrage in dieser Arbeit beantworten sollte: Haben die BMSC mit ihren verschiedenen Voraussetzungen generell einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der FaDu Zellen? Die Nullhypothese besagt, dass es keine Unterschiede in der Proliferation der FaDu Monokultur und der FaDu Co-Kultur mit BMSC Einfluss gibt. Die Alternativhypothese besagt dagegen, dass es Unterschiede in der

Proliferation gibt. Anhand der vorliegenden Ergebnisse lässt sich zunächst interpretieren, dass die Nullhypothese nicht abgelehnt werden kann, da keine Unterschiede im Wachstumsverhalten festgestellt wurden. Dies bedeutet aber nicht, dass die Nullhypothese zwangsläufig angenommen werden muss, da es eventuell noch nicht bekannte Faktoren geben kann, die dazu führen könnten, dass die Alternativhypothese zutrifft. Der Datensatz zeigt große Varianzen in den einzelnen Versuchen. Es lässt sich keine klare Linie bzw. Richtung erkennen. Zudem sind die Standardabweichungen sehr hoch angesetzt. Es lässt sich also nicht ausschließen, dass es möglicherweise individuelle Unterschiede gibt und BMSC eines einzelnen Spenders größere Einflüsse auf das Wachstumsverhalten der FaDu Zellen haben als ein statistisch ausgewertetes Kollektiv verschiedener Spender vermuten lässt. Dies kann Gründe haben, die mit einer größeren Stichprobe bestimmbar sein könnten, wie beispielsweise Abhängigkeiten von Alter und Geschlecht der Stammzellspender. Es können jedoch auch nicht greifbare Gründe sein, wie z. B. genetische Determinierungen, die mit Studien nicht mehr fassbar sind. Eine Gegenüberstellung von Alter und Geschlecht war in dieser Arbeit aufgrund der kleinen Stichprobengröße nicht umsetzbar.

Die einzige Konstanz, die sich erkennen lässt, ist das schlechtere Wachstum der BMSC in der Co-Kultur im Vergleich zu denen, die in der Monokultur gewachsen sind sowie eine generell geringere Proliferationsrate der BMSC. Die Bilanz zeigt auch, dass es zwischen den einzelnen Ansätzen mit BMSC unterschiedlicher Voraussetzungen keine Unterschiede im Wachstumsverhalten der FaDu Zellen gab.

In Kapitel 4.2.1 wurde bereits die Definition der mesenchynalen Stammzellen und damit vor allem die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Forschungsarbeiten in Frage gestellt. Ähnliches gilt auch für die verschiedenen Tumorarten, die in den einzelnen Projekten eingesetzt wurden – von unterschiedlichen Organen stammend bis hin zu unterschiedlichen Geweben. Dies kann ebenso wie die uneinheitliche Nutzung von mesenchymalen Stammzellen zu Differenzen in den einzelnen Studienergebnissen führen.

Die Tatsache, dass keine einheitlichen Konzepte in diesem Forschungsbereich existieren, kommt an dieser Stelle, die die Hauptfrage dieser Arbeit beantworten soll, deutlicher denn je zum Ausdruck, wenn es gilt, die eigenen Ergebnisse zu interpretieren und in den aktuellen Stand der Forschung einzuordnen.

Ein Ergebnis von Jian et al. zeigt, dass im Vergleich zu embryonalen Stammzellen, die adulten Stammzellen neben dem wahrscheinlich stärker eingeschränkten Differenzierungsvermögen auch eine verminderte Proliferationsfähigkeit besitzen (Jiang, Jahagirdar et al. 2002). Daraus lässt sich zum einen erneut schließen, dass es eben einen deutlichen Unterschied zwischen verschiedenen Stammzellen gibt – in diesem Fall zwischen embryonalen und adulten Stammzellen. Zum anderen zeigt dies, dass adulte Stammzellen möglicherweise tatsächlich kein starkes Proliferationsverhalten besitzen. Dies kann wiederum in Frage stellen, ob die direkte Proliferationsinduktion an sich überhaupt die Quintessenz in der Interaktion zwischen Tumorzellen und mesenchymalen Stammzellen ist. Auch hier gilt wieder, dass es lediglich möglich war, sich ein lineares Modell des Informationsflusses mit zwei Zelltypen anzusehen. In der Realität läuft der Informationsfluss der Zellen jedoch ganzheitlich und komplexer ab (Stadlinger 2012). So scheint es, dass womöglich eine direkte rege Proliferationsfähigkeit nicht ausgetauscht werden kann – was mit dem ersten Ansatz mit vermeintlich hochproliferativen BMSC-Klonen getestet wurde. Jedoch ist ein stetiger Austausch mit indirekt resultierender möglicher Förderung oder Hemmung inklusive Interaktion mit Immunzellen und anderen Körperzellen nach wie vor nicht ausgeschlossen. Eine veränderte Proliferation der Tumorzellen kann also immer noch indirekt abhängig sein von mesenchymalen Stammzellen und über andere Mediatorzellen und Botenstoffe vermittelt werden. Es kommt, wie in Kapitel 4.2.1 erwähnt, auf die Umgebung an. Dies lässt sich idealerweise jedoch nur in einem *in vivo*-Modell exakt untersuchen.

Bezüglich des zweiten Ansatz der Versuchsreihe kann weiterhin – wie bereits in Kapitel 4.2.2 angebracht – diskutiert werden, ob die entsprechende Oberflächenkombination mit Stro-1 richtig gewählt wurde. Einerseits sind zu wenig Zellen mit diesem Marker für die Versuche gefiltert worden und

andererseits kann der mögliche Immuneinfluss durch das Fehlen von Immunzellen im Modell nicht beurteilt werden. Zwei Schwierigkeit ergeben sich hierbei wiederholt: Erstens gibt es keine einheitliche Meinung über spezifische Oberflächenmarker. Zweitens exprimieren mesenchymalen Stammzellen auch je nach Ursprungsgewebe unterschiedliche Marker (4.2.1). Auch zu bedenken ist die vielleicht schon zu starke Differenzierung einzelner mesenchymaler Stammzellen, die dadurch zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

Es gilt folglich eine Vielzahl von möglichen Einflussfaktoren zu untersuchen, und doch wird die reale Beeinflussung im lebenden Organismus nie vollständig erforscht werden können.

## 4.3 Ausblick

Wie eingangs berichtet, gibt es schon zahlreiche Ideen, mesenchymale Stammzellen sinnvoll in der Tumortherapie einzusetzen. Die Ansätze klingen plausibel, denn der Tropismus zwischen mesenchymalen Stammzellen und Tumorzellen ist unumstritten. Die Uneinigkeit bezieht sich vielmehr auf die Frage, ob die mesenchymalen Stammzellen den Tumor fördern oder hemmen. Deshalb sollte man nicht voreilig mit solchen nach wie vor noch nicht vollständig verstandenen Optionen handeln. In einem Co-Kultur Modell zwischen BMSC und Tumorzellen der Linien FaDu und HLac78 wurden Tumorzellen mit Paclitaxel behandelt und eine Resistenz der Krebszellen gegen das Chemotherapeutikum in Gegenwart von mesenchymalen Stammzellen verzeichnet (Scherzed et al. 2011). Dies zeigt, dass im Vorfeld nach wie vor noch viel Grundlagenforschung betrieben werden muss, bevor das Ziel „Stammzellen als eine weitere Therapieoption gegen den Krebs“ in Zukunft umgesetzt werden kann.

Auch diese Arbeit wirft neue Fragen auf. Ist Stro-1 wirklich ein spezifischer Marker für BMSC, der zudem noch in Zusammenhang mit immunsupprimierenden Eigenschaften steht? Gibt es überhaupt spezifische Marker für mesenchymale Stammzellen? Welchen Einfluss hat die unterschiedliche Differenzierung und Morphologie der mesenchymalen

Stammzellen? Welche mesenchymalen Stammzellen agieren wie mit welcher Tumor-Art? Und was sind eigentlich adulte, multipotente mesenchymale Stammzellen?

Möglicherweise sollten zukünftige Studien nochmals bei den Grundlagen anfangen und zunächst mesenchymale Stammzellen einheitlich klassifizieren.

# 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Stammzellforschung spielt eine zentrale Rolle bei der Optimierung der Therapie von Krebserkrankungen. Ziel ist eine spezifizierte Therapie durch den angenommenen Tropismus der mesenchymalen Stammzellen gegenüber den Tumorzellen. Bisher konnten keine eindeutigen Verhaltensmuster mesenchymaler Stammzellen in Gegenwart von Tumorzellen verzeichnet werden. Mögliche Gründe für die gegensätzlichen Ergebnisse aufzudecken, war eines der Ziele dieser Arbeit. Um herauszufinden, ob Knochenmarkstammzellen (Bone marrow stem cells = BMSC), das Proliferationsverhalten der Tumorzelllinie FaDu beeinflussen, wurden drei verschiedene Ansätze für BMSC umgesetzt. Für den ersten Ansatz wurden BMSC mit geringer Dichte ausgesät, da sie laut Literatur ein hochproliferatives Wachstumsverhalten aufweisen sollen. Es resultierte die Frage, ob dies auch auf FaDu Zellen übertragbar ist. Der zweite Ansatz umfasste eine reine und homogene Population von BMSC der Passage 1 (P1), die positiv für den Oberflächenmarker Stro-1 sind. Dies führte zu der Überlegung, ob FaDu Zellen dadurch in ihrem Wachstum gefördert werden könnten. Der dritte Ansatz beinhaltete BMSC der Passage 2 (P2), um die Variable der Passage mit einzubeziehen und gleichzeitig eine Kontrolle für die ersten beiden Ansätze zu haben.

Es wurde mit humanen mesenchymalen Knochenmarkstammzellen aus dem Hüftkopf gearbeitet. Die Stichprobengröße umfasste n = 10 für Ansatz 2 bzw. n = 11 für Ansatz 1 und 3 Stammzellspender. Die BMSC wurden auf die Kriterien der International Society for Cellular Therapy geprüft und auf drei Ansätze aufgeteilt. Im ersten Ansatz wurden die BMSC der P1 mit Dichtegraden von jeweils 10, 100 und 1000 Zellen pro $cm^2$ ausgesät. Die am besten gewachsenen BMSC wurden für die weiteren Versuche ausgewählt. Für den zweiten Ansatz wurden die BMSC der P1 magnetisch nach dem Oberflächenmarker Stro-1 sortiert. Für den dritten Ansatz wurde eine Passagierung der BMSC bis zur P2 vorgenommen. Diese drei unterschiedlichen BMSC-Ansätze pro Stammzellspender wurden dann für ein Proliferationsmodell mit FaDu Zellen und einer Co-Kultur aus FaDu und BMSC herangezogen, um ein möglicherweise

verändertes Wachstumsverhalten untersuchen zu können. Die Zellen wurden an vier Tagen gezählt und das Wachstum der FaDu Zellen der Monokultur mit den FaDu Zellen aus der Co-Kultur verglichen. Die Messdaten wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest überprüft. Im ersten Ansatz wurde die Proliferation der unterschiedlich dicht ausgesäten BMSC via Fotodokumentation festgehalten und für den zweiten Ansatz der Ertrag der Stro-1+ BMSC vor und nach der Sortierung dargestellt. Die Zählmessmethoden Neubauerkammer und das Casy Zellzählungsgerät wurden verglichen, um eine Aussage über die Reliabilität treffen zu können.

Für keinen der drei Ansätze zeigten sich Unterschiede im Wachstum der FaDu Zellen verglichen mit den FaDu Zellen in der Co-Kultur. Insgesamt wuchsen die BMSC immer etwas schlechter als die FaDu Zellen. Die Generierung hochproliferativer Klone besonders dünn ausgesäter BMSC konnte nicht bestätigt werden. In der am dünnsten ausgesäten Kolonie mit 10 Zellen pro $cm^2$ wurde bei n=11 insgesamt zweimal ein eindeutig hochproliferativer Klon erkannt. Meist wurde die Kultur mit der dichteren Anzahl an BMSC für die Versuche gewählt. Der Ertrag an Stro-1+ BMSC erwies sich als sehr gering, sodass nur mit einer sehr kleinen Menge gearbeitet werden konnte und auch nur eine Zählung an Tag 4 nach Aussaat stattfand. Die Zuverlässigkeitsprüfung der beiden Zählmethoden erbrachte keine signifikanten Differenzen.

