

Aus der Klinik für Allgemeine, Unfall- und Wiederherstel-
lungschirurgie,
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München,
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker

**Charakterisierung und Zelltracking von Reporter-gen-tragenden humanen mesen-
chymalen Stammzellen**

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

vorgelegt von

Stefanie Elisabeth Wotzlaw, geb. Käsbauer
aus Cham

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christian Ries
PD Dr. Guido Böning

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. rer. nat. Veronika Schönitzer

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Humane mesenchymale Stammzellen.....	1
1.1.1	Definition und Quellen	1
1.1.2	Potential humaner mesenchymaler Stammzellen	3
1.1.3	Stammzellen im skelettalen Gewebe.....	5
1.1.4	Charakterisierung von immortalisierten, humanen mesenchymalen Stammzellen.....	6
1.2	<i>In vivo</i> -Zelltracking	6
1.2.1	Grundlagen der molekularen Bildgebung	6
1.2.2	Mögliche Reportersysteme	9
1.2.3	Bildgebende Verfahren.....	10
1.3	Aufgabenstellung	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Verwendete Materialien und Geräte	15
2.1.1	Übersicht über die verwendeten Antikörper.....	15
2.1.2	Übersicht über die verwendeten Materialien	15
2.1.3	Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien	16
2.1.4	Übersicht über die verwendeten Kits	18
2.1.5	Übersicht über die verwendeten Geräte	19
2.1.6	Übersicht über die verwendeten Puffer	20
2.1.7	Übersicht über die verwendeten Differenzierungsmedien	21
2.1.8	Übersicht über die verwendeten RT-PCR-Primer.....	22
2.1.9	Software	22
2.2	Zellkulturmethoden	23
2.2.1	Zellen und Medien.....	23
2.2.2	Kultivierung von hMSC	23
2.2.3	Passagieren von hMSC.....	24
2.2.4	Zählen von hMSC.....	24
2.2.5	Konservierung und Auftauen von hMSC	24
2.2.6	Vereinzelung von Zellklonen	25
2.2.7	FACS-Analyse	25

2.2.8	Wachstumskurve	25
2.2.9	Zelldifferenzierung	26
2.2.9.1	Osteogene Differenzierung	26
2.2.9.2	Adipogene Differenzierung.....	26
2.3	Molekularbiologische Methoden	27
2.3.1	Isolierung und Reinigung der RNA	27
2.3.2	Konzentrationsbestimmung der RNA	28
2.3.3	cDNA-Synthese	28
2.3.4	RT-PCR.....	28
2.3.5	Gelelektrophorese	29
2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	29
2.4.1	Proteinisolation	29
2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	29
2.4.3	SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese.....	30
2.4.4	Immunoblotting	30
2.5	Immunfluoreszenz.....	31
2.6	Bindungstest.....	31
2.7	GCV-Test.....	32
2.8	Nachweis der Zellviabilität	32
2.8.1	WST-1-Test.....	32
2.8.2	BrdU-Test	33
2.9	Fluoreszenzmikroskopie	33
2.9.1	SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP	34
2.9.2	SCP-1-D2R80A	35
2.10	<i>In vivo</i> -Experimente	35
2.10.1	<i>In vivo</i> -Zelltracking von SCP-1-D2R80A.....	35
2.10.2	<i>In vivo</i> -Zelltracking von SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP	36
2.11	Statistik	37
3	Ergebnisse	38
3.1	<i>In vitro</i> -Charakterisierung und <i>in vivo</i> -Zelltracking von SCP-1-D2R80A	38
3.1.1	Nachweis der Expression auf mRNA-Ebene	38

3.1.2	Untersuchung der zellulären Lokalisation des D2R80A.....	39
3.1.3	Nachweis der Aktivität des rekombinanten Dopaminrezeptors.....	39
3.1.4	Nachweis des Differenzierungspotentials der SCP-1-D2R80A	41
3.1.5	Untersuchung des Wachstumsverhaltens der SCP-1-D2R80A.....	42
3.1.6	Untersuchung der Zellviabilität der SCP-1-D2R80A.....	42
3.1.7	Darstellung der SCP-1-D2R80A <i>in vivo</i>	44
3.2	<i>In vitro</i> -Charakterisierung und <i>in vivo</i> -Zelltracking von SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP	45
3.2.1	Herstellen von Zelllinien	46
3.2.2	Nachweis der Expression der Δ 45-HSV1-TK-eGFP auf mRNA-Ebene ...	48
3.2.3	Nachweis der Expression der Δ 45-HSV1-TK-eGFP auf Protein-Ebene ...	48
3.2.4	Nachweis der Aktivität der Δ 45-HSV1-TK-eGFP	49
3.2.5	Nachweis des Differenzierungspotentials der SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP	52
3.2.6	Untersuchung des Wachstumsverhaltens der SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP	53
3.2.7	Darstellung der SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP <i>in vivo</i>	54
4	Diskussion.....	56
4.1	Auswahl des Imaging-Systems für Labeling von Stammzellen und <i>in vivo</i> -tracking im Knochen	56
4.2	<i>In vitro</i> -Charakterisierung der Reporter-gen-überexprimierenden hMSCs	59
4.2.1	<i>In vitro</i> -Charakterisierung der D2R80A-überexprimierenden hMSCs.....	59
4.2.2	<i>In vitro</i> -Charakterisierung der Δ 45-HSV1-TK-eGFP-überexprimierenden hMSCs.....	60
4.3	Nicht-invasive Abbildung von humanen mesenchymalen Stammzellen im muskuloskelettalen System	63
4.3.1	<i>In vivo</i> -Darstellung von D2R80A-überexprimierenden hMSCs.....	63
4.3.2	<i>In vivo</i> -Darstellung von Δ 45-HSV1-TK-eGFP-überexprimierenden hMSCs	65
4.4	Ausblick und Fazit.....	67
5	Zusammenfassung	69
6	Literaturverzeichnis.....	73
7	Abkürzungsverzeichnis.....	91

8	Anhang	94
8.1	Vektorkarten	94
8.1.1	D2R80A.....	94
8.1.2	Δ 45-HSV1-TK-eGFP	94
8.2	RT-PCR-Programme	94
8.2.1	Programm für die cDNA-Synthese	94
8.2.2	Programm für die Polymerasekettenreaktion	94
9	Publikation	96

1 Einleitung

1.1 Humane mesenchymale Stammzellen

1.1.1 Definition und Quellen

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) sind multipotente, adulte Stammzellen, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in verschiedene Gewebearten (Plastizität) besitzen. Friedenstein et al. erwähnte als einer der Ersten diese Zellpopulation und konnte in einigen Studien aufzeigen, dass diese die Fähigkeit haben sich in verschiedene mesodermale Zelllinien zu differenzieren (Friedenstein et al. 1978, Friedenstein et al. 1976, Friedenstein et al. 1968). Seitdem wurden diese Zellen bezüglich ihrer Eigenschaften und Charakterisierung in einigen Forschungsgruppen untersucht, wobei es durch die Verwendung unterschiedlicher Terminologien zu einer Begriffsvielfalt gekommen ist. So wurden für die mesenchymalen Stammzellen (MSC) Bezeichnungen wie „colony forming unit-fibroblasts“ (Castro-Malaspina et al. 1980, Friedenstein et al. 1968), „bone marrow stromal stem cells“ (Bianco et al. 2000), „multipotent adult progenitor cells“ (Reyes et al. 2001) und „recycling stem cells“ (Colter et al. 2000) verwendet. Die Bezeichnung MSC setzte sich hierbei durch und wurde am häufigsten genannt (Horwitz et al. 2005). Obwohl zurzeit vor allem von Prof. A. I. Caplan eine Umbenennung der mesenchymalen Stammzellen in perizyten mesenchymale Stammzellen (pMSC) oder medizinische Signalzellen (MSC) vorgeschlagen wird (Somoza et al. 2016, Caplan 2017), wird in dieser Arbeit weiterhin der Begriff mesenchymale Stammzellen verwendet.

Die Identifizierung von hMSC ist jedoch aufgrund des Fehlens eines spezifischen Oberflächenmarkers weiterhin problematisch. Obwohl die mesenchymalen Stammzellen mittlerweile über eine Vielzahl verschiedener Oberflächenproteine charakterisiert werden können, gibt es dennoch keinen singulären Marker, wie es zum Beispiel für die hämatopoetischen Stammzellen über CD34 der Fall ist (Conget et al. 1999, Pittenger et al. 1999, Haynesworth et al. 1992, Simmons et al. 1991). Daher erscheint es sinnvoll eine Kombination verschiedener Oberflächenmarker für die Phänotypisierung der hMSC zu verwenden (Haynesworth et al. 1992). Die Tatsache, dass MSC ein Antigenmuster präsentieren, welches Gemeinsamkeiten mit endothelialen, epithelialen und muskulären Zellen aufweist, macht eine gezielte Identifikation bisher unmöglich (Minguell et al. 2001). Um Unklarheiten zu beseitigen und um sicherzustellen, dass in jeder Studie, die mit hMSC arbeitet, die gleichen Zellen verwendet werden, legte die Internationale Gemeinschaft für Zelltherapie bestimmte Minimal Kriterien fest, mit denen MSC definiert werden sollen (Dominici et al. 2006). So sollte unter Standard-

kulturbedingungen eine Plastikadhärenz der Zellen nachgewiesen werden. Zudem muss eine Expression der Oberflächenmarker CD105, CD73 und CD90 und eine Abwesenheit der Marker CD45, CD34 und CD14 oder CD11b, CD79 oder CD19 und HLA-DR bestätigt werden. Außerdem müssen die Zellen *in vitro* dazu fähig sein, sich in die osteogene, adipogene und chondrogene Richtung zu differenzieren. Durch die Beachtung dieser Kriterien soll eine einheitliche Charakterisierung und Identifizierung der hMSC ermöglicht werden.

Für die in Studien verwendeten MSC müssen diese zunächst isoliert, expandiert und anschließend charakterisiert werden. Für die Gewinnung der Zellen kommen außer dem klassischen Entnahmeort Knochenmark (Pittenger et al. 1999, Friedenstein et al. 1976) auch noch andere Gewebe wie Fettgewebe (Zuk et al. 2002), Muskel (Jiang et al. 2002), Haut (Young et al. 2001), Periost (Nakahara et al. 1990), Lunge (Gong et al. 2014), peripheres Blut (Zvaifler et al. 2000), Amnionflüssigkeit (In't Anker et al. 2003), Nabelschnurblut (Rosada et al. 2003) und Plazenta (Pelekanos et al. 2016) in Frage. Dies zeigt also, dass MSC im Körper mannigfaltig verteilt sind. Pelekanos et al. (2016) konnte beispielsweise aufzeigen, dass die Isolierung und Expansion von MSC aus Plazentagewebe möglich ist und einige Vorteile mit sich bringt. So haben die aus Plazentagewebe gewonnenen Zellen eine immunmodulatorische und lange proliferative Kapazität (Pelekanos et al. 2016, Barlow et al. 2008, Jones et al. 2007). Dadurch, dass aus einer Plazenta reichlich MSC gewonnen werden können, stellt es eine optimale Quelle zur Herstellung von allogenen MSC dar (Timmins et al. 2012). Diese wiederum scheinen eine vielversprechende Rolle in der Zell-basierten Therapie zu haben (Brooke et al. 2007). Knochenmark und Fettgewebe stellen jedoch die häufigste Quelle zur Gewinnung von Stammzellen dar (Tuan et al. 2003, Zuk et al. 2001, Pittenger et al. 1999). Tuan et al. (2003) zeigte in seinem Review auf, dass Knochenmark im Vergleich zu anderen möglichen Entnahmeorten von MSC gut zugänglich sei und eine hohe Dichte an MSC aufweise. Zudem besäßen die aus dem Knochenmark stammenden MSC eine höhere Differenzierungskapazität als MSC aus anderen Quellen wie beispielsweise Periost, Haut oder peripheres Blut. Laut Zuk et al. (2001) stellt das Fettgewebe einen guten alternativen Entnahmeort für MSC dar, da eine problemlose Gewinnung möglich und die Anzahl an gewonnenen Zellen hoch sei.

Nach Isolierung und Kultivierung der MSC wird deren Identifizierung jedoch durch das Vorliegen einer inhomogenen Zellpopulation erschwert. In einigen Studien konnten verschiedene Untergruppen der MSC ausgemacht werden (Javazon et al. 2004, Prockop et al. 2001, Colter et al. 2000). In Bezug auf die Morphologie konnten drei Subpopulationen beschrieben werden. Dazu gehören spindelförmige fibroblastenähnliche Zellen, große abgeflachte Zellen und RS-Zellen (rapidly self renewing cells), die sich hinsichtlich der Proliferationskapazität und Differenzierungsfähigkeit unterscheiden (Lee et al. 2006, Muraglia et al. 2000). Docheva et al. (2008) konzipierte eine Studie, in der die Morphologie und Charakteristika der RS-

Zellen und der abgeflachten Zellen (FC) mit Osteoblasten und MG63- Zellen, einer Zelllinie aus einem Osteosarkom, verglichen wurden. Hier wurde aufgezeigt, dass RS-Zellen im Vergleich zu den großen abgeflachten Zellen eine höhere Proliferationsrate aufweisen. Zudem konnte demonstriert werden, dass FC-Zellen den Osteoblasten ähnlicher sind als RS-Zellen. Vermutlich handelt es sich bei den FC-Zellen um Präosteoblasten.

1.1.2 Potential humaner mesenchymaler Stammzellen

Im Hinblick auf das Potential der hMSC sind drei grundlegende Eigenschaften zu erwähnen. Dabei handelt es sich um die Fähigkeit der Selbstreplikation, der Differenzierbarkeit in verschiedenartige Gewebe und um die Hierarchie (Baksh et al. 2004, Pittenger et al. 1999). Unter Selbstreplikation versteht man die theoretische Möglichkeit zur unbegrenzten Zellvermehrung. Dabei entstehen durch eine mitotische Zellteilung identische Tochterzellen über einen längeren Zeitraum. Die Kapazität zur Differenzierung in Zellen verschiedener Gewebetypen wird Plastizität genannt. Es konnte sowohl in *in vitro*- als auch in *in vivo*-Studien gezeigt werden, dass MSC in der Lage sind, sich unter definierten Bedingungen in Zellen mesodermalen Gewebes zu differenzieren (siehe Abbildung 1). Dazu gehören Knochen- (Bruder et al. 1998, Bruder et al. 1997), Knorpel- (Kadiyala et al. 1997), Fett- (Prockop et al. 1997), Muskel- (Ferrari et al. 1998, Galmiche et al. 1993), Sehnen- und Bänderzellen (Awad et al. 1999, Young et al. 1998).

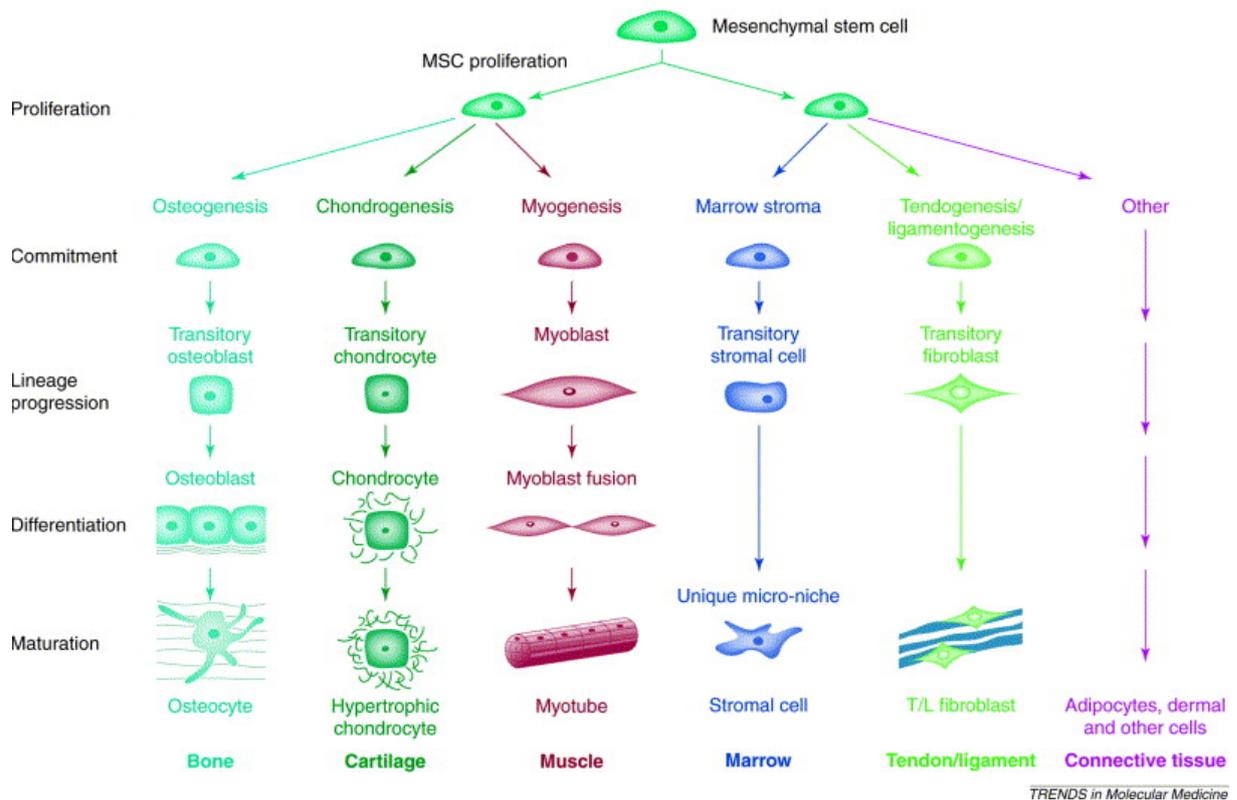


Abb. 1: Schematische Darstellung der Plastizität humaner mesenchymaler Stammzellen (Caplan et al. 2001)

Zudem wurde in einigen Studien eine keimblattübergreifende Differenzierung in Zellen von ektodermalen und endodermalen Gewebe nachgewiesen (Korbling et al. 2003, Jiang et al. 2002). Dabei handelt es sich um eine Transdifferenzierung in Hepatozyten (Kang et al. 2005, Schwartz et al. 2002), Hautzellen (Chavez-Munoz et al. 2013), Pneumozyten (Krause et al. 2001), Inselzellen des Pankreas (Phadnis et al. 2011) und neuronale Zellen (Zhao et al. 2002). Bislang wird die Transdifferenzierungskapazität von mesenchymalen Stammzellen jedoch noch kontrovers diskutiert (Phinney et al. 2007, Krabbe et al. 2005). Die dritte Eigenschaft der MSC, die Hierarchie, beschreibt die fehlende Rückdifferenzierung der differenzierten Zelle in die Stammzelle. Aufgrund der hauptsächlich im hämatopoetischen Stammzellensystem gemachten Beobachtungen, kam Zipori (2005) zu dem Schluss, dass die Selbstreplikation und Hierarchie keine essentiellen Charakteristika der MSC seien. Ebenso postulierte Delorme et al. (2006), dass die Plastizität die wichtigste Eigenschaft von MSC darstelle. Daher wird der Nachweis von hMSC meist indirekt über das Differenzierungspotential erbracht (Oreffo et al. 2005, Pittenger et al. 1999, Williams et al. 1999, Bruder et al. 1994). Es wurde jedoch in einigen Studien beobachtet, dass durch die Differenzierung die Progenitorzellen ihre Fähigkeit zur Selbstreplikation verlieren (Aubin 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die hMSC *in vitro* einem altersbedingtem Wachstumsstillstand unterliegen, der replikative Seneszenz genannt wird (Stenderup et al. 2003). So können die Zellen 25-40 Populationsver-

dopplungen *in vitro* durchführen, bevor ihre Replikations- und Differenzierungsfähigkeit verloren geht (Banfi et al. 2000, Digirolamo et al. 1999, Bruder et al. 1997).

1.1.3 Stammzellen im skelettalen Gewebe

Die Schwierigkeit, die MSC bezüglich Morphologie oder Expression von Oberflächenmarkern zu charakterisieren, sowie die Schwierigkeit die *in vitro* nachgewiesenen Differenzierungen der MSC zu Neuronen, Myozyten oder Tenozyten *in vivo* zu bestätigen, zeigt deutlich, dass es sich bei den MSC um eine heterogene Zellpopulation handelt. Auch wenn der auch in dieser Arbeit verwendete Begriff „mesenchymale Stammzellen“ in der heutigen Literatur nach wie vor omnipräsent ist, sollte man sich dennoch bewusst sein, dass „MSC“ verschiedene Subpopulationen von Stammzellen bezeichnet (Bianco 2015, Dawson et al. 2014).

In den letzten Jahren sind vor allem die skelettalen Stammzellen (SSC) in den Fokus der Forschung gerückt. Diese Stammzellen aus dem Knochenmarksstroma sind unter anderem für die regenerative Kapazität verantwortlich und könnten durch ihr Potential eine wichtige Rolle in der regenerativen Medizin einnehmen (Dawson et al. 2014, Méndez-Ferrer et al. 2010).

Des Weiteren beschrieben Bianco et al. (2015) einige Eigenschaften von skelettalen Stammzellen. Diese Zellen befinden sich im postnatalen Knochenmark und verbinden die skelettale und hämatopoetische Physiologie. So wird durch diese Vorläuferzellen ein Reservoir mit Knochenbildenden Zellen zur Verfügung gestellt, die für das Knochenwachstum und den Umbau eine wichtige Rolle spielen. Außerdem besitzen sie die Fähigkeit Adipozyten zu generieren. Neben der organisierenden und regulierenden Funktion bezüglich des Milieus im Knochenmark, dienen die skelettalen Stammzellen zusätzlich als perivaskuläre Zellen und sind im äußeren Bereich der Knochenmarksinsuloide als retikuläre Zellen aufzufinden (Sacchetti et al. 2007, Bianco et al. 2013). „Bone marrow stromal cells“ -skelettale Stammzellen mit eingeschlossen- regulieren zudem das mikrovaskuläre Netzwerk und die Differenzierung von Osteoklasten. Eine weitere wichtige Funktion der „bone marrow stromal cells“ stellt die Beeinflussung des hämatopoetischen Mikromilieus und der Selbstreplikation hämatopoetischer Stammzellen dar, welche auch als Nischenfunktion bezeichnet wird (Bianco 2015, Bianco et al. 2013, Bianco et al. 2008).

1.1.4 Charakterisierung von immortalisierten, humanen mesenchymalen Stammzellen

Wie bereits oben erwähnt, stellen die hMSC nach einer gewissen Anzahl an Populationsverdopplungen ihr Wachstum ein. Diese replikative Seneszenz beruht auf einer Abnahme der Telomere, repetitive DNA-Sequenzen am Ende jedes Chromosoms, bei jeder Zellteilung (Baxter et al. 2004). Telomerasen verhindern eine solche Verkürzung der Chromosomenenden. Allerdings besitzen humane Somazellen keine Aktivität der Telomerasen mit zunehmendem Alter (Zimmermann et al. 2003). Um diesen Alterungsprozess zu umgehen, wurde in einigen Studien das Gen für die humane Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) über einen viralen Gentransfer in die hMSC transduziert (Bischoff et al. 2012, Mihara et al. 2003, Simonsen et al. 2002). Dadurch konnten immortalisierte hMSC hergestellt werden, die ein unbegrenztes Proliferations- und Differenzierungspotential aufweisen. Jedoch ist zu erwähnen, dass in manchen Studien eine maligne Entartungstendenz der immortalisierten hMSC gezeigt werden konnte (Burns et al. 2005, Serakinci et al. 2004). In diesen Studien wurde für den viralen Gentransfer ein retroviraler Vektor verwendet. Bei Verwendung eines lentiviralen Vektors konnte dagegen keine neoplastische Transformation beobachtet werden (Böcker et al. 2008). Um nun eine homogene Zellpopulation dieser stabil transduzierten Zellen zu erhalten, führten Böcker et al. (2008) eine Vereinzelnung von Zellklonen (single-cell-picked clones) unter dem Lichtmikroskop durch. Dadurch wurde erstmals über einen lentiviralen Gentransfer eine mesenchymale Stammzelllinie generiert, welche die humane Telomerase stabil überexprimiert. Aufgrund ihres erhaltenen Stammzellcharakters, ihrer fehlenden Seneszenz und ihrer hohen Proliferationsrate stellen SCP-1-Klone eine vielversprechende Möglichkeit für zukünftige Ansätze in der Zell- und Genthherapie (Böcker et al. 2008) dar. Deswegen wurde für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente diese immortalisierte hMSC-Zelllinie verwendet.

1.2 *In vivo*-Zelltracking

1.2.1 Grundlagen der molekularen Bildgebung

hMSC besitzen die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Zelllinien und können einfach isoliert und *in vitro* expandiert werden. Durch diese Eigenschaften wurde viel Hoffnung in die hMSC in der regenerativen Medizin, insbesondere im Tissue Engineering von Knochen gesetzt (Gimble et al. 2007, Petite et al. 2005, Orlic et al. 2001). So können die hMSC einen Beitrag zu Zell-basierten Therapien leisten (Drosse et al. 2008). In einigen Studien konnte

bereits ein positiver Effekt der hMSC bezüglich der Regeneration von geschädigtem Gewebe aufgezeigt werden (Wang et al. 2009, Schnabel et al. 2009, Xian et al. 2006, Shake et al. 2002).

Bereits 1998 konnte Bruder et al. veranschaulichen, dass hMSC in Kombination mit einem Keramikträger einen 8 mm großen Defekt im Femur von athymen Ratten durch Knochenneubildung decken können. Ebenso gelang es Granero-Molto et al. (2009) den regenerativen Effekt mesenchymaler Stammzellen in einem Tibiafrakturmodell in Mäusen zu belegen.

Auch wenn positive Effekte von MSC bei der Frakturheilung *in vivo* beobachtet werden konnten, ist immer noch die genaue Beteiligung der MSC in der Frakturheilung unbekannt (Wei et al. 2014, Murphy et al. 2013).

Zudem besitzen aktivierte mesenchymale Stammzellen die Fähigkeit in einem beschädigten Gewebe bioaktive Moleküle zu sezernieren. Dies macht es möglich eine überschießende Immunantwort in dem betroffenen Gewebe zu unterdrücken und ein Milieu der Regeneration zu schaffen (Caplan 2015, Kean et al. 2013, Caplan et al. 2011, Singer et al. 2011, Caplan et al. 2006). Beispielsweise konnte Penn et al. (2009, 2008) demonstrieren, dass bei Nagetieren mit Herzinfarkt eine Injektion von mesenchymalen Stammzellen innerhalb von 48 Stunden nach dem Ereignis zu einem Schutz vor Folgeschäden führt.

