

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
Chirurgische Klinik – Innenstadt der Ludwig–Maximilians–Universität München
Leiterin: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Marianne Jochum

ZIELGERICHTETE GENETISCHE MODIFIKATION
HUMANER MESENCHYMALER STAMMZELLEN MITTELS
LIPOSOMALER TRANSFEKTION NICHT-VIRALER VEKTOREN

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig–Maximilians–Universität zu München

vorgelegt von
Jürgen Hölters

aus
Wasserburg am Inn

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Marianne Jochum
2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Frank Kolligs
Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Peter Jon Nelson, Ph.D.
Priv. Doz. Dr. med. Philipe N. Khalil

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Peter Neth

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2009

IN LIEBE UND DANKBARKEIT

MEINEM VATER

1947 - 2005

INHALTSVERZEICHNIS

A	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
B	EINLEITUNG	3
B.1	Stammzellen.....	3
B.1.1	Embryonale Stammzellen.....	3
B.1.2	Adulte Stammzellen und induzierte pluripotente Stammzellen (iPS).....	4
B.1.2.1	Humane mesenchymale Stammzellen	5
B.2	Gentransfer und Gentherapie	6
B.2.1	Viraler Gentransfer (Transduktion).....	10
B.2.2	Nicht-viraler Gentransfer (Transfektion)	12
B.2.2.1	Transfektion mittels physikalischer Methoden	12
B.2.2.2	Transfektion mittels kationischer Polymere	13
B.2.3	Sequenzspezifisch gerichteter genomischer Gentransfer	16
B.2.3.1	ΦC31 Integrase.....	18
B.3	Fluoreszierende Proteine zur Zellfunktionsanalyse.....	21
C	FRAGESTELLUNGEN UND ZIELE DER ARBEIT	23
D	MATERIAL UND METHODEN.....	25
D.1	Geräte und Materialien.....	25
D.1.1	Geräte	25
D.1.2	Materialien und Substanzen.....	26
D.1.2.1	Bakterienstämme, Nährmedien und Antibiotikallösungen.....	28
D.1.2.2	Oligonukleotide	29
D.1.2.3	Transfektionsreagenzien.....	29
D.1.2.4	Plasmide.....	29
D.1.2.4.1	pEGFP-N3.....	29
D.1.2.4.2	pHRGFP-N1	30
D.1.2.4.3	pEGFP-Luc.....	31
D.1.2.4.4	pIRES2-EGFP	32
D.1.2.4.5	pIRESneo2	33
D.1.2.4.6	pCR2.1-TOPO	33
D.1.2.4.7	pCMV-Int.....	34
D.1.2.4.8	pTA-attB.....	35
D.2	Methoden.....	36
D.2.1	Molekularbiologie.....	36
D.2.1.1	Anzucht und Stammhaltung von <i>Escherichia coli</i>	36
D.2.1.2	Herstellung kompetenter Zellen.....	36
D.2.1.3	Transformation	37
D.2.1.4	Analytische Plasmidpräparation.....	38
D.2.1.5	Restriktionsanalyse	39

D.2.1.6	Agarosegel-Elektrophorese	40
D.2.1.7	Präparative Plasmidpräparation	40
D.2.1.8	Klonierung	42
D.2.1.8.1	pEGFP-IRES-neo2 und phrGFP-IRES-neo2	42
D.2.1.8.2	<i>pattB</i> -EGFP-IRES-neo2 und <i>pattB</i> -hrGFP-IRES-neo2	45
D.2.1.9	RNA-Isolierung	48
D.2.1.10	cDNA-Synthese für die quantitative RT-PCR	49
D.2.1.11	Quantitative RT-PCR.....	50
D.2.1.12	DNA-Isolation aus eukaryontischen Zellen	51
D.2.1.13	DNA-Sequenzierung	52
D.2.1.14	Restriktionsfragmentlängen-Analyse	53
D.2.2	Zellkultur	55
D.2.2.1	Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen.....	55
D.2.2.2	Subkultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen	55
D.2.2.3	Transfektion	56
D.2.2.3.1	Transiente Transfektion	56
D.2.2.3.1.1	Transfektion mit METAFECTENE.....	56
D.2.2.3.1.2	Transfektion mit Lipofectamine Plus	57
D.2.2.3.1.3	Transfektion mit Lipofectamine 2000.....	57
D.2.2.3.2	Toxizitätsanalyse	58
D.2.2.3.3	Nachweis der Transienz.....	59
D.2.2.3.4	Kotransfektion	59
D.2.2.3.5	Stabile Transfektion.....	60
D.2.2.3.5.1	Dosis-Wirkungs-Analyse von Geneticin	61
D.2.2.3.5.2	Durchführung der stabilen Transfektion.....	61
D.2.2.3.5.3	Klonale Expansion	62
D.2.2.4	Differenzierung stabiler Klone.....	62
D.2.2.4.1	Osteogene Differenzierung.....	62
D.2.2.4.2	Adipogene Differenzierung.....	63
D.2.2.4.3	Chondrogene Differenzierung.....	64
D.2.3	Immunfluoreszenz.....	66
D.2.4	Statistik.....	67
E	ERGEBNISSE.....	68
E.1	Liposomale nicht-virale Transfektion von GFP-Varianten in hMSC.....	68
E.1.1	Transiente Transfektion	68
E.1.1.1	Transfektion mittels METAFECTENE.....	68
E.1.1.2	Transfektion mittels Lipofectamine Plus.....	70
E.1.1.3	Transfektion mittels Lipofectamine 2000.....	72
E.1.1.4	Toxizitätsanalyse und Bestimmung der Transfektionsrate.....	74
E.1.1.5	Transienz der Transfektion	75
E.1.2	Stabile Transfektion.....	75
E.1.2.1	Dosis-Wirkungsanalyse von Geneticin.....	75
E.1.2.2	Stabile Transfektion von pEGFP-N3 in hMSC	76
E.1.2.3	Immunfluoreszenz stabil EGFP-exprimierender hMSC.....	77

E.1.3	Differenzierung stabiler hMSC	78
E.1.3.1	Osteogene Differenzierung.....	78
E.1.3.1.1	Morphologische Veränderungen.....	78
E.1.3.1.2	Transkriptionelle Veränderungen	79
E.1.3.2	Adipogene Differenzierung.....	80
E.1.3.2.1	Morphologische Veränderungen.....	80
E.1.3.2.2	Transkriptionelle Veränderungen	81
E.1.3.3	Chondrogene Differenzierung.....	82
E.1.3.3.1	Morphologische Veränderungen.....	82
E.1.3.3.2	Transkriptionelle Veränderungen	83
E.1.4	Vektoren pEGFP-IRES-neo2 und phrGFP-IRES-neo2	84
E.1.4.1	Klonierung	84
E.1.4.2	Transfektion.....	86
E.2	Etablierung des Φ C31 Integrase-Systems zur zielgerichteten Integration....	86
E.2.1	Klonierung der <i>attB</i> -Vektoren.....	86
E.2.2	Kotransfektion zur zielgerichteten Integration	88
E.2.3	Restriktionsfragmentlängen-Analyse.....	89
E.2.4	Sequenzierung des Integrationsortes	90
F	DISKUSSION.....	93
F.1	Liposomale Transfektion humaner mesenchymaler Stammzellen.....	93
F.1.1	Transiente Transfektion	93
F.1.2	Stabile Transfektion.....	95
F.1.3	Differenzierung stabil EGFP-exprimierender Zellen	99
F.2	Zielgerichtete Integration in humane mesenchymale Stammzellen	103
F.2.1	Das Φ C31 Integrase-System.....	103
F.2.1.1	Kotransfektion zur zielgerichteten Integration	103
F.2.1.2	Detektion des chromosomalen Integrationsortes.....	105
G	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK.....	106
H	LITERATURVERZEICHNIS.....	108
I	ANHANG	117
I.1	Kultivierung von hMSC.....	117
I.2	Transfektionsprotokoll für METAFECTENE.....	118
I.3	Transfektionsprotokoll für Lipofectamine Plus	119
I.4	Transfektionsprotokoll für Lipofectamine 2000	120
J	CURRICULUM VITAE.....	121
K	DANKSAGUNG	125

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A

<i>A. victoria</i>	<i>Aequorea victoria</i>
A _{260 nm}	Absorption bei 260 nm
A _{280 nm}	Absorption bei 280 nm
AAV	Adeno-assoziierte Viren
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
AK	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
APH	Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase
AS	Aminosäure
<i>attB</i>	<i>attachment site in the bacterium</i>
<i>attP</i>	<i>attachment site in the phage</i>

B

bp	Basenpaare
----	------------

C

c	Konzentration
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>
CMV	Cytomegalievirus

D

Dapi	4,6-Diamino-2-phenylindol
dest.	destiliert
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
ddNTP	2',3'-Dideoxyribonukleosid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig

E

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ESC	embryonale Stammzellen
Exz.	Exzitation

F

FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	fötales Kälberserum
FDA	Fluoresceindiacetat
FoaS	<i>flask on a slide</i>

G

GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP *green fluorescent protein*

H

HIV *human immunodeficiency virus*
hMSC humane mesenchymale Stammzellen
hrGFP *humanized recombinant green fluorescent protein*
HSC hämapoetische Stammzellen
HSV Herpes simplex Virus

I

ICM innere Zellmasse eines Embryos
iPS induzierte pluripotente Stammzellen
IRES *internal ribosomal entry site*

K

Kan Kanamycin
kB Kilobasen(paare)
kDa Kilodalton

L

Luc Luziferase

M

MAPC *multipotent adult progenitor cells*
mAU *milliAnson Unit*
MCS *multiple cloning site*
mRNA *messenger RNA*
MSC mesenchymale Stammzellen

N

Neo bzw. neo Neomycin
NLS *nuclear localization signal*

O

OD optische Dichte
ori *origin of replication*

P

p Plasmid
PBS Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR *polymerase chain reaction*
poly A Polyadenylierungssignal
PPAR- γ *peroxisome proliferator activated receptor gamma*
pseudo-*attP* *pseudo-attachment site as in the phage*
pUC ori Plasmid-Replikationsursprung

R

RE	Restriktionsendonuklease(n)
RFLA	Restriktionsfragmentlängenanalyse
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus / -en
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	<i>real-time polymerase chain reaction</i>

S

<i>S. coelicolor</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
ss	einzelsträngig (<i>single stranded</i>)
SSR	sequenzspezifische Rekombinase
SV 40	Simian Virus 40

T

TGF- β -3	<i>transforming growth factor-β-3</i>
TK	Thymidinkinase
tRNA	transfer-RNA

U

U	<i>Unit(s)</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute

V

v/v	Volumen / Volumen
VT	Volumentteile

W

w/v	Gewicht / Volumen
-----	-------------------

A ZUSAMMENFASSUNG

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) sind in der Lage innerhalb des mesodermalen Keimblattes in Richtung Knorpel, Knochen und Fett zu differenzieren. Sie sind im adulten Körper an der Gewebemöostase und dem Gewebersatz beteiligt. Seit einigen Jahren können hMSC als Zellpool aus dem Knochenmark isoliert werden, wodurch ihre Verwendung als Ausgangsmaterial für das *tissue engineering* nahe liegend ist. Dennoch ist bis dato weitgehend ungeklärt, was mit den Zellen nach Implantation *in vivo* geschieht. Dies ist jedoch klinisch von enormer Bedeutung. Um eine Zelldetektion *in vivo* zu ermöglichen, bedarf es allerdings suffizienter Methoden zur stabilen, langfristig nachweisbaren Markierung von Zellen *in vitro*, die die Zellfunktion nicht beeinträchtigen. Deshalb sollte in der hier vorliegenden Arbeit ein nicht-virales Transfektionssystem für hMSC entwickelt werden, das auch eine ortsgerichtete Integration des Markierungstransgens (fluoreszierendes Protein) in das Genom erlauben sollte.

Zur Etablierung der nicht-viralen Transfektion wurden zum einen Vektoren benutzt, die die kodierende Sequenz der GFP-Varianten *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) oder *humanized renilla GFP* (hrGFP) enthielten. Zum anderen wurden drei verschiedene liposomale Transfektionsreagenzien komparativ analysiert. Dabei wurde mit 50 % die größte Fraktion fluoreszierender Zellen unter Verwendung von Lipofectamine 2000 erzielt, gefolgt von 22 % durch METAFECTENE und Lipofectamine Plus mit 13 %. In einer Toxizitätsanalyse konnte zudem gezeigt werden, dass die Transfektion mit Lipofectamine 2000 nur einen geringen Einfluss auf die Viabilität der hMSC hat.

Zur Generierung stabil GFP-exprimierender hMSC wurden die Zellen nach Transfektion subkultiviert und mittels Geneticin einem Antibiotikum-Selektionsdruck ausgesetzt. Zellen, die diesem 16 Tage standhielten, wurden als stabil transfiziert bezeichnet. Zu diesem Zeitpunkt konnten keine untransfizierten hMSC (Kontrolle) detektiert werden, die unter identischen Antibiotikums-Selektionsdruck kultiviert wurden. Die Expansion der GFP-exprimierenden hMSC ließ sich über sechs Monate aufrecht erhalten. Die stabile Expression wurde neben der GFP-Fluoreszenz zusätzlich mittels Immunfluoreszenz zum Nachweis des Transgens verifiziert.

Um den Erhalt des Stammzellcharakters der stabil GFP-exprimierenden hMSC zu untersuchen, wurde neun Wochen nach Transfektion die adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung der Zellen über 21 Tage induziert. Es konnten sowohl die typischen zellmorphologischen als auch transkriptionelle Veränderungen der drei unterschiedlichen Zellpopulationen festgestellt werden. Mittels quantitativer RT-PCR konnte ein Anstieg der Expression der jeweiligen Marker PPAR- γ (adipogen), ALP (osteogen) und Aggrecan (chondrogen) um das 600-, 19- bzw. 20-fache gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden.

Zur zielgerichteten Integration von Transgenen in das hMSC-Genom wurde das Φ C31 Integrase-System für diese Stammzellpopulation etabliert. Um die durch die Integrase des Phagen Φ C31 vermittelte Rekombination in definierte Regionen des Genoms der hMSC zu untersuchen, wurde hierzu die bakterielle Rekombinationssequenz *attB* aus *Streptomyces coelicolor* in einen Vektor kloniert, der die Expression von EGFP mit Hilfe einer *internal ribosomal entry site* (IRES) in direkter Korrelation mit dem Neomycin-Resistenzgen Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase erlaubt. Dieser Vektor wurde zusammen mit einem für die Φ C31 Integrase kodierenden Plasmid in hMSC transfiziert. Nach dem Selektionsprozess erfolgte die Isolation der genomischen DNA der stabil transfizierten hMSC. Mittels PCR und anschließender Restriktionsfragmentlängenanalyse sowie durch Sequenzierung gelang der Nachweis der zielgerichteten Integration des EGFP-Vektors in die Region p22 auf Chromosom 8.

In der vorliegenden Arbeit konnte mithilfe nicht-viraler Methoden somit sowohl eine effiziente, über mehrere Monate anhaltende Expression eines Markerproteins (Transgenexpression) als auch eine ortsgerichtete Integration von DNA in eine bestimmte Region des Genoms von hMSC gezeigt werden. Da bestimmte virale Vektoren aufgrund ihrer Immunogenität und Mutagenität anhaltender Kritik unterliegen, sind diese Ergebnisse insbesondere für die Verwendung nicht-viraler Methoden des Gentransfers im Rahmen von Zell- und Gentherapien als auch im Rahmen des *tissue engineering*s von weitreichender Bedeutung.

B EINLEITUNG

B.1 Stammzellen

Ausgehend von der befruchteten Eizelle wird der menschliche Körper aus etwa 210 verschiedenen Zelltypen aufgebaut. Von diesen somatischen Zellen unterscheiden sich Stammzellen durch zwei wesentliche Eigenschaften. Zum einen sind sie in der Lage, sich durch Zellteilung immer wieder selbst zu erneuern. Zum anderen besitzen sie die Fähigkeit, unter geeigneten Bedingungen in mindestens einen spezialisierten Zelltyp zu differenzieren (s. Abb. B1) (Donovan and Gearhart, 2001).

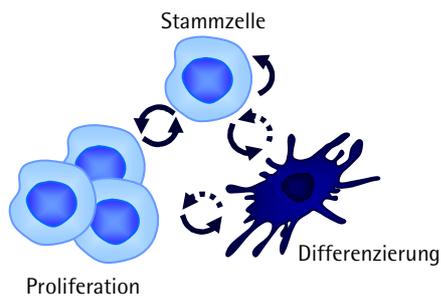


Abb. B1: Multimodales Stammzellkonzept. Proliferation unter Erhalt des Stammzellcharakters und Differenzierungsfähigkeit sind die zwei wesentlichen Charakteristika aller Stammzellen (nach Zipori et al., 2004).

Stammzellen dienen dem Gewebeaufbau, der Gewebemöostase im gesunden Organismus und der Regeneration von defektem Gewebe (Weissman, 2000). Handelt es sich dabei um Stammzellen, die lediglich in einen Zelltyp differenzieren, wie z.B. spermatogoniale, endotheliale und korneale Stammzellen, werden diese als unipotent bezeichnet (Wagers and Weissman, 2004). Hiervon abgegrenzt werden multipotente Stammzellen, wie z.B. hämatopoetische, neuronale und mesenchymale Stammzellen (Donovan and Gearhart, 2001; Verfaillie, 2002). Diese Zellen finden sich in den verschiedensten adulten Geweben und sind in der Lage, innerhalb eines Keimblattes in mehrere Zelltypen zu differenzieren. Pluripotente Stammzellen hingegen, die die Fähigkeit besitzen in alle Zelltypen des Körpers zu differenzieren, können nicht aus adultem Gewebe isoliert werden, sie sind embryonalen Ursprungs (Thomson et al., 1998).

B.1.1 Embryonale Stammzellen

Der wohl bedeutendste Unterschied zwischen embryonalen und adulten Stammzellen liegt in der Pluripotenz embryonaler Stammzellen (*embryonic stem cells*, ESC). Diese Eigenschaft impliziert zwar nicht die Möglichkeit der Generierung eines vollständigen Organismus (Totipotenz), jedoch die Differenzierung in Zelltypen aller drei Keimblätter. Somit können ESC in meso-, ekto- und endodermales Gewebe differenzieren.

Die ersten ESC wurden vor mehr als 25 Jahren aus der inneren Zellmasse einer murinen Blastozyste gewonnen (Martin, 1981; Evans and Kaufman, 1981). Durch die Etablierung spezieller Bedingungen, unter denen murine ESC *in vitro* kultiviert werden können, wurden so embryonale Stammzelllinien mit normalem diploidem Karyotyp generiert (s. Abb. B2). Die *ex vivo* expandierten ESC waren in der Lage, in alle drei Keimblätter zu differenzieren. Diese Arbeiten bildeten zudem die wesentliche Grundlage zur Generierung von *knockout*- und *knockin*-Mäusen, wofür im Jahr 2007 der Nobelpreis für Medizin und Physiologie verliehen wurde (Rippon and Bishop, 2004; Manis, 2007).

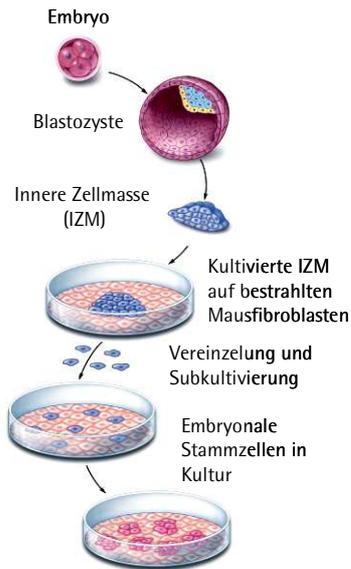


Abb. B2: Gewinnung von ESC.

Nach Isolation der inneren Zellmasse eines Embryos (IZM) wird diese auf murinen Fibroblasten (*feeder layer*) kultiviert. Aus den sich bildenden Zellaggregaten werden Zellen vereinzelt und unter identischen Kulturbedingungen durch klonales Wachstum weiter expandiert (nach Winslow, 2001).

Im Jahr 1998 gelang es schließlich der Arbeitsgruppe um James A. Thomson aus einer humanen Blastozyste gewonnene ESC *in vitro* über mehrere Passagen zu kultivieren. Die Implantation der humanen ESC in immundefiziente Mäuse führte zur Bildung von Teratomen, die Zellen aller drei Keimblätter enthielten (Thomson et al., 1998). Dieses zwar zur Demonstration des pluripotenten Charakters der ESC notwendige Ergebnis stellt jedoch zugleich ein nicht unerhebliches Risiko in der therapeutischen Anwendung dieser Zellen dar. Aus diesem Grunde und der Tatsache, dass die Gewinnung von ESC mit der Zerstörung des Embryos einhergeht, ist die Forschung an humanen ESC stark umstritten (Shapiro, 1999; McLaren, 2001; Normile and Vogel, 2005).

Ungeachtet der Tatsache, dass dem putativen therapeutischen Potential humaner ESC ethische, soziale und juristische Bedenken gegenüberstehen (Rippon and Bishop, 2004; Greely, 2006), führte die Forschung an humanen ESC zu wichtigen Erkenntnissen im Hinblick auf die Charakterisierung der Stammzeleigenschaften und der molekularen Regulationsmechanismen, die diesen und der Differenzierung der Zellen zugrunde liegen.

B.1.2 Adulte Stammzellen und induzierte pluripotente Stammzellen (iPS)

Adulte Stammzellen sind in den verschiedensten Geweben und Organen des menschlichen Körpers lokalisiert und vermitteln dort die gewebespezifische Organregeneration (Korbling and Estrov, 2003). Sie sind demnach in der Lage, terminal differenzierte Zellen mit der entsprechenden funktionellen Gewebeentität zu generieren. Dies kann sowohl im Rahmen des physiologischen Zellumsatzes als auch aufgrund von Gewebeschäden geschehen (Slack, 2000).

Die am besten charakterisierte Stammzellpopulation bilden die hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSC). Ihre Fähigkeit zur Erythro-, Leuko- und Thrombopoese ist seit der Entdeckung von HSC (Siminovitch et al., 1963; Till et al., 1964) bis heute Gegenstand intensiver Forschung. Neuartige Therapien, wie die Transplantation von HSC zur Graft-versus-Tumor-Therapie (Maris et al., 2004), zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen des rheumatischen Formenkreises (Traynor et al., 2000) oder von Diabetes mellitus (Tian et al., 2004)

sind ebenso viel versprechend wie die Verwendung von HSC im Rahmen von antiviralen Gentherapien (Bordignon and Roncarolo, 2002) und auf dem Gebiet des *tissue engineering* (Corbel et al., 2003). Die Anwendungsmöglichkeiten von HSC sind insbesondere deswegen so vielfältig, da sie auch zur Regeneration von keimblattfremdem Gewebe, wie z.B. Haut, Lungenepithel und Leberparenchym beitragen können (Wagers and Weissman, 2004; Grove et al., 2004).

So muss also seit kurzem die Hypothese neu überdacht werden, dass adulte Stammzellen lediglich innerhalb ihres Keimblattes differenzieren können. Die Fähigkeit der HSC ebenso wie anderer adulter Stammzellpopulationen, keimblattübergreifend in Zellen mit definierten Expressionsprofilen und funktionellen Phänotypen zu differenzieren, bezeichnet man als Plastizität (Herzog et al., 2003; Goodell, 2003). Insbesondere die Entdeckung der so genannten *multipotent adult progenitor cells* (MAPC) aus dem Knochenmark revolutionierte die Vorstellung bezüglich der Differenzierungsfähigkeit adulter Stammzellen. MAPC können sowohl in mesodermale, neuroektodermale als auch in endodermale Zelltypen differenzieren und weisen somit ähnliche Eigenschaften wie ESC auf (Jiang et al., 2002).

Einen völlig neuartigen Ansatz zur Gewinnung pluripotenter Zellen aus adultem Gewebe verfolgten die Arbeitsgruppen um J. A. Thomson der *University of Wisconsin* und S. Yamanaka der *Kyoto University*. In den parallel im November 2007 veröffentlichten Artikeln beschreiben die Autoren die Generierung pluripotenter Stammzellen aus adulten Hautfibroblasten durch gleichzeitige ektopische Expression von vier verschiedenen Transkriptionsfaktoren (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Diese so genannten induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) wurden durch retrovirale Transduktion der Gene Oct3/4, Sox2, c-Myc und Klf4 hergestellt. Sowohl die Genexpression, das Proliferationsverhalten, die Morphologie der Zellen als auch deren Oberflächenmarker ähnelten hESC. Zudem gelang die Differenzierung in Zelltypen aller drei Keimblätter *in vitro*. Zur Demonstration der Pluripotenz der Zellen *in vivo* wurden die iPS in immundefiziente SCID-Mäuse implantiert. Es kam – ähnlich wie dies bereits von J. A. Thomson im Jahr 1998 für hESC gezeigt werden konnte – zu Teratomen mit Zellen des Meso-, Endo- und Ektoderms (Yu et al., 2007).

B.1.2.1 Humane mesenchymale Stammzellen

Die oben beschriebenen MAPC stellen eine Subpopulation der mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks (*marrow stromal cells* oder *mesenchymal stem cells*, MSC) dar. Kurz nach Entdeckung der HSC beschrieben, besitzen MSC die elementare Stammzeleigenschaft der Selbstreplikation und Differenzierung durch ihre Fähigkeit zur asymmetrischen Zellteilung (Friedenstein et al., 1966; Baksh et al., 2004). MSC sind in der Lage *in vitro* und *in vivo* in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten zu differenzieren (Friedenstein et al., 1987; Pittenger et al., 1999). Einhergehend mit einer hohen Proliferationsrate und der ethisch unbedenklichen Gewinnung aus dem Knochenmark wurden humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) zu einem großen Hoffnungsträger im klinischen Einsatz. Mit der Behandlung der Erbkrankheit *Osteogenesis imperfecta* (Horwitz et al., 2002) und Chemotherapie-induzierter

Anämien (Koc et al., 2000) sowie der Generierung von Knochengewebe im Rahmen des *tissue engineering* (Petite et al., 2000) sind Zelltherapien bereits Gegenstand klinischer Studien. Hierbei gewinnt die therapeutische Geweberekonstruktion des Stützapparates (s. Abb. B3), die neben der Herstellung von Knochen auch die von Knorpel-, Muskel- und Sehngewebe umfasst, immer mehr an Bedeutung (Bianco and Robey, 2001; Conrad and Huss, 2005).

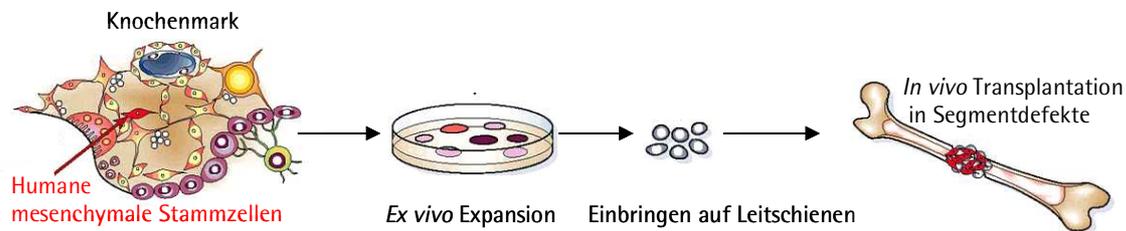


Abb. B3: *Tissue engineering*.

Isolation von hMSC aus dem Knochenmark, Stammzellkultur und deren Reimplantation nach Vermehrung *in vitro* in einen segmentalen Knochendefekt (nach Bianco and Robey, 2001).

Wenngleich zwar eine Differenzierung der hMSC in verschiedene mesodermale Richtungen initiiert werden kann und ihr Einsatz im Rahmen klinischer Studien bereits erfolgt, so sind weder die hMSC selbst noch die molekularen Mechanismen, die gerichteten Differenzierungs- und Migrationsvorgängen zugrunde liegen, ausreichend charakterisiert (Qi et al., 2003; Baksh et al., 2004; Ries et al., 2007). Ein tieferes Verständnis dieser molekularen Netzwerke ist jedoch für die Grundlagenforschung und für eine gezielte Therapie unabdingbar. Hierzu bedarf es effizienter Techniken zur genetischen Modifikation von hMSC. Zum einen kann so z.B. der Effekt von Signaltransduktionswegen wie dem Wnt-Signalweg mittels Überexpression oder temporärem *silencing* von Rezeptoren oder Liganden untersucht werden (Neth et al., 2006; Ries et al., 2007). Zum anderen führt die Überexpression von Wachstumsfaktoren wie z.B. dem *bone morphogenetic protein-2* zu einem verstärkten Knochenwuchs im Vergleich zu nativen hMSC durch autokrine und parakrine Effekte (Turgeman et al., 2002).

B.2 Gentransfer und Gentherapie

Die Entwicklung von Methoden, mit deren Hilfe eine gezielte Modifikation des Genoms vorgenommen werden kann, sind eine wesentliche Errungenschaft der Molekularbiologie (Wurtele et al., 2003). So kann der Transfer von zusätzlicher genetischer Information – insbesondere in eukaryontische Zellen – durch verschiedenste Techniken erreicht werden. Das Einschleusen dieser so genannten Transgene in eukaryontische Zellen wird hierbei als Transfektion bezeichnet. Bei der transienten Transfektion besteht das Ziel darin, das vorwiegend durch Vektoren kodierte Zielgen temporär in eukaryontische Zellen einzubringen (Colosimo et al., 2000). Dabei wird die DNA nicht in das Wirtsgenom integriert, sondern liegt in meist hoher Kopienzahl episomal im Zellkern vor. Dadurch findet die Expression des Transgens in hohem Maße statt. Allerdings wird die extrachromosomal vorliegende ringförmige Plasmid-DNA in einem Zeitraum von wenigen Tagen durch zelluläre Nukleasen abgebaut. Dies führt zu einer zeitlich begrenzten Transgen-Expression (Colosimo et al., 2000). Die temporäre Expression von Transgenen ist häufig dann das Mittel der Wahl, wenn deren Wirkung über einen kurzen Zeitraum benötigt wird (Li and Huang, 2000).

Die Transienz episomaler Plasmide kann mittels viraler oder nicht-viraler Regulationselemente, wie des nukleären Antigens 1 des Epstein-Barr Virus oder der *scaffold/matrix attachment-Region* vermieden werden (Piechaczek et al., 1999). Diese Sequenzen führen zu einer permanenten Expression durch autonome extrachromosomale Replikation und Weitergabe der DNA an Tochterzellen. Darüber hinaus ist die Expression des Transgens in diesem Fall unabhängig von Positionseffekten, die beobachtet werden, wenn der Vektor ins Genom integriert. Da der episomale Vektor oftmals in mehreren Kopien vorliegt, kann die Expression des Transgens zudem in stärkerem Maße stattfinden (Cooper et al., 1997; Aiyar et al., 1998).

Die beschriebenen Methoden, die nicht zu einer Veränderung des chromosomalen Phänotyps einer Zelle führen, bieten eine Reihe von Anwendungsmöglichkeiten. Die permanente Integration der Fremd-DNA gilt jedoch als das probateste Mittel zur Untersuchung seiner Funktion und zellulären Wirkung. Darüber hinaus erfordert insbesondere die therapeutische Anwendung die persistierende Expression des therapeutischen Gens (Somia and Verma, 2000). Diese wird vornehmlich durch die Integration des Zielgens in die chromosomale DNA erreicht, von wo aus die Synthese des Zielproteins in einer physiologischen Konzentration stattfinden soll (Sambrook and Russell, 2001). Das Hauptziel dieser Strategie besteht in der Behandlung einer genetisch bedingten Erkrankung oder Stoffwechselstörung. Derzeit werden Gentherapien in über 1400 klinischen Studien der Phasen I – III geprüft. Die Einsatzgebiete liegen hauptsächlich im Bereich maligner Neoplasien, gefolgt von kardiovaskulären und monogenen Erkrankungen (s. Abb. B4). Mit neuen, insbesondere RNA-Interferenz (RNAi)-basierten Therapieansätzen im Kampf gegen die Immunschwäche AIDS gewinnt das Anwendungsgebiet von Gentherapien gegen Infektionskrankheiten einen in den letzten Jahren wachsenden Stellenwert (Wolkowicz and Nolan, 2005).

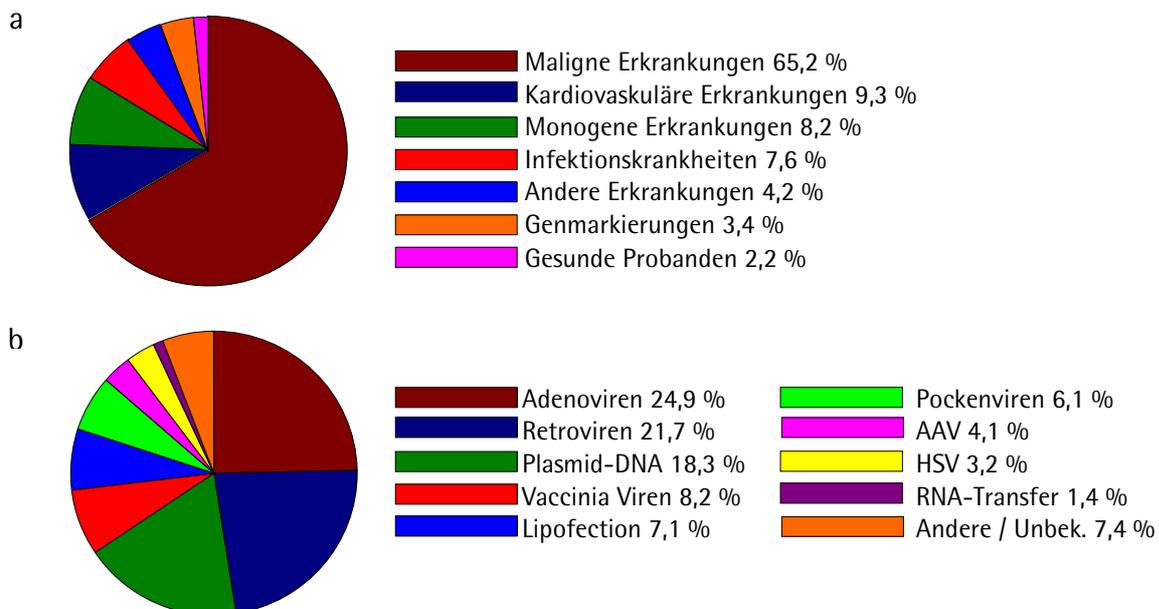


Abb. B4: Anwendungsgebiete der Gentherapie und verwendete Vektoren.

a) Etwa zwei Drittel aller derzeitigen Gentherapiestudien werden im Rahmen von Tumorerkrankungen durchgeführt, gefolgt von kardiovaskulären und monogenen Erkrankungen.

b) Im Einsatz sind hauptsächlich virale Vektoren. Der Transfer sog. „nackter“ oder Plasmid-DNA bzw. die Transfektion mittels liposomaler Transfektionsreagenzien wird in nur ca. 25 % der Studien angewandt.

AAV: Adeno-assoziierte Viren, HSV: Herpes simplex Viren; Unbek.: Unbekannt;

(Quelle: <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>, Bericht über das Jahr 2008)

Die therapeutischen Gene befinden sich auf Vektoren mit weiteren Elementen, die z.B. für die Transkription, Translation und Replikation erforderlich sind. Die Applikation dieser Expressionskassetten kann je nach zu Grunde liegendem Defekt direkt mittels Injektion erfolgen oder indirekt über das vorherige Einbringen in patienteneigene Zellen (s. Abb. B5).

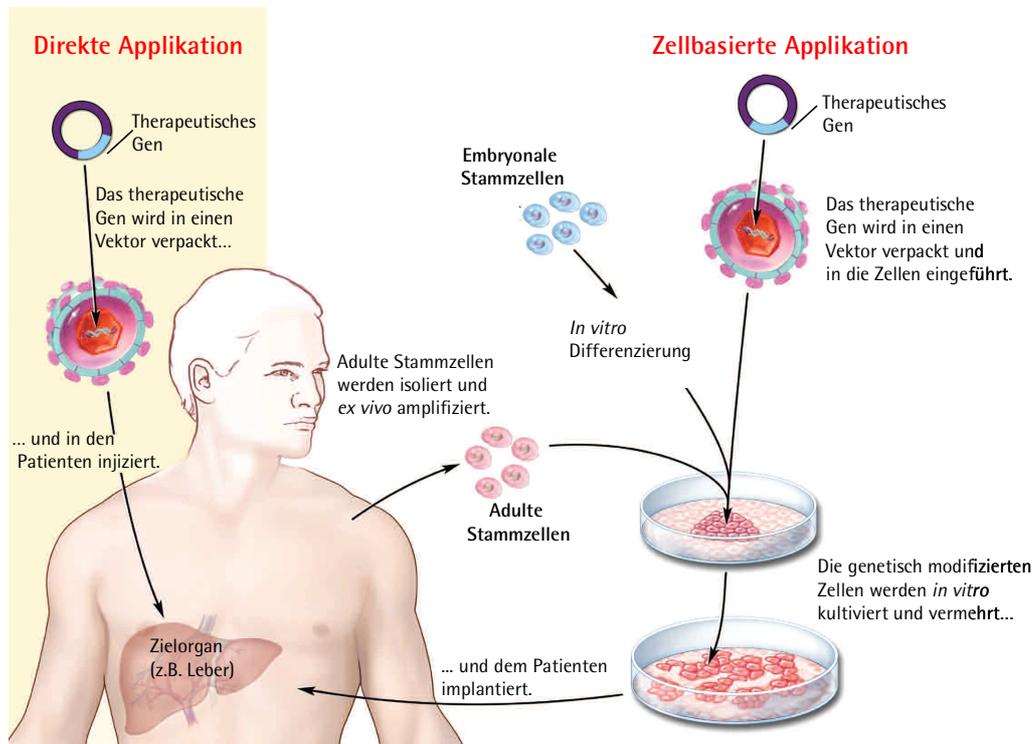


Abb. B5: Möglichkeiten der Transgenapplikation.

Das in einen gentherapeutischen Vektor verpackte Transgen kann dem Patienten entweder direkt injiziert werden (Direkte Applikation) oder man entnimmt dem Patienten Zellen (z.B. Stammzellen), modifiziert die genetische Information dieser Zellen *ex vivo* und infundiert diese anschließend (Zellbasierte Applikation) (nach Winslow, 2001).

Entscheidend für den Erfolg der Therapie sind darüber hinaus weitere Eigenschaften, die im Folgenden genauer erörtert werden:

Die Größe der kodierenden Sequenz eines therapeutischen Gens kann zwischen 350 bp (Insulin) und mehr als 32.000 bp (Kollagen VII) variieren. Da die Ergänzung geeigneter regulativer Sequenzen, wie Promotoren, Enhancer oder Silencer den Vektor vergrößert, sollte dieser eine möglichst unbegrenzte Aufnahmekapazität aufweisen (Somia and Verma, 2000).

Da Vektoren grundsätzlich vom Immunsystem des Körpers als Fremd-DNA erkannt werden können, sollten diese nach Applikation möglichst nicht zu einer ausgeprägten Immunreaktion führen. Humorale Antikörper würden eine Zweitinjektion erschweren und diese womöglich ineffektiv machen, während die zelluläre Abwehr die Zellen eliminieren würde, die das Transgen inkorporiert haben. Systemische Reaktionen des Körpers erschweren die Anwendbarkeit der Gentherapie, so dass auf Vektoren zurückgegriffen werden sollte, die immunologisch möglichst inert sind (Somia and Verma, 2000).

Des Weiteren sollte der Vektor in möglichst großen Mengen und mit möglichst geringem Aufwand herzustellen sein. So kann zwar die Anzahl der Zellen, die das therapeutische Gen exprimieren soll, nur wenige (in etwa 10^5) Stammzellen betragen, um z.B. das gesamte hämatopoetische System zu rekonstituieren. Um jedoch etwa die Regeneration von 5-10 % der Leber einzuleiten, müssen bis zu 10^{11} Zellen das therapeutische Gen exprimieren (Somia and Verma, 2000). Diese Expression sollte zudem in einem möglichst hohen Maße und homogen erfolgen, da ein gleichmäßig effizienter und die Vitalität der Zellen nicht beeinträchtigender Transfer des Vektors in die Zielzellen unabdingbar ist. Da es sich bei vielen Zielzellen um postmitotische Zellen, wie z.B. Neuronen, Hepatozyten oder Myozyten handelt, sollte der Vektor auch in solche Zellen inkorporieren, die sich nicht weiter teilen (Somia and Verma, 2000).

Für einen anhaltenden Therapieeffekt sollte der Vektor entweder dauerhaft episomal im Zellkern vorliegen oder in spezifische genomische Regionen der Zellen integrieren. Obwohl die persistierende episomale Präsenz des Vektors diesen unabhängig von Positionseffekten, der lokalen Chromatinstruktur und damit einhergehenden Expressionsregulationen macht, sind eine zuverlässige Replikation und Weitergabe an die Tochterzellen unabdingbare Voraussetzung zum Einsatz in der Gentherapie, insbesondere unter Verwendung von sich weiterhin teilenden Stammzellen. Daher ist insbesondere im Bereich der Gentherapie mittels Stammzellen die genomische Integration erwünscht. Geschieht diese außerdem zielgerichtet, so kann die Gefahr der Insertionsmutagenese minimiert werden, da das Transgen somit an geeigneter Stelle der Kontrolle endogener und physiologischer regulativer Elemente unterworfen wird (Glover et al., 2005).

Zudem wird oft gefordert, dass die Expression des therapeutischen Gens lediglich in den Zellen erfolgt, die das zu behandelnde Defizit aufweisen. Insbesondere in Zelltypen, die multifokal im Körper vorkommen, wie z.B. im hämatopoetischen System oder in Muskelgewebe, aber auch in Zellen, die Teil einer heterogenen Gewebeentität, wie z.B. dem Gehirn sind, ist eine gewebe- oder zelltypspezifische Genexpression wünschenswert. Diese sollte darüber hinaus nicht immer konstitutiv, sondern vielmehr reguliert erfolgen (Somia and Verma, 2000). So unterliegen gerade Hormone sensitiven Regelkreisen, die von wenigen Stunden (z.B. Insulin) bis zu mehreren Tagen (z.B. Östrogen) reichen und auch mit zunehmendem Alter physiologisch unterschiedliche Expressionsniveaus erfordern.

Trotz einer intensiven Forschungstätigkeit ist es jedoch bis heute nicht gelungen, einen Vektor zu generieren, der all diese Kriterien zufriedenstellend erfüllt.

Neben den Vektoreigenschaften ist der Transfer der Vektoren in die Zellen ein kritisches Element jeder Gentherapie. Die Möglichkeiten Vektoren in eukaryontische Zellen einzuschleusen, sind vielgestaltig. So unterscheidet man die Virus-vermittelten Transduktionen (viralen Gentransfer) von den nicht-viralen Transfektionen (nicht-viralen Gentransfer), die entweder biochemisch oder physikalisch erfolgen (Cooper et al., 1997; Glover et al., 2005).

B.2.1 Viraler Gentransfer (Transduktion)

Als Transduktion bezeichnet man in der Genetik den Transfer fremder genetischer Information in Zielzellen mit Hilfe von Viren. Wie bereits beschrieben, nutzen derzeit etwa 70 % aller klinischen Gentherapiestudien diesen Mechanismus (s. Abb. B4).

Der virale Lebenszyklus ist in eine infektiöse und eine replikative Phase unterteilt. Als Infektion bezeichnet man die Einführung des viralen Genoms in die Wirtszelle. Diese hat die Expression der so genannten „Frühen Gene“ zur Folge, die hauptsächlich regulatorische Proteine umfasst. Es schließt sich eine späte Phase an, in der vornehmlich Strukturgene produziert und neue Viruspartikel generiert werden. In diesen ist das virale Genom verpackt, welches im Falle gentherapeutischer Vektoren modifiziert ist. Hierbei werden Sequenzen, die für die Virusreplikation notwendig sind, durch die therapeutische Expressionskassette ersetzt, um seine ungehinderte Vermehrung zu verhindern (Kay et al., 2001). Dieses manipulierte Virus wird in so genannte Verpackungszellen eingeführt, die wiederum Gene enthalten, die eine gezielte Produktion eines möglichst hohen Virentiters erlauben. Da dieser Helfer-DNA die Verpackungsdomäne fehlt, kann sie nicht in die entstehenden Virenpartikel inkorporiert werden, so dass die Rekonstitution eines replikationsfähigen Virus verhindert wird (s. Abb. B6). Demnach erfolgt der Gentransfer in Form replikationsdefizienter, jedoch infektiöser Viren, die an spezifische Rezeptoren der Zielzelle binden (Colosimo et al., 2000). Dieser Vorgang wird als Transduktion bezeichnet.

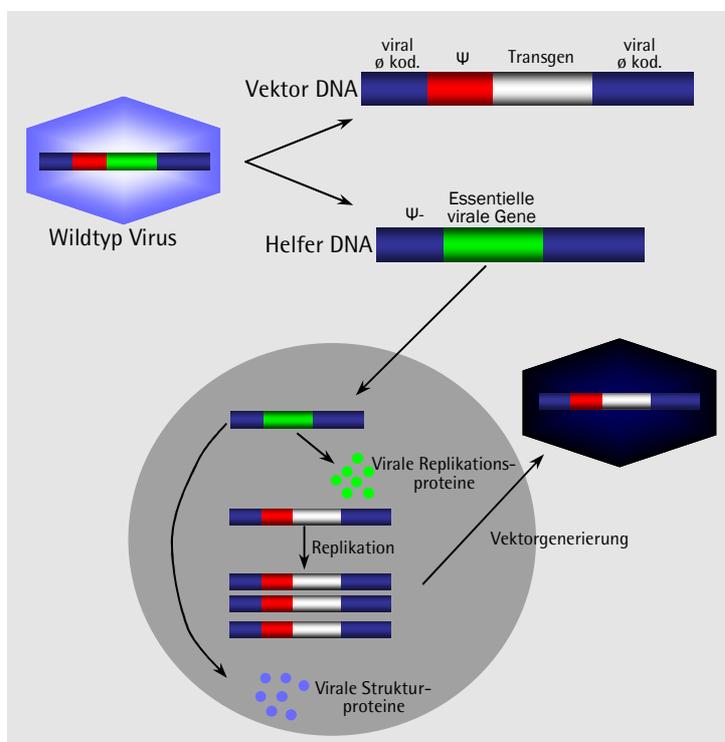


Abb. B6: Herstellung viraler Vektoren. Anstelle viraler Replikationsgene enthält die Vektor-DNA die therapeutische Expressionskassette. Die ebenfalls vorhandene Verpackungsdomäne Ψ sorgt für die Inkorporation in die Viruspartikel. Der Helfer-DNA, die die essentiellen Gene zur Vermehrung der Viren enthält, fehlt diese Domäne (Ψ^-). Somit kann sie nicht in den gentherapeutischen Vektor verpackt werden.

Ψ : Verpackungsdomäne, ø kod.: nicht kodierende virale Sequenz
(nach Kay et al., 2001)

Derzeit gibt es fünf Hauptklassen klinisch anwendbarer Vektoren (s. Tab. B1), die von Onkoretroviren, Lentiviren, Adenoviren, Adeno-assoziierten Viren (AAV) und Herpes simplex-1 Viren (HSV-1) abgeleitet werden (Thomas et al., 2003). Etwa 70 % der momentan durchgeführten Gentherapiestudien werden durch diese Virenklassen vermittelt (s. Abb. B4).

Tab. B1: Eigenschaften bestimmter viraler Vektoren.

* Replikationsdefizient; † HSV-1-Amplikon; § Helferabhängiges Virus, AAV: Adeno-assoziiertes Virus; dsDNA: doppelsträngige DNA; HSV-1: Herpes simplex-1 Virus; ssDNA: einzelsträngige DNA; (nach Thomas et al.; 2003)

Vektor	Genetische Information	Kapazität	Tropismus	Immuno-genität	Vektor-genom	Limitierende Faktoren	Vorteile
Retrovirus	RNA	8 kB	Teilende Zellen	Niedrig	Integriert	Transduktion ledigl. teilender Zellen; Insertionsmutagenese	Persistierender Gentransfer in teilende Zellen
Lentivirus	RNA	8 kB	Breites Spektrum	Niedrig	Integriert	Insertionsmutagenese möglich	Persistierender Gentransfer in viele Gewebe
HSV-1	dsDNA	40 kB* 150 kB†	Insbes. Neuronen	Hoch	Episomal	Immunogen; Transiente Transgen-expression in nicht-neuronale Zellen	Hohe Kapazität; starker Tropismus
AAV	ssDNA	< 5 kB	Breites Spektrum	Niedrig	Episomal Integriert	Geringe Kapazität	Nicht immunogen
Adenovirus	dsDNA	8 kB 30 kB§	Breites Spektrum	Hoch	Episomal	Capsid löst Immunabwehr aus	Hocheffiziente Transduktion

Mittels retroviralem Gentransfer erfolgte z.B. die Therapie der schweren angeborenen Immundefizienz *X-linked SCID-X1* (*X-linked severe combined immunodeficiency X1*). Sie gilt als eine der ersten erfolgreichen Gentherapien (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Hacein-Bey-Abina et al., 2002). *SCID-X1* bezeichnet das Fehlen der für die T- und B-Zellfunktion essentiellen γ -Ketten. Daraus resultiert eine absolute Immundefizienz, die auf Dauer nicht mit dem Leben vereinbar ist. Zur Therapie wurden CD34-positive Zellen *ex vivo* mit einem murinen Leukämievirus transduziert, der für intakte γ -Ketten kodiert. Anschließend wurden den Patienten die genetisch veränderten Zellen wieder transfundiert. Im Ergebnis entwickelten die Kinder ein funktionell adaptives Immunsystem. Allerdings erkrankten drei von elf Kindern an T-Zell-Leukämien, wobei eines an den entsprechenden Folgen verstarb (Glover et al., 2005; Check, 2005). Mindestens zwei der Leukämien waren auf die Insertion des viralen Vektors in die Region des *LIM domain only 2* (*LMO2*) Onkogens zurückzuführen. Dieses Integrationsereignis resultierte in der Aktivierung der *LMO2*-Expression und führte zur Überproliferation dieser Zellen (Kohn et al., 2003; Hacein-Bey-Abina et al., 2003a).

Neben der Gefahr der Insertionsmutagenese stellt auch die Immunogenität viraler Proteine ein ernsthaftes Problem dar (Thomas et al., 2003). Ein 18 Jahre alter Patient starb im Jahr 1999 an den Folgen eines adenoviralen Gentransfers. Der Patient litt an Ornithintranscarbamylase-Mangel (OTC-Mangel), einer X-chromosomal dominanten Erkrankung, die in einem Defekt der Harnstoffsynthese und einer Hyperammonämie resultiert (Wraith, 2001).

Die Therapie des OTC-Mangels erfolgte durch Injektion adenoviraler Vektoren, die für die cDNA des Enzyms kodierten, in die Arteria hepatica. 18 Stunden *post injectionem* entwickelte der Patient eine massive Immunreaktion gegen die Adenoviren, die innerhalb weniger Tage zum Tod führte (Thomas et al., 2003; Raper et al., 2003). Der Fall löste eine intensive Diskussion über Gentherapien aus (Hollon, 2000) und beschäftigte auch das amerikanische Justizministerium, das von den teilnehmenden Instituten hohe Geldstrafen forderte und die klinische Forschung der drei Studienleiter beschränkte (Couzin and Kaiser, 2005).

Es sind dies wohl die beiden prominentesten Fälle gentherapeutischer Nebenwirkungen, die die Notwendigkeit demonstrieren, die Gefahren der Insertionsmutagenese und Immunogenität von viralen Vektoren weiter zu erforschen (Kay and Nakai, 2003; Nakai et al., 2003; Russell, 2003; Wu et al., 2003; Glover et al., 2005).

B.2.2 Nicht-viraler Gentransfer (Transfektion)

Im Allgemeinen wird der Transfer genetischer Information in Eukaryonten als Transfektion bezeichnet. In Abgrenzung zur viralen Transduktion ist die Transfektion jedoch das Einbringen von Transgenen ohne die Zuhilfenahme von Viren. Eine Infektion der Zellen, wie sie beim viralen Gentransfer erfolgt, ist durch nicht-virale Methoden nicht möglich. Die aktive Aufnahme nicht-viraler DNA in die Zelle ist zudem ein überaus seltenes Ereignis. Aus diesem Grund ist das Ziel des nicht-viralen Gentransfers die kurzfristige Überwindung der Zellmembranbarriere, damit die DNA in das Zellinnere gelangen kann. Physikalische Methoden wie intravaskuläre Injektion, Biolistik, direkte zelluläre Mikroinjektion der DNA und Elektroporation werden heutzutage ebenso benutzt wie biochemische Methoden. Hier sei exemplarisch die Transfektion unter Zuhilfenahme von Polyethylenimin, Polyethylenglykolen sowie der durch kationische Peptide bzw. Lipide vermittelte liposomale Gentransfer genannt (Colosimo et al., 2000; Niidome and Huang, 2002; Glover et al., 2005).

B.2.2.1 Transfektion mittels physikalischer Methoden

Die Ausübung eines hohen hydrodynamischen Druckes während der intravaskulären Applikation großer Mengen von Plasmid-DNA kann den Übertritt der DNA-Moleküle aus dem Blutkreislauf in das Gewebe zur Folge haben. Im Tiermodell kann so durch Injektion der DNA z.B. in die Schwanzvene der Maus der Transfer der Plasmide in Muskelgewebe oder Hepatozyten erzielt werden (Olivares et al., 2002). Allerdings kann diese Methode in der gentherapeutischen Anwendung lediglich *in vivo* und nur dort erfolgen, wo ein kurzfristiger Druckanstieg herbeigeführt werden kann.

Auch ballistische Methoden, bei denen DNA-beschichtete Mikropartikel mit hoher Geschwindigkeit in das Zellinnere „geschossen“ werden, erscheinen *in vivo* lediglich für die Therapie von oberflächlichen dermatologischen oder ophthalmologischen Erkrankungen geeignet (Udvardi et al., 1999; Kochling et al., 2003; Wells, 2004).

Obwohl sehr präzise in der Applikation und effizient in der zellulären Transgenexpression, ist die Mikroinjektion von DNA in die Zellen eine sehr zeit- und materialaufwändige Methode, bei der die Zielzellen einzeln manipuliert werden müssen (Colosimo et al., 2000). Da eine Lokalisation der Stammzellen *in situ* kaum möglich ist, muss der Transfer von DNA in Stammzellen mittels Mikroinjektion *ex vivo* durchgeführt werden.