Die Gesamtergebnisse zeigen, dass nach wie vor Widersprüchlichkeiten zu den Literaturergebnissen existieren, die möglicherweise einen Forschungsbeginn noch weiter am Ursprung erfordern. Es zeigen sich keine Proliferationsunterschiede der FaDu Zellen unter verschiedenen Bedingungen der BMSC. Daher konnten keine Gründe für das unterschiedliche Verhaltensmuster von Tumorzellen in Gegenwart von mesenchymalen Stammzellen aufgedeckt werden. Als problematisch erweist sich die variable Klassifikation von Stammzellen in der Literatur und damit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Bevor es in die nächste Etappe der Therapieoptimierung von Krebserkrankungen geht, sollten zunächst die Interaktionen der mesenchymalen Stammzellen und Tumorzellen genauer verstanden werden.

# 6 ANHANG

## 6.1 Materialien und Geräte im Überblick

### 6.1.1 Laborgeräte

| Geräte | Firma, Ort |
|---|---|
| Absaugpumpe | A. Hartenstein GmbH, Würzburg |
| Autoklav, Dampfsterilisation | SHP Steriltechnik AG, Magdeburg |
| BD FACS Canto™II flow cytometer | BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Feinwaage | Kern, Albstadt |
| Fluoreszenzmikroskop (Typ: DMI 4000 B) | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar |
| $CO_2$ Inkubator NU5500E | NuAire Inc., Plymouth, MA, USA |
| $CO_2$ Inkubator Heracell™ 240i (König-Ludwig-Haus) | Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific Company, Life Technologies Corporation, Waltham, USA |
| CP 4056 Kühl-Gefrier-Kombination | Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Würzburg |
| Labortiefkühlschrank (-80°C) ProfiLine ECU Modell 5085-5 | National Lab GmbH, Mölln |
| MACS MultiStand | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach |
| MiniMACS™ Separator | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach |
| Mikroskop, Modell DMIL LED | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar |
| Mikroskop Axiolab, 984166 | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena |
| Pipetten | Eppendorf AG, Hamburg; Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld (König-Ludwig-Haus) |
| Stickstofftank | Air liquide-DMC, Marne-la-Vallée, Frankreich |
| UV Lampe | Desaga, Heidelberg |
| Vortex: Advanced Vortex Mixer (ZX2) | VELP® Scientifica srl, Usmate (MB), Italien |

| Geräte | Firma, Ort |
|---|---|
| Wasserbad (Typ: WNB 22) | Memmert GmbH + Co KG., Schwabach |
| Zählkammer, Neubauer Improved (Bright-Line) | Assistent® Germany, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim / Rhön |
| Casy Innovatis Zellzählgerät | Innovatis AG, Reutlingen |
| Zentrifuge 5810 R | Eppendorf AG, Hamburg |
| Zentrifuge Rotina 380 R (König-Ludwig-Haus) | Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen |

### 6.1.2 Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterialien | Firma, Ort |
|---|---|
| Casy-Cups (Zellcountergefäße) | Innovatis AG, Reutlingen |
| Einfrier Cryo Tube 2ml | Nalgene® Labware, Roskilde, Dänemark |
| Falconröhrchen, 15 ml und 50 ml | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Flow Cytometrie Röhrchen | Sarstedt AG & Co, Nürmbrecht |
| Mr. Frosty Einfrierbehälter | Nalgene® Labware, Roskilde, Dänemark |
| Pasteurpipetten aus Glas | Brand GmbH + Co, Wertheim |
| 200 µl, 1000 µl Pipettenspitzen | Sarstedt AG & Co, Nürmbrecht |
| 0,5 – 10 µl Pipettenspitzen | Sarstedt AG & Co, Nürmbrecht |
| Sterile Serological 10 ml Pipetten (Cellstar) | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| 500 µl Reaktionsgefäße mit Deckel | A. Hartenstein GmbH, Würzburg |
| 1,5 ml Reagiergefäße | Sarstedt AG & Co, Nürmbrecht |
| 4-Wellplatte | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| 12-Wellplatte (Polystyren) und Transwell-Einsätze, costar® | Corning Incorporated, Kennebunk ME, USA |
| Zellkulturflaschen 75 $cm^2$, 175 $cm^2$ | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |

### 6.1.3 Chemikalien

| Chemikalien | Firma, Ort |
|---|---|
| BSA (bovines Serumalbumin) | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe |
| Aluminiumsulfat | Merck, Darmstadt |
| Casy-Ton | Innovatis AG, Reutlingen |
| Cell-Wash (FACS-Lösung) | BD, Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| EDTA<br>(ethylene diamine tetraacetic acid) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Entellan | Merck, Darmstadt |
| Ethanol 70% | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe |
| Kernechtrot | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Mayers-Hematoxylin-Lösung | Merck, Darmstadt |
| 5%-igen Natriumthiosulfat | Merck, Darmstadt |
| Oil Red O | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Paraformaldehyd | Merck, Darmstadt |
| PBS (phosphate buffered saline) | Roche Diagnostics, Mannheim |
| PBS (phosphate buffered saline)<br>(König-Ludwig-Haus) | Dulbecco, Biochrom AG, Berlin |
| Propylenglycol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| 1%ige Silbernitratlösung | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe |
| Triton X-100 | Sigma-Adlrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Trypsin 0,25%-EDTA | Gibco® by life technologies™ GmbH, Darmstadt |
| Trypanblau (Trypan Blue Solution) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |

### 6.1.4 Nährmedium und Zusätze

| Nährmedium und Zusätze | Firma, Ort |
|---|---|
| ß-Glycerol-2-phosphat disodium | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Dexamethason | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium 1x high glucose) | Gibco® by life technologies™ GmbH, Darmstadt |
| DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 Nutrient Mixture (Ham) (DMEM/F-12) (König-Ludwig-Haus) | Gibco® by life technologies™ GmbH, Darmstadt |
| FCS (Fötales Kälberserum) | Linaris, Wertheim-Bettingen |
| FCS (Fötales Kälberserum) (König-Ludwig-Haus) | Bio & Sell GmbH, Feucht / Nürnberg |
| Indomethacin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Insulin, human recombinant | PAA, Laboratories GmbH, Pasching, Österreich |
| L-Ascorbic acid 2-phosphate (König-Ludwig-Haus) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| L-Ascorbic acid 2-phosphate salt hydrate | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| 3-Methyl-1-Isobutylxanthin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Natrium-Pyruvat 100mM | Biochrom AG, Berlin |
| Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA) | Biochrom AG, Berlin |
| Penicillin-Streptomycin, (1000 U / 1000 µg/ml) | Biochrom AG, Berlin |
| Penicillin-Streptomycin (König-Ludwig-Haus) | Gibco® by life technologies™ GmbH, Darmstadt |
| RPMI 1640 mit stabilem Glutamin | Biochrom AG, Berlin |

### 6.1.5 Antikörper und Oberflächenmarker

| Antikörper und Oberflächenmarker | Firma, Ort |
|---|---|
| FITC, Alexa Fluor® 488 Goat anti-Mouse | Invitrogen™, Molecular Probes™, Thermo Fisher Scientific Company, Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA |
| PE Mouse Anit-Human CD34 | BD Biosciences Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ, USA |
| FITC Mouse Anti-Human CD45 | BD Biosciences Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ, USA |
| PE Mouse Anit-Human CD73 | BD Biosciences Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ, USA |
| APC Mouse Anti-Human CD90 | BD Biosciences Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Purified anti-human CD105 | BD Biosciences Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Anti-PE MicroBeads UltraPure | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach |
| Stro-1 (sc-47733 PE) | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |

## 6.2 Messergebnisse

Nachstehend sind von Kapitel 6.2.1 bis 6.2.11 tabellarisch die gesamten Messergebnisse der Proliferationsanalyse aller Ansätze nach BMSC Spendern gegliedert aufgeführt.

### 6.2.1 Spender 1 (männlich, geb. 1949)**Ansatz 1** (Ursprünglich mit 10 – 1000 Zellen / $cm^2$ ausgesät)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 15.000 | 10.000 | 15.000 | 0 | 10.000 | 0 | 15.000 | 0 |
| Tag 2 | 15.000 | 0 | 20.000 | 5.000 | 10.000 | 0 | 15.000 | 0 |
| Tag 3 | 45.000 | 5.000 | 15.000 | 10.000 | 15.000 | 5.000 | 0 | 0 |
| Tag 4 | 30.000 | 0 | 20.000 | 0 | 10.000 | 0 | 5.000 | 15.000 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 44.950 | 73,83% | 23.820 | 58,89% | 28.500 | 44,76% | 18.620 | 39,67% |
| Tag 2 | 34.130 | 75,19% | 19.490 | 67,98% | 19.320 | 48,58% | 22.350 | 34,45% |
| Tag 3 | 55.180 | 79,92% | 37.330 | 75,75% | 25.900 | 48,62% | 11.090 | 45.39% |
| Tag 4 | 49.630 | 80,14% | 46.250 | 80,18% | 20.350 | 37,66% | 13.860 | 45,58% |

**Ansatz 2** (Stro-1+ BMSC)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| *Tag 4* | FaDu | CoK FaDu | Stro-1+ | CoK Stro-1+ |
|---|---|---|---|---|
| Vital | 15.000 | 55.000 | 20.000 | 0 |
| Avital | 10.000 | 0 | 0 | 0 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| *Tag 4* | FaDu | CoK FaDu | Stro-1+ | CoK Stro-1+ |
|---|---|---|---|---|
| **Zellzahl** | 103.700 | 104.800 | 13.340 | 10.650 |
| **Viabilität** | 83,07% | 79,97% | 35,05% | 30,45% |

**Ansatz 3** (BMSC in P2)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital |
| **Tag 0** | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| **Tag 1** | 10.000 | 0 | 5.000 | 0 | 15.000 | 0 | 35.000 | 0 |
| **Tag 2** | 15.000 | 0 | 10.000 | 0 | 5.000 | 0 | 5.000 | 0 |
| **Tag 3** | 35.000 | 0 | 25.000 | 0 | 20.000 | 0 | 10.000 | 0 |
| **Tag 4** | 20.000 | 5.000 | 40.000 | 5.000 | 15.000 | 0 | 10.000 | 5.000 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität |
| **Tag 0** | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| **Tag 1** | 47.470 | 74,25% | 24.510 | 71,65% | 45.650 | 51,41% | 37.070 | 45,58% |
| **Tag 2** | 40.100 | 75,16% | 23.820 | 71,99% | 30.750 | 40,95% | 25.290 | 42,20% |
| **Tag 3** | 62.280 | 78,67% | 42.880 | 74,44% | 27.460 | 50,80% | 16.370 | 39,71% |
| **Tag 4** | 48.680 | 74,73% | 59.680 | 78,92% | 49.200 | 53,99% | 12.820 | 44,31% |

### 6.2.2 Spender 2 (weiblich, geb. 1946)

**Ansatz 1** (Ursprünglich mit 10 – 1000 Zellen / $cm^2$ ausgesät)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 10.000 | 0 | 15.000 | 0 | 10.000 | 0 | 10.000 | 0 |
| Tag 2 | 20.000 | 5.000 | 25.000 | 5.000 | 20.000 | 0 | 15.000 | 0 |
| Tag 3 | 90.000 | 5.000 | 55.000 | 0 | 20.000 | 0 | 10.000 | 0 |
| Tag 4 | 95.000 | 0 | 140.000 | 0 | 35.000 | 0 | 5.000 | 0 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 24.690 | 84,82% | 17.580 | 73,55% | 16.200 | 47,83% | 14.900 | 46,87% |
| Tag 2 | 36.290 | 78,46% | 27.890 | 78,73% | 29.540 | 54,56% | 23.560 | 46,18% |
| Tag 3 | 72.930 | 84,12% | 90.600 | 85,04% | 33.000 | 53,81% | 19.230 | 49,33% |
| Tag 4 | 145.700 | 88,64% | 148.900 | 87,53% | 43.570 | 57,35% | 20.350 | 44,01% |

