

Aus der Klinik für Augenheilkunde
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Gerd Geerling

**Untersuchung des regenerativen Potentials muriner
mesenchymaler Stammzellen aus der Tränendrüse unter
21% und 5% Sauerstoff**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Mathias Roth

2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Dekan:	Herr Univ.- Prof. Dr. Nikolaj Klöcker
Referent:	Herr Prof. Dr. med. Stefan Schrader, PhD
Korreferent:	Herr Prof. Dr. med. Colin MacKenzie

Ich widme diese Arbeit meiner Familie.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Roth, M., Spaniol, K., Kordes, C., Schwarz, S., Mertsch, S., Häussinger, D., et al. (2015). The Influence of Oxygen on the Proliferative Capacity and Differentiation Potential of Lacrimal Gland-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 56(8), 4741–4752.

Im Rahmen der Veröffentlichung wurde das Urheberrecht an die ARVO (*Association for Research in Vision and Ophthalmology*) übertragen.

I Zusammenfassung

Aufgrund Ihrer Fähigkeit, in verschiedene Zielgewebe differenzieren zu können und aufgrund der wachstumsfördernden, anti-apoptotischen, anti-inflammatorischen und immunmodulatorischen Eigenschaften werden mesenchymale Stammzellen (MSC) bereits teilweise in der Klinik eingesetzt.

Bei schweren Verläufen der Keratokonjunktivitis sicca aufgrund eines Mangels an Tränenflüssigkeit gibt es derzeit keine kausalen Therapiestrategien, die zu einer zufriedenstellenden und anhaltenden Beschwerdelinderung führen. Eine langfristige Therapieoption stellt möglicherweise die Regeneration von Tränendrüsenengewebe durch Implantation autologer oder allogener MSC dar.

In der Zellkultur wird standardmäßig mit atmosphärischem Sauerstoff bei einer Konzentration von ca. 21% gearbeitet. Die Sauerstoffkonzentration in der physiologischen Nische der MSC liegt jedoch zwischen 2% und 7% und es ist mittlerweile bekannt, dass die Sauerstoffkonzentration ein wichtiger Parameter in der Zellkultur ist. Um die Kulturbedingungen zu optimieren, sollten in dieser Arbeit Phänotyp, Proliferation, Differenzierungspotential und Regenerationskapazität von MSC aus der murinen Tränendrüsen unter Standardbedingungen und bei reduzierter Sauerstoffkonzentration verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden die Zellen in 21% und 5% Sauerstoff kultiviert und mittels Differenzierungsassays, Durchflusszytometrie, *Cell-Sorter*-unterstützten Proliferations- und *Colony Forming Unit-Assays* charakterisiert. Außerdem wurde der Effekt von MSC-konditioniertem Kulturmedium aus beiden Sauerstoffbedingungen auf epitheliale Zellen der Tränendrüse in Migrations- und Proliferationsassays untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass Zellen aus beiden Kulturbedingungen Differenzierungspotential und einen MSC-typischen Phänotyp aufweisen. In 5% Sauerstoff produzierten die Zellen weniger reaktive Sauerstoffspezies, zeigten eine stabile Morphologie, ein größeres Potential Kolonien zu bilden, eine erhöhte Wachstumsrate und signifikant mehr CD44 positive Zellen. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass das konditionierte Medium aus 5% Sauerstoff zu einer signifikant erhöhten Migration und Proliferation bei Epithelzellen der Tränendrüse führt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expansion von murinen MSC aus der Tränendrüse bei reduzierter Sauerstoffkonzentration die Proliferationskapazität und das Differenzierungspotential erhält und die positiven Effekte von konditioniertem Medium auf Epithelzellen der Tränendrüse verstärkt. Die Expansion in niedriger Sauerstoffkonzentration scheint somit eine ausgezeichnete Methode zu sein, um vitale MSC aus der Tränendrüse zu erhalten. Desweiteren zeigten die Zellen in niedriger Sauerstoffkonzentration eine höhere Expression von CD44, einen möglicherweise nützlichen Marker, um eine potente MSC Subpopulation zu identifizieren.

II Abkürzungsverzeichnis

3T3	3T3 Zelllinie (murin)
α-SMA	α -Smooth Muscle Actin
ABCG-2	ATP-Binding Cassette, Member 2
AMPK/mTOR	AMP-Activated Protein Kinase/Mechanistic Target Of Rapamycin
BMP	Bone Morphogenetic Protein
c-Myc	Transkriptionsfaktor c-Myc
CD	Clusters Of Differentiation
Chx10	ceh-10 Homeo Domain Containing Homolog / Homeobox Protein CHX10
CXCR	Chemokine Receptor
ΔNp63	Tumor Protein 63
DES	Dry Eye Syndrome
EGF	Epithelial Growth Factor
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
FABP-4	Fatty Acid Binding Protein-4
GATA-4 / -6	GATA Transcription Factor-4 / -6
GVHD	Graft Versus Host Disease
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF-1α	Hypoxia Inducible Factor
HLA	Human Leukocyte Antigen
IFN-γ	Interferon- γ
IGF-II	Insulin-like Growth Factor II
IL	Interleukin
Ki-67	Antigen KI-67
Klf4	Kruppel-like Factor 4
LG-EC	Lacrimal Gland Derived Epithelial Cells (porcine)
LG-MSC	Lacrimal Gland Derived Mesenchymal Stem Cells (murine)
MCP-1	Monocyte Chemo-attractant Protein-1
MET	Mesenchymal-Epithelial Transition
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMP	Matrix Metalloproteinase
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MSC-CM	Kulturmedium das durch MSC konditioniert wurde
MSC-CM 21%	Kulturmedium das durch MSC in 21% Sauerstoff konditioniert wurde
MSC-CM 5%	Kulturmedium das durch MSC in 5% Sauerstoff konditioniert wurde
Oct4	Octamer-binding Transcription Factor 4
OSDI	Ocular Surface Disease Index
p53	Tumor Protein p53
PAS	Periodic Acid-Schiff
Pax6	Paired Box Protein-6
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDK	Pyruvatdehydrogenase-Kinase
PGA	Polyglykolsäure
RAB3D	Ras-related Protein-3D
ROS	Reactive Oxygen Species
SCA-1	Stem Cell Antigen-1
Snai-1	Zinc Finger Protein Snai-1
Sox2	(Sex Determining Region Y)-Box 2
SS	Sjögren Syndrom
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGF-β	Transforming Growth Factor β
TLR	Toll-like Receptors
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

III Inhaltsverzeichnis

I Zusammenfassung	5
II Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung.....	8
1.1. Das trockene Auge.....	8
1.2. Formen des trockenen Auges	8
1.3. Aktuelle Therapieansätze beim schweren trockenen Auge	9
1.4. Mesenchymale Stammzellen.....	9
1.5. Regenerative Eigenschaften der MSC	10
1.6. MSC in der Tränendrüse.....	11
1.7. MSC als Therapieoption bei Keratokonjunktivitis sicca.....	13
1.8. Sauerstoff als wichtiger Parameter der Zellkultur	14
2. Ziele der Arbeit	15
3. Publierte Originalarbeit	16
4. Diskussion	28
5. Schlussfolgerungen	34
6. Literaturverzeichnis	35
7. Eidesstattliche Versicherung.....	50

1. Einleitung

1.1. Das trockene Auge

Die Keratokonjunktivitis sicca (auch bekannt als Syndrom des trockenen Auges, engl.: *Dry Eye Syndrome (DES)*) ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung, die zu stärksten Einschränkungen und entsprechender Minderung der Lebensqualität führen kann. Die weltweite Prävalenz eines „*Dry Eye Syndrome*“ wird je nach Altersklasse (21 - >65 Jahre) auf 5 – 35% geschätzt (1). Betroffene Patienten berichten neben Augenbrennen über Fremdkörpergefühl, Juckreiz, Lichtscheu und Verschwommensehen. Objektiv lässt sich meist eine Verringerung des Sehvermögens und des Kontrastsehens mit daraus resultierenden Einschränkungen im Alltag (Lesen, Autofahren, Zurechtfinden im Haushalt und bei der Arbeit etc.) feststellen (2-4). Durch einen chronischen Reizzustand können im Verlauf sehr schmerzhaft Verletzungen der Augenoberfläche, Sekundärinfektion sowie Vernarbungen auftreten, welche zu weiterer Sehbeeinträchtigung bis hin zur Erblindung führen und operative Maßnahmen wie z.B. eine Amnionmembran-Transplantation, Tarsoraphie oder bei Perforation oder Vernarbung der Hornhaut eine Hornhauttransplantation notwendig machen können (5,6). Patienten, die unter einer schweren Form des trockenen Auges leiden, bewerten den Leidensdruck ähnlich hoch wie Patienten, die unter einer Angina pectoris leiden (7).

1.2. Formen des trockenen Auges

Hinsichtlich der Genese dieser Augenoberflächenstörung wird unterschieden zwischen einem quantitativen und einem qualitativen Tränenmangel. Ursache des qualitativen Tränenmangels ist eine veränderte Tränenzusammensetzung, die zu einer vermehrten Verdunstung der Tränenflüssigkeit führt (8). Ein qualitativer Tränenmangel wird hervorgerufen z.B. durch eine Meibomdrüsendysfunktion, Blepharitis oder eine Bindehautveränderung mit Becherzellmangel, wie z.B. beim Stevens-Johnson Syndrom (9-11). Ursache des quantitativen Tränenmangels ist eine verminderte Gesamtsekretion, wie sie primär bei einer angeborenen Aplasie der Tränendrüse (Alakrimie) und familiärer Dysautonomie auftritt, oder sekundär bei einer altersbedingten Atrophie und Fibrose des Tränendrüsenorgans, Autoimmunerkrankungen wie dem Sjögren-Syndrom, *Graft-versus-Host-Disease* (GVHD),

Destruktion des Tränengewebes beispielsweise durch Tumoren, chronische Entzündungen oder Trauma, Destruktion der Tränenausführungsgänge z.B. durch konjunktivale Narben als Folge von okulärem Pemphigoid, Bestrahlungen, Verbrennungen oder Verätzungen (12-19). Quantitativer Tränenmangel aufgrund einer primären oder sekundären Tränendrüseninsuffizienz ist eine der häufigsten Ursachen für die Entwicklung des Krankheitsbilds eines schweren trockenen Auges (20).

1.3. Aktuelle Therapieansätze beim schweren trockenen Auge

Patienten mit schwerem quantitativen Tränenmangel bleibt neben dem Einsatz von speziellen Kontaktlinsen oder Feuchtigkeitskammer-Brillen, dem intensiven Gebrauch von Tränenersatzmitteln und der Anwendung von lokaler oder auch systemischer anti-inflammatorischer Therapie die Möglichkeit, die Tränenpünktchen vorübergehend durch sogenannte *punctum plugs* oder dauerhaft operativ durch Verödung zu verschließen (5,21-23). Allerdings führen diese Maßnahmen bei schweren Fällen des trockenen Auges oft nicht zu einer ausreichenden und anhaltenden Beschwerdelinderung. In besonders schweren Fällen kann die Transplantation einer autologen Unterkieferspeicheldrüse die Beschwerden der Patienten zwar lindern, führt jedoch aufgrund der qualitativen Unterschiede von normaler Tränenflüssigkeit und Speicheltränenflüssigkeit auch nicht zu einer dauerhaften, signifikanten Funktions-Verbesserung (24,25). Für die schwere Form des trockenen Auges aufgrund eines quantitativen Tränenmangels, gibt es somit bis heute keine hinreichende Behandlung, wobei es insbesondere an kausalen Therapieansätzen mangelt.

1.4. Mesenchymale Stammzellen

In den 1960ern isolierten Friedenstein et al. erstmals zunächst unbestimmte Zellen durch Adhärenz an Plastik-Kulturschalen aus Knochenmarks-Aspirat. Diese Zellen ähnelten in der Morphologie den Fibroblasten und waren in der Lage aus einzelnen Zellen Kolonien zu formen und nach Transplantation unter die Nierenkapsel eines Spendertieres ektopes Knochenmark, einschließlich knöcherner Trabekel, Fett- und hämatopoetischen Gewebes zu bilden (26-28). In den 1990ern konnte eine Verbindung dieser initial „*marrow stromal cells*“ genannten Zellen aus dem Knochenmark zur embryonalen Entwicklung verschiedener mesenchymaler Gewebe gezeigt werden, weshalb sie ab diesem Zeitpunkt als mesenchymale

Stammzellen (MSC) bezeichnet wurden (29,30). Nach der erstmaligen Entdeckung im Knochenmark wurden MSC bis heute aus einer Vielzahl anderer Geweben wie Fettgewebe, Haut, Nabelschnur-Blut, Amnion-Flüssigkeit, Speicheldrüsen etc. isoliert und charakterisiert (31-35).

Dominici et al. legten 2006 Minimalkriterien für die Definition der MSC fest (Tabelle 1.), die allerdings mittlerweile nur noch zum Teil Gültigkeit haben bzw. von einigen Arbeitsgruppen in Frage gestellt werden (36-39).

Tabelle 1) Zusammenfassung der Minimalkriterien für MSC nach Dominici et al. (40)

1. Plastikadhärenz unter Standardkulturbedingungen

2. Phänotyp

Positiv (> 95%)	Negativ (<2%)
CD73	CD34
CD90	CD45
CD105	CD11b oder CD14
	D79a oder CD19
	HLA-DR 3

3. *In vitro* Differenzierung in: Osteoblasten, Adipozyten, Chondroblasten

(bewiesen durch Färbung der Zellen *in vitro*)

1.5. Regenerative Eigenschaften der MSC

Einerseits sind MSC aufgrund ihrer Fähigkeit in andere Gewebe zu differenzieren sehr interessant für die klinische Anwendung. Wie gezeigt werden konnte, sind sie nicht nur in der Lage in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten zu differenzieren, sondern auch in Zellen nicht mesodermalen Ursprungs wie Hepatozyten-ähnliche, Neuronen-ähnliche Zellen, Pankreas-ähnliche Zellen und Azinus-ähnliche Zellen der Speicheldrüse (41-45).

Andererseits wirken sie im Rahmen von Regenerationsprozessen unterstützend: Sie sekretieren Wachstumsfaktoren wie *epithelial growth factor* (EGF), *transforming growth factor beta* (TGF- β), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und weitere Chemokine, die die Zellproliferation und Angiogenese induzieren und anti-apoptotisch wirken (46-49). So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Co-Kultur mit MSC oder die Kultur in Kulturmedium, welches mit MSC konditioniert wurde (CM-MS) bei Zellen unterschiedlichen Ursprungs zu einer schnelleren Wundheilung, signifikant erhöhten Proliferation, schnelleren Regeneration und reduzierten Apoptose nach Schädigung führen (50-56).

Darüber hinaus haben MSC eine Reihe anti-inflammatorischer und immunmodulatorischer Wirkmechanismen: Sie inhibieren die Proliferation von T-Zellen, B-Zellen, *Natural Killer*-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen, reduzieren die Immunglobulin-Produktion in B-Zellen und modulieren die Reifung dendritischer Zellen (57,58). Da kultivierte humane MSC kein MHC-II an der Zelloberfläche exprimieren, sind sie nicht immunogen, so dass im Falle einer Transplantation im Rahmen einer klinischen Anwendung eine Überprüfung der HLA-Kompatibilität wahrscheinlich nicht notwendig ist (59-61). Im *in vivo* Tiermodell konnten die positiven Effekte der MSC unter anderem nach Herzinfarkten, bei Herztransplantation, Strahlen-induziertem Lungenschaden, akutem Nierenversagen, akutem Leberschaden oder neonatalem Schlaganfall nachgewiesen werden (62-74).

In mehreren klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass auch Patienten mit Femur-Nekrose, Osteogenesis imperfecta, Osteoarthritis, koronarem Bypass, Kardiomyopathie, Apoplex, Rückenmarksverletzung, Multipler Sklerose und Diabetes Typ 2 von der systemischen Anwendung von MSC profitieren (75-84). Bei GVHD-Patienten wurden im Jahr 1995 im Rahmen einer klinischen Studie erstmals MSC eingesetzt und mittels intravenöser Infusion verabreicht (85). Seitdem sind die positiven Effekte einer solchen systemischen Therapie mit MSC bei GVHD Patienten in einer Reihe von Arbeiten beschrieben worden (86).

1.6. MSC in der Tränendrüse

Die essentielle Rolle der mesenchymalen Zellen als Zielzellen des *Bone morphogenetic protein* (BMP)-7 im Laufe der Morphogenese der Tränendrüse wurde erstmals 2004 von Dean et al. beschrieben (87). Nach Schädigung der Tränendrüse durch eine Interleukin (IL)-1

Injektion in das Drüsengewebe, konnten im Jahr 2008 erstmals eine mesenchymale Subpopulation als mögliche Progenitorzellen in der Tränendrüse identifiziert werden. Histologisch war nach Schädigung ein Untergang der Azinus-Zellen und klinisch eine Reduktion der Tränensekretion festzustellen (88). In dem anschließenden Regenerationsprozess konnte ein Zunahme der Nestin-, Vimentin-, ABCG2- und SCA-1-positiven Zellen nachgewiesen werden, die teilweise auch proliferierten, wie mittels Ki67 Färbung gezeigt wurde (88-90). Neben den für MSC typischen Markern zeigten diese Zellen die Fähigkeit in Adipozyten zu differenzieren, so dass davon auszugehen ist, dass es sich bei den isolierten Zellen tatsächlich um MSC handelte (89). Bei der Regeneration der Tränendrüse nach Schädigung durch IL-1 spielen möglicherweise die Transdifferenzierung von epithelialem in mesenchymales Gewebe (*epithelial-mesenchymal transition* (EMT)) und von mesenchymalem in epitheliales Gewebe (*mesenchymal-epithelial transition* (MET)) eine Rolle, wie der Nachweis Snai1⁺ Zellen im Laufe der Regeneration You et al. vermuten lässt (91).

Shatos et al beschrieben 2012 die Präsenz mesenchymaler Progenitorzellen in ungeschädigten Tränendrüsen, die eine Ko-Färbung für den mesenchymalen Marker α -Smooth Muscle Actin (SMA) und die Stammzellmarkern Nestin, Musashi 1, ABCG2, Pax 6, Chx 10, Sox 2 oder Δ Np63 zeigten. Nach Isolation dieser Zellen war *in vitro* eine Expression von Ki-67, Nestin, Musashi 1, Pax 6, und CHX 10 über 60 Tage nachweisbar und ist gemeinsam mit der Differenzierbarkeit in neuronale, epitheliale und myoepitheliale Zelltypen Hinweis auf das Stammzellpotential (92). Kürzlich zeigten Ackermann et al. die mRNA Expression der Stammzell-Marker Nanog, Oct4, Sox2, Pax6 und Nestin in Zellen die aus Tränendrüsen adulter Mäuse und auch aus humanem Tränendrüsenmaterial isoliert werden konnten (93). Nach der Expansion waren die Stammzellmarker Sox2, Nanog, Nestin, Klf4 und c-Myc, sowie sog. *lineage marker* (endodermale Entwicklung: GATA4, GATA6; ektodermale Entwicklung: Pax6, neurofilament; mesodermale Entwicklung: BMP4, BMP7 und α -SMA) auf mRNA Ebene bis Passage 30 festzustellen.