Mit der Methode der Elektroporation erfolgt die kontrollierte Applikation elektrischer Impulse auf die Zielzellen. Dies führt zu einer temporären Permeabilisierung der Zell- und Kernmembran, so dass Polynukleotide in das Zellinnere gelangen können (Gresch et al., 2004; Quenneville et al., 2004). Ursprünglich lediglich *in vitro* durchführbar, erlauben heute neuartige Elektroden eine regional begrenzte Anwendung auch *in vivo* (Bertoni et al., 2006). So sind Therapien lokaler Erkrankungen mittels gezielter DNA-Elektroporation inzwischen vorstellbar.

B.2.2.2 Transfektion mittels kationischer Polymere

Neben physikalischen Methoden gelingt es auch mittels biochemischer Strategien die nicht-virale DNA in das Zellinnere zu transferieren. Polyethylenimine (PEI) liegen entweder als lineare oder verzweigte Polymere vor (s. Abb. B7). Zum einen sind diese Moleküle positiv geladen, was zu einer effizienten Kondensation der negativ geladenen DNA führt, zum anderen enthalten sie viele protonierbare Aminogruppen (Glover et al., 2005). Diese sind bei neutralem pH-Wert nicht alle protoniert, erst bei Verringerung des pH-Wertes im endosomalen Kompartiment erfolgt die weitere Anlagerung von Wasserstoff-Ionen. Das hat eine osmotische Schwellung des Endosoms und dessen Ruptur zur Folge. Daraufhin erfolgt die Freisetzung der Plasmid-DNA in das Zytosol (Sonawane et al., 2003; Kichler, 2004).

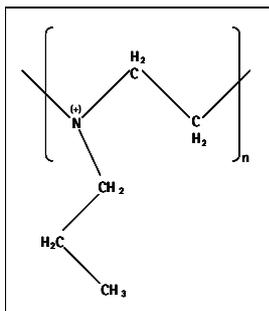


Abb. B7: Schematische Darstellung eines PEI-Moleküls.
PEI = Poly (N-propyl-ethylenimin)

Hiervon unterschieden werden kationische Peptide, die aus einer Folge von basischen Aminosäuren (wie etwa Polylysin) oder aus Chromatinkomponenten (wie Histonen oder Protamin) bestehen. Die gemeinsame Eigenschaft der kationischen Peptide ist ihre Fähigkeit, DNA in einer strukturierten Form, zumeist als sphärischer Komplex, zu binden (Glover et al., 2005). Die zelluläre Aufnahme der kationischen Peptid-DNA-Komplexe erfolgt endozytotisch durch ihre Interaktion mit membranständigen sulfatierten Proteoglykanen (Mislick and Baldeschwieler, 1996).

Liposomale Transfektion

Die Eigenschaften von Zellmembranen macht sich der Gentransfer mittels kationischer Lipide zunutze. Diese so genannte liposomale Transfektion exogener genetischer Information in eukaryontische Zellen wurde 1987 zum ersten Mal beschrieben (Felgner et al., 1987). Das hierbei verwendete Reagens N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)-Propyl]-N,N,N-Trimethylammoniumchlorid, kurz DOTMA genannt, besitzt drei wesentliche Merkmale. Es besteht aus zwei lipophilen Fettsäureketten, die über einen Propylrest mit einer positiv geladenen und hydrophilen Ammoniumgruppe verbunden sind (s. Abb. B8a). Damit handelt es sich um ein kationisches Molekül, das aufgrund seiner lipo- und hydrophilen Eigenschaften als amphipatisch bezeichnet wird.

Felgner legte damit den Grundstein für die Entwicklung weiterer kationischer liposomaler Transfektionsreagenzien, die sich in wässrigem Milieu spontan aneinanderlagern, da die hydrophoben Anteile bestrebt sind, sich von der Lösung weg zu orientieren. Dabei bilden sich Lipid-Doppelschichten ähnlich der *bilayer*-Struktur von Zellmembranen. Diese können sich Micellen-ähnlich zu dreidimensionalen Kugeln formen (s. Abb. B8b, c). Inkubiert man liposomale Transfektionsreagenzien zusammen mit DNA-Molekülen, die aufgrund ihrer Phosphatreste Polyanionen darstellen und deswegen hydrophile Eigenschaften haben, komplexiert das Reagens zusammen mit der DNA (s. Abb. B8d, e).

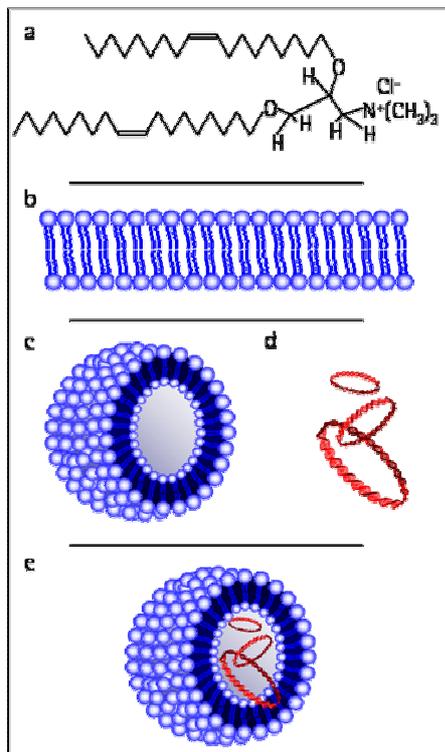


Abb. B8: Kationische Lipide. Darstellung liposomaler Transfektionsreagenzien in verschiedenen Dimensionen.

Das Reagens DOTMA ist hier beispielhaft für die in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien mit seiner Strukturformel (a), seiner 2D-Struktur (b) sowie 3D-Struktur (c) abgebildet. Polyanionische DNA-Moleküle in Form von linearer oder zirkulärer DNA (d) komplexieren zusammen mit dem amphipathischen Transfektionsreagens und bilden eine Micellen-ähnliche Struktur (e).

Quelle: eigene.

Der entscheidende Schritt ist nun die Aufnahme dieses als Lipoplex bezeichneten Liposomen-DNA-Komplexes in die Zellen (s. Abb. B9). Zum einen wird angenommen, dass durch die Ähnlichkeit des Lipoplexes mit dem Aufbau der Zellmembran dieser mit der zellulären Lipidmembran fusioniert, woraufhin die DNA in das Zellinnere gelangen kann (Felgner et al., 1987; Gershon et al., 1993). Zum anderen steht auch die endozytotische Aufnahme der Lipoplexe zur Diskussion (Zabner et al., 1995).

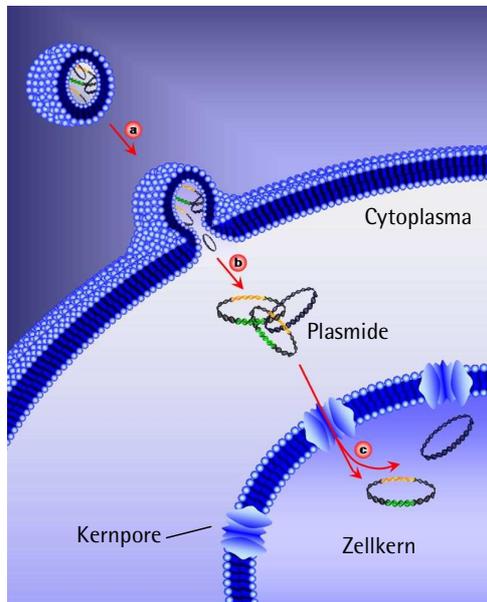


Abb. B9: Liposomale Transfektion.

Fusion des Lipid-DNA-Komplexes mit der Zellmembran bzw. Endozytose (a) und anschließende Inkorporation der DNA in die Zielzelle (b). Erst nach Transport der DNA in den Nukleus (c) kann die Transkription der auf der Fremd-DNA kodierten Gene beginnen.

Quelle: eigene.

Die Tatsache, dass die von den Zellen inkorporierte DNA zur Transkription der auf ihr kodierten Gene in den Zellkern gelangen muss, stellt einen limitierenden Faktor in der Effizienz der liposomalen nicht-viralen Transfektion dar (Luo and Saltzman, 2000; Wurtele et al., 2003). So ist die geringe Effizienz oftmals ein Hauptargument gegen den Einsatz nicht-viraler Methoden.

Insgesamt gesehen halten sich die Vor- und Nachteile des viralen gegenüber dem nicht-viralen Gentransfer die Waage. Nicht-virale Vektoren sind einfach in der Herstellung und kostengünstig in der Anwendung, sie haben eine große Kapazität und sind immunologisch verträglich. Virale Vektoren hingegen weisen eine hohe Transduktionseffizienz auf und können in einer lang anhaltenden Expression des Transgens resultieren. Zusammenfassend sind es jedoch die Nachteile, die den Einsatz der beiden Systeme in der Anwendung im klinischen Einsatz limitieren. Viren sind, wie bereits beschrieben, immunologisch bedenklich und durch die Gefahr der Insertionsmutagenese durchaus gefährlich. Nicht-virale Methoden zeigten sich in Gentherapiestudien häufig als zu wenig effizient, sowohl im Hinblick auf die Transfektionseffizienz *in vivo* als auch bezüglich ihrer lediglich kurz anhaltenden Expression. Eine wesentliche Eigenschaft erfüllen beide Vektorsysteme nicht. Ihnen fehlt die Fähigkeit zur nicht-mutagenen zielgerichteten Integration in das humane Genom, die ihrerseits die Voraussetzung für eine physiologisch regulierte und persistierende Transgenexpression darstellt.

B.2.3 Sequenzspezifisch gerichteter genomischer Gentransfer

Das Hauptziel der meisten Gentherapien besteht in der physiologisch verträglichen und anhaltenden Überexpression eines therapeutischen Gens in einer Zellart oder einem Zellverband, auch über die Zellteilung hinweg. Der Transfer dieser zusätzlichen genetischen Information sollte effizient und nebenwirkungsarm erfolgen. Diese Anforderungen werden bis dato weder von viralen noch von nicht-viralen Vektoren erfüllt. Dennoch sind Viren heutzutage das bevorzugte System, um den Gentransfer in klinischen Studien zu gewährleisten. Hierbei konnte eine effiziente und insbesondere persistierende Transgenexpression lediglich mittels retroviraler Vektoren, wie z.B. dem murinen Leukämievirus (MLV), erreicht werden (Hacein-Bey-Abina et al., 2002; Roesler et al., 2002). Diese integrieren ihre DNA in das Wirtsgenom, so dass das Transgen der regulären DNA-Replikation unterliegt und an die Tochterzellen weitergegeben wird.

Es wurde lange Zeit angenommen, dass die Integration ungerichtet und randomisiert in das Genom erfolgt. Da nur ein Bruchteil des Genoms aus kodierenden Sequenzen besteht, galt es so als unwahrscheinlich, dass die Integration der DNA in ein Wirtsgen erfolgt und damit die Expression eines Tumorsuppressors beeinträchtigt oder ein Onkogen aktiviert.

Allerdings zeigen neuere Studien, dass sowohl MLV als auch Lentiviren vornehmlich in transkriptionell aktive Regionen des Genoms integrieren. Dabei inseriert MLV bevorzugt innerhalb oder nahe von Promotoren (wie z.B. LMO-2), Lentiviren hingegen in transkriptionelle Einheiten wie dem BRCA1-Tumorsuppressorgen (Schroder et al., 2002; Woods et al., 2003; De Palma et al., 2005; Bester et al., 2006).

Diese so genannte Insertionsmutagenese kann verhindert werden, indem das Transgen zielgerichtet in „sichere“ genomische Regionen integriert wird – in Sequenzen also, die nicht mit der Tumorsuppression und damit einhergehend mit dem Zellzyklus in Verbindung stehen. Die einzigen bis dato bekannten Viren, die in der Lage sind, zielgerichtet in solche Sequenzen des Genoms humaner Zellen zu integrieren, sind Adeno-assoziierte Viren (AAV). Mit einer Frequenz von mehr als 70 % adressieren die nicht-pathogenen AAV mittels der so genannten Rep-Proteine eine spezifische Region auf Chromosom 19 (Huser et al., 2002). Obwohl sich diese Sequenz nahe des Gens TNNT1 befindet, welches für Troponin I kodiert und damit für die Muskelfunktion relevant ist, ist kein pathologischer Phänotyp mit einer Integration an dieser Stelle assoziiert (Dutheil et al., 2000). AAV wurden bereits in klinischen Gentherapiestudien eingesetzt (Manno et al., 2003). Da der Wildtyp der AAV jedoch lediglich Transgene mit einer Größe bis zu 5 kB verpacken kann (Dong et al., 1996) und aufgrund der Tatsache, dass manche Patienten neutralisierende Antikörper gegen AAV (Moskalenko et al., 2000) bilden, ist langfristig die erfolgreiche Verwendung dieses Gentherapievektors fraglich.

Doch auch nicht-virale Methoden des Gentransfers können so gesteuert werden, dass die Integration der DNA ohne schädliche Folgen in spezifische Orte des Genoms erfolgt (Glover et al., 2005). So kann man sich Mechanismen prokaryontischer Viren oder primitiver Eukaryonten zu

Nutze machen. Zum einen enthalten viele Hefen einen so genannten „2-micron circle“, dessen Überleben durch eine Rekombinase garantiert wird. Hier bindet die Rekombinase an zwei identische (bzw. invertierte) Erkennungsstellen und führt zu deren Rekombination (Som et al., 1988). Zum anderen existieren Bakteriophagen, die ihre DNA in spezifische Regionen des Bakteriengenoms integrieren. Diese Integration wird von einer sequenzspezifischen Rekombinase (SSR) vermittelt (s. Tab. B2).

Tab. B2: SSR mit möglicher Anwendung in der Gentherapie.

Die Φ C31 Integrase ist die derzeit am besten untersuchte SSR bezüglich vorhandener Pseudosequenzen, ihrer Spezifität und Effizienz. Die Rekombinasen Cre und Flp, sowie die Integrasen λ (λ Int), HK 022 und HP1 vermitteln entweder ebenso die Exzision und gelten als wenig effizient oder benötigen zusätzliche Kofaktoren. Lediglich die Integrasen R4 und TP901-1 ähneln in ihren Eigenschaften der Φ C31 Integrase (nach Glover et al, 2005 und Chalberg et al., 2005).

Die Zeichen (+) für „gering“ bis (+++) für „hoch“ spiegeln das Maß der Effizienz wieder, mit der die SSR in der Lage ist, in das Genom von Säugerzellen zu integrieren. n.bek: nicht bekannt

SSR	Pseudosequenzen in Säugerzellen	Spezifität der Integration	Effizienz in Säugerzellen	Reversibilität	Kofaktoren
Cre	Ja	0,12 %	+	Ja	Nein
Flp	n.bek.	n.bek.	+	Ja	Nein
λ Int	n.bek.	n.bek.	+	Nein	Ja
HK 022	n.bek.	n.bek.	+	Ja	Ja
HP1	n.bek.	n.bek.	n.bek.	Nein	Ja
R4	Ja	n.bek.	++	Nein	Nein
TP901-1	n.bek.	n.bek.	++	Nein	Nein
Φ C31	mind. 40 humane, 2 murine	7,5 % in 19q13.31, 24 - 56 % murin	+++	Nein	Nein

Hierbei führt das Enzym die Sequenzen in einer so genannten Synapse zusammen, katalysiert den Doppelstrangbruch und die Religation der so entstandenen vier freien Enden mit einem anderen Partner (Voziyanov et al., 1999). Diese Reaktion kann in einer Integration, einer Inversion oder Exzision resultieren (s. Abb. B10). Dies ist abhängig von der Position und Orientierung der Rekombinationsstellen, deren Interaktion mit der Rekombinase und dem Vorhandensein oder Fehlen von weiteren Hilfsfaktoren und Sequenzen (Thorpe and Smith, 1998).

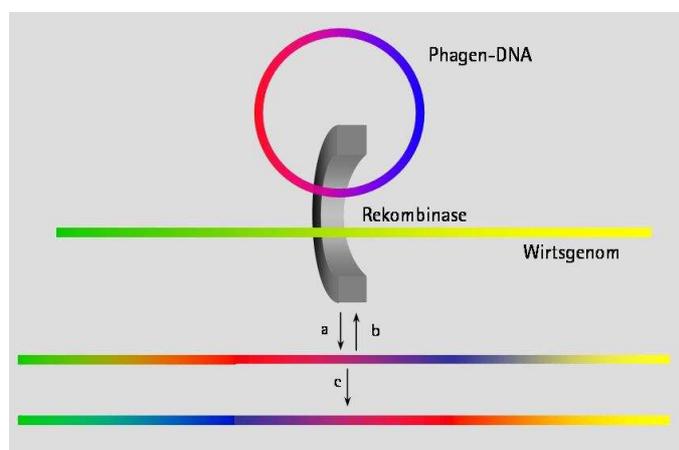


Abb. B10: Rekombination durch eine SSR.

Eine Rekombination zweier DNA-Sequenzen mittels einer Sequenzspezifischen Rekombinase (SSR) kann in einer Integration (a) oder einer Exzision (b) resultieren. Ebenso ist eine Inversion (c) bereits integrierter DNA möglich (nach Smith et al., 2004).

SSR aus prokaryonten Organismen werden in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt, in die Familien der λ Integrasen und der Resolvasen/Invertasen (Stark et al., 1992). Die durch λ Integrasen (wie z.B. λ Integrase, P1 Cre-*loxP*) katalysierte Reaktion beinhaltet die temporäre Anlagerung des Enzyms an spezifische DNA-Sequenzen mittels einer Phosphotyrosin-Bindung, die als *holliday junction* bezeichnet wird (Sauer and Henderson, 1988; Gopaul et al., 1998). Die λ Integrase erkennt hierbei unterschiedliche Sequenzen, zum einen die 25 bp lange chromosomale Rekombinationsstelle im bakteriellen Genom (*attachment site in the bacterium, attB*) und die 240 bp umfassende Sequenz des Phagen (*attachment site in the phage, attP*) (Thorpe and Smith, 1998). Es resultiert die Bildung von zwei Hybridsequenzen, die zum einen Teil aus bakterieller, zum anderen Teil aus Phagen-DNA bestehen und als linke bzw. rechte Rekombinationssequenz bezeichnet werden (*left and right attachment site, attL | attR*). Dabei haben alle Zielsequenzen eine 15 bp große Kernregion mit identischer Basenabfolge. Zur Integration wird ein zusätzlicher Faktor, der so genannte Integrationsfaktor des Wirts (*integration host factor*) benötigt, andere Kofaktoren wiederum zur Exzision (Thorpe et al., 2000).

B.2.3.1 Φ C31 Integrase

Im Gegensatz zu der durch die λ Integrasen vermittelten Rekombination, steht die durch die Familie der Resolvasen/Invertasen katalysierte Reaktion. Sie erfolgt durch Bildung einer Phosphoserinbindung des Enzyms mit den entsprechenden DNA-Sequenzen. Diese führt zu einem konzertierten Bruch der beiden Doppelstränge sowie deren Wiedervereinigung mit den gegensätzlichen Partnern (Stark et al., 1992). Die Rekombinationsstellen weisen in der Regel eine Kernregion von 2 bis 5 bp auf, zeigen jedoch darüber hinaus keinerlei direkte Sequenzhomologie. Für die vorliegende Arbeit relevant ist eine Subpopulation der Resolvasen/Invertasen, die so genannten großen Serin-Rekombinasen. Mit 50 - 80 kDa besitzen sie eine mehr als doppelt so große molekulare Masse wie die typischen Enzyme der Resolvase/Invertase-Familie. Darüber hinaus befindet sich ihre katalytische Domäne in der N-terminalen Region. Sie sind an der Sporenbildung, der Ausbildung von Heterozysten, der Exzision von Transposons und der Integration bzw. Exzision von Bakteriophagen genomem beteiligt (Thorpe and Smith, 1998). Einer dieser Bakteriophagen ist der Phage Φ C31, der den Wirt *Streptomyces coelicolor* infiziert. Die Fähigkeit des Phagen in das bakterielle Genom zu inserieren, wird durch dessen Integrase katalysiert. Sie erkennt eine ca. 34 bp große Nukleotidsequenz des bakteriellen Genoms (*attB*), führt diese mit der *attP*-Region (39 bp) der Phagen-DNA zusammen und bildet eine temporäre Protein-DNA-Bindung aus (Combes et al., 2002; Smith et al., 2004). Diese vollzieht exakt inmitten der Kernregion von 2 bp den Strangbruch und die Integration der Phagen-DNA in das Bakteriengenom (Smith et al., 2004). Die Φ C31 Integrase zeichnet sich durch Sequenzselektivität aus, die sich insbesondere in der unidirektionalen Reaktion der *attP*- mit der *attB*-Sequenz äußert und so lediglich zu einer Integration der Phagen-DNA führt, nicht jedoch zu deren Exzision. Sie benötigt keine zusätzlichen Faktoren, um die Reaktion zu vermitteln (Thorpe and Smith, 1998). Daher ist sie auch in anderen Bakterien, wie *E. coli* sowie auch in Säugerzellen ohne Zugabe weiterer Kofaktoren funktionell aktiv. Sie katalysiert auch dort die Rekombination zweier geeigneter Sequenzen (s. Abb. B11) (Groth et al., 2000).

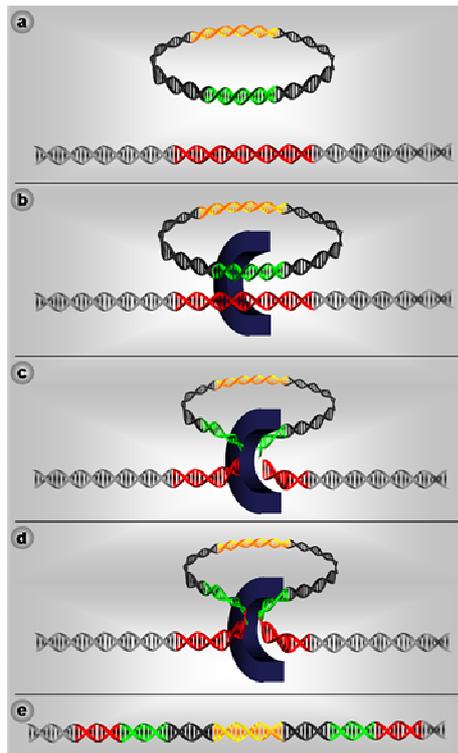


Abb. B11: Sequenzspezifische Rekombination durch die Φ C31 Integrase.

Phagen-DNA (ringförmig dargestellt) mit attP-Region (grün) und bakterielles Genom mit attB-Sequenz (rot) (a). Die SSR (schwarz) erkennt die beiden Rekombinationsstellen und führt sie zusammen (b). Nach Bildung einer kovalenten Protein-DNA-Bindung erfolgt der Doppelstrangbruch (c). Die SSR vermittelt die Rekombination, in diesem Fall die Integration der Phagen-DNA (d). Durch Integration entstehen die beiden Hybrid-Sequenzen attL (rot-grün) und attR (grün-rot) (e).

Quelle: eigene.

Da hier das Enzym jedoch aus seiner natürlichen Umgebung in andere Prokaryonten oder Zellen höherer Eukaryonten transferiert wird, ist davon auszugehen, dass keine genomische Rekombinationssequenz im entsprechenden Wirtsgenom vorliegt, die der *attP*- oder *attB*-Sequenz exakt gleicht. Eine zielgerichtete Integration könnte also nur dann erfolgen, wenn in einem ersten Schritt eine der Rekombinationsregionen im Wirtsgenom platziert wird, so dass in einem zweiten Schritt die Integrase vermittelte sequenzspezifische Rekombination stattfinden kann (Glover et al., 2005). Die primäre Integration könnte jedoch wiederum nur ungerichtet geschehen. Dieses Vorgehen im Rahmen von Gentherapien ist allerdings unpraktikabel. Demnach wird gefordert, dass eine Rekombinase in der Lage sein muss, endogene Rekombinationssequenzen zu erkennen, um so therapeutische Gene an einer definierten Stelle in das humane Genom zu integrieren.

Prima vista erscheint das natürliche Vorliegen solcher Sequenzen im humanen Genom unwahrscheinlich. Rein entwicklungsgeschichtlich gesehen haben sich SSR entwickelt, um die Rekombination in das Genom von Prokaryonten zu katalysieren, nicht aber in Zellen höherer Eukaryonten. Das humane Genom enthält jedoch Sequenzabschnitte, die eine partielle Identität mit der Rekombinationssequenz des Phagen Φ C31 und auch anderer prokaryonten Viren aufweisen (Thyagarajan et al., 2000). Je nach Größe der Erkennungssequenz kommen diese mit einer bestimmten statistischen Häufigkeit im humanen Genom vor. Es wird zudem diskutiert, dass diese Regionen ähnlich wie Transposons und Retrotransposons im Laufe der Evolution integriert wurden, ohne dass ihnen – zumindest bis dato – eine eindeutige Funktion zugeschrieben werden kann (Kazazian, Jr., 2004). So handelt es sich also bei vielen solcher Rekombinationsstellen des Genoms um definierte, jedoch degenerierte Sequenzen. Dies bedeutet, dass sie dem Teil des Genoms zugerechnet werden, der nicht für Proteine kodiert, und somit als „sicher“ bezeichnet werden können (Glover et al., 2005).

Die Φ C31 Integrase vermittelt die Rekombination humaner Pseudosequenzen, so genannter Pseudo-*attP*-Sequenzen mit der 320 bp umfassenden Rekombinationsstelle des Bakteriums *S. coelicolor*, kurz *attB* (Thyagarajan et al., 2001). Etwa 40 dieser Pseudo-*attP*-Sequenzen im humanen Genom sind derzeit untersucht (Chalberg et al., 2006). Zudem sind auch zwei Pseudosequenzen des murinen Genoms beschrieben, in welche die Φ C31 Integrase mit einer Frequenz von 24 – 56 % inseriert (Thyagarajan et al., 2001; Olivares et al., 2002). Das System der Φ C31 Integrase eignet sich daher insbesondere, um permanente genetische Modifikationen in das Genom höherer Eukaryonten einzuführen (Ortiz-Urda et al., 2002).

Der potentielle Nutzen der Φ C31 Integrase wurde bereits in mehreren Studien untersucht. So konnte gezeigt werden, dass das Enzym in der Lage ist, ein Plasmid, das neben einer Rekombinationsstelle die Sequenz des humanen Gerinnungsfaktor IX (Christmas-Faktor) enthielt, effizient in eine der murinen Pseudosequenzen zu integrieren. Das stabile Integrationsereignis führte auch nach 8 Monaten und partieller Leberresektion zu anhaltenden Plasmaspiegeln von Faktor IX (Olivares et al., 2002). Dieses Ergebnis ist viel versprechend, da angenommen wird, dass diese Spiegel ausreichen würden, um eine Hämophilie B (X-Chromosomal-rezessiv vererbter Mangel an Faktor IX) zu therapieren (Glover et al., 2005).

Darüber hinaus demonstrieren andere Studien die Integration auch sehr großer humaner Gene, wie dem humanen Kollagen VII (KOL7A1) mit 32 kB oder des Dystrophin-Gens mit 11 kB. Dies ist insofern von grundlegender Bedeutung, da die Kapazität von Viren oftmals nicht ausreicht, diese großen Gene zu verpacken.

So resultiert ein Defekt des KOL7A1 in einer dystrophischen Lyse des epidermalen Zellverbandes, der so genannten Epidermolysis bullosa (Epstein, Jr., 1992). Humane Keratinozyten von Patienten mit absolutem KOL7A1-Mangel wurden *ex vivo* mit dem KOL7A1-Gen transfiziert und anschließend immundefizienten Mäusen als Xenograft implantiert. Der Gentransfer führte in 16 von 25 Fällen (64 %) zur Integration des Transgens in die charakterisierte Pseudosequenz A auf Chromosom 8. Zudem erfolgte die korrekte und funktionale Expression des KOL7A1, die Ausbildung von Ankerfibrillen in der epidermalen Basalmembran und es zeigte sich eine histologisch vom Gesunden nicht unterscheidbare Gewebsstruktur (Ortiz-Urda et al., 2002). In ähnlicher Weise erfolgte die Untersuchung des Dystrophin-Gens. Dessen von der Φ C31 Integrase katalysierte Integration führte zur stabilen Expression in humanen und murinen Myoblasten und stellt damit einen möglichen Therapieansatz für die Muskeldystrophie vom Typ Duchenne dar (Quenneville et al., 2004; Bertoni et al., 2006).

Obwohl gerade die zielgerichtete Integration von Transgenen in das Genom humaner adulter Stammzellen wesentlich für zukünftige Gentherapien erscheint, fehlen dazu bislang die entsprechenden molekularen Analysen. Die Untersuchung der Funktionalität der Φ C31 Integrase in humanen mesenchymalen Stammzellen war daher ein wesentlicher Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

B.3 Fluoreszierende Proteine zur Zellfunktionsanalyse

Das Wissen über die Funktion biologischer Systeme beruht hauptsächlich auf Untersuchungsmethoden, die zelluläre und molekulare Prozesse qualitativ oder quantitativ visualisieren. Die hierzu oftmals verwendeten Chromophore absorbieren Licht einer bestimmten Wellenlänge und verleihen dem zu untersuchenden Stoff eine bestimmte Farbe, wie z.B. nach Enzymreaktion im *enzyme linked immunosorbent assay*, dem ELISA (Engvall and Perlman, 1971). Fluorophore hingegen sind funktionelle Gruppen von Molekülen, die erst nach Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge (Exzitation) Licht einer anderen, definierten Wellenlänge ausstrahlen (Emission) (Tavare et al., 2001).

Zur Analyse bestimmter zellbiologischer Vorgänge ist neben einer eindeutigen und deutlichen Emission eine hohe örtliche Auflösung nötig, die auch den Erhalt der Zellmorphologie voraussetzt (Zhang et al., 2002). Ein Beispiel hierfür ist die Anwendung von Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen ein bestimmtes Protein. Hierbei werden organische Farbstoffe mit einer Größe von weniger als 1 kDa an einen Antikörper gebunden. Diese so genannte Immunfluoreszenz erlaubt auch die Lokalisation auf subzellulärer Kompartimentebene. Allerdings müssen die Zellen hierzu fixiert und permeabilisiert werden (Giepmans et al., 2006). Die zeitliche Dimension eines Vorgangs in lebenden Zellen oder gar eines lebenden Organismus kann also mittels Immunfluoreszenz nicht untersucht werden (Chudakov et al., 2005). Erst durch die Entdeckung und Weiterentwicklung von fluoreszierenden Proteinen können zellbiologische Prozesse nicht nur in hoher örtlicher, sondern auch in zeitlicher Auflösung analysiert werden (Tsien, 1998).

Die Entdeckung des *green fluorescent protein* (GFP) aus der Quallenart *Aequorea victoria* und die Klonierung der kodierenden DNA setzten die Grundsteine für die Anwendung fluoreszierender Proteine in der Molekular- und Zellbiologie (Prasher et al., 1992; Shimomura et al., 1962). Hierfür erhielt O. Shimomura im Jahr 2008 zusammen mit M. Chalfie und R. Tsien den Nobelpreis für Chemie (Service, 2008).

GFP ist ein aus 238 Aminosäuren bestehendes Monomer mit einem Molekulargewicht von 26,9 kDa (Prasher et al., 1992). Elf β -Faltblätter bilden eine zylinderförmige Struktur, die in seiner Längsachse von einer α -Helix durchwunden ist (s. Abb. B12) (Yang et al., 1996a). Auf letzterer befindet sich der eigentliche Fluorophor des GFP, die Tripeptidsequenz Serin-Tyrosin-Glycin. In drei Reaktionsschritten erhält der Fluorophor seine sichtbare Fluoreszenz (Heim et al., 1994). Während des letzten Schrittes entsteht Wasserstoffperoxid, das durch Bildung von Sauerstoffradikalen eine potentiell toxische Wirkung auf die Zellen hat.

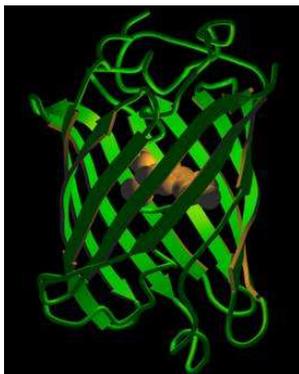


Abb. B12: Tertiärstruktur des *green fluorescent protein* (GFP).

GFP besteht aus elf β -Blättern (grün dargestellt) und einer zentralen α -Helix (orange dargestellt), die die für die Fluoreszenz verantwortliche Tripeptidsequenz beinhaltet (nach Yang et al., 1996).

In vivo erfolgt die Anregung des grün fluoreszierenden Proteins durch den Quallen-eigenen Fluorophor Aequorin, einem Protein, das durch Interaktion mit Calciumionen blaues Licht ausstrahlt. Da GFP keine anderen Kofaktoren als Sauerstoff benötigt, genügt *in vitro* die Exzitation mit blauem Licht der Wellenlänge von 488 nm, um eine Emission von grünem Licht der Wellenlänge 509 nm zu erreichen (Kain et al., 1995). So konnte gezeigt werden, dass die Expression von GFP in pro- und eukaryonten Organismen ohne Addition von Kofaktoren möglich ist (Chalfie et al., 1994).

Das Wildtyp-GFP hat in heterotropen biologischen Systemen jedoch mehrere unerwünschte Eigenschaften. Eine Rolle spielen z.B. eine schwache Proteinexpression, eine deutliche Zeitdifferenz zwischen dieser und der Lichtemission, eine relativ geringe Ausprägung der Fluoreszenz sowie die Bildung von nicht-fluoreszierenden Oligomeren (Yang et al., 1996b). Durch Mutagenese gelang es, die Intensität der Fluoreszenz um mehr als das 20-fache zu steigern. Unter anderem wurden hierzu die für GFP kodierenden DNA-Tripletts so verändert, dass sie den präferentiellen Codons der jeweiligen Spezies entsprachen (Chiu et al., 1996; Haas et al., 1996).

GFP ist jedoch lediglich ein Beispiel für eine große Anzahl von fluoreszierenden Proteinen, die zumeist von marinen Coelenteraten stammen und die durch Mutagenese qualitativ weiterentwickelt wurden (Giepmans et al., 2006). Sie unterscheiden sich hauptsächlich in Exzitations- und Emissionsmaxima, aber auch in Intensität, Halbwertszeit und Toxizität, so dass das Ziel der Untersuchung die Art des fluoreszierenden Proteins bestimmen sollte (Shaner et al., 2005; Thomas, 2007).

Die Anwendung fluoreszierender Proteine ist vielgestaltig. Sie erlauben die nicht-invasive Analyse biologischer Systeme von der Proteinexpression über seine Lokalisation, Wanderung, Protein-Protein-Interaktion sowie Aktivität in Zellen, Geweben oder Organismen (Chudakov et al., 2005). So kann die Aktivität von Promotoren ebenso untersucht werden, wie das Verhalten von Stammzellen im embryonalen und adulten Gewebe (Jiang et al., 2002; Hubner et al., 2003). Die Verwendung von GFP als Transgen in der vorliegenden Arbeit beruht auf diesen Eigenschaften und ist insbesondere vor dem Hintergrund der repetitiven mikroskopischen Analyse des Differenzierungsverhaltens der hMSC unter diversen Versuchsbedingungen wie etwa der liposomalen Transfektion anderen Markerproteinen überlegen.

C FRAGESTELLUNGEN UND ZIELE DER ARBEIT

Im Rahmen des vorliegenden Promotionsvorhabens sollte der nicht-virale Gentransfer in humane mesenchymale Stammzellen mittels liposomaler Transfektion von Reportergenen etabliert und optimiert werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die zielgerichtete Integration der transferierten DNA in bestimmte Regionen des humanen Genoms möglich ist.

Im Einzelnen sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- 1) Ist eine effiziente nicht-virale Transfektion von hMSC mittels liposomaler Transfektionsreagenzien möglich? Welche Bedingungen erlauben eine reproduzierbar hohe transiente Transfektionsrate?
- 2) Kann mittels liposomaler Transfektion eine stabile Integration der DNA in das Genom der hMSC erreicht werden?
- 3) Gelingt die stabile Transfektion von hMSC unter Erhalt des Stammzellcharakters? Hat die Integration der Fremd-DNA Einfluss auf das Proliferations- und/oder Differenzierungsverhalten der Zellen?
- 4) Ist die zielgerichtete Integration der transfizierten DNA in eine bestimmte Region des Genoms der hMSC möglich? Ist eine Kartierung des Integrationsortes durchführbar?

Die Beantwortung dieser Fragen sollte durch die folgenden wesentlichen Zielsetzungen erreicht werden:

1) Transiente Transfektion mittels liposomaler Transfektionsreagenzien

Zur Etablierung der liposomalen Transfektion nicht-viraler Vektoren in hMSC sollten drei verschiedene liposomale Transfektionsreagenzien verglichen werden. Basierend auf dem jeweiligen Transfektionsprotokoll sollte eine Optimierung verschiedener Parameter, wie z.B. Zelldichte, DNA- und Reagensmenge erfolgen, so dass eine möglichst effiziente Transgenexpression resultiert. Als Transgen sollten die GFP-Varianten EGFP und hrGFP komparativ analysiert werden, um eine Visualisierung der Transfektion mittels Mikroskopie an den vitalen Zellen über einen Zeitraum von mehreren Tagen vornehmen zu können.

2) Stabile Transfektion von humanen mesenchymalen Stammzellen

Basierend auf dem optimierten Transfektionsprotokoll für eine effiziente transiente Transgenexpression sollten stabil GFP-exprimierende hMSC generiert werden. Hierzu sollte ein Vektorsystem kloniert werden, das die Expression des Reportergens in Abhängigkeit von der Expression der Antibiotikums-Resistenz mit Hilfe des IRES-Systems erlaubt. Anschließend sollten die Selektionsbedingungen unter Kultivierung mit Antibiotika-haltigen Medien optimiert werden.

3) Kultur und Differenzierung stabil transfizierter hMSC

Um den Erhalt des Stammzellcharakters von stabil GFP-exprimierenden hMSC zeigen zu können, sollte deren Differenzierung innerhalb des mesodermalen Keimblattes in die osteo-, adipo- und chondrogene Richtung erfolgen. Zur Verifizierung sollte neben einer mikroskopischen Analyse der Zellmorphologie die differentielle Expression von Markergenen der jeweiligen Differenzierungslinie nachgewiesen werden. Zur Analyse der Langzeitexpression von GFP sollte zudem eine immunhistochemische Verifizierung der GFP-Expression erfolgen.

4) Zielgerichtete Integration von Transgenen in hMSC

Da die ungerichtete Integration von Vektoren in die chromosomale DNA der Zielzellen einen mutagenen Effekt haben kann, wie dieser auch bei bestimmten viralen Transduktionen bereits beschrieben wurde, sollte das Φ C31 Integrase-System, das eine gezielte Integration in das Genom von humanen Zellen erlaubt, auch in hMSC etabliert werden. Darüber hinaus sollte eine Verifizierung der durch die Integrase vermittelten ortsgerichteten genomischen Integration des Vektors auf Chromosom 8p erfolgen.

D MATERIAL UND METHODEN

D.1 Geräte und Materialien

D.1.1 Geräte

Abzugtisch	Medite, Burgdorf
Airflow	Köttermann, Ütze-Hänigsen
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
CO ₂ -Zellkulturbrutschrank, Typ IG150	Jouan, Unterhaching
Digital pH-Meter	Bachhofer, Reutlingen
Digital Still Kamera, MPEG Movie EX	Sony, Köln
Eismaschine	Tritec, Hannover
Elektrische Präzisionswaage	Kern&Sohn, Frommern
Flachbett-Gelelektrophorese-Apparatur, Modell B ₁	PeqLab, Erlangen
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (-80 °C)	GFL, Burgwedel
Geldokumentationssystem, Image Master VDS	Pharmacia Biotech, USA
Heizblock, HLC, BT 130-2	Medax Nagel GmbH, Kiel
Inverses Fluoreszenzmikroskop IX50	Olympus, Mikro-Optik, München
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlzentrifuge, Typ BR4i	Jouan, Unterhaching
LightCycler	Roche, Mannheim
Magnetrührer	Uni-Equip, Martinsried
Megafuge	Heraeus Instruments, Hanau
Mikrowellengerät (900 Watt)	Siemens, Fürth
Neubauer-Zählkammer	Plazotta, München
PCR-Multicycler PT-200	Biozym, Oldendorf
Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Routinemikroskop, Axiovert Typ S100	Zeiss, Jena
Schüttler, Rotamax 120	Heidolph, Schwabach
Sicherheitswerkbank, HeraSafe	Heraeus Instruments, Mannheim
Spannungsquelle, Consort E132	PeqLab, Erlangen
Sterilwerkbank	Biohit Antares, USA
Thermozykler, PCR-Sprint	Hybaid, Ashford, England
Tischzentrifuge Typ CT 4.22	Jouan, Unterhaching
Tischzentrifuge, Eppendorf Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Vakuum-Zentrifugal-Verdampfer Typ RC 10.9	Jouan, Unterhaching
Varioklav Dampfsterilisator	H&P, Oberschleißheim
Varipipetten, Gilson, Pipetman	Abimed, Langenfeld
Vortex-Genie	Scientific Industries, USA
Wasserbad mit Schüttelvorrichtung	Memmert, Schwabach
Wasserbad	GFL, Burgwedel

D.1.2 Materialien und Substanzen

Für molekularbiologische Ansätze wurde „Aqua ad injectabilia“ der Firma Braun, Melsungen verwendet. Wässrige Lösungen wurden mit Aqua dest. sowie Reinstwasser aus dem Reinstwassersystem der Wasseraufbereitung GmbH, Barsbüttel hergestellt.

Chemikalien

Ampicillin, Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Agar	BD Biosciences, USA
Bacto-Hefe-Extrakt	BD Biosciences, USA
Bacto-Trypton	BD Biosciences, USA
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	R&D Systems, Wiesbaden
DNA-Auftragspuffer, 6 ×	MBI Fermentas, Litauen
DNA-Auftragspuffer, 10 ×	Invitrogen, USA
DNA-Längenstandard, 100 bp Leiter	Invitrogen, USA
DNA-Längenstandard, 250 bp Leiter	Invitrogen, USA
DNA-Längenstandard, Nr. VII	Roche, Mannheim
DNA-Längenstandard, Nr. VIII	Roche, Mannheim
Ethanol abs.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Fluoresceindiacetat	Fluka, Schweiz
Glycerin "ultrapure"	Sigma, Deisenhofen
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
Methanol, 100 %	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natronlauge, 10 M	Apotheke Klinikum Innenstadt
Propidiumiodid	Merck, Darmstadt
Reverse Transkriptase Puffer	R&D Systems, Wiesbaden
Salzsäure, 2 M	Apotheke Klinikum Innenstadt
SeaKem LE Agarose	FMC BioProducts, USA
SeaKem GTG Agarose	FMC BioProducts, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
VenorGeM, PCR Mycoplasmen-Diagnostik Kit	Minerva Biolabs, Berlin

Enzyme, Inhibitoren und Kits

AMV-cDNA-Synthese Kit	Roche, Mannheim
BigDye Terminator v3.1	Applied Biosystems, USA
<i>Calf Intestinal Phosphatase</i>	Roche, Mannheim
DNase Set	Qiagen, Hilden
LC-Primer Set	Search-LC, Heidelberg
LC-SybrGreen Kit	Roche, Mannheim
QIAamp DNA Micro Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraktions Kit	Qiagen, Hilden
Reverse Transkriptase	R&D Systems, Wiesbaden
RNase Inhibitor	Ambion, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden

Substanzen für die Immunfluoreszenz

Anti-GFP Antikörper (<i>Mus musculus</i>)	Roche, Mannheim
Anti-Maus-IgG Antikörper konjugiert mit <i>Texas Red</i> (<i>Equus asinus</i>)	Dianova, Hamburg
Diaminophenylindol	MoBiTec, Göttingen
Eselserum, Blockierungsreagens	Biotrend, Köln
ProLong AntiFade Kit	Molecular Probes, USA

Substanzen für die Zellkultur

Dexamethason	Sigma, Deisenhofen
Fötale Kälberserum	Gibco, USA
Geneticin	Gibco, USA
IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthin)	Sigma, Deisenhofen
Insulin, bovines	Sigma, Deisenhofen
ITS <i>Liquid Media Supplement</i>	Sigma, Deisenhofen
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Lonza, USA
L-Prolin	Gibco, USA
MSC-Basalmedium	Lonza, USA
MSC- <i>Growth Supplement</i> (MCGS)	Lonza, USA
Natriumpyruvat	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Lonza, USA
<i>Phosphat Buffered Saline Solution</i> (PBS)	Gibco, USA
rhTGF- β -3	R&D-Systems, USA
Serumalbumin, bovines (Fraktion V)	Sigma, Deisenhofen
Serum-freies Medium, DMEM	Gibco, USA
β -Glycerolphosphat	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Gibco, USA
Trypsin/EDTA-Lösung	Lonza, USA

Weitere Materialien

0,5 ml Eppendorf Gefäße	Eppendorf, Hamburg
1,5 ml Eppendorf Gefäße	Eppendorf, Hamburg
15 ml Falkonröhrchen	Sarstedt, Nürnberg
50 ml Falkonröhrchen	Sarstedt, Nürnberg
Deckgläser für Neubauer Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Deckgläser, 24 × 60 mm	Roth, Karlsruhe
Deckgläser, rund, 15 mm Durchmesser	Roth, Karlsruhe
<i>Flasks-on-a-slide</i> (10 cm ²)	Nunc, USA
Kryokonservierungs-Röhrchen	Nalgene, USA
LightCycler Kapillaren	Roche, Mannheim
Pasteurpipetten	VWR International, Darmstadt
Petrischalen (Ø 92 mm)	Sarstedt, Nürnberg
Polystyrol Röhrchen, 5 ml	BD Falcon, USA
Quadriperm GT-Kulturschalen	Vivascience, Hannover
Sephadex G-25 Gelfiltrationssäulen	Amersham Biotech, Freiburg

Serologische Pipetten	Sarstedt, Nürnberg
Skalpelle, Fig. 10/11	Feather, Japan
Sterilfiltereinheiten	Nalgene, USA
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
UV-Küvetten	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturflaschen, 75 cm ² bzw. 25 cm ²	Nunc, USA
Zellkulturplatten, 6-, 12- und 96-Kavitäten	Nunc, USA
Zellschaber	Sarstedt, Nürnberg

D.1.2.1 Bakterienstämme, Nährmedien und Antibiotikallösungen

Bakterienstämme

E. coli TOP10 (Invitrogen, USA)

Genotyp: F⁻, mcrA, Δ(mrr-, hsdRMS-, mcrBC), Φ80lacZ ΔM15, ΔlacX74, recA1, deoR, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rspL, (Str^R), endA1, nupG

E. coli XL1-Blue MR (Stratagene, USA)

Genotyp: Δ(mcrA), 183 Δ(mcrCB-, hsdSMR-, mrr), 173 endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac

Nährmedien

Nährmedien wurden für die Dauer von 20 Minuten bei 121 °C unter einem Druck von $1,2 \times 10^5$ Pa autoklaviert. Hitzeinstabile Lösungen wurden durch Filtration (0,2 μm Porengröße) sterilisiert und den auf < 50 °C abgekühlten Nährmedien nach dem Autoklavieren zugesetzt. Zur Herstellung fester Nährmedien (Agarplatten) wurde den Medien vor dem Autoklavieren 15 g/l Bacto-Agar zugesetzt.

2 × YT-Medium:	16 g/l	Bacto-Trypton (Casein-Pepton, tryptisch verdaut)
	10 g/l	Bacto-Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl
SOC-Medium:	20 g/l	Bacto-Trypton (Casein-Pepton, tryptisch verdaut)
	10 g/l	Bacto-Hefeextrakt
	0,5 g/l	NaCl
	1,2 g/l	MgSO ₄
	0,95 g/l	MgCl ₂
	20 g/l	D(+)-Glukose

Antibiotikallösungen

Die beiden Antibiotika Ampicillin (200 mg/ml in 70 % Ethanol) und Kanamycin (100 mg/ml in H₂O) wurden als Stammlösungen aliquotiert bei -20 °C aufbewahrt. Die Zugabe zu den Nährmedien erfolgte bei einer Temperatur < 50 °C. Hierbei betrug die Endkonzentration des Ampicillins 200 μg/ml, die des Kanamycins 50 μg/ml.

D.1.2.2 Oligonukleotide

Tab. D1: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide.

Die Oligonukleotide M13 *forward* und M13 *reverse* stammen von der Fa. Invitrogen, USA. Alle weiteren Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg hergestellt.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
5'- <i>Mlu</i> I- <i>attB</i> -f-52	CGA CGC GTT TCG GCT TGG CTG TCG ACA TGC
3'- <i>Mlu</i> I- <i>attB</i> -r-359	GCA CGC GTT TCC AGG TAC CGT CGA CGA TGT
ps <i>attP</i> -f-30	GGA TAT GGG AGG CCA CAG TTG
Integration-r-400	TGC ATG GCC TCA TTT CCG TCT
Integration-2-f	ATG TAG GTC ACG GTC TCG AAG
M13 <i>forward</i>	GTA AAA CGA CGG CCA G
M13 <i>reverse</i>	CAG GAA ACA GCT ATG AC

D.1.2.3 Transfektionsreagenzien

Lipofectamine Plus

Invitrogen, USA

Lipofectamine 2000

Invitrogen, USA

METAFECTENE

Biontex, München

D.1.2.4 Plasmide

Plasmide sind extrachromosomale ringförmige DNA-Moleküle prokaryonter Organismen. Im ursprünglichen Sinne dienen sie so den Prokaryonten zur Konjugation, also der horizontalen Weitergabe von Genen. Die in der Molekularbiologie heutzutage verwendeten Plasmide sind gegenüber ihren Ursprungsformen stark verändert und den Bedürfnissen der gentechnologischen Fragestellungen angepasst. Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide näher erläutert.

D.1.2.4.1 pEGFP-N3

Das Plasmid pEGFP-N3 dient als Transfektionsmarker zur Generierung von stabilen Zelllinien mit Hilfe des Selektionsantibiotikums Geneticin. Zusätzlich vereinfacht es die Klonierung von N-terminalen Fusionsproteinen und erlaubt so deren Lokalisation *in vitro* und *in vivo*.

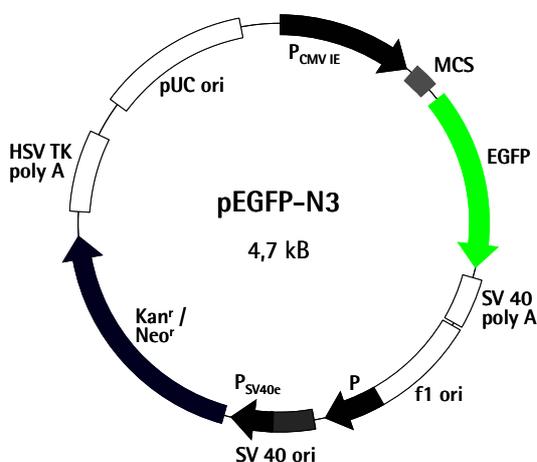


Abb. D1: Vektorkarte von pEGFP-N3.

P_{CMV IE}: Humaner Cytomegalievirus Promotor vom *immediate early*-Typ, EGFP: *enhanced green fluorescent protein*, SV40 poly A: Simian Virus 40 Polyadenylierungssignal, f1 ori: Einzelstrang-Replikationsursprung, SV40 ori: SV 40 Replikationsursprung, P_{SV40e}: früher SV40 Promotor, Kan^r/Neo^r: Kanamycin/Neomycin Resistenzgen, HSV TK poly A: Polyadenylierungssignal der Thymidinkinase des Herpes simplex Virus, pUC ori: Plasmid-Replikationsursprung, Gesamtgröße 4,7 kB

Das Plasmid pEGFP-N3 (s. Abb. D1) der Firma Clontech, USA beinhaltet die kodierende Sequenz einer weiterentwickelten Variante des Markerproteins *green fluorescent protein* (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria*. Neben zwei Aminosäuresubstitutionen (F64L, S65T) enthält sie zudem auch 190 stumme Basenaustausche, die ihrerseits der humanen Codonpräferenz entsprechen. In der Gesamtheit bewirkt dies eine Verstärkung sowohl der Fluoreszenz als auch der Expression dieser GFP-Variante. Daher resultiert der Name *enhanced green fluorescent protein* (EGFP). Sein Exzitationsmaximum liegt bei 488 nm, sein Emissionsmaximum bei 507 nm. Das EGFP steht unter der transkriptionellen Kontrolle des *immediate early promoter* des Cytomegalievirus. Dieser weist eine hohe und konstitutive Aktivität auf und wird in einer Vielzahl von eukaryontischen Zellen abgelesen. Stromabwärts des EGFP befindet sich das Polyadenylierungssignal des *Simian Virus 40*, das für die korrekte Prozessierung der EGFP-mRNA an ihrem 3'-Ende verantwortlich ist. Zwischen dem CMV-Promotor und der EGFP-Sequenz befindet sich eine so genannte *multiple cloning site* (MCS). In ihr sind mehrere singuläre Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen lokalisiert, so dass gewährleistet ist, dass die Konstruktion eines rekombinanten Plamids mit Hilfe dort schneidender Restriktionsendonukleasen spezifisch erfolgt. Gene die in diese MCS kloniert werden, werden als N-terminales Fusionsprotein mit EGFP exprimiert.

Zur Selektion prokaryontischer als auch eukaryontischer Zellen dient das Resistenzgen Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase (APH). Es phosphoryliert Aminoglykoside wie Kanamycin (Kan), Neomycin (Neo) oder das Neomycin-Analogon G418, auch bekannt unter dem Namen Geneticin. Ihr gemeinsames Wirkungsprinzip beruht auf der Interaktion mit der 30 S Untereinheit der Ribosomen. Dies resultiert in Translationsfehlern in der Proteinbiosynthese durch den Einbau falscher Aminosäuren, wodurch so genannte Nonsense-Proteine gebildet werden. Die APH wird in pEGFP-N3 als Kan/Neo-Resistenzgen bezeichnet, da die APH sowohl unter der Kontrolle eines eukaryontischen Promotors (*SV40 early promoter*) als auch eines prokaryontischen Promotors steht. Somit wird die Resistenz in Bakterien wie auch in Säugerzellen von derselben cDNA kodiert.