**Ansatz 2** (Stro-1+ BMSC)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| *Tag 4* | FaDu | CoK FaDu | Stro-1+ | CoK Stro-1+ |
|---|---|---|---|---|
| Vital | 25.000 | 25.000 | 0 | 0 |
| Avital | 0 | 5.000 | 10.000 | 0 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| *Tag 4* | FaDu | CoK FaDu | Stro-1+ | CoK Stro-1+ |
|---|---|---|---|---|
| Zellzahl | 106.500 | 111.400 | 13.770 | 780 |
| Viabilität | 78,95% | 81,14% | 35,89% | 38,46% |

**Ansatz 3** (BMSC in P2)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 10.000 | 5.000 | 10.000 | 0 | 5.000 | 0 | 10.000 | 0 |
| Tag 2 | 30.000 | 0 | 30.000 | 5.000 | 20.000 | 5.000 | 5.000 | 0 |
| Tag 3 | 70.000 | 5.000 | 105.000 | 0 | 15.000 | 0 | 10.000 | 0 |
| Tag 4 | 120.000 | 5.000 | 90.000 | 5.000 | 50.000 | 10.000 | 15.000 | 5.000 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 20.960 | 67,79% | 28.060 | 76,60% | 18.020 | 56,37% | 12.910 | 62,34% |
| Tag 2 | 42.440 | 76,44% | 40.620 | 73,28% | 32.740 | 69,10% | 16.110 | 53,76% |
| Tag 3 | 88.780 | 83,67% | 82.370 | 76,88% | 33.690 | 61,16% | 23.210 | 54,69% |
| Tag 4 | 159.600 | 88,39% | 142.100 | 85,64% | 55.950 | 70,22% | 29.710 | 60,71% |

### 6.2.3 Spender 3 (männlich, geb. 1946)

**Ansatz 1** (Ursprünglich mit 10 – 1000 Zellen / $cm^2$ ausgesät)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vital | Avital | Vital | Avial | Vital | Avital | Vital | Avital |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 25.000 | 0 | 15.000 | 5.000 | 15.000 | 0 | 5.000 | 0 |
| Tag 2 | 35.000 | 0 | 15.000 | 0 | 25.000 | 0 | 10.000 | 0 |
| Tag 3 | 55.000 | 5.000 | 35.000 | 0 | 35.000 | 0 | 5.000 | 5.000 |
| Tag 4 | 95.000 | 0 | 50.000 | 0 | 40.000 | 5.000 | 25.000 | 0 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität |
| **Tag 0** | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| **Tag 1** | 17.410 | 65,47% | 16.370 | 71,59% | 21.650 | 61,27% | 16.630 | 61,74% |
| **Tag 2** | 32.740 | 80,60% | 33.870 | 77,89% | 29.020 | 73,79% | 14.900 | 59,52% |
| **Tag 3** | 58.120 | 84,09% | 50.760 | 80,27% | 37.160 | 69,98% | 28.240 | 53,44% |
| **Tag 4** | 89.220 | 85,34% | 76.000 | 83,13% | 62.620 | 77,49% | 31.700 | 68,41% |

**Ansatz 2** (Stro-1+ BMSC)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| *Tag 4* | FaDu | CoK FaDu | Stro-1+ | CoK Stro-1+ |
|---|---|---|---|---|
| **Vital** | 155.000 | 215.000 | 5.000 | 5.000 |
| **Avital** | 0 | 0 | 0 | 0 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| *Tag 4* | FaDu | CoK FaDu | Stro-1+ | CoK Stro-1+ |
|---|---|---|---|---|
| **Zellzahl** | 176.000 | 188.400 | 21.310 | 21.220 |
| **Viabilität** | 87,14% | 84,37% | 52,90% | 47,12% |

**Ansatz 3** (BMSC in P2)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital |
| **Tag 0** | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| **Tag 1** | 5.000 | 5.000 | 20.000 | 0 | 20.000 | 0 | 15.000 | 0 |
| **Tag 2** | 20.000 | 5.000 | 5.000 | 0 | 10.000 | 0 | 15.000 | 0 |
| **Tag 3** | 35.000 | 0 | 5.000 | 0 | 15.000 | 0 | 10.000 | 0 |
| **Tag 4** | 15.000 | 0 | 30.000 | 0 | 35.000 | 0 | 10.000 | 0 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 17.060 | 67,24% | 11.690 | 63,68% | 25.290 | 73,92% | 14.550 | 68,29% |
| Tag 2 | 20.100 | 79,18% | 16.020 | 69,81% | 30.660 | 72,10% | 20.700 | 67,12% |
| Tag 3 | 26.240 | 72,66% | 19.400 | 62,75% | 36.120 | 63,66% | 22.950 | 60,92% |
| Tag 4 | 33.780 | 76,02% | 38.020 | 71,85% | 55.260 | 72,01% | 29.020 | 64,18% |

### 6.2.4 Spender 4 (weiblich, geb. 1956)

**Ansatz 1** (Ursprünglich mit 10 – 1000 Zellen / $cm^2$ ausgesät)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 15.000 | 5.000 | 30.000 | 0 | 10.000 | 0 | 10.000 | 0 |
| Tag 2 | 70.000 | 0 | 65.000 | 0 | 20.000 | 0 | 5.000 | 0 |
| Tag 3 | 65.000 | 0 | 105.000 | 0 | 15.000 | 0 | 15.000 | 5.000 |
| Tag 4 | 200.000 | 0 | 190.000 | 5.000 | 20.000 | 0 | 15.000 | 0 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 32.130 | 87,71% | 24.080 | 80,81% | 17.320 | 50,13% | 13.770 | 42,06% |
| Tag 2 | 71.460 | 83,76% | 63.400 | 81,97% | 20.610 | 46,58% | 14.470 | 39,95% |
| Tag 3 | 95.280 | 86,41% | 104.500 | 86,59% | 23.470 | 50,09% | 12.990 | 36,50% |
| Tag 4 | 184.800 | 85,94% | 214.300 | 87,64% | 28.840 | 47,98% | 29.280 | 47,21% |

**Ansatz 2** (Stro-1+ BMSC)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| *Tag 4* | FaDu | CoK FaDu | Stro-1+ | CoK Stro-1+ |
|---|---|---|---|---|
| **Vital** | 85.000 | 70.000 | 5.000 | 5.000 |
| **Avital** | 0 | 0 | 5.000 | 0 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| *Tag 4* | FaDu | CoK FaDu | Stro-1+ | CoK Stro-1+ |
|---|---|---|---|---|
| **Zellzahl** | 122.300 | 113.900 | 9.874 | 7.449 |
| **Viabilität** | 86,84% | 85,45% | 48,31% | 38,22% |

**Ansatz 3** (BMSC in P2)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital |
| **Tag 0** | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| **Tag 1** | 10.000 | 0 | 5.000 | 5.000 | 25.000 | 0 | 5.000 | 0 |
| **Tag 2** | 35.000 | 0 | 40.000 | 0 | 5.000 | 5.000 | 10.000 | 0 |
| **Tag 3** | 95.000 | 0 | 95.000 | 0 | 20.000 | 0 | 15.000 | 0 |
| **Tag 4** | 100.000 | 10.000 | 150.000 | 0 | 25.000 | 0 | 10.000 | 5.000 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität |
| **Tag 0** | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| **Tag 1** | 31.620 | 87,53% | 22.780 | 78,51% | 17.240 | 62,78% | 9.355 | 59,02% |
| **Tag 2** | 57.770 | 82,65% | 55.350 | 80,78% | 24.080 | 62,33% | 44.430 | 55,88% |
| **Tag 3** | 86.100 | 80,75% | 74.490 | 77,20% | 31.010 | 61,41% | 22.260 | 60,61% |
| **Tag 4** | 113.600 | 78,74% | 117.600 | 78,14% | 57.770 | 60,14% | 23.390 | 50,19% |

### 6.2.5 Spender 5 (männlich, geb. 1963)

**Ansatz 1** (Ursprünglich mit 10 – 1000 Zellen / $cm^2$ ausgesät)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 20.000 | 0 | 10.000 | 0 | 10.000 | 0 | 10.000 | 0 |
| Tag 2 | 20.000 | 5.000 | 35.000 | 0 | 15.000 | 0 | 15.000 | 0 |
| Tag 3 | 60.000 | 0 | 25.000 | 0 | 15.000 | 0 | 15.000 | 5.000 |
| Tag 4 | 105.000 | 0 | 80.000 | 0 | 25.000 | 0 | 10.000 | 5.000 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 30.400 | 87,53% | 19.750 | 79,72% | 21.570 | 61,18% | 16.370 | 53,09% |
| Tag 2 | 37.770 | 80,59% | 29.620 | 80,85% | 27.890 | 64,79% | 22.170 | 53,33% |
| Tag 3 | 60.980 | 85,02% | 54.400 | 83,29% | 30.490 | 54,24% | 19.840 | 54,52% |
| Tag 4 | 116.500 | 88,43% | 104.900 | 85,70% | 50.500 | 67,32% | 23.130 | 54,60% |

**Ansatz 2** (Stro-1+ BMSC)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| *Tag 4* | FaDu | CoK FaDu | Stro-1+ | CoK Stro-1+ |
|---|---|---|---|---|
| Vital | 140.000 | 100.000 | 5.000 | 10.000 |
| Avital | 0 | 5.000 | 0 | 0 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| *Tag 4* | FaDu | CoK FaDu | Stro-1+ | CoK Stro-1+ |
|---|---|---|---|---|
| Zellzahl | 92.680 | 92.070 | 11.430 | 8.402 |
| Viabilität | 84,65% | 84,90% | 45,67% | 52,15% |

**Ansatz 3** (BMSC in P2)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 30.000 | 0 | 20.000 | 0 | 15.000 | 0 | 5.000 | 0 |
| Tag 2 | 30.000 | 0 | 15.000 | 0 | 10.000 | 0 | 25.000 | 0 |
| Tag 3 | 40.000 | 5.000 | 45.000 | 0 | 30.000 | 0 | 15.000 | 5.000 |
| Tag 4 | 80.000 | 0 | 115.000 | 0 | 45.000 | 0 | 30.000 | 0 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 24.690 | 80,28% | 16.020 | 69,29% | 15.240 | 76,52% | 15.070 | 79,82% |
| Tag 2 | 39.670 | 83,27% | 41.140 | 72,30% | 22.090 | 73,49% | 18.450 | 61,92% |
| Tag 3 | 45.650 | 80,58% | 41.840 | 71,77% | 23.040 | 64,41% | 24.777 | 59,83% |
| Tag 4 | 69.640 | 83,23% | 76.740 | 78,69% | 37.070 | 64,95% | 29.360 | 58,96% |

### 6.2.6 Spender 6 (weiblich, geb. 1940)

**Ansatz 1** (Ursprünglich mit 10 – 1000 Zellen / $cm^2$ ausgesät)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 15.000 | 0 | 10.000 | 0 | 35.000 | 10.000 | 5.000 | 5.000 |
| Tag 2 | 20.000 | 0 | 30.000 | 0 | 15.000 | 0 | 15.000 | 0 |
| Tag 3 | 60.000 | 5.000 | 55.000 | 0 | 30.000 | 0 | 20.000 | 0 |
| Tag 4 | 120.000 | 0 | 50.000 | 0 | 35.000 | 0 | 45.000 | 5.000 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität |
| **Tag 0** | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| **Tag 1** | 23.730 | 74,46% | 16.280 | 79,32% | 24.770 | 80,34% | 18.620 | 69,81% |
| **Tag 2** | 33.690 | 78,43% | 39.150 | 82,18% | 26.420 | 67,63% | 19.230 | 65,49% |
| **Tag 3** | 48.330 | 81,34% | 57.170 | 82,19% | 29.020 | 63,69% | 30.230 | 69,94% |
| **Tag 4** | 88.520 | 84,46% | 103.400 | 85,90% | 49.460 | 66,86% | 31.530 | 57,69% |