Hirayama et al. konnten erstmals im Maus-Modell einen sogenannten Organkeim (engl. *bioengineered lacrimal gland germ*) der Tränendrüse herstellen, also eine *in vitro* erzeugte embryonale Anlage der Tränendrüse, wofür sie vereinzelte embryonale epitheliale und mesenchymale Zellen verwendeten. Durch Einlegen eines PGA Monofilament Fadens konnte ein Ausführungsgang rekonstruiert und nach Anschluss an den Ductus lacrimalis eine Sekretion nachgewiesen werden (94,95).

1.7. MSC als Therapieoption bei Keratokonjunktivitis sicca

Zur topischen oder intravenösen Transplantation von MSC als Therapie bei DES existieren bisher nur wenige Studien im Tiermodell und nur eine klinische Studie am Menschen. Die Erkrankung des schweren trockenen Auges tritt beim Hund relativ häufig auf, so dass sich dieses Tier besonders gut als Modell eignet (96). Die Sicherheit der Anwendung, das Migrationsverhalten der Zellen und die immunmodulatorischen Effekte mit Unterdrückung der T-Zell Proliferation nach lokaler Injektion von MSC in die Tränendrüse konnten im Hunde-Modell gezeigt werden (97,98). Villatoro et al. injizierten MSC, die sie aus dem Fettgewebe von Spendertieren isolierten in die Tränendrüse von Hunden, welche unter chronischem schwerem trockenen Auge litten. In allen Tieren zeigte sich eine signifikante Zunahme der Tränensekretion im Schirmer Test, während die Bindehaut-Hyperämie, Ausfluss und Hornhautveränderungen kontinuierlich über die Zeit abnahmen (99).

In einer kürzlich publizierten Studie schädigten Lee et al. die intraorbitale Tränendrüse im Maus-Modell mit Concanavalin A und injizierten direkt im Anschluss humane oder murine MSC in den periorbitalen Raum. Defekte des Hornhautepithels und IL-2 und Interferon (IFN)- γ Spiegel waren nach MSC Injektion signifikant reduziert, während die Becherzellzahl und Tränen-Sekretion anstiegen (100).

Beyazyildiz et al. applizierten MSC in Form von Tropfen auf die Hornhaut in einem Modell des trockenen Auges in Ratten. Schirmer Test und *Break-up Time* (BUT) zeigten eine signifikante Steigerung, die Fluoreszein- und Bengalrosa-Färbung der Augenoberfläche eine signifikante Abnahme nach der Behandlung mit MSC (101).

Weng et al. beschrieben erstmals die systemische Anwendung von MSC zur Therapie des schweren trockenen Auges bei GVHD-Patienten. Bei 12 der 22 in der Studie eingeschlossenen Patienten kam es nach intravenöser Verabreichung von allogenen MSC zu einer signifikanten Reduktion des Dry Eye Scores, einer Verbesserung des *Ocular Surface Disease Index (OSDI) Scores* und einer Zunahme der Tränensekretion im Schirmer-Test (102).

Zusammengefasst stellt die Transplantation autologer oder allogener MSC somit eine vielversprechende Therapieoption zur Behandlung des schweren trockenen Auges dar, wobei die Isolation einer reinen, möglichst potenten und undifferenzierten Zellpopulation wichtige Voraussetzung ist. Da angenommen wird, dass mesenchymale Stammzellen in unterschiedlichen Geweben bereits in Subpopulationen spezialisiert sind, ist das beste

Regenerations-Ergebnis in der Tränendrüse am ehesten durch Transplantation von MSC zu erzielen, die aus der Tränendrüse isoliert wurden (103-106). Es gibt eine Vielzahl verschiedener Verfahren, um mesenchymale Stammzellen aus den unterschiedlichen Geweben zu extrahieren, allerdings gibt es bisher keine etablierte Methode zur Gewinnung und insbesondere auch zur Expansion mesenchymaler Stammzellen aus der Tränendrüse.

1.8. Sauerstoff als wichtiger Parameter der Zellkultur

In vivo wird die komplexe Stammzellbiologie -einschließlich Selbsterneuerungskapazität und Multipotenz der Zellen- entscheidend durch die anatomische Umgebung inklusive aller zellulären und azellulären Komponenten beeinflusst. Die beteiligten Zellen, Gefäße, Nerven, Matrix-Glykoproteine, dreidimensionale Anordnung etc. aber auch das metabolische Milieu sind hier wichtige Parameter (107). Die physiologische Umgebung der Stammzellen in ihrer Gesamtheit wird als sogenannte Stammzellnische bezeichnet. Sobald Zellen aus ihrer physiologischen Umgebung in die *in vitro* Kultur überführt werden, verändern sich sowohl Phänotyp als auch Funktion der Zellen zunehmend (sog. phänotypischer und funktioneller *drift*) (108). Um die Beeinflussung durch die unphysiologischen Kulturbedingungen zu reduzieren und einen Verlust des Stammzellpotentials zu verhindern, sollten lange Kultur- bzw. Expansions-Zeiten mit vielen Passagen vermieden werden (109-111).

Obwohl die physiologische Sauerstoffkonzentration in der Nische der MSC zwischen 2% und 7% liegt, wird in der Zellkultur standardmäßig die atmosphärische Sauerstoffkonzentration von ca. 21% eingesetzt (112). Die Sauerstoffkonzentration scheint aber - deutlich mehr als initial angenommen - Einfluss auf das metabolische Milieu der Stammzellnische und bei Stammzellen in Kultur unter anderem auf Morphologie, Genexpression, Proliferation und Überleben zu haben und insbesondere bei murinen Zellkulturen eine wichtige Rolle zu spielen (112-117).

2. Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Studie ist es daher, den Einfluss einer -im Vergleich zu den Standard-Kulturbedingungen- physiologisch reduzierten Sauerstoffkonzentration auf mesenchymale Stammzellen der murinen Tränendrüsen (LG-MSc) zu untersuchen (118). Im Einzelnen sollen der Phänotyp, Proliferation und Differenzierungspotential in den beiden Sauerstoffbedingungen verglichen und die Auswirkungen von Kulturmedium, welches mit MSC aus beiden Kulturbedingungen konditioniert wurde (MSC-CM 5% und MSC-CM 21%), auf die Regenerationskapazität epithelialer Tränendrüsenzellen (LG-EC) untersucht werden.

Kooperationen

Die Sortierung der Zellen für die Proliferations-Assays erfolgt im Institut für Transplantations- und Zellmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf. Die Durchflusszytometrische Untersuchung wird in Kooperation mit dem Labor der Hals-Nasen-Ohrenklinik des Universitätsklinikums Ulm durchgeführt. Für die Etablierung der Differenzierungs-Assays und PCR-Analyse wird mit dem Labor der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektionskrankheiten des Universitätsklinikums Düsseldorf zusammengearbeitet.

3. Publiizierte Originalarbeit

Nanotechnology and Regenerative Medicine

The Influence of Oxygen on the Proliferative Capacity and Differentiation Potential of Lacrimal Gland-Derived Mesenchymal Stem Cells

Mathias Roth,¹ Kristina Spaniol,¹ Claus Kordes,² Silke Schwarz,³ Sonja Mertsch,¹ Dieter Häussinger,² Nicole Rotter,³ Gerd Geerling,¹ and Stefan Schrader¹

¹Department of Ophthalmology, University Düsseldorf, Germany

²Department of Gastroenterology, Hepatology and Infectious Diseases, University Düsseldorf, Germany

³Department of Otorhinolaryngology, University Ulm, Germany

Correspondence: Mathias Roth, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Department of Ophthalmology, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Germany; mathias.roth@med.uni-duesseldorf.de

Submitted: August 15, 2014

Accepted: May 14, 2015

Citation: Roth M, Spaniol K, Kordes C, et al. The influence of oxygen on the proliferative capacity and differentiation potential of lacrimal gland-derived mesenchymal stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:4741-4752. DOI:10.1167/iovs.14-15475

PURPOSE. The application of lacrimal gland-derived mesenchymal stem cells (LG-MSC) for the regeneration of lacrimal gland tissue could result in a novel therapy for dry-eye syndrome. To optimize the culture conditions, the purpose of this study was to evaluate the influence of low oxygen on phenotype, differentiation potential, proliferative, and regenerative capacity of murine LG-MSC.

METHODS. Murine LG-MSC were cultured in 21% and 5% oxygen and characterized by flow cytometry, cell sorter assisted proliferation-, and colony forming unit-assays. Reactive oxygen species (ROS) levels as well as lineage differentiation were evaluated. The effect of conditioned medium of LG-MSC from both oxygen conditions (CM^{MSC} 21%, respectively, CM^{MSC} 5%) on lacrimal gland epithelial cells (LG-EC) was examined in wound healing and proliferation assays.

RESULTS. Cells under both culture conditions revealed differentiation potential and presented a MSC-specific flow cytometric phenotype. In 5% oxygen, cells yielded less ROS, showed a stable morphology, higher colony forming potential, and an increased proliferation capacity. Five percent oxygen significantly increased the number of CD44+ LG-MSC. Furthermore, CM^{MSC} 5% significantly enhanced migration and proliferation in LG-EC.

CONCLUSIONS. In vitro expansion in low oxygen preserves the proliferation capacity and differentiation potential of LG-MSC and increases the effects of conditioned medium on migration and proliferation in LG-EC. Therefore, expansion in low oxygen seems to be an excellent method, to obtain vital MSC. Also, an increased number of LG-MSC expressing CD44 was observed under low oxygen, which might be a valuable marker to identify a potent MSC subpopulation.

Keywords: mesenchymal stem cells, oxygen, lacrimal gland, MSC

Dry-eye syndrome, also known as keratoconjunctivitis sicca, is a multifactorial chronic disabling disease, caused by qualitative or quantitative tear deficiency.¹ According to the International Dry Eye Workshop report, the global prevalence of dry eye syndrome is estimated between 5% and 35%, affecting various ages (21–65 years).² Quantitative tear deficiency due to primary or secondary lacrimal gland (LG) insufficiency is one of the major causes for the development of severe dry-eye syndrome. The patients suffer from severe pain and significant deterioration of visual acuity.³ In these severe cases, tear substitutes are not sufficient to relief symptoms and to date, no causative treatment for dry-eye syndrome exists. The understanding of mesenchymal stem cells (MSC) and the use of those cells for the regeneration of LG tissue could result in a novel therapy for severe dry-eye patients.

Several studies showed the high therapeutic potential of MSCs: the outcome after myocardial infarction,^{4–6} acute renal failure,^{7–9} neonatal stroke,^{10,11} osteogenesis imperfecta,¹² multidrug resistant tuberculosis,¹³ fulminant hepatic failure and

further diseases was improved by the application of MSC.^{14,15} even in the absence of apparent MSC long-term engraftment.¹⁶ Although the precise therapeutic mechanisms still remain unclear, so far the prevailing view is, that MSCs home to sites of injury or inflammation, secrete trophic factors to promote the recovery of injured cells and support recruitment as well as proliferation of resident progenitor cells to replace damaged cells. Furthermore, they participate in regeneration through matrix remodeling, immunomodulation, and anti-inflammation.¹⁷ Also, some evidence exists that MSC might contribute to the reconstitution of epithelial tissue by differentiation, as demonstrated for the liver and the cornea.^{18–22}

Due to specialization in subpopulations in different tissue, orthotopic transplantation of MSC will assumable show the best results as a possible therapy for dry-eye syndrome.²³ The existence and possibility of isolating LG-derived MSC (LG-MSC) has been shown.²⁴ And it was demonstrated that after experimentally induced inflammation of the LG, the number of MSC in the LG tissue increased, and that formation of

extracellular matrix corresponds to the location of those cells.²⁵⁻²⁷

Prior to an application of LG-MSC for the regeneration of LG tissue in an animal model and potentially later on in clinical settings, those cells need to be characterized thoroughly. Especially factors influencing their differentiation potential and proliferation, such as isolation and culture conditions, are of great importance. Oxygen concentration is one of the most important determinants of tissue metabolism: changes in morphology and gene expression, growth rate and survival are strikingly modified by altered oxygen concentrations.²⁸⁻³⁰ Recent studies suggest, that the oxygen concentration plays an important role especially in murine MSC cultures.³¹ The aim of this study was to evaluate the influence of oxygen concentration reduced to the physiologically relevant value on the phenotype, the proliferative capacity, and the differentiation potential of murine LG-MSC in order to improve the maintenance of LG-MSC in vitro for transplantation purposes.³²

MATERIALS AND METHODS

Mice

C57BL/6 mice (8-10 weeks old, male) were used for the study. All experiments were conducted in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and the guidelines of the Federation of Laboratory Animal Science Association (FELASA).

Explant Culture

After euthanasia both extraorbital LGs were removed immediately. The glands were washed in culture medium (α -MEM; Biochrom, Berlin, Germany), 2 mM L-glutamine (Biochrom), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 15% fetal bovine serum (FBS; Biochrom) and cut into small pieces (< 1 mm). The pieces were placed on a 6-cm uncoated culture dish (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and allowed to adhere for 5 minutes before culture medium was added.

All experiments were set up in triplicates. Cells were grown on tissue culture treated plastic (Sarstedt) either under routine culture conditions, respectively, high oxygen (21% O₂, 5% CO₂, 37°C) or under low oxygen (5% O₂, 5% CO₂, 37°C). Media was replaced every 2 to 3 days. At approximately 80% confluence, the cells were passaged by trypsinization (Trypsin 0.05%; Invitrogen) and reseeded at a density of 2500 cells/cm² in a T25 flask. At passage 1 and 5 cells of both culture conditions were expanded for further analysis in T75 flask.

Flow Cytometry

Cells from both culture conditions in passage 1 were trypsinized, collected, and incubated with phycoerythrin- or fluorescein isothiocyanate-conjugated antibodies against murine CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD49f, CD54, CD90.2, CD105, CD106, CD117, CD166, SCA-1, and IgG (Biolegend, San Diego, CA, USA; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) for 30 minutes at 4°C. Excess antibody was removed by two washes with staining buffer. Fluorescent labeling (minimum 10,000 events) was detected on a calibrated Gallios cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). For measurement of reactive oxygen species (ROS) a Total Reactive Oxygen Species Assay Kit was used (eBioscience, San Diego, CA, USA). Cells were incubated with ROS assay stain solution for 2 hours in 21% and 5% oxygen, respectively, and afterward analyzed on a flow cytometer (FCS 500; Beckman Coulter) according to the manufacturer's instructions. Histograms were created with FlowJo software (Treestar, Ashland, OR, USA).

Cell Proliferation

Viable Cells from a single cell suspension were sorted by flow cytometry (Mo Flow XDP; Beckman Coulter) with a 100- μ m nozzle at 25 PSI into 6-cm culture dishes (10,000 cells per dish). After 7 and 14 days the dishes were trypsinized, stained with propidium iodide and the viable cells were counted by flow cytometry (FCS 500; Beckman Coulter).

Cumulative Population Doublings

In order to calculate the cumulative population doublings, in every passage up to passage 5 the cells were counted initially after trypsinization and after harvesting at the following passage.

Colony Forming Unit (CFU) Assay

Viable cells from a single cell suspension were sorted by flow cytometry as described above into 6-well plates at two densities (100 cells/well and 1000 cells/well). Cultures were set up in triplicate and incubated at the respective oxygen level. Medium was changed every 2 to 3 days. After 2 weeks, colonies were washed with PBS and then fixed for 30 minutes with methanol at -20°. For enumeration the fixed cultures were stained with 1% Rhodamine red (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) for 30 minutes, then rinsed with water and allowed to dry. As described earlier, aggregates of greater than 50 cells were counted as CFU using an inverted microscope (DM 750; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).³³

Differentiation Assays

To proof the multilineage differentiation potential of LG-MSC, adipogenic, and osteogenic differentiation was induced in both culture conditions. Cells from both culture conditions were trypsinized at passage 1 and 5 and reseeded into 6-cm culture dishes in culture medium. When the cells were subconfluent, medium was changed to osteogenic medium (adipogenic medium [α -MEM]), 2 mM L-glutamine, 1% pen/strep, 10% FBS, 1×10^{-8} M dexamethasone (Sigma-Aldrich Corp.), 0.05 mM ascorbic acid 2 phosphate (Sigma-Aldrich Corp.), 10 mM Beta glycerophosphate (Sigma-Aldrich Corp.) or α -MEM, 2 mM L-glutamine, 1% pen/strep, 10% FBS, 5 μ g/mL insulin (Sigma-Aldrich Corp.), 1×10^{-6} M dexamethasone (Sigma-Aldrich Corp.), 50 μ M indomethacin (Sigma-Aldrich Corp.), 0.5 μ M 3-Isobutyl-1-methylxanthine (Sigma-Aldrich Corp.), and replaced every 2 to 3 days. After 7, 14, and 21 days, cultures were collected for analysis. As control, cells in standard culture medium were collected at day 0 and 21.

The differentiation potential was quantified by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Differentiation was visualized by staining fixed adipogenic cultures with Oil-Red-O solution and osteogenic cultures with Alizarin-Red as described earlier.^{34,35}

Quantitative RT-PCR

For qRT-PCR, cells were harvested from culture dishes, RNA was isolated, and cDNA was synthesized with Super Script II Reverse Transcriptase kit (Invitrogen), RNase Out Inhibitor (Invitrogen), 100 mM dNTP-Set (Invitrogen), and Oligo(dt) 12-18 Primer (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. To evaluate the adipogenic differentiation the expression of fatty acid binding protein 4 (FABP4) was examined. The forward primer of FABP4 was TGAAATCACCGCAGACGACA, the reverse primer ACACATTCCACCACCAGCTT. For the evaluation of osteogenic differentiation, the expression of Osteopontin (OPN) was examined. The forward primer of OPN was

CAGTGATTGCTTTTGCCTGTTTG, the reverse primer GGTCTCATCAGACTCATCCGAATG.³⁶ A 96-well qRT-PCR system (7500 fast; Applied Biosystems) was used for amplification (95°C for 15 minutes, 45 cycles of 94°C for 15 seconds, 59°C for 20 seconds, 72°C for 35 seconds). Amplifications were carried out in triplicates using SYBR green master mix (Invitrogen). No-template-samples served as the negative controls. All measurements were normalized by ribosomal protein S6 (RPS6) expression (forward primer: CTTTTTCGTGACGCCTCCCA; reverse primer: GGGGAAGGAGATGTTAGCTTCA). For data analysis ($\Delta\Delta C_t$ method) SDS Version 2.0.6 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and Excel 2011 (Microsoft, Redmond, WA, USA) were used.