Die meisten Studien bedienen sich zur Untersuchung des regenerativen Effektes von mesenchymalen Stammzellen histologischen Methoden. Hierfür müssen die Versuchstiere jedoch getötet werden oder invasive Biopsien entnommen werden. Nur mit einer großen Tierzahl würde man die bis heute noch offenen Fragen bezüglich des Zellüberlebens, der Zellmigration zum Zielgewebe und der Funktionalität von Stammzellen nach Einbringen in den Körper beantworten können. Dies könnte man mit Hilfe nicht invasiver Methoden wie dem Zelltracking vermeiden (Gildehaus et al. 2011, Massoud et al. 2003).

Unter Zelltracking versteht man ein Verfahren, bei dem lebende Zellen *in vivo* mittels molekularer Bildgebung über einen prolongierten Zeitraum verfolgt werden. Um die Zellen detektieren zu können, stehen zwei Strategien zur Auswahl: die direkte und indirekte Zellmarkierung (Grimm et al. 2007). Wie in Abbildung 2a zu erkennen ist, werden bei der direkten Markierungsmethode die isolierten Zellen mit einem radioaktiven Marker *in vitro* inkubiert und in das Lebewesen injiziert. Anschließend erfolgt eine Bildgebung, die mehrfach innerhalb eines bestimmten Zeitraums durchgeführt wird. Für die Markierung der Zellen kommen verschiedene Isotope wie beispielsweise ^{111}In -Oxinat oder ^{64}Cu -PTSM in Frage (Gildehaus et al. 2011, Adonai et al. 2002). Des Weiteren kann eine Markierung mittels Zellmarker, die auf superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln beruhen, durchgeführt werden (Kraitchman et al. 2003). Trotz der relativ unkomplizierten Durchführung der Markierung, gibt es dennoch gewisse Nachteile. So wurde beobachtet, dass die Zellen ihre Markierung über die Zeit wieder verlieren, was diese Methode ungeeignet für längerfristige Beobachtungen macht (Lucignani

et al. 2011, Rodriguez-Porcel 2011, Grimm et al. 2007). Zudem kann eine gewisse negative Beeinflussung des Metabolismus und der Funktion der Zellen aufgrund toxischer Wirkung des Markers nicht ausgeschlossen werden (Lucignani et al. 2011, Gholamrezanezhad et al. 2009, Puppi et al. 2009). Eine Lösung für diese Problematik bietet die indirekte Zellmarkierung mittels eines Reportergens. In Abb. 2b ist das Prinzip der indirekten Zellmarkierung dargestellt. Die Markierung von Zellen mit Hilfe eines Reportergens erfolgt über eine gentechnische Modifikation. Nach Einfügen des Reportergens in einen Vektor, werden die Zellen transfiziert, kultiviert und in das Lebewesen injiziert. Daraufhin wird eine Bildgebung durchgeführt, mit der die Zellen detektiert werden können. Vor jeder Untersuchung wird hierfür Kontrastmittel appliziert, welches in den Zellen umgesetzt und aufgenommen wird. Die Zellen werden stabil mit dem Reporter gen transduziert, so dass es an die Tochterzellen weitergegeben wird. Dadurch kann eine Zellexpansion durch ein zunehmendes Signal detektiert werden. Es kommt also im Gegensatz zur direkten Methode zu keinem Verlust der Markierung. Zudem können durch die stabile Expression des Markergens in der Zelle diese über einen längeren Zeitraum beobachtet werden und somit Aussagen bezüglich Zellüberleben, -wachstum und -migration *in vivo* gemacht werden (Mathiasen et al. 2013, Kircher et al. 2011, Sharma et al. 2002).

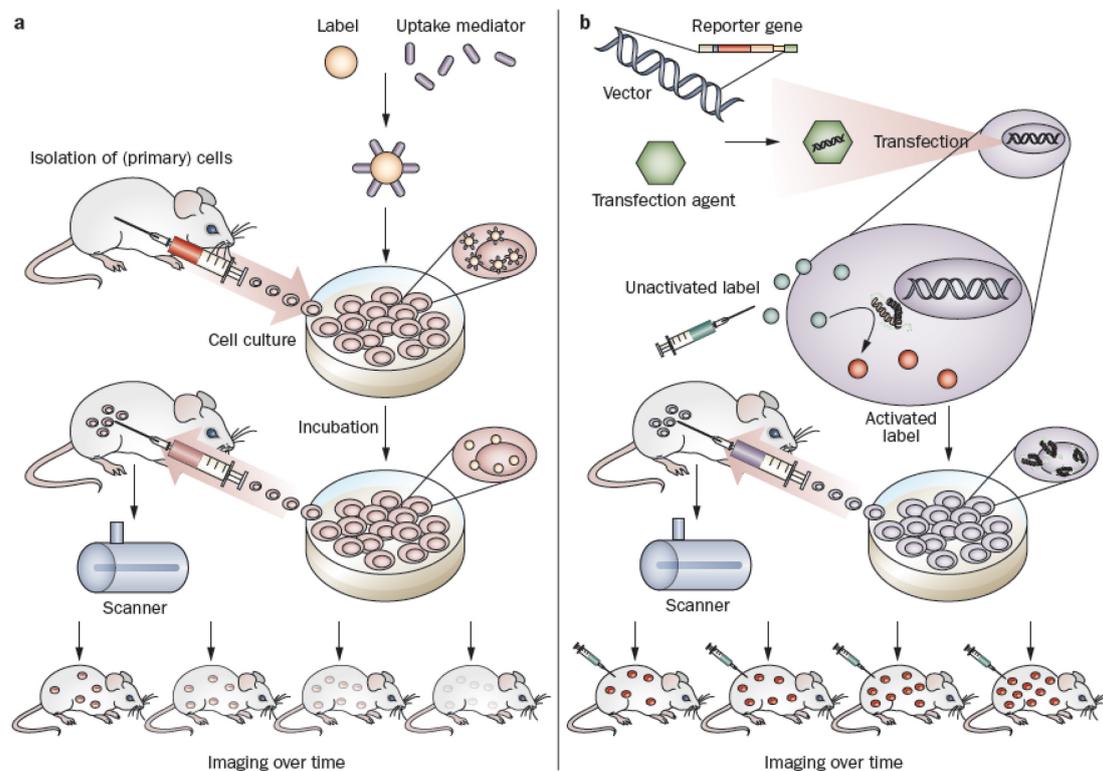


Abb. 2: Darstellung der Prinzipien des Zelltrackings. (a) direkte Zellmarkierung, (b) indirekte Zellmarkierung (Grimm et al. 2007)

1.2.2 Mögliche Reportergensysteme

Man kann zwischen drei verschiedenen Reportergensystemen unterscheiden: als Genprodukt kann entweder ein Enzym (z.B. HSV1-Thymidinkinase, Luziferase), ein membranständiger Rezeptor (z.B. Dopamin D2-Rezeptor, Transferrin-Rezeptor) oder ein Transporter (z.B. Natrium-Iod-Symporter) fungieren (Blasberg et al. 2003). Das bisher am häufigsten verwendete Prinzip ist die Herpes-simplex-Virus 1-Thymidinkinase (HSV1-TK) (Tjuvajev et al. 1998) oder dessen Variante HSV1-sk38-TK (Gambhir et al. 2000), die natürlicherweise nicht in eukaryontischen Zellen vorkommt und radioaktiv markierte Substrate (Pyrimidin- oder Acycloguanosin-Analoga wie ^{124}I -FIAU, ^{18}F -FEAU oder ^{18}F -FHBG) phosphoryliert. Diese akkumulieren durch die Ladungsänderung in den Zellen und können somit mittels nuklearmedizinischer Bildgebung *in vivo* dargestellt werden. Koehne et al. (2003) beispielsweise konnte mit dieser Methode die Akkumulation tumorspezifischer Lymphozyten *in vivo* verfolgen. Perin et al. konnte 2011 belegen, dass ein Monitoring intramyokardial applizierter mesenchymaler Stammzellen, welche retroviral mit sr39HSV1-TK transduziert wurden, im Schwein über 5 Monate mit Hilfe nicht-invasiver repetitiver PET/CT-Bildgebung und ^{18}F -FEAU möglich ist. Eine weitere Variante der Herpes-simplex-Virus 1-Thymidinkinase ist die $\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP, bei der die ersten 45 Aminosäuren, die das Zellkernlokalisierungssignalpeptid codieren, deletiert sind. Dadurch kann die Thymidinkinase nicht im Nukleus der Zelle akkumulieren und ist somit nicht zytotoxisch. Das eGFP am C-Terminus der $\Delta 45$ -HSV1-TK ermöglicht eine fluoreszenzmikroskopische Visualisierung des Fusionsproteins (Ponomarev et al. 2003). Ein weiteres enzymbasiertes Reportergensystem stellt die Luziferase dar. Dabei wird mit Hilfe der Biolumineszenz die Emission von Lichtphotonen durch das Enzym Luziferase aus einem Substrat katalysiert und detektiert (von der Haar et al. 2015, Grimm et al. 2007, Shah et al. 2005). Swart et al. (2015) gelang es beispielsweise mit Luziferase transfizierte mesenchymale Stammzellen sowohl intraperitoneal als auch intraartikulär in Mäuse nach Induktion von Arthritis zu injizieren und diese mittels Biolumineszenz zu verfolgen. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die injizierten Stammzellen über mehrere Wochen am verabreichten Ort verbleiben und eine immunmodulatorische Antwort auslösen.

Eine weitere Möglichkeit, Zellen nicht-invasiv zu detektieren, bietet der Dopamin-2-Rezeptor (Aung et al. 2005, MacLaren et al. 1999), der sich in der Zellmembran befindet und an dessen Liganden ein Radionuklid (^{18}F -FESP, ^{18}F -Fallyprid oder ^{18}F -Desmethoxyfallyprid) gekoppelt wird. Mit Hilfe nuklearmedizinischer Techniken können nun die markierten Zellen nicht-invasiv dargestellt werden. Es ist jedoch zu erwähnen, dass eine Bindung endogener Liganden an den Wildtyp Dopamin-2-Rezeptor cAMP-vermittelt eine biologische Reaktion in der

Zelle auslösen kann (Herschman et al. 2000). Deshalb wurde über eine Punktmutation im Codon 80 des Dopamin-2-Rezeptors ein mutanter Dopamin-2-Rezeptor (D2R80A) entwickelt, der eine solche physiologische Beeinflussung der Zelle nicht provoziert (Liang et al. 2001).

Ein anderes attraktives System für das Zelltracking ist der Natrium-Iod-Symporter (NIS). Dieses transmembranöse Protein sorgt unter physiologischen Bedingungen für den Transport von Iod in die Zelle. Die Expression dieses Symporters kann sowohl mittels PET (^{124}I als Tracer) als auch SPECT (^{123}I oder $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Pertechnetat als Tracer) dargestellt werden (Terrovitis et al. 2008, Kang et al. 2005). So konnte Templin et al. (2012) in einem Tiermodell über nicht-invasive molekulare Bildgebung die Viabilität und Verteilung von NIS-exprimierenden pluripotenten Stammzellen nach intramyokardialer Injektion visualisieren. Wolfs et al. (2014) demonstrierte, dass die Detektion von intravenös bzw. subkutan injizierten NIS- und Luciferase-exprimierenden mesenchymalen Stammzellen in Mäusen mittels multimodaler Bildgebung (PET, Cerenkovlumineszenzbildgebung und Biolumineszenz) möglich ist.

1.2.3 Bildgebende Verfahren

Für die nicht-invasive *in vivo*-Verfolgung der injizierten Zellen stehen verschiedene bildgebende Verfahren zur Verfügung. Dazu gehören sowohl optische Verfahren als auch nuklearmedizinische Untersuchungen (PET, SPECT) und die Magnetresonanztomographie (MRT). Die optimale, bildgebende Technik sollte eine gute räumliche Auflösung und eine hohe Sensitivität haben. Zudem sollte diese in der Lage sein, ein serielles Monitoring der Zellen zu gewährleisten. Je nach Fragestellung des Experiments wird die entsprechende Bildgebung gewählt. Soll beispielsweise das Zellüberleben über einen längeren Zeitraum beobachtet werden, so stellt das Reportersystem unter Verwendung von nuklearmedizinischen bildgebenden Verfahren die ideale Modalität dar (Rodriguez-Porcel 2010). Sowohl PET als auch SPECT verfügen über eine ausreichend hohe Nachweisempfindlichkeit (PET: 10^{-11} - 10^{-12}M , SPECT: 10^{-10} - 10^{-11}M), wodurch nur geringe Konzentrationen der Radiotracer notwendig sind, um die Zellen zu detektieren (Kircher et al. 2011). Das wiederum bedeutet, dass die Viabilität der Zellen durch die radioaktiv markierten Tracer kaum beeinträchtigt wird (Grimm et al. 2007). Außerdem können mit modernen PET-Scannern Ortsauflösungen von 6 mm^3 und mit Micro-PET-Geräten sogar Ortsauflösungen von unter 2 mm^3 erreicht werden (Villa et al. 2010, Alfke et al. 2001). Dadurch können biologische und biochemische Prozesse *in vivo* visualisiert werden (Yu et al. 2000). Im Gegensatz dazu bietet die MRT eine wesentlich höhere Ortsauflösung von bis $10\text{ }\mu\text{m}$ und eine sehr gute Zeitauflösung im μs -Bereich. Somit lassen sich Fragestellungen bezüglich der lokalen Verteilung der Genexpression de-

tailliert beantworten (de Vries et al. 2005, Alfke et al. 2001). Allerdings weist die Magnetresonanztomographie im Vergleich zu den nuklearmedizinischen Verfahren eine geringere Sensitivität auf. Zuletzt seien noch optische Methoden zur Zelldetektion zu erwähnen. Dabei unterscheidet man Techniken, die entweder auf Fluoreszenz oder Biolumineszenz basieren. Von Vorteil ist hierbei, dass das benötigte Equipment relativ klein und kostengünstig ist. Jedoch gibt es auch gewisse Nachteile. So waren diese Verfahren aufgrund der geringen Gewebepenetration von Licht bislang auf kleine Versuchstiere und Untersuchungen von Oberflächenstrukturen beschränkt. Durch die Verwendung von sensitiven Kameras (CCD: charged coupled device) können nun aber auch tiefer gelegene Objekte *in vivo* detektiert werden (Wu et al. 2001, Contag et al. 1998). Insgesamt ermöglichen optische Methoden auf Grund niedriger Hintergrundsignale eine sensitive Bildgebung zur Darstellung von Zellen (Zaidi 2009, Ntziachristos 2006). Eine Zusammenfassung der Charakteristika der erwähnten bildgebenden Verfahren ist in Abbildung 3 dargestellt.

Zu den neueren Entwicklungen bildgebender Methoden zur Detektion von Zellen *in vivo* gehören die Magnetpartikelbildgebung (MPI) und die Cerenkov Lumineszenzbildgebung (CLI). Die Magnetpartikelbildgebung wurde erstmals durch Gleich und Weizenecker 2005 entwickelt und vorgestellt. Hierbei wird die Magnetisierung eingebrachten magnetischen Materials direkt gemessen. Nanopartikel, die sich in einem sogenannten field-free point (FFP) befinden, können aufgrund einer fehlenden magnetischen Sättigung detektiert werden (von der Haar et al. 2015, Gleich et al. 2005). Hervorzuheben sind die hohe Sensitivität, die Verwendung nicht-ionisierender Strahlen und die hohe Geschwindigkeit der Bildgebung (Knopp et al. 2012). Diese Technik birgt jedoch auch Nachteile. So kann diese Methode nur mit Hilfe von magnetischen Tracern angewandt werden (Ittrich et al. 2013, Saritas et al. 2013) und verfügt über ein hohes Hintergrundrauschen (Pablico-Lansigan et al. 2013).

Die Cerenkov Lumineszenzbildgebung gehört zu den neueren bildgebenden Verfahren. Diese bedient sich der Cerenkov-Strahlung und detektiert die Lichtemission mittels eines sensitiven Detektors und der Verwendung von PET-Radiotracern (Robertson et al. 2009). Elektromagnetische Cerenkov-Strahlung entsteht, wenn sich geladene Teilchen in einem dielektrischen Medium mit einer höheren Geschwindigkeit fortbewegen als die spezifische Lichtgeschwindigkeit in diesem Medium (von der Haar et al. 2015, Elrick et al. 1968). 2014 wurde diese Technik erstmals zur Visualisierung von Stammzellen verwendet (Wolfs et al. 2014). Von Vorteil ist das geringe Hintergrundsignal und die Möglichkeit bereits etablierte PET-Tracer verwenden zu können (von der Haar et al. 2015).

Des Weiteren ist die Ultraschall-basierte Bildgebung zu erwähnen. Diese stellt eine günstige und hochsensitive Methode dar, um Zellen *in vivo* zu verfolgen. Jedoch kann hiermit keine genaue Zellquantifizierung erfolgen (von der Haar et al. 2015, Frangioni et al. 2004).

Zudem besteht die Möglichkeit der multimodalen Bildgebung. Hierbei werden verschiedene bildgebende Verfahren kombiniert, um optimale Bedingungen zu erhalten. So kann beispielsweise die MRT mit PET oder SPECT kombiniert werden, wobei das hohe Auflösungsvermögen der MRT und die hohe Sensitivität der PET bzw. SPECT genutzt werden kann (Lewis et al. 2015). Außerdem können auch direkte und indirekte Zellmarkierungsmethoden kombiniert werden (Wu et al. 2014).

Es ist ersichtlich, dass eine Vielzahl an bildgebenden Verfahren zur Detektion von Stammzellen existiert. Dennoch stellt zum jetzigen Zeitpunkt keine der genannten Techniken eine perfekte Methode dar. Frangioni et al. definierte 2004 bestimmte Charakteristika einer idealen bildgebenden Technologie, welche notwendig sind, um Stammzellen auch im klinischen Setting darstellen zu können. So muss das Verfahren beispielsweise sicher sein und sowohl eine Quantifizierung der Zellanzahl als auch eine Detektion einzelner Zellen ermöglichen. Zudem ist es notwendig, dass es zu keiner genetischen Modifikation der Stammzellen kommt und eine nicht-invasive Bildgebung *in vivo* über einen prolongierten Zeitraum möglich ist. Weiterhin sollte kein Transfer des verabreichten Kontrastmittels von den transplantierten Stammzellen zu Nicht-Stammzellen stattfinden (Frangioni et al. 2004).

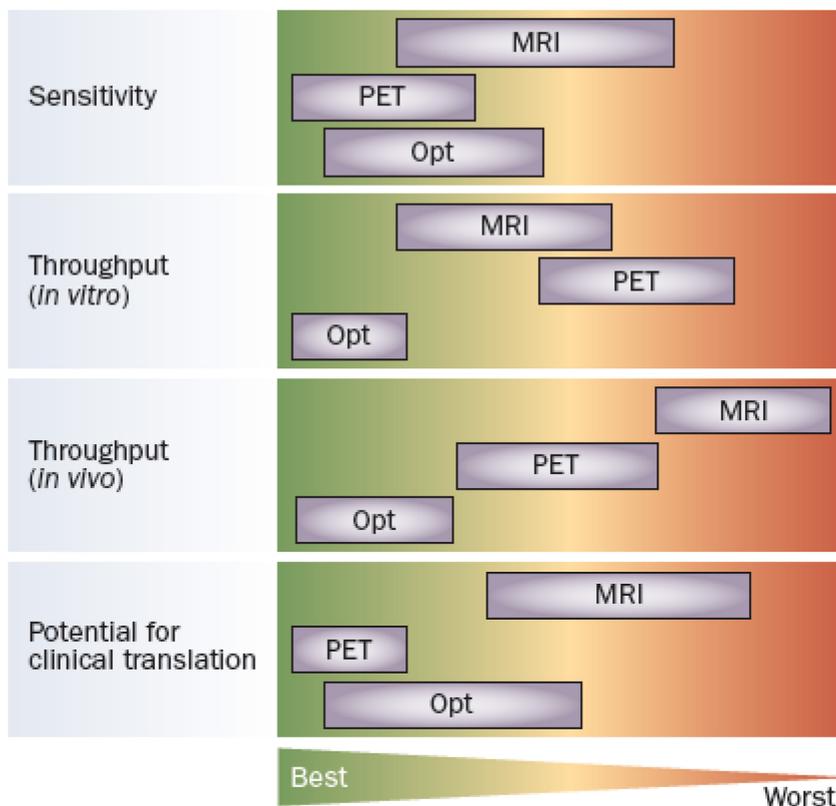


Abb. 3: Charakteristika der für das Zelltracking verwendeten bildgebenden Verfahren (Kircher et al. 2011)

1.3 Aufgabenstellung

Die Behandlung knöcherner Substanzverluste, bedingt durch unterschiedliche Ursachen, stellt ein großes, klinisches Problem dar. Die derzeitigen Behandlungsmethoden, beispielsweise die als Goldstandard geltende autologe Knochentransplantation, stoßen aufgrund der großen Belastung für den Patienten immer wieder an ihre Grenzen. Autologe Transplante beispielsweise stehen für die Therapie ossärer Defekte nur in begrenztem Umfang zur Verfügung. Ebenso ist die Belastung durch die operative Intervention nicht zu vernachlässigen. Bei der alternativen Behandlungsmethode mittels allogener oder alloplastischer Materialien ist die Problematik einer möglichen Abstoßungsreaktion bzw. einer Lockerung des Implantats zu erwähnen (Schaefer et al. 2000, Bruder et al. 1994). Vor diesem Hintergrund wird ersichtlich, wie wichtig es ist, neuartige Therapieverfahren zu erforschen. Eine Möglichkeit ist der Stammzell-basierte Therapieansatz (Baksh et al. 2004). Die Voraussetzung hierfür ist jedoch die exakte Untersuchung der implantierten Stammzellen und deren Verhalten *in vivo*. Jedoch sind bisher noch wenig Informationen diesbezüglich vorhanden (Chamberlain et al. 2007). Aufgrund dessen soll in dieser Arbeit eine Methode etabliert werden, welche zukünftig erlauben soll, die Rolle von hMSC bei der Frakturheilung zu untersuchen. Hierbei spielt das indirekte Zelltracking eine große Rolle, d.h. gentechnisch modifizierte Zellen werden implantiert und deren Akkumulation im Langzeitverlauf mit Hilfe hochsensitiver Bildgebung dargestellt. Ziel dieser Arbeit war es mit dieser Methode Reporter-gen-tragende humane mesenchymale Stammzellen *in vivo* anhand eines Tiermodells mittels nuklearmedizinischer Bildgebung (PET, SPECT) zu detektieren und zu untersuchen. In unserem Labor wurde bereits vor dieser Arbeit das direkte Zellmarkierungsverfahren etabliert (Gildehaus et al. 2011). Hier wurden immortalisierte hMSC (SCP-1) mittels ^{111}In -Oxinat direkt markiert und in Ratten intraossär injiziert. Eine anschließende Detektion der Zellen erfolgte mittels SPECT/CT. Jedoch konnte die Darstellung der SCP-1 im Knochen nur über einen Zeitraum von 48 Stunden gewährleistet werden. Für die genaue Untersuchung des Zellverhaltens *in vivo* -vor allem in Hinblick auf die klinische Relevanz- ist es dringend notwendig eine Visualisierung der implantierten Zellen über einen prolongierten Zeitraum zu ermöglichen. Hier stellt das indirekte Zellmarkierungsverfahren eine geeignete Lösung dar (Grimm et al. 2007, Blasberg et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden der mutante Dopaminrezeptor D2R80A und das Protein $\Delta 45\text{-HSV1-TK-eGFP}$ verwendet, um immortalisierte hMSC (SCP-1) zu markieren und anschließend *in vivo* zu visualisieren. Eine Beeinflussung des Stammzellcharakters auf Grund der gentechnischen Modifikation der SCP-1 sollte durch eine Charakterisierung der verwendeten Zellen ausgeschlossen werden, bevor diese im Tiermodell eingesetzt werden können.

Zur *in vitro*-Charakterisierung der Reporter-gen-tragenden SCP-1 sollte die Expression des transgenen Rezeptors D2R80A auf mRNA-Ebene mittels einer RT-PCR überprüft werden. Die Bestimmung der zellulären Lokalisation des transgenen Rezeptors sollte mittels Immunfluoreszenz untersucht werden. Anschließend sollte die Aktivität des rekombinanten Dopaminrezeptors via Bindungstest überprüft werden. Um eine mögliche Beeinflussung des Stammzellcharakters durch die gentechnische Modifizierung ausschließen zu können, sollten die D2R80A-überexprimierenden SCP-1 bezüglich ihres Differenzierungspotentials und Wachstumsverhaltens untersucht werden. Abschließend sollte noch die Viabilität der D2R80A-tragenden immortalisierten hMSC geklärt werden. Hierfür eignen sich sowohl der WST-1-Test als auch der BrdU-Test.

Vor der Charakterisierung der Δ 45-HSV1-TK-eGFP-überexprimierenden SCP-1 sollte eine Zellvereinzelung durchgeführt werden, um eine Zellkultur mit stabil transduzierten Zelllinien zu erhalten. Im Folgenden sollte die Expression auf mRNA- und Proteinebene mittels einer RT-PCR bzw. eines Westernblots getestet werden. Die Funktionalität des Enzyms sollte durch einen Ganciclovirtest überprüft werden. Zuletzt sollte wie bei den D2R80A-überexprimierenden Stammzellen das Differenzierungspotential und Wachstumsverhalten untersucht werden.