**Ansatz 2** (Stro-1+ BMSC)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| *Tag 4* | FaDu | CoK FaDu | Stro-1+ | CoK Stro-1+ |
|---|---|---|---|---|
| **Vital** | 170.000 | 105.000 | 5.000 | 5.000 |
| **Avital** | 0 | 0 | 5.000 | 0 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| *Tag 4* | FaDu | CoK FaDu | Stro-1+ | CoK Stro-1+ |
|---|---|---|---|---|
| **Zellzahl** | 105.000 | 95.710 | 6.496 | 7.882 |
| **Viabilität** | 83,82% | 82,34% | 34,88% | 37,76% |

**Ansatz 3** (BMSC in P2)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital |
| **Tag 0** | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| **Tag 1** | 5.000 | 0 | 20.000 | 0 | 20.000 | 0 | 15.000 | 0 |
| **Tag 2** | 10.000 | 0 | 30.000 | 0 | 15.000 | 0 | 20.000 | 0 |
| **Tag 3** | 40.000 | 10.000 | 30.000 | 5.000 | 20.000 | 0 | 15.000 | 0 |
| **Tag 4** | 45.000 | 0 | 30.000 | 0 | 25.000 | 0 | 25.000 | 0 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 13.600 | 73,71% | 11.430 | 68,04% | 23.130 | 80,42% | 18.020 | 57,46% |
| Tag 2 | 28.970 | 80,22% | 26.160 | 79,68% | 26.940 | 76,04% | 19.320 | 54,52% |
| Tag 3 | 38.890 | 84,88% | 53.530 | 83,63% | 37.590 | 62,18% | 27.800 | 50,47% |
| Tag 4 | 62.230 | 81,46% | 56.730 | 80,96% | 45.650 | 60,37% | 33.260 | 60,47% |

### 6.2.7 Spender 7 (männlich, geb. 1960)

**Ansatz 1** (Ursprünglich mit 10 – 1000 Zellen / $cm^2$ ausgesät)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 20.000 | 0 | 10.000 | 0 | 10.000 | 10.000 | 5.000 | 0 |
| Tag 2 | 35.000 | 0 | 5.000 | 5.000 | 5.000 | 0 | 5.000 | 0 |
| Tag 3 | 20.000 | 0 | 30.000 | 0 | 15.000 | 0 | 5.000 | 0 |
| Tag 4 | 55.000 | 0 | 25.000 | 10.000 | 5.000 | 5.000 | 5.000 | 0 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 12.210 | 64,68% | 9.441 | 68,99% | 13.250 | 43,10% | 6.756 | 28,06% |
| Tag 2 | 22.350 | 81,13% | 17.840 | 78,03% | 14.980 | 39,32% | 11.610 | 34,81% |
| Tag 3 | 11.170 | 68,98% | 27.890 | 78,35% | 17.410 | 46,64% | 12.999 | 30,86% |
| Tag 4 | 39.500 | 82,46% | 35.510 | 73,48% | 16.020 | 35,92% | 12.910 | 21,84% |

**Ansatz 2** (Stro-1+ BMSC)

Ansatz 2 wurde von der Analyse aufgrund eines methodischen Fehlers ausgenommen. Grund dafür war, dass im Proliferationsversuch mit BMSC aus Ansatz 2 zu viele FaDu Zellen ausgesät wurden, weshalb dieser Versuch am Ende nicht verwertbar war und ausgeschlossen wurde. Die anderen Ansätze blieben davon unbeeinflusst.

**Ansatz 3** (BMSC in P2)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 20.000 | 0 | 5.000 | 0 | 20.000 | 0 | 5.000 | 0 |
| Tag 2 | 15.000 | 0 | 25.000 | 0 | 10.000 | 5.000 | 15.000 | 0 |
| Tag 3 | 40.000 | 0 | 65.000 | 0 | 10.000 | 0 | 10.000 | 0 |
| Tag 4 | 100.000 | 0 | 90.000 | 0 | 35.000 | 0 | 20.000 | 0 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 15.070 | 76,32% | 14.210 | 70.69% | 19.920 | 66,86% | 12.390 | 50,00% |
| Tag 2 | 21.310 | 77,60% | 30.230 | 82,31% | 22.520 | 62,80% | 19.230 | 49,01% |
| Tag 3 | 48.680 | 80,06% | 46.690 | 81,67% | 23.730 | 53,00% | 24.690 | 49,91% |
| Tag 4 | 95.370 | 83,54% | 85.400 | 79,84% | 40.100 | 61,82% | 27.020 | 47,13% |

### 6.2.8 Spender 8 (weiblich, geb. 1961)

**Ansatz 1** (Ursprünglich mit 10 – 1000 Zellen / $cm^2$ ausgesät)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 10.000 | 0 | 10.000 | 0 | 5.000 | 0 | 5.000 | 0 |
| Tag 2 | 5.000 | 0 | 5.000 | 0 | 20.000 | 0 | 15.000 | 0 |
| Tag 3 | 10.000 | 0 | 15.000 | 5.000 | 20.000 | 0 | 10.000 | 5.000 |
| Tag 4 | 15.000 | 0 | 30.000 | 0 | 15.000 | 0 | 10.000 | 10.000 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität |
| **Tag 0** | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| **Tag 1** | 14.550 | 69,14% | 8.142 | 60,26% | 18.190 | 62,87% | 8.402 | 38,19% |
| **Tag 2** | 16.980 | 74,81% | 14.550 | 67,74% | 23.730 | 60,89% | 18.360 | 51,08% |
| **Tag 3** | 16.370 | 74,41% | 17.410 | 68,60% | 15.160 | 43,00% | 17.840 | 43,37% |
| **Tag 4** | 28.930 | 78,22% | 33.170 | 73,80% | 24.770 | 53,46% | 21.390 | 54,41% |

**Ansatz 2** (Stro-1+ BMSC)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| *Tag 4* | FaDu | CoK FaDu | Stro-1+ | CoK Stro-1+ |
|---|---|---|---|---|
| **Vital** | 125.000 | 55.000 | 10.000 | 20.000 |
| **Avital** | 5.000 | 5.000 | 0 | 0 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| *Tag 4* | FaDu | CoK FaDu | Stro-1+ | CoK Stro-1+ |
|---|---|---|---|---|
| **Zellzahl** | 79.950 | 64.010 | 19.400 | 18.100 |
| **Viabilität** | 75,10% | 81,84% | 40,51% | 37,93% |

**Ansatz 3** (BMSC in P2)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital |
| **Tag 0** | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| **Tag 1** | 25.000 | 10.000 | 10.000 | 0 | 5.000 | 0 | 10.000 | 5.000 |
| **Tag 2** | 5.000 | 5.000 | 5.000 | 0 | 5.000 | 5.000 | 5.000 | 0 |
| **Tag 3** | 40.000 | 0 | 10.000 | 5.000 | 15.000 | 0 | 15.000 | 0 |
| **Tag 4** | 85.000 | 0 | 50.000 | 0 | 15.000 | 0 | 10.000 | 5.000 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 15.680 | 68,82% | 15.760 | 66,67% | 29.190 | 43,71% | 12.730 | 54,04% |
| Tag 2 | 12.910 | 66,52% | 15.850 | 76,57% | 13.250 | 47,52% | 12.040 | 38,61% |
| Tag 3 | 32.130 | 77,94% | 33.090 | 78,12% | 18.020 | 46,12% | 12.560 | 32,88% |
| Tag 4 | 40.620 | 78,96% | 38.460 | 79,00% | 18.620 | 44,42% | 16.280 | 45,97% |

### 6.2.9 Spender 9 (weiblich, geb. 1952)

**Ansatz 1** (Ursprünglich mit 10 – 1000 Zellen / $cm^2$ ausgesät)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 15.000 | 0 | 15.000 | 0 | 15.000 | 0 | 5.000 | 0 |
| Tag 2 | 35.000 | 0 | 45.000 | 0 | 15.000 | 0 | 5.000 | 0 |
| Tag 3 | 50.000 | 0 | 70.000 | 0 | 10.000 | 0 | 10.000 | 15.000 |
| Tag 4 | 40.000 | 0 | 90.000 | 0 | 25.000 | 0 | 15.000 | 5.000 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 26.590 | 84,34% | 25.120 | 79,67% | 21.650 | 58,00% | 12.820 | 40,77% |
| Tag 2 | 45.040 | 82,67% | 48.250 | 83,63% | 25.030 | 52.93% | 16.540 | 43,71% |
| Tag 3 | 49.200 | 79,89% | 71.030 | 81,35% | 15.940 | 38,82% | 19.580 | 52,31% |
| Tag 4 | 65.920 | 83,72% | 123.300 | 88,61% | 31.010 | 51,81% | 30.060 | 56,51% |

**Ansatz 2** (Stro-1+ BMSC)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| *Tag 4* | FaDu | CoK FaDu | Stro-1+ | CoK Stro-1+ |
|---|---|---|---|---|
| **Vital** | 30.000 | 40.000 | 10.000 | 10.000 |
| **Avital** | 0 | 0 | 0 | 0 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| *Tag 4* | FaDu | CoK FaDu | Stro-1+ | CoK Stro-1+ |
|---|---|---|---|---|
| **Zellzahl** | 56.470 | 54.140 | 15.680 | 13.430 |
| **Viabilität** | 78,37% | 78,42% | 41,23% | 42,23% |

**Ansatz 3** (BMSC in P2)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital |
| **Tag 0** | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| **Tag 1** | 10.000 | 0 | 5.000 | 0 | 20.000 | 0 | 15.000 | 0 |
| **Tag 2** | 25.000 | 0 | 15.000 | 0 | 25.000 | 0 | 10.000 | 0 |
| **Tag 3** | 35.000 | 5.000 | 45.000 | 0 | 20.000 | 0 | 10.000 | 0 |
| **Tag 4** | 50.000 | 10.000 | 50.000 | 5.000 | 30.000 | 0 | 10.000 | 0 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität |
| **Tag 0** | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| **Tag 1** | 9.528 | 65,09% | 10.570 | 71,31% | 24.170 | 50,64% | 16.110 | 37,80% |
| **Tag 2** | 32.650 | 80,38% | 21.740 | 76,52% | 30.230 | 50,58% | 24.080 | 45,20% |
| **Tag 3** | 27.110 | 74,35% | 29.540 | 74,78% | 24.430 | 46,61% | 24.770 | 48,07% |
| **Tag 4** | 63.750 | 78,05% | 55.690 | 78,99% | 43.310 | 50,70% | 32.220 | 48,63% |

### 6.2.10 Spender 10 (männlich, geb. 1970)

**Ansatz 1** (Ursprünglich mit 10 – 1000 Zellen / $cm^2$ ausgesät)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 10.000 | 0 | 10.000 | 0 | 10.000 | 0 | 15.000 | 0 |
| Tag 2 | 30.000 | 0 | 5.000 | 0 | 30.000 | 5.000 | 15.000 | 0 |
| Tag 3 | 25.000 | 5.000 | 20.000 | 0 | 10.000 | 0 | 20.000 | 5.000 |
| Tag 4 | 55.000 | 0 | 65.000 | 0 | 60.000 | 0 | 45.000 | 10.000 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 9.614 | 72,08% | 14.030 | 77,88% | 24.250 | 60,34% | 17.930 | 48,03% |
| Tag 2 | 34.560 | 83,47% | 31.100 | 81,04% | 34.040 | 56,96% | 33.000 | 50,60% |
| Tag 3 | 42.180 | 82,40% | 45.910 | 85,07% | 28.760 | 50,76% | 29.280 | 50,00% |
| Tag 4 | 69.380 | 85,59% | 63.230 | 82,21% | 56.560 | 57,63% | 50.410 | 58,67% |

**Ansatz 2** (Stro-1+ BMSC)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| *Tag 4* | FaDu | CoK FaDu | Stro-1+ | CoK Stro-1+ |
|---|---|---|---|---|
| Vital | 105.000 | 45.000 | 0 | 5.000 |
| Avital | 0 | 0 | 5.000 | 0 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| *Tag 4* | FaDu | CoK FaDu | Stro-1+ | CoK Stro-1+ |
|---|---|---|---|---|
| Zellzahl | 55.430 | 66.700 | 8.142 | 4.764 |
| Viabilität | 78,34% | 76,46% | 38,68% | 33,54% |