Porcine Lacrimal Gland Epithelial Cell (LG-EC) Isolation and Culture

German domestic pigs (*Sus scrofa*) were euthanized and the LGs were extracted immediately. The LG-EC were isolated and cultured as previously described.^{37,38} Briefly, after removal, the LG tissue was washed, minced, and enzymatically digested by collagenase (350 U/mL, Sigma-Aldrich Corp.), DNase (40 U/mL, Sigma-Aldrich Corp.) and hyaluronidase (300 U/mL, Sigma-Aldrich Corp.). After digestion and filtering through a 70- μ m mesh (Roth, Karlsruhe, Germany) and a ficoll gradient (Sigma-Aldrich Corp.), the cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with glutamax (DMEM/F12) containing 10% FBS (Life Technologies), 0.4 μ g/mL hydrocortisone, 0.1 nM cholera toxin, 0.18 mM adenine, 5 μ g/mL transferrin, 5 μ g/mL insulin (all Sigma-Aldrich Corp.), 10 ng/mL epidermal growth factor, and 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies) at a density of 4.0×10^4 cells per cm^2 on a 3T3/J2 mouse fibroblast feeder layer. For expansion, as well as for experiments, the porcine LG-EC were kept in standard conditions (21% O₂, 5% CO₂, 37°C) at all times.

Immunofluorescence Staining

Porcine LG-EC were fixed with methanol at -20°C for 5 minutes, washed in PBS and nonspecific binding sites were blocked for 1 hour at room temperature with 5% normal goat serum (VWR) in PBS. The cells were incubated with an anti-pan-cytokeratin antibody (anti-pan-cytokeratin [AE1/AE3] conjugated with Alexa Fluor 488; dilution 1:500; eBioscience, San Diego, CA, USA) and anti-Rab3D antibody (dilution 1:500; Abcam, Cambridge, UK) overnight at 4°C and washed with PBS. For Rab3D-staining, cells were washed again, incubated with the appropriate secondary antibody (dilution 1:1000; Alexa Fluor) for 1 hour at room temperature and washed again. Nuclear staining and mounting was performed with Prolong Gold Antifade mounting medium with DAPI (Life Technologies). Images were taken with an immunofluorescence microscope (DFC 450; Leica Microsystems).

Periodic Acid Schiff (PAS)-Alcian Blue Reaction

Porcine LG tissue was embedded in paraffin and cut into 6- μ m sections. After deparaffinization, rehydration, and incubation in alcian blue solution for 5 minutes, the sections were washed with running tap water for 3 minutes and rinsed with distilled water. Then the sections were incubated with Schiff's reagent (Merck, Darmstadt, Germany) for 15 minutes and nuclear staining was performed with hematoxylin solution (Roth).

β -Hexosaminidase Assay

At day 14 porcine LG-EC were seeded in 24 well plates (5×10^5 cells/well) and allowed to adhere overnight. After washing and

incubation in serum-free DMEM for 2 hours, a medium sample was removed for the baseline measurement. Afterward, carbachol was added for 15 minutes (100 μ M), and a stimulated sample was removed. 4-methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide (Sigma-Aldrich Corp.) was used as a substrate in order to measure β -hexosaminidase activity. Fluorescence intensity (360-nm excitation, 450-nm emission) was determined on a microplate reader (FLUOstar Omega; BMG LABTECH, Ortenberg, Germany). The experiment was performed with porcine LG-EC from three different animals.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

The cell pellet was fixed in 2.5% glutaraldehyde with 4% PFA in 0.1 M cacodylate buffer, embedded in Spurr media (Serva, Heidelberg, Germany). Sections of 60 to 80 nm were cut and analyzed with a Hitachi H600 transmission electron microscope (Krefeld, Germany). The images were taken with a Gatan BioScan camera (München, Germany).

Conditioned Medium

Lacrimal gland derived-MSCs were isolated in both 5% and 21% oxygen as described above and expanded on a T75 flask. When subconfluent, medium was removed, cells were washed with PBS and medium was changed to 20 mL DMEM/F12 medium without any supplements. After 24 hours the conditioned medium (CM) was collected, centrifuged at 188 g for 5 minutes to remove detached MSCs and stored at -80°C until further use.

Wound Healing Assay

Porcine LG-EC were seeded in migration assay inserts (ibidi, Martinsried, Germany) according to the manufacturer's instructions. Briefly, one insert per well was placed in a 24-well plate and firmly attached. Into each side of the insert, 7×10^4 porcine LG-EC were seeded and allowed to adhere for 24 hours. Medium was removed, cells were washed two times with PBS, and the insert was carefully removed. Afterward, the cells were washed again two times and incubated with CM from both culture conditions (CM^{MSC} 5%, respectively, CM^{MSC} 21%) and DMEM/F12 medium without any supplements (DMEM/F12). In the gap area a position was randomly marked and pictures of the gap at this position were taken at 0, 5, 10, and 20 hours post insert removal. Experiments were performed independently with three different CM per condition.

Proliferation Capacity After Ethanol Injury

The cell proliferation after injury was measured by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay as described before.³⁹ Briefly, porcine LG-EC were seeded at a density of 1×10^4 cells in a 96-well plate and allowed to adhere for 24 hours. Cells were washed with PBS and incubated with 20% ethanol for 1 minute for injury. After another washing step with PBS, the cells were incubated in CM from both culture conditions (CM^{MSC} 5%, respectively, CM^{MSC} 21%) and DMEM/F12 medium without any supplements as control medium (DMEM/F12) up to 48 hours. Afterward, medium was replaced by 100 μ L MTT solution (0.5 mg/mL) and incubated for 1 hour at 37°C and 5% CO₂. MTT solution was discarded and 100 μ L of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to the cells to dissolve the formazan crystals. Measurement was done at 540 nm using an ELISA reader upon 0, 6, 24, and 48 hours after treatment. Experiments were performed independently three times with CM^{MSC} 5%, CM^{MSC} 21%, and

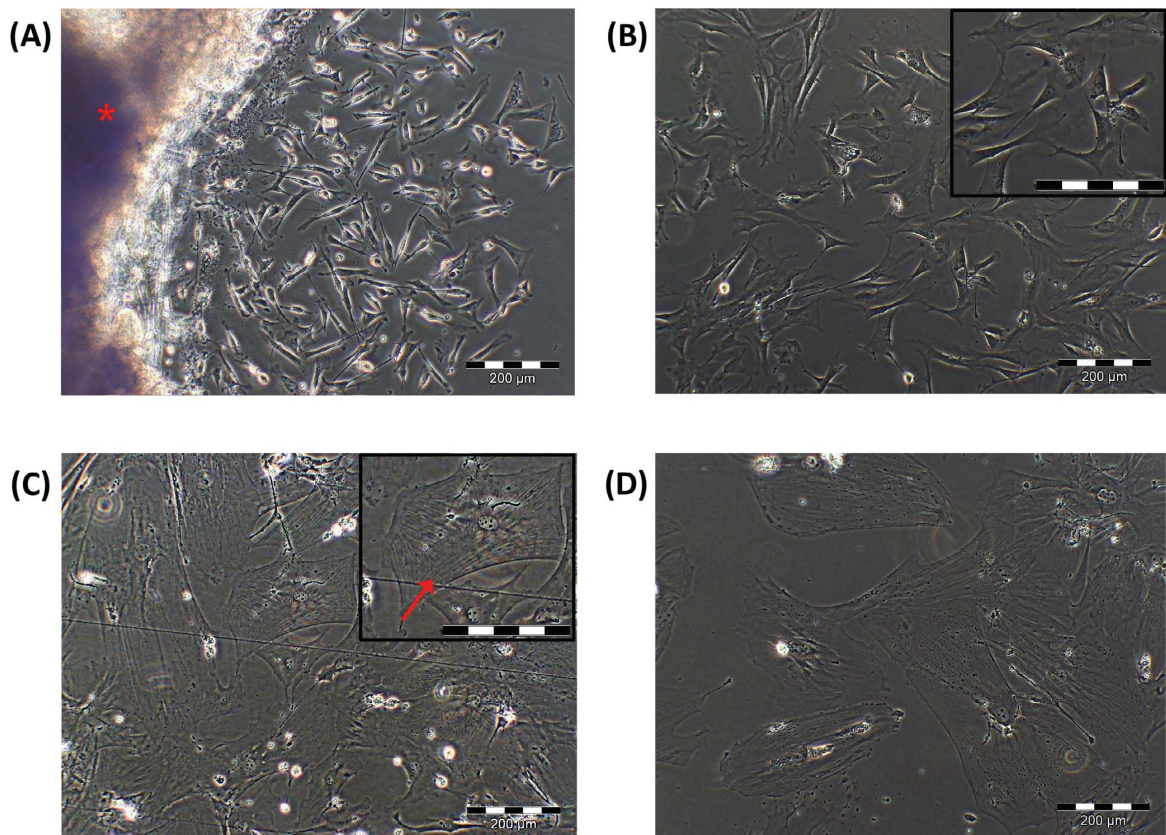


FIGURE 1. Morphology and proliferation of cultured LG-MSC under high and low oxygen. Cells growing out of the explant piece (asterisk) with a fibroblast-like, spindle-shaped morphology in both culture conditions (A). Passage 2 cells with a stable spindle-shaped morphology under low oxygen (B). Passage 2 cells under high oxygen with an increase in cell size, a high cytoplasmic to nuclear ratio and stress fibers (red arrow) [C]. Large cells with stress fibers and ceased growth under high oxygen in passage 4 (D). Scale bars: 200 μ m.

DMEM/F12 as control. Ten wells were evaluated for each experimental condition.

Statistical Analysis

The experimental data was analyzed with Prism 6 (Graphpad, La Jolla, CA, USA). All values are shown as mean $\pm$ SD. *P* values were determined using Student's *t*-test with two-tailed distribution. Differences were considered significant at *P* less than or equal to 0.5. For the migration and regeneration assays a two-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test (*P* < 0.05) was performed.

RESULTS

Cell Morphology

After isolation, LG-MSC in both culture conditions presented an MSC-specific elongated fibroblast-like and spindle-shaped morphology (Fig. 1A). Under high-oxygen conditions the MSC underwent morphologic changes over the culture period. In passage 2 these cells developed stress fibers and an increase in cell-size was found compared with cells under low oxygen (Figs. 1B, 1C). Furthermore, under these conditions cells in two cultures became very large with many stress fibers and ceased growth in passages 4 and 5 (Fig. 1D).

Flow Cytometric Cell Characterization

Analyzed cells in passage 1 showed a MSC-typical marker expression. Cells in both conditions were positive for CD29, CD49 (+/+), CD90, CD105 (+/+), CD106, CD166, and SCA-1, and negative for CD31, CD34, CD45, CD 54 (+/-), and CD117 as shown in Figure 2A. The marker expression did not differ between the two culture conditions, except for a significant difference in CD44. This marker increased under low oxygen (Fig. 2B). Increased fluorescence intensity, indicating higher ROS levels was detected in cells cultured under high oxygen (Fig. 2C).

Differentiation Assays

In both culture conditions, adipogenic differentiation resulted in the formation of lipid vesicles, microscopically visible approximately 3 days after the initiation of differentiation. Those lipid vesicles could be stained with Oil-Red-O (Fig. 3A). After induction of osteogenic differentiation, calcium deposition was microscopically detectable using Alizarin Red (Fig. 3D). Macroscopically and microscopically no difference between the two culture conditions was noted. The differentiation potential was quantified by qRT-PCR. As an indicator for adipocyte differentiation FABP4 expression was measured, respectively, OPN expression as an indicator for osteocyte differentiation. Under low as well as under high oxygen a significant fold change of the

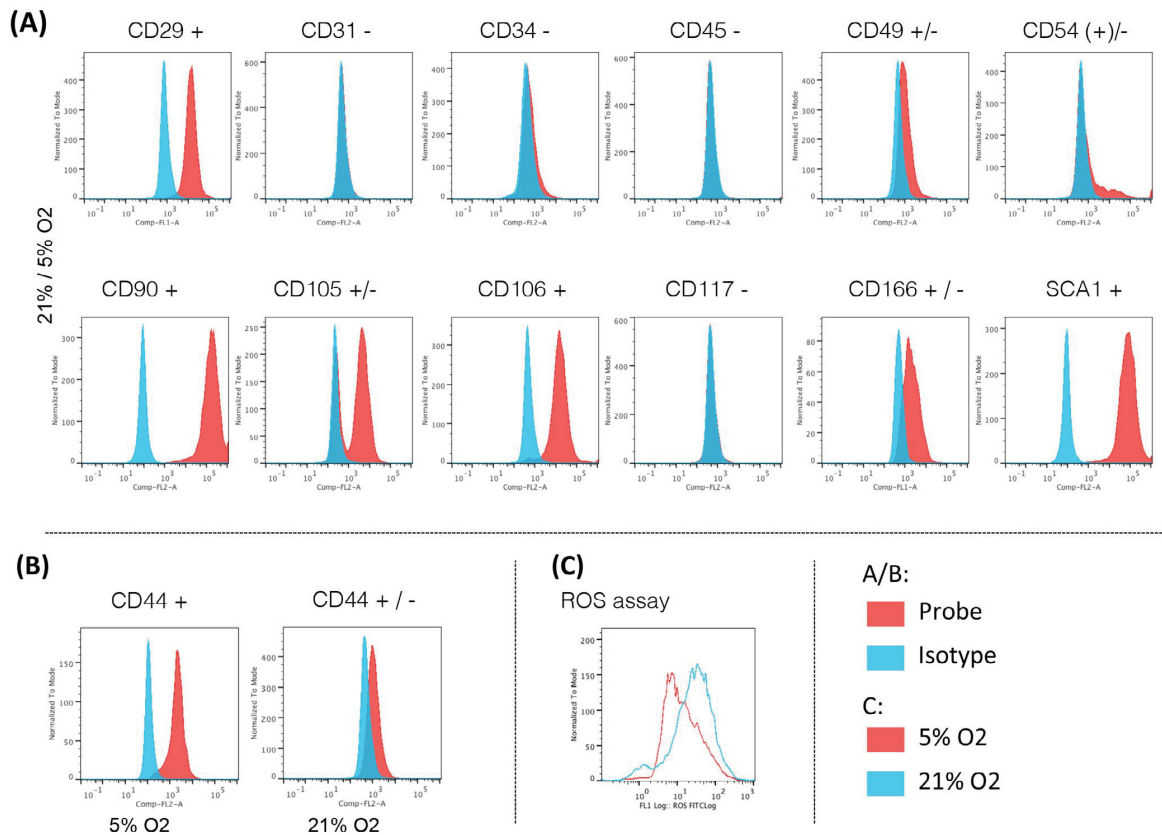


FIGURE 2. Flow cytometric characterization of the phenotype and ROS measurement. Mesenchymal stem cells-typical marker expression of LG-MSC in both culture conditions (A). Increase of CD44 positive cells under low oxygen (B). Higher ROS levels under high oxygen, measured as a shift to an increased fluorescence intensity (C).

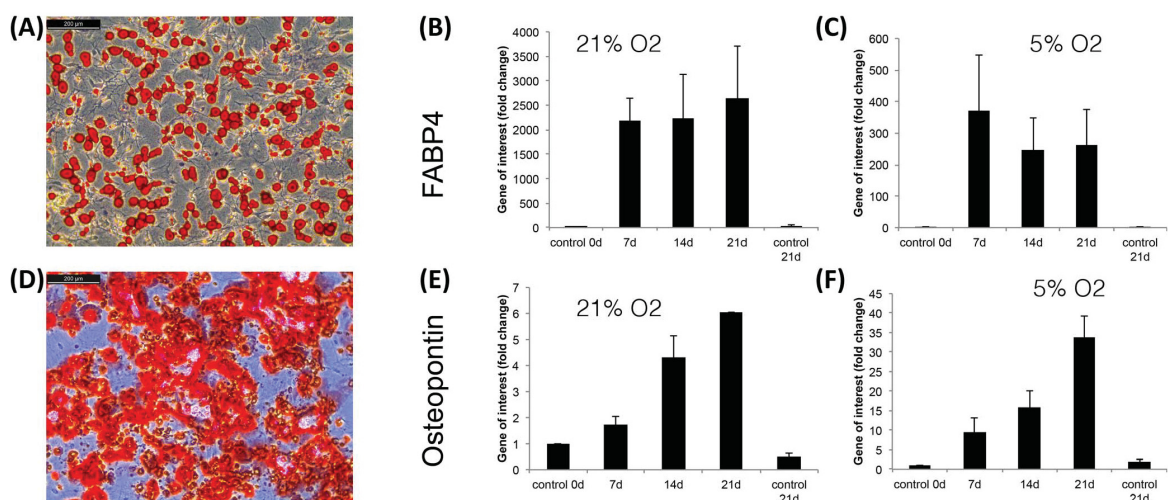


FIGURE 3. Adipogenic and osteogenic differentiation of LG-MSC under high and low oxygen concentration. Formation of lipid vesicles after adipocyte differentiation stained with Oil-Red-O (A). Calcium deposits stained with Alizarin-Red (D). Significant increase of FABP4 (B, C) and OPN expression (E, F) after induction of differentiation under high and low oxygen. Scale bars: 200 μ m.

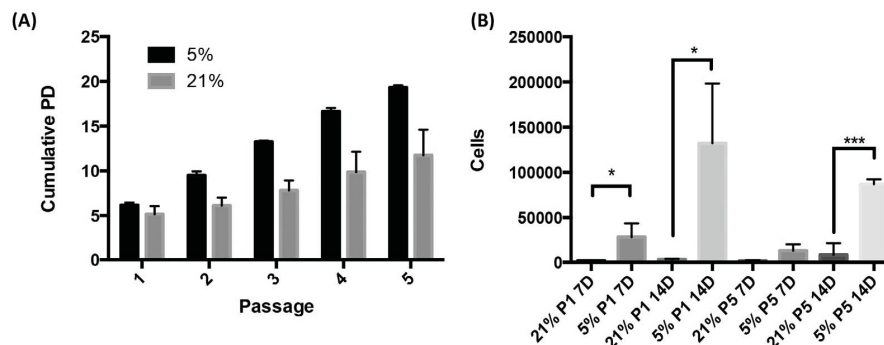


FIGURE 4. Proliferation of LG-MSC under high and low oxygen concentrations. Cumulative population doublings of LG-MSC in high and low oxygen up to passage 5 (11.7 ± 2.5 , respectively, 19.3 ± 0.24 ; $P = 0.015$ [A]). Flow cytometric proliferation assay with a significant difference in the total cell number between the two culture conditions in passage 1 day 7 ($P = 0.0475$), day 14 ($P = 0.0276$), and passage 5 day 14 ($P = 0.0006$ [B]).

measured genes was examined in comparison to the control (Figs. 3B, 3C, 3E, 3F). The fold change after induction of differentiation was higher for FABP4 under high oxygen, with the basic expression of FABP4 8.8-fold elevated under low oxygen (± 1.76 , $P = 0.01$). The fold change of OPN was significantly higher under low oxygen, without a significant difference in the basic expression between the two conditions.