Für das *in vivo*-Experiment sollten bei athymen Nacktratten die gentechnisch veränderten humanen mesenchymalen Stammzellen in eine Muskeltasche bzw. intramedullär injiziert und anschließend mittels nuklearmedizinischer Bildgebung (PET bzw. SPECT/CT) und geeigneten Radiotracer (^{18}F -Fallyprid, ^{18}F -FHBG, ^{123}I -FIAU) über einen prolongierten Zeitraum visualisiert werden. In der vorliegenden Arbeit soll folglich die Methode der indirekten Zellmarkierung unter Verwendung des rekombinanten Dopaminrezeptors D2R80A und des Enzyms Δ 45-HSV1-TK-eGFP etabliert werden, um eine *in vivo*-Verfolgung der injizierten Zellen unter standardisierten Bedingungen gewährleisten zu können. Um nun die Rolle von hMSC bei der Frakturheilung nicht-invasiv *in vivo* untersuchen zu können, ist es notwendig in der Zukunft im Tiermodell eine intraossäre Implantation der modifizierten Stammzellen zu planen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien und Geräte

2.1.1 Übersicht über die verwendeten Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Typ	Hersteller
Anti-Dopamine D2 Receptor	2 µg/ml	AB5084P	Merck, Darmstadt
Anti-mouse HRP	1:20000	610-1316	Rockland Inc., Gilbertsville, USA
Anti-rabbit HRP	1:10000	sc-2004	Santa-Cruz, Heidelberg
GFP Epitope Tag rabbit polyclonal antibody	1:700	ABR-16571	Dianova, Hamburg
Goat anti-rabbit Alexa Fluor 488	1:250	A212065	Invitrogen, Darmstadt
Mouse β-Actin (C4)	1:10000	sc-47778	Santa-Cruz, Heidelberg

2.1.2 Übersicht über die verwendeten Materialien

Materialien	Typ	Hersteller
25 G-Nadel	Microlance, 304000	BD, Heidelberg
Deckgläschen	BB024060A1	Thermo Scientific, Schwerte
Einzelkopfnah	Vicryl	Ethicon, Norderstedt
FACS-Röhrchen	352008	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Fettstift (Dako Pen)	S2002	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Filter	Whatmann 42	Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch
Filterpapier	Whatmann 1	Herolab GmbH Laborgeräte,

		Wiesloch
Glasobjektträger	AA00000112E	Thermo Scientific, Schwerte
Kryoröhrchen	5000-0020	Thermo Scientific, Schwerte
Kulturflaschen T225	NUNC, 159934	Thermo Scientific, Schwerte
Kulturflaschen T25	NUNC, 156367	Thermo Scientific, Schwerte
Kulturflaschen T75	NUNC, 156499	Thermo Scientific, Schwerte
Multischale 12-Well	NUNC, 150628	Thermo Scientific, Schwerte
Multischale 48-Well	NUNC, 142475	Thermo Scientific, Schwerte
Multischale 6-Well	NUNC, 140675	Thermo Scientific, Schwerte
Multischale 96-Well	NUNC, 167008	Thermo Scientific, Schwerte
Pasteurpipetten	9411020	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen D 10	F161631	Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen D 1000	F161671	Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen D 200	F161931	Gilson, Middleton, USA
PVDF-Membran	03010040001	Roche, Penzberg
Qiashredder	79656	Qiagen, Hilden
Quadriperm	94.6077.307	Sarstedt, Nümbrecht
Reagenzröhrchen 15 ml	62.554.502	Sarstedt, Nümbrecht
Reagenzröhrchen 50 ml	62.547.254	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß 0,5 ml	72.699	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß 1,5 ml	72.690.550	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten 10 ml	86.1254.001	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten 2 ml	86.1252.001	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten 25 ml	86.1685.001	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten 5 ml	86.1253.001	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten 50 ml	86.1689.001	Sarstedt, Nümbrecht
Spritze 2 ml	Discardit, 300928	BD, Heidelberg
Sterilfilter	Millex GP, SLGP033RB	Merck, Darmstadt
Zellschaber	83.1830	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.3 Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Typ	Hersteller
100 bp-DNA-ladder	N3231S	New England BioLabs Inc., Frankfurt am Main

Acrylamid mix 30%	01708, Fluka®	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Agarosepulver	840004	Biozym, Hessisch Oldendorf
Alizarin-Red	A5533	Sigma Aldrich, Taufkirchen
APS		Roth, Karlsruhe
BSA	A-9418	Sigma Aldrich, Taufkirchen
CaCl ₂	C2661	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Cell Proliferation Reagent WST-1	05015944001	Roche, Penzberg
DAPI	3571	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Dexamethason	D-2915	Sigma Aldrich, Taufkirchen
D-MEM h-g	E15-843	PAA, Pasching, Österreich
DMSO	A994.1	Roth, Karlsruhe
Dopamin D2 Rezeptor Rot Antagonist	L002RED	Cisbio, Codolet, Frankreich
ECL-Lösung	Luminata Crescendo Western HRP substrate, WBLUR100	Merck, Darmstadt
EDTA		Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	111608	Merck, Darmstadt
FBS	F7524	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Formaldehyd	1.03999.1000	Merck, Darmstadt
Ganciclovir	Cymeven, 500 mg	Roche, Penzberg
Glycin	3790.2	Roth, Karlsruhe
Glycerin	3783.1	Roth, Karlsruhe
H ₂ SO ₄		Merck, Darmstadt
IBMX	I-5879	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Indomethacin	I-7378	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Insulin	I-O516	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol	1.09634.1000	Merck, Darmstadt
KCl	1.04933.0500	Merck, Darmstadt
L-Ascorbinsäure	A-8960	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Loading Dye	B7021	New England BioLabs Inc., Frankfurt am Main
Magermilchpulver	1.5363.0500	Merck, Darmstadt
MEM Alpha Medium + Gluta-MAX	32571-028	Thermo Fisher Scientific, Berlin

Methanol	1.06009.2511	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	2189.1	Roth, Karlsruhe
NaCl	3957.1	Roth, Karlsruhe
Ölrot O	O-0625	Sigma Aldrich, Taufkirchen
PCR-Puffer		Roche, Penzberg
PBS, Dulbecco (mit Mg ²⁺ /Ca ²⁺)	L1815	Biochrom AG, Berlin
PBS, Dulbecco (ohne Mg ²⁺ /Ca ²⁺)	L1825	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin	P11-010	PAA, Pasching, Österreich
Proteaseinhibitoren-Mix	Complete mini, EDTA-frei, 04693159001	Roche, Penzberg
Protein ladder	PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, SM1811	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RotiLumin-Lösung	P080, P079	Roth, Karlsruhe
SDS		Roth, Karlsruhe
TEMED	2367.3	Roth, Karlsruhe
Trizma base	T1503	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Trizma HCl	T5941	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	L11-004	PAA, Pasching, Österreich
Tween 20	P9416	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Zeocin	R25001	Invitrogen, Darmstadt
β-Glycerophosphat	G-9891	Sigma Aldrich, Taufkirchen

2.1.4 Übersicht über die verwendeten Kits

Kit	Typ	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	23225	Thermo Scientific, Schwerte
Cell Proliferation ELISA Kit, BrdU (colorimetric)	1164229001	Roche, Penzberg
Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit	12328-040	Invitrogen, Darmstadt
Rneasy Mini Kit	74106	Qiagen, Hilden

2.1.5 Übersicht über die verwendeten Geräte

Geräte	Typ	Hersteller
Neubauer Zählkammer	717805	Brand, Wertheim
Mikroskop	Axiovert S100	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop	Axiovert 40 CFL	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop	Axio Observer Z1	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop	Diavert	Leitz, Wetzlar
Zentrifuge	Universal, 16R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge	UEC Micro 14/B	Axon, Kaiserslautern
Zentrifuge	5415D	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer	535534243	Eppendorf, Hamburg
FACS-Gerät	FACS Calibur	BioSciences, Heidelberg
Vakuumpumpe	3120005	HLC-Haep Labor Consult, Bovenden
BioPhotometer	6131	Eppendorf, Hamburg
PCR-Gerät/Thermocycler	MG Research, DNA Engine	Bio-Rad, München
Gelelektrophoresekammer	40-0708	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Transluminator		Vilber Lourmat, Eberhard- zell
ELISA reader	Multiscan FC	Thermo Scientific, Schwer- te
Blotgerät	Mini Protean 3 Cell	Bio-Rad, München
Polyacrylamidelektrophorese- gerät	Mini Protean Tetra Cell	Bio-Rad, München
Luminescent Image Analyzer	Image Quant LAS 4000 mini	GE Healthcare, München
PET-Gerät	DPET	Siemens, Eschborn
Inkubator	HeraCell240i	Thermo Scientific, Schwer- te
Mikrobiologische Werkbank	Biohit	Biohit Antares, Köln
Laborwaage	ISO9001	Sartorius, Göttingen

Laborwaage	770	Kern, Balingen
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Schüttler	Rotamax 120	Heidolph, Schwabach

2.1.6 Übersicht über die verwendeten Puffer

Puffer	Herstellung
10 × Elektrodenpuffer	0,25 M Tris-Base 1,92 M Glycin 1% SDS
Alizarin Rot-Lösung	1,36904 g Alizarin Rot (MW:342,26) ad 80 ml H ₂ O (destilliert) →pH 4,1 einstellen, dann filtrieren
Blottpuffer	3,03 g/l Trizmabase (pH 8,3) 14,4 g/l Glycin 1 g/l SDS ad 80 % H ₂ O (destilliert) ad 20 % Methanol
Lämmli-Puffer (4x)	40 % Tris-HCl (pH 6,8) 20 % Glycerin 100 mg/ml SDS 30 % β-Mercaptoethanol 2 mg/ml Bromphenolblau ad H ₂ O →vortexen, aliquotieren und Lagerung bei -20°C
Mowiol-Lösung	6 g Glycerin 2,4 g Mowiol 6 ml H ₂ O destilliert 12 ml 0,2 M Tris-HCl pH 8,0 0,024 g DABCO
Ölrot O-Arbeitslösung (0,2%)	60% Stammlösung ad H ₂ O (destilliert) →10 Minuten stehen lassen, dann filtrieren
Ölrot O-Stammlösung (0,3%)	3 mg/ml Ölrot O

	ad Isopropanol →mit Magnetrührer 10 Minuten rühren
RIPA-Puffer	0,1% SDS 1% NaDOC 1% Triton X-100 50 mM Tris-HCl pH 8,2 150 mM NaCl 10 mM EDTA pH 8,0 20 mM NaF
TAE-Puffer (50 %)	242 g/l Tris-Base 57,1 ml/l reine Essigsäure 100 ml/l EDTA (500 mM, pH 8,0) Ad H ₂ O, auf pH 8,3 einstellen
TBS-T	1 % 1 M Tris-Base (pH 7,4) 9 g/l NaCl 0,05 % Tween 20 ad H ₂ O (destilliert)
Tris-Base (pH 7,4)	1 M Tris-Base pH 7,4 (HCl)
Tris-Base (pH 8,8)	1 M Tris-Base pH 8,8 (HCl)
Tris-HCl (pH 6,8)	1 M Tris-HCl pH 6,8 (HCl)

2.1.7 Übersicht über die verwendeten Differenzierungsmedien

Medium	Herstellung
Adipogenes Erhaltungsmedium	10% (v/v) FBS 40 IU/ml Penicillin/Streptomycin 0,1 mg/ml Insulin ad Medium D-MEM h-g →sterilfiltrieren
Adipogenes Induktionsmedium	10% (v/v) FBS 40 IU/ml Penicillin/Streptomycin 1 µM Dexamethason 0,2 mM Indomethacin

	0,1 mg/ml Insulin 1 mM IBMX ad Medium D-MEM h-g →sterilfiltrieren
Osteogenes Differenzierungsmedium	10% (v/v) FBS 40 IU/ml Penicillin/Streptomycin 100 nM Dexamethason 10 mM β -Glycerophosphat 50 μ M L-Ascorbinsäure ad Medium D-MEM h-g →sterilfiltrieren

2.1.8 Übersicht über die verwendeten RT-PCR-Primer

Bezeichnung	Sequenz (von 5' nach 3')	PCR-Produkt (bp)
D2R80A_for	CCAGCGCCGAGTTACTGTC	334 bp
D2R80A_rev	GCTGGTGCTTGACAGCATC	
Δ 45-HSV1-TK-eGFP_for	TGTTTGCCTGGGCCTTGGAC	264 bp
Δ 45-HSV1-TK-eGFP_rev	ACAGTTCCTCGCCCTTGCTC	
hGAPDH_for	CAACTACATGGTTTACATGTTT	181 bp
hGAPDH_rev	GCCAGTGGACTCCACGAC	

2.1.9 Software

Software	Anwendung
Adobe Illustrator CS5.1	Bildbearbeitung
Adobe Photoshop CS5.1	Bildbearbeitung
BioCapt software	Gelaufnahmen nach Gelelektrophorese
Carl Zeiss Axiovision software	Bildaufnahmen
FlowJo FACS analysis software 7.7	FACS-Auswertung
GraphPadPrism 5.0	ELISA-Auswertung, Statistik
ImageJ 1.52a	Westernblotquantifizierung

2.2 Zellkulturmethoden

2.2.1 Zellen und Medien

Für die nachfolgend beschriebenen Methoden wurden vier verschiedene Zelllinien humaner mesenchymaler Stammzellen, die im Labor generiert wurden, verwendet. Dabei handelt es sich um SCP-1, SCP-1-mock, SCP-1-D2R80A und SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP.

SCP-1 sind immortalisierte hMSC aus dem Knochenmark, die durch die Verwendung eines lentiviralen Gentransfers die humane Telomerase stabil überexprimieren (Böcker et al. 2008). Für die Herstellung der SCP-1-mock wurden SCP-1 lentiviral mit pLenti4.3-mock, dem die komplette Expressionskassette (einschließlich der attR1-Region, dem ccdB-Gen, dem CMV-Promotor und der attR2-Region) fehlt, transduziert. Durch eine stabile Transduktion der SCP-1 mit dem pLenti4.3-D2R80A, das das Gen für den punktmutierten Dopaminrezeptor D2R80A enthält, wurden SCP-1-D2R80A hergestellt. D2R80A steht unter der Kontrolle von dem konstitutiven CMV-Promotor. Das verwendete Plasmid pLenti4.3-V5/DEST enthält außerdem ein Zeocinresistenzgen, wodurch stabil transduzierte SCP-1-D2R80A selektiert werden konnten. Des Weiteren wurden SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP verwendet. In die SCP-1 wurde über einen lentiviralen Vektor, der das Gen für die eGFP-getaggte Herpes simplex Virus 1-Thymidinkinase codiert (pLenti4.3- Δ 45-HSV1-TK-eGFP), transduziert. Außerdem enthält das verwendete Plasmid einen CMV-Promotor und eine Zeocinresistenz.

2.2.2 Kultivierung von hMSC

Die Zellen wurden in Kulturflaschen in einem Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Als Nährmedium wurde Minimum essential medium alpha L-glutamine mit 10% fetal bovine serum (FBS) und 1 % Penicillin/Streptomycin versehen. Zur weiteren Kultivierung wurde bei den Zelllinien SCP-1-mock, SCP-1-D2R80A und SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP zusätzlich zu dem genannten Nährmedium Zeocin (1: 1000) zugegeben. Sämtliche Arbeiten wurden unter einer Arbeitsbank durchgeführt, welche über einen stetigen laminaren Luftstrom verfügt und somit ein steriles Arbeiten gewährleistet. Zur Anzucht der Zelllinien wurde alle 3-4 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt und bei Erreichen einer Konfluenz von circa 80% eine Passagierung vorgenommen.

2.2.3 Passagieren von hMSC

Zunächst wurde für die Passagierung das alte Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen (T75: 10 ml) und die Spülflüssigkeit mittels Vakuumpumpe und Glaspipette abgesaugt. Anschließend erfolgte das Ablösen der Zellen vom Kulturflaschenboden mit Hilfe einer 1x Trypsin/EDTA-Lösung (3 ml bei einer T75-Kulturflasche), welche für 5 Minuten im Brutschrank einwirken konnte. Durch leichtes Beklopfen des Bodens wurden noch adhärenente Zellen abgelöst. Nach Kontrolle im Mikroskop wurde die Trypsin/EDTA-Lösung mittels Medium (1:3; 6 ml bei T75) neutralisiert. Nach einer Zellzählung in einer Neubauer Zählkammer wurden die Zellen in neue Zellkulturflaschen mit entsprechender Dichte überführt (5000 Zellen/cm²).

2.2.4 Zählen von hMSC

Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Zunächst wurde die Zellsuspension durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit einer Pipette gut vermischt und anschließend abhängig von der Zelldichte mit PBS verdünnt. Nachdem die obere und untere Kammer der Neubauer Zählkammer mit jeweils 10 µl der Verdünnung befüllt wurde, wurden die Felder der vier Außenquadranten (A, B, C, D) unter einem Lichtmikroskop (Diavert) ausgezählt. Die Zellkonzentration wurde nun mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{(A_1 + B_1 + C_1 + D_1 + A_2 + B_2 + C_2 + D_2) / 2 \cdot 10^4 \cdot V}{4} = \text{Zellen/ml}$$

(V=Verdünnungsfaktor)

2.2.5 Konservierung und Auftauen von hMSC

Die Zellen wurden zuerst trypsinisiert (s. 2.2.3) und in einer Neubauer Zählkammer (s. 2.2.4) gezählt. Nachdem 1-3 x 10⁶ Zellen zentrifugiert (500 x -g, 5 Minuten) wurden, wurde das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (10% DMSO, 20% FBS, 70% Medium) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde möglichst schnell in vorgekühlte Kryoröhrchen überführt und auf Trockeneis gestellt. Anschließend wurden diese in einem mit Stickstoff gefülltem Aufbewahrungstank gelagert.

Zum Auftauen der in den Kryoröhrchen befindlichen hMSC wurde dieses in ein 37 °C Wasserbad gegeben. Sobald die Zellsuspension aufgetaut war, wurde diese mit etwa 2 ml Kulturmedium vermischt und in eine mit entsprechender Menge Medium gefüllten Zellkulturflasche überführt. Nun wurden die Zellen über Nacht bei 37 °C inkubiert, um am darauffolgenden Tag nach lichtmikroskopischer Kontrolle der Zelladhärenz einen Mediumwechsel vorzunehmen.

2.2.6 Vereinzlung von Zellklonen

Anfangs wurden die SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP in 48-Wellplatten ausgesät, wobei eine Dichte von rechnerisch 9 Zellen/cm² erzielt wurde. Auf diese Weise wurde in den meisten Wells nur eine Zelle ausgesät. Bei Erreichen einer Konfluenz von circa 80 % wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop (Axiovert S100) untersucht, um diejenigen Zellklone, die zu einem hohen Prozentsatz fluoreszent waren, zu selektieren und in eine 12-Wellplatte zu überführen. Die Fluoreszenzintensität wurde in regelmäßigen Zeitabständen kontrolliert, so dass jeweils die optimalsten Zellen schrittweise in größere Zellkulturflaschen expandiert wurden.

2.2.7 FACS-Analyse

Für die Analyse der Expression von Δ 45-HSV1-TK-eGFP der SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP mittels FACS wurden zunächst nach oben erwähntem Schema die Zellen vereinzelt und expandiert (siehe 2.2.6), bei ausreichender Konfluenz wie in 2.2.3 beschrieben mittels Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und mit Hilfe der Neubauer Zählkammer gezählt. Anschließend wurden $0,2 \times 10^6$ Zellen mit 5 ml PBS verdünnt und bei 500 x -g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet mit 200 μ l PBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die Fluoreszenzintensität der Δ 45-HSV1-TK-eGFP-exprimierenden Zellen wurde mit Hilfe eines FACS-Gerätes (FACS-Calibur) gemessen. Dies erfolgte mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einem Emissionsmaximum bei 510 nm (FL1-Kanal). Dabei fungierten SCP-1-mock als Negativkontrolle. Zur Auswertung der Messungen wurde die FlowJo Software (Version 7.7) verwendet.

2.2.8 Wachstumskurve

Zur Erstellung einer Wachstumskurve wurden Zellen von jeder oben genannten Zelllinie in 6-Wellplatten mit einer Dichte von 2080 Zellen/cm² ausgesät und die Zellzahl mit Hilfe einer

Neubauer Zählkammer nach 3, 6, 10, 13, 18, 21 und 29 Tagen bestimmt. Nach Ablösen mit 500 µl Trypsin/EDTA- Lösung (siehe 2.2.3) wurden an den genannten Tagen 3 Wells pro Zelltyp jeweils dreimalig mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt und der Mittelwert pro Well berechnet. Der Mediumwechsel der restlichen Wells erfolgte an den Zähltagen. Die Wachstumskurve wurde unter Verwendung des Programms GraphPadPrism 5 Project ausgewertet.

2.2.9 Zelldifferenzierung

Mit den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien wurde sowohl eine osteogene als auch eine adipogene Differenzierung durchgeführt, wobei die SCP-1-mock-Zellreihe als Positivkontrolle diente. Zur Negativkontrolle wurden die Zellen jeweils in Medium ohne die entsprechenden Differenzierungszusätze kultiviert.

2.2.9.1 Osteogene Differenzierung

Für die osteogene Differenzierung wurden die Zellen mit einer Dichte von 4200 Zellen/cm² in 6-Wellplatten ausgesät. Nachdem die Zellkulturen zu 80-90% konfluent waren und dies mittels mikroskopischer Aufnahme dokumentiert wurde, konnte mit der 21-tägigen Stimulation begonnen werden. Dabei wurden drei der sechs Wells mit Differenzierungsmedium (s. 2.1.7) kultiviert und die restlichen drei Wells mit Standardmedium behandelt. Alle 3-4 Tage wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Zum Nachweis des in Folge einer osteogenen Differenzierung abgelagerten Kalziums, wurde eine Alizarin Rot-Färbung durchgeführt.

Hierfür wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit jeweils 2 ml PBS (ohne Mg²⁺/Ca²⁺)/Well gewaschen und die Spülflüssigkeit abgesaugt. Zur Fixierung der Zellen am Wellboden wurden nun je 2 ml 10 % Formaldehyd zugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem jeweils 5 minütigem Waschen der fixierten Zellen mit destilliertem Wasser, wurde die Färbung mit einer Alizarin Rot-Lösung (siehe 2.1.6) für 20 Minuten vorgenommen (2 ml pro Well). Nachfolgend wurde vier Mal mit destilliertem Wasser für jeweils 5 Minuten gewaschen. Abschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml PBS (ohne Mg²⁺/Ca²⁺)/Well, um ein Austrocknen während der Aufnahmen mit dem Mikroskop (Axiovert 40 CFL) zu verhindern.

2.2.9.2 Adipogene Differenzierung

Die adipogene Differenzierung wurde ebenfalls in 6-Wellplatten durchgeführt, in der die Zellen mit einer Dichte von 4200 Zellen/cm² ausgesät wurden. Der Versuchsaufbau gestaltete

sich analog zu dem der osteogenen Differenzierung. Allerdings mit der Abweichung, dass die stimulierten Zellen zunächst für 5 Tage mit einem Induktionsmedium (s. 2.1.7) und anschließend für 2 Tage mit einem Erhaltungsmedium (s. 2.1.7) inkubiert wurden. Die Stimulation erfolgte über 21 Tage. Anschließend wurden die gebildeten Fettvakuolen mit Ölrot O-Lösung gefärbt.

Zur Herstellung der 0,3%igen Vorratslösung wurden 150 mg Ölrot O mit 50 ml Isopropanol während 10 minütigem Rührens aufgelöst. Anschließend wurde diese Lösung mit destilliertem Wasser verdünnt (12 ml Ölrot O-Lösung + 8 ml destilliertes Wasser), wobei sie für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen wurde. Zum Schluss wurde diese zur Entfernung grober Farbpigmente filtriert. Die Zellen wurden wie in 2.2.9.1 beschrieben fixiert und gefärbt. Die Färbungen wurden mit dem Mikroskop (Axiovert 40 CFL) dokumentiert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Zum Nachweis der Expression des Dopamin 2-Rezeptors der SCP-1-D2R80A-Zellen bzw. des Enzyms Thymidinkinase der SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP-Zellen auf mRNA-Ebene wurde eine RT-PCR-Analyse durchgeführt. Als Kontrolle wurden SCP-1-mock-Zellen verwendet.

2.3.1 Isolierung und Reinigung der RNA

Die Isolierung und Reinigung der RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (s. 2.1.4) nach Angaben des Herstellers. Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen, die sich in T25-Kulturflaschen befinden, mit 5 ml PBS gewaschen und die Waschlösung entfernt. Anschließend wurden 850 μ l Pufferlösung, bestehend aus 3 ml RLT-Puffer und 30 μ l β -Mercaptoethanol, zugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst. Die Suspension wurde in einen QIA-shredder-Behälter überführt und 2 Minuten mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.

Anschließend wurde ein Volumen 70%iger Ethanol zu den Zelllysaten zugegeben und vermischt. Nach Überführen von 700 μ l dieser Lösung in ein „RNeasy spin Säulchen“, wurde diese bei 8000 x -g (10000 rpm) für 15 s zentrifugiert und dieser Schritt gegebenenfalls wiederholt. Daraufhin wurden 350 μ l Puffer RW1 auf die Säulenmembran des Gefäßes pipettiert und nach 15 sekündiger Zentrifugation bei 8000 x -g 80 μ l einer Puffer RDD/DNase-Lösung für 15 Minuten hinzugefügt. Es folgte ein erneuter Waschvorgang mit dem Puffer RW1. Danach wurde zweimal mit 500 μ l Puffer RPE gewaschen, wobei das erste Mal 15 Sekunden und das zweite Mal 2 Minuten bei 8000 x -g zentrifugiert wurde. Nach 1 minütiger Zentrifugation wurde die Säule in ein Eppendorfgefäß überführt und eine Elution mit 30 μ l RNase-

freiem Wasser durchgeführt, wobei für 1 Minute bei 8000 x -g zentrifugiert wurde. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Konzentration mit dem Gerät BioPhotometer 6131 (s. 2.1.5) bestimmt. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.3.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

Für die Konzentrationsbestimmung der RNA wurde diese mit RNase-freiem Wasser verdünnt (1:10). Anschließend wurde eine spektrophotometrische Messung mit dem BioPhotometer 6131 bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Zudem konnte durch die Messung der Reinheitsgrad der RNA-Proben bestimmt werden. Hierfür wurde das Verhältnis der Messungen bei 260 nm und 280 nm herangezogen, wobei ein Wert zwischen 1,9 und 2,1 erzielt werden sollte.

2.3.3 cDNA-Synthese

Der Ansatz für die nachfolgende cDNA-Synthese mittels des Cloned AMV First-Strand cDNA-synthesis Kit (s. 2.1.4) setzte sich zusammen aus 1 µg RNA, 1 µl Primer (Random Hexamere) und 2 µl 10 mM dNTP-Mix. Diese Lösung wurde mit DEPC-Wasser auf 12 µl aufgefüllt und die Denaturierung bei 65°C für 5 Minuten in dem MG Research PCR-Gerät gestartet. Anschließend wurden 8 µl eines Mastermixes (5 × cDNA synthesis buffer, 0,1 M DTT, RNase Out, DEPC-Wasser und Cloned AMV-RT) auf die denaturierte RNA gegeben. Die cDNA-Synthese wurde mit folgendem Programm in einem Thermocycler (s. 2.1.5) durchgeführt: 25°C für 10 Minuten, 50°C für 50 Minuten, 85°C für 5 Minuten, 4°C „forever“.