D.1.2.4.2 phrGFP-N1

Das Plasmid phrGFP-N1 dient als Transfektionsmarker, der die Generierung von Fusionsproteinen zu deren Lokalisation *in vivo* erlaubt.

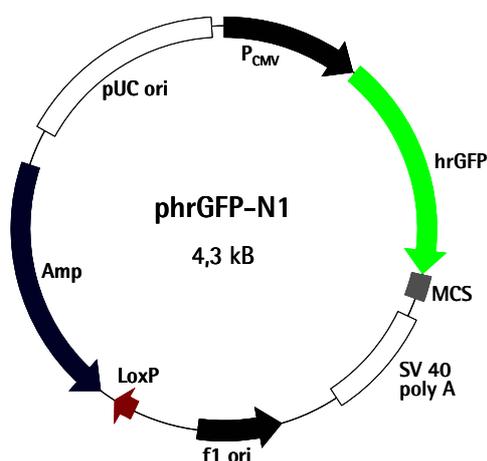


Abb. D2: Vektorkarte von phrGFP-N1.

P_{CMV} : Humaner Cytomegalievirus Promotor, hrGFP: *humanized recombinant green fluorescent protein*, MCS: *multiple cloning site*, SV40 poly A: Simian Virus 40 Polyadenylierungssignal, f1 ori: Einzelstrang-Replikationsursprung, LoxP: LoxP Rekombinationssequenz, Amp: Ampicillin-Resistenzgen (β -Lactamase), pUC ori: Plasmid-Replikationsursprung, Gesamtgröße 4,3 kB

Eine weitere Variante des GFP wird durch den Vektor phrGFP-N1 der Fa. Stratagene, USA kodiert (s. Abb. D2). Das so genannte hrGFP stammt ursprünglich aus dem marinen Organismus *Renilla reniformis*. Aus der Tatsache, dass auch hier stumme Basenaustausche durchgeführt wurden, die der humanen Codonpräferenz entsprechen, leitet sich der Name dieser GFP-Variante ab, nämlich *humanized recombinant* GFP oder hrGFP. Sein Exzitationsmaximum liegt bei 500 nm, der Emmisionsgipfel bei 506 nm. Entsprechend dem Plasmid pEGFP-N3 (s. D.1.2.4.1) wird die Initiation der Transkription durch den CMV Promotor und die 3'-Prozessierung durch das SV40-Polyadenylierungssignal vermittelt. Auch bei diesem Plasmid handelt es sich um einen Vektor, mit dem Fusionsproteine generiert werden können. Allerdings befindet sich die dazu benötigte MCS stromabwärts des hrGFP, so dass das in diese Stelle inserierte Gen am C-terminalen Ende des GFP lokalisiert wäre. Das Plasmid phrGFP-N1 beinhaltet das β -Lactamase-Gen, welches die Resistenz von prokaryontischen Organismen gegen Ampicillin vermittelt. Die Kombination von einem pro- und eukaryontischen Resistenzgen ist in diesem Fall nicht möglich, da Ampicilline nicht auf eukaryontische Zellen wirken können.

D.1.2.4.3 pEGFPLuc

Das Plasmid pEGFPLuc ist ein Markerplasmid, das sowohl die Bestimmung der Transfektionseffizienz durch Fluoreszenzmikroskopie des EGFP erlaubt, als auch eine Quantifizierung der Expression der Luziferase durch herkömmliche Luziferase-Assays möglich macht.

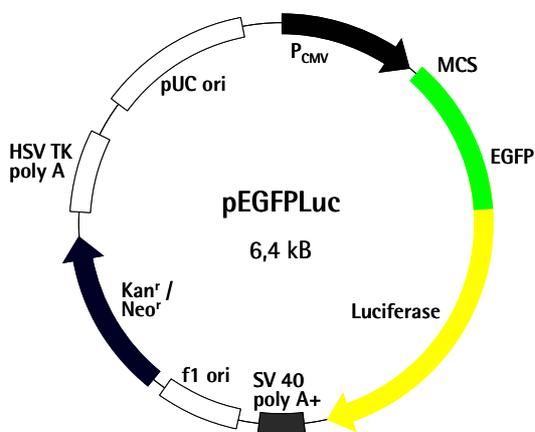


Abb. D3: Vektorkarte von pEGFPLuc.

P_{CMV}: Humaner Cytomegalievirus Promotor, MCS: *multiple cloning site*, EGFP: *enhanced green fluorescent protein*, SV40 poly A⁺: Polyadenylierungssignal des *Simian Virus 40*, f1 ori: Einzelstrang-Replikationsursprung, Kan^r/Neo^r: Kanamycin/Neomycin Resistenzgen, HSV-TK poly A: Polyadenylierungssignal der Thymidinkinase des Herpes simplex Virus, pUC ori: Plasmid-Replikationsursprung, Gesamtgröße 6,4 kB

Das Plasmid pEGFPLuc (Clontech, USA) kodiert eine Fusion des *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) mit dem Enzym Luziferase des Glühwürmchens *Photinus pyralis* (s. Abb. D3). Dabei wurde die Luziferase an den C-terminalen Teil des EGFP kloniert. Die transkriptionelle Kontrolle und die 3'-Prozessierung werden auch hier durch den Promotor des Cytomegalievirus bzw. das Polyadenylierungssignal des *Simian Virus 40* vermittelt. Die Kan/Neo-Resistenzkassette ermöglicht die Selektion in pro- und eukaryontischen Organismen (s. D.1.2.4.1).

D.1.2.4.4 pIRES2-EGFP

Bei dem Plasmid pIRES2-EGFP der Fa. Clontech, USA handelt es sich um ein Konstrukt, das eine interne Bindungsstelle für Ribosomen, kurz IRES (*internal ribosomal entry site*) genannt, des Enzephalomyokarditis-Virus enthält. Diese Sequenz erlaubt die Translation zweier offener Leserahmen von einer mRNA. Die Transkription der mRNA wird dabei durch den *immediate early* (IE) Promotor des Cytomegalievirus initiiert. Die korrekte Prozessierung am 3'-Ende wird durch das Polyadenylierungssignal des Simian Virus 40 gesteuert. Die vollständig prozessierte mRNA enthält nun – beginnend an ihrem 5'-Ende – eine *Cap*-Struktur, darauf folgend eine MCS, in die Gene ligiert werden können, die IRES-Sequenz und das EGFP, letzteres gefolgt von einer Poly-A-Sequenz (s. Abb. D4).

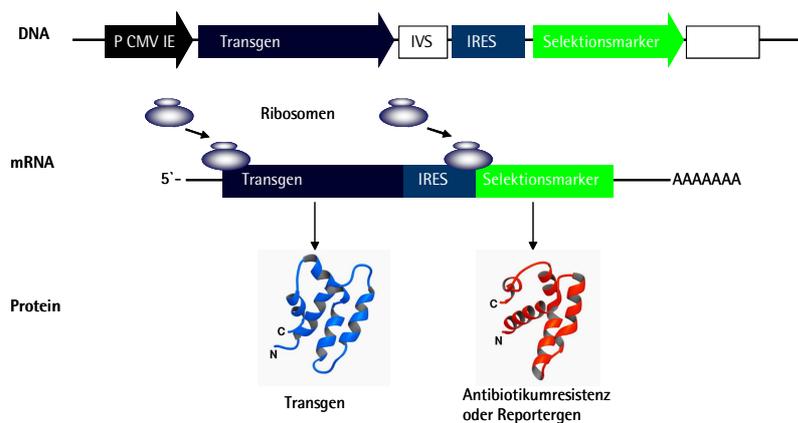


Abb. D4: Prinzip der IRES-vermittelten Translation.

Als Ribosomenbindungsstelle dient sowohl die *Cap*-Struktur am 5'-Ende als auch die IRES-Sequenz. Somit erfolgt die Proteinbiosynthese der beiden Gene unabhängig voneinander, die vorherige Transkription jedoch erfolgt gemeinsam. P_{CMV} IE: Humaner Cytomegalievirus *immediate early* Promotor, IVS: Interveninge Sequenz, IRES: *internal ribosomal entry site*.

Die 30S-Untereinheiten der Ribosomen können nun sowohl an das *Cap* am 5'-Ende der mRNA als auch an die IRES-Sequenz binden und die Proteinsynthese am jeweiligen AUG-Codon beginnen. Zwei voneinander unabhängige Gene werden so gemeinsam transkribiert, aber wieder unabhängig voneinander translatiert.

Daneben enthält dieses Plasmid zur Selektion in Bakterienkulturen als auch in Säugerzellen die für die APH kodierende Kan/Neo-Kassette (s. Abb. D5). Mit dem Plasmid pIRES2-EGFP kann somit sowohl die Transfektionseffizienz über Fluoreszenzmikroskopie (EGFP) bestimmt werden als auch eine Selektion derjenigen Zellpopulation mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS) vorgenommen werden, welche EGFP und somit auch das gewünschte Transgen exprimieren.

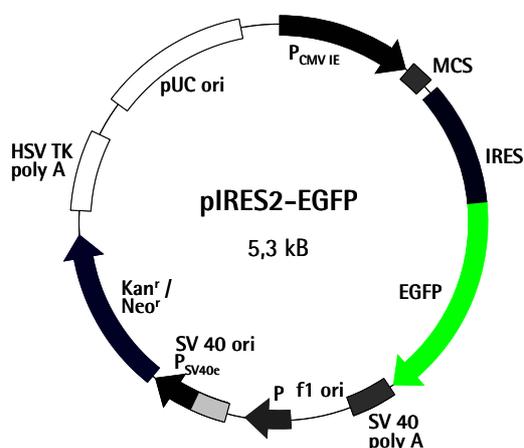


Abb. D5: Vektorkarte von pIRES2-EGFP.

P_{CMV} IE: Humaner Cytomegalievirus Promotor vom *immediate early*-Typ, MCS: *multiple cloning site*, IRES: *internal ribosomal entry site*, EGFP: *enhanced green fluorescent protein*, SV40 poly A: *Simian Virus 40* Polyadenylierungssignal, f1 ori: Einzelstrang-Replikationsursprung, SV40 ori: *SV 40* Replikationsursprung, P_{SV40e} : früher *SV40* Promotor, Kan^r/Neo^r: Kanamycin/Neomycin Resistenzgen, HSV TK poly A: Polyadenylierungssignal der Thymidinkinase des Herpes simplex, pUC ori: Plasmid-Replikationsursprung, Gesamtgröße 5,3 kB

D.1.2.4.5 pIRESneo2

Das Plasmid pIRESneo2 erlaubt die Selektion von Zellen, die sowohl das Resistenzgen gegen Geneticin tragen als auch damit einhergehend das inserierte Transgen exprimieren (s. Abb. D6).

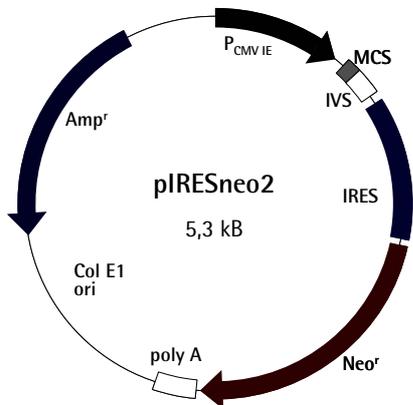


Abb. D6: Vektorkarte von pIRESneo2.

P_{CMV IE}: Humaner Cytomegalievirus Promotor vom *immediate early*-Typ, MCS: *multiple cloning site*, IVS: *Intervenierende Sequenz*, IRES: *internal ribosomal entry site*, Neo^r: Neomycin-Resistenzgen, polyA: Polyadenylierungssignal, ColE1 ori: *E. coli* Plasmid Replikationsursprung, Amp^r: Ampicillin-Resistenzgen (β -Lactamase), Gesamtgröße 5,3 kB

Das Plasmid pIRESneo2, bezogen von der Fa. Clontech, USA, enthält ebenfalls eine IRES-Sequenz. Sie befindet sich stromaufwärts der cDNA der Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase. Am 5'-Ende der IRES-Sequenz ist wiederum eine MCS lokalisiert, in die die gewünschten cDNA-Sequenzen ligiert werden können. Zusätzlich ist zwischen der MCS und der IRES-Sequenz ein synthetisches Intron, oder IVS (*intervening sequence*), eingebracht, das zur Stabilisierung der unprozessierten mRNA dient. Letztere steht unter der transkriptionellen Kontrolle des IE-Promotors des Cytomegalievirus. Das Polyadenylierungssignal stromabwärts der APH, verantwortlich für die korrekte Prozessierung des 3'-Endes der mRNA stammt vom bovinen Wachstumshormon. Eine für das β -Lactamasegen kodierende Kasette sorgt für die Möglichkeit der Selektion in prokaryonten Organismen.

D.1.2.4.6 pCR2.1-TOPO

Der Vektor pCR2.1-TOPO dient der einfachen und effizienten Ligation von PCR-amplifizierten Sequenzen und zugleich der Steigerung der Kompatibilität zur weiteren Klonierung dieser Sequenzen in andere Vektoren.

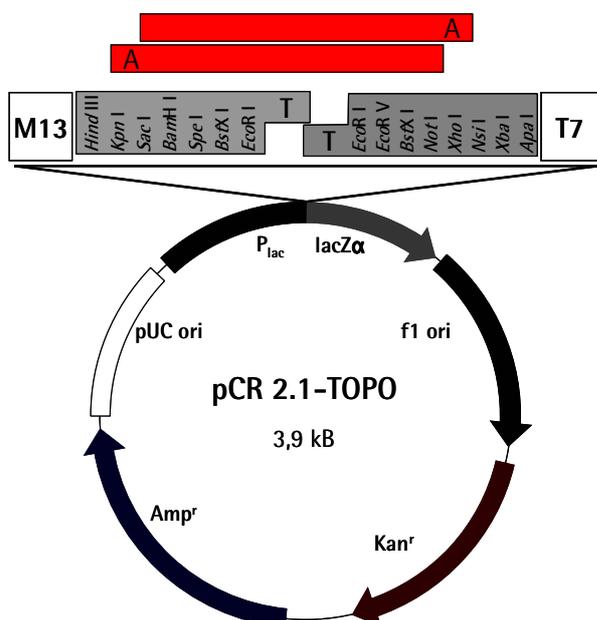


Abb. D7: Vektorkarte von pCR2.1-TOPO.

P_{lac}: Promotor des *lac*-Operons, lac α : β -Galaktosidase Reportergen, f1 ori: Einzelstrang-Replikationsursprung, Kan^r: Kanamycin-Resistenzgen, Amp^r: Ampicillin-Resistenzgen (β -Lactamase), pUC ori: Plasmid-Replikationsursprung, Gesamtgröße: 3,9 kB. M13: M13 Bindungsstelle für den M13 *forward* Primer, T7 Bindungsstelle für den T7 *reverse* Primer bzw. M13 *reverse* Primer.

Der Vektor pCR2.1-TOPO der Fa. Invitrogen, USA ermöglicht die so genannte TOPO-TA-Klonierung, bei der durch die Taq-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte in den oben genannten Vektor ligiert werden können. Das Prinzip der TOPO-TA-Klonierung beruht auf der Tatsache, dass die Taq-Polymerase einerseits eine matrizenunabhängige terminale Transferaseaktivität besitzt, wodurch einzelne Desoxyadenosin-Moleküle an die 3'-Enden der PCR-Produkte angefügt werden. Andererseits sind an den 5'-Enden des linearen Vektors überhängende Desoxythymidin-Moleküle angebracht. Die somit kompatiblen Sequenzen können nun mittels einer an die 3'-Phosphatreste des linearen Vektors gebundenen Topoisomerase effizient und zeitsparend ligiert werden. Stromauf- und abwärts der so in den Vektor ligierten Sequenz befinden sich zahlreiche Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen, die ein Vielfaches an Möglichkeiten bieten, das PCR-Amplifikat wieder aus dem Vektor zu schneiden und in andere Vektoren zu ligieren (s. Abb. D7). Ebenfalls stromauf- bzw. abwärts sind Bindungsstellen für Standard-Primer lokalisiert, die eine Sequenzierung der klonierten Fragmente erlauben. Zusätzlich beinhaltet der Vektor die zuvor bereits beschriebenen Resistenzgene gegen Ampicillin und Kanamycin.

D.1.2.4.7 pCMV-Int

Das Plasmid pCMV-Int wurde von Frau Prof. Dr. Michele Calos (*Genetics Department, Stanford University, USA*) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Dieses Konstrukt erlaubt die Expression der Integrase des Phagen Φ C31 zur zielgerichteten Integration entsprechender Vektoren (s. Abb. D8). Die Initiation der Transkription der Integrase wird durch den oben bereits beschriebenen CMV-Promotor vermittelt, die korrekte 3'-Prozessierung durch das Polyadenylierungssignal des Simian Virus 40. Zur Selektion in Bakterienkulturen befindet sich auf dem Vektor eine Kasette, die für die β -Lactamase kodiert.

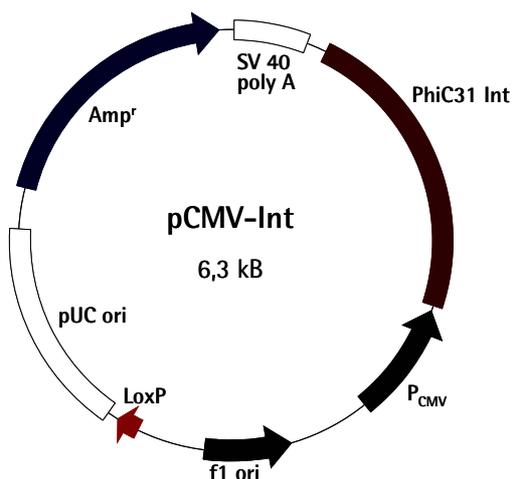


Abb. D8: Vektorkarte von pCMV-Int.

P_{CMV} : Humaner Cytomegalievirus Promotor, PhiC31 Int: Integrase des Phagen PhiC31, SV40 polyA: Polyadenylierungssignal, Amp^r : Ampicillin-Resistenzgen (β -Lactamase), pUC ori: Plasmid Replikationsursprung, LoxP: LoxP Rekombinationssequenz, f1 ori: Einzelstrang-Replikationsursprung, Gesamtgröße 6,3 kB

D.1.2.4.8 pTA-*attB*

Das Plasmid pTA-*attB* wurde ebenfalls von Prof. Calos bereitgestellt. Hierbei handelt es sich um das Grundgerüst des Klonierungsvektors pCR2.1TOPO (s. D.1.2.4.6). Er beinhaltet zusätzlich eine Sequenz aus dem Genom des Bakteriums *Streptomyces coelicolor*, in den der Phage Φ C31 mit Hilfe seiner Integrase integrieren kann (s. Abb. D9). Diese Sequenz wird als bakterielle Bindungsstelle oder kurz *attB* (*attachment site in the bacterium*) bezeichnet.

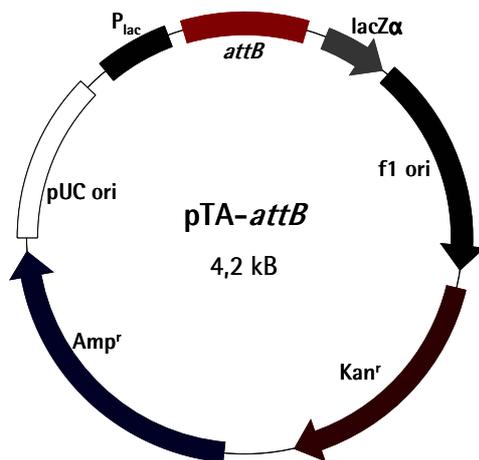


Abb. D9: Vektorkarte von pTA-*attB*.

attB: bakterielle Bindungsstelle, lac α : β -Galaktosidase Reporter-gen, f1 ori: Einzelstrang-Replikationsursprung, Kan^r: Kanamycin-Resistenzgen, Amp^r: Ampicillin-Resistenzgen (β -Lactamase), pUC ori: Plasmid-Replikationsursprung, P_{lac}: Promotor des *lac*-Operons, Gesamtgröße: 4,2 kB

D.2 Methoden

D.2.1 Molekularbiologie

D.2.1.1 Anzucht und Stammhaltung von *Escherichia coli*

Prinzip

Der häufige Einsatz des Bakteriums *E. coli* im Rahmen molekularbiologischer Untersuchungen beruht auf dessen einfacher Handhabung und schneller Vermehrung. Auch seine Aufnahmefähigkeit für eine Vielzahl von verschiedenen Vektoren und ein breites Spektrum an genetisch genau definierten Stämmen spielt dabei eine entscheidende Rolle. Bakterienkulturen dienten in der vorliegenden Arbeit der Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen in Vektoren und deren Isolation aus diesen prokaryontischen Wirtszellen. Im Folgenden werden die Kultivierungsbedingungen dieses gramnegativen Bakteriums genauer erläutert.

Durchführung

Bakterienstämme in Form von Verdünnungsausstrichen, hergestellt durch einen 3-Ösen-Ausstrich oder mit Hilfe eines sterilen Drzygalski-Spatels, wurden nach der Bebrütung maximal 6 Wochen bei 4 °C aufbewahrt. Gegebenenfalls wurde dem Agarmedium zuvor das entsprechende Selektionsantibiotikum zugegeben. Eine über diesen Zeitraum hinausgehende Konservierung erfolgte durch Ansetzen einer Glycerinstammkultur aus einer Einzelkolonie. Hierfür wurden 850 µl einer Übernachtskultur mit 150 µl Glycerin ($c_{\text{Glycerin}} = 0,15 \text{ v/v}$) versetzt und bei -80 °C aufbewahrt. Bakterienkulturen wurden entweder direkt aus Verdünnungsausstrichen oder aus Glycerinstammkulturen angeimpft. Zur nachfolgenden analytischen Präparation von Plasmiden aus Bakterienkulturen betrug das Kulturvolumen 5 ml, zur präparativen Isolierung der Plasmide 100 ml. Erlaubte das zu amplifizierende Plasmid die Selektion durch ein Antibiotikum, wurde dies in einer Konzentration von 200 µg/ml (Ampicillin) bzw. 50 µg/ml (Kanamycin) zugegeben. Sowohl die entsprechende Menge 2 × YT-Medium als auch die verwendeten Reagenzgläser (für 5 ml) bzw. 250 ml-Erlenmeyerkolben wurden zuvor autoklaviert. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C mit 250 Upm geschüttelt. Die Bakterienernte erfolgte mittels Zentrifugation in 15 ml- bzw. 50 ml-Falkonröhrchen (3000 × g, 4 °C, 15 Minuten).

D.2.1.2 Herstellung kompetenter Zellen

Prinzip

Als Zellkompetenz bezeichnet man die Fähigkeit einer Zelle, DNA aufzunehmen und diese in das eigene Genom zu integrieren bzw. extrachromosomal zu replizieren. Bei der in dieser Arbeit angewandten Technik zur Herstellung kompetenter *E. coli* handelt es sich um eine vereinfachte Variante des Protokolls, das von Cohen *et al.* im Jahre 1972 publiziert wurde. Die Transformationseffizienz der so präparierten Bakterien beträgt 5×10^6 bis 2×10^7 transformierter Kolonien pro Mikrogramm eingesetzter Plasmid DNA. Die Bakterien werden dazu in einer eiskalten Lösung aus Calciumchlorid und Magnesiumchlorid inkubiert, wodurch die Zellen zur Aufnahme von Plasmid DNA kompetent gemacht werden.

Durchführung

Die *E. coli*-Stämme wurden auf 2 × YT-Agarplatten vereinzelt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde daraufhin mittels einer sterilen Pipettenspitze in 100 ml 2 × YT-Medium in einem 250 ml Erlenmeyerkolben transferiert. Die Kultur wurde nun für 3 Stunden bei 37 °C und 250 Upm inkubiert, wobei alle 20 Minuten die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) photometrisch bestimmt wurde. Sobald die Kultur eine OD_{600} von über 0,4 erreicht hatte, wurde sie in zwei eiskalte 50 ml-Falkonröhrchen überführt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen 10 Minuten bei 2700 × *g* zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Bakteriensediment überkopf kurz getrocknet, um alle Mediumreste zu entfernen. Das Sediment wurde nun in 30 ml eiskalter $MgCl_2/CaCl_2$ -Lösung (80 mM $MgCl_2$, 20 mM $CaCl_2$) resuspendiert und vorsichtig geschwenkt. Nach erneuter Zentrifugation unter obigen Bedingungen wurden das Medium wiederum abgenommen und die sedimentierten Bakterien in 2 ml einer 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Nun wurden 140 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben, die Suspension vorsichtig vermischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die so generierten kompetenten Zellen à 50 µl in sterilen 1,5 ml-Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt bzw. sofort für die Transformation verwendet.

D.2.1.3 Transformation

Prinzip

Eine Methode, mit deren Hilfe Plasmide in den Intrazellularraum von Bakterien gelangen und dort sowohl exprimiert als auch repliziert werden können, ist die chemische Transformation. *E. coli*, die mit der in D.2.1.2 beschriebenen Methode behandelt und nach Zugabe von Plasmid-DNA kurz auf eine Temperatur von 42 °C erhitzt werden, sind so imstande, diese aufzunehmen.

Durchführung

Dazu wurden die frischen oder bei -80 °C gelagerten Aliquots kompetenter *E. coli* (s. D.2.1.2) auf Eis aufgetaut. Nach Zusatz von 1 ng Plasmid-DNA wurde die Suspension vorsichtig gemischt und 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Lösung wurde nun 90 Sekunden in einem Wasserbad auf 42 °C erhitzt. Nach Ablauf der 90 Sekunden wurde das Zell-DNA-Gemisch sofort wieder auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium (Raumtemperatur) wurde das 1,5 ml Reaktionsgefäß fest verschlossen und 1 Stunde bei 37 °C und 250 Upm geschüttelt. 50 µl des Ansatzes wurden nun auf vorgewärmte Petrischalen mit 2 × YT-Agar gegeben, der das auf dem Plasmid kodierte und zur Selektion nötige Antibiotikum in der gewünschten Konzentration enthielt. Nach kurzer Zentrifugation des verbliebenen Ansatzes bei 2700 × *g* wurden 200 µl des Überstandes verworfen, die sedimentierten Bakterien in den restlichen 50 µl Medium resuspendiert und auch dieser Ansatz auf eine 2 × YT-Agar-Petrischale mit Hilfe eines sterilen und abgeflamten Drzygalski-Spatels ausplattiert. Die Bakterienkulturen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert, so dass gewachsene Einzelkolonien zur weiteren Verwendung gepickt werden konnten.

D.2.1.4 Analytische Plasmidpräparation

Prinzip

Die Plasmidpräparation zur Analyse des transformierten Plasmids beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterienkultur, gefolgt von der selektiven Bindung der Plasmid-DNA an eine Anionen-Austausch-Säule unter Niedrigsalz-Bedingungen. In mehreren Waschschrritten erfolgt die Abtrennung von RNA, Proteinen und niedermolekularen Stoffen durch einen Puffer mittlerer Salzkonzentration, woraufhin die Plasmid-DNA in Hochsalz-Puffer eluiert wird. Die DNA wird anschließend durch eine Isopropanolfällung entsalzt und ankonzentriert. Eine nachfolgende Ethanolbehandlung dient ebenfalls der Entsatzung und sorgt für eine leichtere Löslichkeit der DNA in Wasser.

Durchführung

Entsprechend der Anzahl der zu untersuchenden Einzelkolonien wurden jeweils 5 ml $2 \times$ YT-Medium unter sterilen Bedingungen in Reagenzgläser pipettiert. Das Medium wurde zuvor mit dem notwendigen Selektionsantibiotikum (50 µg/ml Kanamycin bzw. 200 µg/ml Ampicillin) versetzt. Von einer Selektionsagarplatte wurden daraufhin unter sterilen Bedingungen und unter Zuhilfenahme einer sterilen Pipettenspitze Einzelkolonien gepickt, diese auf eine frische Selektionsagarplatte überimpft, und die Pipettenspitze anschließend in die Reagenzgläser abgeworfen. Die mit einer luftdurchlässigen Kapsenberg-Kappe versehenen Reagenzgläser wurden nun über Nacht bei 37 °C und 250 Upm geschüttelt. Ein Reagenzglas mit der entsprechenden Menge an mit Antibiotikum versetztem $2 \times$ YT-Medium diente als Kontrolle. Sollte sich auch in diesem Reagenzglas das Wachstum einer Bakterienkultur (ersichtlich durch die Trübung des ansonsten klaren Mediums) zeigen, wurden die Proben verworfen. Andernfalls wurden die Bakterienkulturen in je ein steriles 15 ml-Falkonröhrchen überführt und bei 4 °C und $3000 \times g$ für 15 Minuten zentrifugiert. Nach vorsichtiger Abnahme des Überstandes wurden die Bakteriensedimente in 300 µl Lösungspuffer resuspendiert und zugleich in je ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Der Lösungspuffer enthielt RNase A, durch die der Abbau von bakterieller RNA vermittelt wurde. Durch Zugabe eines Volumenteils eines SDS- und NaOH-haltigen Puffers, mehrmaligem invertieren der Lösung und fünfminütiger Inkubation, wurden die Bakterien lysiert. Es folgte die Neutralisierung der Lösung durch Zugabe von 300 µl eines Kaliumacetat-Puffers. Ein vollständiges Mischen der Lösungen wurde durch mehrmaliges invertieren gewährleistet. Daraufhin wurden die Reaktionsgefäße 5 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei maximaler Geschwindigkeit ($16.100 \times g$) 10 Minuten zentrifugiert. Zwischenzeitlich wurde die nötige Anzahl von *QIAGEN-tip 20* Filtrationssäulen mit 1 ml eines Niedrigsalz- und Isopropanol-haltigen Puffers äquilibriert. Der Überstand wurde nun auf die Säulen gegeben und letztere anschließend viermal mit je 1 ml eines Puffers mittlerer Salzkonzentration gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 800 µl eines hochsalzhaltigen Puffers. Durch Zugabe von 0,7 Volumenteile (VT) Isopropanol und Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit erfolgte eine erste Fällung der Plasmid-DNA. Nachdem der Überstand vorsichtig abpipettiert worden war, wurde das DNA-Sediment in 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand abgenommen, die Plasmid-DNA fünf Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet und

in 20 µl hochreinem Wasser vorsichtig resuspendiert. 2 µl dieser Lösung wurden in 98 µl Wasser gegeben und diese Verdünnung photometrisch bei einer optischen Dichte von 260 nm vermessen. Als Leerwert wurde das Wasser herangezogen, mit dem auch die Verdünnung der Originallösung durchgeführt worden war. Es wurde darauf geachtet, dass die Ratio $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ zwischen 1,7 und 2,0 lag, so dass von einer proteinfreien DNA-Lösung ausgegangen werden konnte.

D.2.1.5 Restriktionsanalyse

Prinzip

Unter dem Begriff Restriktionsanalyse versteht man die selektive Spaltung von DNA-Fragmenten zur Überprüfung ihrer Sequenzidentität. Im Falle der Plasmidpräparation kann so sichergestellt werden, dass das entstandene Produkt einerseits die erwartete Anzahl an Nukleotiden aufweist und zum anderen nicht durch andere DNA-Sequenzen verunreinigt ist. Dazu wird der Vektor entweder linearisiert oder eine definierte Sequenz aus dem Vektor geschnitten. Die Linearisierung wird mittels einer Restriktionsendonuklease (RE) durchgeführt, die Exzision einer Sequenz erfolgt entweder durch ein RE, welche zwei Erkennungsstellen bindet oder durch zwei unterschiedliche RE. Diese Typ II Restriktionsendonukleasen spalten innerhalb spezifischer und zumeist palindromischer dsDNA-Erkennungssequenzen die Phosphodiesterbindungen in beiden Strängen an definierter Position. Hierbei wird unterschieden zwischen Enzymen, die zu einem 3'- oder 5'-Überhang führen (*sticky end*) und solchen, deren Spaltung keinen Nukleotidüberhang generiert (*blunt end*).

Die Enzymaktivität von Restriktionsendonukleasen wird in *Units* angegeben. Eine *Unit* ist definiert als die Menge an Enzym, die nötig ist, um 1 µg DNA des Phagen Lambda in 1 Stunde unter optimalen Reaktionsbedingungen zu spalten. So berechnet sich also die Anzahl der nötigen *Units* wie folgt:

$$\frac{\text{Nukleotidlänge des } \lambda\text{-Phagen (bp)}}{\text{Nukleotidlänge des Substrats (bp)}} \times \frac{\text{Schnittstellen der RE im Substrat}}{\text{Schnittstellen der RE im } \lambda\text{-Phagen}} = \text{benötigte Units}$$

Durchführung

Restriktionsanalysen wurden unter den von den Herstellern der Enzyme, der Fa. Roche, Mannheim und New England Biolabs, USA empfohlenen Pufferbedingungen und optimalen Reaktionstemperaturen durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug dabei mindestens eine und maximal 2 Stunden. Zur Analyse wurde 1 µg DNA eingesetzt. Die Anzahl der benötigten *Units* des jeweiligen Restriktionsenzym wurde nach obiger Formel errechnet und nach Zugabe des entsprechenden Puffers ebenfalls der Reaktion zugegeben.

D.2.1.6 Agarosegel-Elektrophorese

Prinzip

Die Elektrophorese mittels Agarosegelen wird in der Molekularbiologie zur Separierung, Identifizierung und Isolierung von DNA-Fragmenten verwendet. Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass die Gelierung von aufgekochten Agaroselösungen zu einem dreidimensionalen Netz von Polysaccharidketten führt. Gibt man nun an eine definierte Stelle des erstarrten Agarosegels polyanionische DNA und legt ein elektrisches Feld an, wandert diese je nach Fragmentgröße mehr oder weniger schnell durch das Polysaccharidnetz in Richtung Anode. Ein Gemisch von DNA-Fragmenten verschiedener Nukleotidlängen kann auf diesem Wege aufgetrennt werden. Durch einen Vergleich mit einem DNA-Population definierter Fragmentlängen, Marker oder Leiter genannt, kann so die Länge der Proben-DNA visualisiert und kalkuliert werden.

Durchführung

Sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken wurden die DNA-Fragmente in Agarosegelen (0,5 - 3,0 %, indirekt proportional zur Fragmentgröße) in einer Horizontalgelapparatur elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurde die Agarose in 1 × TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, mit Eisessig auf pH 8,3 eingestellt) suspendiert und durch Kochen solubilisiert.

Zur Visualisierung der Nukleinsäuren im UV-Licht wurde der Agarose-Lösung 1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die benutzten Gelvolumina betragen je nach Probenvolumen und Probenzahl 60, 80 oder 120 ml. Proben, deren erwartete Nukleotidlänge mehr als 500 Basenpaare betrug, wurden mit 1/10 Volumen 10 × Farbmaler (30 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF, 0,25 % (w/v) Orange G) versetzt. Da die Bromphenolblau-Bande DNA-Fragmente von ca. 300 bp überlagert und dies die Visualisierung stört, wurden die Proben, falls die zu erwartende Fragmentlänge kleiner als 500 Basenpaare betrug, mit 1/6 Volumen 6 × Farbmaler (60 % (v/v) Glycerin, 0,05 % Xylencyanol FF, 0,2 % (w/v) Orange G, 60 mM EDTA) versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der Nukleotide erfolgte bei einer Feldstärke von 5-7 V/cm über eine Dauer von 1-3 Stunden. Die separierten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht (302 nm) betrachtet und photographisch bzw. digital dokumentiert.

D.2.1.7 Präparative Plasmidpräparation

Prinzip

Die Plasmidisolierung zur anschließenden Verwendung in der Zellkultur basiert, ebenso wie in D.2.1.4 dieses Teils bereits beschrieben, auf einer alkalischen Lyse der Bakterienkultur, darauf folgender Bindung der Plasmid-DNA an eine Anionen-Austausch-Säule und deren anschließende Elution in hochreinem Wasser. Da bakterielle Endotoxine insbesondere die Transfektion von DNA in primäre Zellen, wie z.B. hMSC, beeinflussen und dabei die Transfektionseffizienz herabsetzen, wird für alle zu diesem Zwecke durchgeführten Präparationen das *EndoFree Plasmid Maxi Kit* der Firma Qiagen verwendet. Diese Variante der Präparation erlaubt es, bis zu 1 mg Endotoxin-freie Plasmid-DNA aus einer Bakterienkultur zu isolieren. Dazu werden die

Bakterien, die bei der Transformation das Plasmid aufgenommen haben und durch Kultivierung einer Einzelkolonie gewachsen sind, in mehreren Schritten lysiert. Die Zugabe eines speziellen Puffers, der Isopropanol und Polyethylenglykolyktylphenylether enthält, verhindert dabei, dass im Lysat vorhandene Endotoxine an die Anionen-Austausch-Säule binden können. Demnach wird lediglich die Plasmid-DNA selektiv an die Membran der Säule gebunden und kann schließlich hochrein eluiert werden.

Durchführung

Dazu wurde in einen autoklavierten Erlenmeyerkolben 100 ml steriles 2 × YT-Medium gegeben und unter sterilen Bedingungen die entsprechende Menge Selektionsantibiotikum (100 µg/ml Kanamycin bzw. 200 µg/ml Ampicillin) zugegeben. Von einer Selektionsagarplatte wurde daraufhin mittels einer sterilen Pipettenspitze eine Einzelkolonie gepickt und in den Erlenmeyerkolben abgeworfen. Der Kolben wurde mit einer Kapsenberg-Kappe luftdurchlässig verschlossen und die Kultur über Nacht bei 37 °C und 250 Upm geschüttelt. Am darauf folgenden Tag wurde die Kultur vorsichtig in zwei 50 ml-Falkonröhrchen überführt und die Bakterien mittels Zentrifugation bei 4000 × *g* für 15 Minuten bei 4 °C und Abnahme des Überstandes geerntet. Das so entstandene Sediment wurde in 10 ml Lösungspuffer resuspendiert. Durch Zugabe der gleichen Menge eines SDS- und NaOH-haltigen Puffers, vorsichtiges Invertieren der Suspension und maximal 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Lyse der Bakterien mit gleichzeitiger Denaturierung chromosomaler und Plasmid-DNA. Durch Neutralisierung der Lösung mit 10 ml eines gekühlten Kaliumacetat-Puffers zeigte sich nach mehrmaligem invertieren der Lösung ein weißes Präzipitat, das im Wesentlichen aus Proteinen, Zelldebris und genomischer DNA bestand. Nach Überführung der Lösung in einen *QIAfilter* Spritzenzylinder und 10-minütiger Inkubation bildete es die oberste Schicht der Lösung, wodurch ein ungehinderter Durchfluss des Lysats durch den Filter gewährleistet wurde. Um diesen Vorgang zu beschleunigen, wurde das Lysat unter Zuhilfenahme eines Spritzenkolbens durch den Filter des Zylinders in ein neues 50 ml-Falkonröhrchen gepresst. Durch Zugabe von 2,5 ml des Isopropanol/Polyethylenglykolyktylphenylether-Puffers und 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden nun die Lipopolysaccharide spezifisch assimiliert. Nachdem eine *QIAGEN-tip 500* Säule mit 10 ml eines Isopropanol enthaltenden Puffers äquilibriert worden war, wurde das gefilterte Lysat nun auf die Säule gegeben. Um RNA, kleine Moleküle und Lösungsmittel aus dem Filter zu entfernen, erfolgten nun zwei Waschschrte mit je 30 ml eines Waschpuffers mit mittlerer Salzkonzentration. Die DNA wurde nun in ein steriles 50 ml-Falkonröhrchen mit 15 ml eines Hochsalz-Puffers eluiert. Durch Zugabe von 0,7 VT Isopropanol wurde die DNA-Fällung durchgeführt. Dazu wurde die Lösung eine Stunde (4000 × *g*, 4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, und das Sediment mit 5 ml 70 %igem Ethanol durch eine weitere einstündige Zentrifugation bei 4000 × *g* und 4°C gewaschen. Wiederum wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, das Präzipitat für 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet und schließlich in 200 µl hochreinem Wasser vorsichtig gelöst. Die DNA-Ausbeute wurde mit Hilfe des UV-Spektralphotometers (s. D.2.1.4) bestimmt. Danach erfolgte entsprechend Abschnitt D.2.1.5 eine Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA, um Reinheit und Effizienz der Präparation zu überprüfen.

D.2.1.8 Klonierung

D.2.1.8.1 pEGFP-IRES-neo2 und phrGFP-IRES-neo2

Vektor-Aufbau

Die Plasmide pEGFP-IRES-neo2 und phrGFP-IRES-neo2 werden in diesem Abschnitt zugleich abgehandelt, da sowohl die Klonierung als auch die spätere Anwendung beider Vektoren zum großen Teil übereinstimmen. Das Grundgerüst beider Vektoren basiert auf dem in Abschnitt D.1.2.4.5 beschriebenen Vektor pIRESneo2. Dieser Vektor erlaubt die Transkription eines beliebigen Gens in Abhängigkeit von der Transkription der Aminoglykosid-3'-Phosphatase. Im Gegensatz hierzu erfolgt jedoch eine unabhängige Translation dieser beiden Gene mit Hilfe der IRES-Sequenz. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Genen handelt es sich um die beiden GFP-Varianten EGFP und hrGFP. Die Vektoren erlauben so eine vereinfachte Selektion von GFP-exprimierenden Zellen durch das Aminoglykosid Geneticin.

Prinzip

Die Klonierung der beiden Vektoren bedarf der Ligation der jeweiligen GFP-Variante in die *multiple cloning site* des Vektors pIRESneo2. Dazu muss die kodierende Sequenz für EGFP bzw. hrGFP aus den Plasmiden pEGFPLuc bzw. phrGFP-N1 mittels zweier Restriktionsendonukleasen herausgeschnitten werden, die entstandenen Fragmente über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und die jeweilige GFP-Sequenz durch Ausschneiden aus dem Gel isoliert werden. Daraufhin wird die DNA mit Hilfe der *QIAquick* Gelextraktion der Fa. Qiagen, Hilden aufgereinigt. Der Vektor pIRESneo2 wird mit den identischen REn restringiert, mit denen auch der Verdau der GFP-Variante durchgeführt worden ist, um kohäsive Enden zur späteren Ligation zu generieren. Die 5'-Enden des linearisierten Vektors werden daraufhin mit *calf intestine phosphatase* dephosphoryliert, um die Wahrscheinlichkeit einer Religation des linearisierten Vektors zu minimieren und so die spätere Ligationseffizienz zu erhöhen. Anschließend werden die beiden Fragmente ligiert und die entstandenen Plasmide in kompetente *E. coli* transformiert. Nach der Verifikation der Ligation mittels analytischer DNA-Präparation und Restriktion erfolgt die endotoxinfreie Plasmidpräparation zur weiteren Verwendung der Plasmide pEGFP-IRES-neo2 und phrGFP-IRES-neo2.

Durchführung

Restriktion

Die kodierenden Sequenzen für EGFP bzw. hrGFP wurden aus den Plasmiden pEGFPLuc (s. D.1.2.4.3) bzw. phrGFP-N1 (s. D.1.2.4.2) mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *EcoR* I und *Nhe* I herausgeschnitten. Beide Enzyme generieren einen 3'-Überhang, der zu kohäsiven Enden führt. Dabei konnte der Restriktionsverdau simultan durchgeführt werden, da beide Enzyme in einem gemeinsamen Puffer ausreichende Aktivität aufweisen. Der Reaktionsansatz wurde mittels der in Abschnitt D.2.1.5 bereits beschriebenen Formel errechnet. Die eingesetzte DNA-Menge betrug jeweils 20 µg (s. Tab. D2).

Tab. D2: Pipettierschema zur präparativen Restriktion der GFP-Varianten EGFP und hrGFP.

	pEGFPLuc	pHrGFP-N1
DNA-Menge	x µl (entspr. 20 µg)	x µl (entspr. 20 µg)
<i>EcoR</i> I (10 Units/µl)	3 µl	4,4 µl
<i>Nhe</i> I (10 Units/µl)	15 µl	22 µl
10 × Puffer	10 µl	10 µl
Aqua dest.	ad 100 µl	ad 100 µl

Die Linearisierung des Vektors pIRESneo2 erfolgte ebenfalls mit den REn *EcoR* I und *Nhe* I. Auch in diesem Ansatz wurden 20 µg Plasmid verdaut (s. Tab. D3).

Tab. D3: Pipettierschema zur präparativen Linearisation des Plasmids pIRESneo2.

	pIRESneo2
DNA-Menge	x µl (entspr. 20 µg)
<i>EcoR</i> I (10 Units/µl)	3,6 µl
<i>Nhe</i> I (10 Units/µl)	18 µl
10 × Puffer	10 µl
Aqua dest.	ad 100 µl

Die beiden Restriktionsansätze wurden 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend, nach Zugabe eines Bromphenolblauhaltigen Auftragspuffers, auf ein Agarosegel aufgetragen (s. D.2.1.6).

DNA-Isolation

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA erfolgte die Exzision der jeweiligen Bande (ca. 700 bp/EGFP bzw. hrGFP; ca. 5300 bp/pIRESneo2) unter UV-Licht mittels eines sterilen Skalpell. Die weitere Aufreinigung und Isolation der DNA aus dem Agarosegel wurde unter Zuhilfenahme des *QIAquick* Geleextraktions-Kits der Firma Qiagen, Hilden durchgeführt.

Das aus dem Agarosegel geschnittene Fragment wurde dazu in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und sein Gewicht auf einer Präzisionswaage bestimmt. Nach Zugabe von 3 VT eines Hochsalzpuffers wurde der Ansatz 10 Minuten bei 50 °C erhitzt, um das Gel zu solubilisieren. Zur Beschleunigung dieses Prozesses wurde der Ansatz alle 2-3 Minuten durch kräftiges Schütteln vermischt. Im Falle der Präparation des linearisierten Vektors (5,3 kb) erfolgte die Zugabe von 1 VT Isopropanol. Dies erhöht die Ausbeute von DNA-Fragmenten, die eine Länge von kleiner als 500 bp bzw. größer als 4 kb aufweisen. Die Suspension wurde nun auf eine *QIAquick* Zentrifugationssäule gegeben und 1 Minute bei 16.100 × g zentrifugiert. Nach Abnahme der Durchfluss-Fraktion wurde die Silicamembran der Säule mit 750 µl eines Ethanol enthaltenden Puffers durch Zentrifugation unter denselben Bedingungen gewaschen. Eine erneute Zentrifugation wurde nach Verwerfen des Durchflusses durchgeführt, um eventuell noch in der Säule vorhandenen Ethanolreste vollständig zu entfernen. Die *QIAquick*-Säule wurde nun in ein neues steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, um darin die DNA nach Zugabe von 30 µl H₂O auf die Silicamembran mittels eines Zentrifugationsschrittes (16.100 × g, 1 Minute) zu eluieren. Die Konzentration der DNA wurde wie bereits unter D.2.1.4 beschrieben bestimmt.

Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierung der 5'-Enden des linearisierten und isolierten Vektors wurde mit der aus Kälberdarm isolierten alkalischen Phosphatase (*Calf Intestinal Phosphatase*, CIP) der Firma Roche, Mannheim durchgeführt. Die zur vollständigen Dephosphorylierung notwendige Enzymmenge errechnet sich aus der Anzahl der in die Reaktion eingesetzten terminal phosphorylierten DNA-Fragmente in Picomol wie folgt:

$$\text{Nukleotidlänge (in bp)} \times 600 \text{ pg/pmol} \times \text{Menge (in } \mu\text{g)} \times \text{Anzahl der Schnittstellen} \times 2 = \text{benötigte IE CIP}$$

Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C in einem von der Fa. Roche mitgelieferten Puffer wurde die Lösung 10 Minuten bei 65 °C erhitzt. Daraufhin wurde anschließend eine Natriumacetat-Ethanol-fällung des dephosphorylierten Vektors durchgeführt, um das Enzym sowie den Dephosphorylierungspuffer zu entfernen. Dazu wurde jeweils 0,1 VT Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 VT Ethanol abs. (-20 °C) zu dem Ansatz gegeben und dieser 15 Minuten bei -20 °C inkubiert. Nach einem 30-minütigen Zentrifugationsschritt (13.000 × g, 4 °C) wurde der Überstand dekantiert und 500 µl 70 %iger Ethanol zugegeben. Der Ansatz wurde erneut 10 Minuten zentrifugiert (13.000 × g, Raumtemperatur), der Überstand abgenommen und das DNA-Sediment in 20 µl hochreinem Wasser gelöst. Die Konzentration wurde analog dem bereits in D.2.1.4 beschriebenen Protokoll bestimmt.

Ligation

Die Ligation des dephosphorylierten und gefällten Vektorrückgrats mit dem Insert erfolgte mit dem Quick Ligation Kit der Firma New England Biolabs, USA. Die Quick T4 DNA Ligase vermittelt die Verknüpfung der kohäsiven Enden innerhalb einer Inkubationszeit von 3–5 Minuten. Zur Ligation eingesetzt wurden 50 ng des linearisierten und dephosphorylierten Vektors pRESneo2 und ein dreifacher molarer Überschuss an kompatiblen Insert EGFP bzw. hrGFP. Das Volumen des Reaktionsansatzes wurde auf 10 µl eingestellt und dasselbe Volumen an 2 × Quick Ligationpuffer zugegeben. Nach Addition von 1 µl der Quick T4 DNA Ligase wurde der Ansatz kurz zentrifugiert und anschließend 3–5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde danach bei 4 °C gestoppt. Die Transformation des Ligationansatzes wurde unter denselben Bedingungen, wie bereits in Abschnitt D.2.1.3 beschrieben, durchgeführt. Nach der analytischen Präparation von je zehn verschiedenen Transformanden aus Übernachtskulturen von *E. coli*-Einzelkolonien und der analytischen Restriktion dieser Plasmide erfolgte eine Endotoxin-freie Plasmidpräparation.

D.2.1.8.2 *pattB*-EGFP-IRES-neo2 und *pattB*-hrGFP-IRES-neo2

Vektor-Aufbau

Die zielgerichtete Integration von Fremd-DNA, vermittelt durch die Integrase des Bakteriophagen Φ C31, erfordert zwei Erkennungssequenzen. Wie bereits einleitend beschrieben, befindet sich eine dieser Sequenzen auf dem humanen Chromosom 8. Diese so genannte Pseudo-*attP*-Sequenz A hat Ähnlichkeit mit der Erkennungssequenz des Phagen selbst, wovon sich auch der Name *attP* (*attachment site in the phage*) ableitet. Um nun ein Plasmid mittels der Integrase in diese pseudo-*attP*-Sequenz zu integrieren, bedarf es der entgegengesetzten Erkennungssequenz, also der, die sich in dem Genom des Bakteriums *Streptomyces coelicolor* befindet. Diese Erkennungssequenz trägt den Namen *attB* (*attachment site in the bacterium*). Diese *attB*-site wurde in die Vektoren pEGFP-IRES-neo2 bzw. phrGFP-IRES-neo2 kloniert. Die resultierenden Vektoren *pattB*-IRES-neo2 und *pattB*-hrGFP-IRES-neo2 dienen so zum einen ihrer zielgerichteten Integration in das Genom der transfizierten Zellen und führen dort zur gleichzeitigen Expression der GFP-Variante zusammen mit der Neomycin-Resistenz.

Prinzip

Die Vektoren pEGFP-IRES-neo2 und phrGFP-IRES-neo2 dienen den beiden Vektoren *pattB*-IRES-neo2 und *pattB*-hrGFP-IRES-neo2 (beide s. D.2.1.8.1) jeweils als Grundgerüst. Um die *attB*-Sequenz in dieses Grundgerüst zu klonieren, muss diese zuerst aus dem von Michele Calos zur Verfügung gestellten Plasmid pTA-*attB* mit Hilfe modifizierter Primer amplifiziert werden. Die Modifikation ist nötig, um eine Restriktionskompatibilität des Vektors und der zu klonierenden *attB*-Sequenz zu erzielen. Nach der Isolation und Aufreinigung des PCR-Produkts aus dem Agarosegel wird dieses in den Klonierungsvektor pCR2.1-TOPO (s. D.1.2.4.6) ligiert. Nach einer Präparation dieses klonierten Plasmids im analytischen Maßstab wird das *attB*-Fragment sequenziert, um eventuelle durch die PCR-Amplifikation generierte Mutationen auszuschließen. Ist sichergestellt, dass es sich bei der amplifizierten DNA um die Originalsequenz handelt, wird diese mittels eines Restriktionsenzym wieder aus dem Vektor pCR2.1-TOPO geschnitten und über eine Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt, das Fragment aus dem Gel isoliert und aufgereinigt. Es schließt sich die Linearisierung der Vektoren pEGFP-IRES-neo2 und phrGFP-IRES-neo2 an sowie deren 5'-Dephosphorylierung mittels des Enzyms CIP. Die Ligation des Vektors mit der *attB*-Sequenz und gelungene Transformation wird mittels analytischer Plasmidpräparation und anschließender Restriktionsanalyse verifiziert. Zuletzt erfolgt unter Zuhilfenahme des *Qiagen Endofree Maxi Kits* die Präparation der beiden Rekombinanten zur Verwendung dieser in der primären Zellkultur.

Durchführung

Modifikation des Inserts

Als Matrize für die 285 Basenpaare umfassende *attB*-Sequenz diente der Vektor pTA-*attB*. Wie bereits in Abschnitt D.1.2.4.8 beschrieben, handelt es sich hierbei um das Grundgerüst des Vektors pCR2.1-TOPO, in den mittels TOPO-TA-Klonierung die *attB*-Sequenz ligiert worden war. Um die Sequenz in die Vektoren pEGFP-IRES-neo2 und phrGFP-IRES-neo2 zu klonieren, mussten die beiden Enden der *attB*-Sequenz zuvor durch Anfügen zweier RE-Erkennungssequenzen

modifiziert werden. Dies geschah durch Amplifikation der *attB*-Sequenz mit spezifischen, jedoch am 5'-Ende modifizierten Primern. Diese wurden so entworfen, dass an das jeweilige 5'-Ende der 30 Nukleotide langen Primer die 6 Basenpaare angefügt wurden, die als Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease *Mlu* I dienen (s. Tab. D4). Die initiale Bindung der Primer an die Matrize, also die *attB*-Sequenz, geschieht dabei in den ersten Zyklen der PCR nicht vollständig, in den darauffolgenden jedoch kommt es aber zu einer Amplifikation auch der gesamten Primerlänge, so dass am Ende das Produkt in der weit überwiegenden Anzahl aus der modifizierten *attB*-Sequenz besteht.

Tab. D4: Modifizierte Primer.