Proliferation Assay and CFU Assay

Cumulative population doublings are shown in Figure 4A. The average population doubling time was significantly shorter under low oxygen compared with high oxygen (low oxygen: $1.8 \text{ d} \pm 0.18$; high oxygen $2.7 \text{ d} \pm 0.37$; $P = 0.043$). Lacrimal gland-MSC cultured in low oxygen resulted in a total cumulative cell numbers of $4.4 \times 10^6 \pm 3.5 \times 10^5$, compared with $1.29 \times 10^6 \pm 1.44 \times 10^5$ cells in high-oxygen cultures ($P = 0.026$) at the end of five passages.

The flow cytometric proliferation assay (Fig. 4B) revealed a difference between the two culture conditions in passage 1, with a cell count of 1796 ± 387 after 7 days and 2985 ± 432.7

after 14 days in high oxygen, compared with 27789 ± 9189 after 7 days and 132455 ± 38241 after 14 days in low oxygen (day 7: $P = 0.0475$, day 14: $P = 0.0276$). In passage 5 the difference in the cell count at day 7 was notable, although slightly not significant (high oxygen: 1528 ± 461.9 ; low oxygen: 12820 ± 4049 ; $P = 0.0503$). At day 14 in passage 5 the flow cytometric cell count showed a highly significant difference between the two culture conditions (high oxygen: 8091 ± 7426 ; low oxygen: 87006 ± 3103 ; $P = 0.0006$).

The CFU assays showed a highly significant difference between the two culture conditions in passage 1 (high oxygen: 0.2889 ± 0.07536 ; low oxygen 8.556 ± 1.215 ; $P < 0.0001$), but no significant difference in passage 5 (high oxygen: 0.7778 ± 0.2778 ; low oxygen 1.978 ± 0.8005 ; Fig. 5).

Epithelial Cell Morphology and Immunocytochemistry

After 3 to 5 days colonies formed, reaching subconfluency after approximately 9 days (Fig. 6A). The porcine LG-EC presented a

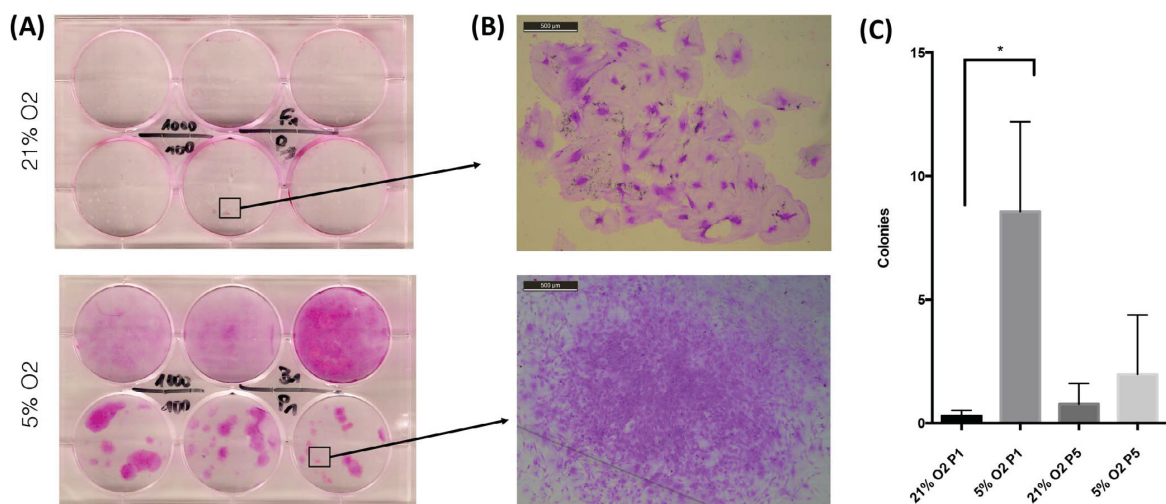


FIGURE 5. Colony forming efficiency assay under high- and low-oxygen concentrations. Significantly restricted colony forming capacity under high oxygen (1000 cells seeded in the upper and 100 cells in the lower wells; $P = 0.0001$ [A, C]). Single colonies under high oxygen, consisting of few very large cells with stress fibers. In contrast colonies consisting of many cells with a small nucleus-plasma-ratio under low oxygen. Scale bar: 500 μm (B). Significant decrease of colony forming capacity from passage 1 to 5 under low oxygen ($P = 0.0003$ [C]).

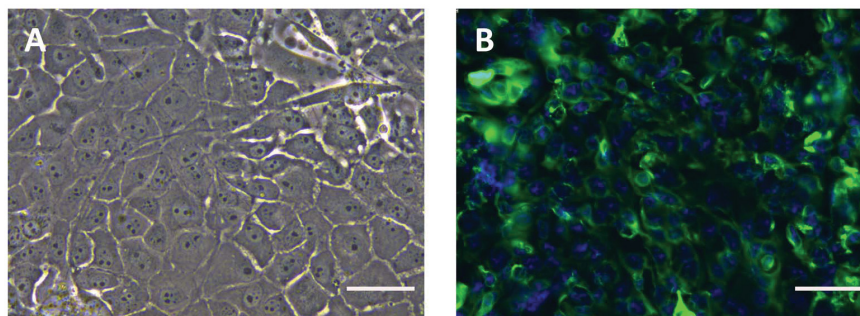


FIGURE 6. Porcine LG-EC. Confluent monolayer of LG-EC with a cobblestone-like morphology at day 5 after isolation (P0 [A]). Immunofluorescence staining of LG-EC (P0) with antipan-cytokeratin antibody (green). Nuclear staining with DAPI (blue [B]). Scale bars: 50 μ m.

typical cobblestone-like morphology and an epithelial cell phenotype could be confirmed by positive pan-cytokeratin staining in the flow cytometry and immunofluorescence (Fig. 6B).

Secretory Activity of Porcine LG-EC

In the PAS-alcian blue reaction, a purple-colored cytoplasmic staining, typical for neutral mucous secretions could be shown

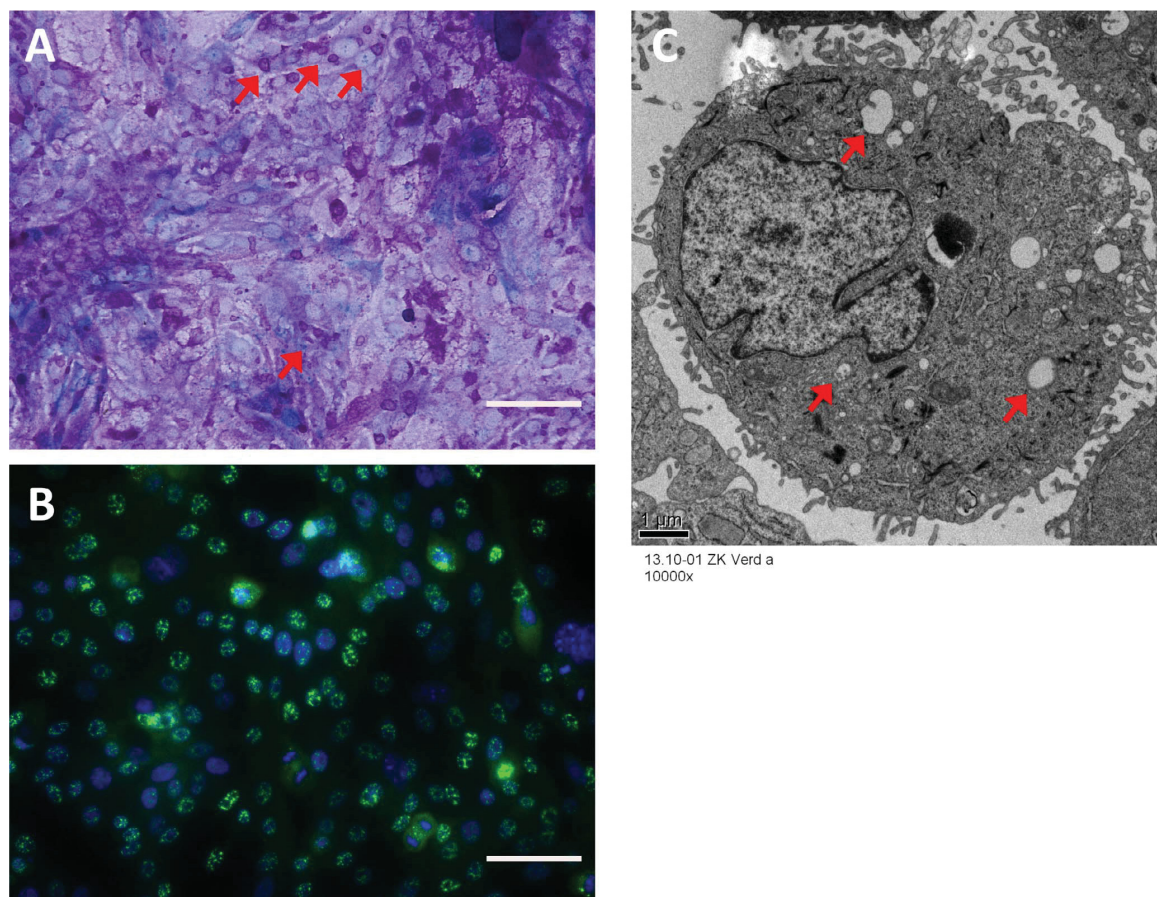


FIGURE 7. Secretory activity of porcine LG-EC was confirmed after expansion in passage 0: PAS-alcian blue reaction revealed multiple purple colored secretory granula (red arrows). Scale bar: 50 μ m (A). Rab3D staining depicted a granular staining, confirming the evidence of secretory vesicles (green). Scale bar: 50 μ m. (B) Transmission electron microscopy analysis shows several vesicles with low electron density typical for mucous substances (red arrows). Scale bar: 1 μ m (C).

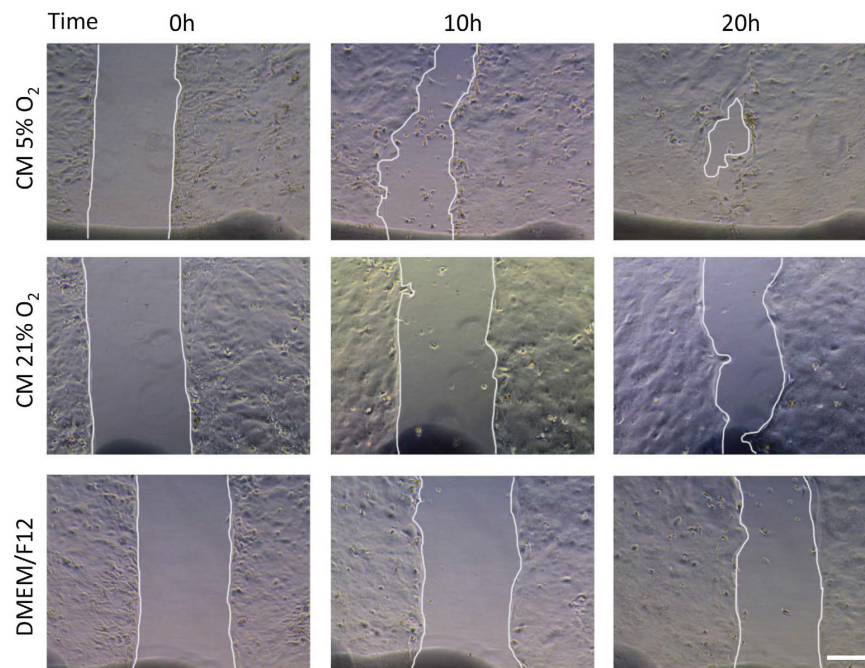


FIGURE 8. Images of porcine LG-EC migration assay. Lacrimal gland-EC incubated in CM^{MSC} 5%, CM^{MSC} 21%, and unconditioned DMEM/F12. Significantly faster gap closure in CM^{MSC} 5% compared with CM^{MSC} 21%. In contrast very slow closure in DMEM/F12. Scale bar: 200 μ m.

(Fig. 7A). Furthermore, the cells showed positive immunofluorescence for Rab3D, a marker for secretory vesicles (Fig. 7B) and the TEM analysis revealed nonelectron-dense vesicles inside the cells, typical for mucous secretion (Fig. 7C). Also LG-EC revealed a significant increase in secretory activity after parasympathetic stimulation with carbachol, measured in the β -hexosaminidase assay (before stimulation: 51.2 ± 17.9 nm; after stimulation: 116.7 ± 36.8 nm, $P = 0.004$).

Wound Healing Assay

The wound healing assay showed a significant difference between the three culture conditions ($P < 0.004$). Cells

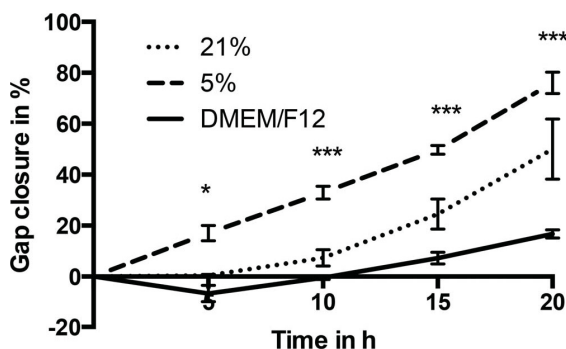


FIGURE 9. Quantification of the gap closure. Significantly faster gap closure with CM^{MSC} 5% (5 hours: 17.08 ± 5.22 ; 10 hours: 32.91 ± 4.36 ; 15 hours: 49.77 ± 2.92 ; 20 hours: 76.02 ± 7.38) compared with CM^{MSC} 21% (5 hours: 0.47 ± 0.82 ; 10 hours: 7.36 ± 5.65 ; 15 hours: 24.59 ± 10.29 ; 20 hours: 50.08 ± 20.57) at all time-points. In the graph only significance levels for CM^{MSC} 5% versus CM^{MSC} 21% are shown (* $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$).

incubated in CM^{MSC} 5% displayed a significantly enhanced migration capacity compared with cells incubated in CM^{MSC} 21% and in DMEM/F12 at all time points, whereas cells incubated in CM^{MSC} 21% MSC did not differ from DMEM/F12 incubated cells at 5 and 10 hours. At 15 and 20 hours cells incubated in CM^{MSC} 21% migrated significantly faster than cells in DMEM/F12 (Figs. 8, 9).

Regeneration Capacity After Ethanol Injury

After ethanol injury, the proliferation assay revealed a significant difference between the three culture conditions (P

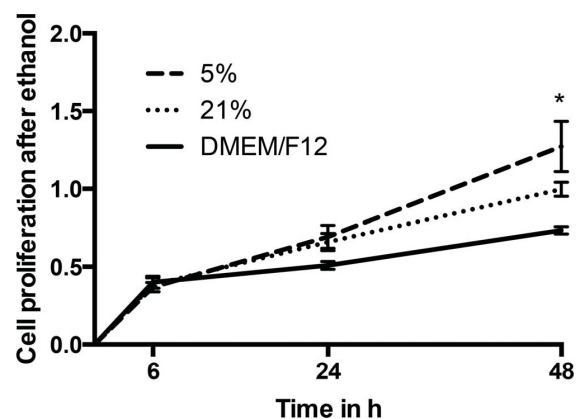


FIGURE 10. Regeneration capacity. Significantly higher proliferation capacity after ethanol injury of cells in CM^{MSC} 5% (1.27 ± 0.28) compared with CM^{MSC} 21% (1.00 ± 0.08) at 48 hours ($P \leq 0.05$). In the graph only significance levels for CM^{MSC} 5% versus CM^{MSC} 21% are shown.

< 0.02). At 48 hours cells incubated in CM^{MSC 5%} proliferated significantly faster than cells incubated in both, CM^{MSC 21%} and DMEM/F12 and cells incubated in CM^{MSC 21%} proliferated faster than cells in DMEM/F12 (Fig. 10).