2.3.4 RT-PCR

Der Ansatz für die PCR bestand aus 1µl cDNA, 2 µl 10 × PCR-Puffer (s. 2.1.3), 10 mM dNTPs, 10 µM Primer, Taq und H₂O (ad 20 µl) bzw. aus 1 µl cDNA, 2 µl Invitrogen 10 × Puffer, 10 mM dNTPs, 10 µM Primer, 50mM MgCl₂, Taq Invitrogen und Wasser (ad 20 µl). Anschließend wurde das PCR-Programm im Thermocycler eingestellt (PCR-Primer s. 2.1.8, RT-PCR-Programme s. 8.2.2).

Die Normierung der in dem Mastermix eingesetzten cDNA-Menge erfolgte über die Analyse der Expression des Haushaltsgens GAPDH.

2.3.5 Gelelektrophorese

Zur Analyse wurden die PCR-Produkte auf horizontalen Agarosegelen analysiert. Für ein 2% Agarosegel wurde 2 g (1,6 g) Agarosepulver mit 100 ml (80 ml) 1× TAE-Puffer vermischt und bis zur vollständigen Auflösung des Pulvers in einer Mikrowelle erhitzt. Nach kurzer Abkühlung der Flüssigkeit wurden 5 µl/100 ml Ethidiumbromid zugegeben. Die Gellösung wurde nun in einen Gelschlitten gefüllt und mit einem Kamm versehen. Nachdem das Gel komplett ausgehärtet war, wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Gelelektrophoresekammer gelegt. Anschließend wurde so viel 1 × TAE-Puffer (s. 2.1.6) in die Kammer gegeben bis das Gel mit diesem bedeckt war. Daraufhin wurden die auf 1× Loading Dye gebrachten DNA-Proben und ein 100 bp-DNA ladder als Referenz in die Geltaschen pipettiert und die Gelelektrophorese für 30 Minuten bei 80 mA durchgeführt. Abschließend wurden mit dem Transluminator und dem Programm BioCapt Aufnahmen des Gels unter UV-Licht zu unterschiedlichen Belichtungszeiten gemacht.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteinisolation

Zur Proteinisolierung wurden die Zellen mit 1× Trypsin/PBS abgelöst, mit PBS gewaschen und abzentrifugiert (500 x- g, 5 Minuten). Danach wurde das entstandene Zellpellet mit einer Pufferlösung, bestehend aus RIPA-Puffer und einem Proteaseinhibitor-Mix (Complete mini, EDTA-frei) (s. 2.1.3 und 2.1.6), resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend bei -80 °C eingefroren und auf Eis aufgetaut. Zur Entfernung von Zellresten wurden die Zelllysate bei 10000 rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Lagerung der schockgefrorenen Proben erfolgte bei -80°C.

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt wurde mittels eines BCA-Tests (BCA protein Test kit, s. 2.1.4) nach Anleitung des Herstellers ermittelt, indem die Intensität der induzierten Farbreaktion photometrisch bei 450 nm mit Hilfe eines ELISA readers gemessen wurde. Mittels einer mit Verdünnungen einer BSA-Lösung bekannter Konzentration hergestellten Eichkurve wurde die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

2.4.3 SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese

Die Proteinproben (40 µg) wurden mit 4× Lämmli-Puffer versetzt und mit RIPA-Puffer auf 20 µl aufgefüllt. Die Proben wurden bei 95°C für 5 Minuten im Thermomixer erhitzt. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben in das vorbereitete Gel, welches aus einem 10%igem Trenngel (destilliertes Wasser, Acrylamid mix 30%, Tris 1M pH 8,8, SDS 10%, APS 10%, TEMED) und einem 5%igem Sammelgel (destilliertes Wasser, Acrylamid mix 30%, Tris 1M pH 6,8, SDS 10%, APS 10%, TEMED) besteht, aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde unter Verwendung eines 1x Elektrodenpuffers bei 100 V und 250 mA für 2 Stunden durchgeführt. Zusätzlich wurde als Standard der Protein ladder (s. 2.1.3) verwendet.

2.4.4 Immunoblotting

Zur Vorbereitung des Proteintransfers wurde das Gel (siehe 2.3.5) im Blotpuffer kurzfristig gelagert und die PVDF-Membran 5-30 Minuten in Methanol inkubiert, schließlich mit destilliertem Wasser gewaschen und im Blotpuffer getränkt. Die Verwendung der Blotapparatur erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Hierfür wurde eine Schichtung aus mit Blotpuffer getränktem dicken Fleece, Filterpapier (zweimal), PVDF-Membran, Gel, Filterpapier (zweimal) und dünnen Fleece verwendet. Es wurde über Nacht bei 40 V und 180 mA geblottet. Dann wurde die PVDF-Membran in einer 5%igen Milchlösung (TBS-T und Magermilchpulver) für eine Stunde blockiert und anschließend mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C (s. 2.1.1, im Verhältnis 1:700 mit 5%iger Milchlösung) inkubiert. Nun wurde ein dreimaliger Waschvorgang mit TBS-T (je 5 Minuten) durchgeführt. Nach einer einstündigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper (anti-rabbit HRP, SantaCruz sc-2004, im Verhältnis 1:10000 mit 5%iger Milchlösung) wurde der Waschvorgang wie oben beschrieben wiederholt. Abschließend wurde die PVDF-Membran mit einer ECL-Lösung (s. 2.1.3) benetzt und die Entwicklung mit Hilfe des Image Quant LAS 4000 mini vorgenommen.

Als Ladekontrolle wurde das Haushaltsgen Aktin untersucht. Hierbei wurde der Primärantikörper β -Actin aus Maus (s. 2.1.1, monoclonal, im Verhältnis 1:10000 mit 5%iger Milchlösung) und der sekundäre HRP-konjuguierte Antikörper (s. 2.1.1, im Verhältnis 1:20000 mit 5%iger Milchlösung) verwendet. Zudem fand die Entwicklung mit Hilfe einer RotiLumin-Lösung (s. 2.1.3) mit Hilfe des ImageQuant LAS 4000 mini statt.

2.5 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden jeweils 25.000 SCP-1-D2R80A- und SCP-1-mock-Zellen auf einem Glasobjektträger ausgesät. Nachdem die Zellen ausreichend konfluent gewachsen waren, wurde mit den weiteren Schritten fortgefahren. Hierfür wurden die Zellen nach mehrmaligem Waschen mittels PBS (mit Mg^{2+}/Ca^{2+}) mit 4%igem Formaldehyd für 10 Minuten fixiert und danach nochmals mit PBS gewaschen. Nachdem mit einem Dako-Pen auf dem Objektträger Felder abgegrenzt wurden, wurden die Zellen mit 3%igem BSA für eine Stunde blockiert und anschließend für eine weitere Stunde mit dem Primärantikörper inkubiert (2 μ g/ml, in 0,1% BSA, s. 2.1.1). Daraufhin folgten ein Waschvorgang mit PBS (ohne Mg^{2+}/Ca^{2+} , dreimal für 5 Minuten) und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:250, in 0,1% BSA, s.2.1.1) für eine Stunde. Darauffolgend wurde mit PBS (ohne Mg^{2+}/Ca^{2+} , dreimal für 5 Minuten) gewaschen. Des Weiteren wurde die Färbung der Zellkerne mit DAPI (1:10000 mit PBS mit Mg^{2+}/Ca^{2+} , s. 2.1.3) für 5 Minuten durchgeführt und Farbreste durch dreimaliges Waschen mit PBS (je 5 Minuten) beseitigt, um abschließend den Objektträger mit einem Deckgläschen und Mowiol abzudichten und das Mowiol über Nacht bei 4°C abhärten zu lassen. Pro Glasobjektträger wurde eine Negativkontrolle angelegt, welche bis auf das Weglassen des Primärantikörpers analog wie oben beschrieben behandelt wurde. Nach Aushärtung der Objektträger wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch (Axiovert S100) untersucht. Dabei wurde zur Detektion der Alexa Fluor 488 Fluoreszenz ein 510-545 nm Bandbreitenemissionsfilter und der DAPI-Fluoreszenz ein 450-475 nm Bandbreitenemissionsfilter verwendet.

2.6 Bindungstest

Für den Nachweis der Aktivität des rekombinanten Dopaminrezeptors in den SCP-1-D2R80A wurde ein Bindungstest etabliert. Dabei dienten SCP-1-mock-Zellen als Negativkontrolle. Die Zellen wurden einen Tag vor Versuchsbeginn mit einer Dichte von 10^5 Zellen in einer T25-Kulturflasche ausgesät. Nachdem die Zellen mit PBS (ohne Mg^{2+}/Ca^{2+}) gewaschen wurden, wurde 1 ml Puffer-/Ligandlösung (50 mM TrisHCl (pH 7,4), 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 4 mM $MgCl_2$, 1,5 mM $CaCl_2$, 1 mM EDTA mit 12,5 nM Liganden (Dopamine D2 Rezeptor Rot Antagonist)) zu den Zellen hinzugegeben. Die Zellen wurden bei einer Einwirkzeit von drei Stunden abgedunkelt und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Trypsinierung und Zentrifugation (5 Minuten, 500 x -g) erfolgte ein Waschvorgang mit PBS für 5 Minuten und eine erneute Zentrifugation. Das entstandene Zellpellet wurde mit 200 μ l PBS resuspendiert und in entsprechende Röhrchen überführt. Außerdem wurden unbehandelte SCP-1-mock zunächst trypsinisiert, mit PBS gewaschen, zentrifugiert (5 Minuten, 500 x -g) und darauffolgend in 200

μ l PBS resuspendiert. Nun wurden die Zellen mit Hilfe eines FACS-Gerätes (s. 2.1.5) quantitativ analysiert. Der Fluoreszenzfarbstoff des Liganden wurde dabei mit 635 nm angeregt und die emittierte Fluoreszenz mit dem 661/16 nm-Filter (APC-Kanal) gemessen. Die Signalverstärkung am Detektor wurde bei der Negativkontrolle, den SCP-1-mock, so eingestellt, dass keine Autofluoreszenz detektiert wurde. Für die Auswertung wurde die Software FlowJo FACS analysis software 7.7 (Treestar Inc.) verwendet.

2.7 GCV-Test

Der Ganciclovirtest zur Überprüfung der Funktionalität der rekombinanten Thymidinkinase wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen durchgeführt. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 1500 Zellen/cm² in 96-Wellplatten ausgesät und pro Zelltyp und eingesetzter Konzentration des Ganciclovirs als Dupletten angelegt. Es wurden drei verschiedene Zelllinien der vereinzelt SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP (s. 2.2.6) untersucht und als Kontrolle SCP-1-mock-Zellen verwendet. Vier Stunden nach Aussäen der Zellen in die Wellplatte wurden diesen fünf verschiedene Konzentrationen des Ganciclovirs hinzugegeben (0 μ g/ml, 10 μ g/ml, 15 μ g/ml, 20 μ g/ml, 30 μ g/ml). Das Medium mit Ganciclovir in den verschiedenen Konzentrationen wurde alle 3-4 Tage erneuert. Nach 10 Tagen wurde der Versuch beendet und das Zellüberleben mittels WST-1-Test analysiert (s. 2.8.1).

2.8 Nachweis der Zellviabilität

2.8.1 WST-1-Test

Zur Durchführung des WST-1-Tests (s. 2.1.3) wurden sowohl SCP-1-D2R80A-Zellen als auch SCP-1-mock-Zellen in einer 96-Wellplatte mit einer Dichte von 3×10^3 Zellen und $0,6 \times 10^4$ Zellen pro Well als Triplets ausgesät. Zudem wurde eine Medium enthaltende Kontrolle (blank) als Triplett angelegt. Nach einer 36-stündigen Inkubation der Zellen im Inkubator bei 37°C wurde eine WST-/Mediumlösung (1:10) nach Absaugen des Mediums zugegeben.

Mit den SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP-Zellen wurde ebenfalls ein WST-1-Test durchgeführt, um die Funktionalität der rekombinanten Thymidininkinase zu belegen (s. 2.7)

Die immortalisierten Zellen wurden für vier Stunden mit dieser Lösung inkubiert. Anschließend wurden pro Well 100 μ l in eine neue 96-Wellplatte überführt, um die OD mit Hilfe eines ELISA readers zu bestimmen. Dabei wurden die Messungen sowohl bei 450 nm als auch bei 620 nm vorgenommen.

2.8.2 BrdU-Test

Der BrdU-Test wurde mit dem Cell Proliferation ELISA-Kit (s. 2.1.4) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Anfangs wurden die SCP-1-D2R80A- und SCP-1-mock-Zellen als Triplets in einer 96-Wellplatte mit einer Dichte von 3×10^3 und $0,6 \times 10^4$ Zellen pro Well ausgesät. Für jede Zelldichte und jeden Zelltyp wurde eine Hintergrundkontrolle als Triplett angelegt, welche bis auf das Weglassen der „BrdU labeling solution“ analog zu den genmodifizierten Zellen behandelt wurde. Des Weiteren wurde ebenfalls als Triplett eine Blank-Kontrolle hinzugefügt. Diese enthielt nur Medium und wurde wie die transduzierten Stammzellen behandelt. Nach 12-stündiger Inkubation bei 37°C wurde eine BrdU labeling solution in jedes Well (10 µl pro Well) mit Ausnahme der Hintergrundkontrolle hinzugegeben, woraufhin eine Inkubation für 24 Stunden folgte. Anschließend wurde diese Lösung abgesaugt und eine Fixierung mit FixDenat (200µl pro Well) für 30 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Daraufhin wurde nach einer 30-minütigen Inkubation mit einer Antikörperlösung bei Raumtemperatur mit einer Waschlösung gewaschen und für weitere 30 Minuten mit einer Substratlösung (100µl pro Well) inkubiert. Abschließend wurde die Farbreaktion mit einer Lösung aus 1 M H₂SO₄ (25 µl pro Well) gestoppt. Die Messung mit Hilfe eines ELISA readers wurde spätestens nach 5 Minuten sowohl bei 450 nm als auch bei 620 nm durchgeführt.

2.9 Fluoreszenzmikroskopie

Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie basiert darauf, dass Fluorochrome die Fähigkeit besitzen Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und dieses längerwellig zu emittieren. Diese Differenz zwischen Absorptions- und Emissionswellenlänge bezeichnet man als Stokesverschiebung (Abb.4). Das emittierte Licht trifft nun auf einen Detektor und kann somit sichtbar gemacht werden. Der Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops wird in Abb. 5 dargestellt. In dieser Arbeit wurde ein Zeiss Axiovert S100 benutzt. Im Folgenden wird nun näher auf die Versuche eingegangen, in denen die Fluoreszenzmikroskopie angewendet wurde.

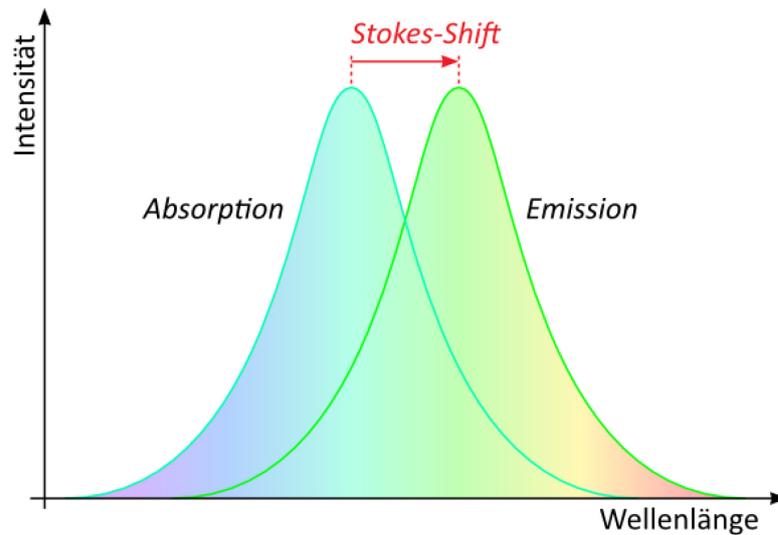


Abb. 4: Prinzip der Stokesverschiebung (Niedermayr, A. (2010), <https://lp.uni-goettingen.de/get/text/6741>)

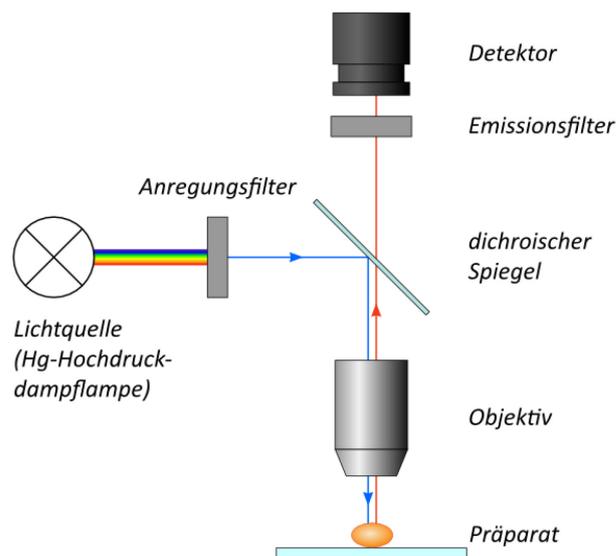


Abb. 5: Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops (Niedermayr, A. (2010), <https://lp.uni-goettingen.de/get/text/6741>)

2.9.1 SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP

Über die Fluoreszenz des eGFP-tags kann die Expression der Thymidinkinase mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Dies war für die Vereinzelung von Zellklonen der SCP1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP von Bedeutung, da dadurch die Fluoreszenzintensität abgebildet werden konnte (s. 2.2.6 und 2.2.7). Für das eGFP liegt die Wellenlänge für die Anregung bei 485 nm (Bandbreitenfilter) und für die Emission im grünen Bereich bei 510-545 nm

(Bandbreitenfilter). Somit konnte das mit dem eGFP fusionierte Enzym Thymidinkinase in den SCP1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP-Zellen dargestellt werden. SCP1-mock-Zellen dienten dabei als Negativkontrolle.

2.9.2 SCP-1-D2R80A

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde außerdem bei der Immunfluoreszenz der SCP1-D2R80A (s. 2.5) verwendet. Dabei wurde zur Abbildung der Alexa Fluor 488-Fluoreszenz ein 510-545 nm Bandbreitenemissionsfilter und der DAPI-Fluoreszenz ein 450-475 nm Bandbreitenemissionsfilter benutzt.

2.10 *In vivo*-Experimente

Alle nachfolgend genannten Versuchsschritte an Tieren wurden in Übereinstimmung mit den geltenden Regeln für die Haltung und Nutzung von Labortieren durchgeführt und durch die Regierung von Oberbayern genehmigt. Die Experimente wurden in Kooperation mit der Nuklearmedizin Großhadern (Prof. P. Bartenstein) durchgeführt.

2.10.1 *In vivo*-Zelltracking von SCP-1-D2R80A

Vor Durchführung der Operation an den Versuchstieren, wurden die hMSC hierfür vorbereitet. Sowohl SCP-1-D2R80A als auch SCP-1-mock wurden trypsinisiert und in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Es wurden $2,4 \times 10^7$ Zellen pro Zelltyp und Injektion zentrifugiert (500 x -g, 5 Minuten), mit PBS gewaschen und anschließend nochmals bei 500 x -g für 5 Minuten zentrifugiert und in 40 μ l PBS resuspendiert.

Für die Operation wurden männliche athym Nacktratten (Harlan) verwendet, mit 2,0-2,5% Isofluran über eine eigens konfektionierte Gesichtsmaske narkotisiert und in Rückenlage gelagert. Nach einer ausgiebigen Desinfektion erfolgte unter sterilen Bedingungen die Hautinzision im Bereich der Oberschenkelmuskulatur mittels eines Skalpells und die i.m.-Injektion der SCP-1-D2R80A mit einer 25 G-Nadel unter Sicht. Anschließend wurde die Wunde mit einer Einzelknopfnahnt verschlossen. Zudem wurde auf der kontralateralen Seite analog zu den genannten Schritten SCP-1-mock als negative Kontrolle in die Oberschenkelmuskulatur injiziert. Bevor die Narkose beendet wurde, wurde noch eine PET-Bildgebung durchgeführt, die im Folgenden besprochen wird.

Um den Erfolg der Applikation zu kontrollieren, wurde ein PET-Scan unter fortgeführter Narkose, Bauchlagerung und intravenöser ^{18}F -Fallyprid-Gabe (20 MBq) über die Schwanzvene durchgeführt. Dies erfolgte jeweils nach der Applikation und an Tag 1 und 7. Nach Abschluss der dritten PET-Untersuchung wurden die Tiere mittels Phenobarbital i.p. euthanasiert. Für die PET-Aufnahmen, welche 90 Minuten dauerten, wurde ein eigens für Tiere entwickeltes PET-Gerät verwendet. Anschließend wurde der Datensatz von den Kollegen der Nuklearmedizin (Dr. med. Erik Mille und PD Dr. rer. nat. Guido Böning, Nuklearmedizin Großhadern) dynamisch rekonstruiert, so dass die Lokalisation der injizierten SCP-1-D2R80A veranschaulicht werden konnte.

2.10.2 *In vivo*-Zelltracking von SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP

Des Weiteren wurden *in vivo*-Versuche mit der Zelllinie SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP durchgeführt. Die Vorbereitung der Zellen und die Durchführung der Versuchsreihe hinsichtlich verwendeter Tierart, deren Haltung und der intraoperativen Handhabung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bei den SCP-1-D2R80A-Zellen beschrieben wurde (siehe 2.10.1). Zur Optimierung des *in vivo*-Zelltrackings wurden verschiedene Strategien getestet.

Beim ersten Versuchsaufbau sollten in einer athymen Nacktratte die SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP intraossär abgebildet werden. Hierfür wurde nach ausreichender Desinfektion unter Narkose und sterilen Bedingungen eine Hautinzision unterhalb der Patella beginnend und zentral über dem Ligamentum patellae liegend durchgeführt. Nach Aufsuchen der Vorderkante der Tibia wurde der Markraum mit einer Kanüle eröffnet und das Zellvolumen (ca. 2×10^6 Zellen, nicht vereinzelt Zellen) verabreicht. Es folgten eine Versiegelung des Markraums mit Knochenwachs und der Verschluss der Haut mit einer Einzelknopfnah. Daraufhin wurde ein PET-Scan nach Verabreichung des radioaktiven Markers (via Schwanzvene, ^{18}F -FHBG) (s. 2.10.1) an Tag 0, 1 und 7 veranlasst.

Als Erweiterung erfolgte beim nächsten Versuchsaufbau bei 2 athymen Nacktratten nicht nur eine intramedulläre (Tibia rechts) sondern auch eine intramuskuläre Injektion in den Oberschenkelmuskel (links). Das Vorgehen für die i.m.-Injektion wurde bereits in 2.10.1 beschrieben. Das verabreichte Zellvolumen betrug 3×10^6 ungepickte Zellen. Zudem wurden die Zellen für die intramedulläre Injektion vorher mit einer radioaktiven Substanz (^{18}F -FHBG) inkubiert und die zellgebundene Radioaktivität mit einem Aktivimeter gemessen. Nach Abschluss der Operation wurde die Bildgebung mittels PET an Tag 0,1 und 7 in die Wege geleitet.

In der letzten Versuchsreihe wurden Zellklone (SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP (a2)) in den Oberschenkelmuskel zweier athymer Nacktratten injiziert. Hierbei wurden auf der rechten Seite unmarkierte Zellen und auf der linken Seite vormarkierte Zellen verabreicht. Das Zell-

volumen betrug jeweils 3×10^6 Zellen. Zur Vormarkierung der Zellen wurden diese für 45 Minuten mit 40 MBq inkubiert, zentrifugiert (5 Minuten, $500 \times g$), mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und in PBS resuspendiert. Anschließend wurde die zellgebundene Radioaktivität mit einem Aktivimeter gemessen. Nach Beendigung des operativen Eingriffs wurde über die Schwanzvene ^{123}I -FIAU appliziert und die Bildgebung mit SPECT/CT (SPECT dynamisch und statisch, gefolgt von CT) gestartet. Diese wurde 0 h, 1,5 h, 13 h und am Tag 8 postoperativ durchgeführt.

2.11 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism (Version 5.0). Es wurde ein Student's t-Test durchgeführt, um die statistische Signifikanz der Experimente zu belegen. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte mit der Standardabweichung an.

3 Ergebnisse

3.1 *In vitro*-Charakterisierung und *in vivo*-Zelltracking von SCP-1-D2R80A

Bei der *in vitro*-Charakterisierung der SCP1-D2R80A wurden generell als Kontrollzellen neben den SCP-1-mock auch SCP-1 verwendet. Es gab bei den Ergebnissen keine Unterschiede zwischen den SCP-1-mock und den SCP-1. Da SCP-1-mock aufgrund der zweifachen Virusbehandlung die korrekte Kontrolle ist, wurde auf die Darstellung von SCP-1 verzichtet.

3.1.1 Nachweis der Expression auf mRNA-Ebene

Um die Expression von D2R80A in den D2R80A-überexprimierenden, immortalisierten hMSC auf mRNA-Ebene nachzuweisen, wurde eine RT-PCR-Analyse durchgeführt.

Bei den SCP-1-D2R80A konnte eine Bande der erwarteten Größe von 330 bp detektiert werden. Die SCP-1-mock wiesen kein PCR-Produkt auf. Die eingesetzte cDNA-Menge wurde über die Expression des Haushaltsgens GAPDH normiert (siehe Abb. 6).

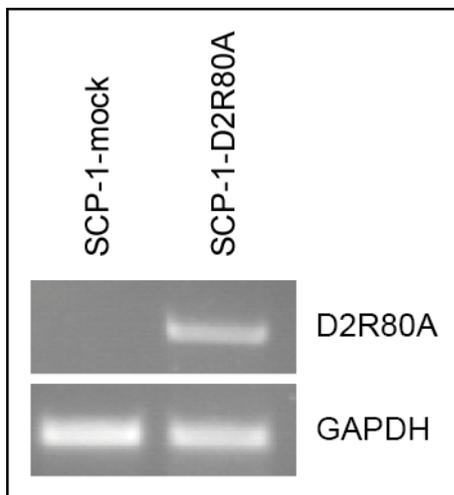


Abb. 6: Darstellung der Expression von D2R80A in den SCP-1-D2R80A auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR.

3.1.2 Untersuchung der zellulären Lokalisation des D2R80A

Mittels Immunfluoreszenz sollte die Lokalisation des transmembranen Dopaminrezeptors D2R80A überprüft werden.

Hier konnte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axiovert S100) ein Fluoreszenzsignal in den SCP-1-D2R80A-Zellen detektiert werden. Bei den Negativkontrollen und den SCP-1-mock konnte bei derselben Einstellung keine Fluoreszenz auf Grund unspezifischer Bindung der Antikörper detektiert werden. Das Fluoreszenzsignal ist im Bereich der Filopodien und am Zellrand zu sehen (Abb. 7). Das transgene D2R80A scheint folglich auch in die Zellmembran integriert zu sein.