**Ansatz 3** (BMSC in P2)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 10.000 | 0 | 10.000 | 0 | 15.000 | 0 | 5.000 | 0 |
| Tag 2 | 25.000 | 0 | 10.000 | 0 | 20.000 | 0 | 25.000 | 0 |
| Tag 3 | 45.000 | 0 | 40.000 | 0 | 45.000 | 0 | 25.000 | 0 |
| Tag 4 | 45.000 | 0 | 40.000 | 0 | 20.000 | 5.000 | 45.000 | 0 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 15.760 | 70,00% | 11.690 | 81,33% | 19.230 | 59,04% | 11.350 | 45,96% |
| Tag 2 | 26.680 | 78,77% | 24.860 | 79,50% | 31.530 | 61,59% | 24.080 | 54,51% |
| Tag 3 | 36.900 | 80,68% | 37.510 | 76,77% | 34.040 | 64,01% | 22.430 | 54,99% |
| Tag 4 | 46.510 | 78,28% | 58.030 | 81,41% | 45.910 | 60,16% | 47.470 | 66,50% |

### 6.2.11 Spender 11 (männlich, geb. 1946)

**Ansatz 1** (Ursprünglich mit 10 – 1000 Zellen / $cm^2$ ausgesät)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 20.000 | 0 | 10.000 | 0 | 15.000 | 0 | 5.000 | 5.000 |
| Tag 2 | 45.000 | 0 | 35.000 | 0 | 10.000 | 0 | 10.000 | 0 |
| Tag 3 | 30.000 | 10.000 | 70.000 | 0 | 5.000 | 0 | 5.000 | 5.000 |
| Tag 4 | 70.000 | 5.000 | 70.000 | 5.000 | 15.000 | 0 | 5.000 | 0 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität |
| **Tag 0** | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| **Tag 1** | 20.350 | 81,88% | 18.540 | 75,89% | 22.780 | 61,88% | 18.020 | 46,33% |
| **Tag 2** | 32.830 | 83,66% | 40.020 | 78,84% | 26.680 | 58,00% | 21.310 | 51,04% |
| **Tag 3** | 46.510 | 76,06% | 53.010 | 80,63% | 30.320 | 50,36% | 23.560 | 41,53% |
| **Tag 4** | 84.710 | 87,17% | 99.350 | 85,15% | 39.580 | 57,27% | 27.460 | 46,69% |

**Ansatz 2** (Stro-1+ BMSC)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| *Tag 4* | FaDu | CoK FaDu | Stro-1+ | CoK Stro-1+ |
|---|---|---|---|---|
| **Vital** | 60.000 | 75.000 | 0 | 0 |
| **Avital** | 0 | 5.000 | 5.000 | 0 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| *Tag 4* | FaDu | CoK FaDu | Stro-1+ | CoK Stro-1+ |
|---|---|---|---|---|
| **Zellzahl** | 45.650 | 54.920 | 7.622 | 7.449 |
| **Viabilität** | 75,29% | 77,13% | 41,90% | 45,26% |

**Ansatz 3** (BMSC in P2)

*Ergebnisse Neubauerkammer / Trypanblau-Ausschlussverfahren*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital | Vital | Avital |
| **Tag 0** | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| **Tag 1** | 10.000 | 0 | 10.000 | 0 | 20.000 | 0 | 0 | 10.000 |
| **Tag 2** | 10.000 | 0 | 49.000 | 0 | 10.000 | 0 | 20.000 | 0 |
| **Tag 3** | 55.000 | 0 | 55.000 | 0 | 20.000 | 0 | 10.000 | 0 |
| **Tag 4** | 65.000 | 5.000 | 75.000 | 0 | 20.000 | 0 | 10.000 | 0 |

*Ergebnisse Casy Zellzählungsgerät*

| | FaDu | | CoK FaDu | | BMSC | | CoK BMSC | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität | Zellzahl | Viabilität |
| Tag 0 | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | | 20.000 | |
| Tag 1 | 17.150 | 73,06% | 17.580 | 73,55% | 22.090 | 64,89% | 13.080 | 37,56% |
| Tag 2 | 41.140 | 79,97% | 24.250 | 75,07% | 27.000 | 59,47% | 23.560 | 51,22% |
| Tag 3 | 44.870 | 78,84% | 47.290 | 75,73% | 30.490 | 61,32% | 19.750 | 40,93% |
| Tag 4 | 76.480 | 83,46% | 98.830 | 83,90% | 49.890 | 67,21% | 29.100 | 55,35% |

## 6.3 Ergebnisse und Statistik in Tabellenform

### 6.3.1 Magnetische-Zellsortierung nach Stro-1+ Bone marrow stem cells

Die nachstehenden Tabellen sind eine Ergänzung zu Kapitel 3.5.

*Tabelle 6: Ausgangssituation vor der Sortierung*
*Statistische Werte zur Ausgangszellzahl vor dem Sortierungsvorgang anhand der Casy Daten.*

| | |
|---|---|
| **Mittelwert** | 4.092.550 |
| **Minimum** | 1.960.200 |
| **Maximum** | 7.317.000 |
| **Median** | 3.693.050 |
| **25. Perzentile** | 3.073.840 |
| **75. Perzentile** | 5.231.350 |

*Tabelle 7: Ertrag Stro-1+ BMSC*
*Statistische Werte zur Zellzahl von Stro-1+ Zellen nach dem Sortieren. Auswertung anhand der Daten der Neubaukammer.*

| | |
|---|---|
| **Mittelwert** | 54.060 |
| **Minimum** | 10.000 |
| **Maximum** | 125.600 |
| **Median** | 37.500 |
| **25. Perzentile** | 18.750 |
| **75. Perzentile** | 90.000 |

### 6.3.2 Proliferationsvergleich FaDu Monokultur vs. FaDu Co-Kultur

Die nachstehenden Tabellen sind eine Ergänzung zu den Kapiteln 3.6.2 bis 3.6.4.

*Tabelle 8: FaDu Proliferation mit dem BMSC **Ansatz 1***
*Tabellarische Übersicht der statistischen Auswertung der Proliferationsanalyse des Ansatzes 1 (mit ursprünglich 10 – 1000 ausgesäten BMSC pro cm²) zwischen vitalen FaDu und CoK FaDu an **Tag 4** anhand der Werte der Neubauerkammer.*

| **Wilcoxon Test** | FaDu | CoK FaDu |
|---|---|---|
| **P-Wert** | 0,6426 | |
| **Signifikanz** (P<0,05) | Nein | |
| Mittelwert | 80.000 | 73.640 |
| Minimum | 15.000 | 20.000 |
| Maximum | 200.000 | 190.000 |
| Median | 70.000 | 65.000 |
| 25. Perzentile | 40.000 | 30.000 |
| 75. Perzentile | 105.000 | 90.000 |

*Tabelle 9: FaDu Proliferation mit dem BMSC **Ansatz 2***
*Tabellarische Übersicht der statistischen Auswertung der Proliferationsanalyse des Ansatzes 2 (mit Stro-1+ BMSC) zwischen vitalen FaDu und CoK FaDu an **Tag 4** anhand der Werte der Neubauerkammer*

| **Wilcoxon Test** | FaDu | CoK FaDu |
|---|---|---|
| **P-Wert** | 0,3828 | |
| **Signifikanz** (P<0,05) | Nein | |
| Mittelwert | 91.000 | 78.500 |
| Minimum | 15.000 | 25.000 |
| Maximum | 170.000 | 215.000 |
| Median | 95.000 | 62.500 |
| 25. Perzentile | 28.750 | 43.750 |
| 75. Perzentile | 143.800 | 101.300 |

*Tabelle 10: FaDu Proliferation mit dem BMSC **Ansatz 3***
*Tabellarische Übersicht der statistischen Auswertung der Proliferationsanalyse des Ansatzes 3 (mit BMSC der P2) zwischen vitalen FaDu und CoK FaDu an **Tag 4** anhand der Werte der Neubauerkammer.*

| **Wilcoxon Test** | FaDu | CoK FaDu |
|---|---|---|
| **P-Wert** | 0,7070 | |
| **Signifikanz** (P<0,05) | Nein | |
| Mittelwert | 65.910 | 69.090 |
| Minimum | 15.000 | 30.000 |
| Maximum | 120.000 | 150.000 |
| Median | 65.000 | 50.000 |
| 25. Perzentile | 45.000 | 40.000 |
| 75. Perzentile | 100.000 | 90.000 |

## 6.4 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| APC | Allophyocyanin |
| BFGF | Basic fibroblast growth factor |
| BMP4 | Bone morphogenetic protein 4 |
| BMSC | Bone Marrow Stromal / Stem Cells |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| ca. | circa |
| CAFs | Cancer-associated fibroblasts |
| Casy | Cell counter and analyzing system |
| CCR2 | Chemokine receptor 2 |
| $cm^2$ | Quadratzentimeter |
| CD | Cluster of differentiation |
| CI | Konfidenzintervall |
| $CO_2$ | Kohlenstoffdioxid |
| CoK | Co-Kultur |
| d. h. | das heißt |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | Epidermal growth factor |
| EMT | Epithelial-Mesenchymale Transition |
| FACS | Fluoreszenz-aktivierte Zellfluss Sortierung |
| FCS | fötales Kälberserum |
| FGF 7 | Fibroblast growth factor 7 |
| FITC | Fluoreszeinisothiocyanat |
| FSC | Forward Scatter / Vorwärtsstreulicht |
| g | Gramm |
| geb. | Geboren |
| h | Stunde |
| HGF | Hepatocyte growth factor |
| HIV | Humanes Immundefizienz-Virus |
| HLA-DR | Human leukocyte Antigen-DR |
| HNSCC | Head and neck squamous cell carcinoma |
| ICC | Intra – Klassen – Korreliation |
| IDO | Indoleamine 2,3-dioxygenase |
| IFN- ß | Interferon beta |

| | |
|---|---|
| IL | Interleukin |
| ISCT | International Society for Cellular Therapy |
| IQR | Interquartilsabstand |
| kDa | Kilodalton |
| MACS | Magnetic Activated Cell Sorting |
| M2 | Makrophagen Typ 2 |
| MCP-1 | Monocyte chemoattractant protein-1 |
| mg | Milligramm |
| min | Minute/n |
| ml | Milliliter |
| MSC | Mesenchymal Stem Cells |
| NF- κB | Nuclear Factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells |
| nm | Nanometer |
| NO | Nitric oxide |
| µg | Mikrogram |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| P | Passage |
| PBS | Phosphat gepufferte Salzlösung / Phosphat buffered Saline |
| PDGF | Platelet-derived growth factor |
| PE | Phycoerythrin |
| Pen/Strep | Penicillin / Streptomycin |
| PerCP | Peridin Chlorophyll |
| PET | Polyethylenterephthalat |
| PGE2 | Prostaglandin E2 |
| PKB | Proteinkinase B |
| PTEN | Phosphatase and Tensin homolog |
| rpm | Revolutions per minute / Runden pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde/n |
| SCF | Stem cell factor |
| SDF-1 | Stromal cell-derived factor 1 |
| sog. | sogenannte |
| SSC | Side Scatter / Seitwärtsstreulicht |
| Stro-1+ | Stro-1 positiv |
| TAMs | Tumor-associated macrophages |
| TGF-ß | Transforming growth factor beta. |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor alpha |
| TRAIL | TNF-related apoptosis-inducing ligand |

| | |
|---|---|
| u. a. | unter anderem |
| VEGF | Vascular-endothelial growth factor |
| VEGFR | Vascular-endothelial growth factor receptor |
| vs. | versus |
| Wnt | Wingless-type |
| z. B. | zum Beispiel |