Die Primer zur Amplifikation der *attB*-Sequenz wurden so gestaltet, dass sie an den Enden des Amplifikats eine Erkennungsstelle der Restriktionsendonuklease *Mlu* I (fettgedruckt, Markierung der Schnittstelle durch ein ^) generieren.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
5'- <i>Mlu</i> I- <i>attB</i> -f-52	CGA^CGC GTT TCG GCT TGG CTG TCG ACA TGC
3'- <i>Mlu</i> I- <i>attB</i> -r-359	GCA^CGC GTT TCC AGG TAC CGT CGA CGA TGT

Der PCR-Ansatz bestand aus folgenden Komponenten (s. Tab. D5):

Tab. D5: Pipettierschema des PCR-Ansatzes.

10 × HiFiBuffer	2 µl
dNTP's (jeweils 10 mM)	1 µl
Primer 1: 5'- <i>Mlu</i> I- <i>attB</i> -f-52 (10 µM)	1 µl
Primer 2: 3'- <i>Mlu</i> I- <i>attB</i> -r-359 (10 µM)	1 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
pTA- <i>attB</i> (1 ng/µl)	1 µl
Aqua dest.	ad 20 µl

Die Amplifikation erfolgte in 40 Zyklen mit folgendem Temperaturprofil (s. Tab. D6):

Tab. D6: PCR-Schema.

Denaturierung, Annealing und Elongation bilden einen Zyklus. Dieser wurde 39-mal wiederholt.

Anfangsdenaturierung	95 °C	2 Minuten
Denaturierung	95 °C	15 Sekunden
Annealing	66 °C	30 Sekunden
Elongation	72 °C	60 Sekunden
Auffüllreaktion	72 °C	10 Minuten

TOPO-TA-Klonierung

Das Prinzip der TOPO-TA-Klonierung wurde bereits eingehend in Abschnitt D.1.2.4.6 dieser Arbeit beschrieben. Der Reaktionsansatz ist in Tab. D7 wiedergegeben:

Tab. D7: Reaktionsansatz der TOPO-TA-Klonierung.

PCR-Produkt	2 µl
Salzlösung konzentriert	1 µl
Aqua dest.	2 µl
pCR2.1-TOPO	1 µl

Nach kurzem Vermischen der Reaktionsansätze erfolgte die Ligation des PCR-Fragments in den Vektor pCR2.1-TOPO innerhalb einer 5-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur (s. Tab. D7). Danach wurde der Reaktionsansatz auf Eis gestellt. Es folgte die Transformation in kompetente *E. coli* (Top 10 F, Invitrogen, USA), indem 2 µl des Ligationsansatzes zu der Zellsuspension gegeben wurden. Das Gemisch wurde nun 30 Sekunden in einem auf 42 °C äquilibrierten Wasserbad erhitzt. Im Anschluß wurde das Zell-DNA-Gemisch sofort wieder auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgefäß wieder fest verschlossen und 1 Stunde bei 37 °C und 250 Upm geschüttelt. Die weitere Anzucht der Kultur ist dem in D.2.1.1 beschriebenen Protokoll zu entnehmen.

Sequenzierung des Inserts

Die anschließende Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Methode nach Sanger und Coulson (Sanger et al., 1977). Diese wurde entsprechend dem in Abschnitt D.2.1.13 beschriebenen Procedere durchgeführt.

Restriktion der Vektorgrundgerüste

Die Vektoren, in die die sequenzierte *attB*-Sequenz ligiert werden sollte, wurden mit der RE *Mlu* I linearisiert, um kohäsive Enden für die spätere Klonierung zu generieren. Es wurden jeweils 20 µg der beiden Plasmide pEGFP-IRES-neo2 und phrGFP-IRES-neo2 verdaut (s. Tab. D8).

Tab. D8: Pipettierschema zur präparativen Linearisierung der Plasmide pEGFP-IRES-neo2 und phrGFP-IRES-neo2.

	pEGFP-IRES-neo2	phrGFP-IRES-neo2
DNA-Menge	x µl (entspr. 20 µg)	x µl (entspr. 20 µg)
<i>Mlu</i> I (10 Units/µl)	2,3 µl	2,3 µl
10 × Puffer	10 µl	10 µl
Aqua dest.	ad 100 µl	ad 100 µl

DNA-Isolation und Dephosphorylierung

Der Restriktionsverdau der beiden Plasmide pEGFP-IRES-neo2 und phrGFP-IRES-neo2 wurde jeweils auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Vektor-DNA wurde isoliert und die 5'-Enden wurden anschließend dephosphoryliert, wie es unter dem Abschnitt D.2.1.8.1 bereits beschrieben wurde.

Plasmidpräparation, Restriktionsanalyse und Ligation

Nachdem 10 Einzelkolonien in 5 ml 2 × YT-Medium über Nacht vermehrt worden waren, erfolgte tags darauf eine Plasmidpräparation des rekombinanten Plasmids pCR2.1TOPO-*attB*+ im analytischen Maßstab (s. D.2.1.4). Die Plasmidpräparation wurde ebenso wie die darauf folgende Restriktionsanalyse (s. D.2.1.5) analog den bereits zuvor erläuterten Protokollen durchgeführt. Verdaut wurden die Plasmide mit dem Enzym *Mlu* I. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der *attB*-Sequenz des Vektors pCR2.1TOPO wurde diese mit Hilfe eines sterilen Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und mit dem *QIAquick* Geleextraktions-Kit isoliert. Die Ligationen des *attB*-Fragments mit den linearisierten und terminal dephosphorylierten Vektoren pEGFP-IRES-neo2 bzw. phrGFP-IRES-neo2 wurden analog dem in D.2.1.8.1 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

D.2.1.9 RNA-Isolierung

Prinzip

Die RNA-Isolierung erfolgt mit Hilfe des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen, der für die Isolierung von bis zu 100 µg Total-RNA geeignet ist. Über die selektive Bindung der RNA an die Silica-Gel-Membran einer RNeasy Mini-Säule und durch anschließende Elution mittels RNase-freiem Wasser kann die RNA isoliert werden. Für die Homogenisierung der Probe, also die Scherung der genomischen DNA und die Herabsetzung der Viskosität des Lysats, wird eine *QIAshredder*-Säule benutzt, wobei eine gleichzeitige Inaktivierung der RNasen durch das im RLT-Puffer enthaltene Guanidiniumisothiocyanat gewährleistet wird. Die mit diesem Verfahren isolierten RNA-Moleküle weisen eine Länge von > 200 Nukleotide auf. Das bedeutet, dass 5 S rRNA, 5,8 S rRNA und tRNAs, welche ca. 15-20 % der Total-RNA darstellen, im Eluat nicht enthalten sind.

Zusätzlich muss ausgeschlossen werden, dass im Probenansatz möglicherweise enthaltene Plasmid-DNA, insbesondere im Falle der quantitativen Bestimmung von EGFP, die nachfolgenden Untersuchungen stört. Aus diesem Grund wird ein DNase-Verdau des Ansatzes durchgeführt.

Durchführung

Die in der Zellkultur mittels eines Zellschabers abgelösten Zellen wurden in 350 µl RLT-Puffer resuspendiert, wodurch eine vollständige Lyse erreicht wurde. Zur gänzlichen Denaturierung der Proteine wurde dem RLT-Puffer das Reduktionsmittel β-Mercaptoethanol in einem Verhältnis von 1:100 zugegeben. Das Lysat wurde mittels 2-minütiger Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit ($16.100 \times g$) durch eine *QIAshredder*-Säule homogenisiert. Das homogene Lysat wurde anschließend mit der äquivalenten Menge (350 µl) an 70 %igem Ethanol versetzt, da diese Ethanolkonzentration (35 %) eine optimale Bindung der RNA an die RNeasy Mini-Säule ermöglicht. Das Gemisch wurde daraufhin zentral auf die RNeasy Mini-Säule pipettiert und nach Zentrifugation (15 s, $\geq 9300 \times g$) der Durchfluss verworfen. Die nicht RNA-haltige Fraktion wurde durch Zugabe von 700 µl RW1 Puffer auf die RNeasy Mini-Säule und einem weiteren Zentrifugationsschritt für 15 s bei $\geq 9300 \times g$ entfernt.

Daraufhin wurden 80 µl DNase-Lösung zugegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNase-Lösung setzte sich aus 10 µl DNase I-Stammlösung (27 Kunitz Einheiten) und 70 µl RDD-Puffer zusammen. Anschließend folgte ein zweimaliger Waschschrift durch Zentrifugation mit 500 µl RPE-Puffer (15 s bei $\geq 9300 \times g$). Um die RNeasy Silica-Gel Membran vollständig zu trocknen und Ethanolreste im Eluat zu vermeiden, wurde die Säule nochmals bei maximaler Geschwindigkeit für eine Minute zentrifugiert. Nachdem die RNeasy-Säule in ein neues 1,5 ml Sammelgefäß überführt worden war, erfolgte die RNA-Elution durch Zugabe von 50 µl RNase-freiem Wasser in die Mitte der Silica-Gel-Membran und einem Zentrifugationsschritt von einer Minute bei $\geq 9300 \times g$. Um die Gesamtausbeute zu erhöhen, wurde nochmals mit 30 µl RNase-freiem Wasser unter Zentrifugation (eine Minute bei $\geq 9300 \times g$) eluiert. Auf Grund dieser erneuten Elution war zwar die Konzentration der RNA geringer, die Ausbeute jedoch um ungefähr 15 - 30 % höher.

Die Konzentration der erhaltenen Total-RNA wurde photometrisch bei einer optischen Dichte von 260 nm bestimmt. Als Leerwert wurde RNase-freies Wasser herangezogen. Bei einem Quotienten von $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ zwischen 1,8 und 2,2 kann von einer proteinfreien RNA-Lösung ausgegangen werden.

D.2.1.10 cDNA-Synthese für die quantitative RT-PCR

Prinzip

Das Umschreiben der mRNA in cDNA erfolgt unter zu Hilfenahme des *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)* der Firma Roche. Hierbei binden Oligo-dT-Primer spezifisch an die für mRNA charakteristische Poly-A-Sequenz an deren 3'-Ende. Dadurch wird die ausschließliche Verwendung der mRNA als Matrize für die cDNA-Synthese gewährleistet. Andere in dem Total-RNA-Pool der durch die RNeasy Mini Präparation (s. D.2.1.9) enthaltenen RNA-Arten können somit nicht in die anschließende reverse Transkription einfließen. Die Reaktion selbst wird dabei durch die Reverse Transkriptase des *Avian Myeloblastosis Virus (AMV)* vermittelt.

Durchführung

Als Ausgangsmaterial diente Total-RNA, die mit Hilfe des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen gewonnen wurde (s. D.2.1.9). Für die cDNA-Synthese wurden 250 ng DNase-behandelte Total-RNA eingesetzt. Da das RNA-Volumen nur maximal 8,2 µl betragen durfte, musste es gegebenenfalls mit Hilfe eines Vakuum-Zentrifugal-Verdampfers (Lyofuge) auf das gewünschte Volumen eingengt werden. Eine primäre 15-minütige Denaturierung der RNA-Sekundärstrukturen wurde im PCR-Multicycler bei 65 °C durchgeführt, woraufhin die Proben vor Zugabe der restlichen Komponenten fünf Minuten auf Eis inkubiert wurden. Anschließend wurden die für die cDNA-Synthese erforderlichen Komponenten wie in der folgenden Tabelle beschrieben in einem Gesamtvolumen von 11,8 µl zugegeben (s. Tab. D9).

Tab. D9: cDNA-Synthese mittels Oligo-dT-Primern.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
10 × Reaktionspuffer	2 µl	1 ×
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl	5 mM
Desoxynukleotid-Mix (je 10 mM)	2 µl	1 mM
Oligo-dT-Primer	2 µl	0,04 A ₂₆₀ Units (1,6 µg)
RNase Inhibitor (50 U/µl)	1 µl	50 Units
AMV Reverse Transkriptase (50 U/µl)	0,8 µl	≥ 20 Units

Die reverse Transkription erfolgte eine Stunde bei 42 °C, nachdem zuvor eine 10-minütige Inkubation bei 25 °C für das Anlagern der Oligo-dT-Primer vorangegangen war. Zum Schluss wurde die Reverse Transkriptase denaturiert (5 Minuten, 99 °C). Die so erhaltene cDNA konnte bei -20 °C für einen längeren Zeitraum ohne Qualitätsverluste aufbewahrt werden.

D.2.1.11 Quantitative RT-PCR

Prinzip

Durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes, der in doppelsträngige (ds) DNA interkaliert, kann während einer durchgeführten Polymerasekettenreaktion unter Zuhilfenahme eines entsprechenden Detektors die bei den einzelnen PCR-Zyklen jeweils entstandene Produktmenge quantifiziert werden. Aus diesem Grund wird diese Methode auch als quantitative *real-time* (RT) PCR bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurden die quantitativen DNA-Bestimmungen mittels des der Fa. Roche, Mannheim durchgeführt. Die Quantifizierung der eingesetzten Matrize gelingt über die Korrelation zwischen Produktmenge und Fluoreszenz. Der verwendete fluoreszierende Farbstoff *SybrGreen I* interkaliert in die bei jedem PCR-Zyklus entstehenden dsDNA-Produkte, so dass mit zunehmender Zyklenzahl, und damit einhergehend steigenden Mengen an spezifischem amplifiziertem Produkt, nun die Zunahme der Fluoreszenz mit Hilfe des *LightCycler*-Systems detektiert und aufgezeichnet werden kann. Gleichzeitig erfolgt die Bestimmung mehrerer Proben in unterschiedlichen Verdünnungsstufen mit genau definierter Kopienzahl. Hierdurch kann eine Standardkurve generiert werden, anhand derer die ursprüngliche Kopienzahl in der zu analysierenden Probe bestimmt werden kann. Da *SybrGreen I* nicht nur in spezifische Produkte, sondern auch in Primerdimere und doppelsträngige Nebenprodukte interkaliert, erfolgt im Anschluss an die quantitative RT-PCR ein Nachweis der Spezifität der generierten Produkte sowohl über die Schmelzkurvenanalyse als auch über Agarosegel-Elektrophorese. Die PCR-Bedingungen im *LightCycler* richten sich nach den für die RT-PCR benötigten Primersets gemäß den Angaben des Herstellers Search-LC (www.search-LC.de).

Durchführung

LightCycler-Lauf

Unabhängig von der Menge der für die cDNA-Synthese eingesetzten RNA (s. oben), wurde jeweils 1 µl der cDNA-Lösung mit Aqua dest. auf 10 µl aufgefüllt. Dieses Volumen wurde in die dafür vorgesehenen *LightCycler*-Glas-Kapillaren pipettiert und mit 10 µl eines PCR-Ansatzes ergänzt, was zu einem Gesamtvolumen von 20 µl pro Kapillare führte. Abschließend wurde jede Kapillare mit einem Plastikstopfen verschlossen. Die PCR-Stocklösung setzte sich aus 6 µl Aqua dest., jeweils 2 µl Primer Set und *LightCycler FastStart DNA Master SybrGreen I* der Firma Roche zusammen, das neben *SybrGreen I*, die DNA-Polymerase, den PCR-Puffer und die dNTPs enthielt. MgCl₂ lag in allen Ansätzen in einer Endkonzentration von 1 mM vor. Anschließend wurden die Kapillaren vier Minuten bei 660 × g und 4 °C zentrifugiert, um die Lösung mit einem Gesamtvolumen von 20 µl in die Spitze der Kapillaren zu transferieren. Nach erfolgter Zentrifugation wurden die Kapillaren in das dafür vorgesehene Karussell der *LightCycler*-Apparatur gestellt. Die PCR-Bedingungen blieben bei allen Experimenten unverändert (s. Tab. D10). In jedem *LightCycler*-Lauf wurden Kontrollen mitgeführt, wobei humane cDNA als Positiv- und Aqua. dest. als Negativkontrolle dienten.

Tab. D10: RT-PCR-Schema.

Denaturierung, Annealing und Elongation bilden einen Zyklus. Dieser wurde 44-mal wiederholt.

Anfangsdenaturierung	95 °C	10 Minuten
Denaturierung	95 °C	10 Sekunden
Annealing	68 °C	10 Sekunden
Elongation	72 °C	16 Sekunden

Analyse mittels Agarosegel-Elektrophorese

Nach beendeter RT-PCR wurden die Kapillaren geöffnet, invers in 1,5 ml-Reaktionsgefäße gestellt und bei $660 \times g$ kurz zentrifugiert, um die Lösung vollständig aus den Kapillaren zu entfernen. Die Proben wurden anschließend wie unter D.2.1.6 beschrieben mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert.

D.2.1.12 DNA-Isolation aus eukaryontischen Zellen

Prinzip

Die Isolation genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen, wie humanen mesenchymalen Stammzellen, erfordert andere Bedingungen als die Präparation von vektorieller DNA. Die Durchführung erfolgt unter Zuhilfenahme des *QIAamp DNA Micro Kits* der Fa. Qiagen. Dabei bedarf die Isolierung von genomischer DNA aus einer sehr geringen Anzahl von Zellen (< 500 Zellen) entweder der Zugabe von so genannter Carrier-RNA, oder dem vorherigen Zusatz einer größeren Anzahl von Zellen (> 50.000 Zellen). Letztere Option besteht lediglich, wenn diese so genannten Carrier-Zellen die Folgeanalytik nicht beeinträchtigen. In einem ersten Reaktionsschritt werden die Zellen mittels eines Guanidiniumhydrochlorid-Puffers lysiert. Die Zugabe von Proteinase K führt zum Abbau der Histon-Proteine. Die in diesem Lysat nun befindliche proteinfreie DNA kann an die Silica-Membran einer *QIAamp MiniElute* Säule gebunden werden. Nach Zentrifugations- und Waschschritten wird schließlich die Elution der genomischen DNA mit hochreinem Wasser vorgenommen.

Durchführung

In der Zellkultur wurde zum einen eine definierte Zellzahl mittels Trypsin/EDTA-Behandlung geerntet. Dabei wurden 100.000 Carrier-Zellen (hMSC) trypsinisiert (s. D.2.2) und in 100 µl Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) resuspendiert. Zum anderen wurden die zu untersuchenden Zellen (< 500 Zellen) nach dem identischen Protokoll isoliert. Das PBS-Volumen betrug hier allerdings in 50 µl. Nach Zusatz von 50 µl Carrier-Zellsuspension (50.000 Zellen) zu der zu untersuchenden Zellpopulation und Vermischen der beiden Lösungen (Gesamt-volumen: 100 µl), erfolgte die Zugabe von 10 µl Proteinase K (> 600 mAU/ml) sowie von 1 VT Guanidiniumhydrochlorid-Puffer. Die Suspension wurde daraufhin kräftig vermischt und 10 Minuten bei 56 °C unter Schütteln der Lösung bei 125 Upm inkubiert, da Proteinase K ein Temperaturoptimum von 56 °C besitzt. Darauf folgend wurden 50 µl 100 % Ethanol (-20 °C) zugegeben und die Lösung nach kräftigem Mischen des Reaktionsansatzes 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde nun zentral auf die Membran einer *QIAamp MiniElute-Säule* pipettiert und 1 Minute bei 8000 Upm zentrifugiert. Nachdem die Durchflussfraktion verworfen worden war, wurde die Membran in zwei Schritten mit je 500 µl ethanolhaltigen Puffern durch eine einminütige Zentrifugation bei 8000 Upm gewaschen. Um

in der Membran befindliche Ethanolreste zu entfernen, wurde die Säule anschließend noch einmal 3 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit ($16.100 \times g$) zentrifugiert. Die Elution erfolgte mit 30 μ l hochreinem Wasser, das zentral auf die Membran in der *QIAamp MiniElute-Säule* pipettiert wurde. Nach einem Inkubationsschritt von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die DNA durch 1-minütige Zentrifugation bei $16.100 \times g$ in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß eluiert.

D.2.1.13 DNA-Sequenzierung

Prinzip

Die in dieser Arbeit angewandte Sequenziertechnik zur Aufklärung der Nukleotidabfolge bestimmter DNA-Sequenzen beruht auf der von Sanger und Coulson entwickelten Didesoxy-Methode (Sanger et al., 1977). Notwendig hierfür ist ein geeigneter Primer, an dessen 3'-Ende eine DNA-Polymerase mit der Synthese der zu untersuchenden Sequenz beginnen kann. Dem Reaktionsansatz werden nicht nur die zum Kettenaufbau nötigen Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) zugegeben, sondern auch – in geringerer Konzentration – Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP). Letzteren fehlt an der 3'-Position ihrer jeweiligen Desoxyribose die Hydroxylgruppe, die zwingend notwendig ist zur Verknüpfung der kovalenten Bindungen mit dem 5'-Phosphat des folgenden Nukleotids. Aus diesem Grund kommt es zum Kettenabbruch, je nachdem, an welcher Stelle das jeweilige ddNTP eingebaut wurde. Da die vier ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) zuvor mit je einem Fluoreszenzfarbstoff markiert worden waren, lässt sich die Sequenz der teilamplifizierten Matrize nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Polyacrylamidgel bestimmen. Diese Technik erlaubt es, Sequenzen bis zu einer Länge von 1000 Basen zu lesen.

Durchführung

Die Sequenzierreaktionen wurden mit Hilfe des BigDye Kits der Fa. Applied Biosystems, USA, durchgeführt. Zu je 350 ng der zu untersuchenden Sequenz wurden 2 μ l BigDye gegeben. Diese Lösung enthält sowohl dNTP als auch markierte ddNTP, einen $10 \times$ PCR-Puffer sowie die DNA-Polymerase. Nach Zugabe von 3,2 pmol des Primers (M13 *forward* bzw. M13 *reverse*) wurden der Ansatz auf 10 μ l aufgefüllt und die lineare PCR durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte in 25 Zyklen mit folgendem Temperaturprofil (s. Tab. D11):

Tab. D11: Durchführung der Sequenzierreaktion.

Anfangsdenaturierung	96 °C	1 Minute
Denaturierung	96 °C	10 Sekunden
Annealing	50 °C	5 Sekunden
Elongation	60 °C	14 Sekunden

Die anschließende Gelelektrophorese und Detektion der fluoreszenzmarkierten DNA-Moleküle wurden von der Fa. MediGenomix, Martinsried durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse erfolgte jeweils durch Abgleich mit der Originalsequenz.

D.2.1.14 Restriktionsfragmentlängen-Analyse

Prinzip

Die Restriktionsfragmentlängen-Analyse (RFLA) entspricht im Wesentlichen der Untersuchung von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP), die in der Medizin zum Nachweis von Insertionen, Deletionen und Punktmutationen benutzt werden. In der vorliegenden Arbeit relevant ist die Detektion der Insertion eines Plasmids an eine bestimmte Stelle des humanen Genoms, der humanen pseudo-*attP*-Sequenz A auf Chromosom 8. Dazu wird genomische DNA aus Zellen isoliert, die zuvor durch die zielgerichtete Integration der Vektor-DNA mit dem entsprechenden Transgen modifiziert wurde. Diese neu generierte DNA-Sequenz fungiert als Matrize in der darauf folgenden PCR. Als Primer dienen Oligonukleotidsequenzen, die lediglich dann zur Amplifikation eines 320 bp langen Fragments führen, falls das Integrationsereignis spezifisch an der Rekombinationssequenz der Φ C31 Integrase stattgefunden hat. Anschließend wird das PCR-Produkt elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt. Nach Isolation der amplifizierten Sequenz erfolgt eine TOPO-TA-Klonierung mit RFLA, die charakteristische Fragmentgrößen erzeugt. Zusätzlich wird eine Sequenzüberprüfung des rekombinierten Fragmentes durchgeführt. Somit kann sowohl über die charakteristischen Fragmentgrößen als auch über die Sequenzierung des Fragments die Integration der Fremd-DNA in eine definierte Stelle des humanen Genoms untersucht bzw. verifiziert werden.

Durchführung

Nach der Isolierung der genomischen DNA aus den Zellen wurde eine PCR mit Primern durchgeführt, die ausschließlich die DNA-Sequenz der Integration in die pseudo-*attP*-Sequenz A amplifiziert (s. D.1.2.2). Als Kontrolle diente ein Primerpaar, das lediglich zu einer amplifizierten Sequenz führt, falls das Integrationsereignis nicht an der pseudo-*attP*-Sequenz auf Chromosom 8 stattgefunden hatte (s. D.1.2.2 und Tab. D12).

Tab. D12: Primer zum Nachweis der zielgerichteten Integration.

Das Primer-Paar 1 (1&2), welches zum einen an der vektorialen *attB*-Sequenz (1) und zum anderen an der nativen humanen Sequenz hybridisiert (2), führt zur Amplifikation des gezielten Integrationsereignisses. Das Primer-Paar 2 (2&3) hybridisiert an der nativen pseudo-*attP*-Sequenz A, jeweils stromauf- bzw. abwärts der Rekombinationsstelle der Φ C31 Integrase.

Primer	Komplementäre Sequenz
Integration-2-f (1)	<i>attB</i> , stromaufwärts der Rekombinationssequenz (RS)
Integration-r-400 (2)	pseudo- <i>attP</i> A, stromabwärts der RS
ps <i>attP</i> -f-30 (3)	pseudo- <i>attP</i> A, stromaufwärts der RS

Der PCR-Ansatz bestand aus folgenden Komponenten (s. Tab. D13):

Tab. D13: Pipettierschema des PCR-Ansatzes.

10 × HiFiBuffer	2 μ l
dNTP's (jeweils 10 mM)	1 μ l
Primerpaar 1 (1&2) / 2 (2&3)	je 1 μ l
Taq-Polymerase	0,5 μ l
Template	30 μ l
Aqua dest.	ad 50 μ l

Die Amplifikation erfolgte in 35 Zyklen mit folgendem Temperaturprofil (s. Tab. D14):

Tab. D14: PCR-Schema.

Denaturierung, Annealing und Elongation bilden einen Zyklus. Dieser wurde 34-mal wiederholt.

Anfangsdenaturierung	95 °C	2 Minuten
Denaturierung	95 °C	15 Sekunden
Annealing	66 °C	30 Sekunden
Elongation	72 °C	60 Sekunden
Auffüllreaktion	72 °C	10 Minuten

Das Amplifikat hatte im Falle der zielgerichteten Integration eine Nukleotidlänge von 320 bp, im Falle der nativen Sequenz eine Länge von 370 bp. Diese Sequenzen wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Isolation aus dem Agarosegel in den Vektor pCR2.1TOPO kloniert (s. D.1.2.4.6 und D.2.1.8.2). Die RFLA wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I und *Hinc* II durchgeführt. Dazu wurden die in den Vektor pCR2.1-TOPO ligierten PCR-Amplifikate jeweils mit den beiden Enzymen restringiert und die Produkte per Agarosegel-Elektrophorese visualisiert. Mithilfe der flankierenden Standard-Nukleotidsequenzen (M13 *forward* bzw. M13 *reverse*) erfolgte die Sequenzierung (s. D.2.1.13).

D.2.2 Zellkultur

Alle Versuche wurden mit humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) der Firma Lonza, USA, durchgeführt. Die Zellen wurden mittels einer Knochenmarksbiopsie des posterioren Beckenkamms isoliert und durch Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Ihre Abtrennung von hämatopoetischen Zellen wird durch selektive Adhärenz an Plastik erreicht. Die Firma garantiert einen negativen Befund auf HIV, Hepatitis-B und -C, Mycoplasmen, Bakterien und Pilzen sowie die Differenzierungsfähigkeit dieser Zellen in drei mesodermale Richtungen. Dabei wird die adipogene Differenzierung durch Lipidvakuolenbildung, die chondrogene Differenzierung durch Bildung von Kollagen II sowie die osteogene Differenzierung durch Mineralisierung (Kalziumdeposition) nachgewiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden humane mesenchymale Stammzellen einer 19-jährigen Spenderin (Kaukasierin) herangezogen. Die Spenderin war laut Firmenangabe normalgewichtig und zeigte keine Anzeichen für Diabetes, Herzerkrankungen, Krebs, Epilepsie oder andere Organerkrankungen bzw. für virale oder bakterielle Infektionen. Während der Experimente erfolgte in regelmäßigen Abschnitten die Überprüfung der hMSC auf eine Mycoplasmenkontamination mit Hilfe eines Mycoplasmen-PCR-Kits der Firma Minerva.

D.2.2.1 Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen

Die kryokonservierten humanen mesenchymalen Stammzellen (750.000 Zellen/Ampulle) wurden vor ihrer Kultivierung zwei Minuten im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in 5 ml 37 °C temperiertem Stammzellwachstumsmedium resuspendiert, das basierend auf dem humanen Stammzell-Basalmedium der Firma Lonza, USA (*MSCBM, mesenchymal stem cell basal medium*) folgende Zusätze enthielt: Komplettiert wurden 440 ml Basalmedium mit 50 ml fötalem Kälberserum (*Fetal Bovine Serum*, kurz FBS), 10 ml L-Glutamin (200 mM) und 0,5 ml Penicillin/Streptomycin (*MSCGM Single Quot*, Lonza). Nach 5-minütiger Zentrifugation der Zellen bei $600 \times g$ und 20 °C waren die Zellen sedimentiert und konnten nach Abnahme des Überstandes in 3 ml Medium durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert werden. Jeweils 1 ml dieser Suspension wurde in eine T75-Kulturflasche pipettiert, in die zuvor 9 ml Medium vorgelegt worden waren. Die Zellen wurden somit in 10 ml Medium kultiviert und zweimal pro Woche nach Abnahme des verbrauchten Mediums und Waschen mit 5 ml PBS mit frischem Medium versorgt. Die Inkubation erfolgte in einem CO₂-Brutschrank (5 % CO₂) bei 37 °C und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit.

D.2.2.2 Subkultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen

Hatten die Zellen einen optischen Konfluenzgrad von mehr als 90 % erreicht, wurden sie subkultiviert oder geerntet. Zu diesem Zweck wurde das Medium entfernt, um die adhärennten Zellen mittels 4 ml einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen, welches frei von Mg²⁺- und Ca²⁺-Ionen war. Zum einen wurden dadurch Reste in der Kulturflasche verbliebenen Mediums entfernt, die eine Inaktivierung des Trypsins bewirkt hätten. Zum anderen wurde die Anzahl zweifach positiv geladener Ionen minimiert, die in einem Chelatkomplex die Inaktivierung der in der Trypsin/EDTA-Lösung befindlichen Etyhlendiamintetraacetat-Moleküle be-

wirkt hätten. Nach Abnahme des PBS wurde dieses durch 4 ml Trypsin/EDTA-Lösung ersetzt. Die Inkubationszeit betrug 5 Minuten und wurde, falls sich die Zellen nicht vollständig ablösen, auf maximal 10 Minuten unter zusätzlicher Inkubation im CO₂-Brutschrank bei 37 °C verlängert. Durch Zugabe von 3 ml hMSC-Medium wurde diese Reaktion gestoppt, woraufhin die Zellsuspension zum vollständigen Entfernen des Trypsin/EDTA-Gemischs in einem 15 ml-Falkonröhrchen 5 Minuten bei 600 × g und einer Temperatur von 20 °C zentrifugiert wurde. Zur weiteren Kultivierung erfolgte die Resuspension des Zellsediments in einem geringen Volumen (< 5 ml) Medium.

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden der Zellsuspension 10 µl entnommen und diesem Aliquot 5 µl Trypan-blau zugegeben. Gezählt wurde lediglich die Anzahl der vitalen Zellen, also derer, die sich nicht mit dem Farbstoff anfärbten. Bei der folgenden Aussaat wurde die Zellzahl auf die Quadratzentimeter effektiver Wachstumsoberfläche der jeweiligen Kavitäten berechnet (s. Anhang, Tab. I1). Zur Subkultivierung der Zellen betrug die Aussaat grundsätzlich 5000 Zellen/cm². Zur Transfektion wurden je nach Transfektionsreagens und Kavitätengröße zwischen 8500 und 10.000 Zellen/cm² und zur adipogenen bzw. osteogenen Differenzierung jeweils 10.000 Zellen/cm² ausgesät.

D.2.2.3 Transfektion

D.2.2.3.1 Transiente Transfektion

Prinzip

Das Prinzip der transienten Transfektion wurde bereits einleitend beschrieben (s. B.2). Die temporäre Einschleusung der meist in Vektoren vorliegenden DNA in eukaryontische Zellen bewirkt eine hohe episomale Kopienzahl und damit eine starke Expression der auf den Vektoren kodierten Gene. Die Plasmide sind jedoch dem Angriff von zellulären Nukleasen ausgesetzt, die dazu führen, dass die Expression des eingebrachten Transgens über einen Zeitraum von wenigen Tagen stark abnimmt. Die Optimierung der Transfektion von hMSC wird mit dem Vektor pIRES2-EGFP (s. D.1.2.4.4) durchgeführt und mit dem Plasmid pEGFP-N3 (s. D.1.2.4.1) verifiziert. Da die Transfektionen hauptsächlich in 12-Kavitäten-Zellkulturplatten mit einer Kulturfläche von 3,5 cm²/Kavität erfolgen, sind die folgenden Angaben auf dieses Format bezogen.

24 Stunden nach Transfektion der Zellen wird die Transfektionseffizienz mittels Fluoreszenzmikroskopie bei einer Wellenlänge von 488 nm ausgewertet. Dabei wird die Anzahl der fluoreszierenden Zellen bei 200-facher Vergrößerung gegen die Anzahl aller im Lichtfeld sichtbaren Zellen normiert.

D.2.2.3.1.1 Transfektion mit METAFECTENE

Zur späteren Transfektion der hMSC wurden diese in 12-Kavitäten-Zellkulturplatten in einer Dichte von 10.000 Zellen/cm² bzw. entsprechend 3000 Zellen pro 100 µl Stammzellwachstumsmedium ausplattiert und unter gewöhnlichen Kultivierungsbedingungen inkubiert. Hatten die Zellen 18 bis 24 Stunden später einen Konfluenzgrad von ca. 60 % erreicht, wurde die Transfektion vorbereitet. Dazu wurden 0,1 µg bzw. 0,2 µg DNA pro 10.000 Zellen in 50 µl Serum-freiem DMEM gelöst. Die entsprechende Menge des Transfektionsreagenzes METAFECTENE (Biontex, München) wurde ebenfalls in 50 µl Serum- und Antibiotikum-freiem

Medium gelöst. Dabei betrug das Verhältnis von eingesetztem Transfektionseagens zur entsprechenden DNA-Menge zwischen 2:1 und 12:1. Die Herstellung der Lösungen erfolgte in 5 ml-Polystyrol-Röhrchen. Die beiden Lösungen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt und daraufhin vereinigt. Die Inkubation zur Formierung der DNA-Lipidkomplexe erfolgte für 20 Minuten bei Raumtemperatur. In diesem Zeitraum wurde das Medium von den hMSC abgenommen und durch 900 µl frisches Stammzellwachstumsmedium pro Kavität ersetzt. Der Transfektionsansatz wurde nach Ende der Inkubation tropfenweise zu den Zellen gegeben und durch vorsichtiges Schwenken der Zellkulturplatte mit dem Stammzellwachstumsmedium vermischt. Nach weiterer 6-stündiger Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) wurde der gesamte Transfektionsansatz entfernt und durch 1 ml frisches Stammzellwachstumsmedium ersetzt. Ausgewertet wurden die Versuche jeweils 24 Stunden nach Transfektion. Dabei wurde die Anzahl der fluoreszierenden Zellen bei 200-facher Vergrößerung gegen die Anzahl aller im Lichtfeld sichtbaren Zellen normiert.

D.2.2.3.1.2 Transfektion mit Lipofectamine Plus

Am Tag vor der geplanten Transfektion wurden 35.000 hMSC so ausgesät, dass sie zur Transfektion einen Konfluenzgrad von 60 % erreichten. 18 bis 24 Stunden darauf erfolgte die Transfektion mittels Lipofectamine Plus. Dazu wurden pro Kavität 2 Polystyrol-Röhrchen steril unter der *laminar flow* vorbereitet und jeweils 100 µl Serum-freies DMEM vorgelegt. In eines der beiden Röhrchen wurden zwischen 0,1 µg und 0,4 µg in Wasser gelöste DNA gegeben und diese Lösung anschließend durch Auf- und Abpipettieren durchmischt. Durch Zugabe des *Plus*-Reagens in verschiedenen Verhältnissen von 2:1 bis 14:1 - jeweils bezogen auf die eingesetzte DNA-Menge - erfolgte nach wiederholtem Auf- und Abpipettieren und 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur die Präkomplexierung der DNA. In das verbliebene Polystyrol-Röhrchen wurden nun zwischen 2 und 12 Teile Lipofectamine pro eingesetzter DNA-Menge gegeben. Nach Durchmischen der Lösung wurde diese mit dem DNA-*Plus*-Gemisch vereint. Der Transfektionsansatz wurde weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Innerhalb dieses Zeitraums wurde das Medium von den hMSC abgenommen und durch 400 µl Serum-freies DMEM ersetzt. Daraufhin wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben, vorsichtig mit dem Medium vermischt und 3, 6, bzw. 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung inkubiert. Danach wurde der Ansatz von den Zellen abgenommen und durch 1 ml frisches Stammzellwachstumsmedium ersetzt. Die Auswertung erfolgte 24 Stunden nach Transfektion der Zellen. Dabei wurde die Anzahl der fluoreszierenden Zellen bei 200-facher Vergrößerung gegen die Anzahl aller im Lichtfeld sichtbaren Zellen normiert.

D.2.2.3.1.3 Transfektion mit Lipofectamine 2000

Zur Transfektion der hMSC mittels Lipofectamine 2000 wurden die Zellen so ausplattiert, dass die Konfluenz nach 18 – bis 24-stündiger Inkubation 50 % betrug. Dies erforderte pro Kavität einer 12-Kavitäten-Zellkulturplatte eine Aussaat von 30.000 Zellen. Die Transfektion selbst erfolgte an dem darauf folgenden Tag unter sterilen Bedingungen unter der *laminar flow*. Dazu wurde das Medium von den Zellen abgenommen und durch 800 µl frisches Stammzellwachstumsmedium ersetzt. Pro Kavität wurden nun zwei 5 ml fassende Polystyrol-Röhrchen vorbereitet und je 100 µl Serum-freies DMEM vorgelegt. Zu einem der beiden Röhrchen wurden nun

zwischen 0,2 und 0,8 µg in Wasser gelöste DNA gegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit dem Medium vermischt. In das verbliebene Röhrchen wurde die 0,5- bis 4-fache Menge an Lipofectamine 2000 (bezogen auf die DNA-Menge) zugesetzt und ebenfalls vorsichtig vermischt. Nach maximal fünfminütiger Inkubation wurden die beiden Ansätze vereint und wiederum durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren durchmischt. Dieser Transfektionsansatz wurde nun für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Innerhalb dieses Zeitraums konnten sich nun die DNA-Lipidkomplexe formieren, so dass der Ansatz im Anschluss tropfenweise auf die hMSC gegeben werden konnte. Nach sechsständiger Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) erfolgten die Abnahme des Ansatzes und die Zugabe von 2 ml frischem Stammzellwachstumsmedium. Die Effizienz wurde 24 Stunden nach der Transfektion bestimmt.

Zudem wurde eine Untersuchung durchgeführt, mit der der Einfluss des Konfluenzgrades der Zellen auf die Transfektionseffizienz analysiert wurde. Die Fa. Invitrogen schlägt zur Transfektion von adhärennten Zellen eine 90 %ige Konfluenz vor. Um die optimale Zelldichte von hMSC zu ermitteln, wurden diese mit einem Konfluenzgrad von 20, 40, 60 und 80 % in 12-Kavitäten-Zellkulturplatten eingesät. 24 Stunden später erfolgte die Transfektion der Zellen nach dem optimierten Transfektionsprotokoll (s. Anhang). An dem darauf folgenden Tag wurden die Zellen trypsinisiert (s. D.2.2.2) und die Transfektionseffizienz mithilfe der Neubauer-Zählkammer und Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Dabei wurde die Anzahl der fluoreszierenden Zellen mit der jeweiligen Gesamtzellzahl korreliert.

D.2.2.3.2 Toxizitätsanalyse

Prinzip

Sowohl die Einbringung von Fremd-DNA als auch die Technik des liposomalen Gentransfers sind für Zellen putativ toxisch. Aus diesem Grund erfolgt zum einen die Untersuchung der Toxizität der verwendeten Transfektionsreagenzien. Zum anderen wird eine vergleichende Transfektion der Plasmide pEGFP-N3 (s. D.1.2.4.1) und pIRESneo2 (s. D.1.2.4.5) durchgeführt, um festzustellen, ob das Überleben der hMSC mit der Expression von bestimmten Transgenen (EGFP bzw. Neomycin-Resistenz) korreliert.

Durchführung

Einen Tag vor der Transfektion der Zellen wurden in 21 Vertiefungen zweier 12-Kavitäten-Zellkulturplatten je 30.000 hMSC ausgesät. Die Transfektion der hMSC erfolgte im Triplet analog dem optimierten Transfektionsprotokoll des jeweiligen Reagenzes (s. E.1.1.1 für METAFECTENE, E.1.1.2 für Lipofectamine Plus und E.1.1.3 für Lipofectamine 2000). Zur Transfektion herangezogen wurden die beiden Plasmide pEGFP-N3 und pIRESneo2. Die Zellen dreier unbehandelter Kavitäten dienten als Kontrolle. Nach quantitativer Abnahme des Überstandes wurden die transfizierten Zellen 24 Stunden nach Transfektion mit 400 µl Trypsin/EDTA abgelöst und mit dem zuvor abgenommenen Überstand der jeweiligen Kavität vermischt. Dies führte zum einen zur Neutralisierung der Trypsin-Aktivität, und zum anderen konnte so die Anzahl der im Überstand befindlichen Zellen mitbestimmt werden. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 Minuten,

600 × g, 20 °C) erfolgte die Aufnahme in 200 µl PBS. Zu 20 µl dieser Lösung wurden 2 µl Propidiumiodid (500 µg/ml) und 4 µl Fluoresceindiacetat (10 µg/ml; kurz FDA), gegeben. Dabei färbt Propidiumiodid tote, FDA hingegen vitale Zellen. Die Anzahl der Propidiumiodid-gefärbten roten Zellen und die der FDA-gefärbten grünen Zellen wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer durch Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Die Exzitation betrug hierbei 450 – 490 nm.

D.2.2.3.3 Nachweis der Transienz

Prinzip

Das Vorliegen der Plasmid-DNA als episomaler Zellbestandteil und nicht als genomischer Anteil einer Zelle nimmt aufgrund verschiedener, zum Teil bereits beschriebener Mechanismen, über einen Zeitraum von wenigen Tagen ab. Dieser als Transienz bezeichnete Effekt wird durch den Nachweis der Anzahl von mRNA-Kopien der für EGFP kodierenden DNA-Sequenz über einen definierten Zeitraum bestimmt. Die RNA wird mithilfe des RNeasy Mini Kits isoliert. Die Behandlung der RNA mit DNase I wird durchgeführt, um die Bestimmung der durch reverse Transkription generierten cDNA-Sequenz nicht durch die identische EGFP-Plasmid-Sequenz zu verfälschen. Die EGFP-Kopienzahl wird daraufhin unter Zuhilfenahme der *LightCycler* Technologie der Fa. Roche, Mannheim auf transkriptioneller Ebene analysiert.

Durchführung

Zur Transfektion der Zellen wurden in insgesamt 18 Vertiefungen zweier 12-Kavitäten-Zellkulturplatten 30.000 hMSC ausgesät und diese 24 Stunden unter gewöhnlichen Kulturbedingungen inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde das Plasmid pEGFP-N3 (s. D.1.2.4.1) mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 nach dem unter I.4 beschriebenen Protokoll transfiziert. Die Aufnahme der mit 500 µl PBS gewaschenen Zellen in 350 µl RLT-Puffer zur Isolierung der RNA (s. D.2.1.9) erfolgte an Tag 1, 2, 4, 7, 10 und 14 nach Transfektion. Sowohl die cDNA-Synthese aus der isolierten Total-RNA als auch die Technik der quantitativen RT-PCR wurden analog den bereits beschriebenen Protokollen (s. D.2.1.10 und D.2.1.11) durchgeführt.

D.2.2.3.4 Kotransfektion

Prinzip

Die Transfektion zweier oder mehrerer Vektoren zum Zweck der gemeinsamen Inkorporation in die Zielzellen wird als Kotransfektion bezeichnet. Zu diesem Zweck werden in ein und demselben Ansatz mindestens zwei unterschiedliche Plasmide mit einem liposomalen Transfektionsreagens vereint und auf die hMSC gegeben. Diese Strategie wird gewählt, um die zielgerichtete Integration des Transgens mittels der Φ C31-Integrase zu ermöglichen. Dazu erfolgt die simultane Transfektion der Vektoren *pattB-IRES-neo2* (s. D.2.1.8.2) und *pCMV-Int* (s. D.1.2.4.7). Der Vektor *pCMV-Int* kodiert für die Φ C31-Integrase, die die zielgerichtete Rekombination der EGFP- und Neomycinresistenz-Expressionskassette zwischen der eingebrachten Erkennungssequenz *attB* und der genomischen pseudo-*attP*-Sequenz katalysiert.

Durchführung

Einen Tag vor der Kotransfektion erfolgte die Aussaat von 30.000 hMSC pro Vertiefung einer 12-Kavitäten-Zellkulturplatte. Dies resultierte 24 Stunden später in einer ca. 50 %igen Konfluenz der Zellen. Zur Vorbereitung der Transfektion wurde das Medium von den Zellen abgenommen und durch 800 µl frisches Stammzellwachstumsmedium ersetzt. Pro Kavität wurde in zwei 5 ml fassende Polystyrolröhrchen 100 µl Serum-freies DMEM vorgelegt. In einen der beiden Ansätze wurde nun 0,6 µg Plasmid-DNA gegeben, wobei entweder nur der Vektor *pattB-IRES-neo2* oder dieser zusammen mit dem Vektor *pCMV-Int* in den Verhältnissen 1:1, 1:5 und 1:10 pipettiert wurde. In die verbliebenen Polystyrol-Röhrchen wurde das Transfektionsreagens Lipofectamine 2000 eingebracht. Dabei betrug das Verhältnis von Reagens zur eingesetzten DNA-Menge (konstant 0,6 µg) entweder 1:1,5, 1:2,5 oder 1:3,5. Innerhalb von fünf Minuten wurden die beiden Ansätze vereint und weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die je 200 µl des DMEM-DNA-Lipofectamine 2000-Gemisches wurden nun tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 6-stündiger Inkubation der Zellen unter gewöhnlichen Kulturbedingungen erfolgten die Abnahme des Transfektionsansatzes und der Ersatz durch 1 ml frisches Stammzellwachstumsmedium. Zur Generierung einer größeren Anzahl an kotransfizierten Zellen erfolgten weitere Transfektionen im 75 cm²-Zellkulturformat. Dazu wurden 625.000 Zellen pro T75-Kulturschale eingesät und am darauf folgenden Tag nach dem etablierten Lipofectamine 2000-Protokoll transfiziert (s. E.1.1.3). Die Ratio zwischen *attB*-Vektor und *pCMV-Int* wurde zwischen 1:1, 1:2,5, 1:5 und 1:25 variiert. Die Gesamt-DNA-Menge betrug 0,17 µg pro 8500 Zellen. Vermittelt wurde die Transfektion von 0,26 µl Lipofectamine 2000 pro 8500 Zellen. Alle weiteren Schritte der Transfektion wurden analog dem optimierten Transfektionsprotokoll (s. E.1.1.3) durchgeführt.

D.2.2.3.5 Stabile Transfektion

Prinzip

Das Ziel des stabilen Gentransfers in die chromosomale DNA besteht in der moderaten aber konstanten Expression des Transgens über einen Zeitraum von mehreren Wochen bis Monaten. Dazu bedarf es der Integration der inkorporierten DNA in das Genom der Wirtszelle. Diese Integration wird im Allgemeinen als ein sehr seltenes Ereignis erachtet. Die Unterscheidung zwischen der häufigeren transienten Expression und der stabilen Integration des Transgens gelingt meist über den Einsatz von Selektionsmarkern. Hierbei erfolgt ein Selektionsdruck mittels eines Antibiotikums, der über einen bestimmten Zeitraum auf die Zellen ausgeübt wird. Dazu ist auf den Vektoren eine Antibiotikumresistenz kodiert, die den stabil modifizierten Zellen einen Selektionsvorteil gegenüber nicht-transfizierten und auch transient transfizierten Zellen verleiht. Die Länge der Selektion hängt dabei sowohl von der Art als auch der Konzentration des Antibiotikums ab. So muss also zum einen im Vorfeld die zytotoxische Konzentration des Antibiotikums auf unbehandelte Zellen überprüft werden. Zum anderen müssen nach Beendigung der Selektion die Kultivierungsbedingungen so gewählt werden, dass die Zellen wieder expandieren, um stabil genetisch modifizierte Zellen in ausreichender Menge generieren zu können.

D.2.2.3.5.1 Dosis-Wirkungs-Analyse von Geneticin

Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten eukaryontisch wirksamen Antibiotikum handelte es sich ausnahmslos um das bereits im Abschnitt D.1.2.4 erwähnte Neomycin-Analogen Geneticin. Dieses gehört in die Klasse der Aminoglykosid-Antibiotika und blockiert die Proteinbiosynthese durch Hemmung der ribosomalen Funktion. Das Resistenzgen Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase (APH) wurde, mit Ausnahme von pCMV-Int und phrGFP-N1, von allen in dieser Arbeit verwendeten Plasmiden kodiert. Nach Transfektion der hMSC mit diesen Vektoren entgiftet das Neomycinresistenzgen das Geneticin und bewirkt so das Überleben der transfizierten Zellen. Der zugrunde liegende Mechanismus ist die Inaktivierung des Neomycins durch dessen Phosphorylierung, die von der APH unter ATP-Spaltung katalysiert wird. Legt man den Selektionsdruck über einen bestimmten Zeitraum an, wirkt Geneticin zudem zytotoxisch auf transient transfizierte Zellen, da diese dem Abbau der episomalen DNA und damit der Abnahme der Expression der Neomycinresistenz unterworfen sind. Zur Ermittlung der Konzentration, die nötig ist, um zwischen nativer und erworbener Resistenz gegen eine bestimmte Dosis Geneticin zu diskriminieren, erfolgte eine Zytotoxizitätsbestimmung. Dazu wurden in 12-Kavitäten-Zellkulturplatten 30.000 untransfizierte hMSC ausgesät. Einen Tag später erfolgte die Abnahme des Mediums und der Ersatz durch frisches Stammzellwachstumsmedium, dem zuvor jedoch Geneticin in einer Endkonzentration zwischen 100 µg/ml und 350 µg/ml (in 50 µg/µl-Schritten) zugegeben worden war. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 8 bzw. 11 Tagen kultiviert, wobei das Medium zweimal wöchentlich durch frisches Selektionsmedium ausgetauscht wurde. Die Zellen wurden nach beendeter Kultivierung mit 200 µl Trypsin/EDTA abgelöst und mit dem zuvor abgenommenen Überstand der jeweiligen Kavität vermischt. Das anschließende Procedere wurde analog dem unter D.2.2.3.2 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

D.2.2.3.5.2 Durchführung der stabilen Transfektion

Um stabil modifizierte Zellen zu generieren, wurden die Zellen wie in Abschnitt I.4 beschrieben transfiziert. 72 Stunden nach Zugabe des Transfektionsansatzes wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und gemäß des dargestellten Protokolls (s. D.2.2.2) nach Zentrifugation und Aufnahme in einer adäquaten Menge frischen Stammzellwachstumsmediums zu gleichen Teilen in einem Verhältnis von 1:5 subkultiviert, so dass die Aussaat in einer sehr geringen Zelldichte (ca. 10 %) resultierte. Die Selektion wurde 24 Stunden später mit einer Konzentration von 100 µg Geneticin pro Milliliter Stammzellwachstumsmedium eingeleitet und über 16 Tage aufrechterhalten. Dabei erfolgte der Mediumwechsel und damit zugleich die Abnahme der toten, nicht-adhärenenten Zellen im Vier-Tage-Turnus. Neben der Selektion der transfizierten Zellen wurden zugleich unbehandelte Zellen (im gleichen Zellkulturplattenformat und gleicher Dichte) unter Antibiotikum-Druck gestellt, um das Überleben nicht stabil transfizierter Zellen nach Ablauf des gewählten Zeitraums auszuschließen.

D.2.2.3.5.3 Klonale Expansion

Durch die Behandlung der transfizierten Zellen mit dem Selektionsantibiotikum nimmt die Zellzahl in der Regel um mehr als 99 % ab. Da das Ziel der stabilen Transfektion in der Generierung einer ausreichenden Anzahl von stabil modifizierten Zellen bestand, mussten diese Zellen unter Bedingungen weiterkultiviert werden, die eine ausreichende Expansion der Zellzahl ermöglichten. Um zudem genetisch einheitliche Zelllinien herzustellen, musste diese Expansion wenn möglich klonal geschehen. Der Begriff der klonalen Expansion bezeichnet die Generierung einer Vielzahl von Zellen ausgehend von einer Ursprungszelle. Um dieses zu erreichen, wurden die Zellen nach vollständiger Selektion (s. D.2.2.3.5.2) mittels Trypsin/EDTA von dem Zellkulturgefäß (s. D.2.2.2) abgenommen und in einem Verhältnis von 1 zu 2 in Zellkulturplatten mit einem Durchmesser von 10 cm² subkultiviert. Dies resultierte in einer äußerst geringen Zelldichte (2 Zellen/cm²), so dass die Zellen in einem ausreichenden Abstand voneinander klonal expandieren konnten. Eine mögliche Expansion der Zellen wurde jeden zweiten Tag kontrolliert. Falls diese eingetreten war, wurde der Klon durch selektive Trypsinierung isoliert. Dazu wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen, um das Ablösen semiadhärenter Zellen sowohl durch ausgiebiges Spülen der Zellen als auch durch Schwenken der Zellkulturplatte zu erreichen. Auf das zuvor an der Unterseite der Zellkulturplatten aufgezeichnete Feld, in dem der klonal expandierende Zellklon lokalisiert war, wurden zwischen 4 und 6 µl Trypsin/EDTA-Lösung gegeben und diese für 5 Minuten auf dem Feld belassen. Die nun abgelösten Zellen wurden zusammen mit 1 ml Stammzellwachstumsmedium, das direkt auf das Feld pipettiert wurde, in eine Vertiefung einer 6-Kavitäten-Zellkulturplatte überführt. Die Zellen wurden unter gewöhnlichen Kultivierungsbedingungen inkubiert. 24 Stunden später erfolgte der erste Mediumwechsel, die darauf folgenden im Drei- bzw. Vier-Tage-Turnus.