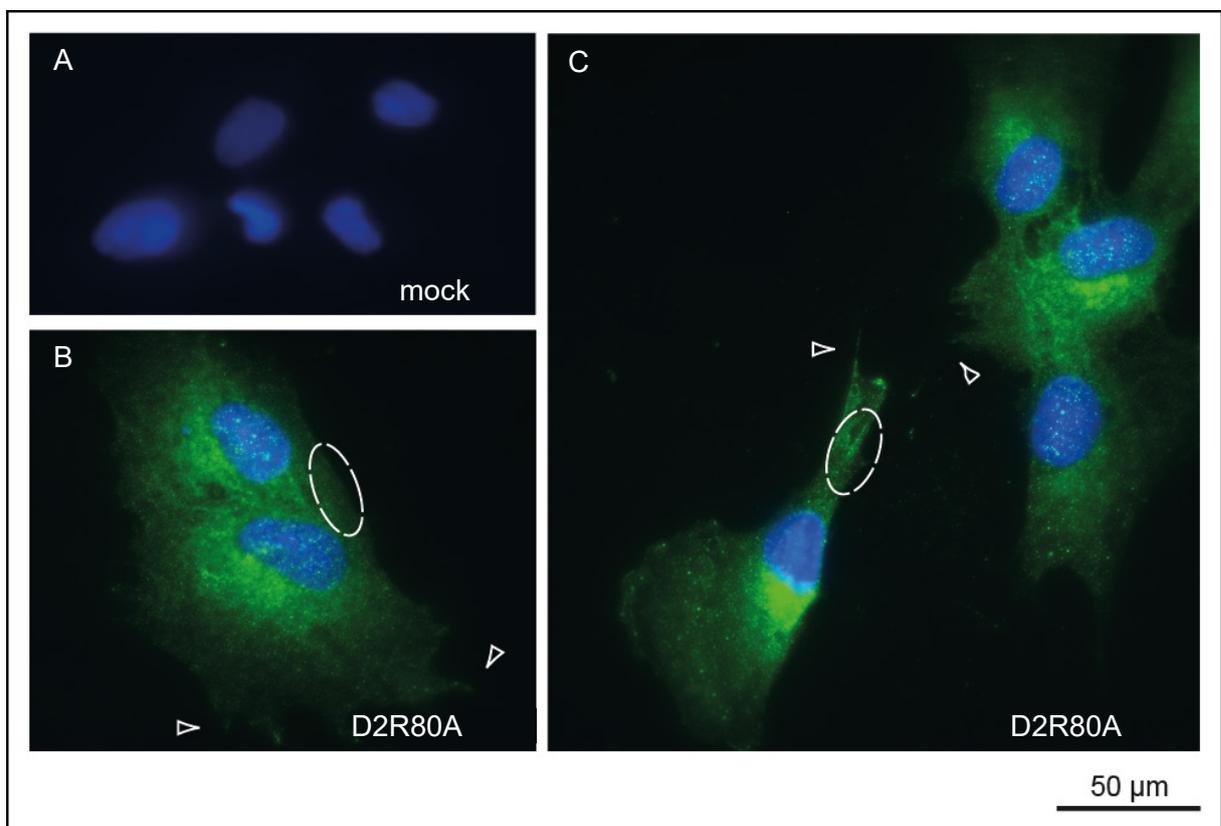


Abb. 7: Untersuchung der Lokalisation des transmembranen Dopaminrezeptors D2R80A mittels Immunfluoreszenz. Dargestellt sind die SCP-1-mock-Zellen als Kontrollzellen. Hier konnte keine Fluoreszenz detektiert werden (**A**). Bei den SCP-1-D2R80A-Zellen konnte im Bereich der Filopodien (Pfeilspitzen) und des Zellrandes (Kreise) ein Fluoreszenzsignal visualisiert werden (**B, C**). Die Zellkerne sind in allen Abbildungen (**A-C**) blau dargestellt.

3.1.3 Nachweis der Aktivität des rekombinanten Dopaminrezeptors

Um die Aktivität des Dopaminrezeptors D2R80A in den hMSC bestimmen zu können, wurden die Zellen mit dem Liganden Dopaminrezeptor D2 Rot Antagonist (s. 2.1.1) inkubiert.

Dieser ist ein Spiperonderivat gekoppelt mit einer rot-emittierenden HTRF Fluoreszenzprobe, wodurch mit Hilfe eines FACS-Geräts die Anzahl der D2R80A-exprimierenden Zellen, die den fluoreszierenden Liganden binden konnten, ermittelt werden konnte. In Tab.1 sind die Ergebnisse von fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten aufgeführt. Abbildung 8 zeigt exemplarisch die graphische Auswertung einer FACS-Analyse. Im Vergleich zu den SCP-1-mock sind $90,82 \pm 1,72\%$ der SCP-1-D2R80A in Bezug auf die Färbung positiv. Bei diesen Zellen liegt der Rezeptor in aktiver Form vor.

Negative SCP-1-D2R80A	Positive SCP-1-D2R80A
9,97 %	90,00 %
11,5 %	88,50 %
9,07 %	90,90 %
6,91 %	93,10 %
6,91 %	91,60 %

Tab. 1: Darstellung der Ergebnisse von 5 Wiederholungen des Bindungstests.

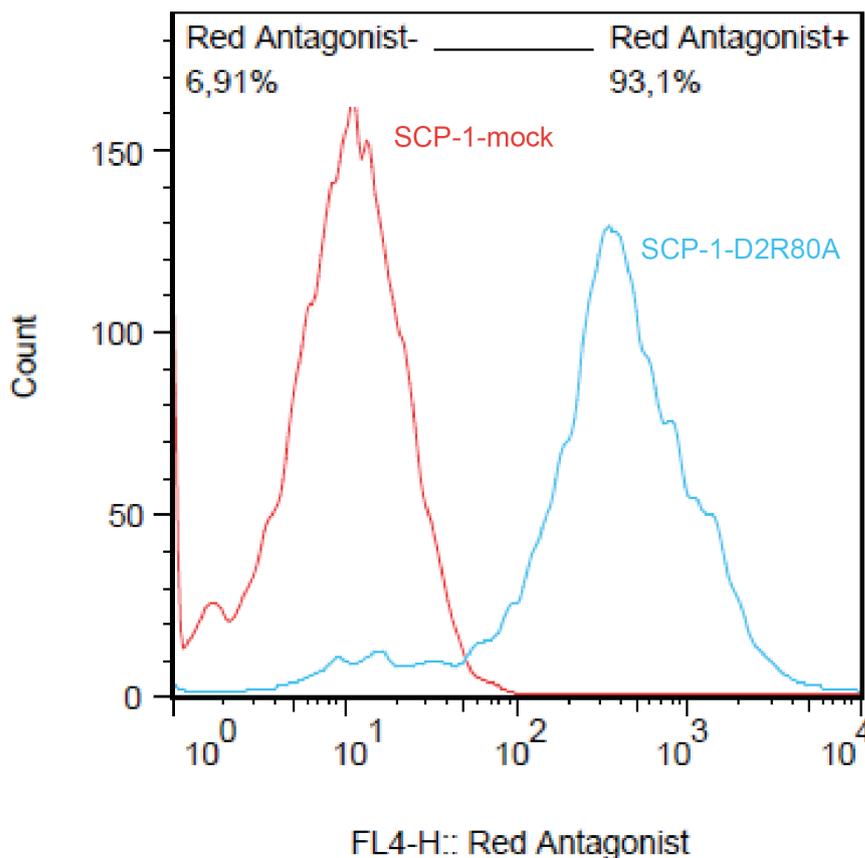


Abb. 8: Untersuchung der Aktivität des Dopaminrezeptors D2R80A in den hMSC mit Hilfe eines Bindungstests. Mittels FACS konnte gezeigt werden, dass in diesem Experiment 93,1 % der SCP-1-D2R80A-Zellen den fluoreszierenden Liganden binden konnten.

3.1.4 Nachweis des Differenzierungspotentials der SCP-1-D2R80A

Des Weiteren wurde untersucht, ob es durch die Überexpression von D2R80A zu einer Beeinflussung des Stammzellcharakters der SCP-1 gekommen ist. Hierfür wurden die Zellen sowohl in die osteogene als auch in die adipogene Richtung differenziert.

Mittels Alizarin Rot-Färbung konnte gezeigt werden, dass bei den SCP-1-D2R80A ebenso wie bei den SCP-1-mock in Folge der osteogenen Stimulierung Kalzium abgelagert wurde (s. Abb. 9, A).

Aufgrund der adipogenen Stimulierung bildeten sich Fettvakuolen aus, die mittels einer Ölrot O-Färbung gefärbt wurden. Hier wurde ersichtlich, dass sich SCP-1-D2R80A-Zellen ähnlich zu den SCP-1-mock-Zellen verhalten (s. Abb. 9, B).

Sowohl bei der osteogenen als auch bei der adipogenen Stimulierung wurden zur Kontrolle außerdem Zellen (SCP-1-D2R80A und SCP-1-mock) ohne die entsprechenden Differenzierungszusätze behandelt. Hier konnten die Zellen nicht angefärbt werden.

Es erfolgten zwei unabhängige Versuchsreihen.

Durch die Überexpression des mutanten Dopaminrezeptors scheint es zu keiner Beeinflussung des Differenzierungspotentials der SCP-1 gekommen zu sein.

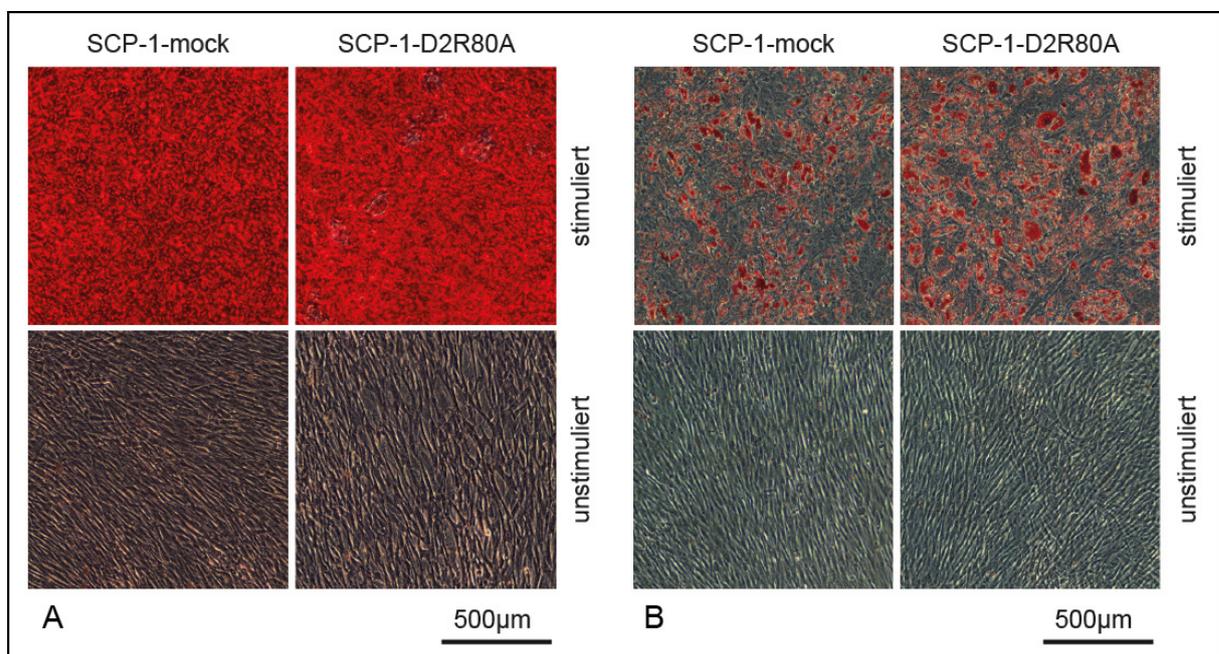


Abb. 9: Darstellung der osteogenen und adipogenen Differenzierung von SCP-1-D2R80A-Zellen im Vergleich zu SCP-1-mock-Zellen. Bei der Differenzierung der SCP-1-mock- und SCP-1-D2R80A-Zellen in die osteogene Richtung konnten über eine Alizarin Rot-Färbung Kalziumablagerungen dargestellt werden (**A**). Bei der Differenzierung der SCP-1-mock- und SCP-1-D2R80A-Zellen in die adipogene Richtung konnten mittels einer Ölrot O-Färbung Fettvakuolen visualisiert werden (**B**). Bei den unstimulierten genmodifizierten Zellen kam es zu keiner Anfärbung von Kalziumablagerungen bzw. Fettvakuolen.

3.1.5 Untersuchung des Wachstumsverhaltens der SCP-1-D2R80A

Mittels der Erstellung einer Wachstumskurve sollte überprüft werden, ob es durch die Expression von D2R80A zu einer Veränderung des Wachstumsverhaltens der SCP-1-D2R80A gekommen ist. Es zeigte sich hierbei ein langsames Wachstum von SCP-1-D2R80A gegenüber den Kontrollzellen (SCP-1-mock), wobei der Verlauf der Proliferation unbeeinflusst blieb. Das heißt es kam zunächst zu einem exponentiellen Wachstum der Zellen (Tag 0 bis 18) und einer anschließenden Plateauphase mit einem Proliferationsstillstand bzw. leichtem -rückgang (ab Tag 18), wie in Abb. 10 zu erkennen ist. Somit konnte auch hier bewiesen werden, dass durch die Genmodifikation die Proliferationsrate kaum verändert wird.

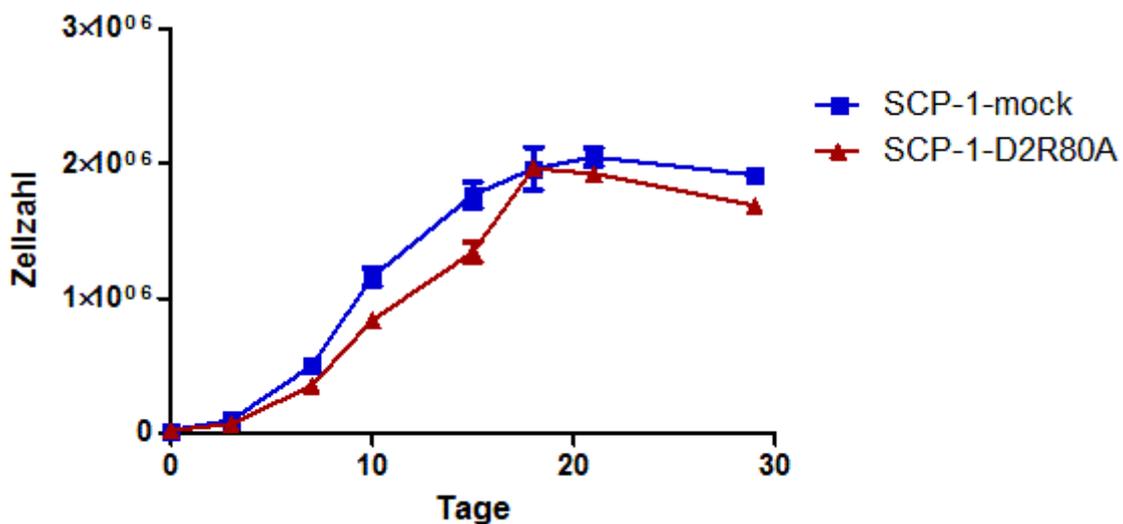


Abb. 10: Untersuchung des Wachstumsverhaltens von SCP-1-mock- im Vergleich zu SCP-1-D2R80A-Zellen. (n=2, r=3)

3.1.6 Untersuchung der Zellviabilität der SCP-1-D2R80A

Zudem sollte die Zellviabilität der genmodifizierten SCP-1 untersucht werden. Diese beschreibt den Anteil lebender Zellen in einer Zellpopulation und kann mittels eines WST-1-Tests beurteilt werden. Lebende Zellen können aufgrund ihrer intakten Atmungskette und dem mitochondrialen Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase-System das schwach rot gefärbte Tetrazoliumsalz WST-1 enzymatisch in das dunkelrote Formazan umsetzen. Photometrisch kann der Farbumschlag gemessen und analysiert werden. Dabei korreliert die Absorption direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen. Wie in Abb. 11 zu erkennen ist, ist die Zellviabilität bei den SCP-1-D2R80A nicht signifikant niedriger als bei den SCP-1-mock. Dies konnte mit zwei Zelldichten (ausgesäte Zelldichte: $0,6 \times 10^4$ und 3×10^3 Zellen pro Well)

bestätigt werden. Diese wurden ausgewählt, da der Test eine Detektionsgrenze aufweist. Bei zu großer Farbintensität sind die Messungen in Sättigung und können keine Unterschiede mehr detektieren.

Ein weiterer Test mit dem die Zellviabilität untersucht werden kann, ist der BrdU-Test. Hierbei wird Bromdesoxyuridin in die Zelle aufgenommen und anstelle des Nukleotids Desoxythymidintriphosphat in die DNA eingebaut. Dies geschieht während der S-Phase des Zellzyklus. Durch Hinzufügen eines gegen BrdU gerichteten Antikörpers, der mit einer Peroxidase gekoppelt ist, und einer anschließenden Substratreaktion kann nun mittels eines ELISA readers der entstandene Farbstoff photometrisch quantifiziert werden. Hierdurch kann die DNA-Synthese in den Zellen nachgewiesen und somit indirekt die Zellviabilität beurteilt werden. Die Zellzyklusprogression der SCP-1-D2R80A ist im Vergleich zu der Rate der SCP-1-mock nicht signifikant verlangsamt (Abb. 12).

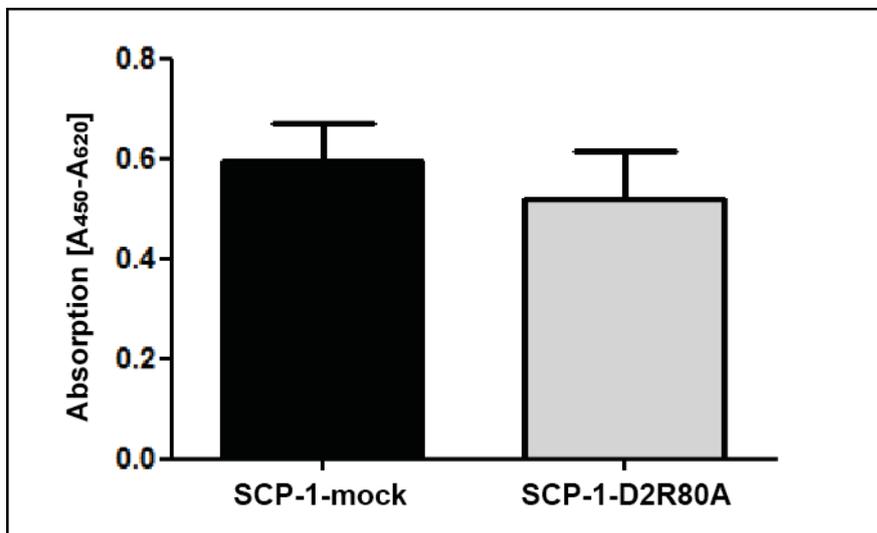


Abb. 11: Darstellung der Zellviabilität von SCP-1-mock- und SCP-1-D2R80A-Zellen mittels WST-1-Test. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (n=2; r=3).

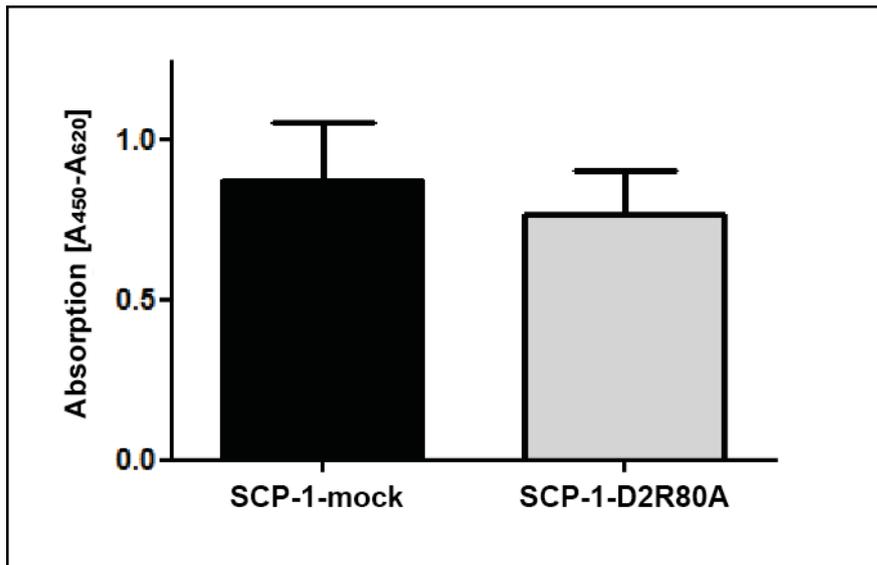


Abb. 12: Darstellung der Zellproliferation von SCP-1-mock- und SCP-1-D2R80A-Zellen mittels BrdU-Test. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (n=2; r=3).

3.1.7 Darstellung der SCP-1-D2R80A *in vivo*

Zur *in vivo*-Darstellung der D2R80A-überexprimierenden Zellen wurde ein Tierversuch mit athymen Nacktratten durchgeführt. Vor jedem Experiment wurde mittels eines Bindungstests mit dem Dopaminrezeptor D2 Rot Antagonist (s. 2.6 und 3.1.3) die Qualität der transgenen Zellen überprüft. Mindestens 90% der Zellen sollten den Liganden binden können.

Insgesamt wurden 10 Nacktratten untersucht. Dabei konnte bei 8 Tieren ein spezifisches Signal im Bereich der Injektionsstelle der SCP-1-D2R80A detektiert werden. Bei einem von den 10 Tieren konnte postoperativ aufgrund einer zu geringen Aufnahme des Tracers kein signifikantes Signal an der Injektionsstelle festgestellt werden. Das spezifische Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis war niedriger als 1,2 und das Bindungspotential des Dopaminrezeptors (BP) war niedriger als 0,5. Bei einem zweiten Tier kam es an Tag 1 zu einem technischen Problem bei den PET-Aufnahmen. Aufgrund dessen wurden die beiden genannten Tiere bei den folgenden Analysen nicht weiter berücksichtigt. Auf der kontralateralen Seite konnte im Bereich der Injektionsstelle der SCP-1-mock erwartungsgemäß nur ein Hintergrundsignal visualisiert werden. Die PET-Aufnahmen wurden dabei postoperativ, an Tag 1 und 7 durchgeführt. An Tag 7 konnte bei 6 von 8 Tieren ein signifikantes Signal an der Lokalisationsstelle der SCP-1-D2R80A veranschaulicht werden (Abb. 13). Zudem werden in Abb. 14 die Zeit-Aktivitätskurven der spezifischen Bindung von ¹⁸F-Fallyprid der SCP-1-D2R80A gegenüber der Kontrollzellen SCP-1-mock an der Lokalisationsstelle dargestellt. Hier ist an den Tagen 0,1 und 7 postoperativ ein spezifisches Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis über 1,2 erkennbar.

Wie in den Abbildungen zu erkennen ist, wurde durch die PET-Untersuchung der Tiere auch deren Skelett dargestellt. Diese Beobachtung beruht auf der Defluoridierung des Tracers ^{18}F -Fallyprid durch eine Nagetier-spezifische Dehalogenase. Das entstandene Fluorid wird in die stoffwechselaktiven Bereiche im Knochen eingebaut (Mille et al. 2012).

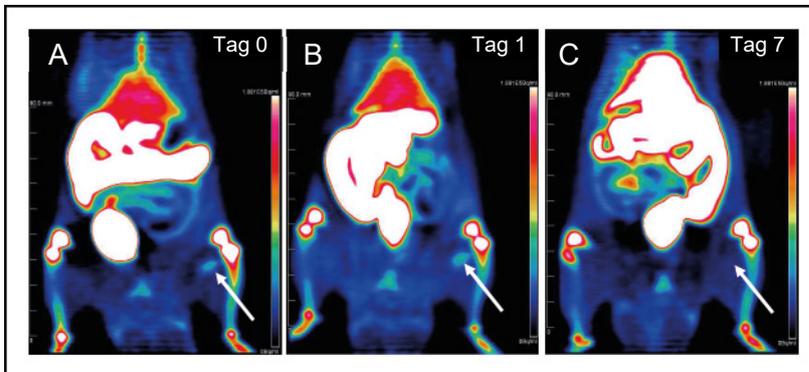


Abb. 13: *In vivo*-Zelltracking von SCP-1-D2R80A-Zellen mittels ^{18}F -Fallyprid und PET anhand eines repräsentativen Versuchstieres. Sowohl postoperativ (A) als auch am 1. (B) und 7. (C) postoperativen Tag konnte ein signifikantes Signal an der Lokalisationsstelle (Pfeil) der genmodifizierten Zellen veranschaulicht werden.

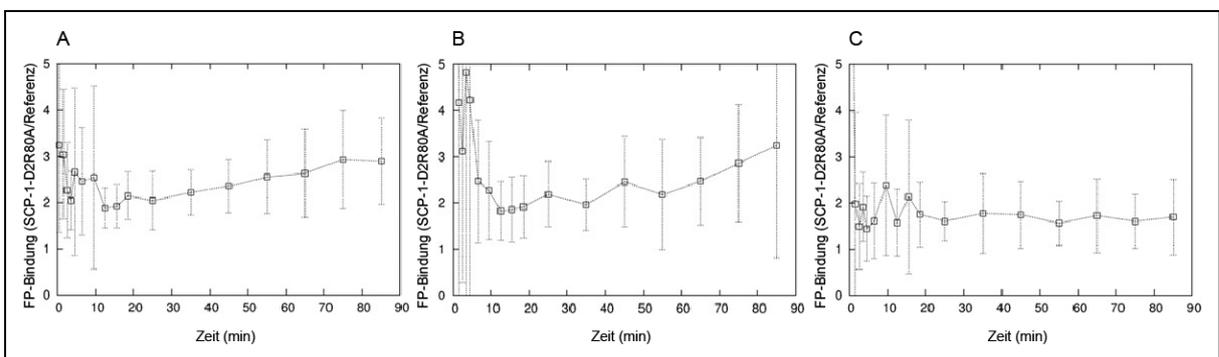


Abb. 14: Die Zeit-Aktivitätskurven zeigen die spezifische Bindung von ^{18}F -Fallyprid der SCP-1-D2R80A gegenüber den Kontrollzellen SCP-1-mock an Tag 0 (A), Tag 1 (B) und Tag 7 (C) postoperativ. Gezeigt werden die Mittelwerte mit der Standardabweichung von 8 Versuchstieren.