DISCUSSION

In vitro culture conventionally uses the atmospheric oxygen concentration (21% O₂), widely defined as normoxia, whereas oxygen concentrations below 21% are traditionally called hypoxia in laboratory settings. In vivo the niche of MSCs displays oxygen concentrations between 2% and 7%, therefore the so called hypoxic conditions are rather physiological.^{40,41}

Beneficial effects of low oxygen on MSC from different origin have been indicated by several studies.^{29,42–47} However, a study by Hung et al.⁴⁸ described a decrease of proliferation rate in human bone marrow-derived MSC (BM-MSC) exposed to 1% oxygen. In this study LG-MSC showed significantly higher population doublings under 5% oxygen compared with 21% oxygen up to passage 5. Additionally, LG-MSC expanded under low oxygen yielded a significantly higher colony forming capacity as well as a higher proliferation rate in the flow cytometry assisted proliferation assay, indicating a beneficial effect of low oxygen on the maintenance of the MSC population during in vitro expansion. It has to be noted that the very low colony forming capacity under high oxygen might be influenced by flow cytometry assisted sorting and that those comparatively larger cells are more susceptible to the damage induced by the sorting procedure.^{49,50}

In accordance with the proliferative capacity also the morphology of the cells differed between the two culture conditions in this study, displaying rather large and flattened cells with stress fibers under high oxygen and small, compact spindle shaped cells with no or few stress fibers in low oxygen. In later passages (~passages 5–8), foci with small spindle-shaped cells without stress fibers appeared under high oxygen and with ongoing passages the phenotype changed to a more uniform phenotype with progressive growth. Such findings are typical for murine cells and have been shown to be caused by oxidative stress.^{31,51,52} Under high-oxygen concentrations ROS levels increase, as it has also been observed in our study. Reactive oxygen species may lead to an upregulation of p53 and to activation of this tumor suppressor protein by phosphorylation, resulting in growth arrest and apoptosis.^{53–55} Under continuous exposure to atmospheric oxygen cells with DNA damage, loss of function, and mutations of p53, possibly induced by ROS, can accumulate and grow unrestricted.³¹ The DNA damaging effects of high oxygen concentrations contributing to cell senescence and loss of viability are not only shown for murine but also mammalian cells.³⁰

The flow cytometry analysis in our study revealed an increase of CD44 expression in LG-MSC under low oxygen, which has not been shown before. Krishnamachary et al.⁵⁶ were able to demonstrate in breast cancer cells, that the induction of CD44 expression is probably triggered via the HIF-1 α pathway. Valorani et al.⁴³ showed an increase of CD44/SCA-1 double-positive cells in murine adipose tissue-derived MSC (AT-MSC) under hypoxia, but an increase under hypoxia was only observed in SCA-1-positive cells while CD44 was staying stable in both conditions. Although the function of CD44 in MSC is not yet fully understood and it is suggested as a potential cancer stem cell marker in some studies,⁵⁷ it plays an important role in regenerative and anti-inflammatory processes: CD44 is responsible for increased migration, homing, and recruiting of exogenous MSC to sites of tissue injury.⁵⁸ It regulates macrophage inflammatory response,⁵⁹ plays a protective role in inflammation mediated by toll-like receptors

(TLR) by suppression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation and binds proteases as matrix metalloproteinase 9 (MMP-9),⁶⁰ resulting in reduced monocyte-migration.⁶¹

In this study, the basic FABP4 expression and the OPN and FABP4 expression after induction were significantly different between the two culture conditions. However, no difference between the two culture conditions could be identified macroscopically and microscopically in the stained cells after adipogenic and osteogenic differentiation. Varying results can be found in the literature concerning the differentiation of MSC under low oxygen. Berniakovic et al.⁶² (BM-MSC; 3% oxygen) and Valorani et al.⁶³ (AT-MSC; 2% oxygen) revealed an increased adipogenic and osteogenic differentiation potential under low-oxygen concentrations. In contrast, Malladi et al.⁶⁴ (AT-MSC; 2%) described the reduction of osteogenic differentiation in murine cells. Fehrer et al.⁶⁵ (BM-MSC; 3% O₂) could not detect osteogenic differentiation and a diminished adipogenic differentiation. The differences concerning the effects of low oxygen on proliferation capacity, differentiation potential, and stemness might be explained by the heterogeneous cell origins and different oxygen levels, as well as further influencing factors such as the time and continuity of exposure to oxygen used in the different studies.⁶⁶

Proliferation and migration of cells at the site of injury are essential parts of tissue regeneration and wound healing processes in vivo.^{25–27,67–69} As support of proliferation and migration has been described as one function of MSC's in regeneration in vivo,^{70–73} we evaluated the effect of migration and proliferation of LG-MSC on porcine LG-EC in vitro to test and quantify their potential in LG tissue regeneration. The results of the experiments showed that CM^{MSC 5%} compared with CM^{MSC 21%} significantly increased migration and enhanced proliferation of LG epithelial cells after injury, indicating a high regenerative potential. As shown in the literature, the increase of migration and proliferation in CM^{MSC 5%} might be the result of an upregulated secretion of factors, such as IL-6, vascular VEGF, bFGF, PDGF, insulin-like growth factor II (IGF-II), hepatocyte growth factor (HGF), and monocyte chemoattractant protein (MCP)-1.^{74–77} In agreement with our results, Lee et al.⁷⁸ demonstrated that CM of MSC harvested under hypoxic conditions significantly promoted the migration of human dermal fibroblasts and reduced the wound area in an in vivo model, compared with those in normoxic conditioned medium. Hung et al.⁷⁴ showed, that CM from hypoxic culture of MSCs was more effective in decreasing induced apoptosis and cell death than CM from MSCs incubated under normoxic conditions.

The porcine LG is very similar to the human LG in terms of its macro- and microanatomical structure.⁷⁹ The cultivated porcine LG epithelial cells showed positivity for pan-cytokeratin and secretory activity by PAS-alcian-blue staining, TEM, positivity for Rab3D and secretory response to carbachol stimulation. The supportive and regenerative effects of cross-species feeder cells (e.g., 3T3), conditioned medium and even xenografts of cells are well described.^{80–84}

In summary, this study shows, that in vitro expansion at low oxygen preserves the proliferation capacity and differentiation potential of LG-MSC, and therefore seems to be an excellent method to obtain vital MSC. Also an increased number of LG-MSC expressing CD44 was observed under low oxygen, which might be a valuable marker to identify a potent MSC subpopulation. Lacrimal gland-MSC cultivated under 5% O₂ improve migration and proliferation of LG epithelial cells indicating a higher supportive regenerative function in comparison with LG-MSC cultivated under 21% O₂. However, little is known about in vivo transplantation of cells cultured under low-oxygen conditions. For this reason, the potential as

a possible novel therapeutic option in the treatment of severe dry-eye syndrome and especially the safety of regional and systemic delivery of LG-MSC cultured in low-oxygen conditions needs to be further examined in vivo by using animal models.

Acknowledgments

The authors thank Silke Götze, Iris Sawitzka (Clinic for Gastroenterology, Hepatology and Infectious Diseases, Düsseldorf, Germany), Sabine Seggewiß (Department of Ophthalmology, University Düsseldorf), Monika Jerg (Clinic for Otorhinolaryngology, Ulm, Germany), and Katharina Raba (ITZ, Düsseldorf, Germany) for their support and excellent technical assistance.

Supported by the Volkswagen Foundation (Lichtenberg Professorship of Prof. Schrader) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft through Sonderforschungsbereich SFB 974 (Düsseldorf, Germany).

Disclosure: **M. Roth**, None; **K. Spaniol**, None; **C. Kordes**, None; **S. Schwarz**, None; **S. Mertsch**, None; **D. Häussinger**, None; **N. Rotter**, None; **G. Geerling**, None; **S. Schrader**, None

References

- Javadi M-A, Feizi S. Dry eye syndrome. *J Ophthalmic Vis Res*. 2011;6:192-198.
- The epidemiology of dry eye disease: report of the Epidemiology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf*. 2007;5:93-107.
- Tutt R, Bradley A, Begley C, Thibos LN. Optical and visual impact of tear break-up in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:4117-4123.
- Bittira B. Mobilization and homing of bone marrow stromal cells in myocardial infarction. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2003;24:393-398.
- Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg*. 2002;73:1919-1926.
- Nagaya N, Fujii T, Iwase T, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H2670-H2676.
- Morigi M, Benigni A. Mesenchymal stem cells and kidney repair. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28:788-793.
- Morigi M. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:1794-1804.
- Cheng K, Rai P, Plagov A, et al. Transplantation of bone marrow-derived MSCs improves cisplatin-induced renal injury through paracrine mechanisms. *Exp Mol Pathol*. 2013;94:466-473.
- Sanchez-Ramos JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res*. 2002;69:880-893.
- van Velthoven CTJ, Sheldon RA, Kavelaars A, et al. Mesenchymal stem cell transplantation attenuates brain injury after neonatal stroke. *Stroke*. 2013;44:1426-1432.
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WKK, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:8932-8937.
- Skrabin A, Ahmed RK, Ferrara G, et al. Autologous mesenchymal stromal cell infusion as adjunct treatment in patients with multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis: an open-label phase 1 safety trial. *Lancet Respir Med*. 2014;2:108-122.
- Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One*. 2007;2:e941.
- Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36:568-584.
- Barminko J, Gray A, Maguire T, Schloss R, Yarmush ML. Mesenchymal stromal cell mechanisms of immunomodulation and homing. *Mesenchymal Stem Cell Therapy*. 2013;(Chapter 2):15-38.
- Hematti P, Keating A. Mesenchymal stromal cells in regenerative medicine: a perspective. *Mesenchymal Stromal Cells*. 2013;(Chapter 1):3-16.
- Aurich H, Sgodda M, Kaltwaßer P, et al. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut*. 2009;58:570-581.
- Bin Li, Zheng Y-W, Sano Y, Taniguchi H. Evidence for mesenchymal-epithelial transition associated with mouse hepatic stem cell differentiation. *PLoS One*. 2011;6:e17092.
- Hashmani K, Branch MJ, Sidney LE, et al. Characterization of corneal stromal stem cells with the potential for epithelial transdifferentiation. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4:75.
- Anne SC. Cultured Human keratocytes from the limbus and cornea both express epithelial cytokeratin 3: possible mesenchymal-epithelial transition. *Int J Ophthalmic Pathol*. 2012;1:1-7.
- Ahn W, Hong HS, Zhang M, Chung E, Son Y. Induction of mesenchymal to epithelial transition of circulating mesenchymal stem cells by conditioned medium of injured cornea. *Tissue Eng Regen Med*. 2013;10:86-92.
- Panepucci RA, Siu JLC, Silva WA Jr, et al. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2004;22:1263-1278.
- You S, Kublin CL, Avidan O, Miyasaki D, Zoukhri D. Isolation and propagation of mesenchymal stem cells from the lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:2087-2094.
- Zoukhri D, Fix A, Alroy J, Kublin CL. Mechanisms of murine lacrimal gland repair after experimentally induced inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:4399-4406.
- Zoukhri D. Mechanisms involved in injury and repair of the murine lacrimal gland: role of programmed cell death and mesenchymal stem cells. *Ocul Surf*. 2010;8:60-69.
- You S, Avidan O, Tariq A, et al. Role of epithelial-mesenchymal transition in repair of the lacrimal gland after experimentally induced injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:126-135.
- Feng Y, Zhu M, Dangelmajer S, et al. Hypoxia-cultured human adipose-derived mesenchymal stem cells are non-oncogenic and have enhanced viability, motility, and tropism to brain cancer. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1567.
- Santos dos E, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MM, da Silva CUL, Cabral JMS. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J Cell Physiol*. 2010;223:27-35.
- Estrada JC, Albo C, Benguria A, et al. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell Death Differ*. 2012;19:743-755.
- Krishnappa V, Boregowda SV, Phinney DG. The peculiar biology of mouse mesenchymal stromal cells-oxygen is the key. *Cytotherapy*. 2013;15:536-541.
- Carreau A, Hafny Rahbi BE, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med*. 2011;15:1239-1253.
- Fraser JK, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z. Adipose-derived stem cells. *Methods Mol Biol*. 2008;449:59-67.

34. Fink T, Zachar V. Adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol.* 2011;698:243–251.
35. Horn P, Bork S, Wagner W. Standardized isolation of human mesenchymal stromal cells with red blood cell lysis. *Methods Mol Biol.* 2011;698:23–35.
36. Futami I, Ishijima M, Kaneko H, et al. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal cells from the mouse synovium. *PLoS One.* 2012;7:e45517.
37. Schrader S, Kremling C, Klinger M, Laqua H, Geerling G. Cultivation of lacrimal gland acinar cells in a microgravity environment. 2009;93:1121–1125.
38. Guo Z, Song D, Azzarolo AM, et al. Autologous lacrimal-lymphoid mixed-cell reactions induce dacryoadenitis in rabbits. *Exp Eye Res.* 2000;71:23–31.
39. Mertsch S, Schurgers IJ, Weber K, Paulus W, Senner V. Matrix gla protein (MGP): an overexpressed and migration-promoting mesenchymal component in glioblastoma. *BMC Cancer.* 2009;9:302.
40. Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Stem Cell.* 2010;7:150–161.
41. Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: the stem cell paradigm. *J Cell Physiol.* 2009;219:271–275.
42. Basciano L, Nemos C, Foliguet B, et al. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biol.* 2011;12:12.
43. Valorani MG, Germani A, Otto WR, et al. Hypoxia increases Sca-1/CD44 co-expression in murine mesenchymal stem cells and enhances their adipogenic differentiation potential. *Cell Tissue Res.* 2010;341:111–120.
44. Zhao F, Veldhuis JJ, Duan Y, et al. Low oxygen tension and synthetic nanogratings improve the uniformity and stemness of human mesenchymal stem cell layer. *Mol Ther.* 2010;18:1010–1018.
45. Fotia C, Massa A, Boriani F, Baldini N, Granchi D. Hypoxia enhances proliferation and stemness of human adipose-derived mesenchymal stem cells [published online ahead of print May 6, 2014]. *Cytotechnology.* doi:10.1007/s10616-014-9731-2.
46. Estrada JC, Albo C, Benguría A, et al. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell Death Differ.* 2012;19:743–755.
47. Nekanti U, Dastidar S, Venugopal P, Totey S, Ta M. Increased proliferation and analysis of differential gene expression in human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells under hypoxia. *Int J Biol Sci.* 2010;6:499–512.
48. Hung S-C, Pochampally RR, Hsu S-C, et al. Short-term exposure of multipotent stromal cells to low oxygen increases their expression of CX3CR1 and CXCR4 and their engraftment in vivo. *PLoS One.* 2007;2:e416.
49. Seidl J, Knuechel R, Kunz-Schughart LA. Evaluation of membrane physiology following fluorescence activated or magnetic cell separation. *Cytometry.* 1999;36:102–111.
50. Mollet M, Godoy-Silva R, Berdugo C, Chalmers JJ. Computer simulations of the energy dissipation rate in a fluorescence-activated cell sorter: implications to cells. *Biotechnol Bioeng.* 2008;100:260–272.
51. Harvey DM, Levine AJ. p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Genes Dev.* 1991;5:2375–2385.
52. Phinney DG, Sensebé L. Mesenchymal stromal cells: misconceptions and evolving concepts. *Cytotherapy.* 2013;15:140–145.
53. Xie S, Wang Q, Wu H, et al. Reactive oxygen species-induced phosphorylation of p53 on serine 20 is mediated in part by polo-like kinase-3. *J Biol Chem.* 2001;276:36194–36199.
54. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene.* 2003;22:9030–9040.
55. Zhao R, Gish K, Murphy M, et al. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev.* 2000;14:981–993.
56. Krishnamachary B, Penet M-F, Nimmagadda S, et al. Hypoxia regulates CD44 and its variant isoforms through HIF-1 α in triple negative breast cancer. *PLoS One.* 2012;7:e44078.
57. de Jong MC, Pramana J, van der Wal JE, et al. CD44 expression predicts local recurrence after radiotherapy in larynx cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16:5329–5338.
58. Herrera M, Bussolati B, Camussi G. Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury. *Kidney Int.* 2007;72:430–441.
59. Milette-González KE, Murphy K, Kumaran MN, et al. Identification of function for CD44 intracytoplasmic domain (CD44-ICD): modulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) transcription via novel promoter response element. *J Biol Chem.* 2012;287:18995–19007.
60. Kawana H, Karaki H, Higashi M, et al. CD44 suppresses TLR-mediated inflammation. *J Immunol.* 2008;180:4235–4245.
61. Rahat MA, Marom B, Bitterman H, Weiss-Cerem L, Kinarty A, Lahat N. Hypoxia reduces the output of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in monocytes by inhibiting its secretion and elevating membranous association. *J Leukoc Biol.* 2006;79:706–718.
62. Berniakovich I, Giorgio M. Low oxygen tension maintains multipotency, whereas normoxia increases differentiation of mouse bone marrow stromal cells. *Int J Mol Sci.* 2013;14:2119–2134.
63. Valorani MG, Montelatici E, Germani A, et al. Pre-culturing human adipose tissue mesenchymal stem cells under hypoxia increases their adipogenic and osteogenic differentiation potentials. *Cell Prolif.* 2012;45:225–238.
64. Malladi P, Xu Y, Chiou M, Giaccia AJ, Longaker MT. Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290:C1139–C1146.
65. Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell.* 2007;6:745–757.
66. Buravkova IB, Andreeva ER, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mesenchymal stem cells and hypoxia: where are we? *Mitochondrion.* 2014;19(pt A):105–112.
67. Meyer U, Meyer T, Handschel J, Wiesmann HP. *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* Berlin: Springer Science & Business Media; 2009.
68. Martin P. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997;276:75–81.
69. Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, Leroux MA. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1:142–149.
70. Linero I, Chaparro O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PLoS One.* 2014;9:e107001.
71. Sheng L, Yang M, Liang Y, Li Q. Adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) transplantation promotes regeneration of expanded skin using a tissue expansion model. *Wound Repair Regen.* 2013;21:746–754.
72. van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology.* 2008;47:1634–1643.

73. Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*. 2008;3:e1886.
74. Hung S-C, Pochampally RR, Chen S-C, Hsu S-C, Prockop DJ. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells*. 2007;25:2363-2370.
75. Park B-S, Kim W-S, Choi J-S, et al. Hair growth stimulated by conditioned medium of adipose-derived stem cells is enhanced by hypoxia: evidence of increased growth factor secretion. *Biomed Res*. 2010;31:27-34.
76. Di Santo S, Yang Z, Wyler von Ballmoos M, et al. Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: in vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation. *PLoS One*. 2009;4:e5643.
77. Lee EY, Xia Y, Kim W-S, et al. Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen*. 2009;17:540-547.
78. Jun EK, Zhang Q, Yoon BS, et al. Hypoxic conditioned medium from human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells accelerates skin wound healing through TGF- β /SMAD2 and PI3K/Akt pathways. *Int J Mol Sci*. 2014;15:605-628.
79. Henker R, Scholz M, Gaffling S, et al. Morphological features of the porcine lacrimal gland and its compatibility for human lacrimal gland xenografting. *PLoS One*. 2013;8:e74046.
80. Sharma SM, Fuchsluger T, Ahmad S, et al. Comparative analysis of human-derived feeder layers with 3T3 fibroblasts for the ex vivo expansion of human limbal and oral epithelium. *Stem Cell Rev*. 2012;8:696-705.
81. Lu R, Bian F, Lin J, et al. Identification of human fibroblast cell lines as a feeder layer for human corneal epithelial regeneration. *PLoS One*. 2012;7:e38825.
82. Amirjamshidi H, Milani BY, Sagha HM, et al. Limbal fibroblast conditioned media: a non-invasive treatment for limbal stem cell deficiency. *Mol Vis*. 2011;17:658-666.
83. Timmers L, Lim SK, Hoefer IE, et al. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res*. 2011;6:206-214.
84. Oh JY, Lee RH, Yu JM, et al. Intravenous mesenchymal stem cells prevented rejection of allogeneic corneal transplants by aborting the early inflammatory response. *Mol Ther*. 2012;20:2143-2152.

4. Diskussion

Die in der Zellkultur standardmäßig verwendete atmosphärische Sauerstoffkonzentration (21% Sauerstoff) wird gängigerweise als Normoxie und niedrigere Sauerstoffkonzentrationen als Hypoxie bezeichnet, obwohl die physiologischen Sauerstoffkonzentration weit unter 21% liegen (119): Nachdem das Blut als Sauerstofftransporter im Körper die Lunge in den alveolären Kapillaren passiert hat, sinkt die Sauerstoffkonzentration zunehmend bis das zu versorgende Gewebe oder Organ erreicht ist. Je nach Lage und Durchblutung ist die Sauerstoffkonzentration im Zielgewebe unterschiedlich hoch, liegt aber meist zwischen 2 - 9% (120). Die Sauerstoff-Konzentration in der physiologischen Nische der MSC liegt zwischen 2% - 7% (112).