D.2.2.4 Differenzierung stabiler Klone

Obwohl die Fa. Lonza, USA, von der die in dieser Arbeit verwendeten humanen mesenchymalen Stammzellen erworben wurden, die Differenzierungsfähigkeit dieser Zellen in Richtung Knochen, Fett und Knorpel garantiert, wurde diese in der AG Neth mittels etablierter Methoden (Witthauer, 2003) wiederholt verifiziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte vor allem untersucht werden, ob stabil modifizierte hMSC weiterhin ihre Differenzierungsfähigkeit besitzen. Dazu wurden die Zellen den bereits etablierten Kultivierungsbedingungen, die zur osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierung der Zellen führt, unterworfen. Die Medien wurden nach ihrer Herstellung mittels eines geeigneten Filters (0,2 µm Porengröße) steril filtriert.

D.2.2.4.1 Osteogene Differenzierung

Die osteogene Differenzierung der stabil modifizierten hMSC erfolgte mithilfe eines im Labor hergestellten Mediums. Dies bestand aus dem bereits in Abschnitt D.2.2.1 beschriebenen Stammzellwachstumsmedium und folgenden Medienzusätzen, die speziell zur osteogenen Stimulation nötig waren (s. Tab. D15).

Tab. D15: Osteogene Zusätze zur osteoblastären Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen (nach Jaiswal *et al.*, 1997).

Zusatz zu 25 ml hMSC-Medium	c _{Stammlösung}	Volumen [µl]	c _{End}
Dexamethason	50 µM	50	100 nM
β-Glycerophosphat	2,5 M	100	10 mM
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	12,5 mM	100	0,05 mM

Die stabil genetisch modifizierten Zellen wurden drei Monate nach der Transfektion in zwei so genannte *Flasks-on-a-slide* (FoaS) eingesät. Hierbei handelt es sich um Polystyrolobjektträger mit einer effektiven Wachstumsfläche von 10 cm². Der Objektträger ist mit einem nach unten offenen 20 ml fassenden Polystyrol-Gefäß bedeckt, der die Kultivierung der auf dem Objektträger adhären Zellen mit 3 ml Medium erlaubt. Einer der FoaS wurde in hMSC-Vollmedium ohne (Kontrolle), der andere in hMSC-Vollmedium mit osteogenen Zusätzen kultiviert. Medienwechsel erfolgten zweimal pro Woche, die Kultivierungsdauer betrug 21 Tage. Nach Beendigung der Kultivierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und der entfernbare Kunststoffdeckel abgenommen. Eine Hälfte der auf dem Objektträger adhären Zellen wurde mittels eines sterilen Zellschabers in 350 µl RLT Puffer aufgenommen und bis zur Isolierung der RNA (s. D.2.1.9) bei 80 °C gelagert. Auf die andere Hälfte der Zellen wurden ein polymerisierendes Kunststoffreagens (ProLong AntiFade Kit, s. D.2.3) gegeben und die Zellen mit einem Deckglass eingedeckelt. So konnten die Zellen dauerhaft und ohne EGFP-Fluoreszenzverlust bei 4 °C gelagert werden.

D.2.2.4.2 Adipogene Differenzierung

Die Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen in Richtung Fettgewebe erfordert zum einen die Induktion der Fettvakuolenbildung, zum anderen die Erhaltung der gebildeten Fettzellen. Aus diesem Grund wurden zur adipogenen Differenzierung der Zellen zwei Medien hergestellt (s. Tab. D16 und D17).

Tab. D16: Adipogene Zusätze zur Induktion der Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen in Richtung Adipozyten (Adipogenes Induktionsmedium).

Zusätze zu 25 ml DMEM	c _{Stammlösung}	Volumen [µl]	c _{End}
FBS	100 %	2500	10 %
Penicillin-Streptomycin	10.000 IU bzw. µg/ml	100	40 IU bzw. µg/ml
Dexamethason	50 µM	500	0,1 µM
Indomethacin	50 mM	100	0,2 µM
Insulin	10 mg/ml	250	100 µg/ml
3-Isobutyl-1-Methylxanthin	500 mM	50	1 mM

Tab. D17: Adipogene Zusätze zur Erhaltung der Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen in Richtung Adipozyten (Adipogenes Erhaltungsmedium).

Zusätze zu 25 ml DMEM	c _{Stammlösung}	Volumen [µl]	c _{End}
FBS	100 %	2500	10 %
Penicillin-Streptomycin	10.000 IU bzw. µg/ml	100	40 IU bzw. µg/ml
Insulin	10 mg/ml	250	100 µg/ml

Drei Monate nach der Transfektion wurden die stabil modifizierten hMSC in zwei *Flasks-on-a-slide* (FoaS) eingesät. Die adipogene Differenzierung erfolgte über einen Zeitraum von 21 Tagen, wobei eine der FoaS in hMSC-Vollmedium kultiviert wurde und somit als Kontrolle diente. Das Medium wurde hier im Drei- bis Vier-Tage-Turnus gewechselt. Die adipogene Differenzierung hingegen wurde in drei Zyklen mit ansteigender Induktionsdauer von 4, 5 und 6 Tagen durchgeführt. Hierbei bezeichnet ein Zyklus die Induktion und anschließende Erhaltung bzw. Ernte der Zellen. Die Induktions- und Erhaltungsdauer ist in Tabelle D18 ersichtlich.

Tab. D18: Dauer der Induktions- und Erhaltungsperioden zur adipogenen Differenzierung von hMSC.

Zyklus	Modus	Tage
1	Induktion	4
1	Erhaltung	4
2	Induktion	5
2	Erhaltung	2
3	Induktion	6

Nach 21 Tagen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und der entfernbare Kulturdeckel der FoaS abgenommen. Eine Hälfte der auf den FoaS adhärenen Zellen wurde mit 350 µl eines Lysispuffers (RLT-Puffer, s. D.2.1.9) unter Zuhilfenahme eines Zellschabers abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die andere Hälfte wurde mit Hilfe eines polymerisierenden Kunststoffreagenzes (ProLong AntiFade Kit, s. D.2.3), das zwischen Objektträger und Deckglas gegeben wurde, dauerhaft und ohne Fluoreszenzverlust bei 4 °C gelagert.

D.2.2.4.3 Chondrogene Differenzierung

Um humane mesenchymale Stammzellen in einen chondrogenen Phänotyp zu differenzieren, mussten die Zellen als Sediment vorliegen und nicht – wie zur Differenzierung in Richtung Knochen oder Fett – in einer so genannten Monolayer-Schicht. Eine Million stabil mit dem Plasmid pEGFP-N3 transfizierte hMSC wurden dazu mittels Trypsin/EDTA-Behandlung in Suspension gebracht, die Wirkung des Trypsins durch Zugabe einer ausreichenden Menge Stammzellwachstumsmedium gestoppt und die Zellen zu gleichen Teilen in vier 15 ml-Falkonröhrchen überführt. Zwei Ansätze davon wurden zur chondrogenen Differenzierung herangezogen, wobei eines der beiden zur späteren Transkript-Analyse mittels RT-PCR, das andere zur phänotypischen Auswertung mittels Gefrierschnitten verwendet wurde. Die zwei übrigen Ansätze dienten als Kontrolle und wurden in Stammzellwachstumsmedium ohne Zusätze kultiviert. Auch hier wurden später zum einen RNA zur anschließenden Transkriptbestimmung isoliert und zum anderen Gefrierschnitte hergestellt. Nach Zentrifugation der Zellsuspensionen (5 Minuten, 600 × g, 20 °C) wurden das Medium vorsichtig abgenommen und die Sedimente entweder mit hMSC-Medium (Kontrollen) oder mit chondrogenem Differenzierungsmedium resuspendiert (s. Tab. D19).

Tab. D19: Zusätze zur Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen in die chondrogene Richtung.
Die Zugabe von TGF- β -3 (c_{End} : 0,01 $\mu\text{g/ml}$) erfolgte zum Zeitpunkt des Mediumwechsels.

Zusätze zu 18 ml DMEM	$c_{\text{Stammlösung}}$	Volumen [μl]	c_{End}
BSA	1,25 mg/ml	200	125 mg/ml
Penicillin-Streptomycin	10.000 IU bzw. $\mu\text{g/ml}$	80	40 IU bzw. $\mu\text{g/ml}$
L-Glutamin	4 mM	400	200 mM
Natriumpyruvat	1 mM	40	50 μM
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	0,17 mM	272	12,5 mM
L-Prolin	175 mM	40	0,35 mM
Linolsäure	500 \times	40	5,33 $\mu\text{g/ml}$
Insulin/Selenit/Transferrin	100 \times	250	6,25 ng/ml
Dexamethason	50 μM	40	0,1 μM

Die Kultivierung der Suspensionen in den 15 ml-Falkonröhrchen erfolgte in einem CO_2 -Brutschrank (5 % CO_2) bei 37 °C und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit. Der Deckel der Reaktionsgefäße wurde dabei nicht vollständig verschlossen, um einen ausreichenden Gasaustausch zu gewährleisten. Nach 24-stündiger Inkubation zeigte sich am Boden der Falkonröhrchen ein im Durchmesser etwa 0,5 – 1 mm großes Zellknäuel. Von diesem wurde das jeweilige Medium im Zwei- bis Drei-Tage-Turnus mit einer 1000 μl Pipette vorsichtig abgenommen und durch 1 ml frisches Differenzierungs- bzw. Stammzellwachstumsmedium ersetzt. Nach 31 Tagen Kultivierung wurden das Medium von den Zellen abgenommen und diese mit 1 ml PBS gewaschen. Zu je einem Differenzierungs- und Kontrollansatz wurden 350 μl RLT-Puffer gegeben und das Zellknäuel durch kräftiges Triturieren mit der 100 μl Pipette in Suspension überführt. Die verbliebenen beiden Sedimente wurden in 1 ml absolutem Methanol gelagert.

Die Herstellung der Gefrierschnitte, die notwendig ist um eine mikroskopische Analyse der Sedimente durchzuführen, erfolgte freundlicherweise von Frau Claudia Harbauer in der Anatomischen Anstalt der LMU München.

D.2.3 Immunfluoreszenz

Prinzip

Die Detektion transfizierter Zellen kann beispielsweise über das Markerprotein GFP erfolgen. Dabei ist die Leuchtkraft von transient transfizierten Zellen, deren GFP-Expression ein Vielfaches über der eher moderaten Expression stabiler transfizierter Zellen liegt, sehr unterschiedlich. Um zu verifizieren, dass es sich bei der Fluoreszenz stabiler Zellen um die durch GFP hervorgerufene Lichtemission handelt, wird die Technik der indirekten Immunfluoreszenz angewandt. Hierbei handelt es sich um die Detektion eines Antikörpers gegen GFP mittels eines Fluoreszenzfarbstoff-markierten Zweitantikörpers. Dies ist möglich, da der Antikörper gegen GFP einerseits in der Maus (*Mus musculus*), der Zweitantikörper andererseits im Esel (*Equinus asinus*) generiert wird und gegen den Fc-Teil von Mausantikörpern gerichtet ist. Da der mit einem Fluorochrom, wie z.B. *Texas Red*, versehene Zweitantikörper nicht gegen das eigentliche Zielprotein gerichtet ist, sondern gegen einen anderen Antikörper, spricht man von der indirekten Immunfluoreszenz. Sie hat eine Verstärkung des Signals zur Folge und bewirkt daher eine erhöhte Sensitivität.

Durchführung

Die stabil transfizierten hMSC wurden dazu in einer Dichte von 1×10^5 auf einen Glasobjektträger ausgesät, der sich in einer entsprechenden Kulturschale (Quadriperm, Nunc, USA) befand. Die Zellen wurden über Nacht unter gewöhnlichen Kultivierungsbedingungen inkubiert, tags darauf mit PBS gewaschen und anschließend 8 Minuten in 100 % eiskaltem Methanol bei -20 °C fixiert. Alle folgenden Inkubationsschritte wurden in einer feuchten und dunklen Kammer durchgeführt. Die Zellen wurden mit PBS rehydriert und der Glasobjektträger 30 Minuten mit 2 ml equinem Serum in einer Verdünnung von 1 : 20 bedeckt. Dieses Blockierungsreagens führte zur Absättigung negativ geladener Molekülgruppen der Zellen, um unspezifische Bindungen der Primärantikörper zu minimieren. Es folgte die 30-minütige Inkubation der Zellen mit $60\text{ }\mu\text{l}$ des Primärantikörpers gegen GFP ($c = 8\text{ }\mu\text{g/ml}$) und dessen Varianten, wie EGFP. Ein Abschnitt des Objektträgers wurde nicht mit dem GFP-Antikörper inkubiert. Dieser Teil wurde zur späteren Spezifitätskontrolle des Zweitantikörpers herangezogen. Nach drei 5-minütigen Waschschritten mit PBS wurden die Zellen mit dem im Esel generierten Sekundärantikörper gegen Maus-IgG (Verdünnung 1 : 200) wiederum 30 Minuten inkubiert. Dieser Sekundärantikörper war mit dem Fluorochrom *Texas Red* (Emission: 620 nm) konjugiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Färbung des Zellkerns mittels 2-minütiger Inkubation von Diaminophenylindol (DAPI, Emission: 461 nm) in einer Konzentration von $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ durchgeführt. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen mittels eines Tropfens ProLong AntiFade Kit und eines Deckglases eingebettet.

Die Detektion der Auto- und Immunfluoreszenz der Zellen erfolgte mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Die Exzitationen betragen hierbei 450 – 490 nm (GFP), 530 – 585 nm (*Texas Red*) und 365 nm (DAPI).

D.2.4 Statistik

Einer statistischen Analyse wurden alle Versuchsreihen unterzogen, die mindestens im Triplikate durchgeführt wurden. Aufgrund des Vergleichs von mindestens drei Stichproben erfolgte eine univariate Varianzanalyse mit dem so genannten ANOVA-Test. Anschließend wurde ein Tukey HSD-Test durchgeführt und hierzu ein Signifikanzniveau von 0,05 (*) bzw. 0,01 (**) angesetzt, womit die beobachteten Unterschiede mit einer Fehlerquote von <5 % bzw. <1 % belegt waren. Die Analyse der Mittelwerte und Standardabweichungen erfolgte mit dem Microsoft Office XP Programm Excel. Die weitere Analyse der Varianz und der post-hoc Tukey HSD-Test zur Ermittlung der Signifikanz wurden mit dem Programm SPSS durchgeführt.

E ERGEBNISSE

E.1 Liposomale nicht-virale Transfektion von GFP-Varianten in hMSC

Bei den in diesem Abschnitt erläuterten Transfektionen handelt es sich lediglich um einen Ausschnitt aller während dieses Promotionsvorhabens durchgeführten Transfektionen. Sie stehen beispielhaft für das jeweils verwendete Plasmid bzw. Transfektionsreagens und stellen die bereits in Vorversuchen ermittelten optimalen Mengen, Verhältnisse und Inkubationszeiten dar. Diese Vorversuche werden im jeweiligen Abschnitt zusammenfassend dargestellt.

E.1.1 Transiente Transfektion

Um sowohl das für die Transfektion humaner mesenchymaler Stammzellen am besten geeignete Transfektionsreagens zu finden als auch um die optimalen Mengen und Verhältnisse von Plasmid-DNA und Transfektionsreagens zu ermitteln, wurden drei verschiedene liposomale Transfektionsreagenzien verwendet. Zur Optimierung der Transfektion wurden hMSC mit den Vektoren pIRES2-EGFP oder pEGFP-N3 transfiziert.

Die Auswertung der Versuche erfolgte in zweierlei Hinsicht. Zum einen wurde die Anzahl der fluoreszierenden Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl aller adhärenen Zellen bestimmt. Diese so genannte Transfektionseffizienz wurde durch Quantifizierung der Zellen ermittelt, die nach Anregung durch Licht einer Wellenlänge von 490 nm grüne Fluoreszenz zeigten. Zum anderen wurde die Zellvitalität untersucht. Die Vitalität wurde durch Beobachtung von morphologischen Veränderungen und durch eine Toxizitätsanalyse der Reagenzien bestimmt.

E.1.1.1 Transfektion mittels METAFECTENE

Die von der Fa. Biontex vorgeschlagenen Optimierungsparameter (s. www.biontex.com) beziehen sich auf das Verhältnis von METAFECTENE zu DNA, die Quantität des gesamten Lipoplexes (METAFECTENE/DNA-Komplex) und den Effekt verschiedener Serumkonzentrationen während der Inkubation des Transfektionsansatzes. Daher wurden METAFECTENE/DNA-Verhältnisse zwischen 2:1 und 12:1 eingesetzt, wobei zu 10.000 Zellen 0,1 bzw. 0,2 µg Plasmid-DNA gegeben wurden. Die Inkubation der Lipoplexe erfolgte unter Serum-haltigen (10 % Serumanteil) und Serum-freien Bedingungen.

METAFECTENE-vermittelte Transfektion von pIRES2-EGFP

In der folgenden Abbildung ist das Ergebnis der Transfektion des Plasmids pIRES2-EGFP in hMSC, vermittelt durch METAFECTENE, dargestellt (s. Abb. E1). Die Inkubation erfolgte in Serum-freiem DMEM, die Inkubationszeit betrug 24 Stunden. Eine Menge von 0,2 µg transfizierter DNA pro 10.000 Zellen erwies sich bereits als verstärkt zytotoxisch. Auffallend waren hierbei, neben dem Verlust der Adhärenz vieler Zellen, insbesondere zytoplasmatische und membranständige Konglomerate. Dieser Effekt wurde durch die Verwendung größerer Mengen von METAFECTENE noch verstärkt.

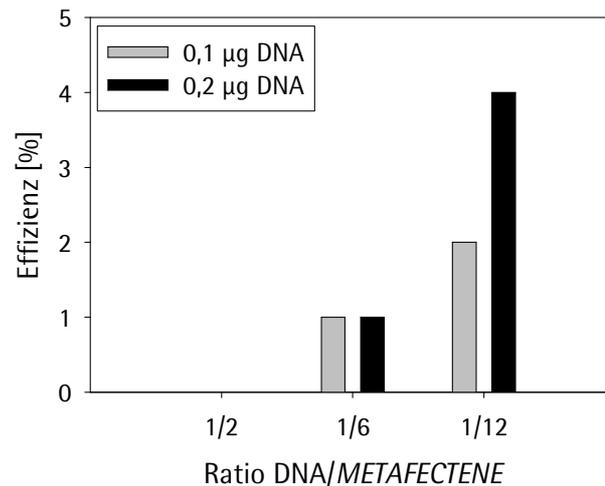


Abb. E1: Effizienz der METAFACTENE – vermittelten Transfektion von pIRES2-EGFP in hMSC. Die Transfektionseffizienz wurde 24 Stunden nach Zugabe der Lipoplexe ermittelt.

METAFACTENE-vermittelte Transfektion von pEGFP-N3

Die weitere Effizienzbestimmung erfolgte durch Transfektion des Plasmids pEGFP-N3. Der folgenden Abbildung sind die Effizienzen der METAFACTENE-vermittelten Transfektion des Plasmids pEGFP-N3 in hMSC unter 6-stündiger Inkubation der Zellen mit Serum-haltigem (10 %) Stammzellwachstumsmedium zu entnehmen (s. Abb. E2). Die signifikant höchste Transfektionseffizienz wurde durch die Zugabe von 0,2 µg DNA und 1,2 µl METAFACTENE (Ratio 1:6) pro 10.000 Zellen erreicht.

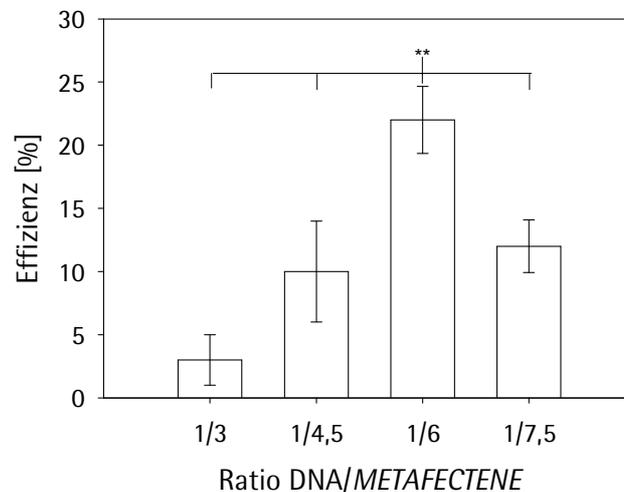


Abb. E2: Effizienz der METAFACTENE-vermittelten Transfektion von pEGFP-N3 in hMSC.

Die Effizienz wurde 24 Stunden nach Transfektion quantifiziert. Die statistische Analyse wurde mittels ein-faktoriellem ANOVA-Test durchgeführt, das Signifikanzniveau von $p < 0,01$ (**) wurde mit dem Tukey HSD-Test errechnet.

Zusammenfassung

Eine Reduzierung des Serumanteils zur Inkubation des Transfektionsansatzes bewirkte eine Abnahme der Transfektionseffizienz. Zudem resultierte die Serum-freie Inkubation der Lipoplexe auf den Zellen in einer verminderten Überlebensrate und einer Veränderung der Zellmorphologie. Daher wurden die Lipoplexe auf den Zellen in Serum-haltigem Medium inkubiert. Allerdings zeigte sich eine unabhängig von der Serumkonzentration auftretende rote Autofluores-

zenz (ca. 620 nm, s. Abb. E3 b, c). Diese war lediglich bei der METAFECTENE-vermittelten Transfektion zu beobachten (s. Abb. E3).

Im Mittel ließen sich durch das Reagens METAFECTENE ca. 20 - 25 % der hMSC transfizieren. Die Transfektionseffizienz des bicistronischen Vektors pIRES2-EGFP, der das in Abhängigkeit des IRES-Elementes translatierte Gen EGFP kodiert, lag mit maximal 4 % um mehr als das 6-fache darunter.



Abb. E3: METAFECTENE-vermittelte Transfektion von pEGFP-N3 in hMSC.

- (a) Aufnahme zweier EGFP-exprimierender hMSC in $400\times$ Vergrößerung (Exz.: 450-490 nm). Balken = 50 μm
 (b) Überlagerung der Fluoreszenzemissionen bei 450-490 nm (GFP-Kanal) und 530-585 nm (*Texas Red*-Kanal) in $100\times$ Vergrößerung. Balken = 50 μm
 (c) Autofluoreszenz nach METAFECTENE-vermittelter Transfektion. Aufnahme in $100\times$ Vergrößerung bei 530-585 nm Exzitation. Balken = 50 μm

Alle Parameter, die zur Erzielung einer maximalen Transfektionseffizienz mithilfe des Reagenzes METAFECTENE optimiert wurden, finden sich im Transfektionsprotokoll im Anhang dieser Arbeit (s. I2) zusammengefasst.

E.1.1.2 Transfektion mittels Lipofectamine Plus

Da es sich bei dem Transfektionsreagens Lipofectamine Plus (www.invitrogen.com) um ein 2-Komponenten-Reagens handelt, mussten sowohl die Verhältnisse von DNA zum Präkomplexierungsreagens *Plus* sowie von DNA zum eigentlichen Transfektionsreagens Lipofectamine als auch die Quantität des Gesamtansatzes bezogen auf die Anzahl der zu transfizierenden Zellen optimiert werden. Zusätzlich wurde die Inkubationsdauer des Transfektionsansatzes variiert. Da die Anwesenheit von Serum die Lipofectamine Plus-vermittelte Transfektion inhibiert, spielte die Modulation der Serum-Bedingungen im Falle von Lipofectamine Plus keine Rolle. Wie bereits in Abschnitt D.2.2.3.1.2 dargestellt, wurden zwischen 0,1 und 0,4 μg DNA zur Transfektion eingesetzt. Die Verhältnisse von Präkomplexierungsreagens zu DNA wurden zwischen 2:1 und 14:1 variiert, die Verhältnisse von Transfektionsreagens Lipofectamine zu DNA zwischen 2:1 und 12:1.

Lipofectamine Plus-vermittelte Transfektion von pIRES2-EGFP

Die Untersuchung der Transfektionseffizienz wurde primär durch Transfektion des Plasmids pIRES2-EGFP durchgeführt. Der nachstehenden Abbildung sind die Effizienzen der mit variierenden Parametern durchgeführten Transfektionen zu entnehmen (s. Abb. E4). Auf der Abszisse ist das Verhältnis von DNA zu Lipofectamine aufgetragen, auf der Ordinate die erzielte Transfektionseffizienz. Grau bzw. schwarz sind die transfizierten Mengen an DNA dargestellt (0,1 μg bzw. 0,2 μg pro 10.000 Zellen).

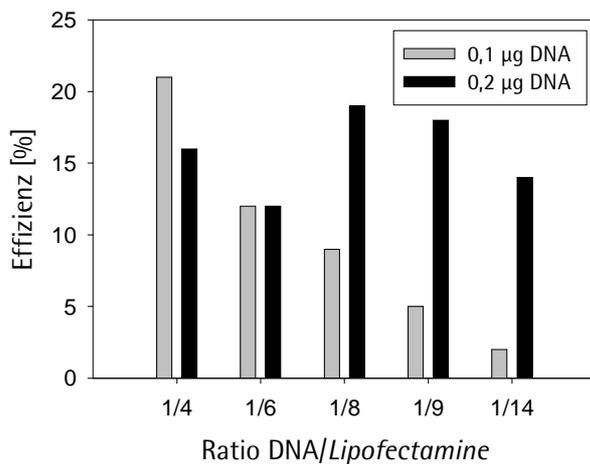


Abb. E4: Effizienz der Lipofectamine Plus-vermittelten Transfektion von pIRES2-EGFP in hMSC.

Ermittlung der Effizienz 24 Stunden nach Transfektion.

Die höchste Anzahl transfizierter Zellen (21 %) wurde durch Präkomplexierung von 0,2 µg DNA pro 10.000 Zellen mit 0,6 µl *Plus*-Reagens (Ratio 1:3) und anschließender Komplexierung dieser Lösung mit 0,8 µl Lipofectamine (Ratio 1:4) erhalten. Eine annähernd hohe Transfektionseffizienz wurde durch die Präkomplexierung von 0,1 µg DNA pro 10.000 Zellen mit 0,6 µl *Plus*-Reagens (Ratio 1:3) und darauf folgender Komplexierung mit 0,8 µl Lipofectamine (Ratio 1:8) erzielt.

Lipofectamine Plus-vermittelte Transfektion von pEGFP-N3

Dass die Transfektion von 0,2 µg des mit 0,6 µl *Plus*-Reagens präkomplexierten Plasmids pEGFP-N3 (jeweils pro 10.000 Zellen) mittels Lipofectamine Plus ebenfalls zur höchsten Transfektionseffizienz führte, ist aus nachstehender Abbildung ersichtlich (s. Abb. E5). Die Inkubation des Transfektionsansatzes auf den Zellen wurde über einen Zeitraum von 6 Stunden in Serum-freiem DMEM durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in Stammzellwachstumsmedium kultiviert.

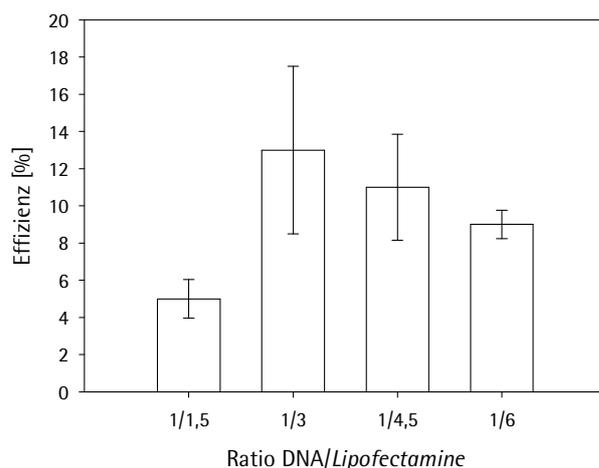


Abb. E5: Effizienz der Lipofectamine Plus-vermittelten Transfektion von pEGFP-N3 in hMSC. Eingesetzt wurden 0,2 µg DNA und 0,6 µl *Plus*-Reagens pro 10.000 Zellen. Die Ermittlung der Effizienz wurde 24 Stunden nach Transfektion durchgeführt. Die statistische Analyse wurde mittels einfaktoriellem ANOVA-Test durchgeführt, ein Signifikanzniveau wurde mit dem Tukey HSD-Test ausgeschlossen.

Zusammenfassung

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Effizienz der Lipofectamine Plus-vermittelten Transfektion von hMSC zwischen 5 % und 13 % lag. Offensichtliche morphologische Veränderungen - z.B. die Auflösung der Zellmembran und vermehrter Adhärenzverlust - zeigten sich erst ab Lipofectamine-Konzentrationen von 1,0 µl pro 10.000 Zellen (s. Abb. E6).

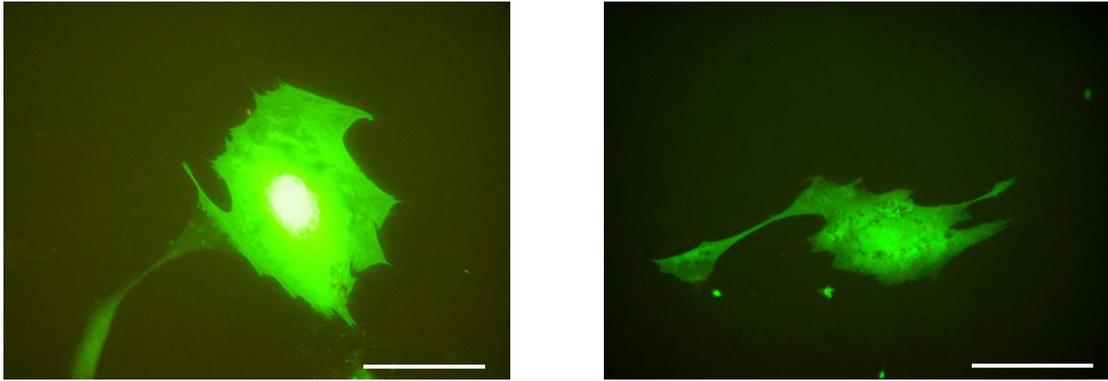


Abb. E6: Lipofectamine Plus-vermittelte Transfektion von pEGFP-N3 in hMSC. Aufnahmen zweier Zellen in 400 \times Vergrößerung (Exz.: 450-490 nm). Balken = 50 μ m.

Durch die gezielte Optimierung der Transfektionsparameter wurde ein Transfektionsprotokoll entwickelt, welches im Anhang der vorliegenden Arbeit zu finden ist (s. I3).

E.1.1.3 Transfektion mittels Lipofectamine 2000

Die im Lipofectamine 2000-Transfektionsprotokoll (www.invitrogen.com) vorgeschlagenen Optimierungsparameter beziehen sich auf die Konzentrationen der zu transfizierenden DNA und des Lipofectamine 2000. Die Transfektion unter Serum-haltiger Inkubation des Transfektionsansatzes auf den Zellen hat laut Herstellerangaben keinen negativen Einfluss auf die Effizienz des Gentransfers. Die Zellen sollen sich in gut proliferierendem Zustand befinden, als Anhaltspunkt werden 90 % Konfluenz angegeben. Zur Generierung stabil transfizierter Zellen hingegen sollte dieser Wert laut der Fa. Invitrogen auf 50 % reduziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden alle diese Parameter optimiert, da sich von Beginn an sehr hohe Transfektionseffizienzen abzeichneten.

Lipofectamine 2000-vermittelte Transfektion von pIRES2-EGFP

Primär erfolgte die Bestimmung der Transfektionseffizienz, indem das Plasmid pIRES2-EGFP in den Mengen von 0,17 und 0,35 μ g pro 8500 Zellen eingesetzt wurde. Das Verhältnis DNA zu Lipofectamine 2000 lag zwischen 1:0,25 und 1:3. Die höchste Effizienz (26,9 %) konnte mit der Kombination von 0,17 μ g pIRES2-EGFP und 0,26 μ l Lipofectamine 2000 (Ratio 1 : 1,5) erreicht werden (s. Abb. E7).

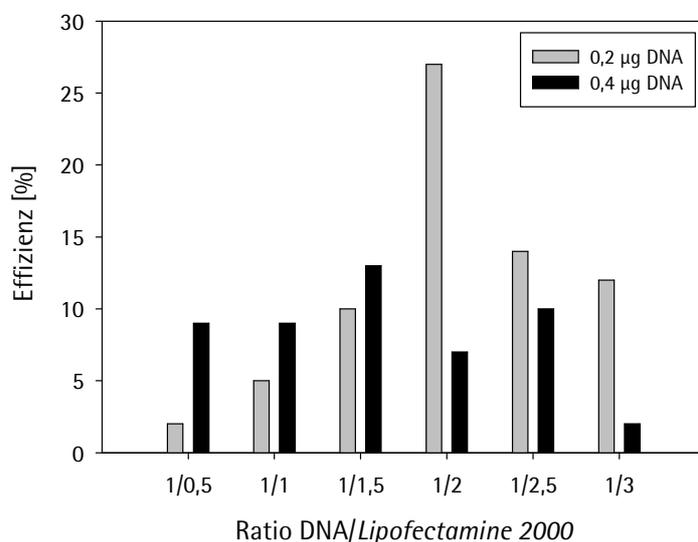


Abb. E7: Effizienz der durch Lipofectamine 2000 vermittelten Transfektion von pIRES2-EGFP in hMSC. Ermittlung der Effizienz 24 Stunden nach Transfektion.

Lipofectamine 2000-vermittelte Transfektion von pEGFP-N3

Die Transfektion des Vektors pEGFP-N3 mittels Lipofectamine 2000 ist aus nachstehender Abbildung zu entnehmen. Eingesetzt wurden 0,17 µg DNA pro 8500 Zellen. Die Inkubation des Transfektionsansatzes betrug 6 Stunden. Die Auswertung erfolgte 24 Stunden nach Transfektion. Die signifikant höchste Effizienz lag hier bei 50 % (s. Abb. E8).

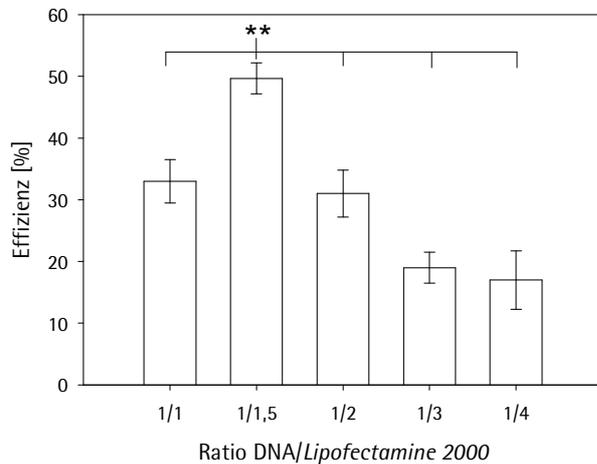


Abb. E8: Effizienz der durch Lipofectamine 2000 vermittelten Transfektion von pEGFP-N3 in hMSC. Eingesetzt wurden 0,17 µg DNA pro 8500 Zellen. 24 Stunden nach Transfektion wurde die Transfektionseffizienz ermittelt. Die statistische Analyse wurde mittels einfaktoriellem ANOVA-Test durchgeführt, das Signifikanzniveau von $p < 0,01$ (**) wurde mit dem Tukey HSD-Test errechnet.

Bestimmung der Zelldichte

Der Einfluss der Zelldichte auf die Transfektionseffizienz ist aus Abb. E9 ersichtlich. Es zeigte sich, dass die Effizienz der Transfektion tendenziell mit zunehmender Konfluenz ansteigt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Effizienzen bei 40, 60 und 80-prozentiger Konfluenz bestand hingegen nicht (s. Abb. E9).

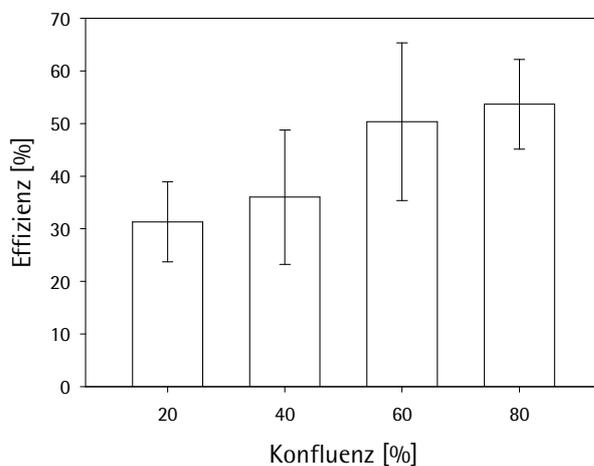


Abb. E9: Effizienz der Lipofectamine 2000-vermittelten Transfektion von pEGFP-N3 in hMSC verschiedener Konfluenzgrade. Eingesetzt wurden 0,17 µg DNA pro 8500 Zellen, die Effizienz wurde 24 Stunden nach Transfektion ermittelt. Die statistische Analyse wurde mittels einfaktoriellem ANOVA-Test durchgeführt, ein Signifikanzniveau wurde mit dem Tukey HSD-Test ausgeschlossen.

Zusammenfassung

Die durch das Reagens Lipofectamine 2000 vermittelten Transfektionen der Vektoren pIRES2-EGFP und pEGFP-N3 in hMSC resultierten in einer maximalen Effizienz von 27 bzw. 50 %. Zur Erzielung dieser Effizienzen betrug der Konfluenzgrad der Zellen zwischen 40 und 80 %. Ab einem zur Transfektion eingesetzten Volumen von 0,85 µl Lipofectamine 2000 pro 8500 Zellen war eine Auflösung der Zellmembran zu beobachten. In Abb. E10 ist beispielhaft die Transfektion des Vektors pEGFP-N3 bei 50 % Konfluenz wiedergegeben.

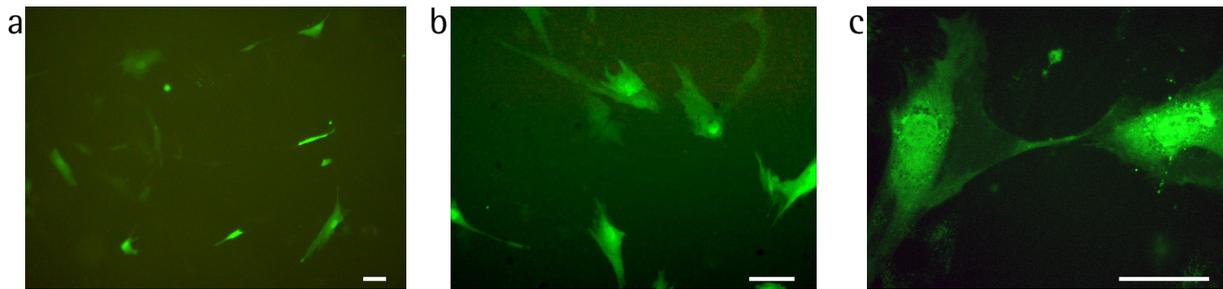


Abb. E10: Transiente Transfektion von pEGFP-N3 vermittelt durch Lipofectamine 2000. hMSC wurden mit einer Zelldichte von 50 % ausplattiert und tags darauf transfiziert. Die Bestimmung der EGFP-Expression erfolgte 24 Stunden nach Transfektion. (a) 100 × Vergrößerung, (b) 200 × Vergrößerung, (c) 400 × Vergrößerung. Aufnahme unter Fluoreszenz (Exz. 450–490 nm). Balken = 50 µm.

Die optimierten Parameter sind in einem Transfektionsprotokoll, das sich im Anhang dieser Arbeit befindet noch einmal zusammenfassend dargestellt (s. I.4).

E.1.1.4 Toxizitätsanalyse und Bestimmung der Transfektionsrate

Wie oben bereits angeführt, wird der Anteil der fluoreszierenden Zellen an der Gesamtzahl aller adhärennten Zellen als Transfektionseffizienz bezeichnet. Die effektive Ausbeute von transfizierten Zellen schließt jedoch die Anzahl der Zellen aus, die durch die gewählten Transfektionsbedingungen nicht weiter kultivierbar sind. Somit errechnet sich die Transfektionsrate aus Transfektionseffizienz und Überlebensrate der Zellen. Entsprechend wurde in der Versuchsanordnung zur Ermittlung der Transfektionsrate die Toxizität der in dieser Arbeit verwendeten Transfektionsreagenzien bestimmt. Dazu wurden die Zellen nach den optimierten Transfektionsprotokollen (s. E.1.1.1, E.1.1.2 und E.1.1.3) transfiziert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Viabilität der Zellen wie in D.2.2.3.2 beschrieben. Es zeigte sich, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen mindestens 80 % der Zellen die Transfektionsprozedur überlebt hatten (s. Abb. E11). Ein signifikanter Unterschied in der Viabilität zwischen den einzelnen Transfektionseffizienzen bestand hingegen nicht. Ebenso konnte kein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate zwischen der Transfektion des für EGFP kodierenden Plasmids pEGFP-N3 und des für die APH kodierenden Plasmids pIRESneo2 beobachtet werden (s. Abb. E11).

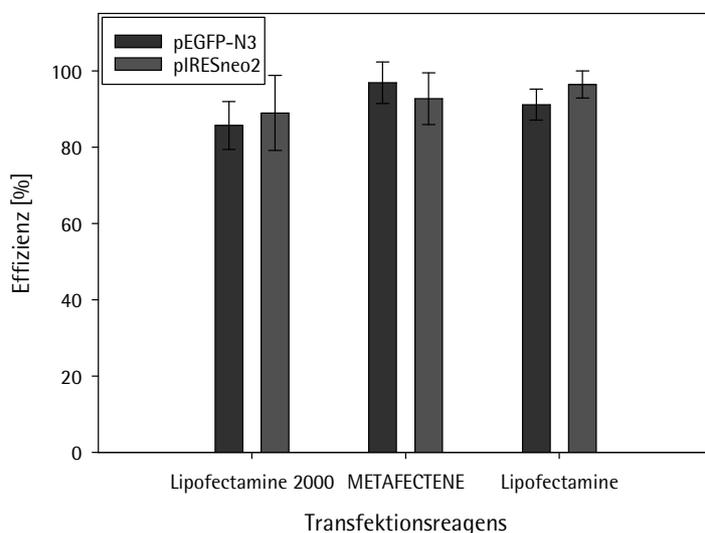


Abb. E11: Viabilität von hMSC 24 Stunden nach Transfektion mit Lipofectamine 2000, METAFECTENE und Lipofectamine. Transfiziert wurden die Plasmide pEGFP-N3 und pIRESneo2 unter den jeweils optimierten Parametern. Die statistische Analyse wurde mittels einfaktoriellem ANOVA-Test durchgeführt, ein Signifikanzniveau wurde mit dem Tukey HSD-Test ausgeschlossen.

E.1.1.5 Transienz der Transfektion

Hierzu wurden hMSC, wie in Abschnitt D.2.2.3.3 beschrieben, mit dem Vektor pEGFP-N3 unter Verwendung des Transfektionsreagenzes Lipofectamine 2000 nach dem optimierten Protokoll (s. E.1.1.3) transfiziert. Über einen Zeitraum von 14 Tagen (1, 2, 4, 7, 10 und 14 Tag(e) nach Transfektion) wurde die EGFP-Kopienzahl mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Die Anzahl der ermittelten EGFP-Kopienzahl in jeweils 5 ng revers transkribierter und DNase-behandelter Total-RNA ist in Abb. E12 zusammenfassend dargestellt. Demnach konnte die höchste Zahl 310.000 Kopien (100 %) an EGFP-mRNA-Transkripten einen Tag nach der Transfektion detektiert werden, die sich bis zum Tag 14 auf 0,052 % reduzierte. Dieser Nachweis korreliert mit der Beobachtung mittels Fluoreszenzmikroskopie. Insgesamt konnte auf Proteinebene 24 –48 Stunden nach Transfektion die höchste EGFP-Expression beobachtet werden. So konnten mittels Fluoreszenzmikroskopie an Tag 1 und 2 nach Transfektion mehr als 50 % der Zellen als EGFP-synthetisierend detektiert werden.

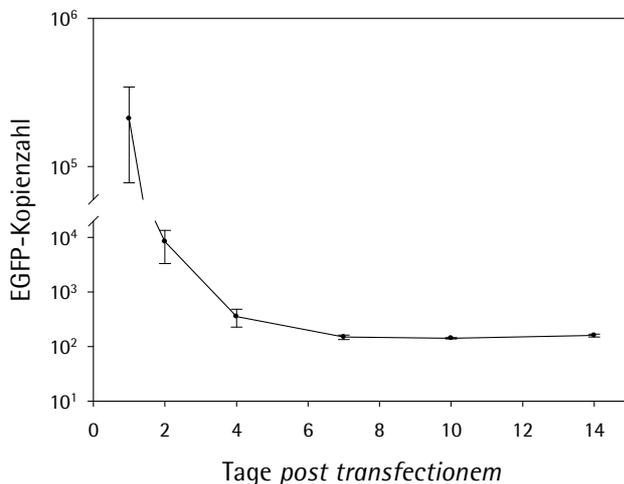
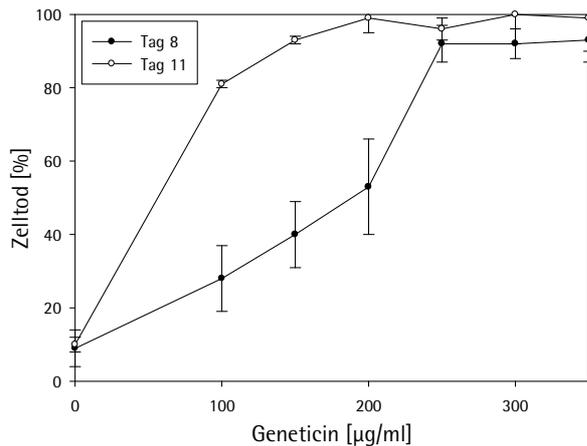


Abb. E12: EGFP-cDNA-Kopienzahl pro 5 ng revers transkribierter und DNase-behandelter Total-RNA über einen Zeitraum von 14 Tagen. Der höchsten EGFP-Expression 24 Stunden nach der Transfektion folgt ein rapider Abfall der EGFP-Kopienzahl. Die statistische Analyse wurde mittels einfaktoriellem ANOVA-Test durchgeführt.

E.1.2 Stabile Transfektion

E.1.2.1 Dosis-Wirkungsanalyse von Geneticin

Die Bestimmung der zytotoxischen Konzentration des zur Selektion stabil transfizierter hMSC verwendeten Antibiotikums Geneticin erfolgte an nicht-transfizierten Zellen. Somit konnte die Geneticin-Konzentration ermittelt werden, die nötig ist, um alle eingesetzten Zellen abzutöten. Die Ergebnisse an Tag 8 und Tag 11 nach Beginn der Selektion sind aus Abb. E13 ersichtlich. Eine Erhöhung der Geneticin-Konzentration bewirkt eine zunehmende Steigerung der Zytotoxizität. So reichen 200 µg/ml Geneticin über einen Zeitraum von 11 Tagen mit relativer Sicherheit (99 % ± 4 % der Zellen) aus, um die Selektion einer hMSC-Population zu gewährleisten, die durch Expression des Transgens APH resistent gegenüber Geneticin sind.



E13: Dosis-Wirkungsanalyse von Geneticin. Zunehmende Geneticin-Konzentrationen (Abszisse) führen zu einem verstärkten Zelltod (Ordinate). Die Auswertung erfolgte 8 bzw. 11 Tage nach Transfektion. Die statistische Analyse wurde mittels ein-faktoriellem ANOVA-Test durchgeführt.

E.1.2.2 Stabile Transfektion von pEGFP-N3 in hMSC

Zum Zweck der stabilen Transfektion humaner mesenchymaler Stammzellen erfolgte die Transfektion nach dem optimierten Transfektionsprotokoll (s. E.1.1.3). Die Zellen wurden als stabil transfiziert bezeichnet, wenn sie dem Selektionsdruck in Geneticin-haltigem Medium ($c = 200 \mu\text{g/ml}$) über einen Zeitraum von mindestens 16 Tagen standhalten konnten. Um mit höherer Sicherheit von einer Selektion der letztgenannten Zellpopulation ausgehen zu können, wurde jeweils eine Kontrollpopulation von untransfizierten Zellen mit Geneticin behandelt. Die Selektion wurde zu dem Zeitpunkt beendet, an dem keine adhärenzte Zelle mehr in der untransfizierten Kontrolle nachgewiesen werden konnte.

Nach Subkultivierung der Zellen erfolgte die weitere Kultivierung in Stammzellwachstumsmedium ohne Antibiotikum. Vorversuche hatten nämlich gezeigt, dass Geneticin die Proliferation der Zellen hemmt. Nachdem eine klonale Expansion mancher stabil transfizierter Zellen eingetreten war, wurden diese Klone mittels Trypsin/EDTA-Behandlung abgenommen und in je einer Kavität einer 6-Kavitäten-Zellkulturplatte weiter kultiviert.

Die Überprüfung der stabilen Transfektion, im Sinne eines Einbaus des Vektors in das Genom der hMSC oder seiner episomalen Persistenz, erfolgte zum einen über den Nachweis durch indirekte Immunfluoreszenz (s. E.1.2.3) und zum anderen durch die Bestimmung der EGFP-mRNA-Kopien mittels quantitativer RT-PCR (s. E.1.3). Die Abbildung E14 zeigt stabil pEGFP-N3-transfizierte hMSC dreieinhalb Monate nach Transfektion.

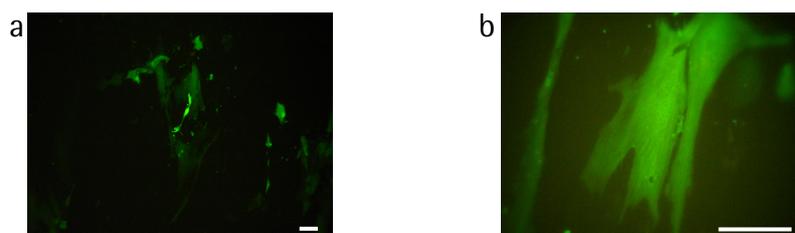


Abb. E14: Stabil mit pEGFP-N3 transfizierte hMSC.

(a) $100\times$ Vergrößerung; (b) $400\times$ Vergrößerung. Aufnahmen unter Fluoreszenz (Exz. 450–490 nm) 15 Wochen nach Transfektion. Balken = $50 \mu\text{m}$.

E.1.2.3 Immunfluoreszenz stabil EGFP-exprimierender hMSC

Die EGFP-Expression stabil transfizierter hMSC wurde zusätzlich durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen. Das im Kapitel D.2.3 beschriebene Procedere führte im Ergebnis zu einer sehr sensitiven und spezifischen Detektion der stabil EGFP-exprimierenden hMSC (s. Abb. E15). Die Spezifität des Sekundärantikörpers wurde mittels eines Kontrollfeldes überprüft, in dem kein Primärantikörper auf die Zellen gegeben worden war. Da hier keine dem Fluorochrom *Texas Red* entsprechende Emission detektiert wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass der Sekundär- an den Primärantikörper spezifisch gebunden hatte. Die Spezifität des Primärantikörpers (Anti-GFP-AK) wurde durch die Kolo-kalisation der Emission von roter und grüner Fluoreszenz nachgewiesen. Somit hatte der Primärantikörper an das exprimierte EGFP gebunden und nicht an andere Protein- oder Zellstrukturen. Die hohe Sensitivität zeigte sich zudem insbesondere durch die verstärkte Fluoreszenz im Wellenbereich des Fluorochroms *Texas Red*, welches an den Sekundärantikörper gebunden war. Dieses Signal war in höherem Maße detektierbar als das der EGFP-Autofluoreszenz.

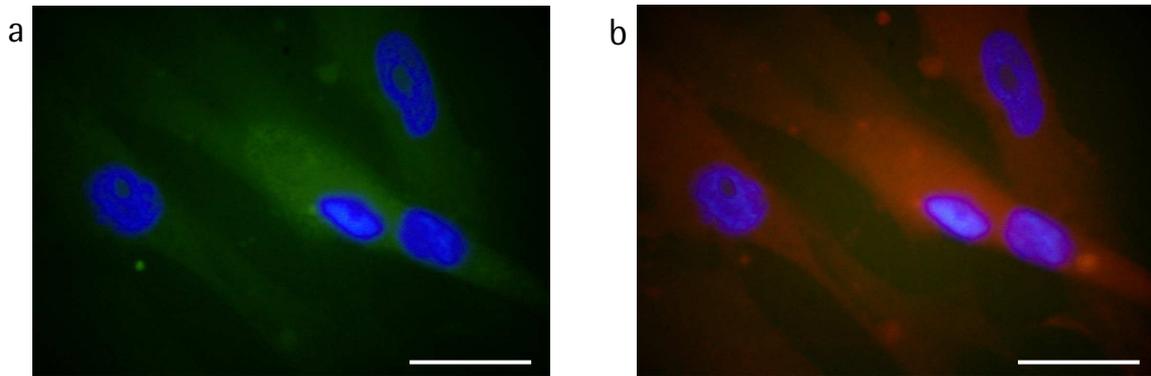


Abb. E15: Auto- und Immunfluoreszenz stabil EGFP-exprimierender hMSC.

Dargestellt ist die Kolo-kalisation der EGFP-Expression mit der sekundären Immunfluoreszenz (*Texas Red*). Zusätzlich wurde eine DAPI-Kernfärbung durchgeführt. Die Aufnahmen erfolgten 12 Wochen nach Transfektion.

- (a) Exzitation bei 450–490 nm zur Darstellung der EGFP-Expression und der DAPI-Kernfärbung. Aufnahme in 400 × Vergrößerung.
- (b) Darstellung der identischen Zellen unter Anregung von Licht einer Wellenlänge zwischen 530 und 585 nm zum Nachweis des mit *Texas Red* markierten Sekundärantikörpers. 400 × Vergrößerung, Balken = 50 µm.

E.1.3 Differenzierung stabiler hMSC

Der Stammzellcharakter von hMSC beinhaltet die Differenzierungsfähigkeit in mindestens drei mesodermale Phänotypen. Um zu untersuchen, ob bzw. inwieweit die genetische Modifikation diese Differenzierungen beeinflusst, wurden stabil EGFP-exprimierende hMSC in die osteoblastäre, adipozytäre und chondrozytäre Richtung differenziert. Dabei wurden sowohl morphologische als auch transkriptionelle Veränderungen evaluiert.