3.2 *In vitro*-Charakterisierung und *in vivo*-Zelltracking von SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP

Bei der *in vitro*-Charakterisierung der SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP wurden generell als Kontrollzellen neben den SCP-1-mock auch SCP-1 verwendet. Es gab bei den Ergebnissen keine Unterschiede zwischen den SCP-1-mock und den SCP-1. Da SCP-1-mock aufgrund der

zweifachen Virusbehandlung die korrekte Kontrolle ist, wurde auf die Darstellung von SCP-1 verzichtet.

Zudem wurden einige Versuchsreihen (RT-PCR, Westernblot, Differenzierungsverhalten, Wachstumsverhalten, *in vivo*-Versuche) sowohl mit den nicht vereinzelt Zellen SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP als auch mit den vereinzelt Zellen SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP (a2), - (a5) und -(d1) durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse mit den vereinzelt Zellen präsentiert.

3.2.1 Herstellen von Zelllinien

Es wurde wie in 2.2.6 beschrieben eine Zellvereinzeltung der SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP durchgeführt, um eine Zellkultur mit stabil transduzierten Zelllinien zu erhalten. Das rekombinante Enzym wird mit einem C-terminalen eGFP-tag exprimiert. Bei der Vereinzeltung von Zellklonen wurden die Zellen sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch mittels FACS untersucht, um den Grad der Expression der Δ 45-HSV1-TK-eGFP zu analysieren. Dadurch konnten stabil transduzierte Zelllinien generiert werden.

Um den Grad der Δ 45-HSV1-TK-eGFP-Expression in den SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP bestimmen zu können, wurde eine Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Bei den SCP-1-mock wurden die Einstellungen am Mikroskop so gewählt, dass kein Fluoreszenzsignal detektiert wurde. In Zusammenschau mit den Phasenkontrastaufnahmen stellte sich heraus, dass die ausgewählten Klone Δ 45-HSV1-TK-eGFP-tragender Zellen (SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP (a2, a5 und d1)) zu einem Großteil (ca. 90%) grün fluoreszieren. Dies lässt darauf schließen, dass die Zellen zu einem hohen Prozentsatz die Thymidinkinase exprimieren (Abb. 15).

Abschließend wurde der Prozentsatz des Δ 45-HSV1-TK-eGFP-Gehalts in den ausgewählten Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt.

Der Prozentsatz der Δ 45-HSV1-TK-eGFP-Expression belief sich dabei je nach untersuchtem Zellklon (a2, a5 und d1) zwischen 91,7% und 99,3% (Abb. 16). SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP (a2) ließ dabei mit 99,3% positiv fluoreszierenden Zellen das höchste Expressionslevel des transgenen Proteins erkennen.

Diese drei Zelllinien, die den höchsten Prozentsatz an fluoreszierenden Zellen aufweisen, wurden im Folgenden mittels RT-PCR und Westernblot auf ihre Expression hin untersucht. Außerdem wurde die Aktivität der Thymidinkinase in den drei Zelllinien in einem Ganciclovir-test verglichen.

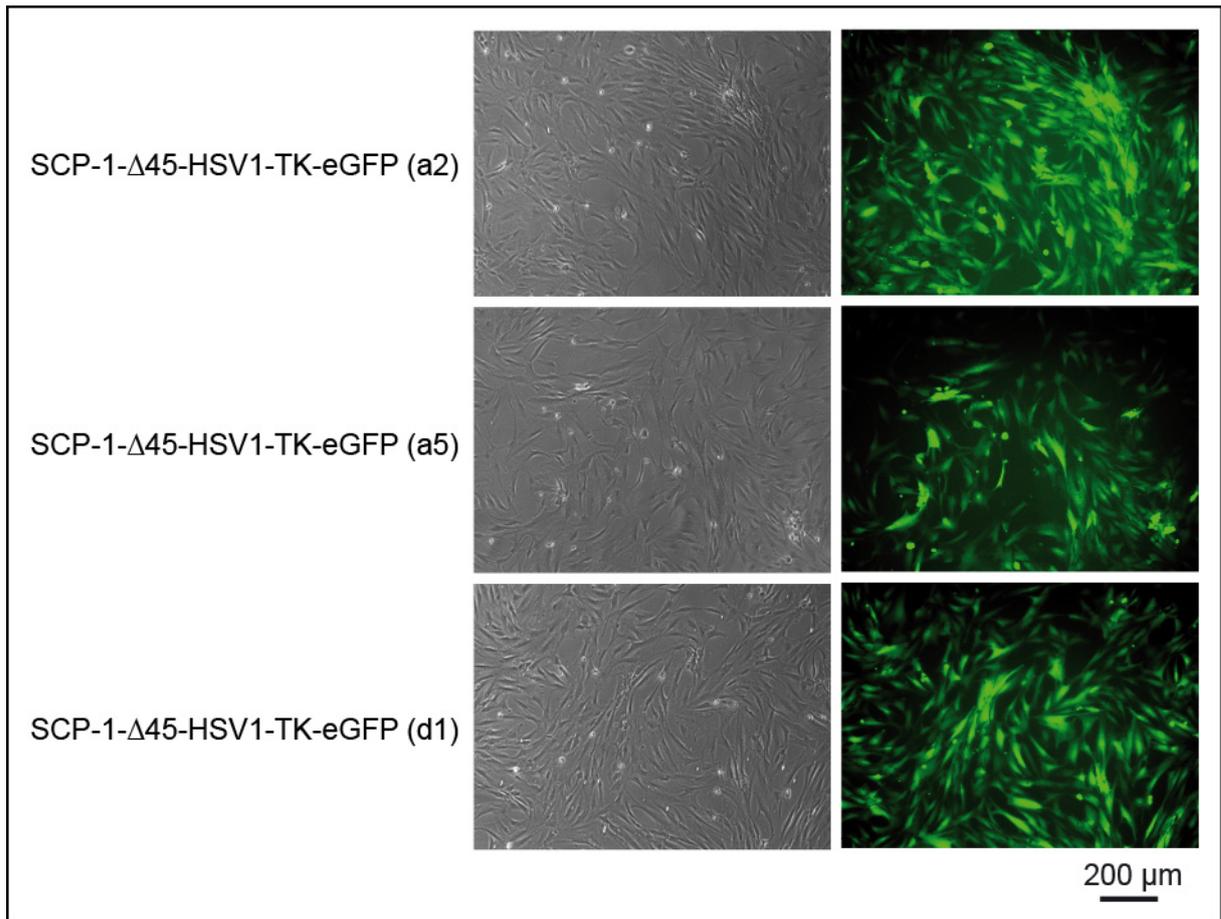


Abb. 15: Untersuchung der Expression der $\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP in immortalisierten humanen mesenchymalen Stammzellen nach Zellvereinzelnung. Darstellung der Zelllinien SCP-1- $\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP (a2), -(a5) und -(d1) mittels Phasenkontrastmikroskopie (linke Spalte) und Fluoreszenzmikroskopie (rechte Spalte).

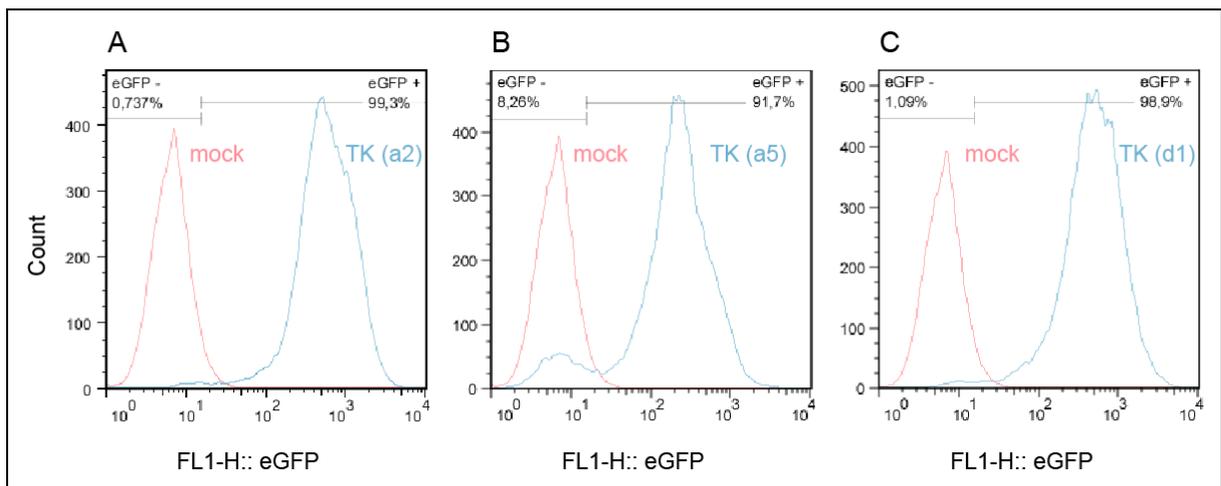


Abb. 16: Ergebnisse der FACS-Analyse der Zelllinien SCP-1- $\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP (a2) (A), -(a5) (B) und -(d1) (C).

3.2.2 Nachweis der Expression der $\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP auf mRNA-Ebene

Um die Expression der $\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP auf mRNA-Ebene spezifisch nachzuweisen, wurden die SCP-1- $\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP mittels RT-PCR analysiert. Das Auftreten einer Bande erwarteter Größe von 264 bp lässt auf die Überexpression von $\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP schließen. Die verwendeten Zelllinien SCP-1- $\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP (a2), -(a5) und -(d1) weisen alle drei eine starke Bande auf. Ein Unterschied im Expressionslevel der $\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP kann nicht ausgemacht werden. Wohingegen die Kontrollzellen (SCP-1-mock) erwartungsgemäß kein PCR-Produkt aufwiesen (Abb. 17). Die eingesetzte cDNA-Menge wurde über die Expression des Haushaltsgens GAPDH normiert (s. Abb. 17).

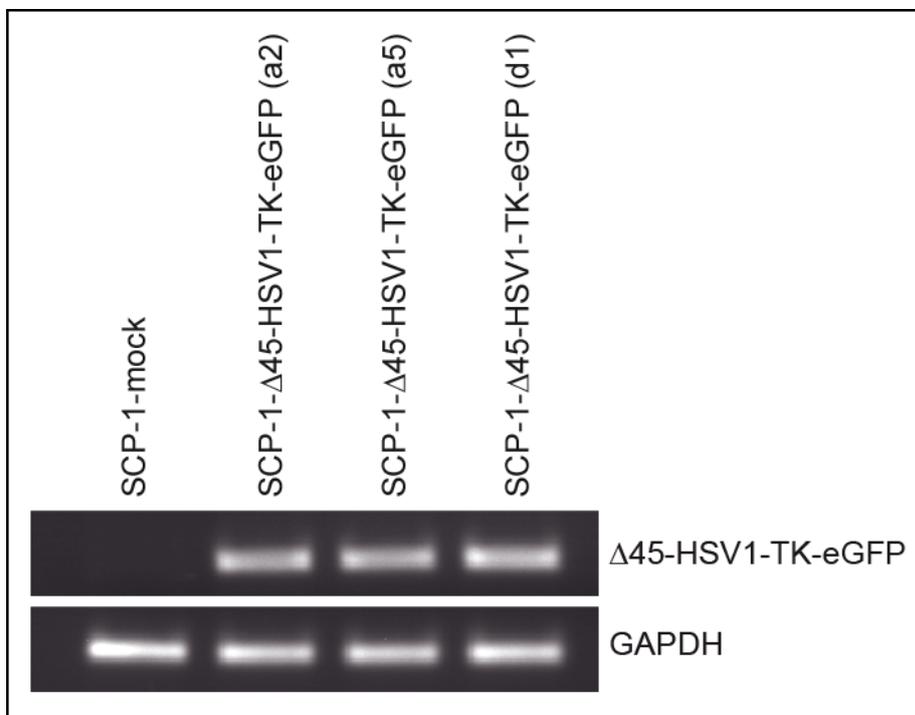


Abb. 17: Darstellung der Expression von $\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR. Gezeigt werden die drei Zellklone SCP-1- $\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP (a2), -(a5) und -(d1), welche alle drei eine starke Bande für die cDNA von $\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP in richtiger Größe aufweisen. Im Vergleich dazu ist eine Bande dieser Größe bei den SCP-1-mock nicht zu sehen.

3.2.3 Nachweis der Expression der $\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP auf Protein-Ebene

Der nächste Schritt war nun die Expression des Enzyms Thymidinkinase auf Proteinebene mittels Westernblot darzustellen. Das Enzym konnte in allen drei Zellklonen der SCP-1- $\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP (a2, a5, d1) durch das Auftreten einer Bande erwarteter Größe von 64 kDa

nachgewiesen werden. In den Kontrollzellen konnte kein Protein dieser Größe detektiert werden.

Außerdem konnte in allen Zelllinien das Protein Aktin (42 kDa) mit etwa gleicher Intensität detektiert (Abb. 18) und somit eine korrekte Ladekontrolle aufgezeigt werden.

Beim Vergleich der drei Zellklone fällt auf, dass die Bande bei SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP (a2) in Korrelation mit dem Expressionslevel von Aktin etwas stärker ausgeprägt ist als bei SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP (a5). Bei den SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP (d1) zeigt sich eine etwa gleiche Intensität der Bande wie bei SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP (a2). Dies lässt schlussfolgern, dass das Expressionslevel von Δ 45-HSV1-TK-eGFP auf Proteinebene bei SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP (a2) und -(d1) höher ist als bei den SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP (a5). Dies konnte auch mit der FACS-Analyse bestätigt werden.

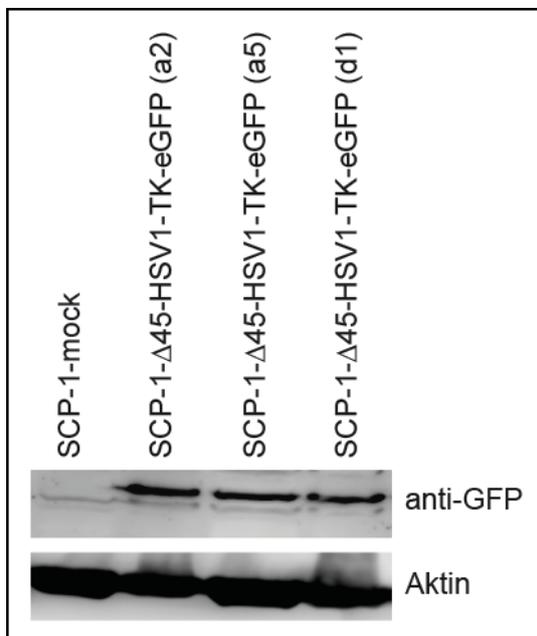


Abb. 18: Untersuchung der Expression von Δ 45-HSV1-TK-eGFP auf Proteinebene mittels Westernblot. Gezeigt werden die drei Zellklone SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP (a2), -(a5) und -(d1). Durch das Auftreten einer Bande in der richtigen Größe (64 kDa) konnte das Enzym Thymidinkinase in allen drei Zellklonen nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu konnte bei den SCP-1-mock diese Bande nicht dargestellt werden.

3.2.4 Nachweis der Aktivität der Δ 45-HSV1-TK-eGFP

Zudem wurde die Funktionalität der Thymidinkinase mit Hilfe eines Ganciclovirtests überprüft. Ganciclovir ist ein Analogon der Nukleinbase Guanin und wirkt durch einen Kettenabbruch zytotoxisch. Die vorhandene HSV1-Thymidinkinase aktiviert Ganciclovir durch Phosphorylierung, welches dann in die DNA eingebaut wird. Es kommt durch Kettenstrangbrüche der DNA zu einer Hemmung der Zellreplikation und die Zelle stirbt ab. Folglich sollte man bei

Anwendung von Ganciclovir einen Rückgang des Zellwachstums der SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP beobachten, wohingegen die Kontrollzellen (SCP-1-mock) keine Abnahme des Zellüberlebens zeigen sollten. Wie in Abb. 19 und 20 zu erkennen ist, konnte dies nach 10-tägiger Inkubation mit Ganciclovir bestätigt und dadurch die Funktionalität des Enzyms nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich eine Korrelation des Zellüberlebens mit der verwendeten Konzentration des toxischen Nukleosidanalogons, indem es bei zunehmender Konzentration des Ganciclovirs zu einem vermehrten Zelltod gekommen ist. In Tabelle 2 findet sich eine Gegenüberstellung des Zellüberlebens der SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP (a2), - (a5) und -(d1) in Abhängigkeit der verwendeten Ganciclovirkonzentration.

Wenn man die verschiedenen Zellklone (a2, a5 und d1) miteinander vergleicht, kann man bei SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP (a5) ein geringfügig schlechteres Ansprechen auf Ganciclovir, welches durch ein erhöhtes Zellüberleben erkennbar ist, feststellen. Dies lässt sich vermutlich auf das geringere Expressionslevel der Thymidinkinase im Vergleich zu SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP (a2) und -(d1) zurückführen. Die beiden zuletzt genannten Zelllinien verhalten sich bezüglich des Zellüberlebens nahezu identisch.

Da die Zelllinie a2 sowohl die höchsten Expressionslevel als auch folglich die höchste Enzymaktivität aufwies und in der FACS-Analyse im Vergleich zu d1 ein höheres Expressionslevel des transgenen Proteins zeigte, wurde für die Charakterisierung des Stammzellcharakters und die *in vivo*-Experimente diese Zelllinie verwendet.

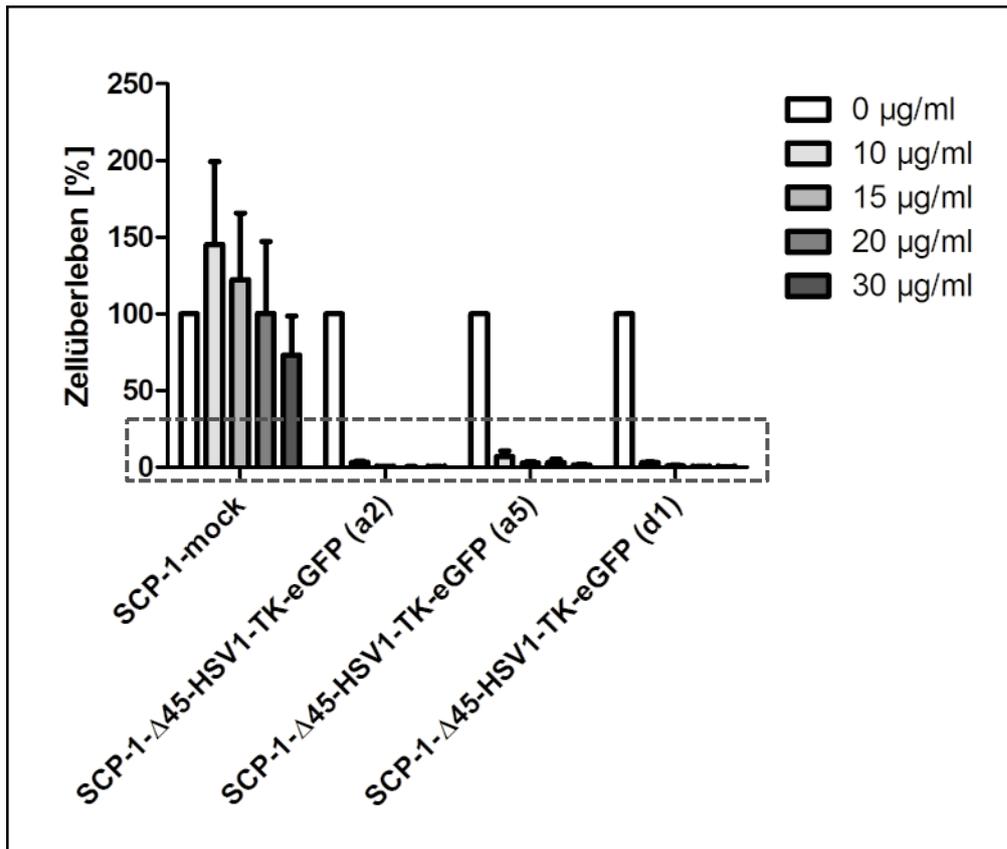


Abb. 19: Darstellung der Ergebnisse des Ganciclovirtests zur Überprüfung der Aktivität der $\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP. Durch den Rückgang des Zellüberlebens konnte die Funktionalität des Enzyms in den Zelllinien SCP-1- $\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP (a2), -(a5) und -(d1) nachgewiesen werden. Zudem ist eine Korrelation des Zellüberlebens mit der verwendeten Konzentration des Ganciclovirs zu erkennen. Im Vergleich dazu kam es bei den SCP-1-mock zu keinem Abnehmen des Zellüberlebens. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung ($n=1$; $r=2$). Markierter Bereich wird in Abb.20 vergrößert dargestellt.

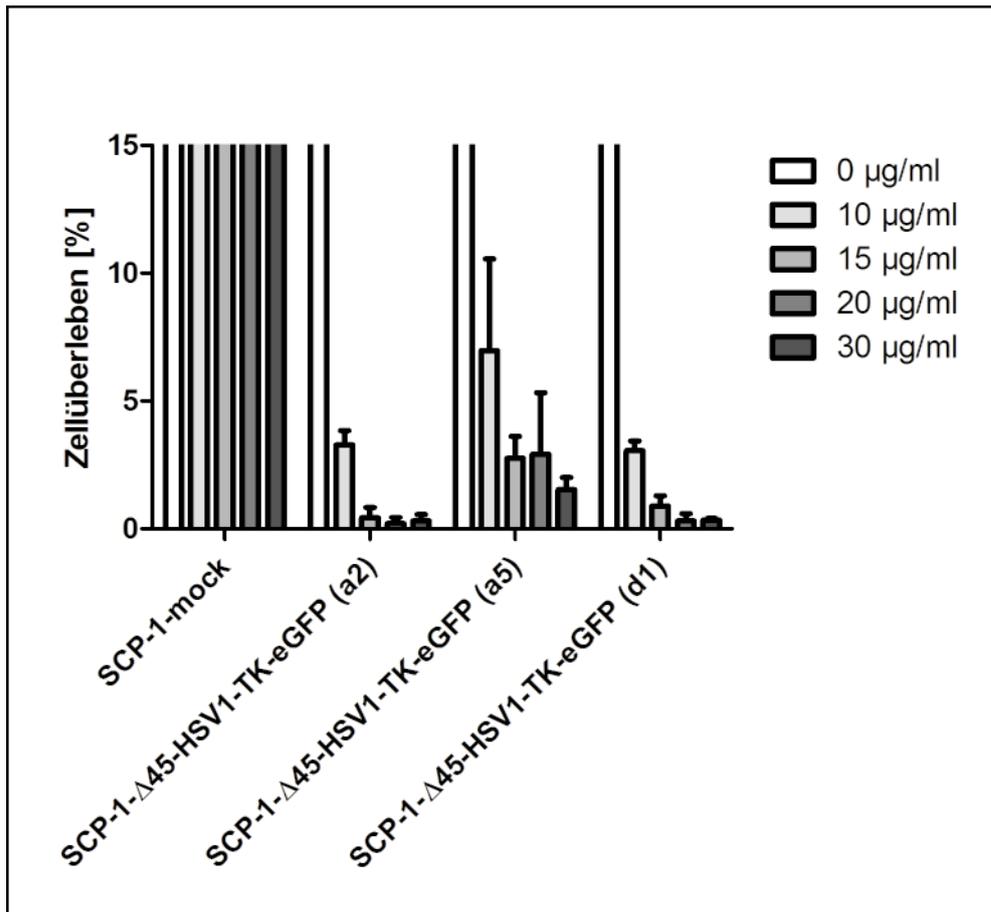


Abb. 20: Vergrößerte Darstellung des in Abb.19 markierten Bereichs.

	10 μg/ml	15 μg/ml	20 μg/ml	30 μg/ml
TK (a2)	3%	0,7%	0%	0,2%
TK (a5)	6%	2%	3%	1,6%
TK (d1)	3%	1%	0,1%	0,3%

Tab. 2: Darstellung des Zellüberlebens (in %) der SCP-1-Δ45-HSV1-TK-eGFP (a2), -(a5) und -(d1) in Abhängigkeit der verwendeten Ganciclovirkonzentration (obere Zeile)

3.2.5 Nachweis des Differenzierungspotentials der SCP-1-Δ45-HSV1-TK-eGFP

Die mit Δ45-HSV1-TK-eGFP transduzierten Stammzellen wurden in die osteogene und in die adipogene Richtung differenziert, um eine mögliche Beeinflussung des Stammzellcharakters durch die Genmodifikation feststellen zu können.

Durch eine Alizarin Rot-Färbung nach osteogener Stimulierung der Zellen konnte gezeigt werden, dass bei den SCP-1-Δ45-HSV1-TK-eGFP ebenso wie bei den SCP-1-mock Kalzium abgelagert wurde.

Zudem wurde über die Färbung von Fettvakuolen mittels einer Ölrot O-Lösung nach adipogener Stimulierung bestätigt, dass SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP und SCP-1-mock in ähnlichem Ausmaß dazu fähig sind, sich in die adipogene Richtung zu differenzieren.

Weiterhin wurde bei beiden Versuchsreihen kein Nachweis über Kalziumablagerungen bzw. über Fettvakuolen in den unstimulierten Zellen erbracht (Abb. 21).

Abschließend kann man sagen, dass durch die Transduktion der Stammzellcharakter der SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP hinsichtlich des Differenzierungspotentials erhalten blieb.