## 6.5 Abbildungsverzeichnis & Tabellenverzeichnis

### *Abbildungsverzeichnis*

*Abbildung 1: Hüftkopfknochen unmittelbar aus dem OP ... 18*
*Abbildung 2: Aufgesägter Hüftkopf nach dem Auswaschen ... 18*
*Abbildung 3: Aufbau eines FACS-Gerätes ... 21*
*Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes ... 28*
*Abbildung 5: Visualisierung des Stromausschlussverfahrens des automatisierten Zellzählgerätes Casy ... 35*
*Abbildung 6: Exemplarische Darstellung einer Neubauerkammer ... 36*
*Abbildung 7: Exemplarisches Foto der BMSC ... 38*
*Abbildung 8: Schematische Ausführung einer positiven Selektion mit Hilfe der magnetischen Zellseparation ... 39*
*Abbildung 9: Veranschaulichung der in dieser Arbeit verwendeten indirekten Kopplung der Microbeads an die Zellen ... 40*
*Abbildung 10: Versuchsaufbau mit dem Magnetic Activated Cell Sorting ... 42*
*Abbildung 11: Darstellung einer 12-Wellplatte für die Zellzählung an Tag 1 – 4 ... 43*
*Abbildung 12: Darstellung eines Transwell-Einsatzes ... 44*
*Abbildung 13: Übersicht einer Boxplot-Darstellung ... 48*
*Abbildung 14: Verifizierung des Immunphänotyps der BMSC: positive Marker ... 50*
*Abbildung 15: Verifizierung des Immunphänotyps der BMSC: negative Marker ... 51*
*Abbildung 16: Stro-1 Präsenz in einer aus dem Knochenmark isolierten mesenchymalen Stammzellkultur der P1 ... 52*
*Abbildung 17: Von Kossa-Färbung als histologischer Nachweis der osteogenen Differenzierung ... 53*
*Abbildung 18: Oil Red O-Färbung als histologischer Nachweis der adipogenen Differenzierung ... 53*
*Abbildung 19: Boxplot für die BMSC-Zahl vor der Aussaat auf die drei Ansätze ... 54*
*Abbildung 20: Lichtmikroskopische Dokumentation kleiner, hochproliferativer BMSC Klone ... 55*
*Abbildung 21: Ursprünglich ausgesäte Dichte von **10 Zellen pro cm²** (750 Zellen) ... 56*
*Abbildung 22: Ursprünglich ausgesäte Dichte von **100 Zellen pro cm²** (7.500 Zellen) ... 56*
*Abbildung 23: Ursprünglich ausgesäte Dichte von **1.000 Zellen pro cm²** (75.000 Zellen) ... 57*
*Abbildung 24: Überblick der BMSC-Zellzahl vor und nach der Sortierung für den Marker Stro-1 ... 58*
*Abbildung 25: Proliferation mit dem BMSC **Ansatz 1** an Tag 4 ... 59*
*Abbildung 26: Proliferation mit dem BMSC **Ansatz 2** an Tag 4 ... 60*
*Abbildung 27: Proliferation mit dem BMSC **Ansatz 3** an Tag 4 ... 61*
*Abbildung 28: FaDu Proliferation mit dem BMSC **Ansatz 1** im zeitlichen Verlauf ... 62*

*Abbildung 29: FaDu Proliferation mit dem BMSC **Ansatz 2*** ..... 63
*Abbildung 30: FaDu Proliferation mit dem BMSC **Ansatz 3** im zeitlichen Verlauf* ..... 64
*Abbildung 31: Neubauerkammer vs. Casy Zellzählungsgerät: ICC Analyse mit herangezogenen Werten der FaDu Proliferation mit **Ansatz 1*** ..... 66
*Abbildung 32: Neubauerkammer vs. Casy Zellzählungsgerät: ICC Analyse mit herangezogenen Werten der FaDu Proliferation mit **Ansatz 2*** ..... 67
*Abbildung 33: Neubauerkammer vs. Casy Zellzählungsgerät: ICC Analyse mit herangezogenen Werten der FaDu Proliferation mit **Ansatz 3*** ..... 68

## *Tabellenverzeichnis*

*Tabelle 1: Einschlusskriterien: Patientenalter zum Entnahmezeitpunkt und Geschlecht* ..... 19
*Tabelle 2: Verwendete Antikörper zur Verifizierung der BMSC im FACS-Gerät* ..... 23
*Tabelle 3: Steckbrief des verwendeter Antikörpers Stro-1* ..... 24
*Tabelle 4: Zusammensetzung des Osteogenen Differenzierungsmediums* ..... 26
*Tabelle 5: Zusammensetzung des Adipogenen Differenzierungsmediums* ..... 27
*Tabelle 6: Ausgangssituation vor der Sortierung* ..... 112
*Tabelle 7: Ertrag Stro-1+ BMSC* ..... 112
*Tabelle 8: FaDu Proliferation mit dem BMSC **Ansatz 1*** ..... 113
*Tabelle 9: FaDu Proliferation mit dem BMSC **Ansatz 2*** ..... 113
*Tabelle 10: FaDu Proliferation mit dem BMSC **Ansatz 3*** ..... 114

## 6.6 Literaturverzeichnis

Abarbanell AM, Coffey AC, Fehrenbacher JW, Beckman DJ, Herrmann JL, Weil B and Meldrum DR (2009). "*Proinflammatory cytokine effects on mesenchymal stem cell therapy for the ischemic heart*." Ann Thorac Surg 88(3): 1036-1043.

Abts H, Emmerich M, Miltenyi S, Radbruch A and Tesch H (1989). "*CD20 positive human B lymphocytes separated with the magnetic cell sorter (MACS) can be induced to proliferation and antibody secretion in vitro*." J Immunol Methods 125(1-2): 19-28.

Aggarwal S and Pittenger MF (2005). "*Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses*." Blood 105(4): 1815-1822.

Albini A and Sporn MB (2007). "*The tumour microenvironment as a target for chemoprevention*." Nat Rev Cancer 7(2): 139-147.

Arnold KM, Opdenaker LM, Flynn D and Sims-Mourtada J (2015). "*Wound healing and cancer stem cells: inflammation as a driver of treatment resistance in breast cancer*." Cancer Growth Metastasis 8: 1-13.

Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C and Prockop DJ (1998). "*Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts*." Proc Natl Acad Sci U S A 95(7): 3908-3913.

Bartmann C, Rohde E, Schallmoser K, Purstner P, Lanzer G, Linkesch W and Strunk D (2007). "*Two steps to functional mesenchymal stromal cells for clinical application*." Transfusion 47(8): 1426-1435.

Beckermann BM, Kallifatidis G, Groth A, Frommhold D, Apel A, Mattern J, Salnikov AV, Moldenhauer G, Wagner W, Diehlmann A, Saffrich R, Schubert M, Ho AD, Giese N, Buchler MW, Friess H, Buchler P and Herr I (2008). "*VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma*." Br J Cancer 99(4): 622-631.

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 (2004). "*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(9): 3313-3319.

Beresford JN (1989). "*Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow*." Clin Orthop Relat Res(240): 270-280.

Bergfeld SA, Blavier L and DeClerck YA (2014). "*Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote survival and drug resistance in tumor cells*." Mol Cancer Ther 13(4): 962-975.

Bianco P (2014). "*"Mesenchymal" stem cells*." Annu Rev Cell Dev Biol 30: 677-704.

Biosciences B. (2004). "*BD FACSCanto Flow Cytometer Reference Manual*." from http://web4.cbm.uam.es/joomla-rl/images/Servicios/030.Citometria-flujo/documentos/UsersguideFACSCanto.pdf.

Böhrnsen F, Fricke M, Sander C, Leha A, Schliephake H and Kramer FJ (2015). "*Interactions of human MSC with head and neck squamous cell carcinoma cell line PCI-13 reduce markers of epithelia-mesenchymal transition*." Clin Oral Investig 19(5): 1121-1128.

Bosch P, Musgrave DS, Lee JY, Cummins J, Shuler T, Ghivizzani TC, Evans T, Robbins TD and Huard (2000). "*Osteoprogenitor cells within skeletal muscle*." J Orthop Res 18(6): 933-944.

Brighton CT, Lorich DG, Kupcha R, Reilly TM, Jones AR and Woodbury RA, 2nd (1992). "*The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell*." Clin Orthop Relat Res(275): 287-299.

Bulman SE, Barron V, Coleman CM and Barry F (2013). "*Enhancing the mesenchymal stem cell therapeutic response: cell localization and support for cartilage repair*." Tissue Eng Part B Rev 19(1): 58-68.

Caplan AI (1991). "*Mesenchymal stem cells*." J Orthop Res 9(5): 641-650.

Caplan AI (2017). "*The new MSC: MSCs as pericytes are sentinels and gatekeepers*." J Orthop Res.

Caplan AI and Correa D (2011). "*The MSC: an injury drugstore*." Cell Stem Cell 9(1): 11-15.

Carvalho JL, Braga VB, Melo MB, Campos AC, Oliveira MS, Gomes DA, Ferreira AJ, Santos RA and Goes AM (2013). "*Priming mesenchymal stem cells boosts stem cell therapy to treat myocardial infarction*." J Cell Mol Med 17(5): 617-625.

Cassiede P, Dennis JE, Ma F and Caplan AI (1996). "*Osteochondrogenic potential of marrow mesenchymal progenitor cells exposed to TGF-beta 1 or PDGF-BB as assayed in vivo and in vitro*." J Bone Miner Res 11(9): 1264-1273.

Chen C, Zimmermann M, Tinhofer I, Kaufmann AM and Albers AE (2013). "*Epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem(-like) cells in head and neck squamous cell carcinoma*." Cancer Lett 338(1): 47-56.

Chen XC, Wang R, Zhao X, Wei YQ, Hu M, Wang YS, Zhang XW, Zhang R, Zhang L, Yao Bet al. (2006). "*Prophylaxis against carcinogenesis in three kinds of unestablished tumor models via IL12-gene-engineered MSCs*." Carcinogenesis 27(12): 2434-2441.

Cicchetti DV (1994). "*Guidelines, Criteria, and Rules of Thumb for Evaluating Normed and Standardized AssessmentInstruments in Psychology*." Psychological Assessment 6(4): 284-290.

Cipriani P, Di Benedetto P, Liakouli V, Del Papa B, Di Padova M, Di Ianni M, Marrelli A, Alesse E and Giacomelli R (2013). "*Mesenchymal stem cells (MSCs) from scleroderma patients (SSc) preserve their*

*immunomodulatory properties although senescent and normally induce T regulatory cells (Tregs) with a functional phenotype: implications for cellular-based therapy*." Clin Exp Immunol 173(2): 195-206.

Cohnheim J (1867). "*Über Entzündungen und Eiterung*." Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin 40: 1-79.

Colter DC, Class R, DiGirolamo CM and Prockop DJ (2000). "*Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow*." Proc Natl Acad Sci U S A 97(7): 3213-3218.

Colter DC, Sekiya I and Prockop DJ (2001). "*Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells*." Proc Natl Acad Sci U S A 98(14): 7841-7845.

Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang Let al. (2008). "*A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs*." Cell Stem Cell 3(3): 301-313.

Dennis JE and Caplan AI (1996). "*Analysis of the developmental potential of conditionally immortal marrow-derived mesenchymal progenitor cells isolated from the H-2Kb-tsA58 transgenic mouse*." Connect Tissue Res 35(1-4): 93-99.

Di Bella C, Farlie P and Penington AJ (2008). "*Bone regeneration in a rabbit critical-sized skull defect using autologous adipose-derived cells*." Tissue Eng Part A 14(4): 483-490.

Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R and Prockop DJ (1999). "*Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate*." Br J Haematol 107(2): 275-281.

Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, Cantos C, Jorgensen C and Noel D (2007). "*Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism*." Stem Cells 25(8): 2025-2032.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D and Horwitz E (2006). "*Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*." Cytotherapy 8(4): 315-317.

Droujinine IA, Eckert MA and Zhao W (2013). "*To grab the stroma by the horns: From biology to cancer therapy with mesenchymal stem cells*." Oncotarget 4(5).

Duvvuri U and Myers JN (2009). "*Cancer of the head and neck is the sixth most common cancer worldwide*." Curr Probl Surg 46(2): 114-117.

Dvorak HF (1986). "*Tumors: Wounds that do not heal: Similarities between tumor stroma generation and wound healing (Review)*." The new England Journal of Medicine 315(26): 1650-1659.

Dvorak HF (2015). "*Tumors: wounds that do not heal-redux*." Cancer Immunol Res 3(1): 1-11.