Die positiven Auswirkungen hypoxischer Kulturbedingungen auf MSC wurde in mehreren Arbeiten beschrieben (113,114,121-125). Während Hung et al. zeigten, dass MSC aus dem Knochenmark unter 1% Sauerstoff eine reduzierte Wachstumsrate aufweisen (126) wurde in unserer Arbeit eine signifikant erhöhte Proliferation unter 5% Sauerstoff im Vergleich zu 21% Sauerstoff nachgewiesen - sowohl in den Zell-Verdopplungs-Zeiten in der Kultur als auch in den Durchfluss-Zytometrie-assitierten Proliferations-Assays. Desweiteren zeigten die in niedrigem Sauerstoff expandierten LG-MSC eine signifikant höhere *Colony Forming*-Kapazität. Diese Ergebnisse deuten auf den positiven Effekt einer reduzierten Sauerstoffkonzentration auf die Kultur und Expansion von MSC hin. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass die sehr niedrige *Colony Forming*-Kapazität unter 21% Sauerstoff möglicherweise durch die Durchfluss-Zytometrie-assistierte Sortierung der Zellen beeinflusst ist: Der durch den Sortierprozess induzierte Schaden beeinflusst die vergleichsweise großen Zellen aus der Kultur in 21% Sauerstoff möglicherweise mehr als die kompakteren Zellen aus der Kultur in 5% Sauerstoff (127,128).

Nach der Isolation aus dem Gewebe (Passage 0) weisen die Zellen aus beiden Kulturbedingungen eine relativ kompakte, längliche, spindelförmige Morphologie auf, die für MSC typisch ist. Bereits ab Passage 2 lassen sich erste Unterschiede erkennen: Die Kern-Plasma-Relation der Zellen in 21% Sauerstoff nimmt im Vergleich deutlich stärker ab,

zunehmend größere und flache Zellen mit sogenannten Stressfasern sind zu finden. Die Zellen in 5% Sauerstoff hingegen nehmen kaum an Größe zu, und behalten größtenteils die kompakte spindelförmige Morphologie ohne Stressfasern. In höheren Passagen (ca. Passage 5-8) sind unter 21% Sauerstoff zunehmend Zell-Anhäufungen mit kleinen spindelförmigen Zellen ohne Stressfasern zu finden und in den folgenden Passagen wird die Morphologie zunehmend einheitlicher und das Wachstum nimmt zu. Dieses Verhalten ist typisch für die Kultur muriner MSC und wird durch oxidativen Stress ausgelöst (117,129,130): Unter hohen Sauerstoffkonzentrationen steigen die Level der Reaktiven Sauerstoffspezies (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS), wie auch in unserer Arbeit gezeigt werden konnte. Die DNA-schädigenden Effekte hoher ROS-Level sind bekannt (131-133). Eine Schädigung der DNA führt zu einer Hochregulierung und Stabilisierung des sogenannten *Tumor-Suppressors* p53, was normalerweise zu einem Sistieren des Zellwachstums und ggf. zur Apoptose führt (134-136). Kommt es allerdings zur Schädigung bzw. Mutation des p53-Gens selbst, kann das zum Funktionsverlust (engl. „*loss of function*“) des *Tumor-Suppressors* p53 führen (135). Bei kontinuierlich hohen Sauerstoffkonzentrationen und entsprechend hohem ROS-Level können im Verlauf Zellen mit geschädigter DNA sowie Mutationen und einem *loss of function* in p53 akkumulieren und uneingeschränkt wachsen (117).

In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich in unserer Arbeit eine erhöhte CD44 Expression unter niedrigem Sauerstoff. Krishnamachary et al. konnten bei Brustkrebs-Zellen zeigen, dass die Zunahme der CD44 Expression wahrscheinlich über den *Hypoxia inducible factor* (HIF)-1 α Signalweg induziert wird (137). Bei MSC aus der Nabelschnur und aus dem Fettgewebe wurde ein Anstieg der Expression von HIF-1 α in reduziertem Sauerstoff nachgewiesen (116,138). Valorani et al. zeigten eine Zunahme von CD44⁺-SCA-1⁺ Zellen aus murinem Fettgewebe unter hypoxischen Bedingungen, wobei die Zunahme sich nur auf die SCA-1⁺ Zellen bezieht, während die CD44-Expression in beiden Kulturbedingungen unverändert blieb (122). Obwohl die Funktion von CD44 in MSC noch nicht gänzlich verstanden ist und CD44 auch als Tumorzellmarker verwendet wird (139), spielt es eine vermeintlich wichtige Rolle in anti-inflammatorischen und regenerativen Prozessen: CD44 ist mitverantwortlich für gesteigerte Migration und somit auch für das *Homing* der MSC, also der Migration hin zu lokalisierten Entzündungen oder Verletzungen und auch für die Rekrutierung weiterer MSC (140). CD44 kann die Entzündungsantwort von Makrophagen regulieren, wirkt durch Unterdrückung der NF- κ B Aktivierung bei Entzündungsprozessen schützend, die durch *Toll-like receptors* (TLR) vermittelt werden und bindet Proteasen wie

die Matrix Metalloproteinase (MMP) 9, was zu einer reduzierten Monozyten-Migration führt (141-143).

Möglicherweise ist nicht nur die in unserer Arbeit festgestellte unter reduzierter Sauerstoffkonzentration erhöhte CD44 Expression, sondern auch die Reduktion der ROS und die gesteigerte Migrationsfähigkeit der Epithelzellen (s.u.) durch den HIF-1 α Signaltransduktionsweg induziert. Denn neben CD44 induziert HIF-1 α mehrere hundert Zielgene, darunter auch CXCR4, CXCR7 und CX3CR1, Chemokinrezeptoren, die beim *Homing*, Migrationsprozess und Zellüberleben der MSC *in vitro* und auch *in vivo* eine entscheidende Rolle spielen (144-147). Über eine Steigerung der Pyruvatdehydrogenase-Kinase (PDK) reduziert HIF-1 α den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch und somit auch die ROS-Produktion. Außerdem steigert HIF-1 α über eine Aktivierung des AMPK/mTOR Signaltransduktionsweges die Autophagozytose der Zellen (148-150). Autophagozytose spielt eine entscheidende Rolle bei unterschiedlichen Stressantworten und ist ein wichtiger Homöostase- und Überlebens-Mechanismus (151,152). Seo et al. konnten zeigen, dass eine Induzierung des trockenen Auges mittels Trockenkammer und Scopolamin-Hydrobromid im Maus-Modell durch Aktivierung von HIF-1 α zu einer Zunahme der Autophagozytose führt. Nach einem Knockout von HIF-1 α sind in der Tränendrüse ein ausgeprägter apoptotischer Untergang der Azinuszellen, ein Verlust der normalen Tränendrüsen-Morphologie und -Polarität und -ähnlich wie im Sjögren Syndrom- eine Zunahme der Einwanderung von CD3⁺ und CD11b⁺ Zellen festzustellen (153).

Trotz signifikanter Unterschiede in der basalen Expression von *Fatty acid binding protein* (FABP)4 und der Expression von Osteopontin und FABP4 nach Induktion der Differenzierung war in der Oil-Red-O bzw. der Alizarin-Rot Färbung nach Abschluss des Differenzierungsassays makro- und mikroskopisch kein Unterschied zwischen den beiden Kulturbedingungen festzustellen. Bzgl. des Einflusses einer reduzierten Sauerstoffkonzentration auf das Differenzierungspotential von MSC finden sich in der Literatur teils unterschiedliche Ergebnisse. Berniakovic et al. (*Bone marrow* (BM)-MSC; 3% Sauerstoff) und Valorani et al. (*Adipose tissue* (AT)-MSC; 2% Sauerstoff) beschreiben ein gesteigertes Differenzierungspotential in Adipo- wie auch in Osteozyten unter niedrigem Sauerstoff (154,155). Im Gegensatz dazu berichten Malladi et al. (AT-MSC; 2% Sauerstoff) von einer Reduktion des Osteozyten- Differenzierungspotentials in murinen Zellen (156). Auch Fehrer et al. (BM-MSC; 3% Sauerstoff) beschreiben eine signifikante Reduktion der

Adipozyten-Differenzierung, eine Osteozyten-Differenzierung war sogar überhaupt nicht festzustellen (157). Die unterschiedlichen Ergebnisse bzgl. der Auswirkungen einer niedrigen Sauerstoffkonzentration auf die MSC lassen sich möglicherweise durch die Unterschiede in den Ursprüngen der verwendeten Zellen, der verwendeten Sauerstoffkonzentrationen und anderen Einflussfaktoren (z.B. die Kontinuität und Zeit in der die Zellen den unterschiedlichen Sauerstoffkonzentration ausgesetzt sind) erklären (158,159).

In vivo sind Proliferation und Migration hin zu lokalen Entzündungsherden oder Verletzungen wichtige Elemente von Regenerations- und Wundheilungsprozessen (90,91,160-163). Hier wirken MSC proliferations-und migrations-unterstützend und tragen so zur Regeneration bei (48,71,164,165). Um das mögliche Tränendrüsen-Regenerationspotential zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen von MSC-CM aus beiden Kulturbedingungen auf Migration und Proliferation von epithelialen Zellen der Tränendrüse (LG-EC) *in vitro* evaluiert. Hierfür wurden Zellen aus der porzinen Tränendrüse verwendet, die der menschlichen Tränendrüse in mikro- und makro-anatomischer Struktur sehr ähnlich ist (166). Die Isolation, Expansion und Charakterisierung dieser Zellen ist in unserer Arbeitsgruppe bereits etabliert (167). Die unterstützenden und regenerativen Effekte von *cross*-Spezies Feeder-Zellen (z.B. 3T3), *cross*-Spezies konditioniertem Medium und Xenograft Transplantaten sind gut beschrieben, so dass auch in diesem Fall eine *cross*-Spezies Verwendung unproblematisch erscheint (168-172). Die kultivierten LG-EC sind Pan-Zytokeratin und RAB3D positiv und zeigen sekretorische Aktivität in der *PAS-Alcain-Blue*-Färbung, in der Transmissionslektronen-mikroskopischen (TEM) Untersuchung und nach Carbachol-Stimulation.

In mehreren Arbeiten ist an kornealen Endothelzellen, Epithelzellen des proximalen Tubulus, Haut-Fibroblasten und Keratinozyten in *Scratch-Assays* ein schnellerer Wund-Verschluss im Zellrasen durch Inkubation in MSC-CM im Vergleich zur Inkubation im jeweiligen Kontroll-Medium nachgewiesen worden (52,53,173). Akram et al. zeigten an epithelialen Zellen aus der humanen Lunge zwar, dass dieser Effekt weitgehend auf gesteigerte Migration zurückzuführen und nach Inkubation in MSC-CM eine Auflockerung in den Zellabständen festzustellen ist (50). Dennoch führt eine Inkubation in MSC-CM neben der gesteigerten Migration auch zur einer Zunahme der Proliferationsrate (53,173,174). Ausschließliche Migrationseffekte zeigten Chen et al. in sogenannten *Transwell-Migration-Assays*. Fibroblasten, Keratinozyten und endotheliale Zellen migrieren signifikant schneller durch

eine Membran hindurch, wenn der Kulturbedälter auf der anderen Seite der Membran mit MSC-CM aus hypoxischen Kulturbedingungen (2% Sauerstoff) statt aus normoxischen Bedingungen (21% Sauerstoff) befüllt ist (174). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten auch Jun et al. und Lee et al. zeigen, dass die migrations- und proliferationsfördernden Effekte des MSC-CM durch eine hypoxische Konditionierung der MSC weiter zunehmen. Sowohl *in vitro* an Haut-Fibroblasten als auch *in vivo* in einem Maus-Modell führt die Behandlung mit Kulturmedium, das bei reduzierter Sauerstoffkonzentration (1% bzw. 2% Sauerstoff) durch MSC konditioniert wurde, zu einer erhöhten Migration, schnellerem Wundverschluss und einer gesteigerten Proliferation als die Behandlung mit Kulturmedium, welches bei normaler Sauerstoffkonzentration (21% Sauerstoff) durch MSC konditioniert wurde (175,176).

Der Einfluss von MSC-CM auf die Regeneration nach Schädigung wurde an verschiedenen Zielzellen und Schädigungsmodellen untersucht. In murinen Hepatozyten (Schädigung durch Carbon-Tetrachlorid), neuronalen Zellen (Schädigung durch 2,5-Hexandion), Podozyten (Schädigung durch hohe Glukose-Spiegel), Epithelzellen des proximalen Tubulus (Schädigung durch Gentamicin) und kornealen Epithelzellen (Schädigung durch 20% Ethanol über 1 Minute) konnte eine Reduktion der Apoptoseraten bzw. erhöhte Proliferationsraten nach Inkubation in MSC-CM gezeigt werden (53,177-180). Diese Regenerationsunterstützenden Effekte werden durch Inkubation in MSC-CM aus hypoxischen Kulturbedingungen (1% Sauerstoff) weiter verstärkt, wie an Endothelzellen der Aorta (Schädigung durch Hypoxie) gezeigt werden konnte (181). Übereinstimmend mit den oben aufgeführten Ergebnissen nimmt in der vorliegenden Arbeit die Proliferationsrate der geschädigten LG-EC (Schädigung durch 20% Ethanol über 1 Minute) in MSC-CM 5% im Vergleich zur Inkubation in MSC-CM 21% signifikant zu.

Diese Zunahme der Migration und Proliferation der LG-EC in MSC-CM 5% deutet auf ein erhöhtes regeneratives Potential von LG-MSC aus der Kultur mit 5% Sauerstoffkonzentration hin und ist wahrscheinlich bedingt durch höhere Sekretion von Faktoren wie IL-6, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *platelet derived growth factor* (PDGF), *insulin-like growth factor II* (IGF-II), *hepatocyte growth factor* (HGF) und *monocyte chemo-attractant protein* (MCP-1) (176,181-183).

Auf die Wirkung dieser und ggf. weiterer Faktoren sind wahrscheinlich auch die gesteigerten regenerativen Effekte hypoxisch präkonditionierter MSC zurückzuführen, die im Tiermodell neben der Haut (s.o.) bereits an weiteren Organen und Geweben untersucht wurden. Die Behandlung mit hypoxisch präkonditionierten MSC, also von MSC die über einen bestimmten Zeitraum in reduzierter Sauerstoffkonzentration konditioniert wurden, führt im Vergleich zu MSC, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden, beispielsweise zu einer signifikant höheren Festigkeit der geschädigten Achilles-Sehne, zu geringeren Entzündungsparametern und einer histologisch signifikanten Reduktion der Lungenfibrose, einer gesteigerten Nierenfunktion nach akuter Schädigung der Niere, besseren motorischen und kognitiven Funktion nach Hirnschaden, Verbesserung der Linksventrikelfunktion nach myokardialer Ischämie und generell besserem *Engraftment* der MSC in dem geschädigten Zielgewebe (184-189). Obwohl sich die Arbeiten in Form der Anwendung, Ursprung, Isolation und Expansionsbedingungen der MSC sehr unterscheiden, geben sie Grund zur Annahme, dass LG-MSC, die unter reduzierter Sauerstoffkonzentration kultiviert wurden, in *in vivo* Experimenten im Rahmen von Transplantationsversuchen zu einem besseren funktionellen Ergebnis führen, als LG-MSC aus den Standardbedingungen.

5. Schlussfolgerungen

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass die Verwendung einer reduzierten Sauerstoffkonzentration in der Zellkultur eine exzellente Methode zur Isolation und Expansion vitaler MSC aus Tränendrüsenengewebe ist: In beiden Kulturbedingungen weisen die Zellen die für MSC typischen Marker auf. Unter reduzierter Sauerstoffkonzentration zeigte sich eine Zunahme der CD44 Expression, einem möglicherweise nützlichen Marker zur Identifizierung einer potenten MSC-Subpopulation. Das Differenzierungs-Potential der Zellen bleibt erhalten und im Vergleich zur Expansion unter 21% Sauerstoff war unter 5% Sauerstoff eine signifikante höhere Proliferations- und *Colony Forming*-Kapazität bei vergleichsweise stabiler Morphologie festzustellen. Desweiteren steigert die Verwendung von MSC-CM 5% Migration und Proliferation von Epithelzellen der Tränendrüse signifikant, was auf ein im Vergleich zur Kultur in 21% Sauerstoff erhöhtes regeneratives Potential der Zellen in 5% Sauerstoff hindeutet. Es ist davon auszugehen, dass diese erhöhten regenerativen Effekte auch *in vivo* zum Tragen kommen. Außerdem kann die Verwendung einer reduzierten Sauerstoffkonzentration in der Zellkultur dazu beitragen, in kürzerer Zeit die Menge an MSC zu gewinnen, die für eine systemische oder lokale regenerative Therapie benötigt wird und so das Risiko einer Akkumulation von Zellen mit DNA-Schäden oder Mutation reduzieren. Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie und der bisher in der Literatur beschriebenen Eigenschaften der MSC, erscheint ein zelltherapeutischer Ansatz zur Regeneration der Tränendrüse vielversprechend. Bisher gibt es allerdings noch keine Studie, in der die Applikation von MSC, die aus der Tränendrüse isoliert und in reduzierter Sauerstoffkonzentration kultiviert wurden, zur Regeneration der Tränendrüse untersucht wurde. Deshalb muss das regenerative Potential und insbesondere die Sicherheit der Verwendung dieser Zellen als Therapieoption beim Syndrom des trockenen Auges in Form von lokaler oder systemischer Anwendung im Rahmen von *in vivo* Tiermodellen weiter untersucht werden, bevor eine klinische Anwendung erwogen werden kann.

6. Literaturverzeichnis

1. The epidemiology of dry eye disease: report of the Epidemiology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf.* 2007 Apr;5(2):93–107.
2. Goto E, Yagi Y, Matsumoto Y, Tsubota K. Impaired functional visual acuity of dry eye patients. *Am J Ophthalmol.* 2002 Feb;133(2):181–6.
3. Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, Hirsch JD, Reis BL. Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. *Arch Ophthalmol.* 2000 May;118(5):615–21.
4. Begley CG, Chalmers RL, Abetz L, Venkataraman K, Mertzanis P, Caffery BA, et al. The relationship between habitual patient-reported symptoms and clinical signs among patients with dry eye of varying severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Nov;44(11):4753–61.
5. Management and therapy of dry eye disease: report of the Management and Therapy Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf.* 2007 Apr;5(2):163–78.
6. Tutt R, Bradley A, Begley C, Thibos LN. Optical and visual impact of tear break-up in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000 Dec;41(13):4117–23.
7. Buchholz P, Steeds CS, Stern LS, Wiederkehr DP, Doyle JJ, Katz LM, et al. Utility Assessment to Measure the Impact of Dry Eye Disease. *Ocul Surf.* 2006 Jul;4(3):155–61.
8. Perry HD. Dry eye disease: pathophysiology, classification, and diagnosis. *Am J Manag Care.* 2008 Apr;14(3 Suppl):S79–87.
9. Stern ME, Gao J, Siemasko KF, Beuerman RW, Pflugfelder SC. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Exp Eye Res.* 2004 Mar;78(3):409–16.
10. Zoukhri D. Effect of inflammation on lacrimal gland function. *Exp Eye Res.* 2006 May;82(5):885–98.
11. Ralph RA. Conjunctival goblet cell density in normal subjects and in dry eye syndromes. *Invest Ophthalmol.* 1975 Apr;14(4):299–302.
12. Mathers WD, Lane JA, Zimmerman MB. Tear film changes associated with normal aging. *Cornea.* 1996 May;15(3):229–34.
13. Goldberg MF, Payne JW, Brunt PW. Ophthalmologic studies of familial dysautonomia. The Riley-Day syndrome. *Arch Ophthalmol.* 1968 Dec;80(6):732–43.
14. Palma J-A, Norcliffe-Kaufmann L, Fuente-Mora C, Percival L, Mendoza-Santiesteban C, Kaufmann H. Current treatments in familial dysautonomia. *Expert*

Opin Pharmacother. 2014 Dec;15(18):2653–71.