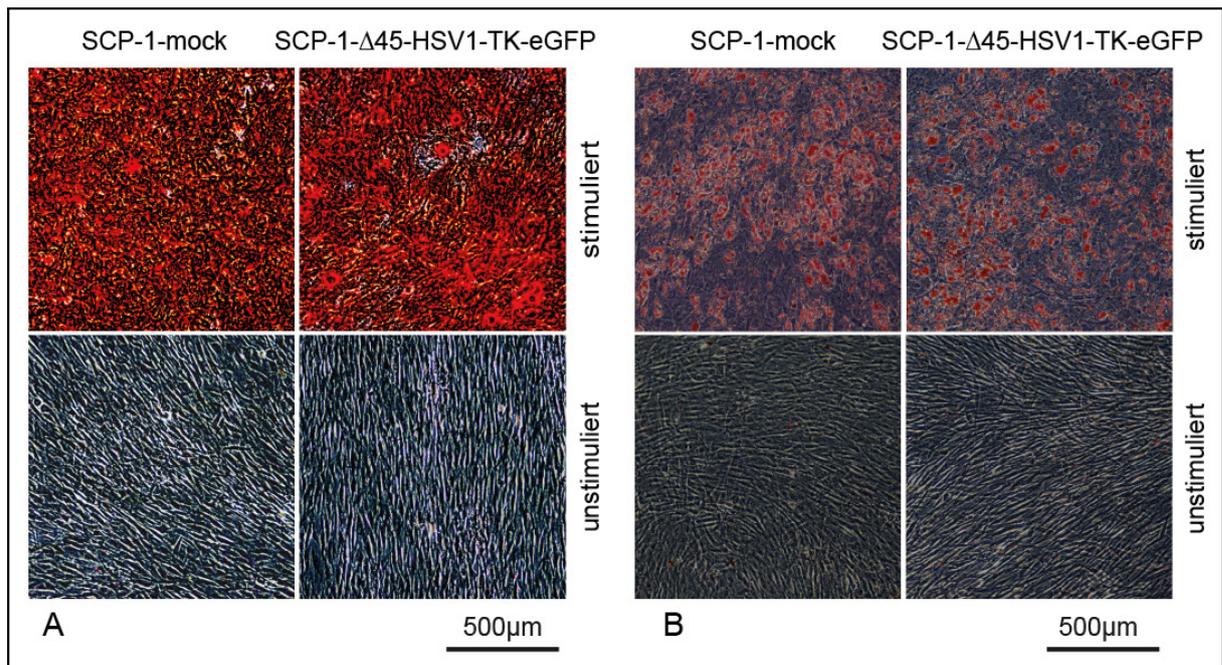


Abb. 21: Darstellung der osteogenen und adipogenen Differenzierung von SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP im Vergleich zu SCP-1-mock. Bei der Differenzierung der SCP-1-mock und SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP (a2) in die osteogene Richtung konnten über eine Alizarin Rot-Färbung Kalziumablagerungen dargestellt werden (**A**). Bei der Differenzierung der SCP-1-mock und SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP (a2) in die adipogene Richtung konnten mittels Ölrot O-Färbung Fettvakuolen visualisiert werden (**B**). Bei den unstimulierten genmodifizierten Zellen kam es zu keiner Anfärbung von Kalziumablagerungen bzw. Fettvakuolen.

3.2.6 Untersuchung des Wachstumsverhaltens der SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP

Eine weitere Methode um den Stammzellcharakter zu überprüfen, ist die Analyse des Wachstumsverhaltens von SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP gegenüber SCP-1-mock. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die Thymidinkinase-überexprimierenden Zellen etwas langsamer proliferieren als die SCP-1-mock. Der Verlauf der Wachstumskurve gestaltete sich jedoch ähnlich und beide Zelllinien erreichten nach circa 20 Tagen eine Plateauphase

(Abb. 22). Daraus lässt sich schließen, dass es durch die Expression der Thymidinkinase zu keiner Beeinflussung des Stammzellcharakters der SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP gekommen ist.

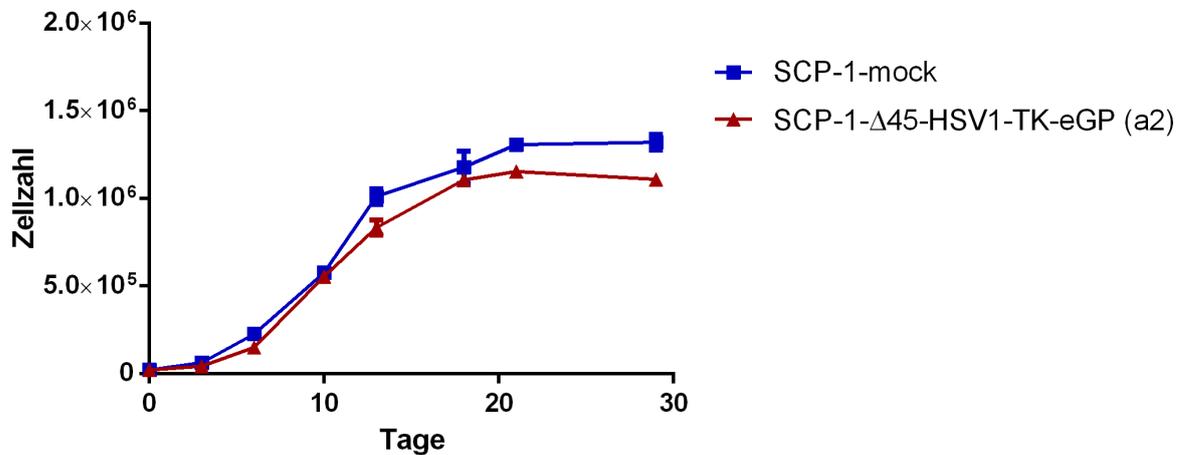


Abb. 22: Untersuchung des Wachstumsverhaltens von SCP-1-mock- im Vergleich zu SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP (a2)-Zellen (n=1; r=3).

3.2.7 Darstellung der SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP *in vivo*

Als nächstes wurden *in vivo*-Versuche mit athymen Nacktratten durchgeführt mit dem Ziel die applizierten Thymidinkinase-überexprimierenden SCP-1 mittels bildgebender Verfahren zu detektieren. Dabei wurden verschiedene Strategien verfolgt.

Beim ersten Versuchsaufbau wurde nach der intramedullären Injektion der Zellen und Verabreichung des radioaktiven Markers ¹⁸F-FHBG ein PET-Scan durchgeführt. Hier zeigte sich eine postoperative Akkumulation der applizierten Zellen.

Bei der zweiten Versuchsreihe wurden zwei athyme Nacktratten verwendet. Während der Narkose verstarb dabei ein Tier, so dass nur noch ein Tier zur Auswertung herangezogen werden konnte. In der Bildgebung mittels PET konnte eine Darstellung der injizierten Stammzellen postoperativ gezeigt werden. Die Verfolgung über einen längeren Zeitraum konnte jedoch nicht ausreichend belegt werden.

Als letztes wurden bei zwei Versuchstieren die genmodifizierten SCP-1 nach i.m.-Injektion mittels SPECT/CT und Applikation von ¹²³I-FIAU (via Schwanzvene) detektiert. Postoperativ konnte zunächst die *in vivo*-Verfolgung erfolgreich gezeigt werden. 13 Stunden und 8 Tage nach Operation war dies jedoch nicht mehr möglich (Abb. 23).



Abb. 23: Darstellung des *in vivo*-Zelltrackings von SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP mittels ^{123}I -FIAU und SPECT/CT anhand eines repräsentativen Versuchstieres. Direkt postoperativ konnten mittels dynamischer SPECT-Aufnahmen die injizierten SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP (a2) an der Lokalisationsstelle (Kreis) detektiert werden (**A**). Ebenso konnten 90 Minuten postoperativ mittels statischer Aufnahmen die Zellen am Injektionsort (Kreis) visualisiert werden (**B**). 13 Stunden postoperativ gelang keine erfolgreiche Detektion der Zellen (**C**). 8 Tage nach der Operation konnte ebenfalls kein Signal an der Injektionsstelle ausgemacht werden (**D**).

4 Diskussion

4.1 Auswahl des Imaging-Systems für Labeling von Stammzellen und *in vivo*-tracking im Knochen

Trotz ihrer Limitationen ist die autologe Knochentransplantation nach wie vor der Goldstandard bei der chirurgischen Therapie von Pseudarthrosen oder Frakturen, die mit einem kritischen Knochendefekt einhergehen (Breer et al. 2015, Biberthaler und van Griensven 2016). Zur Stimulierung der Frakturheilung gibt es aktuell verschiedene Forschungsansätze. Ein Verfahren ist die Applikation von mesenchymalen Stammzellen (MSCs), die durch Knochenmarkpunktion oder aus dem Markraum langer Röhrenknochen gewonnen werden und die dann nach direkter Applikation vor Ort im Sinne einer Transplantation in den Frakturspalt die Frakturheilung direkt stimulieren können. Die Zellen können mit oder ohne Kultivierung sowie mit oder ohne Matrix appliziert werden (Rosset et al. 2014). Um die Stammzelltherapie weiterentwickeln zu können, ist es notwendig, das Überleben, die Bioverteilung und das Anwachsen der Zellen *in vivo* nach Transplantation zu verstehen (Brader et al. 2013, Chamberlain et al. 2007). Ziel dieser Arbeit war es, eine geeignete Methode zu entwickeln, mit der die Zellen künftig *in vivo* bei Frakturheilungsstudien verfolgt werden können.

Generell stehen hierfür das direkte oder das indirekte System zur Verfügung. Unser Labor konnte in Kooperation mit Prof. Bartenstein beispielsweise durch die direkte Markierung der Stammzellen mit ^{111}In -Oxinat diese nicht-invasiv mittels SPECT/CT im Tiermodell über 48 Stunden darstellen (Gildehaus et al. 2011). Dieses Verfahren birgt jedoch einige Nachteile. So ist ein Markierungsverlust durch das Zerfallen der Radioaktivität und die Verteilung des Radiotracers auf die Tochterzellen zu verzeichnen. Somit ist keine Aussage über die Viabilität und Funktion der Zellen möglich. Folglich ist das direkte Zellmarkierungsverfahren nicht geeignet, Zellen über einen prolongierten Zeitraum, der für Frakturheilungsstudien relevant ist, zu verfolgen (Grimm et al. 2007, Gildehaus et al. 2011, Lucignani et al. 2011).

Um die Zellen über einen längeren Zeitraum *in vivo* verfolgen zu können, sollte in dieser Arbeit die indirekte Zellmarkierung mittels Reportergenen etabliert werden. Es wurde zum einen ein Rezeptorbasiertes-System (Dopamine Rezeptor D2) und zum anderen ein Enzymbasiertes System (HSV1-Thymidinkinase) gewählt. Bei stabiler Integration der Reportergene in das Genom der Zellen werden diese an die Tochterzellen weitergegeben, so dass es zu keinem Markierungsverlust kommt (Kircher et al. 2011). Die in dieser Arbeit verwendeten SCP-1 wurden mit Hilfe von Lentiviren genetisch modifiziert, da diese als Provirus in das Wirtsgenom integrieren und damit zu einer stabilen Langzeitexpression führen (Buchsacher und Wong-Staal 2000). Die Verwendung von Viren für Zell- und Gentherapien ist auf

Grund von möglichen Risiken umstritten. Auch die Lentiviren können bei der chromosomalen Integration sich in regulative oder kodierende Regionen des Wirtsgenoms einfügen und damit zur Insertionsmutagenese und im Fall von Proto-Oncogenen zu maligner Entartung der Zielzellen führen (Beard et al. 2007). Um das Risiko zu reduzieren, wurden die lentiviralen Vektoren intensiv untersucht und optimiert. Die selbst-inaktivierenden Lentiviren dritter Generation, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden bereits in mehreren klinischen Studien eingesetzt. Bei keiner Studie wurden negative Auswirkungen auf Grund der Verwendung von den Lentiviren berichtet. Im August 2017 wurde in den USA die erste Zelltherapie, tisagenlecleucel (Kymriah®), für die Behandlung einer B-Zell akuten lymphatischen Leukämie (r/r B-Zell ALL) zugelassen. Hierbei werden für die Transduktion der patienteneigenen, zytotoxischen T-Zellen Lentiviren verwendet (Ginn et al. 2018, Milone und O'Doherty 2018). Um die möglichen Gefahren der Viren zu vermeiden, wurden weitere Methoden zur gentechnischen Modifizierung von Zellen mit stabiler Integration des Zielgens in das Genom etabliert, wie z.B. das „Sleeping Beauty (SB) Transposon System“ und das „CRISPR/CAS9-System“. Das „SB Transposon System“, das 1997 designt wurde, besteht aus einem Transposon, das das Zielgen enthält, und einer Transposase, deren Sequenz auf einer sehr alten, inaktiven Transposase-Sequenz aus einem Fischgenom basiert (Ivics et al. 1997). Derzeit laufen klinische Studien zur Behandlung von CD19-positiven hämatologischen Tumoren, bei denen SB Vektoren zur Modifizierung von CAR T-Zellen verwendet werden (Kebriaei et al. 2017). Das CRISPR/Cas9-System, das auf dem adaptiven Immunsystem von Bakterien und Archaeen basiert, kann dazu verwendet werden Gene auszuschalten, zu mutieren oder einzuführen. Die Endonuclease Cas9 schneidet die DNA an der Stelle, die die an die DNA assoziierte Erkennungs-RNA vorgibt. Anschließend wird der DNA-Strangbruch von der Zelle wieder repariert (Jinek et al. 2012, Doudna und Charpentier 2014). Das System wurde auch bereits in mehreren klinischen Studien zur Therapie von HIV, Epstein-Barr-Virus und Muskeldystrophie Duchenne verwendet. Allerdings wurden hier jeweils Gene ausgeschaltet (La Russa und Qi 2015). Beide molekularbiologischen Methoden könnten in Zukunft auch für das in dieser Arbeit beschriebene Projekt verwendet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl HSV1-TK-überexprimierende Zellen als auch D2R80A-überexprimierende Zellen charakterisiert, da beide möglichen Systeme ihre Vor- und Nachteile haben. Von einer Thymidinkinase können viele Substratmoleküle phosphoryliert werden, wodurch das HSV1-TK-System hochsensitiv ist. Dagegen kann ein Dopaminrezeptormolekül nur einen radioaktiv markierten Liganden binden. Damit ist die Menge an Signalproduktion limitiert. Außerdem kann der Rezeptor durch die Bindung von nicht markierten, endogenen Liganden blockiert werden (Haralampieva et al. 2016). Die Thymidinkinase aus Säugern kann nicht die spezifisch entwickelten radioaktiven Sonden umsetzen, so dass es zu einem relativ niedrigen Hintergrundsignal in den nicht mit HSV1-TK transduzierten Zellen

kommt. Außerdem kann die HSV1-TK im Gegensatz zum D2R auch als Suizidgen für die Therapie von Krebszellen verwendet werden. Nachteil des HSV1-TK-Systems ist die mögliche Immunogenität der HSV1-TK und ihrer mutierten Varianten. Die nicht mutierte Variante des D2R gilt dagegen als nicht immunogen. Bei der Verwendung von nicht mutierten D2R können allerdings die radioaktiv markierten Liganden in den Zellen akkumulieren, die das endogene Gen exprimieren. Außerdem können durch die Bindung der Liganden an die humanen D2R Signaltransduktionen ausgelöst werden, die die Funktion der Zellen stören können (Herschman et al. 2000). Deshalb wurde in dieser Arbeit die im Codon 80 punktmutierte Form des D2R aus der Ratte verwendet. Bei dieser Variante des Rezeptors wird durch die Bindung des Liganden keine biologische Reaktion ausgelöst (Liang et al. 2001). Für klinische Anwendungen müsste der entsprechende humane D2R80A etabliert werden. Der Vollständigkeit halber ist auch zu erwähnen, dass die Tracer für das HSV1-TK-System im Gegensatz zu denen des D2R-Systems nicht die Blut-Hirn-Barriere überwinden können (Rodriguez-Porcel 2010, Yaghoubi et al. 2012).

Für beide Systeme stehen verschiedene Tracer zur Verfügung, die im PET oder im SPECT abgebildet werden können. Für das Dopaminrezeptor-System werden bereits spezifische PET-Liganden mit hoher Affinität in der Klinik routinemäßig angewendet (Haralampieva et al. 2016). Auch Substrate für die HSV1-TK wurden bereits in klinischen Studien eingesetzt (Eisenberg et al. 2014). Für das HSV1-Thymidinkinase-System ist auf Grund seiner hohen Affinität das Pyrimidinanalogon FIAU ein beliebtes Substrat. Allerdings hat es den Nachteil, dass es auch von den Thymidinkinasen aus Säugern umgesetzt wird. Dadurch kommt es zu einem hohen Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis (Rudin 2013). Um Toxizität ausschließen zu können, sollte die zu injizierende Radioaktivität möglichst gering gehalten werden (von der Haar et al. 2015). Durch die Etablierung von zwei verschiedenen genetisch modifizierten Zelllinien, können in diesem Projekt verschiedene Tracer getestet werden. Auch werden die Tracer in der Forschung immer weiter entwickelt (Mach und Luedtke 2018), so dass in Zukunft auch für dieses Projekt weitere, noch bessere Tracer zur Verfügung stehen könnten.

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, stehen für die Abbildung von den markierten Zellen verschiedene Techniken zur Verfügung. BLI und FLI können hier nicht verwendet werden, da sie nur eine geringe Eindringtiefe von bis zu 3 mm haben. Sie sind daher nur für die Verfolgung von Zellen in der Haut oder für endoskopische Detektion geeignet. Wir haben uns vor allem für PET und SPECT entschieden, da sie im Vergleich zu dem MRI hochsensitiv sind (von der Haar et al. 2015). Die hohe Sensitivität wird benötigt, da an der Stelle der Fraktur hMSCs zwar wichtig sind, aber nur sehr selten vorhanden. Insgesamt sind im Knochenmark nur 0,001%-0,01% der nuklearen Zellen hMSCs (Pittenger et al. 1999).

4.2 *In vitro*-Charakterisierung der Reporter-gen-überexprimierenden hMSCs

Die im Vorfeld dieser Arbeit hergestellten Zelllinien SCP1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP und SCP1-D2R80A wurden zunächst hinsichtlich Expression des Transgens und ihres Stammzellcharakters charakterisiert, um zu überprüfen, ob der Einbau des Transgens in die genomische DNA entscheidende biologische Prozesse zerstört hat.

In der gesamten Arbeit wurde auf die Darstellung der Ergebnisse von SCP-1 verzichtet, da die SCP-1-mock als korrekte Kontrolle anzusehen sind: Sie wurden wie die Reporter-gen-überexprimierenden SCP-1 zweifach mit Virus behandelt. In den Untersuchungsergebnissen wurden keine Unterschiede zwischen SCP-1 und SCP-1-mock gesehen.

4.2.1 *In vitro*-Charakterisierung der D2R80A-überexprimierenden hMSCs

Als Reportergensystem wurden D2R80A-überexprimierende Zellen hergestellt. Der Nachweis über die Expression des Rezeptors auf mRNA-Ebene konnte mit Hilfe der RT-PCR erbracht werden. Des Weiteren konnte per Immunfluoreszenz die Expression auf Proteinebene gezeigt werden. Am Zellrand wurde Fluoreszenzsignal detektiert. Dies deutet auf eine transmembrane Lokalisation des transgenen Dopamin 2-Rezeptors hin. Nur bei einem korrekten Einbau in die Membran kann der Rezeptor Liganden binden. Bei den Kontrollzellen wurde keine Expression des D2R80A nachgewiesen. Somit ist der D2R80A ein für humane mesenchymale Stammzellen geeignetes Reporterprotein.

Um die Aktivität des transgenen Rezeptors nachzuweisen, wurde in dieser Arbeit ein Bindungstest etabliert. Hierbei wurden die Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten Spiperonderivat inkubiert und der Prozentsatz an Zellen, die den Liganden gebunden haben, mit Hilfe eines FACS bestimmt. Über 90% der immortalisierten Stammzellen exprimieren den transmembranen Dopaminrezeptor in der aktiven Form. Dies liegt im Effizienzbereich (50-100%) lentiviraler Transduktionen (Lin et al. 2012, Warlich et al. 2010, Van Damme et al. 2006). Generell sind die besten Ergebnisse zu erwarten, wenn 100% der D2R80A-überexprimierenden Zellen das fluoreszenzmarkierte Spiperonderivat binden würden. Dies könnte durch eine Vereinzelung von Zellklonen, wie sie bei den SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP durchgeführt wurden, erreicht werden. Da die Zellen auch bei längerer Kultivierungsdauer (z.B. SCP-1-D2R/72 (+8)) zu ca. 90% den Rezeptor in aktiver Form exprimierten, wurde in dieser Arbeit aus Zeitgründen auf die Generierung einer Zelllinie verzichtet. Um eine gleichbleibende Qualität der Zellen garantieren zu können, wurde zur Kontrolle vor jedem *in vivo*-Experiment ein Expressionslevel des Rezeptors von mindestens 90% der SCP1-D2R80A mit Hilfe des Bindungsassays bestätigt. In der Nuklearmedizin konnte zusätzlich die Bindungsak-

tivität des D2R80A mit ^{18}F -Fallypride *in vitro* bestätigt werden. Dabei wurden die SCP1-D2R80A mit verschiedenen Konzentrationen an ^{18}F -Fallypride (5-120 MBq/ml Endkonzentration) inkubiert und nach Waschen wurde die gebundene Radioaktivität bestimmt. Bereits bei der Zugabe von 30 Bq/ml wurde eine maximale Bindeaktivität von 22 MBq/Zelle gemessen (Schönitzer et al. 2014).

Zur Charakterisierung der SCP1-D2R80A wurden die Proliferation, die Viabilität sowie das Differenzierungsverhalten untersucht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (SCP-1-mock) konnte ein etwas langsames Wachstum der SCP-1-D2R80A-Zellen festgestellt werden, wohingegen der Verlauf der Wachstumskurve unbeeinflusst blieb. Dieses Ergebnis konnte mit dem WST-1-Test und dem BrDU-Test bestätigt werden. Die SCP-1-D2R80A zeigten im Vergleich zu den SCP-1-mock eine nicht signifikant geringere Viabilität im WST-1-Test und eine nicht signifikant verlangsamte Proliferation im BrDU-Test. Da die Unterschiede jedoch statistisch nicht signifikant waren, weisen sie keine biologische Relevanz auf und können vernachlässigt werden. Aung et al. (2005) beobachteten ebenfalls ein etwas verlangsamtes Wachstum von D2R-überexprimierenden HeLa-Tet-On-Zellen. Die Beeinflussung könnte mit dem energetischen Aufwand für die Zellen, um das transgene Protein zu exprimieren und in die Membran einzubauen, zusammenhängen.

Bezüglich der Differenzierungskapazität in die osteogene und adipogene Richtung konnte gezeigt werden, dass sowohl bei SCP-1-mock- als auch bei SCP-1-D2R80A-Zellen Kalzium bzw. Fettvakuolen angefärbt werden konnten. Insgesamt lässt sich also sagen, dass der Stammzellcharakter bei den Dopamin 2-Rezeptor-überexprimierenden Zellen erhalten bleibt. Nach meinem Kenntnisstand sind bisher in der Literatur noch von keiner anderen Arbeitsgruppe D2R-überexprimierende, humane mesenchymale Stammzellen beschrieben worden.

4.2.2 *In vitro*-Charakterisierung der $\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP-überexprimierenden hMSCs

In der vorliegenden Arbeit wurde das Gen für die HSV1-TK ohne nukleares Signalpeptid als Fusionskonstrukt mit eGFP kloniert. Im Vorfeld zu dieser Arbeit hatte sich herausgestellt, dass eine Anhäufung der HSV1-TK-eGFP im Zellkern toxisch für die hMSCs war. Durch die Deletion des nuklearen Signallokalisationspeptids wurde das transgene Protein im Zytoplasma zurückgehalten und damit der Zelltod verhindert. In der Literatur ist beschrieben, dass es durch die Verhinderung der nuklearen Zytotoxizität zu keiner unspezifischen Inhibition der Expression der HSV1-TK kommt und damit die Expressionslevel der trunkierten HSV1-TK-eGFP höher sind als der Wildtyp-HSV1-TK-eGFP (Ponomarev et al. 2003). In Versuchen stellte sich bei fluoreszenzmikroskopischer Überprüfung heraus, dass die Anzahl

der fluoreszierenden SCP1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP mit zunehmender Kultivierungsdauer abnimmt, so dass die Vereinzelung von Zellklonen sinnvoll erschien. Das Ziel hiervon war, stabil transduzierte Zellen zu isolieren. Die FACS-Analyse der drei Zellklone, die unter dem Fluoreszenzmikroskop die höchste Fluoreszenzintensität und damit ein hohes Expressionslevel des transgenen Fusionsproteins aufwiesen, zeigte eine nahezu hundertprozentige Positivität bezüglich des Expressionslevels. Die SCP1-D2R80A sind dagegen im Liganden-Bindungs-Assay nur bis zu 90% der Zellen positiv. Bei diesem Test wird allerdings nicht die Expression, sondern die Bindungsaktivität des Rezeptors gemessen. In einer anderen Studie wurde ein lentiviraler Vektor, der für GFP unter Kontrolle des CMV-Promoters codiert, zur Transduktion von hMSCs verwendet. Dabei exprimierten ebenfalls etwa 100% der transduzierten Zellen GFP (Van Damme et al. 2006). Zusätzlich wurde die Expression des Enzyms Thymidinkinase auf mRNA- und Proteinebene mittels RT-PCR bzw. Westernblot nachgewiesen. Für die RT-PCR wurden dabei die Primer so gewählt, dass der Forward-Primer an einen Sequenzbereich der Thymidinkinase und der Reverse-Primer an einen Bereich der eGFP-Sequenz anlagern. Es wurde also nur mRNA, die für das volle Fusionsprotein codiert, nachgewiesen. Für die Detektion des Proteins im Westernblot wurde ein Antikörper gegen eGFP verwendet. Die Bandengröße von 64 kDa zeigt eindeutig die Expression des kompletten Fusionsproteins. Dabei weisen die Klone a2 und d1 die höchsten Expressionslevel auf. Die Zelllinien haben in der FACS-Analyse den höchsten Prozentansatz an fluoreszierenden Zellen (a2: 99,3% und d1: 98,9%) mit etwa gleicher Fluoreszenzintensität. Lee et al. (2009) hatten in ihrer Studie mit murinen multipotenten Zellen aus dem Fettgewebe nur eine 35%-Transfektionseffizienz des lentiviralen Vektors codierend für Luciferase mit mRFP und trunkeierte HSV1-TK, die sie ebenfalls über FACS-Analyse bestätigten. Auch die semiquantitative Auswertung der Intensität der Banden im Westernblot bestätigt dieses Ergebnis (a2: 1; d1: 0,95; a5: 0,72). Bei den SCP-1-mock wurde keine Expression von Δ 45-HSV1-TK-eGFP sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen. Dies zeigt, dass Δ 45-HSV1-TK-eGFP für hMSCs ein geeignetes Reporterprotein darstellt.