Dwyer RM, Potter-Beirne SM, Harrington KA, Lowery AJ, Hennessy E, Murphy JM, Barry FP, O'Brien T and Kerin MJ (2007). "*Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells*." Clin Cancer Res 13(17): 5020-5027.

Erices A, Conget P and Minguell JJ (2000). "*Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood*." Br J Haematol 109(1): 235-242.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G and Mavilio F (1998). "*Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors*." Science 279(5356): 1528-1530.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK and Lalykina KS (1970). "*The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*." Cell Tissue Kinet 3(4): 393-403.

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK and Gerasimov UV (1987). "*Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers*." Cell Tissue Kinet 20(3): 263-272.

Friedenstein AJ, Piatetzky S, II and Petrakova KV (1966). "*Osteogenesis in transplants of bone marrow cells*." J Embryol Exp Morphol 16(3): 381-390.

Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T and Tsuji K (2004). "*Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential*." Stem Cells 22(5): 649-658.

Fukuda K (2001). "*Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering*." Artif Organs 25(3): 187-193.

Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, Bhatt KA, Callaghan M, Bastidas N, Bunting S, Steinmetz HG and Gurtner GC (2004). "*Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells*." Am J Pathol 164(6): 1935-1947.

Gatta G, Botta L, Sanchez MJ, Anderson LA, Pierannunzio D, Licitra L and Group EW (2015). "*Prognoses and improvement for head and neck cancers diagnosed in Europe in early 2000s: The EUROCARE-5 population-based study*." Eur J Cancer 51(15): 2130-2143.

Glauner B (2006). "*Stromausschlussverfahren - Standardisierung der Vitalitätsvestimmung*." BIOspektrum: 394-395.

Global Burden of Disease Cancer C, Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, Dicker DJ, Chimed-Orchir O, Dandona Ret al. (2017). "*Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic*

*Analysis for the Global Burden of Disease Study*." JAMA Oncol 3(4): 524-548.

Grieb G, Steffens G, Pallua N, Bernhagen J and Bucala R (2011). "*Circulating fibrocytes--biology and mechanisms in wound healing and scar formation*." Int Rev Cell Mol Biol 291: 1-19.

Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG and Shi S (2002). "*Stem cell properties of human dental pulp stem cells*." J Dent Res 81(8): 531-535.

Gronthos S, Graves SE, Ohta S and Simmons PJ (1994). "*The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors*." Blood 84(12): 4164-4173.

Haasters F, Prall WC, Anz D, Bourquin C, Pautke C, Endres S, Mutschler W, Docheva D and Schieker M (2009). "*Morphological and immunocytochemical characteristics indicate the yield of early progenitors and represent a quality control for human mesenchymal stem cell culturing*." J Anat 214(5): 759-767.

Hall PA and Watt FM (1989). "*Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity*." Development 106(4): 619-633.

Hanahan D and Weinberg RA (2011). "*Hallmarks of cancer: the next generation*." Cell 144(5): 646-674.

Hartmann S and Grandis JR (2016). "*Treatment of head and neck cancer in the elderly*." Expert Opin Pharmacother 17(14): 1903-1921.

Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM and Caplan AI (1992). "*Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow*." Bone 13(1): 81-88.

Hong IS, Lee HY and Kang KS (2014). "*Mesenchymal stem cells and cancer: friends or enemies?*" Mutat Res 768: 98-106.

Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR and Pittenger MF (2000). "*Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase*." J Biol Chem 275(13): 9645-9652.

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 (2002). "*Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow*." Nature 418(6893): 41-49.

Jouppila-Matto A, Narkio-Makela M, Soini Y, Pukkila M, Sironen R, Tuhkanen H, Mannermaa A and Kosma VM (2011). "*Twist and snai1 expression in pharyngeal squamous cell carcinoma stroma is related to cancer progression*." BMC Cancer 11: 350.

Jung S, Panchalingam KM, Rosenberg L and Behie LA (2012). "*Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells in defined serum-free media*." Stem Cells Int 2012: 123030.

Kadiyala S, Young RG, Thiede MA and Bruder SP (1997). "*Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro*." Cell Transplant 6(2): 125-134.

Kalluri R and Neilson EG (2003). "*Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*." J Clin Invest 112(12): 1776-1784.

Kandel ES and Hay N (1999). "*The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB*." Exp Cell Res 253(1): 210-229.

Kang SK, Shin IS, Ko MS, Jo JY and Ra JC (2012). "*Journey of mesenchymal stem cells for homing: strategies to enhance efficacy and safety of stem cell therapy*." Stem Cells Int 2012: 342968.

Kansy BA, Dißmann PA, Hemeda H, Bruderek K, Westerkamp A. M., Jagalski V, Schuler P, Kansy K, Lang S, Dumitru CA and Brandau S (2014). "*The bidirectional tumor-mesenchymal stromal cell interaction promotes the progression of head and neck cancer*." Stem Cell Res Ther 5(4): 95.

Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, Rovira, II, Nguyen AT, Malide D, Combs CA, Hall G, Zhang J, Raffeld M, Rogers TB, Stetler-Stevenson W, Frank JA, Reitz M and Finkel T (2006). "*Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma*." J Exp Med 203(5): 1235-1247.

Kidd S, Caldwell L, Dietrich M, Samudio I, Spaeth EL, Watson K, Shi Y, Abbruzzese J, Konopleva M, Andreeff M and Marini FC (2010). "*Mesenchymal stromal cells alone or expressing interferon-beta suppress pancreatic tumors in vivo, an effect countered by anti-inflammatory treatment*." Cytotherapy 12(5): 615-625.

Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, Klopp A, Battula VL, Weil M, Andreeff M and Marini FC (2009). "*Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging*." Stem Cells 27(10): 2614-2623.

Kidd S, Spaeth E, Watson K, Burks J, Lu H, Klopp A, Andreeff M and Marini FC (2012). "*Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma*." PLoS One 7(2): e30563.

Kim JW, Ha KY, Molon JN and Kim YH (2013a). "*Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for chronic spinal cord injury in rats: comparative study between intralesional and intravenous transplantation*." Spine (Phila Pa 1976) 38(17): E1065-1074.

Kim N, Im KI, Lim JY, Jeon EJ, Nam YS, Kim EJ and Cho SG (2013b). "*Mesenchymal stem cells for the treatment and prevention of graft-versus-host disease: experiments and practice*." Ann Hematol 92(10): 1295-1308.

Koo TK and Li MY (2016). "*A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research*." J Chiropr Med 15(2): 155-163.

Koontongkaew S (2013). "*The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas*." J Cancer 4(1): 66-83.

Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D and Robey PG (1997). "*Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo*." J Bone Miner Res 12(9): 1335-1347.

Lee RH, Seo MJ, Pulin AA, Gregory CA, Ylostalo J and Prockop DJ (2009). "*The CD34-like protein PODXL and alpha6-integrin (CD49f) identify early progenitor MSCs with increased clonogenicity and migration to infarcted heart in mice*." Blood 113(4): 816-826.

Li W, Zhou Y, Yang J, Zhang X, Zhang H, Zhang T, Zhao S, Zheng P, Huo J and Wu H (2015). "*Gastric cancer-derived mesenchymal stem cells prompt gastric cancer progression through secretion of interleukin-8*." J Exp Clin Cancer Res 34: 52.

Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR and Flake AW (2000). "*Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep*." Nat Med 6(11): 1282-1286.

Lin G, Liu G, Banie L, Wang G, Ning H, Lue TF and Lin CS (2011). "*Tissue distribution of mesenchymal stem cell marker Stro-1*." Stem Cells Dev 20(10): 1747-1752.

Liotta F, Querci V, Mannelli G, Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Rossi MC, Mazzoni A, Cosmi L, Romagnani S, Maggi E, Gallo O and Annunziato F (2015). "*Mesenchymal stem cells are enriched in head neck squamous cell carcinoma, correlates with tumour size and inhibit T-cell proliferation*." Br J Cancer 112(4): 745-754.

Liu J, Han G, Liu H and Qin C (2013). "*Suppression of cholangiocarcinoma cell growth by human umbilical cord mesenchymal stem cells: a possible role of Wnt and Akt signaling*." PLoS One 8(4): e62844.

Loebinger MR, Eddaoudi A, Davies D and Janes SM (2009). "*Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer*." Cancer Res 69(10): 4134-4142.

Lüllmann-Rauch R (2003). *Taschenlehrbuch Histologie*, Thieme: 88-89.

Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM and Leung VY (2014). "*Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells*." Stem Cells 32(6): 1408-1419.

Ma Y, Hao X, Zhang S and Zhang J (2012). "*The in vitro and in vivo effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on the growth of breast cancer cells*." Breast Cancer Res Treat 133(2): 473-485.

Maby-El Hajjami H, Ame-Thomas P, Pangault C, Tribut O, DeVos J, Jean R, Bescher N, Monvoisin C, Dulong J, Lamy T, Fest T and Tarte K (2009). "*Functional alteration of the lymphoma stromal cell niche by the cytokine context: role of indoleamine-2,3 dioxygenase*." Cancer Res 69(7): 3228-3237.

Mafi P, Hindocha S, Mafi R, Griffin M and Khan WS (2011). "*Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization - a systematic review of the literature*." Open Orthop J 5(Suppl 2): 253-260.

Majors AK, Boehm CA, Nitto H, Midura RJ and Muschler GF (1997). "*Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation*." J Orthop Res 15(4): 546-557.

Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M and Gerson SL (1998). "*Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells*." J Cell Physiol 176(1): 57-66.

Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A and Ogawa S (1999). "*Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro*." J Clin Invest 103(5): 697-705.

Mandal M, Myers JN, Lippman SM, Johnson FM, Williams MD, Rayala S, Ohshiro K, Rosenthal DI, Weber RS, Gallick GE and El-Naggar AK (2008). "*Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features*." Cancer 112(9): 2088-2100.

Martin FT, Dwyer RM, Kelly J, Khan S, Murphy JM, Curran C, Miller N, Hennessy E, Dockery P, Barry FP, O'Brien T and Kerin MJ (2010). "*Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumour microenvironment: stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT)*." Breast Cancer Res Treat 124(2): 317-326.

Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W and Dilloo D (2004). "*Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation*." Blood 103(12): 4619-4621.

Meleshina AV, Cherkasova EI, Shirmanova MV, Klementieva NV, Kiseleva EV, Snopova Lcapital Ve C, Prodanets NN and Zagaynova EV (2015). "*Influence of mesenchymal stem cells on metastasis development in mice in vivo*." Stem Cell Res Ther 6: 15.

Mets T and Verdonk G (1981). "*In vitro aging of human bone marrow derived stromal cells*." Mech Ageing Dev 16(1): 81-89.

Miltenyi S, Muller W, Weichel W and Radbruch A (1990). "*High gradient magnetic cell separation with MACS*." Cytometry 11(2): 231-238.

Bywalez W der Firma Miltenyi (2017). Persönliche Mitteilung über das Entwicklungsjahr der MACS Methode.

Motegi SI and Ishikawa O (2016). "*Mesenchymal stem cells: The roles and functions in cutaneous wound healing and tumor growth*." J Dermatol Sci.

Mucci I, Legitimo A, Compagnino M, Consolini R, Migliaccio P, Metelli MR and Scatena F (2009). "*The methodological approach for the generation of human dendritic cells from monocytes affects the maturation state of the resultant dendritic cells*." Biologicals 37(5): 288-296.

Nakahara H, Goldberg VM and Caplan AI (1991). "*Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo*." J Orthop Res 9(4): 465-476.

Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J, Chen J, Hentschel S, Vecil G, Dembinski J, Andreeff M and Lang FF (2005). "*Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas*." Cancer Res 65(8): 3307-3318.

Nasef A, Zhang YZ, Mazurier C, Bouchet S, Bensidhoum M, Francois S, Gorin NC, Lopez M, Thierry D, Fouillard L and Chapel A (2009). "*Selected Stro-1-enriched bone marrow stromal cells display a major suppressive effect on lymphocyte proliferation*." Int J Lab Hematol 31(1): 9-19.

Ning H, Lin G, Lue TF and Lin CS (2011). "*Mesenchymal stem cell marker Stro-1 is a 75 kd endothelial antigen*." Biochem Biophys Res Commun 413(2): 353-357.