E.1.3.1 Osteogene Differenzierung

E.1.3.1.1 Morphologische Veränderungen

Die 21-tägige osteogene Differenzierung der stabil EGFP-exprimierenden hMSC führte zu dem charakteristischen Phänotyp. So zeigte sich auflichtmikroskopisch in 100-facher Vergrößerung – ähnlich wie bei nicht genetisch modifizierten hMSC – bereits nach wenigen Tagen eine beginnende Anordnung der Zellen im so genannten „Cobblestone“-Muster („Kopfsteinplaster“) (s. Abb. E16b). Bei stärkerer Vergrößerung wiesen undifferenzierte hMSC (Kontrolle) eine spindelförmige, bipolare Zellmorphologie auf (s. Abb. E16e). Im Vergleich dazu zeigten osteoblastär differenzierte hMSC eine typische polygonale Zellform mit epithelähnlich eng beieinander liegenden Zellen (s. Abb. E16f). Allerdings konnten auch Zellen mit prominenten, zum Teil bipolaren Zellausläufern beobachtet werden, die undifferenzierten Stammzellen ähnelten. Dieser Beobachtung lag die Differenzierung einer heterogenen Zellpopulation aus EGFP exprimierenden und nicht-fluoreszierenden Zellen zugrunde (s. Abb. E17).

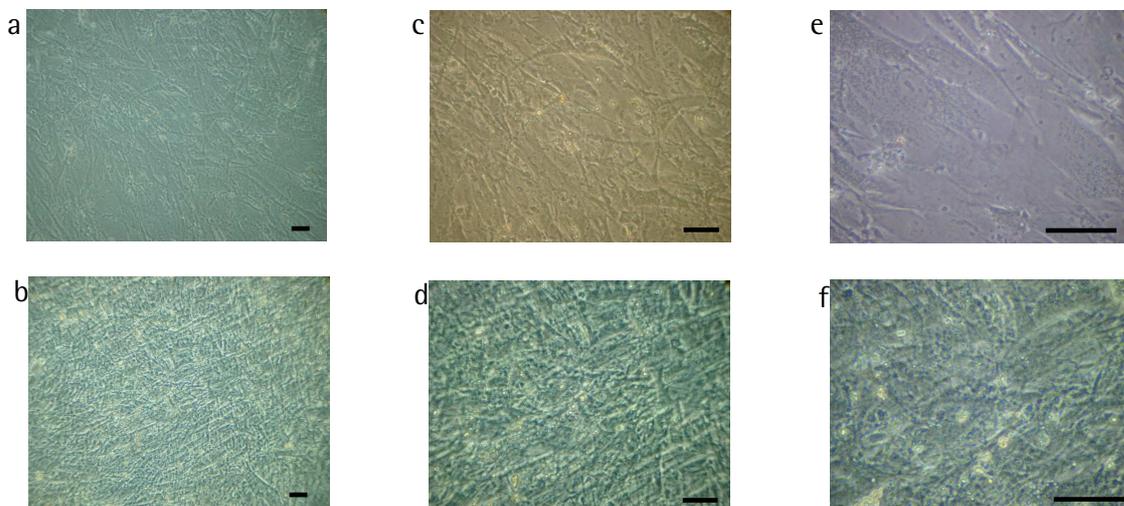


Abb. E16: Osteogene Differenzierung stabil transfizierter hMSC im Vergleich zu undifferenzierten Kontrollen. 100 × (a, b), 200 × (c, d) und 400 × (e, f) Vergrößerung der osteogen differenzierten Zellen an Tag 21 (b, d, f) im Vergleich zur Kontrollpopulation (a, c, e) im Phasenkontrast. Weitere Erklärung siehe Text. Balken = 50 µm.

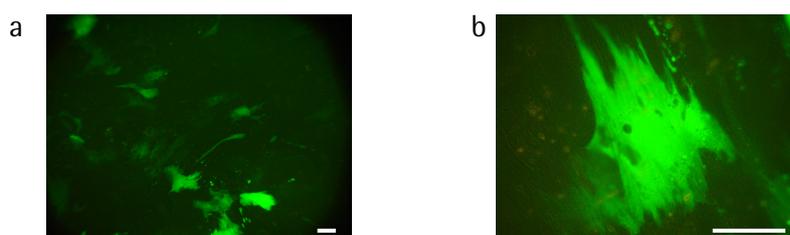


Abb. E17: Osteogene Differenzierung von stabil EGFP-exprimierenden hMSC. 100 × Vergrößerung (a) und 400 × Vergrößerung (b) der osteogen differenzierten Zellen an Tag 21 (Exz.: 450-490 nm). Balken = 50 µm.

E.1.3.1.2 Transkriptionelle Veränderungen

Die Bestimmung der mRNA-Transkripte von EGFP (Transgen) und Alkalischer Phosphatase (osteogenes Markerprotein) erfolgte durch quantitative RT-PCR im *LightCycler*. Dazu wurden nach vollständiger osteogener Stimulation der stabil transfizierten Zellen jeweils 5 ng revers transkribierte und DNase-behandelte Total-RNA zur quantitativen Bestimmung der Kopienzahl der jeweiligen cDNAs eingesetzt. In Abb. E18 ist das Expressionsniveau der beiden Genprodukte aufgetragen. Als Kontrolle dienten hierbei stabil EGFP-exprimierende hMSC, die in Stammzellwachstumsmedium ohne osteogene Zusätze kultiviert worden waren. Nach 21-tägiger Differenzierung stabil transfizierter hMSC in einen osteogenen Phänotyp konnte mittels quantitativer RT-PCR ein Anstieg der Knochen-spezifischen Alkalischen Phosphatase um das ca. 20-fache beobachtet werden (s. Abb. E18). Dieser Wert wurde zuvor auf GAPDH, einem zur Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels nötigen Enzym, auch als *Housekeeping-Gen* bezeichnet, normiert. Die Transkription der GAPDH sank im Verlaufe der Differenzierung um 74 % (s. Abb D19). Der Nachweis des Transgens EGFP wurde ebenso mithilfe der quantitativen RT-PCR durchgeführt. Hier sank die EGFP-Expression osteogen differenzierter hMSC im Vergleich zur in Stammzellwachstumsmedium kultivierten Stammzellen auf 18 %. Nach Normierung auf die Transkription von GAPDH lag dieser Wert bei 69 %.

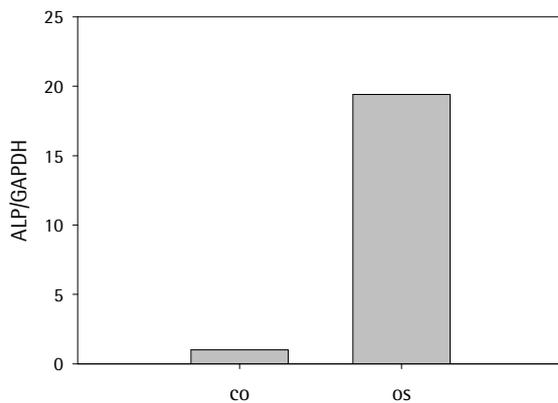


Abb. E18: Quantitative RT-PCR der differentiellen Transkription des osteogenen Markergens Alkalische Phosphatase nach osteogener Induktion stabil transfizierter hMSC.

ALP: Alkalische Phosphatase; GAPDH: Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase; co: Kontrollpopulation undifferenzierter hMSC; os: osteogen differenzierte hMSC.

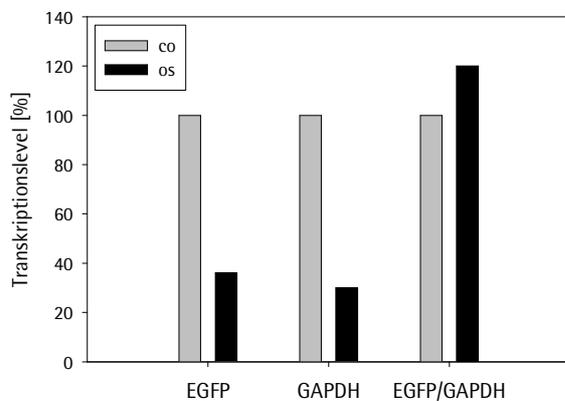


Abb. E19: Quantitative RT-PCR der differentiellen EGFP-Transkription nach osteogener Induktion stabil transfizierter hMSC.

EGFP: *enhanced green fluorescent protein*; GAPDH: Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase; co: Kontrollpopulation undifferenzierter hMSC; os: osteogen differenzierte hMSC.

E.1.3.2 Adipogene Differenzierung

E.1.3.2.1 Morphologische Veränderungen

Die in drei Zyklen durchgeführte adipogene Differenzierung stabil EGFP-transfizierter hMSC mittels des hergestellten Induktions- und Erhaltungsmediums (s. D.2.2.4.2) führte bereits nach sechs Tagen zu einer zellmorphologischen Veränderung im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrollpopulation. Die ursprünglich zumeist spindelförmigen, bipolaren Zellen nahmen eine abgerundete, polygonale Form ein, wobei ihr Zellkern nahezu zentral lag. Bei einzelnen Zellen dominierten bereits nach dieser ersten Induktion multiple nicht konfluierende Fettvakuolen im zytoplasmatischen Kompartiment der Zellen (s. Abb. E20).

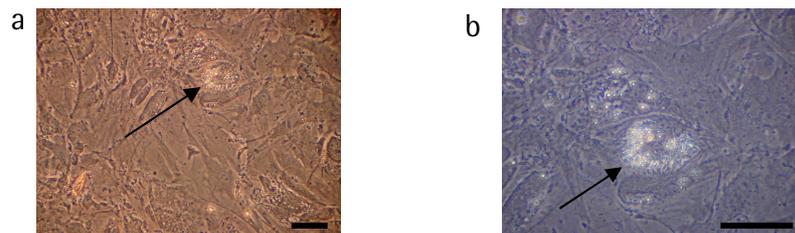


Abb. E20: Adipogene Differenzierung von stabil EGFP-transfizierten hMSC nach 6 Tagen.

In der adipogen differenzierten Zellpopulation zeigen sich bereits nach 6 Tagen Zellen mit zytoplasmatischen Lipid-Vakuolen. Bei stärkerer Vergrößerung der mittels eines Pfeils markierten Zelle (a, 200 × Vergrößerung) sind diese im Phasenkontrast deutlich zu erkennen (b, 400 × Vergrößerung). Balken = 50 µm.

Die Inkubation der Zellen in adipogenem Erhaltungsmedium (s. D.2.2.4.2) führte insgesamt zu einer Abnahme der Anzahl und Größe der Fettvakuolen. Aus diesem Grund erfolgte die 21-tägige Differenzierung mit ansteigender Induktionsdauer, so dass im Gesamtverlauf durch eine sukzessive Verlängerung der Induktionsphasen eine effizientere adipozytäre Differenzierung erreicht werden konnte (s. Abb. E21 und E22).

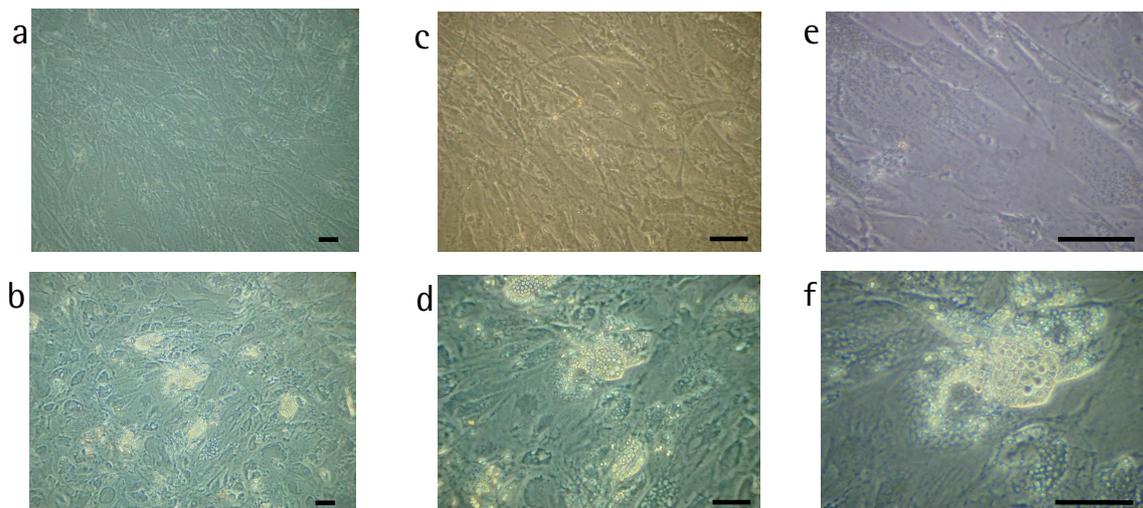


Abb. E21: Adipogene Differenzierung von stabil EGFP-transfizierten hMSC an Tag 21.

Nach 3-wöchiger Differenzierung (b, d, f) steigt im Vergleich zur Kontrollpopulation (a, c, e) sowohl die Anzahl der Zellen mit zytoplasmatischen Fettvakuolen als auch die Anzahl der Fettvakuolen selbst. Aufnahmen in 100 × (a, b), 200 × (c, d) und 400 × (e, f) Vergrößerung. Balken = 50 µm.

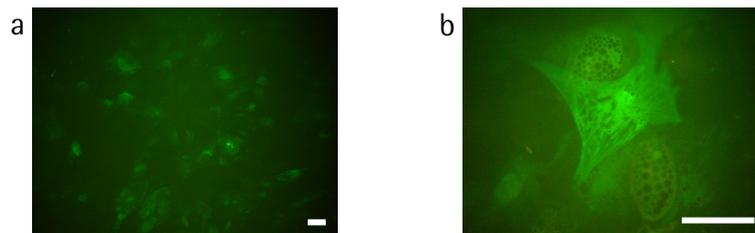


Abb. E22: Adipogene Differenzierung von stabil EGFP-transfizierten hMSC an Tag 21.

Die nicht-fluoreszierenden Fettvakuolen heben sich deutlich vom fluoreszierenden, wasserlöslichen Zytoplasma ab. (a) 100 × Vergrößerung, (b) 400 × Vergrößerung, Exz. 450-490 nm). Balken = 50 μm.

E.1.3.2.2 Transkriptionelle Veränderungen

Mittels quantitativer RT-PCR wurde die zahlenmäßige Änderung der Transkription des adipogenen Markergens PPAR- γ (*peroxisome proliferator activated receptor gamma*) nach Beendigung der adipogenen Stimulation untersucht. In gleicher Weise wurde auch die Anzahl der EGFP-cDNA-Kopien bestimmt. Als Kontrolle dienten stabil transfizierter hMSC, die in Stammzellwachstumsmedium – ebenfalls über 21 Tage – kultiviert worden waren.

PPAR- γ wurde im Vergleich zur Kontrollpopulation 607-fach höher exprimiert (s. Abb. E23). Dieser Wert wurde zuvor auf GAPDH normiert, dessen Expressionsniveau im Verlauf der adipogenen Differenzierung auf 30 % abgenommen hatte.

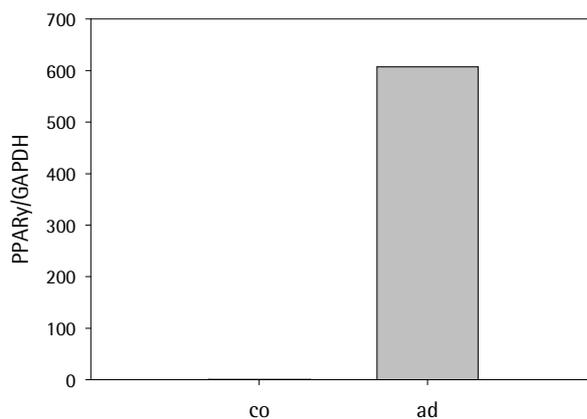


Abb. E23: Quantitative RT-PCR der differentiellen Transkription des adipogenen Markergens PPAR- γ nach adipogener Induktion stabil EGFP-exprimierender hMSC.

PPAR- γ : *Peroxisome proliferator activated receptor gamma*, GAPDH: Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase; co: Kontrollpopulation undifferenzierter hMSC; ad: adipogen differenzierte hMSC.

Die Messung der EGFP-Kopienzahl zeigte eine Abnahme der Transkription auf 26 % im Vergleich zur undifferenzierten Kontrolle. Normiert man diesen Wert auf das Transkriptionsniveau von GAPDH liegt er bei 89 % (s. Abb. E24).

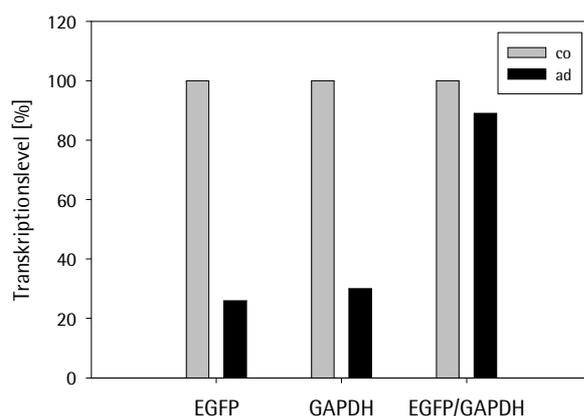


Abb. E24: Quantitative RT-PCR der differentiellen EGFP-Transkription nach adipogener Induktion stabil transfizierter hMSC.

EGFP: *enhanced green fluorescent protein*; GAPDH: Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase; co: Kontrollpopulation undifferenzierter hMSC; ad: adipogen differenzierte hMSC.

E.1.3.3 Chondrogene Differenzierung

E.1.3.3.1 Morphologische Veränderungen

Die 31-tägige Differenzierung der hMSC in Richtung eines chondrogenen Phänotyps, die in 3D-Kultur erfolgte, führte zu markanten morphologischen Veränderungen gegenüber einer Kontrollpopulation, die in Stammzellwachstumsmedium (ebenfalls in 3D-Kultur) kultiviert worden war. Die Auflichtmikroskopie der Gefrierschnitte des chondrogen differenzierten Zellsedimentes zeigte eine homogene radiäre Anordnung der Zellen unterhalb einer Plattenepithel-ähnlichen Schicht aus flachen Zellen (s. Abb. E25e). Eine zufriedenstellende fluoreszenzmikroskopische Bewertung der Zellen konnte aufgrund der Hintergrundfluoreszenz, die durch die Herstellung der Gefrierschnitte entstanden war, nicht vorgenommen werden. Die Auflichtmikroskopie der Kontrollpopulation ergab auffällige Unterschiede in der Homogenität der Probe und der Zellanordnung. Das makroskopisch kleinere Zellsediment war inhomogen, mit zum Teil lückenhaftem Wachstum der hMSC. Zudem war die Anordnung der hMSC diffus und ohne radiären Charakter. Deutlicher wurde dies nach Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (s. Abb. E25a und b). Hier musste zudem eine Größenabnahme der Zellen im Verlauf der chondrogenen Induktion beobachtet werden. Neben der homogenen Anordnung der Zellkerne im gesamten Sediment zeigte sich deren Verdichtung am epithelialen Rand. Dies konnte in der undifferenzierten Kontrolle nicht nachgewiesen werden. Zwar lag auch hier eine Verstärkung des DAPI-Signals im Randbereich vor, jedoch war diese ohne geordnete Struktur.

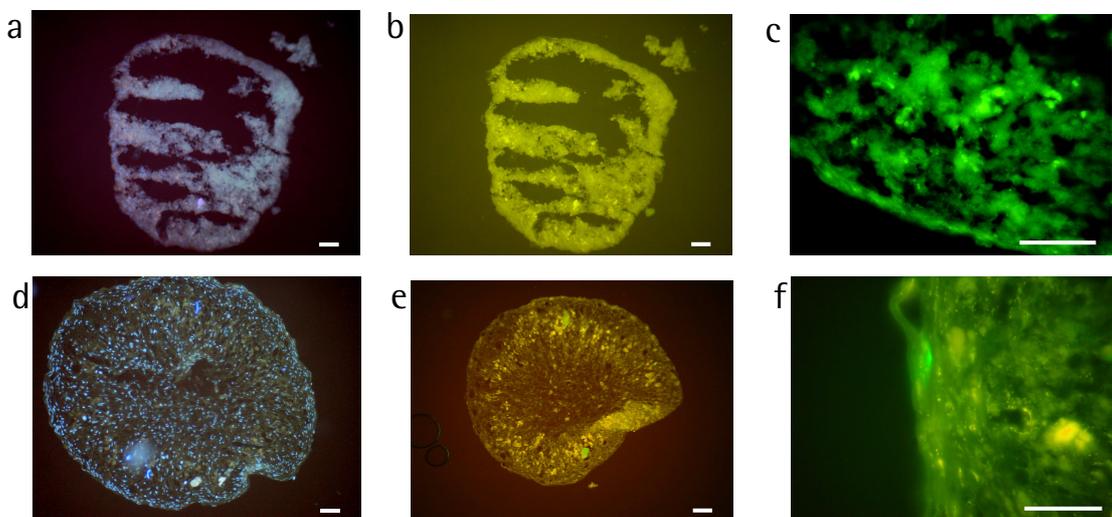


Abb. E25: Chondrogene Differenzierung von stabil EGFP-exprimierenden hMSC an Tag 31.

Gefrierschnitt des chondrogen differenzierten hMSC-Sedimentes (d, e, f) im Vergleich zur undifferenzierten Kontrolle (a, b, c). a, b: Färbung der Zellkerne mittels DAPI (100 × Vergrößerung, Exz.: 365 nm). b, e und c, f: Aufnahme unter Exzitation von 450 - 490 nm zur Visualisierung EGFP-exprimierender Zellen. (c, f in 100 × Vergrößerung, , f in 400 × Vergrößerung). Weitere Erklärung siehe Text. Balken = 50 μm.

E.1.3.3.2 Transkriptionelle Veränderungen

Die chondrogene Differenzierung führte nicht nur zu phänotypischen Veränderungen, sondern auch zu einer Induktion des frühen chondrogenen Markergens Aggrecan. Der Nachweis dieses Proteoglykans, das durch die 31-tägige Differenzierung 20-fach höher transkribiert wurde als in der Kontrolle (s. Abb. E26), wurde ebenso mittels quantitativer RT-PCR durchgeführt wie der von Kollagen II, wobei der Nachweis dieses späten chondrogenen Markers negativ war.

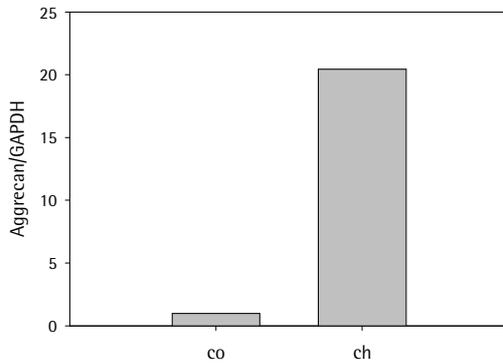


Abb. E26: Quantitative RT-PCR der differentiellen Transkription des chondrogenen Markergens Aggrecan nach chondrogener Induktion stabil transfizierter hMSC. GAPDH: Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase; co: Kontrollpopulation undifferenzierter hMSC; ch: chondrogen differenzierte hMSC.

Da die Überprüfung der stabilen EGFP-Expression durch Fluoreszenzmikroskopie nur sehr schwer möglich war, erfolgte diese ebenfalls durch quantitative RT-PCR. Als Kontrolle dienten bei allen Untersuchungen stabil transfizierte hMSC, die in Stammzellwachstumsmedium ohne chondrogene Zusätze im 3D-Sediment kultiviert worden waren. Das Transkriptionsniveau sank hierbei auf 4 % des Kontrollwertes (s. Abb. E26). Nach Normierung auf GAPDH lag dieser Wert bei 29 % (s. Abb. E27).

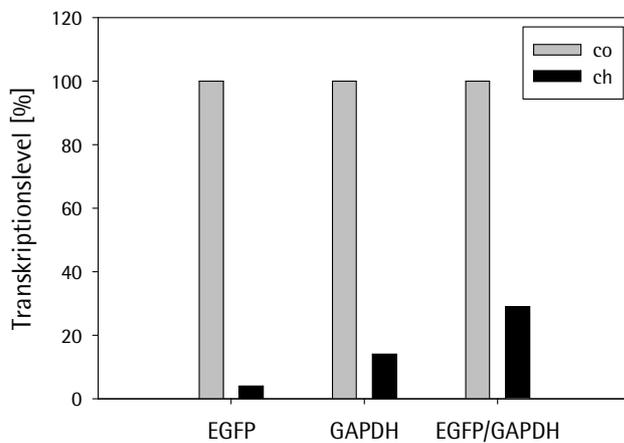


Abb. E27: Quantitative RT-PCR der differentiellen EGFP-Transkription nach chondrogener Induktion stabil transfizierter hMSC. EGFP: *enhanced green fluorescent protein*; GAPDH: Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase; co: Kontrollpopulation undifferenzierter hMSC; ch: chondrogen differenzierte hMSC.

E.1.4 Vektoren pEGFP-IRES-neo2 und phrGFP-IRES-neo2

Durch den Einsatz von Plasmiden, die interne Bindungsstelle für Ribosomen, kurz IRES (*internal ribosomal entry site*), enthalten, ist die Translation zweier offener Leserahmen von einer mRNA möglich (s. D.1.2.4.4). Da so zwei voneinander unabhängige Gene gemeinsam transkribiert, aber wieder unabhängig voneinander translatiert werden, kann in der Theorie eine 1:1-Relation zwischen der Expression zweier Gene angenommen werden. Dies ist z.B. dann hilfreich, wenn eines der Gene für eine Antibiotikum-Resistenz oder ein Markerprotein kodiert und so Rückschlüsse auf die Expression des zweiten Genes gezogen werden können.

E.1.4.1 Klonierung

Die einzelnen Schritte der Klonierung der Vektoren pEGFP-IRES-neo2 und phrGFP-IRES-neo2 wurden mittels präparativer und analytischer Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt und überprüft. Die in Abschnitt D.2.1.8.1 beschriebene Strategie zur Herstellung der beiden Vektoren begann mit der Linearisierung des Vektors pIRESneo2 durch die beiden Restriktionsendonukleasen *Nhe* I und *Eco*R I sowie der Exzision der beiden GFP-Varianten aus den Vektoren phrGFP-N1 bzw. pEGFPLuc mittels derselben REn (s. Abb. E28)

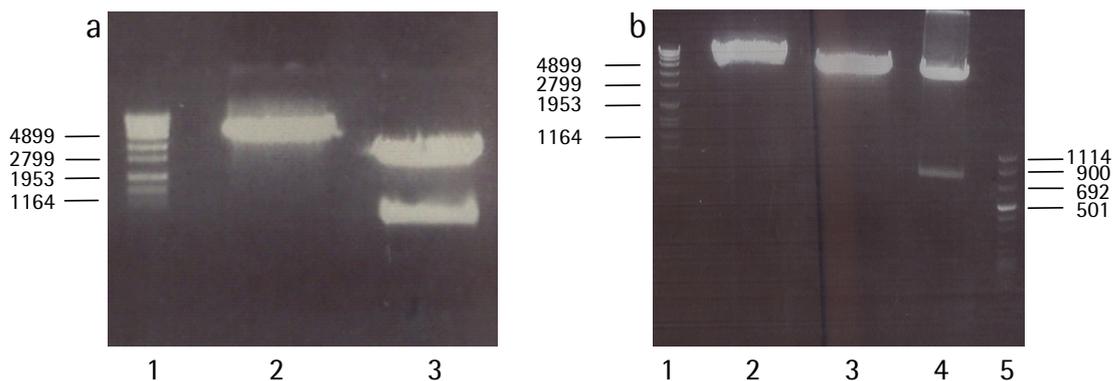


Abb. E28: Präparative Agarosegel-Elektrophorese der Vektoren pIRESneo2, phrGFP-N1 und pEGFPLuc.
 (a) DNA-Marker VII (1); pIRESneo2 linearisiert mit *Nhe* I und *Eco*R I (2); phrGFP-N1 restringiert mit *Nhe* I und *Eco*R I (3).
 (b) DNA-Marker VII (1); pJH11 linearisiert mit *Nhe* I und *Eco*R I (2); pIRESneo2 linearisiert mit *Nhe* I und *Eco*R I (3); pEGFPLuc restringiert mit *Nhe* I und *Eco*R I (4); DNA-Marker VIII (5).

Nach Transformation der Ligationsansätze erfolgte eine analytische Plasmidpräparation von jeweils zehn in Kultur überführten Einzelkolonien. In der analytischen Agarosegel-Elektrophorese zeigten sich jeweils mehrere Banden, die den beiden erwarteten Fragmentlängen entsprachen (s. Abb. E29 a, b). Nach Durchführung der Endotoxin-freien Plasmidpräparation wurde eine erneute Restriktion vorgenommen. Die Analyse mittels Gelelektrophorese zeigte, dass die jeweilige Herstellung der rekombinanten Plasmide pEGFP-IRES-neo2 und phrGFP-IRES-neo2 erfolgreich war (s. Abb. E29 c).

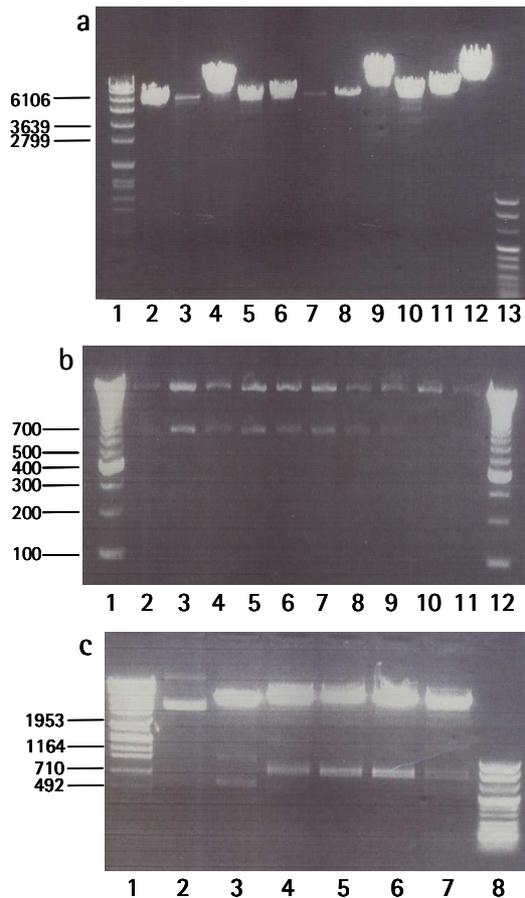


Abb. E29: Analytische Agarosegel-Elektrophorese der generierten Vektoren.

(a) 1: DNA-Marker VII; 2: pIRESneo2; 3-12: Produkte der Ligation von pIRESneo2 mit hrGFP restringiert mit *Bam*HI; 13: DNA-Marker VIII

(b) 1: 100 bp-Leiter; 2-11: Produkte der Ligation von pIRESneo2 mit EGFP restringiert mit *Nhe*I und *Eco*R I; 12: 100 bp-Leiter

(c) 1: DNA-Marker VII; 2&3: pCG21/pCG23 (hier nicht relevant); 4-7: Klone 2,7,9 und 10 der Ligation von phrGFP-IRES-neo2; 8: DNA-Marker VIII

In der nachfolgenden Abbildung sind die auf diese Weise hergestellten Plasmide als Vektorkarte dargestellt (s. Abb. E30).

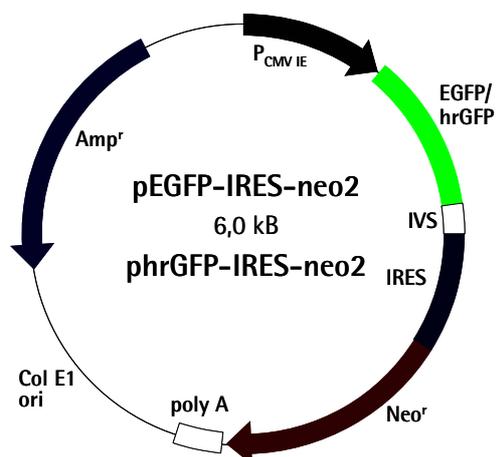


Abb. E30: Vektorkarte von pEGFP-IRES-neo2 bzw. phrGFP-IRES-neo2.

P_{CMV} IE: Humaner Cytomegalievirus *immediate early* Promotor, EGFP: *enhanced green fluorescent protein*, hrGFP: *humanized recombinant green fluorescent protein*, IVS: Intervenierende Sequenz, IRES: *internal ribosomal entry site*, Neo^r: Neomycin Resistenzgen, PolyA: *Simian Virus 40* Polyadenylierungssignal, Col E1 ori: Replikationsursprung, Amp^r: Ampicillin Resistenzgen.

E.1.4.2 Transfektion

Nach Optimierung der einzelnen Transfektionsparameter wurden alle folgenden Transfektionen mit Lipofectamine 2000 durchgeführt, welches diese am effizientesten vermittelte. Dabei ließen sich die beiden Vektoren mit einer Effizienz von 22 % (pHRGFP-IRES-neo2) bzw. 11 % (pEGFP-IRES-neo2) transfizieren (s. Abb. E31a,b). Diese Ergebnisse entsprechen dem Wertebereich der optimierten Parameter des Plasmids pIRES2-EGFP (s. E.1.1.3). Nach Selektion der transfizierten hMSC mit Geneticin (s. D.2.2.3.5) zeigte sich, dass ca. 60 -70 % der selektierten Zellen auch GFP exprimierten.

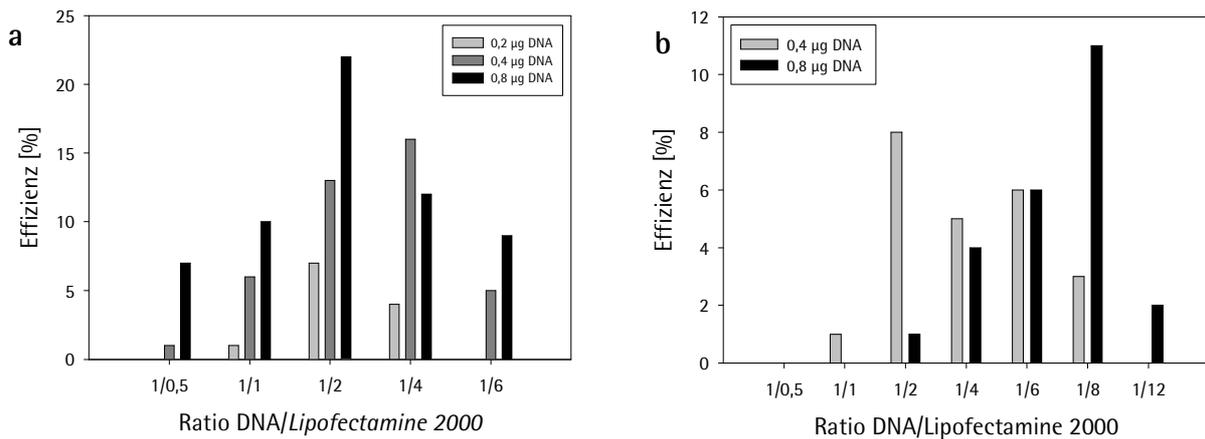


Abb. E31: Effizienz der Transfektion von pHRGFP-IRES-neo2 (a) und pEGFP-IRES-neo2 (b) in hMSC. Ermittlung der Effizienz 24 Stunden nach Transfektion.

E.2 Etablierung des Φ C31 Integrase-Systems zur zielgerichteten Integration

Aufbauend auf den Ergebnissen der transienten und stabilen nicht-viralen Transfektion humaner mesenchymaler Stammzellen erfolgte die Etablierung der zielgerichteten Integration von Plasmid-DNA in das Genom von hMSC. Die Entwicklung eines geeigneten Vektors, die Optimierung der Transfektionsbedingungen und der Nachweis der gezielten Integration werden im Folgenden anhand der erzielten Ergebnisse erläutert.

E.2.1 Klonierung der *attB*-Vektoren

Um die zielgerichtete Insertion von Plasmid-DNA mittels der Φ C31-Integrase in das Genom von hMSC zu ermöglichen, wurde die ursprüngliche Rekombinationssequenz des Φ C31-Phagen aus dem Genom von *Streptomyces coelicolor* in die Vektoren pEGFP-IRES-neo2 und pHRGFP-IRES-neo2 ligiert. Dazu wurde diese so genannte *attB*-Sequenz wie in D.2.1.8.2 beschrieben mit modifizierten Primern amplifiziert (s. Abb. E32). Als Matrize diente der von Prof. Dr. Michele Calos zur Verfügung gestellte Vektor pTA-*attB* (s. D.1.2.4.8).

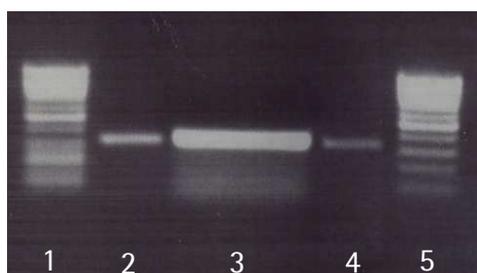


Abb. E32. Präparative Agarosegel-Elektrophorese des *attB*-Amplifikats.

Auftragsschema von links nach rechts:

- 1: 100 bp-DNA-Marker;
- 2-4: *attB*-Amplifikat;
- 5: 100 bp-DNA-Marker.

Nach der Isolierung der *attB*-Sequenz erfolgte die Ligation in den Vektor pCR2.1-TOPO. Nach der Plasmidpräparation wurde die Sequenzierung von fünf verschiedenen Klonen durchgeführt, wobei nur Klon Nr. 1 die korrekte Sequenz aufwies (s. Tab. E1).

Tab. E1: Sequenzierung der *attB*-Amplifikate.

Lediglich Klon 1 entsprach der Originalsequenz.

	Mutationen, Insertionen und Deletionen
Klon Nr. 1	Korrekte Sequenz
Klon Nr. 2	nicht lesbar
Klon Nr. 3	326 (A → G)
Klon Nr. 4	323 (T → C)
Klon Nr. 5	345 T; 236 (A → G)

Die *attB*-Sequenz aus Klon Nr. 1 wurde wiederum aus dem Vektor pCR2.1-TOPO mittels der RE *Mlu* I geschnitten (s. Abb. E33) und in die linearisierten und dephosphorylierten Vektoren pEGFP-IRES-neo2 und phrGFP-IRES-neo2 ligiert.

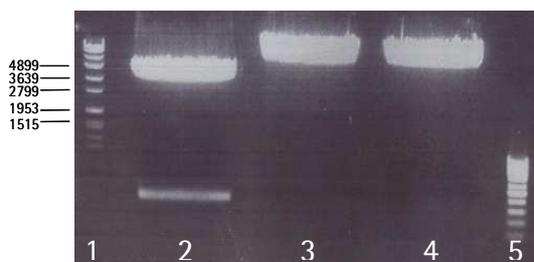


Abb. E33: Präparative Agarosegel-Elektrophorese zur Ligation der *attB*-Sequenz in pEGFP-IRES-neo2 bzw. phrGFP-IRES-neo2.

Auftragsschema von links nach rechts:

1: DNA-Marker VII;

2: pCR2.1-TOPO × *attB*; 3: pEGFP-IRES-neo2;

4: phrGFP-IRES-neo2;

5: 100 bp-DNA-Marker;

(alle Plasmide wurden zuvor mit *Mlu* I restringiert)

Die so generierten Plasmide wurden nach Restriktion mit der RE *Mlu* I durch analytische Agarosegel-Elektrophorese überprüft (s. Abb. E34).

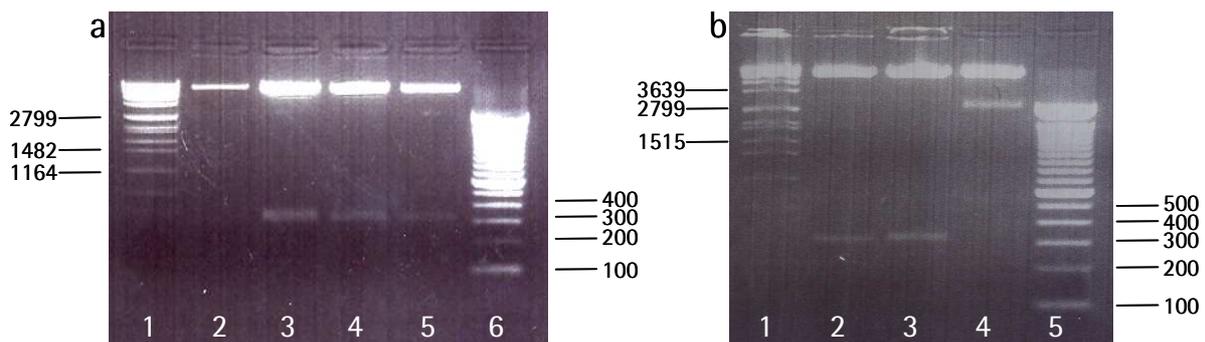


Abb. E34: Analytische Agarosegel-Elektrophorese der ligierten Vektoren.

(a) Auftragsschema von links nach rechts: 1: DNA-Marker VII; 2-4: pIRESneo2 × *attB*; 5: *pattB*-hrGFP-IRES-neo2; 6: 100 bp-DNA-Marker (alle Plasmide wurden zuvor mit *Mlu* I restringiert)

(b) Auftragsschema von links nach rechts: 1: DNA-Marker VII; 2,3: *pattB*-IRES-neo2 restringiert mit *Mlu* I; 4: pEGFP-IRES-neo2 restringiert mit *Nhe* I und *EcoR* I; 5: 100 bp-DNA-Marker

Anschließend erfolgte die Endotoxin-freie Plasmidpräparation der Vektoren nach dem in D.2.1.7 beschriebenen Protokoll und danach die Verifizierung des Ergebnisses durch erneute analytische Restriktion (s. Abb. E35).

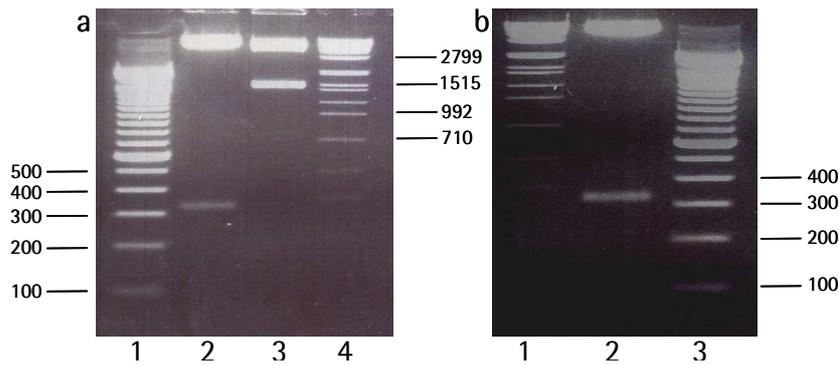


Abb. E35: Analytische Agarosegel-Elektrophorese der Endotoxin-freien Plasmidpräparation von pEGFP-IRES-neo2 und phrGFP-IRES-neo2.

- (a) Auftragsschema von links nach rechts: 1: 100 bp-DNA-Marker; 2: *pattB*-IRES-neo2; 3: pCMV-Int; 4: DNA-Marker VII (die Plasmide wurden zuvor mit *Mlu* I restringiert)
 (b) Auftragsschema von links nach rechts: 1: DNA-Marker VII; 2: *pattB*-hrGFP-IRES-neo2 restringiert mit *Mlu* I; 3: 100 bp-DNA-Marker

Die Vektorkarte dieser Plasmide ist in nachfolgender Abbildung dargestellt (s. Abb. E36).

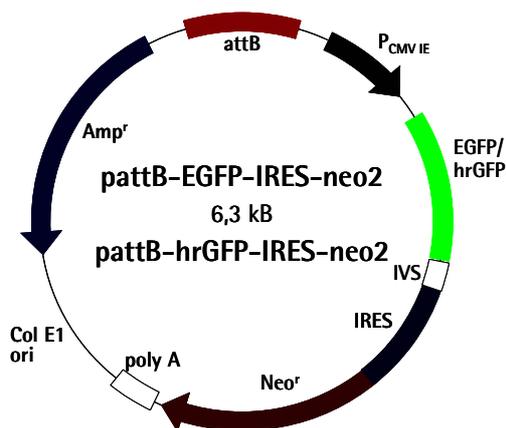


Abb. E36: Vektorkarte von *pattB*-IRES-neo2 / *pattB*-hrGFP-IRES-neo2.

attB: Bacterial attachment site of the Φ C31 Integrase, P_{CMV IE}: Humaner Cytomegalievirus Immediate Early Promotor, EGFP: enhanced green fluorescent protein, hrGFP: humanized recombinant green fluorescent protein, IVS: Intervenierende Sequenz, IRES: internal ribosomal entry site, Neo^r: Neomycin Resistenzgen, PolyA: Simian Virus 40 Polyadenylierungssignal, Col E1ori: Replikationsursprung, Amp^r: Ampicillin Resistenzgen.

E.2.2 Kotransfektion zur zielgerichteten Integration

Die Optimierung der Kotransfektion der Plasmide *pattB*-IRES-neo2 bzw. *pattB*-hrGFP-IRES-neo2 zusammen mit dem Vektor pCMV-Int wurde nach dem bereits etablierten Protokoll zur Transfektion von hMSC mit Lipofectamine 2000 (s. E.1.1.3) durchgeführt (s. D.2.2.3.4). Die Ratio der beiden Vektoren zueinander betrug – bei gleichbleibender Menge an Gesamt-DNA – 1:1, 1:5 und 1:10. In den Kontrolltransfektionen ohne das Plasmid pCMV-Int zeigte sich eine Transfektionseffizienz von 10-15 % bezogen auf das Plasmid *pattB*-IRES-neo2 und ca. 5 % bezogen auf das Plasmid *pattB*-hrGFP-IRES-neo2. Höhere Lipofectamine 2000-Konzentrationen hatten keinen positiven Einfluss auf die Transfektionseffizienz. In allen kotransfizierten hMSC-Populationen zeigten sich lediglich vereinzelt fluoreszierende Zellen, zudem wurde eine Abnahme dieser Fraktion mit zunehmender pCMV-Int-Konzentration beobachtet.

Die weiteren Transfektionen wurden in 75 cm²-Zellkulturgefäßen und mit dem Vektor *pattB-IRES-neo2* durchgeführt, um eine ausreichende Anzahl an transfizierten Zellen zu erhalten. Nach 72 Stunden erfolgte die Subkultivierung der transfizierten Zellen analog dem bereits in Abschnitt D.2.2.3.5 beschriebenen Procedere zur Generierung stabil transfizierter Zellen. Nach Beendigung des Selektionsprozesses war es vereinzelt zu klonaler Expansion der Zellen gekommen. Daraufhin wurde aus diesen Zellen die genomische DNA isoliert und einer Restriktionsfragmentlängen-Analyse unterzogen (s. D.2.1.14).

E.2.3 Restriktionsfragmentlängen-Analyse

Die Überprüfung der zielgerichteten Insertion mittels des Φ C31 Integrase-Systems erfolgte durch Restriktionsfragmentlängenanalyse (s. D.2.1.14). Dazu wurde genomische DNA der mit den Vektoren *pattB-IRES-neo2* und pCMV-Int transfizierten sowie mittels Geneticin selektionierten hMSC aus den Zellen isoliert (s. D.2.1.12). Diese DNA wurde anschließend als Matrize in die PCR zur Detektion des Integrationsereignisses in die humane pseudo-*attP*-Sequenz A auf Chromosom 8 sowie zur Amplifikation der nativen pseudo-*attP*-Sequenz eingesetzt (s. Abb. E37a). Die PCR-Produkte wurden anschließend per TOPO-TA-Klonierung in den Vektor pCR2.1-TOPO ligiert und daraufhin mit *EcoR* I und *Hinc* II verdaut. Die Auftrennung der resultierenden DNA-Fragmente durch Agarosegel-Elektrophorese entsprach den jeweils erwarteten Fragmentlängen. Die DNA-Sequenz, die durch Amplifikation des genomischen Bereichs der ortsspezifischen Integration des *attB*-Vektors entstanden war, hatte eine Fragmentlänge von 320 bp (s. Abb. E37b). Die durch die Enzyme *EcoR* I und *Hinc* II generierten Fragmente waren 262 bzw. 72 bp lang. Die Amplifikation der nativen pseudo-*attP*-Sequenz A resultierte dagegen in einem PCR-Produkt mit einer Länge von 370 bp. Der Restriktionsverdau dieses Produktes mit *EcoR* I und *Hinc* II führte zu DNA-Fragmenten mit 314 bzw. 72 Basenpaaren (s. Abb. E38).

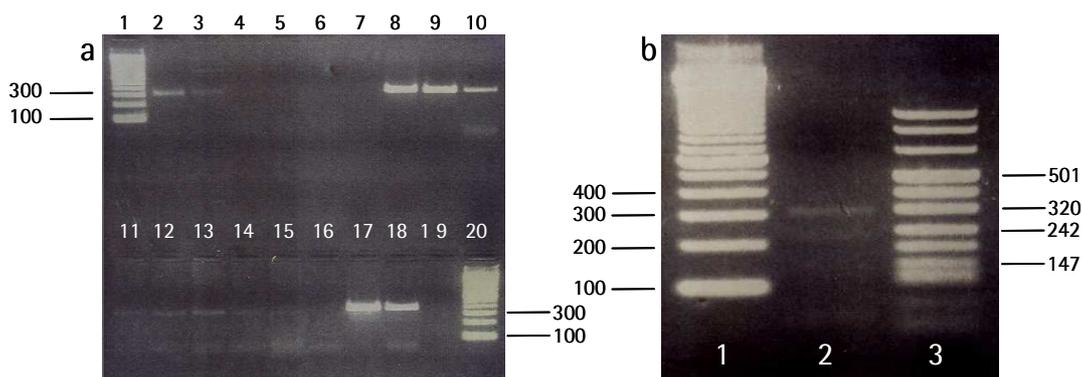


Abb. E37: Analytische Agarosegel-Elektrophorese nach Amplifikation des genomischen Bereichs der ortsspezifischen Integration.

- (a) Auftragsschema von links nach rechts: 1: 100 bp-DNA-Marker; 2-9 und 11-18 PCR-Produkte des Nachweises der zielgerichteten Integration; 10 und 19 Negativ-Kontroll-PCR (10 verunreinigt); 20: 100 bp-DNA-Marker;
- (b) Auftragsschema von links nach rechts: 1: 100 bp-DNA-Marker; 2: PCR-Produkt der ortsspezifischen Integration; 3: DNA-Marker VIII

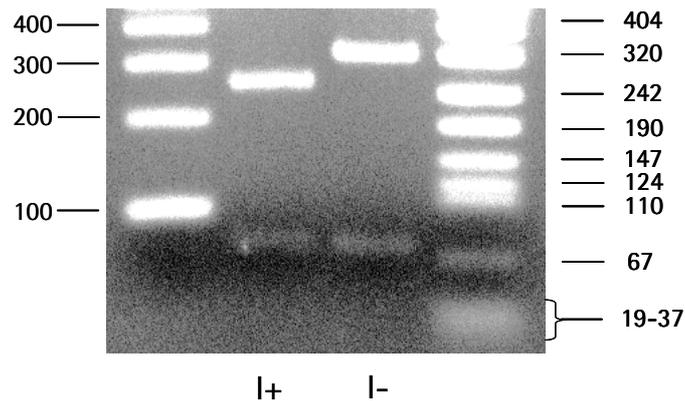


Abb. E38: Restriktionsfragmentlängenanalyse der zielgerichteten Integration in die genomische *pseudo-attP*-Sequenz A.

Die Restriktion des 320 bp langen Amplifikats der ortsspezifischen Integration (I+) führte zu zwei DNA-Fragmenten mit 262 bzw. 72 bp. Der Verdau des PCR-Produktes der nativen *pseudo-attP*-Sequenz A (370 bp) resultierte in zwei Fragmenten von 314 bzw. 72 bp (I-).

E.2.4 Sequenzierung des Integrationsortes

Nachdem die Integration des Vektors *pattB*-IRES-neo2 in die humane *pseudo-attP*-Sequenz A der hMSC per Polymerasekettenreaktion amplifiziert worden war, wurde das PCR-Produkt wie in D.2.1.14 beschrieben in den Vektor pCR2.1-TOPO ligiert. Ebenso wurde das Amplifikat der nativen *pseudo-attP*-Sequenz TOPO-TA-kloniert.

Zum einen gab die Sequenzierung der Amplifikate Aufschluss über die Spezifität der PCR. Die von Calos et al. publizierte *pseudo-attP*-Sequenz A auf dem Chromosom 8 (s. B.2.3.1) entsprach exakt der entsprechenden genomischen Region der in dieser Arbeit verwendeten hMSC einer 19-jährigen Spenderin (s. Tab. E2.1). Ebenso enthielt die aus dem Vektor pTA-attB klonierte attB-Sequenz keine Deletionen, Insertionen oder Mutationen (s. Tab. E2.2).

Zum anderen konnten die aus der zielgerichteten Integration mittels des Φ C31-Integrasesystems resultierenden Rekombinationssequenzen attL und attR analysiert werden (s. Tab. E2.3). Die Untersuchung der 8 sequenzierten Klone erbrachte in zwei Fällen den Nachweis der ortsspezifischen Integration. Beide Integrationsereignisse führten zur Deletion von 7 bzw. 8 Nucleotiden im Bereich der Rekombinationsregion (s. Tab. E2 3.2 und 3.4). Ein Klon zeigte zusätzlich eine Punktmutation und eine Insertion, ebenfalls nahe der Rekombinationssequenz (s. Tab. E2 3.2). In sechs Fällen war die Amplifikation mit Hilfe der Primerpaare unspezifisch oder die Sequenzierung zeigte kein Ergebnis. Eine genaue Analyse der Rekombinationen ist aus Tabelle E2 ersichtlich.

1. Pseudo-attP-Region auf Chromosom 8:

1.1. Publikation von Groth et al., 2000

Chr.8p22, Position 13.031.729–13.032.203, Länge 475 bp, Rekombinationskern 13032075, angezeigt werden die 50 flankierenden Basen (GenBank Accession number AF333429 vom 12. Juni 2001):

GAGATCCAAGAGGTGGTTTCAAAATACAGCAATAAGTACTGGGTTCCCTGGGTGCCCATGGAGATTTAAGCCATGACGCAATGTTTAAATCAGAGTG
CTCTAAGGTTCTCCACCAAGTTAATGTCGTATTATCATGAACCCAAAGGGAAACACAGGGGTACCTCTAAAAATCCGGTACTGGTTACAAAATTTAGTCTCAC

1.2. Sequenzierung im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit

Chr.8p22, Position 13.031.803–13.032.174, Länge 372 bp, Rekombinationskern 13032075, angezeigt werden die 50 flankierenden Basen:

GAGATCCAAGAGGTGGTTTCAAAATACAGCAATAAGTACTGGGTTCCCTGGGTGCCCATGGAGATTTAAGCCATGACGCAATGTTTAAATCAGAGTG
CTCTAAGGTTCTCCACCAAGTTAATGTCGTATTATCATGAACCCAAAGGGAAACACAGGGGTACCTCTAAAAATCCGGTACTGGTTACAAAATTTAGTCTCAC

Ergebnis: Keine Insertionen, Deletionen oder Punktmutationen. Die TT- bzw. AA-Region des Rekombinationskerns wurde hervorgehoben.