15. Sahinoglu N, Tuncer S, Alparslan N, Peksayar G. Isolated form of congenital bilateral lacrimal gland agenesis. *Indian J Ophthalmol*. Medknow Publications; 2011 Nov;59(6):522–3.
16. López-Miguel A, Tesón M, Martín-Montañez V, Enríquez-de-Salamanca A, Stern ME, González-García MJ, et al. Clinical and Molecular Inflammatory Response in Sjögren Syndrome-Associated Dry Eye Patients under Desiccating Stress. *Am J Ophthalmol*. 2015 Oct 8.
17. Lemp MA. Basic Principles and Classification of Dry Eye Disorders. In: *The Dry Eye*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1992. pp. 101–31.
18. Thomas O, Mahé M, Campion L, Bourdin S, Milpied N, Brunet G, et al. Long-term complications of total body irradiation in adults. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001 Jan 1;49(1):125–31.
19. Ogawa Y, Okamoto S, Wakui M, Watanabe R, Yamada M, Yoshino M, et al. Dry eye after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Ophthalmol*. BMJ Group; 1999 Oct;83(10):1125–30.
20. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf*. 2007 Apr;5(2):75–92.
21. Hessen M, Akpek EK. Dry eye: an inflammatory ocular disease. *J Ophthalmic Vis Res*. Medknow Publications; 2014 Apr;9(2):240–50.
22. Messmer EM. The pathophysiology, diagnosis, and treatment of dry eye disease. *Dtsch Arztebl Int*. 2015 Jan 30;112(5):71–81–quiz82.
23. Korb DR, Blackie CA. Using goggles to increase periocular humidity and reduce dry eye symptoms. *Eye Contact Lens*. 2013 Jul;39(4):273–6.
24. Geerling G, Sieg P, Meyer C, Bastian GO, Laqua H. [Transplantation of autologous submandibular glands in very severe keratoconjunctivitis sicca. 2 year outcome]. *Ophthalmologe*. 1998 Apr;95(4):257–65.
25. Borrelli M, Schröder C, Dart JKG, Collin JRO, Sieg P, Cree IA, et al. Long-Term Follow-up after Submandibular Gland Transplantation in Severe Dry Eyes Secondary to Cicatrizing Conjunctivitis. *Am J Ophthalmol*. 2010 Dec;150(6):894–904.
26. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976 Sep;4(5):267–74.
27. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974 Apr;17(4):331–40.
28. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966 Dec;16(3):381–90.

29. Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl.* 1988;10:63–76.
30. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991 Sep;9(5):641–50.
31. Jin HJ, Bae YK, Kim M, Kwon S-J, Jeon HB, Choi SJ, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *Int J Mol Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute;* 2013;14(9):17986–8001.
32. Reinisch A, Etchart N, Thomas D, Hofmann NA, Fruehwirth M, Sinha S, et al. Epigenetic and in vivo comparison of diverse MSC sources reveals an endochondral signature for human hematopoietic niche formation. *Blood. American Society of Hematology;* 2015 Jan 8;125(2):249–60.
33. Zhang L, Hong T-P, Hu J, Liu Y-N, Wu Y-H, Li L-S. Nestin-positive progenitor cells isolated from human fetal pancreas have phenotypic markers identical to mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol.* 2005;11(19):2906–11.
34. Hass R, Kasper C, Bohm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal.* 2011.
35. Rotter N, Oder J, Schlenke P, Lindner U, Böhrnsen F, Kramer J, et al. Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands. *Stem Cells Dev.* 2008 Jun;17(3):509–18.
36. Lin C-S, Ning H, Lin G, Lue TF. Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells? *Cytotherapy.* 2012 Nov;14(10):1159–63.
37. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells.* 2014 Jun;32(6):1380–9.
38. Zimmerlin L, Donnenberg VS, Rubin JP, Donnenberg AD. Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells. Donnenberg VS, Ulrich H, Tárnok A, editors. *Cytometry Part A. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company;* 2013 Jan 1;83A(1):134–40.
39. Anderson P, Carrillo-Gálvez AB, García-Pérez A, Cobo M, Martín F. CD105 (Endoglin)-Negative Murine Mesenchymal Stromal Cells Define a New Multipotent Subpopulation with Distinct Differentiation and Immunomodulatory Capacities. Menendez P, editor. *PLoS ONE. Public Library of Science;* 2013 Apr 10;8(10):e76979.
40. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy [Internet].* 2006 Jan;8(4):315–7.
41. Jeong J, Baek H, Kim Y-J, Choi Y, Lee H, Lee E, et al. Human salivary gland stem cells ameliorate hyposalivation of radiation-damaged rat salivary glands. *Exp Mol Med.* 2013;45(11):e58.
42. Aurich H, Sgodda M, Kaltwaßer P, Vetter M, Weise A, Liehr T, et al. Hepatocyte

- differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut*. BMJ Publishing Group Ltd and British Society of Gastroenterology; 2009 Apr;58(4):570–81.
43. Hou L, Cao H, Wang D, Wei G, Bai C, Zhang Y, et al. Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. *Int J Hematol*. 2003 Oct;78(3):256–61.
 44. Yang X-S, Wu H-X, Xiao B. [Human mesenchymal stem cells differentiate into neuron-like cells and show SMN protein expression]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2005 Apr 27;85(16):1125–8.
 45. Xie Q-P, Huang H, Xu B, Dong X, Gao S-L, Zhang B, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into insulin-producing cells upon microenvironmental manipulation in vitro. *Differentiation*. 2009 Jun;77(5):483–91.
 46. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2006 Aug 1;98(5):1076–84.
 47. Liu Y, Han Z-P, Zhang S-S, Jing Y-Y, Bu X-X, Wang C-Y, et al. Effects of inflammatory factors on mesenchymal stem cells and their role in the promotion of tumor angiogenesis in colon cancer. *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2011 Jul 15;286(28):25007–15.
 48. Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. Bozza P, editor. *PLoS ONE*. 2008;3(4):e1886.
 49. Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med*. Nature Publishing Group; 2013;45(11):e54.
 50. Akram KM, Samad S, Spiteri MA, Forsyth NR. Mesenchymal stem cells promote alveolar epithelial cell wound repair in vitro through distinct migratory and paracrine mechanisms. *Respir Res*. BioMed Central Ltd; 2013;14(1):9.
 51. Hu N, Zhang Y-Y, Gu H-W, Guan H-J. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on cell proliferation and growth factor expression of limbal epithelial cells in vitro. *Ophthalmic Res*. 2012;48(2):82–8.
 52. Walter MNM, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WEB. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Exp Cell Res*. 2010 Apr 15;316(7):1271–81.
 53. Moghadasali R, Mutsaers HAM, Azarnia M, Aghdami N, Baharvand H, Torensma R, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates regeneration of human renal proximal tubule epithelial cells after gentamicin toxicity. *Exp Toxicol Pathol*. 2013 Jul;65(5):595–600.
 54. Cselenyák A, Pankotai E, Horváth EM, Kiss L, Lacza Z. Mesenchymal stem cells rescue cardiomyoblasts from cell death in an in vitro ischemia model via direct cell-to-cell connections. *BMC Cell Biol*. BioMed Central Ltd; 2010;11(1):29.

55. Li N, Sarojini H, An J, Wang E. Prosaposin in the secretome of marrow stroma-derived neural progenitor cells protects neural cells from apoptotic death. *J Neurochem*. Blackwell Publishing Ltd; 2010 Mar;112(6):1527–38.
56. Kim S-Y, Lee J-H, Kim HJ, Park MK, Huh JW, Ro JY, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned media recovers lung fibroblasts from cigarette smoke-induced damage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. American Physiological Society; 2012 May 1;302(9):L891–908.
57. Bifari F, Lisi V, Mimiola E, Pasini A, Krampera M. Immune Modulation by Mesenchymal Stem Cells. *Transfus Med Hemother*. Karger Publishers; 2008;35(3):194–204.
58. Castro-Manreza ME, Montesinos JJ. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *J Immunol Res*. Hindawi Publishing Corporation; 2015;2015(2):394917–20.
59. Browne CM, Chung T-L, Atkinson K. The Biology of Mesenchymal Stem Cells in Health and Disease and Its Relevance to MSC-Based Cell Delivery Therapies. In: *Mesenchymal Stem Cell Therapy*. Totowa, NJ: Humana Press; 2013. pp. 63–86.
60. Chen X, Armstrong MA, Li G. Mesenchymal stem cells in immunoregulation. *Immunol Cell Biol*. Nature Publishing Group; 2006 Oct;84(5):413–21.
61. Jacobs SA, Roobrouck VD, Verfaillie CM, Van Gool SW. Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells. *Immunol Cell Biol*. 2013 Jan;91(1):32–9.
62. Bittira B. Mobilization and homing of bone marrow stromal cells in myocardial infarction. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2003 Sep;24(3):393–8.
63. Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Dec;287(6):H2670–6.
64. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2002 Jun;73(6):1919–26.
65. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001 Apr 5;410(6829):701–5.
66. Montanari S, Dayan V, Yannarelli G, Billia F, Viswanathan S, Connelly KA, et al. Mesenchymal stromal cells improve cardiac function and left ventricular remodeling in a heart transplantation model. *J Heart Lung Transplant*. 2015 Jun.
67. Jiang X, Jiang X, Qu C, Chang P, Zhang C, Qu Y, et al. Intravenous delivery of adipose-derived mesenchymal stromal cells attenuates acute radiation-induced lung injury in rats. *Cytotherapy*. 2015 May;17(5):560–70.
68. Morigi M, Benigni A. Mesenchymal stem cells and kidney repair. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Apr;28(4):788–93.

69. Morigi M. Mesenchymal Stem Cells Are Renotropic, Helping to Repair the Kidney and Improve Function in Acute Renal Failure. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2004 Jul 1;15(7):1794–804.
70. Cheng K, Rai P, Plagov A, Lan X, Kumar D, Salhan D, et al. Transplantation of bone marrow-derived MSCs improves cisplatin-induced renal injury through paracrine mechanisms. *Exp Mol Pathol*. 2013 Mar 25.
71. van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology*. 2008 May;47(5):1634–43.
72. Manzini BM, da Silva Santos Duarte A, Sankaramanivel S, Ramos AL, Latuf-Filho P, Escanhoela C, et al. Useful properties of undifferentiated mesenchymal stromal cells and adipose tissue as the source in liver-regenerative therapy studied in an animal model of severe acute fulminant hepatitis. *Cytotherapy*. 2015 Aug;17(8):1052–65.
73. van Velthoven CTJ, Sheldon RA, Kavelaars A, Derugin N, Vexler ZS, Willemsen HJLM, et al. Mesenchymal Stem Cell Transplantation Attenuates Brain Injury After Neonatal Stroke. *Stroke*. 2013 May;44(5):1426–32.
74. Sanchez-Ramos JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2002 Sep 15;69(6):880–93.
75. Kong D, Zhuang X, Wang D, Qu H, Jiang Y, Li X, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transfusion ameliorated hyperglycemia in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Lab*. 2014;60(12):1969–76.
76. Rastogi S, Sankineani SR, Nag HL, Mohanty S, Shivanand G, Marimuthu K, et al. Intralesional autologous mesenchymal stem cells in management of osteonecrosis of femur: a preliminary study. *Musculoskelet Surg*. 2013 Dec;97(3):223–8.
77. Götherström C, Westgren M, Shaw SWS, Aström E, Biswas A, Byers PH, et al. Pre- and postnatal transplantation of fetal mesenchymal stem cells in osteogenesis imperfecta: a two-center experience. *Stem Cells Transl Med*. 2014 Feb;3(2):255–64.
78. Jo CH, Lee YG, Shin WH, Kim H, Chai JW, Jeong EC, et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells*. 2014 May;32(5):1254–66.
79. Karantalis V, DiFede DL, Gerstenblith G, Pham S, Symes J, Zambrano JP, et al. Autologous mesenchymal stem cells produce concordant improvements in regional function, tissue perfusion, and fibrotic burden when administered to patients undergoing coronary artery bypass grafting: The Prospective Randomized Study of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Patients Undergoing Cardiac Surgery (PROMETHEUS) trial. *Circ Res*. 2014 Apr 11;114(8):1302–10.
80. Qiao L-Y, Huang F-J, Zhao M, Xie J-H, Shi J, Wang J, et al. A two-year follow-up study of cotransplantation with neural stem/progenitor cells and mesenchymal stromal cells in ischemic stroke patients. *Cell Transplant*. 2014;23 Suppl 1:S65–72.
81. Li J-F, Zhang D-J, Geng T, Chen L, Huang H, Yin H-L, et al. The potential of human

- umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a novel cellular therapy for multiple sclerosis. *Cell Transplant*. 2014;23 Suppl 1:S113–22.
82. Wong KL, Lee KBL, Tai BC, Law P, Lee EH, Hui JHP. Injectable cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in varus knees with cartilage defects undergoing high tibial osteotomy: a prospective, randomized controlled clinical trial with 2 years' follow-up. *Arthroscopy*. 2013 Dec;29(12):2020–8.
 83. Golpanian S, El-Khorazaty J, Mendizabal A, DiFede DL, Suncion VY, Karantalis V, et al. Effect of aging on human mesenchymal stem cell therapy in ischemic cardiomyopathy patients. *Journal of the American College of Cardiology*. 2015 Jan 20;65(2):125–32.
 84. Jarocho D, Milczarek O, Wedrychowicz A, Kwiatkowski S, Majka M. Continuous improvement after multiple mesenchymal stem cell transplantations in a patient with complete spinal cord injury. *Cell Transplant*. 2015;24(4):661–72.
 85. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant*. 1995 Oct;16(4):557–64.
 86. Amorin B, Alegretti AP, Valim V, Pezzi A, Laureano AM, da Silva MAL, et al. Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: a review. *Hum Cell*. 2014 Jun; 27:137–150.
 87. Dean C, Ito M, Makarenkova HP, Faber SC, Lang RA. Bmp7 regulates branching morphogenesis of the lacrimal gland by promoting mesenchymal proliferation and condensation. *Development*. 2004 Sep;131(17):4155–65.
 88. Zoukhri D, Macari E, Kublin CL. A single injection of interleukin-1 induces reversible aqueous-tear deficiency, lacrimal gland inflammation, and acinar and ductal cell proliferation. *Exp Eye Res*. 2007 May;84(5):894–904.
 89. You S, Kublin CL, Avidan O, Miyasaki D, Zoukhri D. Isolation and propagation of mesenchymal stem cells from the lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Apr;52(5):2087–94.
 90. Zoukhri D, Fix A, Alroy J, Kublin CL. Mechanisms of murine lacrimal gland repair after experimentally induced inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 Oct;49(10):4399–406.
 91. You S, Avidan O, Tariq A, Ahluwalia I, Stark PC, Kublin CL, et al. Role of epithelial-mesenchymal transition in repair of the lacrimal gland after experimentally induced injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Jan;53(1):126–35.
 92. Shatos MA, Haugaard-Kedstrom L, Hodges RR, Dartt DA. Isolation and characterization of progenitor cells in uninjured, adult rat lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 May;53(6):2749–59.
 93. Ackermann P, Hetz S, Dieckow J, Schicht M, Richter A, Kruse C, et al. Isolation and Investigation of Presumptive Murine Lacrimal Gland Stem Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. The Association for Research in Vision and Ophthalmology; 2015 Jul 1;56(8):4350–63.