Nöth U, Tuli R, Osyczka AM, Danielson KG and Tuan RS (2002). "*In vitro engineered cartilage constructs produced by press-coating biodegradable polymer with human mesenchymal stem cells*." Tissue Eng 8(1): 131-144.

Nuschke A (2014). "*Activity of mesenchymal stem cells in therapies for chronic skin wound healing*." Organogenesis 10(1): 29-37.

Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL and Weinberg RA (2005). "*Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion*." Cell 121(3): 335-348.

Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M and Werner C (2004). "*Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro*." Stem Cells 22(3): 377-384.

Owen M (1988). "*Marrow stromal stem cells*." J Cell Sci Suppl 10: 63-76.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak DR (1999). "*Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*." Science 284(5411): 143-147.

Poggi A and Giuliani M (2016). "*Mesenchymal Stromal Cells Can Regulate the Immune Response in the Tumor Microenvironment*." Vaccines (Basel) 4(4).

Poggi A, Musso A, Dapino I and Zocchi MR (2014). "*Mechanisms of tumor escape from immune system: role of mesenchymal stromal cells*." Immunol Lett 159(1-2): 55-72.

Portney LG WM (2000). *Foundations of clinical research: applications to practice*. New Jersey, Prentice Hall.

Prestwich RJ, Oksuz DC, Dyker K, Coyle C and Sen M (2011). "*Feasibility and efficacy of induction docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil chemotherapy combined with cisplatin concurrent chemoradiotherapy for nonmetastatic Stage IV head-and-neck squamous cell carcinomas*." Int J Radiat Oncol Biol Phys 81(4): e237-243.

Prockop DJ, Sekiya I and Colter DC (2001). "*Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells*." Cytotherapy 3(5): 393-396.

Qiao L, Xu Z, Zhao T, Zhao Z, Shi M, Zhao RC, Ye L and Zhang X (2008a). "*Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model*." Cell Res 18(4): 500-507.

Qiao L, Xu ZL, Zhao TJ, Ye LH and Zhang XD (2008b). "*Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling*." Cancer Lett 269(1): 67-77.

Qiao L, Zhao TJ, Wang FZ, Shan CL, Ye LH and Zhang XD (2008c). "*NF-kappaB downregulation may be involved the depression of tumor cell proliferation mediated by human mesenchymal stem cells*." Acta Pharmacol Sin 29(3): 333-340.

Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang SS, Takashi S, Baik GH, Shibata W, Diprete B, Betz KS, Friedman R, Varro A, Tycko B and Wang TC (2011). "*Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth*." Cancer Cell 19(2): 257-272.

Rajantie I, Ilmonen M, Alminaite A, Ozerdem U, Alitalo K and Salven P (2004). "*Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells*." Blood 104(7): 2084-2086.

Rangan SR (1972). "*A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma*." Cancer 29(1): 117-121.

Rao TP and Kuhl M (2010). "*An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more*." Circ Res 106(12): 1798-1806.

Ren C, Kumar S, Chanda D, Kallman L, Chen J, Mountz JD and Ponnazhagan S (2008). "*Cancer gene therapy using mesenchymal stem cells expressing interferon-beta in a mouse prostate cancer lung metastasis model*." Gene Ther 15(21): 1446-1453.

Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH and Verfaillie CM (2002). "*Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow*." J Clin Invest 109(3): 337-346.

Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L and Verfaillie CM (2001). "*Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells*." Blood 98(9): 2615-2625.

Ridge SM, Sullivan FJ and Glynn SA (2017). "*Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression*." Mol Cancer 16(1): 31.

Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, Hoogduijn M, Jankovskis G, Muiznieks I, Muceniece R and Ancans J (2009). "*Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis*." Stem Cell Rev 5(4): 378-386.

Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D and Shimizu H (2008). "*Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type*." J Immunol 180(4): 2581-2587.

Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K and Ozawa K (2007). "*Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells*." Blood 109(1): 228-234.

Schafer M and Werner S (2008). "*Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited*." Nat Rev Mol Cell Biol 9(8): 628-638.

Scherzad A, Hackenberg S, Radeloff A, Froelich K, Rak K, Hagen R and Kleinsasser N (2013). "*Human mesenchymal stem cells promote cancer motility and cytokine secretion in vitro*." Cells Tissues Organs 198(5): 327-337.

Scherzad A, Steber M, Gehrke T, Rak K, Froelich K, Schendzielorz P, Hagen R, Kleinsasser N and Hackenberg S (2015). "*Human mesenchymal stem cells enhance cancer cell proliferation via IL-6 secretion and activation of ERK1/2*." Int J Oncol 47(1): 391-397.

Scherzed A, Hackenberg S, Froelich K, Kessler M, Koehler C, Hagen R, Radeloff A, Friehs G and Kleinsasser N (2011). "*BMSC enhance the survival of paclitaxel treated squamous cell carcinoma cells in vitro*." Cancer Biol Ther 11(3): 349-357.

Schütze N, Kunzi-Rapp K, Wagemanns R, Noth U, Jatzke S and Jakob F (2005). "*Expression, purification, and functional testing of recombinant CYR61/CCN1*." Protein Expr Purif 42(1): 219-225.

Sekiya I, Colter DC and Prockop DJ (2001). "*BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells*." Biochem Biophys Res Commun 284(2): 411-418.

Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG and Prockop DJ (2002). "*Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality*." Stem Cells 20(6): 530-541.

Shi S, Zhang Q, Xia Y, You B, Shan Y, Bao L, Li L, You Y and Gu Z (2016). "*Mesenchymal stem cell-derived exosomes facilitate nasopharyngeal carcinoma progression*." Am J Cancer Res 6(2): 459-472.

Simmons PJ and Torok-Storb B (1991). "*Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1*." Blood 78(1): 55-62.

Spaeth EL, Kidd S and Marini FC (2012). "*Tracking inflammation-induced mobilization of mesenchymal stem cells*." Methods Mol Biol 904: 173-190.

Stadlinger BaTH (2012). *Kommunikation der Zellen: Die entzündliche Reaktion*. Deutschland, Quintessence Publishing.

Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F and Zander AR (2004). "*Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use*." Exp Hematol 32(12): 1212-1225.

Suila H, Pitkanen V, Hirvonen T, Heiskanen A, Anderson H, Laitinen A, Natunen S, Miller-Podraza H, Satomaa T, Natunen J, Laitinen S and Valmu L (2011). "*Are globoseries glycosphingolipids SSEA-3 and -4 markers for stem cells derived from human umbilical cord blood?*" J Mol Cell Biol 3(2): 99-107.

Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR and Miller FD (2001). "*Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin*." Nat Cell Biol 3(9): 778-784.

Villaron EM, Almeida J, Lopez-Holgado N, Alcoceba M, Sanchez-Abarca LI, Sanchez-Guijo FM, Alberca M, Perez-Simon JA, San Miguel JF and Del Canizo MC (2004). "*Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*." Haematologica 89(12): 1421-1427.

Wakitani S, Saito T and Caplan AI (1995). "*Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine*." Muscle Nerve 18(12): 1417-1426.

Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ and Black IB (2000). "*Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons*." J Neurosci Res 61(4): 364-370.

Wu Y, Chen L, Scott PG and Tredget EE (2007). "*Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis*." Stem Cells 25(10): 2648-2659.

Yamada K, Uchiyama A, Uehara A, Perera B, Ogino S, Yokoyama Y, Takeuchi Y, Udey MC, Ishikawa O and Motegi S (2016). "*MFG-E8 Drives Melanoma Growth by Stimulating Mesenchymal Stromal Cell-Induced Angiogenesis and M2 Polarization of Tumor-Associated Macrophages*." Cancer Res 76(14): 4283-4292.

Yang Y, Bucan V, Baehre H, von der Ohe J, Otte A and Hass R (2015a). "*Acquisition of new tumor cell properties by MSC-derived exosomes*." Int J Oncol 47(1): 244-252.

Yang Y, Otte A and Hass R (2015b). "*Human mesenchymal stroma/stem cells exchange membrane proteins and alter functionality during interaction with different tumor cell lines*." Stem Cells Dev 24(10): 1205-1222.

Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H and Sekiya I (2007). "*Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle*." Cell Tissue Res 327(3): 449-462.

Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL and Fink DJ (1998). "*Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair*." J Orthop Res 16(4): 406-413.

Yu L, Lu S, Tian J, Ma J, Li J, Wang H and Xu W (2012). "*TWIST expression in hypopharyngeal cancer and the mechanism of TWIST-induced promotion of metastasis*." Oncol Rep 27(2): 416-422.

Zhang QZ, Su WR, Shi SH, Wilder-Smith P, Xiang AP, Wong A, Nguyen AL, Kwon CW and Le AD (2010). "*Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of m2 macrophages and enhance cutaneous wound healing*." Stem Cells 28(10): 1856-1868.

Zhang Y, Zhao D, Tian C, Li F, Li X, Zhang L and Yang H (2013). "*Stro-1-positive human mesenchymal stem cells prolong skin graft survival in mice*." Transplant Proc 45(2): 726-729.

Zhu Y, Sun Z, Han Q, Liao L, Wang J, Bian C, Li J, Yan X, Liu Y, Shao C and Zhao RC (2009). "*Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1*." Leukemia 23(5): 925-933.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P and Hedrick MH (2002). "*Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*." Mol Biol Cell 13(12): 4279-4295.

Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA and Maini RN (2000). "*Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals*." Arthritis Res 2(6): 477-488.

# Danksagung

Ich möchte mich herzlichst bei zahlreichen Leuten bedanken, die mich während meiner Arbeit an diesem Projekt auf die unterschiedlichste Art und Weise unterstützt haben!

Ich danke Herrn Univ.-Professor Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen, der mir die Möglichkeit geboten hat, diese Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen der Universität Würzburg durchzuführen.

Genauso danke ich Herrn Univ.-Professor Dr. med. Norbert Kleinsasser, meinem Doktorvater, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mich bei Fragen, bei denen keiner mehr weiter wusste, unterstützt hat.

Ein großer Dank geht auch an meine exklusive Betreuung durch Priv.-Dozent Dr. med. Agmal Scherzad und Priv.-Dozent Dr. med. Stephan Hackenberg. Ihr habt mir diese interessante Themenstellung gegeben und mich dafür begeistern können. Ihr hattet immer ein offenes Ohr für Probleme und habt mich unterstützt, wo es möglich war. Das habe ich sehr geschätzt.

Weiterhin möchte ich auch einen Dank aussprechen an alle Mitarbeiter des Labors der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen der Universität Würzburg, die mich so herzlich aufgenommen haben und mir immer zur Seite standen, wenn ich etwas brauchte. Vielen Dank an Frau Dr. rer. nat. Gudrun Steußloff und Herrn Michael Kessler für die gute Einarbeitung in die Laborfertigkeiten und Geduld während meiner experimentellen Arbeit sowie an Petra Joa, Silke Hummel, Jeanette Roller, Laura Halbhuber, Christine Polednik, Margarete Appelmann, Renate Port und Karin Jung.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Jakob und das Laborteam der Orthopädischen Klinik des König-Ludwig-Hauses der Universitätsklinik Würzburg für die Zusammenarbeit im Bezug auf die mesenchymalen Stammzellen und vor allem

an Beate Geyer, die mich während meiner Laborzeit diesbezüglich so zuverlässig betreut hat und bei Rückfragen immer sofort reagierte.

Danke an Frau Carolin Malsch aus dem medizinischen Epidemiologischen Institut der Universität Würzburg für die fachkundige statistische Beratung.

Vielen Dank auch an Simone König, die mich bei statistischen Fragen immer geduldig und kompetent beraten hat.

Abschließend möchte ich meinen Eltern aus tiefstem Herzen danken, für ihre Unterstützung, ihr Vertrauen in mich und die Motivation. Ohne euch wäre dieses Studium gar nicht möglich gewesen!

Sowie ein großer Dank an meinen Freund Rudi, der so manches Mal auf mich verzichten musste und mich trotzdem geduldig in allem unterstützt und ermutigt.

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ferner bestätige ich, dass ich weder an der Universität Würzburg noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung abzulegen.

Würzburg, Dezember 2019

Hannah Grein