2. attB-Region

2.1. attB-Region des Vektors pIA-attB (siehe C.1.2.5.7) von Prof. M. Calos, dargestellt sind die 50 flankierenden Basen um den Rekombinationskern:

TCATCATGATGGACCAGATGGGTGAGGTGGAGTACGGCCCGGGGAGCCCAAGGGCACGCCCTGGCACCCCGCACCCGGGCTTCGAGACCCGTGACCTACATCG
AGTAGTACTACCTGGTCTACCCACTCCACCTCATGCGCGGGCCCTCGGGTCCCGGTGCGGGACCGTGGGCGTGGCCCGAAGCTCTGGCACTGGATGTAGC

2.2. attB-Region des klonierten Vektors *patB-IRES-neo2* (siehe C.2.1.8.2), angezeigt werden die 50 flankierenden Basen um den Rekombinationskern:

TCATCATGATGGACCAGATGGGTGAGGTGGAGTACGGCCCGGGGAGCCCAAGGGCACGCCCTGGCACCCCGCACCCGGGCTTCGAGACCCGTGACCTACATCG
AGTAGTACTACCTGGTCTACCCACTCCACCTCATGCGCGGGCCCTCGGGTCCCGGTGCGGGACCGTGGGCGTGGCCCGAAGCTCTGGCACTGGATGTAGC

Ergebnis: Keine Insertionen, Deletionen oder Punktmutationen. Die AA- bzw. TT-Region des Rekombinationskerns wurde hervorgehoben.

3.1. Zu erwartende attL-Region (ohne AA-Core):

IGCATGGCCCTCATTCCTGTTCCGTCCTAGGAGGAGTGAAGCATGAGAAACTGTGTGACAACTACTGGACCATCCTGTCCAGCACAAAGGCTCTTCCAAAAAGTCCGATCCCAITTCACCCACTGTACTCTGGATGCCCACTCTCTGGACCAAAATCACCCCTCCCTGAAATATTTCCAAATGGCAATATTTACCCCGCTTAAGTCAIAAAAAATACCACCTCTGATTTAAACATTTGCGTCAATGGCTTAAATCTCCATGGGGACACCAAAAGGGACGCCCCCTGGCACCCGACCCGGCTTCGAGACCCGTGACCTACAG
 -1(00)1+

Die Bindungsstellen der Primer (Integration-r-400 und Integration-2-f) wurden unterstrichen. Der Rekombinationskern, welcher sich auf der attR-Sequenz befindet wurde markiert. Zur Orientierung werden Basen, welche stromabwärts der Rekombinatioessequenz liegen mit „+“ und Basen, welche sich stromaufwärts des Kerns befinden, mit „-“ bezeichnet.

3.2. Sequenzierte attL-Region (ohne AA-Core), Klon 8410r:

NGMATGGCCCTCATTCCTGTTCCGTCCTAGGAGGAGTGAAGCATGAGAAACTGTGTGACAACTACTGGACCATCCTGTCCAGCACAAAGGCTCTTCCAAAAAGTCCGATCCCAITTCACCCACTGTACTCTGGATGCCCACTCTCTGGACCAAAATCACCCCTCCCTGAAATATTTCCAAATGGCAATATTTACCCCGCTTAAGTCAIAAAAAATACCACCTCTGATTTAAACATTTGCGTCAATGGCTTAAATCTCCATGGGGACACCAAAAGGGACGCCCCCTGGCACCCGACCCGGCTTCGAGACCCGTGACCTACAT
 -1(00)1+

Ergebnis: Rekombination der attB-site am Rekombinationskern, Insertion GC nach Position -6, Mutation A zu G auf Position -3, Deletion der ersten acht Basen stromabwärts des Kerns.

3.3. Zu erwartende attL-Region (ohne TT-Core):

IGTAGGTCACGGTCTCGAAGCCGGTGGGGTGCCAGGGCGTGCCTTTGGTGCCCCAIGGAGATTTAAGCCATGACGCCAAITGTTAAATCAGAGTGGTATTTTATGACTTAAGCGGGTAAATATGCCAATGGAAAATATTCAGGGAGGGTGAATGGTCCAGAAAGAGTGGGGCATCCAGAGTACAGTGGGTGAAATGGGATCGGGACTTTTGGAAAGAGAGCCCTGTGCTGGACAGGATGGTCCAGTATGTCAACACAAGTTCTCATGCTCCTCCTAGCAACAGGAAGACGGGAAATGAGGCCAIGCA
 -1(00)1+

Die Bindungsstellen der Primer (Integration-2-f und Integration-r-400) wurden unterstrichen. Der Rekombinationskern, welcher sich auf der attR-Sequenz befindet wurde markiert.

3.4. Sequenzierte attL-Region (ohne TT-Core), Klon 8310f:

IGTAGGTCACGGTCTCGAAGCCGGTGGGGTGCCAGGGCGTGCCTTTGGTGCCCCAIGGAGATTTAAGCCATGACGCCAAITGTTAAATCAGAGTGGTATTTTATGACTTAAGCGGGTAAATATGCAATGGAAAATATTCAGGGAGGGTGAATGGTCCAGAAAGAGTGGGGCATCCAGAGTACAGTGGGTGAAATGGGATCGGGACTTTTGGAAAGAGAGCCCTGTGCTGGACAGGATGGTCCAGTATGTCAACACAAGTTCTCATGCTCCTCCTAGCAACAGGAAGACGGGAAATGAGGCCAIGCA
 -1(00)1+

Ergebnis: Rekombination der attB-site am Rekombinationskern, Deletion der ersten sieben Basen stromabwärts des Kerns.

F DISKUSSION

F.1 Liposomale Transfektion humaner mesenchymaler Stammzellen

Der Transfer von zusätzlicher genetischer Information in eukaryontische Zellen ist wesentlich, um die funktionellen Bedeutungen der Gene und deren regulatorischer Sequenzen zu verstehen, aber auch um Strategien für zukünftige Gentherapien zu entwickeln (Colosimo et al., 2000). Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Etablierung dieses Transfers in humane mesenchymale Stammzellen unter Zuhilfenahme nicht-viraler Vektoren und liposomaler Transfektionsreagenzien.

F.1.1 Transiente Transfektion

Bestimmung der transienten Transfektionseffizienz mittels EGFP

Grün-fluoreszierendes Protein (GFP) ist neben Enzymen wie Chloramphenicol-Acetyltransferase, β -Galactosidase und Luziferase als bekanntestes der stetig wachsenden Gruppe der fluoreszierenden Proteine zur Bestimmung der Transfektionseffizienz besonders geeignet (Miyawaki, 2002; Labas et al., 2002). Es erlaubt die nicht-invasive Analyse seiner Expression sowohl *in vitro* in der Zellkultur als auch *ex vivo*, z.B. durch Untersuchung von Gewebeschnitten. Des Weiteren kann GFP zur Untersuchung der Zellmigration in Zellverbänden sowie in Organismen *in vivo* verwendet werden (Gerdes and Kaether, 1996). Darüber hinaus bietet es die Möglichkeit neben Zellen auch Proteine zu markieren. Hierdurch kann das inter- und intrazelluläre *trafficking* verfolgt werden (Viallet and Vo-Dinh, 2003).

Um die Bedingungen der liposomalen Transfektion von hMSC zu optimieren, wurde die Effizienz des Gentransfers in mehreren Versuchsreihen bestimmt. Dabei war sowohl die transiente als auch die Vorbereitung der permanenten Expression des Reportergens GFP im Sinne einer kurz- bzw. langfristigen Markierung und zum Zweck des *proof-of-principle* Gegenstand der Untersuchung. Unter Erprobung dreier liposomaler Reagenzien wurde hierbei die Effizienz der jeweiligen Transfektion von hMSC optimiert. Die höchste Transfektionseffizienz, gemessen als GFP-exprimierende Zellen gegenüber nicht-fluoreszierenden Zellen, wurde dabei durch das Reagens Lipofectamine 2000 erzielt (50 %, s. E.1.1.3), gefolgt von METAFECTENE (22 %, s. E.1.1.1), und Lipofectamine Plus (21 %, s. E.1.1.2)

Die Betrachtung dieser Ergebnisse vor dem Hintergrund anderer Arbeiten fällt zunächst schwer, da es keine publizierten Daten zur liposomalen Transfektion von humanen mesenchymalen Stammzellen gibt. Setzt man die maximale Effizienz von 50 % jedoch in Relation zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die adulte Stammzellen mittels anderer nicht-viraler Techniken transfizieren, so erscheint diese relativ hoch. Die mittels Elektroporation bzw. Nukleofektion von hMSC und humanen MAPC erreichten transienten Transfektionsraten liegen bei 11, 12 bzw. 27 % (Peister et al., 2004; Lakshmipathy et al., 2004; Aluigi et al., 2006), die von humanen hämatopoetischen Stammzellen bei weniger als 7 % (Weissinger et al., 2003) und der liposomale Gentransfer in murine neurale Stammzellen bei 15 % (Falk et al., 2002).

Zeitpunkt der Bestimmung der Transfektionseffizienz

Die Bestimmung dieser Effizienzen durch verschiedene Reporter-gen-Assays oder Zellzählung erfolgt zumeist 12 – 72 Stunden nach Transfektion, da die Expression des Transgens in diesem Zeitraum am stärksten ist (Colosimo et al., 2000). In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Transfektionseffizienz 24 Stunden nach Transfektion bestimmt, da sich bereits in Vorversuchen gezeigt hatte, dass Bestimmungen zu früheren Zeitpunkten zu geringeren Effizienzen führten. Auf der anderen Seite nahm die Expression 48 Stunden nach Transfektion und später jedoch nicht mehr weiter zu. Es kam vielmehr zu einer rapiden Abnahme der Expression des Transgens, die auch in der Literatur beschrieben wird (Tseng et al., 1997). Mögliche Ursachen hierfür sind eine erhöhte Zelltodrate oder ein verstärkter Abbau der episomalen DNA (Colosimo et al., 2000). Beide Szenarien wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Bestimmung der Zytotoxizität unter den gewählten Versuchsbedingungen

Zur Bestimmung der Zelltodrate wurde 24 Stunden nach Transfektion die Anzahl lebender und toter hMSC evaluiert (s. D.2.2.3.2 und E.1.1.4). Um auszuschließen, dass die Expression des Reporter-gens GFP für eine eventuell verminderte Viabilität der Zellen verantwortlich ist, wurde neben dem Plasmid pEGFP-N3 auch das Plasmid pIRESneo2 transfiziert, welches für das Neomycin-Resistenzgen kodiert. Dabei zeigte sich, dass alle gewählten Transfektionsbedingungen zu einer Überlebensrate von mehr als 80 % führten. Dies entspricht in etwa den Werten, die durch Anwendung anderer Transfektionsreagenzien, wie etwa FuGENE6 (81 %) oder DOTAP (99 %) erzielt wurden (Aluigi et al., 2006). Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden transfizierten Genen war 24 Stunden nach Transfektion nicht zu beobachten. Kombiniert man nun die erzielte Transfektionseffizienz von 50 % mit der Überlebensrate von 86 % (bezogen auf das Transfektionsreagens Lipofectamine 2000 und das Plasmid pEGFP-N3), so ergibt sich eine absolute Transfektionsrate von 43 %.

Aus diesen Ergebnissen können zwei Schlüsse gezogen werden. Eine kurzfristige toxische Wirkung des EGFP, die zum Absterben der hMSC geführt hätte, erscheint eher unwahrscheinlich. Dieses Ergebnis ist insbesondere vor dem Hintergrund interessant, dass eine hohe EGFP-Expression mit einer erhöhten Zytotoxizität einhergehen und auch *in vivo* zu Veränderungen führen kann (Huang et al., 2000; Martinez-Serrano et al., 2000; Torbett, 2002). Allerdings wurden bereits transgene konstitutiv EGFP-exprimierende Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*), Mäuse (*Mus musculus*) und auch Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) hergestellt (Plautz et al., 1996; Okabe et al., 1997; Hadjantonakis et al., 1998; Chan et al., 2001) wobei die GFP-Expression keinen nachhaltigen Einfluss auf die transgenen Tiere zeigte.

Darüber hinaus gestaltet sich eine Interpretation der Transfektionsrate als Kombination von Effizienz und Überleben als schwierig, da entsprechende Daten in der Literatur meist fehlen, in denen die Viabilität der Zellen in das Ergebnis mit einfließt. Im Vergleich zur Elektroporation von hMSC, die bei einer Effizienz von 74 % mit einer Überlebensrate von 45 % einherging (Aluigi et al., 2006), spricht das Ergebnis der vorliegenden Arbeit jedoch für eine eher geringere Beeinflussung der Zellen durch die Transfektion.

Bestimmung der Transienz der Transfektion

Nachdem die Zelltodrate also keinen entscheidenden Einfluss auf die Abnahme der Fluoreszenz hatte, wurde untersucht, ob die Expression des Transgens EGFP im Zeitverlauf nachlässt. Dazu wurde seine Expression über einen Zeitraum von 14 Tagen mittels quantitativer RT-PCR analysiert (s. D.2.2.3.3 und E.1.1.5). Die höchste EGFP-Kopienzahl konnte 24 Stunden nach Transfektion beobachtet werden, was mit den bereits erwähnten Daten aus der Literatur übereinstimmt (Tseng et al., 1997). Nach einem starken Abfall der Expression, die sich sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene zeigte, blieb die Expression hingegen ab Tag 7 nach Transfektion bis Tag 14 auf konstant niedrigem Niveau. Dabei ist nicht eindeutig geklärt, ob die Expression des untersuchten Transgens auf dessen Insertion in das Genom der Zellen oder auf einen verbliebenen Rest an episomaler Plasmid-DNA zurückzuführen ist (Colosimo et al., 2000).

Zusammenfassend betrachtet zeigt sich, dass die transiente Expression eines Gens durch liposomale Transfektion eines nicht-viralen Vektors in humane mesenchymale Stammzellen, insbesondere im Vergleich zu anderen primären Zellen (inklusive Stammzellen), durchaus effizient gelingt und somit das *proof-of-principle* in der Untersuchung anderer Gene münden kann.

F.1.2 Stabile Transfektion

Generierung stabil transfizierter hMSC durch Antibiotikum-Selektion

Um hMSC zu generieren, die das Transgen EGFP permanent exprimieren, wurden die Zellen mit dem Plasmid pEGFP-N3 nach dem optimierten Lipofectamine 2000-Protokoll transfiziert (s. I.4). Dieses Plasmid kodiert zusätzlich zum eigentlichen Transgen EGFP den Selektionsmarker Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase (APH). Die Selektion von hMSC wurde mit 100 µg/ml Geneticin über einen Zeitraum von 16 Tagen durchgeführt (s. D.2.2.3.5 und E.1.2). Dies führte zum Absterben nicht-transfizierter, darauf folgend transient-transfizierter Zellen und schließlich zu einer Selektion von stabil modifizierten Zellen.

Die Geneticin-Konzentration 100 µg/ml wurde zuvor als die Mindestkonzentration ermittelt, die nötig ist, um untransfizierte Zellen abzutöten (s. D.2.2.3.5.1 und E.1.2.1). Die transfizierten Zellen, die den Selektionsprozess überlebt hatten, wurden daraufhin in Medium ohne Selektionsantibiotikum weiter kultiviert, was in einer klonalen Expansion der Zellen resultierte, einer typischen Eigenschaft von mesenchymalen Stammzellen (Friedenstein et al., 1970; Colter et al., 2001). Die Kultivierung in Selektionsmedium hatte hingegen nicht zu einer Expansion geführt. Nachdem das Transgen EGFP selbst ein Reportergen ist, konnte nach Beendigung der Antibiotikum-Selektion die Expression beider Gene miteinander korreliert werden. Interessanterweise waren zwar die meisten hMSC EGFP-positiv, allerdings waren mehr als 40 % der Zellen nicht-fluoreszierend. Zum einen ist in Erwägung zu ziehen, dass die Expression des Transgens abhängig von dessen chromosomalem Integrationsort ist, die Stärke der EGFP-Expression also variieren kann (Lindemann et al., 2002; Rosenqvist et al., 2002; Baum et al., 2006). Zum anderen muss bedacht werden, dass die Transkription des EGFP von einem anderen Promotor initiiert wird als die des APH und somit die Expression beider Gene nicht unbedingt gekoppelt erfolgen muss. Zudem erfordert die Integration ins Genom eine Linearisierung des Vektors.

Diese Linearisierung kann an jeder beliebigen Stelle innerhalb des Vektors erfolgen und daher auch innerhalb einer der beiden Expressionskassetten (jeweils beginnend mit dem Promotor, darauf folgend die kodierende Sequenz des jeweiligen Transgens und das Polyadenylierungssignal), was zu dessen Zerstörung führen kann (s. Abb. F1 am Beispiel des Vektors pEGFP-N3).

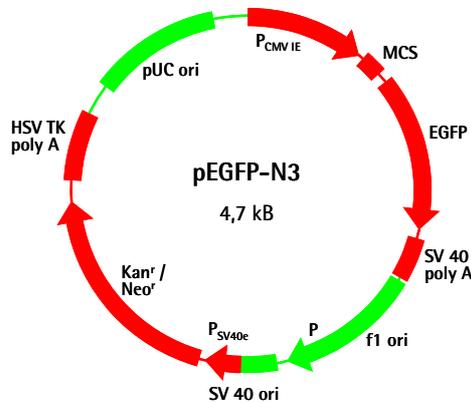


Abb. F1: Linearisierungswahrscheinlichkeit eines Vektors.

Die Linearisierung des Vektors pEGFP-N3 kann prinzipiell an jeder Stelle erfolgen. Findet sie in einem der rot markierten Bereiche statt (EGFP- und APH-Kassette), führt dies zu einer mangelnden Expression der jeweiligen eukaryontischen Expressionskassette (eE). Grün dargestellt sind Regionen, die lediglich in Prokaryonten benötigt werden und somit zu keiner Expressionsänderung der relevanten Transgene im Eukaryonten führt.

Die Linearisierungswahrscheinlichkeit außerhalb der eukaryontischen Expressionskassetten kann berechnet werden. Für den Vektor pEGFP-N3 mit 4,7 kB Gesamtbasenpaaren und einer Länge der EGFP-Expressionskassette von 1,6 kB bzw. der Neomycinresistenzkassette von 1,4 kB ergibt sich nach der nachfolgenden Formel, dass lediglich in 36 % Geneticin-resistente und zugleich EGFP-exprimierende hMSC generiert

$$\frac{(\text{Gesamtbasenzahl} - \text{eukaryontische Expressionskassetten (eE)}) \times 100}{\text{Gesamtbasenzahl}} = \text{Linearisierungswahrscheinlichkeit außerhalb der eE (in \%)}$$

werden.

In 70 % der Linearisierungsereignisse bleibt die Antibiotikumresistenz erhalten, wie aus der folgenden Gleichung errechnet werden kann:

$$\frac{(\text{Gesamtbasenzahl} - \text{Antibiotikumresistenz}) \times 100}{\text{Gesamtbasenzahl}} = \text{Wahrscheinlichkeit resistenter Zellen (in \%)}$$

Durch die Selektion gelingt nun, ersichtlich in der folgenden Formel, eine Steigerung des prozentualen Anteils an EGFP-exprimierenden Zellen auf 52 %.

$$\frac{(\text{Gesamtbasenzahl} - \text{eukaryontische Expressionskassetten (eE)}) \times 100}{\text{Gesamtbasenzahl} - \text{Antibiotikumresistenz}} = \text{Wahrscheinlichkeit der Transgenexpression nach antibiot. Selektion (in \%)}$$

Einsatz bicistronischer Vektoren

Um die Effektivität des zeit- und kostenintensiven Selektionsprozesses zu erhöhen, wurden bicistronische Vektoren entworfen und kloniert, die das Transgen GFP in Korrelation zum Selektionsgen APH exprimieren (s. D.2.1.8.1 und E.1.4). Somit werden lediglich nur solche Zellen selektioniert, die zugleich beide Transgene exprimieren. Das so genannte IRES-Element, das bereits in Abschnitt D.1.2.4.4 dieser Arbeit beschrieben wurde, erlaubt hierbei die Translation zweier offener Leserahmen von einer mRNA, so dass die Expression der beiden Gene miteinander gekoppelt wird (Gurtu et al., 1996). Die bicistronische Expression von GFP und APH wurde

in der vorliegenden Arbeit durch die Transfektion der Vektoren pEGFP-IRES-neo2 bzw. phrGFP-IRES-neo2 analysiert (s. E.1.4). Dabei zeigte sich zwar eine erhöhte, aber nicht vollständige Expressionskorrelation zwischen den beiden Genen, da nach Abschluss der Selektion weniger als 70 % der Zellen GFP in ausreichendem Maße exprimierten. Dies steht im Widerspruch zu den Daten, die eine Kopplung zwischen der durch die *Cap*-Struktur der mRNA vermittelten und der IRES-vermittelten Translation von 90 % zeigen (Martinez-Salas, 1999). Diese enge Korrelation ist allerdings nicht unumstritten. Eine Variationsbreite der Korrelation zwischen 6 und 100 % macht das IRES-System erst nach einer ausreichenden Optimierung nutzbar (Mizuguchi et al., 2000).

Neben dieser niedrigen Korrelationsrate zeigte sich zudem eine geringere Transfektionseffizienz, was absolut gesehen in einer geringeren Anzahl an selektionierten GFP-exprimierenden Zellen resultierte. Da die Transfektionseffizienz von 11 bzw. 22 % nicht an die mit dem Plasmid pEGFP-N3 erzielte Effizienz von 50 % heranreichte, wurde dieses System daher nicht weiter verwendet. Allerdings ist nicht klar, auf welchen Ursachen diese verminderte Transfektionseffizienz beruht. Einen möglichen Grund stellt die unterschiedliche Größe der Vektoren (pEGFP-N3: 4,7 kb, pEGFP-IRES-neo2 bzw. phrGFP-IRES-neo2: 6,0 kb) dar, da bekannt ist, dass die Transfektionseffizienz mit zunehmender Größe des Vektors abnimmt. Eine Konkurrenz oder gegenseitige Inhibition der beiden Translationsursprünge kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Dabei ist die Effizienz der IRES-vermittelten Translation auch abhängig von zellulären Faktoren, angefangen vom Zelltyp, über den Differenzierungszustand bis hin zum Zellalter (Vagner et al., 2001).

Interessant erscheint in dieser Hinsicht die Annahme, dass die Differenzierung von Stammzellen in einem Anstieg der nativen IRES-vermittelten Translation resultiert (Werner, 2000). Diese als D-IRES (*differentiation-linked internal ribosomal entry site*) bezeichneten Sequenzen sind z.B. in differenzierenden Megakaryozyten für die Expressionszunahme des *platelet-derived growth factors B* (PDGF2) verantwortlich (Bernstein et al., 1997). PDGF2 wird eine proliferationsfördernde Funktion zugesprochen. Zudem spielt er auch bei der Differenzierung von Osteoprogenitoren in die osteoblastäre Richtung eine Rolle (Chaudhary et al., 2004). Mediatoren dieser u.a. durch *bone morphogenetic protein*-vermittelten Differenzierung sind Proteine der Smad-Familie. Die 5'-untranslatierte Region des humanen Smad5, einem Schlüsselregulator der TGF- β -1/BMP-Signalwege, enthält eine Sequenz, die ebenfalls als eukaryontische IRES-Sequenz fungieren kann. Eine effiziente Translation, die auf diese Sequenz zurückzuführen ist, wurde bereits in murinen mesenchymalen Zellen gezeigt (Shiroki et al., 2002). Eine IRES-abhängige Translation des Smad5 erscheint somit auch in der Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen wahrscheinlich. Da die Aktivierung der D-IRES-abhängigen Translation in einer allgemeinen Steigerung der IRES-vermittelten Translation resultiert (Vagner et al., 2001), besteht somit die Möglichkeit, dass letztere in differenzierenden hMSC ansteigt. Dies würde bedeuten, dass dabei auch die Translation des über das vektorielle IRES-Element regulierten Gens induziert würde.

Im Umkehrschluss ließe sich so die insgesamt verringerte Transfektionseffizienz des Vektors pIRES2-EGFP gegenüber dem Plasmid pEGFP-N3 in hMSC erklären. Es ist anzunehmen, dass die IRES-abhängige Translation in undifferenzierten Zellen nicht oder nicht stark ausgeprägt ist. Eine Korrelation zweier Gene über die IRES-Sequenz ist damit nicht möglich, denn die Expression des über die IRES-Sequenz translatierten Gens wäre geringer oder nicht vorhanden. So translatierte Reporter oder Selektionsmarker hätten damit keine hinreichende Aussagekraft. Demgegenüber stehen jedoch auch Publikationen, die den erfolgreichen Einsatz des IRES-Elementes in embryonalen und adulten Stammzellen beschreiben (Eggan et al., 2004; Chamberlain et al., 2004).

Zusammenfassend betrachtet erscheint die Verwendung des IRES-Systems in Stammzellen ohne intensive Analyse der Korrelation von *Cap*- und IRES-vermittelter Translation jedoch nicht geeignet.

Proliferationsfähigkeit stabil transfizierter hMSC

Eine wesentliche Fragestellung war, ob bzw. inwiefern hMSC ihren Stammzellcharakter nach deren genetischer Modifikation aufrechterhalten. Dazu wurde die Proliferationsfähigkeit analysiert, die ein wesentliches Kriterium von Stammzellen darstellt (s. E.1.2.2). Die initiale klonale Expansion selektionierter GFP-exprimierender Zellen war ein Hinweis auf die ungehinderte Proliferation, ebenso die Tatsache, dass noch 6 Monate nach Transfektion GFP-Expression beobachtet werden konnte. Diese Daten entsprechen Ergebnissen, die durch Elektroporation von hMSC erreicht wurden (Peister et al., 2004).

Verifizierung der Fluoreszenz von GFP

GFP und seine Varianten dienen zwar selbst als Markerproteine, mittels derer die verschiedensten molekular- und zellbiologischen Fragestellungen beantwortet werden können, jedoch war es in dieser Arbeit von Bedeutung, die detektierten Lichtemissionen einer Wellenlänge von 500–510 nm der Fluoreszenz von GFP spezifisch zuordnen zu können. Mittel der Wahl war hierbei die indirekte Immunfluoreszenz. Dazu wurde eine indirekte Detektion des GFP mithilfe eines Anti-GFP-Antikörpers und eines sekundären, mit *Texas Red* markierten Antikörpers (Emission: 620 nm) durchgeführt (s. D.2.3 und E.1.2.3). Es zeigte sich, dass die indirekte Immunfluoreszenz von stabil transfizierten hMSC hochsensitiv und -spezifisch war. GFP erfüllt damit die von einem Reporter gen geforderten Eigenschaften, denn es ist zum einen biologisch inert und zum anderen mit 714 bp (entspr. 238 AS) relativ klein, so dass es durch Plasmidtransfer leicht in die Zelle eingebracht werden kann (Torbett, 2002). Darüber hinaus besteht eine ausreichende Expression, um eine eindeutige direkte oder indirekte Visualisierung zu gewährleisten. Allerdings ist die direkte Detektion des GFP durch die Autofluoreszenz mancher Gewebe, Gewebeschnitte und Zellmetabolite, wie z.B. NAD(P)H oder Flavine, zum Teil schwierig (Billinton and Knight, 2001; Jackson et al., 2004). Durch die Kolo-kalisation des bei ca. 507 nm emittierenden Signals mit der sekundären Immunfluoreszenz kann somit die Gefahr einer Verfälschung durch Autofluoreszenz minimiert werden. Dies spielt insbesondere bei der Anwendung *in vivo* eine wichtige Rolle.

F.1.3 Differenzierung stabil EGFP-exprimierender Zellen

Zwei wesentliche Charakteristika von Stammzellen sind ihre Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit. Da es sich bei hMSC um adulte Stammzellen handelt, sind beiden Kriterien zwar Grenzen gesetzt (Herzog et al., 2003), eine frühzeitige Änderung des Stammzellcharakters aufgrund einer vorangegangenen stabilen Transfektion würde eine weitere Anwendung der Zellen zudem erschweren. Neben der Analyse der Proliferationskapazität (s. F.1.2) wurden daher Differenzierungsstudien durchgeführt (s. D.2.2.4 und E.1.3). Die Induktion in Richtung eines osteogenen, adipogenen und chondrogenen Phänotyps erfolgte dabei nach etablierten Protokollen, mit denen bereits nicht genetisch modifizierte hMSC differenziert worden waren.

Osteogene Differenzierung

Die Differenzierung stabil EGFP-exprimierender hMSC in Richtung eines osteogenen Phänotyps hatte sowohl Änderungen in der Morphologie der Zellen zur Folge als auch eine differentielle Transkription des osteogenen Markers Alkalische Phosphatase (ALP). Dieses Enzym ist verantwortlich für die Einlagerung von Kalziumphosphatkristallen in neu synthetisierte Knochenmatrix (Blum et al., 2004).

Es zeigte sich, dass sich die osteogene Differenzierung von genetisch modifizierten hMSC analog der von nicht-modifizierten durchführen ließ. Die spindelförmigen hMSC, die sich in Kultur ähnlich der Papillarlinien eines Fingerballens anordnen, änderten ihre Zellmorphologie in eine eher polygonale Form (Pittenger et al., 1999), so dass sich die gerichtete Anordnung in eine mehrschichtige Übereinanderlagerung der differenzierenden hMSC änderte (s. E.1.3.1.1). Diese charakteristischen Veränderungen, die sich während der 21-tägigen osteogenen Induktion entwickelten, konnten insbesondere deshalb gut beurteilt werden, weil eine heterogene Zellpopulation aus EGFP-exprimierenden und nicht-fluoreszierenden Zellen differenziert wurde. So konnte auch die Zellmorphologie einzelner Zellen genau betrachtet werden. Diese spiegelten mit ihrer zumeist polygonalen Form das histologische Bild von Osteoblasten wider. Diese Ergebnisse entsprechen auch denen anderer Arbeitsgruppen. So ist nach Elektroporation von GFP-Vektoren in hMSC und anschließender Differenzierung in Richtung eines osteogenen Phänotyps die Expression des Transgens noch nachweisbar (Peister et al., 2004).

Die Bestimmung der mRNA-Transkripte von ALP erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Die 21-tägige Differenzierung stabil transfizierter hMSC in Richtung eines osteoblastären Phänotyps führte – nach Normierung auf das *housekeeping*-Gen GAPDH – zu einem Anstieg der ALP um das ca. 20-fache (s. E.1.3.1.2). Dass die Transkription der GAPDH im Verlauf der Differenzierung auf 30 % des Ursprungswertes absank, erscheint nicht ungewöhnlich, da der Zellstoffwechsel von multipotenten Stammzellen einen höheren Energieumsatz benötigt als der von differenzierten Zellen (Ciccarella et al., 2004).

Der Nachweis des Transgens EGFP wurde ebenso mithilfe der quantitativen RT-PCR durchgeführt. Hier sank die EGFP-Expression osteogen differenzierter hMSC im Vergleich zu den in Stammzellwachstumsmedium kultivierten Stammzellen auf 36 %. Nach Normierung auf die

Expression von GAPDH lag dieser Wert bei 120 %. Die Normierung des Transgens auf ein *housekeeping* - Gen ist dabei nur bedingt zulässig. Zwar muss auf der einen Seite eine Normierung durchgeführt werden, um Unterschiede in der Effizienz der cDNA-Synthese zu nivellieren. Auf der anderen Seite unterliegt das Transgen, das durch den konstitutiv aktiven CMV-Promotor gesteuert wird, dem natürlichen Prozess der endogenen Genregulation nur teilweise. Obwohl ein Anstieg der EGFP-Expression durch Fluoreszenzmikroskopie nicht beobachtet werden konnte, erscheint es interessant, dass sich auch nach retroviraler Transduktion humaner mesenchymaler Stammzellen mit GFP und anschließender osteogener Differenzierung ein Anstieg der Fluoreszenz gezeigt hat (Lee et al., 2001).

Adipogene Differenzierung

Die Differenzierung der hMSC in die adipozytäre Richtung führte zu einem charakteristischen Zellbild mit einer Veränderung der bipolaren spindelförmigen Zellstruktur der hMSC in eine eher polygonale Form verbunden mit der Bildung von zytoplasmatischen Fettvakuolen (s. D.2.2.4.2 und E.1.3.2). Der Nachweis der differentiellen Transkription eines adipogenen Markergens durch die adipogene Induktion wurde mittels der Analyse von PPAR- γ erbracht. Seine Transkription stieg nach 21-tägiger Differenzierung der hMSC um mehr als das 600-fache des Ausgangswertes. Diese Daten weisen auf eine ungehinderte Differenzierungsfähigkeit permanent EGFP-exprimierender hMSC in die adipozytäre Richtung hin und wurden zusätzlich unterstützt durch das gemeinsame Auftreten von grüner Fluoreszenz und Fettvakuolen im Zytoplasma der Zellen. Da GFP jedoch lipophob ist, zeigten die Fettvakuolen selbst keine grüne Fluoreszenz. Die Tatsache, dass sich pro Zelle mehrere nicht-konfluierende Vakuolen und nicht eine das Zytoplasma ausfüllende Fettvakuole fanden, spricht entweder für die Bildung von embryonalem braunem Fettgewebe oder für eine zu kurze Induktionsdauer. Im Hinblick auf die Literatur erscheint jedoch eher die Differenzierung in Richtung weißes Fettgewebe gegeben, da diese Vakuolen während dreimonatiger Induktion und Kultivierung konfluieren und schließlich die Zellen ausfüllen (Pittenger et al., 1999).

Die differentielle Expression des adipogenen Markers PPAR- γ , eines nukleären Steroidhormon-ähnlichen Rezeptors, der überwiegend in Fettgewebe exprimiert wird (Rosen et al., 2002), spricht darüber hinaus für die erfolgreiche Induktion eines adipogenen Phänotyps. Nach Normierung der mRNA-Expression von PPAR- γ auf die des Enzyms GAPDH, zeigte sich eine mehr als 600-fache Induktion des adipogenen Markers. Dabei erscheint die Abnahme der GAPDH-Expression auf 30 % des Ursprungswertes – ähnlich wie bei der osteogenen Differenzierung – nicht ungewöhnlich (Cicarella et al., 2004).

Die Transkription des Transgens EGFP sank während der Differenzierung auf 26 % des Ursprungswertes ab. Nach Normierung auf die Transkription des *housekeeping*-Gens GAPDH lag dieser Wert bei 89 %. Geht man davon aus, dass die Normierung zulässig ist, so ist diese Abnahme sehr gering und entspricht ebenfalls den Ergebnissen, die von Lee et al. 2001 publiziert wurden.

Chondrogene Differenzierung

Die Differenzierung der stabil EGFP-exprimierenden hMSC in Richtung eines chondrogenen Phänotyps erfolgte in 3D-Kultur über einen Zeitraum von 31 Tagen (s. D.2.2.4.3). Der Nachweis der Differenzierung wurde mittels Beurteilung morphologischer Kriterien der Gefrierschnitte des Zellsedimentes zusammen mit den Ergebnissen der quantitativen RT-PCR des chondrogenen Markers Aggrecan erbracht (s. E.1.3.3). Nach Betrachtung sowohl der Gesamtansicht als auch einzelner Ausschnitte des Sediments zeigte sich, dass die Kultivierung in chondrogenem Induktionsmedium zu einer organisierten Ausrichtung der Zellen geführt hatte. Die Kultivierung in Stammzellwachstumsmedium ohne chondrogene Zusätze hingegen ging nicht mit einer gerichteten Anordnung einher. Ausgehend von rein morphologischen Kriterien konnte eine ausreichende Induktion in Richtung Knorpel allerdings noch nicht hinreichend bewiesen werden.

Weiteren Aufschluss über die Differenzierung in einen chondrogenen Zelltyp gab die quantitative RT-PCR des chondrogenen Markers Aggrecan. Dieses Proteoglykan ist neben Kollagen II einer der Hauptbestandteile von Knorpelgewebe (Kiani et al., 2002). Nach Normierung der mRNA-Expression von Aggrecan auf die von GAPDH zeigte sich eine 20-fache Induktion dieses Proteoglykans nach 31-tägiger Kultivierung des Zellsedimentes in chondrogenem Differenzierungsmedium gegenüber Zellen, die in Stammzellwachstumsmedium kultiviert worden waren. Zusammen mit den morphologischen Unterschieden spricht dieses Ergebnis für eine Differenzierung der stabil EGFP-exprimierenden Zellen in Richtung eines chondrogenen Zelltyps.

Durch Fluoreszenzmikroskopie war es nicht sicher möglich, EGFP-exprimierende Zellen zu detektieren, da die Herstellung der Gefrierschnitte zu einer ausgeprägten Hintergrundfluoreszenz geführt hatte, wie dies auch von anderen Autoren beschrieben wurde (Jackson et al., 2004). Der Nachweis der Expression des Transgens gelang daher mit höherer Aussagekraft durch Analyse seiner Transkription. Die chondrogene Differenzierung hatte zu einer Abnahme der mRNA-Expression von EGFP auf 4 % des Kontrollwertes geführt. Letzterer wurde durch die EGFP-mRNA-Analyse des Zellsedimentes ermittelt, welches in reinem Stammzellwachstumsmedium kultiviert worden war, um eventuelle Einflüsse der 3D-Kultivierung auszuschließen. Da auch die Expression der mRNA von GAPDH auf 14 % abgenommen hatte – dies erscheint im Hinblick auf die Daten der osteogenen und adipogenen Differenzierung realistisch – kam es nach Normierung auf das *housekeeping*-Gen zu einer Abnahme der EGFP-Expression auf 29 %. Auch hier sei noch einmal erwähnt, dass das Transgen nur bedingt endogenen Mechanismen der Genregulierung unterworfen ist. Daher kann nicht eindeutig geklärt werden, welcher dieser Werte (4 oder 29 %) der vorliegenden Situation am nächsten kommt.

Zusammenfassung der Differenzierung stabil EGFP-exprimierender hMSC

Das Hauptkriterium, das angesetzt wurde, um den Erhalt des Stammzellcharakters nach genetischer Modifikation von hMSC zu beurteilen, war ihre uneingeschränkte Differenzierungsfähigkeit innerhalb des mesodermalen Keimblattes. Dazu wurden die stabil EGFP-exprimierenden hMSC in Richtung eines osteogenen, adipogenen und chondrogenen Phänotyps differenziert. Dabei gilt festzustellen, dass die jeweilige Induktion zu den entsprechenden charakteristischen morphologischen Änderungen geführt hat. Unterstützt wurde diese Beobachtung durch den Nachweis der Induktion eines jeweils typischen Markergens mittels quantitativer RT-PCR. Somit besteht neben der Möglichkeit, hMSC mittels Elektroporation oder retroviralem Gentransfer unter Erhalt des Stammzellcharakters zu transduzieren (Lee et al., 2001; Peister et al., 2004) auch die Option, hMSC mittels liposomalem nicht-viralem Gentransfer zu modifizieren ohne die Differenzierungsfähigkeit zu beeinträchtigen.

Die Tatsache, dass darüber hinaus eine Subpopulation von mesenchymalen Stammzellen in der Lage ist, keimblattübergreifend, das heisst neben der mesodermalen auch in die ektodermale und endodermale Richtung zu differenzieren (Verfaillie, 2002), wurde in dieser Arbeit nicht evaluiert. Zum einen ist dieses Attribut (Plastizität) nicht allen mesenchymalen Stammzellen zueigen (Jiang et al., 2002). Zum anderen gilt bereits die Induktion eines osteogenen und adipogenen Phänotyps als ausreichend um den Erhalt des Stammzellcharakters zu demonstrieren (Colter et al., 2001; Herzog et al., 2003; Gronthos et al., 2003).

Weiterhin zeigte sich, dass die Stärke der Expression des Transgens durch die jeweilige Differenzierung verändert wurde. Sie führte im Falle der Differenzierung in Richtung Adipozyten und Chondrozyten zu einer deutlichen Abnahme. Unter der Annahme, dass Stammzellen eine weitaus höhere Anzahl an Genen exprimieren als differenzierte Zellen (Ciccarella et al., 2004), erscheint die Abnahme des Expressionsniveaus insgesamt durchaus realistisch. Dass dies auch die Expression des Transgens beeinflusst, zeigen auch Publikationen über die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen (Lindemann et al., 2002) und neuronalen Progenitoren (Rosenqvist et al., 2002). In beiden Studien wurde die Abnahme der Transgenexpression nach Differenzierung durch FACS-Analyse nachgewiesen. Als Ursache können epigenetische Effekte, wie eine verändertes DNA-Methylierungsmuster oder Histonmodifikationen angenommen werden (Ramalho-Santos et al., 2002).

Anzumerken gilt zudem noch, dass in der vorliegenden Arbeit die quantitative RT-PCR als Nachweismethode gewählt wurde. Im Falle der Differenzierung zu Zellen eines osteogenen Phänotyps zeigte sich die Schwierigkeit der Normierung des Transgens auf ein endogen reguliertes *housekeeping*-Gen. So kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass es auf transkriptioneller Ebene zu einer Zu- oder Abnahme der Expression gekommen war. Eine Untersuchung auf Proteinebene (normiert auf die Zellzahl) könnte darüber weiterhin Aufschluss geben.

F.2 Zielgerichtete Integration in humane mesenchymale Stammzellen

F.2.1 Das Φ C31 Integrase-System

Die Integrase des Phagen Φ C31 ist in ihrem Wirt *S. coelicolor* in der Lage, die Rekombination zweier spezifischer Sequenzen zu vermitteln (Thorpe and Smith, 1998). Darüber hinaus ist sie auch in anderen Bakterien, wie *E. coli* ebenso wie in Säugerzellen ohne Zugabe weiterer Kofaktoren funktionell aktiv. Somit katalysiert sie auch dort die Rekombination zweier kompatibler Sequenzen (Groth et al., 2000). Das System der Φ C31 Integrase eignet sich daher insbesondere, um permanente genetische Modifikationen in das humane Genom einzuführen und weiter zu untersuchen (Ortiz-Urda et al., 2002). Das humane Genom enthält Sequenzabschnitte, die eine partielle Identität mit der Rekombinationssequenz des Phagen Φ C31 aufweisen. Die Integrase vermittelt eine Rekombination dieser humanen Sequenzen mit der 320 bp umfassenden Rekombinationssequenz des Bakteriums, kurz *attB* genannt (Thyagarajan et al., 2001).

Im Jahr 2001 wurde eine Präferenz der Φ C31 Integrase für eine spezifische Region des kurzen Arms von Chromosom 8 publiziert (Thyagarajan et al., 2001), die auch in der vorliegenden Arbeit analysiert wurde. Diese hohe Sequenzselektivität musste in der Zwischenzeit jedoch relativiert werden. Derzeit sind etwa 40 Sequenzen im humanen Genom beschrieben, innerhalb derer eine ortsspezifische Rekombination gezeigt werden konnte. Ausgehend von einem mathematischen Modell müssen allerdings etwa 370 humane genomische Sequenzen angenommen werden, die prinzipiell als Erkennungssequenz für die Φ C31 Integrase dienen könnten (Chalberg et al., 2006). Dennoch ist die Wahrscheinlichkeit der ortsspezifischen Integration mit Hilfe der Φ C31 Integrase gegenüber anderen nicht-viralen Systemen, wie dem der so genannten *sleeping beauty* Transposase, höher und die Genexpression effizienter (Ehrhardt et al., 2005).

F.2.1.1 Kotransfektion zur zielgerichteten Integration

Um die zielgerichtete Integration exogener genetischer Information in hMSC zu etablieren, wurde ein Vektor entworfen, der neben einer EGFP-Expressionskassette zusätzlich eine *attB*-Sequenz beinhaltet. Die Translation des Reporters EGFP erfolgte dabei bicistronisch gemeinsam mit der APH, die ihrerseits die Neomycinresistenz vermittelt (s. D.2.1.8.2 und E.2.1). Dieser Vektor wurde zusammen mit dem für die Φ C31 Integrase kodierenden Plasmid pCMV-Int (s. D.1.2.4.7) in hMSC transfiziert. Die transiente Transfektionseffizienz, gemessen als fluoreszierende Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl, betrug dabei maximal 5 %. Trotz nachgewiesener Funktionalität (Thyagarajan et al., 2001), erscheint die Kotransfektion der beiden DNA-Sequenzen in vielerlei Hinsicht problematisch. Zum einen standen in den gewählten Versuchsbedingungen sowohl das Reporter-gen als auch die Integrase unter der transkriptionellen Kontrolle eines CMV-Promotors. Es besteht daher die Möglichkeit, dass es zu einer Auslastung der Transkriptionsfaktoren kommt und die beiden Gene somit geringer transkribiert werden. Zum anderen ist die Gesamtmenge an DNA, die in Säugerzellen transfiziert werden kann, be-

schränkt. Wie bereits beschrieben, wirkt eine DNA-Menge größer 1 µg pro 10.000 Zellen toxisch auf hMSC (s. E.1.1.3). Um eine ausreichende Aktivität der Integrase zu erzielen und damit die Anzahl randomisierter Insertionen im Vergleich zu minimieren, muss die Integrase im Verhältnis zu dem Vektor, der das Zielgen und die Rekombinationssequenz kodiert, jedoch im Überschuss vorliegen. Die gewählten Verhältnisse der beiden Vektoren wurden deshalb zwischen 1:10 und 1:50 (als 1 wird jeweils der Vektor mit Zielgen und *attB*-Sequenz gesetzt) variiert. Somit kann nur 1/10 bis 1/50 der Menge des für das Zielgen kodierenden Vektors eingesetzt werden. Auch dies könnte eine Ursache der verringerten Transfektionseffizienz sein.

Zudem kann die Integration des für die Integrase kodierenden Vektors in das Genom nicht ausgeschlossen werden. Die stabile Expression einer konstitutiv aktiven Integrase ist vor dem Hintergrund der Biosicherheit nicht wünschenswert (Groth et al., 2004) und müsste daher mittels weiterer Analyseverfahren wie PCR oder *Southern Blot* ausgeschlossen werden.

Zur Lösung dieser Problematik bieten sich zwei Alternativen an. Zum einen besteht die Möglichkeit, die Zellen mit rekombinanter Integrase zu behandeln, wie dies auch im prokaryontischen System bereits erfolgreich eingesetzt wird (Thorpe et al., 2000). In diesem Falle könnte man optimale Transfektionsbedingungen wählen und würde zudem eine eventuelle Integration der Integrase selbst vermeiden. Dagegen spricht jedoch die aufwändige Herstellung eines rekombinanten, hochreinen und enzymatisch aktiven Proteins. Zudem ist eine ausreichende Inkorporation der Integrase in eukaryontische Zellen fraglich.

Zum anderen besteht die Möglichkeit, den für das Zielgen kodierenden *attB*-Vektor zusammen mit der mRNA der Integrase zu transfizieren (Hollis et al., 2003; Groth et al., 2004). Auch diese Methode würde nicht zu einer Insertion der Φ C31 Integrase in das Genom der Zellen führen. Außerdem müsste die mRNA zur Translation lediglich in das zytosolische Kompartiment der Zellen inkorporiert werden. Da sich *short interfering RNAs* (siRNAs) mittels liposomalen Nukleotidtransfers hocheffizient in hMSC transfizieren lassen (Hoelters et al., 2005a; Neth et al., 2006), erscheint eine ausreichende Transfektion von mRNA in hMSC ebenfalls nicht unrealistisch. Ein weiterer Vorteil der Anwendung der Integrase in Form von mRNA besteht in der frühzeitigen Translation der Integrase, so dass das Maximum der Integraseexpression mit der höchsten Inkorporationsrate des *attB*-Vektors zusammenfällt (s. E.1.1.5). Dies würde die Wahrscheinlichkeit einer Integration erhöhen. Die Herstellung einer ausreichenden Menge an mRNA kann durch *in vitro*-Transkription gewährleistet werden, wird jedoch als anfällig für replikative Mutationen und die Ausbildung inhibitorischer RNA-Doppelstranghelices beschrieben (Forster and Church, 2007).

Eine weitere Möglichkeit der Verbesserung des Φ C31-Systems besteht in der Fusion der Integrase mit einem *nuclear localization signal* (NLS). Die Φ C31 Integrase besitzt eine molekulare Masse von 67 kDa; ihr passiver Transport in den Nukleus erscheint aufgrund dieser Größe somit eher unwahrscheinlich. Zwar gelangt die Integrase in den Zellkern, was durch Analyse seiner Aktivität auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde. Die zugrunde liegenden Mecha-

nismen hierzu sind jedoch nicht bekannt. Um die Effizienz des nukleären Transports zu erhöhen, kann man sich ein NLS zunutze machen. Diese zumeist aus wenigen, überwiegend basischen Aminosäuren bestehenden Motive dirigieren Proteine, wie z.B. das *SV40 T large antigen*, in den Zellkern (Kalderon et al., 1984). Durch C-terminale Fusion dieses NLS an die Φ C31 Integrase wurde eine signifikante Steigerung der Aktivität in Säugerzellen beobachtet (Andreas et al., 2002). Hiervon erhofft man sich eine deutlich höhere Rekombinationseffizienz (Hollis et al., 2003).

F.2.1.2 Detektion des chromosomalen Integrationsortes

Nach Kotransfektion der beiden Vektoren *pattB-IRES-neo2* und *pCMV-Int*, anschließender Selektion und klonaler Expansion der Zellen, wurde die genomische DNA aus den stabil transfizierten hMSC isoliert (s. D.2.1.12). Daraufhin wurde die Integration an der pseudo-*attP*-Sequenz A auf Chromosom 8 mittels Amplifikation der Rekombinationssequenz und anschließender Restriktionsfragmentlängenanalyse bzw. DNA-Sequenzierung untersucht. Beide Analysen zeigten, dass die Integration spezifisch an dieser Stelle stattgefunden hatte.

Die gewählten Nachweismethoden basierten auf der prinzipiellen Untersuchung der Anwendbarkeit der Kotransfektion. So wurden nicht einzelne Klone untersucht, sondern eine Population von stabil transfizierten hMSC. Mit diesem *proof-of-principle* konnte gezeigt werden, dass die gewählten Versuchsbedingungen zur ortsspezifischen Integration von exogener genetischer Information in das Genom von hMSC führen. Auch die Funktionalität der Vektoren konnte so überprüft werden.

Eine Quantifizierung des Integrationsereignisses konnte allerdings aus logistischen Gründen nicht mehr vorgenommen werden. Sie könnte indirekt mit dem so genannten *plasmid rescue*-Verfahren vorgenommen werden. Dazu wird genomische DNA aus den zuvor mit der Φ C31 Integrase transfizierten Zellen isoliert. Anschließend wird diese mittels weniger Restriktionsendonukleasen (RE) fragmentiert. Dabei müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein. Zum einen müssen die RE kohäsive Enden generieren. Zum anderen dürfen sie keine Erkennungsstellen innerhalb des transfizierten Vektors besitzen. Die DNA-Fragmente werden daraufhin ligiert, so dass zirkuläre doppelsträngige DNA entsteht. Diese wird in kompetente Bakterien transformiert und mithilfe der prokaryontischen Antibiotikumsresistenz selektioniert, die sich auf dem in das Genom integrierten Vektor befindet. Die so wieder gewonnenen Plasmide enthalten neben der ursprünglichen Plasmidsequenz flankierend auch Nukleotide des chromosomalen Integrationsortes. Diese Plasmide können sequenziert und der chromosomale Integrationsort zugeordnet werden (Thyagarajan et al., 2001; Chalberg et al., 2006).

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit Zellklone zu untersuchen. Ein Teil des Klons könnte zur Analyse des Integrationsortes herangezogen werden. Der andere Teil könnte für weitere Studien zur Verfügung stehen. Allerdings bedarf es hierbei einer größeren Anzahl von Zellen. Zudem muss gewährleistet sein, dass es sich mit Sicherheit um einen Zellklon und keine genomisch heterogene Zellpopulation handelt.

G SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

Abschließend kann festgehalten werden, dass – wie in der Aufgabenstellung formuliert – in der vorliegenden Arbeit mithilfe nicht-viraler Methoden sowohl eine effiziente Transgenexpression als auch eine ortsgenaue Integration von DNA in eine bestimmte Region des Genoms von hMSC gezeigt werden konnte.

Zu Beginn der Promotionsarbeit war die Forschung an nicht-viralen Transfektionssystemen zur genetischen Modifikation von humanen Stammzellen zum einen und die Notwendigkeit zielgerichteter Integrationsstrategien zum anderen weitgehend unbeachtet. Die aktuellen Forschungsanstrengungen, die durch die Induktion und Reprogrammierung humaner somatischer Zellen mittels embryonaler Transkriptionsfaktoren ein neues Kapitel in der Stammzellforschung aufgeschlagen haben, unterstreichen jedoch die Notwendigkeit gerade diese Untersuchungen fortzuführen (Yu et al., 2007; Takahashi et al., 2007). Den beiden Arbeitsgruppen um J. A. Thomson und S. Yamanaka gelang es mittels retroviralem Transfer der Gene Oct3/4, Sox2, c-Myc und Klf4 in adulte humane Hautfibroblasten Zellen zu generieren, die Ähnlichkeit mit humanen embryonalen Stammzellen besitzen. Dies konnte hinsichtlich der Genexpression, dem Proliferationsverhalten, der Morphologie der Zellen, deren Oberflächenmarker als auch in Bezug auf ihre Differenzierung in Zelltypen aller drei Keimblätter *in vitro* sowie durch Teratombildung nach Implantation in immundefiziente SCID-Mäuse gezeigt werden (Yu et al., 2007).

Zur Diskussion stellen die Autoren mehrere Fragen, die vor dem Hintergrund der eigenen Arbeit beispielhaft folgende Schlussfolgerungen und Ausblicke erlauben und die Bedeutung der in dieser Promotionsarbeit generierten Daten in diesem Kontext unterstreichen.