94. Hirayama M, Tsubota K, Tsuji T. Bioengineered Lacrimal Gland Organ Regeneration in Vivo. *J Funct Biomater*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2015;6(3):634–49.
95. Hirayama M, Ogawa M, Oshima M, Sekine Y, Ishida K, Yamashita K, et al. Functional lacrimal gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. *Nat Commun*. 2013 Oct 1;4:2497.
96. Barabino S, Dana MR. Animal models of dry eye: a critical assessment of opportunities and limitations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Jun;45(6):1641–6.
97. Park SA, Reilly CM, Wood JA, Chung DJ, Carrade DD, Deremer SL, et al. Safety and immunomodulatory effects of allogeneic canine adipose-derived mesenchymal stromal cells transplanted into the region of the lacrimal gland, the gland of the third eyelid and the knee joint. *Journal of Cytotherapy*. Elsevier Inc; 2013 Dec 1;15(12):1498–510.
98. Wood JA, Chung DJ, Park SA, Zwingenberger AL, Reilly CM, Ly I, et al. Periocular and Intra-Articular Injection of Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: An In Vivo Imaging and Migration Study. <http://dxdoiorg/101089/jop20110166>. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA; 2012 Jun 7;28(3):307–17.
99. Villatoro AJ, xel F, ndez V, Claros S, Rico-Llanos GA, Becerra JX, et al. Use of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Keratoconjunctivitis Sicca in a Canine Model. *Biomed Res Int*. Hindawi Publishing Corporation; 2015 Feb 23;2015(3):1–10.
100. Lee MJ, Ko AY, Ko JH, Lee HJ, Kim MK, Wee WR, et al. Mesenchymal stem/stromal cells protect the ocular surface by suppressing inflammation in an experimental dry eye. *Mol Ther*. 2015 Jan;23(1):139–46.
101. Efficacy of topical mesenchymal stem cell therapy in the treatment of experimental dry eye syndrome model. *Stem Cells Int*. 2014;2014(3):250230–9.
102. Weng J, He C, Lai P, Luo C, Guo R, Wu S, et al. Mesenchymal stromal cells treatment attenuates dry eye in patients with chronic graft-versus-host disease. *Mol Ther*. Nature Publishing Group; 2012 Dec;20(12):2347–54.
103. Panepucci RA, Siufi JLC, Silva WA Jr., Proto-Siquiera R, Neder L, Orellana M, et al. Comparison of Gene Expression of Umbilical Cord Vein and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 2004 Dec;22(7):1263–78.
104. Harichandan A, Sivasubramaniyan K, Bühring H-J. Prospective isolation and characterization of human bone marrow-derived MSCs. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013;129(Chapter 147):1–17.
105. Collins E, Gu F, Qi M, Molano I, Ruiz P, Sun L, et al. Differential efficacy of human mesenchymal stem cells based on source of origin. *J Immunol*. 2014 Nov;193(9):4381–90.
106. Bortolotti F, Ukovich L, Razban V, Martinelli V, Ruozi G, Pelos B, et al. In vivo therapeutic potential of mesenchymal stromal cells depends on the source and the

- isolation procedure. *Stem Cell Reports*. 2015 Mar;4(3):332–9.
107. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 2006 Jun 29;441(7097):1075–9.
 108. Jones E, Schafer R. Biological differences between native and cultured mesenchymal stem cells: implications for therapies. *Methods Mol Biol*. 2015;1235:105–20.
 109. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. John Wiley & Sons, Ltd; 2006 Feb;24(2):462–71.
 110. Bahr von L, Sundberg B, Lönnies L, Sander B, Karbach H, Hägglund H, et al. Long-term complications, immunologic effects, and role of passage for outcome in mesenchymal stromal cell therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*. Elsevier; 2012 Apr;18(4):557–64.
 111. Moll G, Rasmusson-Duprez I, Bahr von L, Connolly-Andersen A-M, Elgue G, Funke L, et al. Are therapeutic human mesenchymal stromal cells compatible with human blood? *Stem Cells*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2012 Jul;30(7):1565–74.
 112. Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*. 2010 Aug 6;7(2):150–61.
 113. Santos dos F, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MM, da Silva CUL, Cabral JMS. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: A more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J Cell Physiol*. 2010 Apr; 223(1):27-35.
 114. Estrada JC, Albo C, Benguría A, Dopazo A, López-Romero P, Carrera-Quintanar L, et al. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell Death Differ*. 2012 May;19(5):743–55.
 115. Feng Y, Zhu M, Dangelmajer S, Lee YM, Wijesekera O, Castellanos CX, et al. Hypoxia-cultured human adipose-derived mesenchymal stem cells are non-oncogenic and have enhanced viability, motility, and tropism to brain cancer. *Cell Death Dis*. Nature Publishing Group; 2014;5(12):e1567.
 116. Drela K, Sarnowska A, Siedlecka P, Szablowska-Gadomska I, Wielgos M, Jurga M, et al. Low oxygen atmosphere facilitates proliferation and maintains undifferentiated state of umbilical cord mesenchymal stem cells in an hypoxia inducible factor-dependent manner. *Journal of Cytotherapy*. Elsevier Inc; 2014 Jul 1;16(7):881–92.
 117. Krishnappa V, Boregowda SV, Phinney DG. The peculiar biology of mouse mesenchymal stromal cells--oxygen is the key. *Cytotherapy*. 2013 May;15(5):536–41.
 118. Carreau A, Hafny Rahbi BE, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med*. Blackwell Publishing Ltd; 2011;15(6):1239–53.
 119. Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J Cell Physiol*.

Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2009 May 1;219(2):271–5.

120. Haque N, Rahman MT, Abu Kasim NH, Alabsi AM. Hypoxic Culture Conditions as a Solution for Mesenchymal Stem Cell Based Regenerative Therapy. *The Scientific World Journal*. 2013;2013(4):1–12.
121. Basciano L, Nemos C, Foliguet B, de Isla N, de Carvalho M, Tran N, et al. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biol. BioMed Central Ltd*; 2011 Mar 30;12(1):12.
122. Valorani MG, Germani A, Otto WR, Harper L, Biddle A, Khoo CP, et al. Hypoxia increases Sca-1/CD44 co-expression in murine mesenchymal stem cells and enhances their adipogenic differentiation potential. *Cell Tissue Res. Springer-Verlag*; 2010 Jul;341(1):111–20.
123. Zhao F, Veldhuis JJ, Duan Y, Yang Y, Christoforou N, Ma T, et al. Low oxygen tension and synthetic nanogratings improve the uniformity and stemness of human mesenchymal stem cell layer. *Mol Ther*. 2010 May;18(5):1010–8.
124. Fotia C, Massa A, Boriani F, Baldini N, Granchi D. Hypoxia enhances proliferation and stemness of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cytotechnology. Springer Netherlands*; 2014 May 6;:1–12.
125. Nekanti U, Dastidar S, Venugopal P, Totey S, Ta M. Increased proliferation and analysis of differential gene expression in human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells under hypoxia. *Int J Biol Sci*. 2010;6(5):499–512.
126. Hung S-C, Pochampally RR, Hsu S-C, Sanchez C, Chen S-C, Spees J, et al. Short-term exposure of multipotent stromal cells to low oxygen increases their expression of CX3CR1 and CXCR4 and their engraftment in vivo. Unutmaz D, editor. *PLoS ONE. Public Library of Science*; 2007;2(5):e416.
127. Mollet M, Mollet M, Silva RG, Godoy-Silva R, Berdugo C, Berdugo C, et al. Computer simulations of the energy dissipation rate in a fluorescence-activated cell sorter: Implications to cells. *Biotechnol Bioeng. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company*; 2008 Jun 1;100(2):260–72.
128. Seidl J, Knuechel R, Kunz-Schughart LA. Evaluation of membrane physiology following fluorescence activated or magnetic cell separation. *Cytometry*. 1999 Jun 1;36(2):102–11.
129. Harvey DM, Levine AJ. p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Genes Dev*. 1991 Dec;5(12B):2375–85.
130. Phinney DG, Sensebé L. Mesenchymal stromal cells: misconceptions and evolving concepts. *Cytotherapy*. 2013 Feb;15(2):140–5.
131. Burrows CJ. *Surviving an Oxygen Atmosphere: DNA Damage and Repair. ACS Symp Ser. Washington DC: American Chemical Society*; 2009 Dec 20;2009:147–56.
132. Brierley DJ, Martin SA. *Oxidative stress and the DNA mismatch repair pathway. Antioxid Redox Signal. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New*

Rochelle, NY 10801 USA; 2013 Jun 20;18(18):2420–8.

133. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J. Federation of American Societies for Experimental Biology*; 2003 Jul;17(10):1195–214.
134. Xie S, Wang Q, Wu H, Cogswell J, Lu L, Jhanwar-Uniyal M, et al. Reactive oxygen species-induced phosphorylation of p53 on serine 20 is mediated in part by polo-like kinase-3. *J Biol Chem*. 2001 Sep 28;276(39):36194–9.
135. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*. 2003 Dec 8;22(56):9030–40.
136. Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman WH, et al. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev*. 2000 Apr 15;14(8):981–93.
137. Krishnamachary B, Penet M-F, Nimmagadda S, Mironchik Y, Raman V, Solaiyappan M, et al. Hypoxia regulates CD44 and its variant isoforms through HIF-1 α in triple negative breast cancer. Lisanti M, editor. *PLoS ONE. Public Library of Science*; 2012;7(8):e44078.
138. Choi JR, Pingguan-Murphy B, Wan Abas WAB, Noor Azmi MA, Omar SZ, Chua KH, et al. Impact of low oxygen tension on stemness, proliferation and differentiation potential of human adipose-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 May 30;448(2):218–24.
139. de Jong MC, Pramana J, van der Wal JE, Lacko M, Peutz-Kootstra CJ, de Jong JM, et al. CD44 expression predicts local recurrence after radiotherapy in larynx cancer. *Clin Cancer Res*. 2010 Nov 1;16(21):5329–38.
140. Herrera M, Bussolati B, Camussi G. Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury. 2007 Aug;72(4):430–41.
141. Miletti-González KE, Murphy K, Kumaran MN, Ravindranath AK, Wernyj RP, Kaur S, et al. Identification of function for CD44 intracytoplasmic domain (CD44-ICD): modulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) transcription via novel promoter response element. *Journal of Biological Chemistry. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*; 2012 Jun 1;287(23):18995–9007.
142. Kawana H, Karaki H, Higashi M, Miyazaki M, Hilberg F, Kitagawa M, et al. CD44 suppresses TLR-mediated inflammation. *J Immunol*. 2008 Mar 15;180(6):4235–45.
143. Rahat MA, Marom B, Bitterman H, Weiss-Cerem L, Kinarty A, Lahat N. Hypoxia reduces the output of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in monocytes by inhibiting its secretion and elevating membranous association. *J Leukoc Biol. Society for Leukocyte Biology*; 2006 Apr;79(4):706–18.
144. Liu H, Liu S, Li Y, Wang X, Xue W, Ge G, et al. The role of SDF-1-CXCR4/CXCR7 axis in the therapeutic effects of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells for renal ischemia/reperfusion injury. *PLoS ONE*. 2012.
145. Shi M, Li J, Liao L, Bin Chen, Li B, Chen L, et al. Regulation of CXCR4 expression

- in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica*. *Haematologica*; 2007 Jul 1;92(7):897–904.
146. Benita Y, Kikuchi H, Smith AD, Zhang MQ, Chung DC, Xavier RJ. An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucl Acids Res*. Oxford University Press; 2009 Jun 2;37(14):gkp425–602.
 147. Liu H, Xue W, Ge G, Luo X, Li Y, Xiang H, et al. Hypoxic preconditioning advances CXCR4 and CXCR7 expression by activating HIF-1alpha in MSCs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Oct;401(4):509–15.
 148. Li J, Zhou J, Zhang D, Song Y, She J, Bai C. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhance autophagy via PI3K/AKT signalling to reduce the severity of ischaemia/reperfusion-induced lung injury. *J Cell Mol Med*. 2015 Oct;19(10):2341–51
 149. Kim J-W, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism*. 2006 Mar;3(3):177–85.
 150. Semenza GL. Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Physiology*. American Physiological Society; 2009 Apr 1;24(2):97–106.
 151. Liu J, Hao H, Huang H, Tong C, Ti D, Dong L, et al. Hypoxia Regulates the Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells Through Enhanced Autophagy. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*. 2015 Apr 8;14(1):63–72.
 152. Thorburn A. Autophagy and its effects: making sense of double-edged swords. *PLoS Biol*. Public Library of Science; 2014 Oct;12(10):e1001967.
 153. Seo Y, Ji YW, Lee SM, Shim J, Noh H, Yeo A, et al. Activation of HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α) prevents dry eye-induced acinar cell death in the lacrimal gland. *Cell Death Dis*. Nature Publishing Group; 2014;5(6):e1309.
 154. Berniakovich I, Giorgio M. Low oxygen tension maintains multipotency, whereas normoxia increases differentiation of mouse bone marrow stromal cells. *Int J Mol Sci*. 2013;14(1):2119–34.
 155. Valorani MG, Montelatici E, Germani A, Biddle A, D'Alessandro D, Strollo R, et al. Pre-culturing human adipose tissue mesenchymal stem cells under hypoxia increases their adipogenic and osteogenic differentiation potentials. *Cell Prolif*. 2012 Jun;45(3):225–38.
 156. Malladi P, Xu Y, Chiou M, Giaccia AJ, Longaker MT. Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. *Am J Physiol, Cell Physiol*. 2006 Apr;290(4):C1139–46.
 157. Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitinger S, Kloss F, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell*. Blackwell Publishing Ltd; 2007 Dec;6(6):745–57.
 158. Buravkova LB, Andreeva ER, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mesenchymal stem cells

and hypoxia: Where are we? Mitochondrion. 2014 Nov;19 Pt A:105-12

159. Bain O, Detela G, Kim H-W, Mason C, Mathur A, Wall IB. Altered hMSC functional characteristics in short-term culture and when placed in low oxygen environments: implications for cell retention at physiologic sites. *Regen Med*. 2014 Mar;9(2):153–65.
160. Meyer U, Meyer T, Handschel J, Wiesmann HP. *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Meyer U, Handschel J, Wiesmann HP, Meyer T, editors. Berlin, Heidelberg: Springer Science & Business Media; 2009. 1 p.
161. Zoukhri D. Mechanisms involved in injury and repair of the murine lacrimal gland: role of programmed cell death and mesenchymal stem cells. *Ocul Surf*. 2010 Apr;8(2):60–9.
162. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997 Apr 4;276(5309):75–81.
163. Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, Leroux MA. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med*. AlphaMed Press; 2012 Feb;1(2):142–9.
164. Linero I, Chaparro O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. Camussi G, editor. *PLoS ONE*. 2014;9(9):e107001.
165. Sheng L, Yang M, Liang Y, Li Q. Adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) transplantation promotes regeneration of expanded skin using a tissue expansion model. *Wound Repair Regen*. 2013 Sep;21(5):746–54.
166. Henker R, Scholz M, Gaffling S, Asano N, Hampel U, Garreis F, et al. Morphological features of the porcine lacrimal gland and its compatibility for human lacrimal gland xenografting. Bhattacharya S, editor. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e74046.
167. Spaniol K, Metzger M, Roth M, Greve B, Mertsch S, Geerling G, et al. Engineering of a secretory active three-dimensional lacrimal gland construct on the basis of decellularized lacrimal gland tissue. *Tissue Eng Part A*. 2015 Jul 29;:150729113407005.
168. Sharma SM, Fuchsluger T, Ahmad S, Katikireddy KR, Armant M, Dana R, et al. Comparative analysis of human-derived feeder layers with 3T3 fibroblasts for the ex vivo expansion of human limbal and oral epithelium. *Stem Cell Rev*. Humana Press Inc; 2012 Sep;8(3):696–705.
169. Lu R, Bian F, Lin J, Su Z, Qu Y, Pflugfelder SC, et al. Identification of human fibroblast cell lines as a feeder layer for human corneal epithelial regeneration. Kerkis I, editor. *PLoS ONE*. 2012;7(6):e38825.
170. Amirjamshidi H, Milani BY, Sagha HM, Movahedan A, Shafiq MA, Lavker RM, et al. Limbal fibroblast conditioned media: a non-invasive treatment for limbal stem cell deficiency. *Mol Vis*. 2011;17:658–66.
171. Timmers L, Lim SK, Hoefer IE, Arslan F, Lai RC, van Oorschot AAM, et al. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following

- myocardial infarction. *Stem Cell Res.* 2011 May;6(3):206–14.
172. Oh JY, Lee RH, Yu JM, Ko JH, Lee HJ, Ko AY, et al. Intravenous mesenchymal stem cells prevented rejection of allogeneic corneal transplants by aborting the early inflammatory response. *Mol Ther.* 2012 Nov;20(11):2143–52.
 173. Nakahara M, Okumura N, Kay EP, Hagiya M, Imagawa K, Hosoda Y, et al. Corneal endothelial expansion promoted by human bone marrow mesenchymal stem cell-derived conditioned medium. Covas DT, editor. *PLoS ONE. Public Library of Science*; 2013;8(7):e69009.
 174. Chen L, Xu Y, Zhao J, Zhang Z, Yang R, Xie J, et al. Conditioned medium from hypoxic bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. Pesce M, editor. *PLoS ONE.* 2014;9(4):e96161.
 175. Jun EK, Zhang Q, Yoon BS, Moon J-H, Lee G, Park G, et al. Hypoxic conditioned medium from human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells accelerates skin wound healing through TGF- β /SMAD2 and PI3K/Akt pathways. *Int J Mol Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*; 2014;15(1):605–28.
 176. Lee EY, Xia Y, Kim W-S, Kim MH, Kim TH, Kim KJ, et al. Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen. Blackwell Publishing Inc*; 2009 Jul;17(4):540–7.
 177. Xagorari A, Siotou E, Yiangou M, Tsolaki E, Bougiouklis D, Sakkas L, et al. Protective effect of mesenchymal stem cell-conditioned medium on hepatic cell apoptosis after acute liver injury. *Int J Clin Exp Pathol. e-Century Publishing Corporation*; 2013;6(5):831–40.
 178. Li S-Y, Qi Y, Hu S-H, Piao F-Y, Guan H, Wang Z-M, et al. Mesenchymal stem cells-conditioned medium protects PC12 cells against 2,5-hexanedione-induced apoptosis via inhibiting mitochondria-dependent caspase 3 pathway. *Toxicol Ind Health. SAGE Publications*; 2015 Sep 29;:0748233715598267. [Epub ahead of print]
 179. Li D, Wang N, Zhang L, Hanyu Z, Xueyuan B, Fu B, et al. Mesenchymal stem cells protect podocytes from apoptosis induced by high glucose via secretion of epithelial growth factor. *Stem Cell Res Ther. BioMed Central Ltd*; 2013;4(5):103.
 180. Oh JY, Ko JH, Kim MK, Wee WR. Effects of mesenchymal stem/stromal cells on cultures of corneal epithelial progenitor cells with ethanol injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci. The Association for Research in Vision and Ophthalmology*; 2014 Nov;55(11):7628–35.
 181. Hung S-C, Pochampally RR, Chen S-C, Hsu S-C, Prockop DJ. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells. John Wiley & Sons, Ltd*; 2007 Sep;25(9):2363–70.
 182. Park B-S, Kim W-S, Choi J-S, Kim H-K, Won J-H, Ohkubo F, et al. Hair growth stimulated by conditioned medium of adipose-derived stem cells is enhanced by hypoxia: evidence of increased growth factor secretion. *Biomed Res.* 2010 Feb;31(1):27–34.

183. Di Santo S, Yang Z, Wyler von Ballmoos M, Voelzmann J, Diehm N, Baumgartner I, et al. Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: in vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation. Najbauer J, editor. PLoS ONE. 2009;4(5):e5643.
184. Huang T-F, Yew T-L, Chiang E-R, Ma H-L, Hsu C-Y, Hsu S-H, et al. Mesenchymal stem cells from a hypoxic culture improve and engraft Achilles tendon repair. Am J Sports Med. American Orthopaedic Society for Sports Medicine; 2013 May;41(5):1117–25.
185. Lan Y-W, Choo KB, Chen C-M, Hung T-H, Chen Y-B, Hsieh C-H, et al. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Stem Cell Res Ther. 2015;6:97.
186. Zhang W, Liu L, Huo Y, Yang Y, Wang Y. Hypoxia-pretreated human MSCs attenuate acute kidney injury through enhanced angiogenic and antioxidative capacities. Biomed Res Int. 2014;2014:462472.
187. Yu X, Lu C, Liu H, Rao S, Cai J, Liu S, et al. Hypoxic Preconditioning with Cobalt of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Improves Cell Migration and Enhances Therapy for Treatment of Ischemic Acute Kidney Injury. Singh SR, editor. PLoS ONE. 2013 May 9;8(5):e62703–12.
188. Chang C-P, Chio C-C, Cheong C-U, Chao C-M, Cheng B-C, Lin M-T. Hypoxic preconditioning enhances the therapeutic potential of the secretome from cultured human mesenchymal stem cells in experimental traumatic brain injury. Clin Sci. Portland Press Ltd; 2013 Feb;124(3):165–76.
189. Jaussaud J, Biais M, Calderon J, Chevaleyre J, Duchez P, Ivanovic Z, et al. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stromal cells improve cardiac function in a swine model of chronic myocardial ischaemia. Eur J Cardiothorac Surg. 2013 May;43(5):1050–7.

7. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.