Jeder Zellklon der so genannten induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) enthält drei bis sechs retrovirale Integrationen pro Faktor, so dass mehr als 20 ungerichtete Integrationsereignisse pro Zelle vorliegen, die das Risiko der Tumorigenese deutlich erhöhen (Hacein-Bey-Abina et al., 2003b). Die Autoren fordern, dass nicht-retrovirale Methoden untersucht werden müssen, um das mutagene Risiko zu mindern. Die in der eigenen Arbeit untersuchte Φ C31 Integrase stellt nach aktuellem Stand des Wissens hierzu zwar keine ausreichend sichere Alternative dar, da auch sie keine auf einen singulären Genomlokus bezogene Integration gewährleistet. Dennoch erfolgt die durch die Φ C31 Integrase vermittelte genomische Integration nach einem statistischen Modell in 61 % der Fälle in intergenische Bereiche, lediglich 37 % in Introns und 2 % in Exons. Retroviren hingegen integrieren mit einer Frequenz von 67 % in Transkriptionseinheiten (Schroder et al., 2002; Chalberg et al., 2006). Das rechnerische Risiko eines „Genproduktschadens“ könnte somit zumindest reduziert werden und die gewünschten Integrationsereignisse mittels *Southern Blot*-Analyse gefiltert und entsprechende Klone selektiert werden.

Von weiterer Bedeutung ist zudem, dass die zielgerichtete Integration in genreiche Regionen, wie z.B. einer definierten intergenischen Stelle des Chromosoms 19, in der ca. 7,5 % aller durch die Φ C31 Integrase vermittelten Rekombinationen stattfinden, eine hohe Expression verspricht. Vor diesem Hintergrund erfolgte in unserer Arbeitsgruppe bereits eine Fortsetzung der hier dargestellten Promotionsarbeit. Eine komparative Analyse der Expression des Reporters Luciferase nach ungerichteter und gerichteter Integration von hMSC zeigte sowohl im undifferenzierten Status als auch nach osteogener Differenzierung eine signifikant höhere Transgenaktivität in den mittels der Φ C31 Integrase modifizierten Zellen (Keravala et al., 2005; Hoelters et al., 2005b). Weitere Untersuchungen sind jedoch nötig, um dieses Ergebnis zu erhärten.

Die Arbeiten an iPS-Zellen werfen zudem die Frage auf, warum lediglich ein geringer Anteil von 0,0002 Prozent der transduzierten humanen Hautfibroblasten den Charakter von iPS angenommen hat (Takahashi et al., 2007). Die Autoren konstatieren, dass dies undifferenzierte Stamm- bzw. Progenitorzellen sind, deren Suszeptibilität für eine Reprogrammierung deutlich höher ist. Sollte sich dies bewahrheiten, so ist anzunehmen, dass es sich hierbei um humane mesenchymale Stammzellen oder eine Subpopulation von hMSC handelt. Somit gerät die Forschung an hMSC und der zielgerichteten genetischen Modifikation weiter in den Mittelpunkt aktueller Stammzellforschung und sollte sicherlich ein wesentlicher Gegenstand zukünftiger Forschungsanstrengung bleiben.

H LITERATURVERZEICHNIS

- Aiyar, A., Tyree, C. and Sugden, B. (1998). The plasmid replicon of EBV consists of multiple cis-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. *EMBO J.* 17, 6394-6403.
- Aluigi, M., Fogli, M., Curti, A., Isidori, A., Gruppioni, E., Chiodoni, C., Colombo, M. P., Versura, P., Errico-Grigioni, A., Ferri, E. et al. (2006). Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 454-461.
- Andreas, S., Schwenk, F., Kuter-Luks, B., Faust, N. and Kuhn, R. (2002). Enhanced efficiency through nuclear localization signal fusion on phage PhiC31-integrase: activity comparison with Cre and FLPe recombinase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 30, 2299-2306.
- Baksh, D., Song, L. and Tuan, R. S. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell Mol. Med.* 8, 301-316.
- Baum, C., Kustikova, O., Modlich, U., Li, Z. and Fehse, B. (2006). Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. *Hum. Gene Ther.* 17, 253-263.
- Bernstein, J., Sella, O., Le, S. Y. and Elroy-Stein, O. (1997). PDGF2/c-sis mRNA leader contains a differentiation-linked internal ribosomal entry site (D-IRES). *J. Biol. Chem.* 272, 9356-9362.
- Bertoni, C., Jarrahan, S., Wheeler, T. M., Li, Y., Olivares, E. C., Calos, M. P. and Rando, T. A. (2006). Enhancement of plasmid-mediated gene therapy for muscular dystrophy by directed plasmid integration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103, 419-424.
- Bester, A. C., Schwartz, M., Schmidt, M., Garrigue, A., Hacein-Bey-Abina, S., Cavazzana-Calvo, M., Ben-Porat, N., Von, K. C., Fischer, A. and Kerem, B. (2006). Fragile sites are preferential targets for integrations of MLV vectors in gene therapy. *Gene Ther.* 13, 1057-1059.
- Bianco, P. and Robey, P. G. (2001). Stem cells in tissue engineering. *Nature* 414, 118-121.
- Billinton, N. and Knight, A. W. (2001). Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Anal. Biochem.* 291, 175-197.
- Blum, J. S., Parrott, M. B., Mikos, A. G. and Barry, M. A. (2004). Early osteoblastic differentiation induced by dexamethasone enhances adenoviral gene delivery to marrow stromal cells. *J. Orthop. Res.* 22, 411-416.
- Bordignon, C. and Roncarolo, M. G. (2002). Therapeutic applications for hematopoietic stem cell gene transfer. *Nat. Immunol.* 3, 318-321.
- Burns, T. C., Ortiz-Gonzalez, X. R., Gutierrez-Perez, M., Keene, C. D., Sharda, R., Demorest, Z. L., Jiang, Y., Nelson-Holte, M., Soriano, M., Nakagawa, Y. et al. (2006). Thymidine analogs are transferred from prelabeled donor to host cells in the central nervous system after transplantation: a word of caution. *Stem Cells* 24, 1121-1127.
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint, B. G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L. et al. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288, 669-672.
- Chalberg, T. W., Portlock, J. L., Olivares, E. C., Thyagarajan, B., Kirby, P. J., Hillman, R. T., Hoelters, J. and Calos, M. P. (2006). Integration specificity of phage phiC31 integrase in the human genome. *J. Mol. Biol.* 357, 28-48.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. and Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.
- Chamberlain, J. R., Schwarze, U., Wang, P. R., Hirata, R. K., Hankenson, K. D., Pace, J. M., Underwood, R. A., Song, K. M., Sussman, M., Byers, P. H. et al. (2004). Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Science* 303, 1198-1201.

- Chan, A. W., Chong, K. Y., Martinovich, C., Simerly, C. and Schatten, G. (2001). Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. *Science* 291, 309-312.
- Chaudhary, L. R., Hofmeister, A. M. and Hruska, K. A. (2004). Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone* 34, 402-411.
- Check, E. (2005). Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature* 433, 561.
- Chiu, W., Niwa, Y., Zeng, W., Hirano, T., Kobayashi, H. and Sheen, J. (1996). Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr. Biol.* 6, 325-330.
- Chudakov, D. M., Lukyanov, S. and Lukyanov, K. A. (2005). Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. *Trends Biotechnol.* 23, 605-613.
- Ciccarella, M., Hoelters, J., Geissler, C., Drechsel, M., Guelkan, H., Schieker, M., Mutschler, W., Jochum, M. and Neth, P. (2004). Knock-down of gene expression by RNA interference in human mesenchymal stem cells. *Keystone Symposium on Stem Cells, Keystone Resort, Colorado, USA*.
- Colosimo, A., Goncz, K. K., Holmes, A. R., Kunzelmann, K., Novelli, G., Malone, R. W., Bennett, M. J. and Gruenert, D. C. (2000). Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *Biotechniques* 29, 314-2, 324.
- Colter, D. C., Sekiya, I. and Prockop, D. J. (2001). Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98, 7841-7845.
- Combes, P., Till, R., Bee, S. and Smith, M. C. (2002). The streptomyces genome contains multiple pseudo-attB sites for the (phi)C31-encoded site-specific recombination system. *J. Bacteriol.* 184, 5746-5752.
- Conrad, C. and Huss, R. (2005). Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. *J. Surg. Res.* 124, 201-208.
- Cooper, M. J., Lippa, M., Payne, J. M., Hatzivassiliou, G., Reifenberg, E., Fayazi, B., Perales, J. C., Morrison, L. J., Templeton, D., Piekarz, R. L. et al. (1997). Safety-modified episomal vectors for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 6450-6455.
- Corbel, S. Y., Lee, A., Yi, L., Duenas, J., Brazelton, T. R., Blau, H. M. and Rossi, F. M. (2003). Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *Nat. Med.* 9, 1528-1532.
- Couzin, J. and Kaiser, J. (2005). Gene therapy. As Gelsinger case ends, gene therapy suffers another blow. *Science* 307, 1028.
- Daley, G. O., Ahrlund, R. L., Auerbach, J. M., Benvenisty, N., Charo, R. A., Chen, G., Deng, H. K., Goldstein, L. S., Hudson, K. L., Hyun, I. et al. (2007). Ethics. The ISSCR guidelines for human embryonic stem cell research. *Science* 315, 603-604.
- De Palma, M., Montini, E., Santoni de Sio, F. R., Benedicenti, F., Gentile, A., Medico, E. and Naldini, L. (2005). Promoter trapping reveals significant differences in integration site selection between MLV and HIV vectors in primary hematopoietic cells. *Blood* 105, 2307-2315.
- Dong, J. Y., Fan, P. D. and Frizzell, R. A. (1996). Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum. Gene Ther.* 7, 2101-2112.
- Donovan, P. J. and Gearhart, J. (2001). The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 414, 92-97.
- Dutheil, N., Shi, F., Dupressoir, T. and Linden, R. M. (2000). Adeno-associated virus site-specifically integrates into a muscle-specific DNA region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 4862-4866.
- Eggan, K., Baldwin, K., Tackett, M., Osborne, J., Gogos, J., Chess, A., Axel, R. and Jaenisch, R. (2004). Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature* 428, 44-49.
- Ehrhardt, A., Xu, H., Huang, Z., Engler, J. A. and Kay, M. A. (2005). A direct comparison of two nonviral gene therapy vectors for somatic integration: in vivo evaluation of the bacteriophage integrase phiC31 and the Sleeping Beauty transposase. *Mol. Ther.* 11, 695-706.

- Engvall, E. and Perlman, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871-874.
- Epstein, E. H., Jr. (1992). Molecular genetics of epidermolysis bullosa. *Science* 256, 799-804.
- Evans, M. J. and Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Falk, A., Holmstrom, N., Carlen, M., Cassidy, R., Lundberg, C. and Frisen, J. (2002). Gene delivery to adult neural stem cells. *Exp. Cell Res.* 279, 34-39.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M. and Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 84, 7413-7417.
- Forster, A. C. and Church, G. M. (2007). Synthetic biology projects in vitro. *Genome Res.* 17, 1-6.
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K. and Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3, 393-403.
- Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K. and Gerasimov, U. V. (1987). Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet.* 20, 263-272.
- Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I. and Petrakova, K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 16, 381-390.
- Gerdes, H. H. and Kaether, C. (1996). Green fluorescent protein: applications in cell biology. *FEBS Lett.* 389, 44-47.
- Gershon, H., Ghirlando, R., Guttman, S. B. and Minsky, A. (1993). Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry* 32, 7143-7151.
- Giepmans, B. N., Adams, S. R., Ellisman, M. H. and Tsien, R. Y. (2006). The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* 312, 217-224.
- Glover, D. J., Lipps, H. J. and Jans, D. A. (2005). Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat. Rev. Genet.* 6, 299-310.
- Goodell, M. A. (2003). Stem-cell "plasticity": befuddled by the muddle. *Curr. Opin. Hematol.* 10, 208-213.
- Gopaul, D. N., Guo, F. and Van Duyne, G. D. (1998). Structure of the Holliday junction intermediate in Cre-loxP site-specific recombination. *EMBO J.* 17, 4175-4187.
- Greely, H. T. (2006). Moving human embryonic stem cells from legislature to lab: remaining legal and ethical questions. *PLoS Med.* 3, e143.
- Gresch, O., Engel, F. B., Nestic, D., Tran, T. T., England, H. M., Hickman, E. S., Korner, I., Gan, L., Chen, S., Castro-Obregon, S. et al. (2004). New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods* 33, 151-163.
- Gronthos, S., Zannettino, A. C., Hay, S. J., Shi, S., Graves, S. E., Kortessidis, A. and Simmons, P. J. (2003). Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J. Cell Sci.* 116, 1827-1835.
- Groth, A. C., Fish, M., Nusse, R. and Calos, M. P. (2004). Construction of transgenic drosophila by using the site-specific integrase from phage phi C31. *Genetics* 166, 1775-1782.
- Groth, A. C., Olivares, E. C., Thyagarajan, B. and Calos, M. P. (2000). A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 5995-6000.
- Grove, J. E., Bruscia, E. and Krause, D. S. (2004). Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 22, 487-500.
- Gurtu, V., Yan, G. and Zhang, G. (1996). IRES bicistronic expression vectors for efficient creation of stable mammalian cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229, 295-298.

- Haas, J., Park, E. C. and Seed, B. (1996). Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr. Biol.* 6, 315-324.
- Hacein-Bey-Abina, S., Le Deist, F., Carlier, F., Bouneaud, C., Hue, C., De Villartay, J. P., Thrasher, A. J., Wulffraat, N., Sorensen, R., Dupuis-Girod, S. et al. (2002). Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N. Engl. J. Med.* 346, 1185-1193.
- Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J. L., Fraser, C. C., Cavazzana-Calvo, M. et al. (2003a). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 348, 255-256.
- Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E. et al. (2003b). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-419.
- Hadjantonakis, A. K., Gertsenstein, M., Ikawa, M., Okabe, M. and Nagy, A. (1998). Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mech. Dev.* 76, 79-90.
- Heim, R., Prasher, D. C. and Tsien, R. Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91, 12501-12504.
- Herzog, E. L., Chai, L. and Krause, D. S. (2003). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 102, 3483-3493.
- Hoelters, J., Ciccarella, M., Drechsel, M., Geissler, C., Gulkan, H., Bocker, W., Schieker, M., Jochum, M. and Neth, P. (2005a). Nonviral genetic modification mediates effective transgene expression and functional RNA interference in human mesenchymal stem cells. *J. Gene Med.* 7, 718-728.
- Hoelters, J., Ciccarella, M., Maiostre, J., Keravala, A., Jarrahan, S., Chalberg, T. W., Calos, M. P., Jochum, M. and Neth, P. (2005b). Site-specific Chromosomal Integration in Human Mesenchymal Stem Cells. *4th Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society, München, Deutschland.*
- Hollis, R. P., Stoll, S. M., Sclimenti, C. R., Lin, J., Chen-Tsai, Y. and Calos, M. P. (2003). Phage integrases for the construction and manipulation of transgenic mammals. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 79.
- Hollon, T. (2000). Researchers and regulators reflect on first gene therapy death. *Nat. Med.* 6, 6.
- Horwitz, E. M., Gordon, P. L., Koo, W. K., Marx, J. C., Neel, M. D., McNall, R. Y., Muul, L. and Hofmann, T. (2002). 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* 99, 8932-8937.
- Huang, W. Y., Aramburu, J., Douglas, P. S. and Izumo, S. (2000). Transgenic expression of green fluorescence protein can cause dilated cardiomyopathy. *Nat. Med.* 6, 482-483.
- Hubner, K., Fuhrmann, G., Christenson, L. K., Kehler, J., Reinbold, R., De La, F. R., Wood, J., Strauss, J. F., III, Boiani, M. and Scholer, H. R. (2003). Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 300, 1251-1256.
- Huser, D., Weger, S. and Heilbronn, R. (2002). Kinetics and frequency of adeno-associated virus site-specific integration into human chromosome 19 monitored by quantitative real-time PCR. *J. Virol.* 76, 7554-7559.
- Jackson, K. A., Snyder, D. S. and Goodell, M. A. (2004). Skeletal muscle fiber-specific green autofluorescence: potential for stem cell engraftment artifacts. *Stem Cells* 22, 180-187.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M. et al. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.
- Kain, S. R., Adams, M., Kondepudi, A., Yang, T. T., Ward, W. W. and Kitts, P. (1995). Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. *Biotechniques* 19, 650-655.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D. and Smith, A. E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39, 499-509.

- Kay, M. A., Glorioso, J. C. and Naldini, L. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med.* 7, 33-40.
- Kay, M. A. and Nakai, H. (2003). Looking into the safety of AAV vectors. *Nature* 424, 251.
- Kazazian, H. H., Jr. (2004). Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303, 1626-1632.
- Keravala, A., Hoelters, J., Jarrahan, S., Chalberg, T. W., Ciccarella, M., Calos, M. P., Jochum, M. and Neth, P. (2005). Site-specific chromosomal integration in human mesenchymal stem cells mediated by phiC31 Integrase. *8th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, St. Louis, Missouri, USA.*
- Kiani, C., Chen, L., Wu, Y. J., Yee, A. J. and Yang, B. B. (2002). Structure and function of aggrecan. *Cell Res.* 12, 19-32.
- Kichler, A. (2004). Gene transfer with modified polyethylenimines. *J. Gene Med.* 6 Suppl 1:S3-10.
- Koc, O. N., Gerson, S. L., Cooper, B. W., Dyhouse, S. M., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I. and Lazarus, H. M. (2000). Rapid hematopoietic recovery after coinfection of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 18, 307-316.
- Kochling, J., König-Merediz, S. A., Stripecke, R., Buchwald, D., Korte, A., Von Einsiedel, H. G., Sack, F., Henze, G., Seeger, K., Wittig, B. et al. (2003). Protection of mice against Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia by cell-based vaccination using nonviral, minimalistic expression vectors and immunomodulatory oligonucleotides. *Clin. Cancer Res.* 9, 3142-3149.
- Kohn, D. B., Sadelain, M. and Glorioso, J. C. (2003). Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID. *Nat. Rev. Cancer* 3, 477-488.
- Korbling, M. and Estrov, Z. (2003). Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N. Engl. J. Med.* 349, 570-582.
- Labas, Y. A., Gurskaya, N. G., Yanushevich, Y. G., Fradkov, A. F., Lukyanov, K. A., Lukyanov, S. A. and Matz, M. V. (2002). Diversity and evolution of the green fluorescent protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99, 4256-4261.
- Lakshminpathy, U.; Pelacho, B.; Sudo, K.; Linehan, J. L.; Coucouvanis, E.; Kaufman, D. S. and Verfaillie, C. M. (2004). Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. *Stem Cells* 22, 531-543.
- Lee, K., Majumdar, M. K., Buyaner, D., Hendricks, J. K., Pittenger, M. F. and Mosca, J. D. (2001). Human mesenchymal stem cells maintain transgene expression during expansion and differentiation. *Mol. Ther.* 3, 857-866.
- Li, S. and Huang, L. (2000). Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther.* 7, 31-34.
- Lindemann, C., Schilz, A. J., Emons, B., Baum, C., Low, R., Fauser, A. A., Kuehlcke, K. and Eckert, H. G. (2002). Down-regulation of retroviral transgene expression during differentiation of progenitor-derived dendritic cells. *Exp. Hematol.* 30, 150-157.
- Luo, D. and Saltzman, W. M. (2000). Synthetic DNA delivery systems. *Nat. Biotechnol.* 18, 33-37.
- Manis, J. P. (2007). Knock out, knock in, knock down--genetically manipulated mice and the Nobel Prize. *N. Engl. J. Med.* 357, 2426-2429.
- Manno, C. S., Chew, A. J., Hutchison, S., Larson, P. J., Herzog, R. W., Arruda, V. R., Tai, S. J., Ragni, M. V., Thompson, A., Ozelo, M. et al. (2003). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 101, 2963-2972.
- Maris, M. B., Sandmaier, B. M., Storer, B. E., Chauncey, T., Stuart, M. J., Maziarz, R. T., Agura, E., Langston, A. A., Pulsipher, M., Storb, R. et al. (2004). Allogeneic hematopoietic cell transplantation after fludarabine and 2 Gy total body irradiation for relapsed and refractory mantle cell lymphoma. *Blood* 104, 3535-3542.
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 78, 7634-7638.

- Martinez-Salas, E. (1999). Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 458-464.
- Martinez-Serrano, A., Villa, A., Navarro, B., Rubio, F. J. and Bueno, C. (2000). Human neural progenitor cells: better blue than green? *Nat. Med.* 6, 483-484.
- McLaren, A. (2001). Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature* 414, 129-131.
- Mislick, K. A. and Baldeschwieler, J. D. (1996). Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93, 12349-12354.
- Miyawaki, A. (2002). Green fluorescent protein-like proteins in reef Anthozoa animals. *Cell Struct. Funct.* 27, 343-347.
- Mizuguchi, H., Xu, Z., Ishii-Watabe, A., Uchida, E. and Hayakawa, T. (2000). IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol. Ther.* 1, 376-382.
- Moskalenko, M., Chen, L., van Roey, M., Donahue, B. A., Snyder, R. O., McArthur, J. G. and Patel, S. D. (2000). Epitope mapping of human anti-adenovirus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. *J. Virol.* 74, 1761-1766.
- Nakai, H., Montini, E., Fuess, S., Storm, T. A., Grompe, M. and Kay, M. A. (2003). AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat. Genet.* 34, 297-302.
- Neth, P., Ciccarella, M., Egea, V., Hoelters, J., Jochum, M. and Ries, C. (2006). Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 1892-1903.
- Niidome, T. and Huang, L. (2002). Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther.* 9, 1647-1652.
- Normile, D. and Vogel, G. (2005). Stem cells. Korean university will investigate cloning paper. *Science* 310, 1748-1749.
- Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T. and Nishimune, Y. (1997). 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 407, 313-319.
- Olivares, E. C., Hollis, R. P., Chalberg, T. W., Meuse, L., Kay, M. A. and Calos, M. P. (2002). Site-specific genomic integration produces therapeutic Factor IX levels in mice. *Nat. Biotechnol.* 20, 1124-1128.
- Ortiz-Urda, S., Thyagarajan, B., Keene, D. R., Lin, Q., Fang, M., Calos, M. P. and Khavari, P. A. (2002). Stable nonviral genetic correction of inherited human skin disease. *Nat. Med.* 8, 1166-1170.
- Peister, A., Mellad, J. A., Wang, M., Tucker, H. A. and Prockop, D. J. (2004). Stable transfection of MSCs by electroporation. *Gene Ther.* 11, 224-228.
- Petite, H., Viateau, V., Bensaid, W., Meunier, A., de Pollak, C., Bourguignon, M., Oudina, K., Sedel, L. and Guillemain, G. (2000). Tissue-engineered bone regeneration. *Nat. Biotechnol.* 18, 959-963.
- Piechaczek, C., Fetzer, C., Baiker, A., Bode, J. and Lipps, H. J. (1999). A vector based on the SV40 origin of replication and chromosomal S/MARs replicates episomally in CHO cells. *Nucleic Acids Res.* 27, 426-428.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. and Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
- Plautz, J. D., Day, R. N., Dailey, G. M., Welsh, S. B., Hall, J. C., Halpain, S. and Kay, S. A. (1996). Green fluorescent protein and its derivatives as versatile markers for gene expression in living *Drosophila melanogaster*, plant and mammalian cells. *Gene* 173, 83-87.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. and Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229-233.
- Qi, H., Aguiar, D. J., Williams, S. M., La Pean, A., Pan, W. and Verfaillie, C. M. (2003). Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100, 3305-3310.

- Quenneville, S. P., Chapdelaine, P., Rousseau, J., Beaulieu, J., Caron, N. J., Skuk, D., Mills, P., Olivares, E. C., Calos, M. P. and Tremblay, J. P. (2004). Nucleofection of muscle-derived stem cells and myoblasts with phiC31 integrase: stable expression of a full-length-dystrophin fusion gene by human myoblasts. *Mol. Ther.* 10, 679-687.
- Ramalho-Santos, M., Yoon, S., Matsuzaki, Y., Mulligan, R. C. and Melton, D. A. (2002). "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* 298, 597-600.
- Raper, S. E., Chirmule, N., Lee, F. S., Wivel, N. A., Bagg, A., Gao, G. P., Wilson, J. M. and Batshaw, M. L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* 80, 148-158.
- Ries, C., Egea, V., Karow, M., Kolb, H., Jochum, M. and Neth, P. (2007). MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood* 109, 4055-4063.
- Rippon, H. J. and Bishop, A. E. (2004). Embryonic stem cells. *Cell Prolif.* 37, 23-34.
- Roesler, J., Brenner, S., Bukovsky, A. A., Whiting-Theobald, N., Dull, T., Kelly, M., Civin, C. I. and Malech, H. L. (2002). Third-generation, self-inactivating gp91(phox) lentivector corrects the oxidase defect in NOD/SCID mouse-repopulating peripheral blood-mobilized CD34+ cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease. *Blood* 100, 4381-4390.
- Rosen, E. D., Hsu, C. H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M. W., Gonzalez, F. J. and Spiegelman, B. M. (2002). C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev.* 16, 22-26.
- Rosenqvist, N., Hard Af, S. C., Samuelsson, C., Johansen, J. and Lundberg, C. (2002). Activation of silenced transgene expression in neural precursor cell lines by inhibitors of histone deacetylation. *J. Gene Med.* 4, 248-257.
- Russell, D. W. (2003). AAV loves an active genome. *Nat. Genet.* 34, 241-242.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning - A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 74, 5463-5467.
- Sauer, B. and Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 85, 5166-5170.
- Service, R. F. (2008). Nobel prize in chemistry. Three scientists bask in prize's fluorescent glow. *Science* 322, 361.
- Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R. and Bushman, F. (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110, 521-529.
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A. and Tsien, R. Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods.* 2, 905-909.
- Shapiro, H. T. (1999). Ethical dilemmas and stem cell research. *Science* 285, 2065.
- Shimomura, O., Johnson, F. H., and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J. Cell Comp. Physiol.* 59:229-39.
- Shiroki, K., Ohsawa, C., Sugi, N., Wakiyama, M., Miura, K., Watanabe, M., Suzuki, Y. and Sugano, S. (2002). Internal ribosome entry site-mediated translation of Smad5 in vivo: requirement for a nuclear event. *Nucleic Acids Res.* 30, 2851-2861.
- Siminovitch, L., McCulloch, E. A. and Till, J. E. (1963). The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J. Cell Physiol.* 62:327-36., 327-336.
- Slack, J. M. (2000). Stem cells in epithelial tissues. *Science* 287, 1431-1433.
- Smith, M. C., Till, R., Brady, K., Soutanas, P., Thorpe, H. and Smith, M. C. (2004). Synapsis and DNA cleavage in phiC31 integrase-mediated site-specific recombination. *Nucleic Acids Res.* 32, 2607-2617.

- Som, T., Armstrong, K. A., Volkert, F. C. and Broach, J. R. (1988). Autoregulation of 2 micron circle gene expression provides a model for maintenance of stable plasmid copy levels. *Cell* 52, 27-37.
- Somia, N. and Verma, I. M. (2000). Gene therapy: trials and tribulations. *Nat. Rev. Genet.* 1, 91-99.
- Sonawane, N. D., Szoka, F. C., Jr. and Verkman, A. S. (2003). Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J. Biol. Chem.* 278, 44826-44831.
- Stark, W. M., Boocock, M. R. and Sherratt, D. J. (1992). Catalysis by site-specific recombinases. *Trends Genet.* 8, 432-439.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
- Tavare, J. M., Fletcher, L. M. and Welsh, G. I. (2001). Using green fluorescent protein to study intracellular signalling. *J. Endocrinol.* 170, 297-306.
- Thomas, C. E., Ehrhardt, A. and Kay, M. A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* 4, 346-358.
- Thomas, N. (2007). Fluorescent proteins and engineered cell lines. *Methods Mol. Biol.* 356:165-87., 165-187.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Thorpe, H. M. and Smith, M. C. (1998). In vitro site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 5505-5510.
- Thorpe, H. M., Wilson, S. E. and Smith, M. C. (2000). Control of directionality in the site-specific recombination system of the *Streptomyces* phage phiC31. *Mol. Microbiol.* 38, 232-241.
- Thyagarajan, B., Guimaraes, M. J., Groth, A. C. and Calos, M. P. (2000). Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene* 244, 47-54.
- Thyagarajan, B., Olivares, E. C., Hollis, R. P., Ginsburg, D. S. and Calos, M. P. (2001). Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase. *Mol. Cell Biol.* 21, 3926-3934.
- Tian, C., Bagley, J., Cretin, N., Seth, N., Wucherpennig, K. W. and Iacomini, J. (2004). Prevention of type 1 diabetes by gene therapy. *J. Clin. Invest.* 114, 969-978.
- Till, J. E., McCulloch, E. A. and Siminovitch, L. (1964). A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 51:29-36., 29-36.
- Torbett, B. E. (2002). Reporter genes: too much of a good thing? *J. Gene Med.* 4, 478-479.
- Traynor, A. E., Schroeder, J., Rosa, R. M., Cheng, D., Stefka, J., Mujais, S., Baker, S. and Burt, R. K. (2000). Treatment of severe systemic lupus erythematosus with high-dose chemotherapy and haemopoietic stem-cell transplantation: a phase I study. *Lancet* 356, 701-707.
- Tseng, W. C., Haselton, F. R. and Giorgio, T. D. (1997). Transfection by cationic liposomes using simultaneous single cell measurements of plasmid delivery and transgene expression. *J. Biol. Chem.* 272, 25641-25647.
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67:509-44., 509-544.
- Turgeman, G., Aslan, H., Gazit, Z. and Gazit, D. (2002). Cell-mediated gene therapy for bone formation and regeneration. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 4, 390-394.
- Udvardi, A., Kufferath, I., Grutsch, H., Zatloukal, K. and Volc-Platzer, B. (1999). Uptake of exogenous DNA via the skin. *J. Mol. Med.* 77, 744-750.
- Vagner, S., Galy, B. and Pyronnet, S. (2001). Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep.* 2, 893-898.
- Verfaillie, C. M. (2002). Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol.* 12, 502-508.

- Viallet, P. M. and Vo-Dinh, T. (2003). Monitoring intracellular proteins using fluorescence techniques: from protein synthesis and localization to activity. *Curr. Protein Pept. Sci.* 4, 375-388.
- Voziyanov, Y., Pathania, S. and Jayaram, M. (1999). A general model for site-specific recombination by the integrase family recombinases. *Nucleic Acids Res.* 27, 930-941.
- Wagers, A. J. and Weissman, I. L. (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116, 639-648.
- Weissinger, F., Reimer, P., Waessa, T., Buchhofer, S., Schertlin, T., Kunzmann, V. and Wilhelm, M. (2003). Gene transfer in purified human hematopoietic peripheral-blood stem cells by means of electroporation without prestimulation. *J. Lab Clin. Med.* 141, 138-149.
- Weissman, I. L. (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100, 157-168.
- Wells, D. J. (2004). Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods. *Gene Ther.* 11, 1363-1369.
- Werner, R. (2000). IRES elements in connexin genes: a hypothesis explaining the need for connexins to be regulated at the translational level. *IUBMB Life* 50, 173-176.
- Winslow, T. (2001). Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. Department of Health and Human Services. June 2001. <<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/2001report>>.
- Witthauer, J. (2003). Vergleichende molekulare Charakterisierung von humanen mesenchymalen Stammzellen und primären Osteoblasten mittels der Microarray-Technik. *Diplomarbeit aus dem Chirurgischen Forschungslabor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik - Innenstadt der Universität München.*
- Wolkowicz, R. and Nolan, G. P. (2005). Gene therapy progress and prospects: novel gene therapy approaches for AIDS. *Gene Ther.* 12, 467-476.
- Woods, N. B., Muessig, A., Schmidt, M., Flygare, J., Olsson, K., Salmon, P., Trono, D., von Kalle, C. and Karlsson, S. (2003). Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis. *Blood* 101, 1284-1289.
- Wraith, J. E. (2001). Ornithine carbamoyltransferase deficiency. *Arch. Dis. Child* 84, 84-88.
- Wu, X., Li, Y., Crise, B. and Burgess, S. M. (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 300, 1749-1751.
- Wurtele, H., Little, K. C. and Chartrand, P. (2003). Illegitimate DNA integration in mammalian cells. *Gene Ther.* 10, 1791-1799.
- Yang, F., Moss, L. G. and Phillips, G. N., Jr. (1996a). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 14, 1246-1251.
- Yang, T. T., Cheng, L. and Kain, S. R. (1996b). Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res.* 24, 4592-4593.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., ntosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R. et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.
- Zabner, J., Fasbender, A. J., Moninger, T., Poellinger, K. A. and Welsh, M. J. (1995). Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J. Biol. Chem.* 270, 18997-19007.
- Zhang, J., Campbell, R. E., Ting, A. Y. and Tsien, R. Y. (2002). Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 906-918.

I ANHANG

I.1 Kultivierung von hMSC

Die Kultivierung und Subkultivierung von hMSC erfolgte je nach Erfordernis in Zellkulturschalen unterschiedlicher Größe. Einen Überblick über die ausgesäte Zellzahl und die erwartete Zellernte sowie das notwendige Mediumvolumen gibt die folgende Tabelle I1 zusammengefasst wieder.

Tab. I1: Aussaat und Ernte von hMSC in Zellkulturschalen verschiedener Größe.

Die effektive Kulturfläche der jeweiligen Kavitäten wurde von den Daten des Herstellers der Platten (Nunc, USA) übernommen. Die Anzahl der Zellen bei Zellernte entspricht der zu erwartenden Zellzahl, wenn die Zellen eine 90 -100 %ige Konfluenz erreicht haben.

Kavitätenformat	Kulturfläche in [cm ²]	Zell-Aussaat Zellzahl in [1000]	Zellernte Zellzahl in [1000]	Mediumvolumen in [ml]
T 25	25	125	375 – 1000	5
T 75	75	375	1125 – 3000	10
T 150	150	750	2250 – 6000	20
35 mm	8,8	45.000	135 – 360	2
60 mm	21,5	110.000	330 – 880	5
100 mm	56,7	275.000	825 – 2200	7
150 mm	145	725.000	2175 – 5800	18
6 well	9,6	48.000	144 – 384	2
12 well	3,5	17.500	52,5 – 140	1
24 well	1,9	9500	28,5 – 760	0,5
48 well	1,1	5500	16,5 – 44	0,25
96 well	0,33	1650	4,9 – 13,2	0,15

I.2 Transfektionsprotokoll für METAFECTENE

1. Zur Transfektion werden 10.000 hMSC pro Quadratcentimeter Kulturfläche einer Zellkulturschale in 150 - 300 µl Stammzellwachstumsmedium (entsprechend der Kavitätengröße, s. Tab. I2) pro 10.000 Zellen ausplattiert.
2. Die Zellen werden 18-24 Stunden bei 37 °C in einem CO₂-Brutschrank (5 % CO₂) und gesättigter Wasserdampf-Atmosphäre inkubiert. Die optische Konfluenz sollte 60 % der Wachstumsfläche betragen.
3. Vor dem Gebrauch werden die DNA-Lösung und das Transfektionsreagens jeweils kurz geschüttelt (Vortex-Mischer). Beide Lösungen sollten Raumtemperatur besitzen.
4. In zwei Polystyrol-Röhrchen werden jeweils 15 µl Serum- und Antibiotika-freies Medium (DMEM) pro 10.000 Zellen vorgelegt. In eines der beiden Röhrchen wird 0,2 µg der Plasmid-DNA (ebenfalls bezogen auf 10.000 hMSC) gegeben. In das zweite Röhrchen wird die 4,5-fache Menge (0,9 µl pro 10.000 hMSC) METAFECTENE pipettiert. Beide Suspensionen werden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren jeweils gemischt.
5. Nach der Vereinigung der beiden Suspensionen werden diese wiederum durch Auf- und Abpipettieren vermischt und 15 bis 20 Minuten inkubiert.
6. Inzwischen wird das überstehende Medium von den hMSC abgenommen und durch 250 µl frisches Stammzellwachstumsmedium pro 10.000 Zellen ersetzt.
7. Die DNA/Lipid-Komplexe werden nun zu den Zellen gegeben, vorsichtig mit dem Stammzellwachstumsmedium vermischt und sechs Stunden im CO₂-Brutschrank inkubiert.
8. Schließlich wird die Transfektionslösung nach Beendigung der Inkubation von den Zellen abgenommen und durch 150 - 300 µl Stammzellwachstumsmedium pro 10.000 Zellen ersetzt (s. Tab. I2).

Tab. I2: Transfektion von hMSC mit METAFECTENE in verschiedenen Zellkultur-Formaten.

Bei den Medienvolumina handelt es sich um das jeweils gängige Volumen (s. Tab. I1). Die Verdünnungsvolumina sind auf die Verdünnung der DNA bzw. des Reagenzes in der entsprechenden Menge DMEM bezogen.

	96-well	24-well	12-well	6-well	T25	T75
Oberfläche [cm ²]	0,3	1,9	3,5	9,6	25	75
Zellzahl	3000	19.000	35.000	96.000	250.000	750.000
Medium [ml]	0,1	0,5	1	2	5	10
DNA [µg]	0,07	0,4	0,7	2	5	15
METAFECTENE [µl]	0,32	1,8	3,2	9	22,5	67,5
Verdünnung [µl]	5	30	50	150	375	1000

I.3 Transfektionsprotokoll für Lipofectamine Plus

1. Zur Transfektion werden 10.000 hMSC pro Quadratcentimeter Kulturfläche einer Zellkulturschale in 230 - 400 µl Stammzellwachstumsmedium (entsprechend der Kavitätengröße, s. Tab. I3) pro 10.000 Zellen ausplattiert.
2. Die Zellen werden 18-24 Stunden bei 37 °C in einem CO₂-Brutschrank (5 % CO₂) und gesättigter Wasserdampf-Atmosphäre inkubiert. Die optische Konfluenz sollte 60 % der Wachstumsfläche betragen.
3. Vor dem Gebrauch wird die DNA-Lösung geschüttelt (Vortex-Mischer) und kurz zentrifugiert. Das Transfektionsreagens hingegen wird nur durch leichtes Schwenken durchmischt.
4. In zwei Polystyrol-Röhrchen werden jeweils 35 µl Serum- und Antibiotika-freies Medium (DMEM) pro 10.000 Zellen vorgelegt.
5. In eines der beiden Röhrchen wird 0,2 µg der Plasmid-DNA (ebenfalls bezogen auf 10.000 hMSC) gegeben.
6. Zur Präkomplexierung der DNA wird die dreifache Menge (bezogen auf die DNA) PLUS-Reagens (d.h. 0,6 µl pro 10.000 Zellen) in die DNA-Medium-Suspension pipettiert und diese durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren durchmischt. Die Bildung der Komplexe benötigt eine Inkubationszeit von 15 Minuten (bei Raumtemperatur).
7. Nach Ablauf der Inkubation des DNA-PLUS-Gemisches wird in das zweite Röhrchen die 4-fache Menge (0,8 µl pro 10.000 hMSC) Lipofectamine pipettiert. Die Suspension wird durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt.
8. Nach der Vereinigung der beiden Suspensionen werden diese wiederum durch Auf- und Abpipettieren vermischt und 15 bis 20 Minuten inkubiert.
9. Inzwischen wird das Medium von den hMSC abgenommen und durch ca. 250 µl frisches Serum- und Antibiotika-freies Medium pro 10.000 Zellen ersetzt.
10. Die DNA/Lipid - Komplexe werden zu den Zellen gegeben, vorsichtig mit dem Medium vermischt und sechs Stunden im CO₂-Brutschrank inkubiert.
11. Die Transfektionslösung wird nach Ablauf der Inkubationszeit von den Zellen abgenommen und durch 230 - 400 µl Stammzellwachstumsmedium pro 10.000 Zellen ersetzt (s. Tab. I3).

Tab. I3: Transfektion von hMSC mit Lipofectamine Plus in verschiedenen Zellkultur-Formaten.

Bei den Medienvolumina handelt es sich um das jeweils gängige Volumen (s. Tab. I1). Die Verdünnungsvolumina sind auf die Verdünnung der DNA bzw. des Reagenzes in der entsprechenden Menge DMEM bezogen.

	96-well	24-well	12-well	6-well	T25	T75
Oberfläche [cm ²]	0,3	1,9	3,5	9,6	25	75
Zellzahl	2800	16.000	30.000	80.000	215.000	625.000
Medium [ml]	0,1	0,5	1	2	5	10
DNA [µg]	0,06	0,32	0,6	1,6	4,3	12,5
PLUS [µl]	0,18	0,96	1,8	4,8	12,9	37,5
Lipofectamine [µl]	0,24	1,28	2,4	6,4	17,2	50
Verdünnung [µl]	5	30	50	150	375	1000

I.4 Transfektionsprotokoll für Lipofectamine 2000

1. Zur Transfektion werden 8500 hMSC pro Quadratcentimeter Kulturfläche einer Zellkulturschale in 200 - 350 μ l Stammzellwachstumsmedium (entsprechend der Kavitätengröße, s. Tab. I4) pro 8500 Zellen ausplattiert.
2. Die Zellen werden 18-24 Stunden bei 37 °C in einem CO₂-Brutschrank (5 % CO₂) und gesättigter Wasserdampf-Atmosphäre inkubiert. Die optische Konfluenz sollte 50 % der Wachstumsfläche betragen.
3. Vor dem Gebrauch wird die DNA-Lösung geschüttelt (Vortex-Mischer) und kurz zentrifugiert. Das Transfektionsreagens hingegen wird nur durch leichtes Schwenken durchmischt. Die Lösungen sollten beide Raumtemperatur besitzen.
4. In zwei Polystyrol-Röhrchen werden jeweils ca. 30 μ l Serum- und Antibiotika-freies Medium (DMEM) pro 8500 Zellen vorgelegt. In eines der beiden Röhrchen wird 0,17 μ g der Plasmid-DNA (ebenfalls bezogen auf 8500 hMSC) gegeben. In das zweite Röhrchen wird die 1,5-fache Menge (0,26 μ l pro 8500 hMSC) Lipofectamine 2000 pipettiert. Beide Suspensionen werden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt.
5. Nach der Vereinigung der beiden Suspensionen werden diese wiederum durch Auf- und Abpipettieren vermischt und 15 bis 20 Minuten inkubiert.
6. Inzwischen wird das Medium von den hMSC abgenommen und durch 250 μ l frisches Stammzellwachstumsmedium pro 8500 Zellen ersetzt.
7. Die DNA/Lipid - Komplexe werden zu den Zellen gegeben, vorsichtig mit dem Stammzellwachstumsmedium vermischt und sechs Stunden im CO₂-Brutschrank inkubiert.
8. Die Transfektionslösung wird nach vollständiger Inkubationszeit von den Zellen abgenommen und durch 200 - 350 μ l Stammzellwachstumsmedium pro 8500 Zellen ersetzt (s. Tab. I4).

Tab. I4: Transfektion von hMSC mit Lipofectamine 2000 in verschiedenen Zellkultur-Formaten.

Bei den Medienvolumina handelt es sich um das jeweils gängige Volumen(s. Tab. I1). Die Verdünnungsvolumina sind auf die Verdünnung der DNA bzw. des Reagenzes in der entsprechenden Menge DMEM bezogen.

	96-well	24-well	12-well	6-well	T25	T75
Oberfläche [cm ²]	0,3	1,9	3,5	9,6	25	75
Zellzahl	2800	16.000	30.000	80.000	215.000	625.000
Medium [ml]	0,1	0,5	1	2	5	10
DNA [μ g]	0,06	0,32	0,6	1,6	4,3	12,5
Lipofectamine 2000 [μ l]	0,09	0,48	0,9	2,4	6,45	18,75
Verdünnung [μ l]	10	50	100	250	750	2000

J CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Robert Jürgen Hölters
Geburtsdatum: 18. April 1978
Geburtsort: Wasserburg am Inn
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Gabriele Hölters, geb. Stein
Joachim Hölters, Beamter, † 2005
Geschwister: Stefan Hölters, Architekt

SCHULISCHE AUSBILDUNG

09/88 – 07/97 Luitpold-Gymnasium Wasserburg am Inn

ZIVILDienst

08/97 – 08/98 Zivildienst auf der Intensivstation der Chirurgischen Klinik - Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

05/99 bis 04/06 Studium der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der LMU München
04/06 Ärztliche Approbation mit der Note 1,99 (gut)
09/02 – 05/04 Zusatzstudium „Molekulare Medizin“
an der Medizinischen Fakultät der LMU München

KLINISCHE AUSBILDUNG

03/01 – 04/01 Differentialdiagnostik der Inneren Medizin und Pneumologie
Asklepios Fachkliniken München – Gauting
03/04 – 04/04 Chirurgische Ambulanz
Chirurgische Klinik – Innenstadt der LMU München
09/04 – 10/04 Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
in der Chirurgischen Klinik – Innenstadt der LMU München
04/05 – 07/05 1. Tertial des „Praktischen Jahres“ im Fachbereich Radiologie
Institut für Klinische Radiologie an der Poliklinik, Chirurgischen Klinik
und Medizinischen Klinik des Standortes Innenstadt der LMU München
08/05 – 11/05 2. Tertial des „Praktischen Jahres“ im Fachbereich Innere Medizin
Medizinische Kliniken II und III sowie Nothilfe der Medizinischen
Kliniken I-III am Standort Großhadern der LMU München
12/05 – 03/06 3. Tertial des „Praktischen Jahres“ im Fachbereich Chirurgie
Chirurgische Abteilung der Asklepios Fachkliniken München – Gauting

WISSENSCHAFTLICHE AUSBILDUNG

- 09/02 – 10/02 Praktikum „Molekularbiologische Diagnostik“
Max v. Pettenkofer Institut der LMU München
- 11/02 – 05/04 Wissenschaftliche Hilfskraft
bei Herrn Prof. Dr. med. Wolf Mutschler,
Arbeitsgruppe Dr. rer. nat. Peter Neth, Chirurgisches Forschungslabor,
Chirurgische Klinik – Innenstadt der LMU München
- 07/04 – 09/04 *Internship*
bei Frau Prof. Dr. Michele Calos,
Genetics Department, Stanford University, CA, USA
- 10/04 – 03/05 Wissenschaftliche Hilfskraft
bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Marianne Jochum,
Arbeitsgruppe Dr. rer. nat. Peter Neth,
Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie,
in der Chirurgischen Klinik – Innenstadt der LMU München

DISSERTATION

„Zielgerichtete genetische Modifikation humaner mesenchymaler Stammzellen mittels liposomaler Transfektion nicht-viraler Vektoren“
Chirurgisches Forschungslabor und Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik – Innenstadt der LMU München

ÄRZTLICHE TÄTIGKEIT:

- Seit 06/06 Arzt in der Weiterbildung zum Facharzt für Innere Medizin mit
Schwerpunkt Pneumologie an den Asklepios Fachkliniken – München
Gauting

STIPENDIEN

- 09/02 – 05/04 Promotionsstudium „Molekulare Medizin“ der LMU München (13.500 €)
- 07/04 – 09/04 Reisemittel des FöFoLe (Förderprogramm für Forschung und Lehre der
Medizinischen Fakultät der LMU München) zum Besuch der *Stanford
University, CA, USA* (2500 €)

AUSZEICHNUNGEN

- 01/04 *Keystone Symposia Scholarship* der *National Institutes of Health*
(N.I.H.), USA für die Präsentation des Posters „*Stable Nonviral Site-
Specific Integration in Human Mesenchymal Stem Cells*“ auf dem
Keystone Symposium on Stem Cells, Keystone Resort, Colorado, USA,
2004 (1000 US\$)

AUSGEWÄHLTE POSTER UND VORTRÄGE**2nd Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society, Genua, Italien 2003**

"Stable Transfection of Human Mesenchymal Stem Cells with Fluorescent Reporter Genes"

Hoelters, J., Ciccarella, M., Geißler, C., Drechsel, M., Gülkan, H., Schieker, M., Mutschler, W., Jochum, M., Neth, P.

Keystone Symposium on Stem Cells, Keystone Resort, CO, USA, 2004

*"Stable Nonviral Site-Specific Integration in Human Mesenchymal Stem Cells" **

Hoelters, J., Ciccarella, M., Geißler, C., Drechsel, M., Gülkan, H., Schieker, M., Mutschler, W., Jochum, M., Neth, P.

* Posterpräsentation als Stipendiat der *National Institutes of Health, USA*

"Knock-Down of Gene Expression by RNA Interference in Human Mesenchymal Stem Cells"

Ciccarella, M., Hoelters, J., Geißler, C., Drechsel, M., Gülkan, H., Schieker, M., Mutschler, W., Jochum, M., Neth, P.

Keystone Symposium on Stem Cells, Banff, AB, Canada, 2005

"Efficient Nonviral Nucleic Acid Incorporation and Targeted Chromosomal Integration in Human Mesenchymal Stem Cells"

Hoelters, J., Ciccarella, M., Drechsel, M., Maiostre, J., Keravala, A., Jarrahan, S., Chalberg, T.W., Jochum, M., Calos, M.P., Neth, P.

"Wnt Signaling Regulates the Invasion capacity of Human Mesenchymal Stem Cells"

Ciccarella, M., Egea, V., Ries, C., Hoelters, J., Ilmer, M., Jochum, M., Neth, P.

8th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy in St. Louis, MO, USA, 2005

„Site-specific Chromosomal Integration in Human Mesenchymal Stem Cells Mediated By PhiC31 Integrase"

Keravala, A., Hoelters, J., Jarrahan, S., Chalberg, T.W., Ciccarella, M., Neth, P., Calos, M.P.

4th Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society, München, Deutschland, 2005

„Site-specific Chromosomal Integration in Human Mesenchymal Stem Cells"

Hoelters, J., Ciccarella, M., Maiostre, J., Keravala, A., Jarrahan, S., Chalberg, T.W., Calos, M.P., Jochum, M., Neth, P.

PUBLIKATIONEN

"Nonviral Genetic Modification Mediates Effective Transgene Expression and Functional RNA Interference in Human Mesenchymal Stem Cells"

Hoelters, J. and Ciccarella, M., Geißler, C., Drechsel, M., Gülkan, H., Böcker, W., Schieker, M., Jochum, M., Neth, P.

J Gene Med. 2005 Jun;7(6):718-728.

"Integration Specificity of Phage Φ C31 Integrase in the Human Genome"

Chalberg, T.W., Portlock, J.L., Olivares, E.C., Thyagarajan, B., Kirby, P.J., Hillmann, R.T., Hoelters, J., Calos, M.P.

J. Mol. Biol. 2006 Mar; 17;357(1): 28-48

"Wnt-Signalling Regulates Invasion Capacity of Human Mesenchymal Stem Cells"

Neth, P., Ciccarella, M., Egea, V., Hoelters, J., Jochum, M., Ries, C.

Stem Cells 2006 Aug; 24; 1892-1903

K DANKSAGUNG

Zum Zustandekommen dieser Arbeit haben in direkter oder indirekter Art und Weise eine Vielzahl von Personen beigetragen, denen ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen möchte.

Für die Überlassung des Themas danke ich Herrn Prof. Dr. W. Mutschler, Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt der LMU München und Frau Prof. Dr. M. Jochum, Leiterin der Abteilung Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik – Innenstadt der LMU, sehr herzlich. Herrn Prof. W. Mutschler gilt mein Dank für die fachliche, formelle und finanzielle Unterstützung während meiner Zeit im Chirurgischen Forschungslabor. Frau Prof. Jochum hat meine Arbeit mit unermüdlichem Einsatz, außerordentlichem Engagement und ebenfalls großzügiger finanzieller Unterstützung begleitet, wofür ich besonders dankbar bin.

Ein Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann, Vorsitzender der Kommission „Förderprogramm für Forschung und Lehre“ (FöFoLe) der das Promotionsstudium „Molekulare Medizin“ ins Leben gerufen hat, in dessen Rahmen diese Arbeit entstehen konnte.

Michele Calos, Professorin am *Genetics Department* der *Stanford University* sei an dieser Stelle dankend erwähnt. Ihre Bereitschaft zur Kooperation hat das Gelingen dieser Arbeit erst möglich gemacht. Die Zeit als *summer student* in ihrem Labor war sehr lehrreich und fruchtbar.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich meinem Betreuer Herrn Dr. Peter Neth aussprechen. Er hat wie kein anderer wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Dass das Wort „Doktor“ vom lateinischen *docere*, „lehren“, stammt, hat er beispielhaft verinnerlicht. Sein Engagement und seine Fähigkeit zur Motivation werden mir immer ein Vorbild sein. Für die zahllosen wissenschaftlichen Diskussionen, aber auch für die Unterstützung in den schweren Tagen der vergangenen Zeit kann ich ihm gar nicht genug danken.

Zudem bin ich Herrn Dr. Neth und Frau Prof. Jochum für die schnellen Korrekturen und Hilfestellungen beim Verfassen dieser Arbeit in hohem Maße dankbar.

Ganz besonders danken möchte ich Dr. Marisa „Paula“ Karow. Die Wissenschaft mit ihr zu entdecken und zu erleben war und ist ein unvergessliches Erlebnis. Die anfängliche gemeinsame Freude am Forschen ist zu einer unvergleichlichen Freundschaft herangewachsen, die mich im Beruflichen wie im Privaten prägt.

Ein herzliches Dankeschön gilt außerdem

Claudia Geißler, die mich zusammen mit Bettina Rinjes in die hohe Kunst des praktischen Arbeitens eingeführt hat, und das mit unvergleichlicher Geduld und Sorgfalt getan hat,

Dr. Marei Drechsel und Matthias Ilmer, Mitstreiter im Rahmen der „Molekularen Medizin“, für das kollegiale Verhältnis und die gute Atmosphäre im Labor, auf Kongressen und darüber hinaus,

allen anderen Mitarbeitern der Abteilung, insbesondere Dr. Virginia Egea Alonso und Tanja Popp für das stets angenehme Arbeitsklima.

Meinem Bruder Stefan danke ich für seine fortwährende Unterstützung. Auch meine Großmutter Franziska Stein hat mir in jeder Hinsicht zur Seite gestanden und mich nicht zuletzt fortlaufend ermuntert, diese Doktorarbeit fertig zu stellen.

An letzter, wichtigster Stelle möchte ich meinen Eltern von ganzem Herzen danken. Ohne ihre unermüdliche Unterstützung wäre weder mein Studium der Humanmedizin noch die damit verbundene Möglichkeit zur wissenschaftlichen Arbeit denkbar gewesen. Leider kann nur noch meine Mutter Gabriele diesen Dank persönlich entgegennehmen.

Meinem Vater möchte ich daher die vorliegende Arbeit posthum widmen.