Zum Nachweis der Funktionalität des rekombinanten Enzyms wurde ein Ganciclovirtest durchgeführt. Es zeigte sich, dass unter Zugabe von Ganciclovir das Zellwachstum abhängig von der hinzugefügten Konzentration des Virostatikums abnahm. Dies beruht auf der Tatsache, dass Ganciclovir durch das Enzym Thymidinkinase phosphoryliert, aktiviert und in die DNA eingebaut wird (Rubsam et al. 1999). Eine Reduktion der Zellproliferation bestätigt in diesem Fall also das Vorliegen einer funktionstüchtigen Thymidinkinase. Außerdem waren zwischen den vereinzelt SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP Unterschiede bezüglich des Zellüberlebens erkennbar. So zeigten SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP (a5) im Vergleich zu SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP (a2) und -(d1) ein geringfügig schlechteres Ansprechen auf Ganciclovir. Dies lässt sich auf ein geringeres Expressionslevel der Thymidinkinase zurückführen. In

dieser Arbeit überlebten 3% der SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP (a2) und -(d1) eine Zugabe von 39 μ M Ganciclovir über 10 Tage. Bei gleicher Behandlung mit Ganciclovir proliferierten die SCP1-mock sogar. Die ungepickten SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP überlebten dieselben Bedingungen zu 32,4%. Durch die Generierung der Zelllinien wurden demnach die Reporterzellen um das 10-fache optimiert. Salomon et al. (1995) überexprimierten Δ 45-HSV1-TK in L-Zellen. Nach 4-tägiger Kultivierung der Zellen in Gegenwart von 40 μ M GCV überlebten auch nur unter 10% der Zellen. In einer anderen Studien (Li et al. 2013) wurden nach Zugabe von 40 μ M Ganciclovir über 3 Tage zu C6-Gliomazellen aus der Ratte, die Wildtyp-HSV1-TK bzw. eine punktmutierte Form der HSV1-TK überexprimieren, höhere Überlebensraten von 80% bzw. 40% der Zellen gemessen.

Da bei der lentiviralen Transduktion das Transgen ungezielt in das Genom integriert, wurde des Weiteren überprüft, ob der Stammzellcharakter der Thymidinkinase-überexprimierenden Zellen erhalten geblieben ist. Die SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP konnten wie die Kontrollzellen (SCP-1-mock) in die osteogene und adipogene Richtung stimuliert werden. Bei der Analyse des Wachstums über einen bestimmten Zeitraum zeigten sie jedoch ein etwas geringeres Wachstum als die Kontrollzellen. Beide Zelllinien sind allerdings nach 13-15 Tagen in die Plateauphase eingetreten. Ähnliches konnte auch bei den Dopamin 2-Rezeptor-überexprimierenden Zellen beobachtet werden. Es liegt die Vermutung nahe, dass das etwas geringere Wachstumsverhalten mit der Überexpression des Enzyms Δ 45-HSV1-TK-eGFP zu tun hat. Da die Expression des Enzyms energetisch aufwendig ist, ist es möglich, dass dadurch das Wachstumsverhalten geringfügig beeinflusst wird. Außerdem ist das Enzym Thymidinkinase zelltoxisch, weswegen eine Deletion des Zellsignals notwendig war. Ebenso könnte eine mögliche Zelltoxizität von eGFP eine Rolle spielen. In einigen Studien konnte diese sowohl belegt als auch widerlegt werden (Mak et al. 2007, Krestel et al. 2004, Liu et al. 1999).

Die Ergebnisse zusammenfassend ist ersichtlich, dass sowohl die SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP als auch die SCP-1-D2R80A ihren Stammzellcharakter behalten haben. Bei beiden Systemen wurden die Transgene anscheinend nicht in regulative Stellen integriert und damit keine relevanten, biologischen Prozesse zerstört. Die Unterschiede in Proliferation und Viabilität waren nicht statistisch signifikant und haben daher vermutlich keine biologische Relevanz. Über den für diese Arbeit wesentlichen Zeitraum exprimieren die Zellen konstitutiv das jeweilige Reporterprotein in funktioneller Form.

4.3 Nicht-invasive Abbildung von humanen mesenchymalen Stammzellen im muskuloskelettalen System

Für die *in vivo*-Darstellung wurden die Abbildungen sowohl der Thymidinkinase- als auch der Dopaminrezeptor-überexprimierenden hMSCs getestet. Beide Systeme wurden bereits in der Literatur für die nicht-invasive Abbildung und Verfolgung von Zellen erfolgreich, auch im Bereich des muskuloskelettalen Systems, angewendet (Roelants et al. 2008, Gildehaus et al. 2011, Lee et al. 2009, Yakushev et al. 2010, Schreckenberger et al. 2004). Jedoch gibt es noch keine Arbeiten, die sich mit der Frakturheilung unter Verwendung des Zelltrackings mit den Reportersystemen der Thymidininkinase oder des Dopaminrezeptors beschäftigen. Dies wäre das Ziel im Hinblick auf die Entwicklung neuartiger Therapiestrategien für die regenerative Medizin.

4.3.1 *In vivo*-Darstellung von D2R80A-überexprimierenden hMSCs

Für die *in vivo*-Detektion der genmodifizierten hMSC mittels PET wurde der Radiotracer ^{18}F -Fallyprid verwendet. Hier zeigte sich eine Darstellung des Skeletts der athymen Ratten. Dies beruht vermutlich auf der Defluoridierung des Tracers durch eine bei Nagetieren vorkommende Dehalogenase und den anschließenden Einbau des radioaktiv markierten Fluorids in den Knochen (Mille et al. 2012). Aufgrund dieser Tatsache und zur Etablierung der Methode wurden die Dopaminrezeptor-überexprimierenden Zellen in die Oberschenkelmuskulatur der Versuchstiere injiziert. Um die Problematik mit der Darstellung des Skeletts in Nagetieren durch den Radiotracer ^{18}F -Fallyprid zu beheben, könnte in Zukunft ein ^{11}C -gekoppelter Ligand verwendet werden (Gallezot et al. 2012, Zhang et al. 2008, Schreckenberger et al. 2004). Dies würde es ermöglichen, genmodifizierte humane mesenchymale Stammzellen auch im Knochen darstellen zu können. Andere weit verbreitete PET-Tracer zur Detektion von D2R-tragenden Zellen *in vivo* wären ^{124}I -Epideprid und ^{76}Br -Isoremoxiprid (England et al. 2016, de Paulis 2003). Der Tracer ^{18}F -Fallyprid wurde in dieser Arbeit dennoch verwendet, da man erwartete, dass das spezifische Signal stärker als das Hintergrundsignal ist.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo*-Experimenten konnte bei 8 von 10 Tieren ein signifikantes Signal im Bereich der Injektionsstelle der SCP-1-D2R80A-Zellen detektiert werden. Wie bereits in 3.1.7 erwähnt, wurden 2 Tiere bei der weiteren Analyse aufgrund eines technischen Problems beziehungsweise aufgrund eines zu geringen Traceruptakes nicht weiter berücksichtigt. Bei den verbliebenen 8 athymen Ratten konnte bei 6 Tieren am 7. postoperativen Tag noch ein Signal im Bereich der Injektionsstelle visualisiert werden. Bei 2 Versuchstieren konnte kein signifikantes Signal detektiert werden. Hierfür gibt es verschie-

dene Erklärungsansätze. Ein möglicher Grund könnte die Migration der Zellen vom Injektionsort in den Körper sein. Eine andere Erklärung wäre die Verwendung humaner Zellen in athymen Ratten. Diese weisen zwar ein herabreguliertes Immunsystem auf, sind jedoch nicht gänzlich immundefizient. Somit sind Immunreaktionen unter Verwendung humaner Stammzellen -wenn auch minimiert- möglich (Charles River (2019), <http://www.crriver.com/products-services/basic-research/find-a-model/rnu-rat>). Es wurde dennoch die athyme Nacktratte als Tierart herangezogen, da sich bereits einige Studien der Ratte als Tiermodell bedienen (Dupont et al. 2010, Schneiders et al. 2008). Zudem weisen diese Tiere eine hohe Reproduktionsrate und einige Ähnlichkeiten mit Prozessen im menschlichen Körper auf und stellen daher ein geeignetes Versuchstier dar. Des Weiteren konnte in einigen Studien die problemlose Verwendung von humanen mesenchymalen Stammzellen in Nagetieren demonstriert werden (Polzer et al. 2014, Polzer et al. 2012). Eine weitere Erklärung für den genannten Detektionsverlust der Zellen könnte die Studie von Terrovitis et al. (2010) liefern. Dieser beschrieb sowohl eine mögliche Beeinflussung von Reporter genen auf die PET-Quantifizierung als auch auf das kinetische Muster von Tracern *in vivo*. Dabei sei ein effektiver Traceruptake von verschiedenen Faktoren wie der Verfügbarkeit der zu detektierenden Zellen, der injizierten Tracerdosis und der regionalen Vaskularisierung des Gewebes abhängig. Aufgrund der guten Vaskularisierung des Muskelgewebes birgt dieses Gewebe optimale Voraussetzungen für das Zelltracking und wurde für die *in vivo*-Versuche in dieser Arbeit als Injektionsort der Zellen ausgewählt.

Eine weitere Limitation des D2R80A-Reportersystems stellt die unspezifische Radiotra-ceraufnahme in Harnblase und Leber der athymen Ratten dar. Somit bleibt die Verwendung der genmodifizierten Zellen für diese Bereiche außen vor. Wohingegen die Bindung des Radiotracers ^{18}F -Fallyprid im Gehirn gut untersucht ist und sich für die Visualisierung von mesenchymalen Stammzellen eignen würde (Schönitzer et al. 2014, Yakushev et al. 2010, Schreckenberger et al. 2004). Daher könnte das D2R80A-Reportersystem nicht nur für das muskuloskelettale System eine Rolle spielen.

Bei den beschriebenen *in vivo*-Untersuchungen wurde als Negativkontrolle am kontralateralen Oberschenkelmuskel die Injektion von SCP-1-mock durchgeführt. Hier konnte erwartungsgemäß lediglich ein Hintergrundsignal detektiert werden. Die Zeit-Aktivitätskurven und die kinetische Modellberechnung deuten auf eine spezifische Bindung des ^{18}F -Fallyprids hin. Generell konnten demnach die hMSC-D2R80A *in vivo* überleben und sind für eine Langzeit-Verfolgung von hMSC *in vivo* geeignet. In dieser Arbeit wurden ungefähr $2,4 \times 10^7$ Zellen injiziert. Bei optimalen Verhältnissen wurde ein Ziel-zu-Hintergrund-Verhältnis von ungefähr 3,5 bis 1 gemessen. Unter der Annahme, dass ein Ziel-zu-Hintergrund-Verhältnis von 1,2-1 ausreichend ist, um verlässlich ein Signal zu detektieren, kann unter der Berücksichtigung der Leistungseigenschaften des hier verwendeten Kamerasystems ein Detektionslimit von

etwa 5×10^5 Zellen vermutet werden (Chatziioannou et al. 1999, Schönitzer et al. 2014). Eine ähnliche Größenordnung wurde in anderen Studien mit genetisch markierten hMSC angegeben (Pei et al. 2012).

Als ein „proof of principle“ konnten wir SCP-1-D2R80A *in vivo* über einen längeren Zeitraum mit hoher Spezifität darstellen. Allerdings sind noch einige Optimierungen notwendig, um die hMSC über den gesamten Frakturheilungsprozess verfolgen zu können.

4.3.2 *In vivo*-Darstellung von $\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP-überexprimierenden hMSCs

Für die Etablierung der Abbildung der $\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP-überexprimierenden hMSCs *in vivo* wurden verschiedene Versuchsansätze getestet. Zunächst wurden bei athymen Nacktratten die Thymidinkinase-überexprimierenden Zellen intramedullär in die Tibia injiziert und anschließend ein PET-Scan nach Verabreichung von ^{18}F -FHBG über die Schwanzvene injiziert. Hier konnte direkt postoperativ die Akkumulation der Zellen am Injektionsort aufgezeigt werden. An den folgenden postoperativen PET-Untersuchungen gelang dies jedoch nicht mehr. Ebenso fiel auf, dass es zur Darstellung des Skeletts der athymen Ratten kam. Dies beruht vermutlich auf der Defluoridierung des Tracers durch eine bei Nagetieren vorkommende Dehalogenase (Mille et al. 2012). Dies könnte auch eine mögliche Ursache für die erfolglose Visualisierung der intramedullär injizierten Zellen sein, da durch die starke Markierung des Skeletts das Signal der Zellen überdeckt wird.

Im nächsten Schritt wurde eine Applikation der Zellen nicht nur intramedullär sondern auch intramuskulär durchgeführt. Damit sollte überprüft werden, ob die Anreicherung des radioaktiv markierten Fluorids das Signal der $\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP-überexprimierenden hMSCs überdeckt. Die Zellen für die intramedulläre Injektion wurden zudem vor Applikation markiert. Postoperativ verlief die Detektion mittels PET erfolgreich. Bei Zunahme des Beobachtungszeitraums konnte jedoch kein signifikantes Signal dargestellt werden.

Aus beiden Experimenten lässt sich also schlussfolgern, dass generell die HSV1-Thymidinkinase-überexprimierenden Zellen funktionell sind und mit der verwendeten, nicht-invasiven Methode dargestellt werden können. Mit zunehmendem Zeitintervall konnte man die verabreichten Zellen aber nicht mehr detektieren. Eine mögliche These wäre, dass die Zellen nicht am Injektionsort verbleiben, sondern in andere Bereiche des Körpers wandern. Dies könnte beispielsweise durch den Einsatz von Trägermaterialien wie Gele oder Keramik verhindert bzw. minimiert werden (Plumton et al. 2016, Drosse et al. 2008, Tuan et al. 2003, Bruder et al. 1998). Zudem sei zu erwähnen, dass für die ersten beiden Versuchsansätze nicht gepickte Zelllinien verwendet wurden. Es wäre also möglich, dass die Thymidinkinase-überexprimierenden Zellen mit zunehmender Zellteilung das Transgen verloren haben oder

dass in der Mischpopulation Zellen, die nicht das Transgen integriert hatten, schneller wuchsen (Kallifatidis et al. 2008).

Aus diesem Grund wurden im Verlauf Zelllinien generiert und diese in der letzten Versuchsreihe verwendet. Als radioaktiver Marker kam anstatt ^{18}F -FHBG ^{123}I -FIAU zum Tragen, da dieser in den *in vitro*-Bindungstests zu einer stärkeren Markierung der Zellen geführt hatte und das radioaktiv markierte Iod nicht im Skelett der Ratten angereichert wird. Aufgrund des Tracerwechsels wurde die Bildgebung mittels SPECT/CT durchgeführt. Auch in diesem Versuch konnten die injizierten hMSC direkt nach der Operation dargestellt werden. Sowohl nach 13 Stunden als auch nach 8 Tagen postoperativ konnte allerdings kein signifikantes Signal mehr detektiert werden. Es findet sich allerdings eine unspezifische Anreicherung des Tracers ^{123}I -FIAU in der Harnblase, der Schilddrüse und dem Gastrointestinaltrakt. Dies limitiert die Untersuchung der genannten Bereiche mit diesem Zelltrackingverfahren. Zudem wurde die SPECT/CT-Bildgebung der Humanmedizin verwendet und zeigt im Vergleich zum eigens für Tiere entwickelten PET eine schlechtere Auflösung (Ruggiero et al. 2012, Gambhir et al. 2000). Eine eigens für Tiere konzipierte SPECT/CT stand jedoch nicht zur Verfügung. Nachteile der bildgebenden Methoden SPECT und PET im Vergleich zur MRT sind jedoch die geringere Orts- und Zeitauflösung (Alfke et al. 2001). Um die Vorteile der Tier-Positronenemissionstomographie für eine Darstellung von hMSC im Knochen nutzen zu können, müssten aufgrund der in Nagetieren vorkommenden Dehalogenase andere Radiotracer als ^{18}F -FHBG verwendet werden. So könnten beispielsweise ^{74}Br -FBAU (Cho et al. 2005), ^{14}C -FIAU (Min et al. 2003) oder ^{131}I -FIAU (Zhang et al. 2012) als PET-Radiotracer eingesetzt werden. Allgemein weisen jedoch die nuklearmedizinischen bildgebenden Verfahren (PET, SPECT) eine höhere Sensitivität auf als das MRT oder optische bildgebende Verfahren (Kircher et al. 2011). Daher stellen sowohl PET als auch SPECT eine geeignete Bildgebung für das Zelltracking dar. So gelang es beispielsweise Gildehaus et al. (2011) humane mesenchymale Stammzellen nicht-invasiv mittels direkter Zellmarkierung über das auch in dieser Arbeit verwendete SPECT/CT *in vivo* über einen Zeitraum von 48 Stunden zu detektieren.

Auch Lee et al. (2009) beobachteten, dass das anfänglich detektierte Signal der applizierten Zellen rasch abfällt. Im Gegensatz zu unserer Studie wurden die Luciferase und HSV1-TK-überexprimierenden Zellen systemisch injiziert und konnten anfänglich in der Lunge und nach wenigen Tagen an der Frakturstelle abgebildet werden. Sie schlugen vor, dass die Zellen absterben, es zur Immunreaktionen kommt oder die Reportergene nach Differenzierung stillgelegt werden. Bezüglich der Zellsterblichkeit könnte auch die verwendete radioaktive Dosis eine Rolle spielen und müsste gegebenenfalls optimiert werden. Die radioaktive Dosis, die für einen einzigen Scan angewendet wurde, betrug ca. 40 MBq. Die Ganzkörperdosis für

eine Ratte kann abhängig von der biologischen Halbwertszeit des Radiotracers zwischen 1 cGy und 27 cGy liegen (Funk et al. 2004).

4.4 Ausblick und Fazit

Letztendliches Ziel der hier etablierten Reportgensysteme ist es, die positive Auswirkung von humanen mesenchymalen Stammzellen auf die Knochenneubildung im Rahmen von Frakturheilungsstudien genauer zu beleuchten. Die Mehrheit der Studien in der Stammzelltherapie war bisher erfolgreich bei der Untersuchung der myokardialen oder neuronalen Regeneration nach Verletzung oder Ischämie mittels nuklearen Abbildungsmethoden oder MRI (Lee et al. 2009, Perin et al. 2011).

Bei allen eingesetzten Radiotracern hatten wir mit der Hintergrundaktivität und der Einlagerung des abgespaltenen, radioaktiv markierten Fluorids in den Knochen, die zwangsläufig bei der nuklearen Abbildung nach der Injektion von Radionukliden oder Radioliganden auftritt, zu kämpfen. Eine normale physiologische Verteilung der Radioliganden verhindert den Nachweis der Reporter-gen-überexprimierenden Zellen. Neben der bereits erwähnten Verwendung alternativer Radiotracer, besteht im Allgemeinen auch die Möglichkeit Zelllinien zu generieren, die mehrere Reportergene exprimieren (Hwang et al. 2007).

Für eine künftige klinische Anwendung ist eine hohe Sensitivität und keine Immunogenität gegen den Menschen notwendig, um das Schicksal und physiologische Veränderungen wie z.B. Proliferation und Differenzierung der applizierten Stammzellen verfolgen zu können. HSV1-Thymidinkinase könnte nicht nur als diagnostisches, sondern auch als therapeutisches Suizidgen verwendet werden (Hwang et al. 2007, Alaei et al. 2014, Leten et al. 2014, Hung et al. 2005). Auch in dieser Hinsicht wäre die Etablierung eines dualen Reportergensystems bestehend aus dem Dopaminrezeptor und der Thymidinkinase interessant.

Entscheidend bei der Generierung von Transgen-überexprimierenden Zellen ist auch die Wahl eines geeigneten Promoters. Neben der Menge an Protein, ist auch entscheidend, dass die Proteinexpression auch während der Differenzierung der hMSC erhalten bleibt. Im Vergleich zu dem in dieser Arbeit verwendeten CMV-Promoter scheinen verschiedene Arbeitsgruppen mit dem EF1 α -Promoter eine stärkere Expression des Transgens zu erzielen (Wolfs et al. 2014). Zudem zeigten mehrere Studien, dass der CMV-Promoter mit der Zeit inaktiviert wird. Grund hierfür ist teilweise die Methylierung von CpG-Inseln in der viralen Promotersequenz, die auch während der Differenzierung der MSC auftreten kann (Brooks et al. 2004, Corn et al. 2013, Mitsui et al. 2009, Herbst et al. 2012). So beobachteten Haralampeva et al. (2016) beispielsweise, dass die unter Kontrolle des CMV-Promoters stehende

hD2R-Expression bei genetisch modifizierten Muskelvorläuferzellen auf Proteinebene, aber nicht auf mRNA-Ebene während der Differenzierung zu Myofasern abnimmt.

Corn et al. (2013) verwendete Luciferase unter der Kontrolle von dem Kollagen type 1 (Col1 α 1)-Promoter, um die osteogene Differenzierung von MSCs in einem murinen Knochendefektmodell mit für die Knochenheilung kritischer Größe abzubilden. Bei dieser Studie wurde ein Hydrogel mit Alginat verwendet, um die hMSC an der Defektstelle zurückzuhalten. Die Biolumineszenz kann jedoch nur begrenzt eingesetzt werden, da eine Detektion von Zellen in tieferen Schichten erschwert ist. Daher ist eine Anwendung im Großtiermodell im Gegensatz zu den in dieser Arbeit verwendeten Reportergensystemen limitiert. Bei der Verwendung eines durch osteogene Differenzierung angeschalteten Promoters, kann allerdings nicht die Rolle der MSC bei der Rekrutierung von anderen Zellen untersucht werden.

Auch in der vorliegenden Studie könnten durch die Verwendung von Trägermaterialien wie Gele oder Keramiken die applizierten Zellen am Injektionsort gehalten werden und damit über einen längeren Zeitraum als sieben Tage verfolgt werden. Es gibt mehrere Studien, die belegen, dass MSC bei der Frakturheilung eine Rolle spielen (Kon et al. 2000, Frasca et al. 2017). Eine Langzeit-Verfolgung von in Knochendefektmodellen applizierten hMSCs für die Untersuchung ihrer Rolle als osteogen differenzierende oder als signalisierende Zellen mittels nicht-invasiven, radioaktiven Methoden wurde, soweit es mir bekannt ist, noch nicht berichtet.

Eine weitere Optimierung der Darstellung der hier etablierten Thymidinkinase-überexprimierenden hMSC ist besonders interessant, da Chen et al. (2004) zeigte, dass transmembrane Rezeptoren wie der Dopaminrezeptor D2R intrazellulären Enzymen oder Transportern aufgrund fehlender intrazellulärer Akkumulation des Tracers unterlegen seien. Zusammenfassend haben MSC ein großes Potential für die Therapie von schwer heilenden Knochenbrüchen aufgrund ihrer guten Proliferationsfähigkeit und ihrer osteogenen Differenzierungskapazität. Um neue Stammzell-basierte Therapien zu entwickeln, wird eine Langzeitverfolgung der hMSC *in vivo*, die auch erlaubt die Differenzierung von hMSCs zu Osteoblasten, zu verfolgen, benötigt. Die Reportergentechnologie ist hierfür eine geeignete Methode. Aus den Daten dieser Arbeit lässt sich schließen, dass die etablierten SCP-1-D2R80A vielversprechend sind, um hMSC *in vivo* zu lokalisieren: Allerdings gibt es noch einige Limitationen, die Zellen zu späteren für die Frakturheilung relevanten Zeitpunkten zu verfolgen.

5 Zusammenfassung

Zielsetzung und Fragestellung:

Die Behandlung knöcherner Substanzverluste, bedingt durch unterschiedliche Ursachen, stellt ein großes, klinisches Problem dar. Die derzeitigen Behandlungsmethoden, beispielsweise die autologe Knochentransplantation, stoßen aufgrund der großen Belastung für den Patienten immer wieder an ihre Grenzen. Vor diesem Hintergrund wird ersichtlich, wie wichtig es ist, neuartige Therapieverfahren zu erforschen. Eine Möglichkeit ist der Stammzellbasierte Therapieansatz. Jedoch ist immer noch wenig über die zugrundeliegenden Mechanismen und das Schicksal der transplantierten Zellen bekannt. Hierbei spielt das indirekte Zelltracking eine große Rolle, d.h. gentechnisch modifizierte Zellen werden implantiert und deren Akkumulation im Langzeitverlauf mit Hilfe hochsensitiver Bildgebung dargestellt. Diese Methode basiert auf dem Prinzip von Reportersystemen wie zum Beispiel dem Dopaminrezeptor D2 an dessen Liganden ein Radionuklid gekoppelt und mit nuklearmedizinischen Verfahren (PET/SPECT) dargestellt werden kann. Als weitere Möglichkeit zur nicht-invasiven Detektion ist das Thymidinkinase-reportersystem von implantierten Zellen zu nennen. Ziel dieser Arbeit war es Dopaminrezeptor D2- bzw. Thymidinkinase-überexprimierende humane mesenchymale Stammzellen (hMSC), die bereits im Vorfeld im Labor hergestellt wurden, zu charakterisieren und ihre *in vivo*-Abbildung zu etablieren.

Methoden:

Vor Beginn dieser Arbeit wurden durch lentiviralen Gentransfer hTERT immortalisierte hMSC (SCP-1), die eine Mutante des Dopaminrezeptors D2 (D2R80A) bzw. eine Mutante der eGFP getaggten Thymidinkinase ($\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP) konstitutiv überexprimieren, hergestellt.

Die Expression von D2R80A wurde mittels RT-PCR auf mRNA-Ebene bestätigt. Die Lokalisation des transmembranen Proteins wurde mittels Immunfluoreszenz untersucht. Die Viabilität der SCP-1-D2R80A wurde mittels WST-1-Test und BrdU-Test überprüft. Zudem wurde die Wachstumsrate bestimmt. Zur Untersuchung des Stammzellcharakters wurden die modifizierten Zellen in die osteogene sowie in die adipogene Richtung stimuliert. *In vitro*-spezifische Bindung eines fluoreszenzmarkierten Spiperonderivats wurde mittels FACS bestimmt.

Anschließend wurden die SCP-1-D2R80A in die Oberschenkelmuskulatur von Nacktratten transplantiert und mittels PET nach Injektion von ^{18}F -Fallyprid abgebildet.

Zur Generierung einer stabilen Zelllinie wurden die SCP-1- $\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP zuerst vereinzelt. Im Anschluss erfolgte der Nachweis der Expression des Enzyms Thymidinkinase auf mRNA- und Proteinebene durch die Durchführung einer RT-PCR und eines Westernblots.

Die Funktionalität des Proteins wurde mit Hilfe eines Ganciclovirtests untersucht. Der mögliche Einfluss der gentechnischen Modifikation auf den ursprünglichen Stammzellcharakter wurde mittels Wachstumskurve und Differenzierungsverhalten dargestellt. Darauf folgten die *in vivo*-Versuche zur Detektion der in den Tibiamarkraum bzw. in die Oberschenkelmuskulatur injizierten Zellen mittels PET bzw. SPECT/CT.

Ergebnisse:

Die SCP-1-D2R80A sowie SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP zeigten eine Langzeitüberexpression des jeweiligen transgenen Produkts. Das Fluoreszenzsignal deutet auf eine Lokalisation des D2R80A in der Membran hin. Beide Zelllinien erhielten ihren Stammzellcharakter, wie durch ihre osteogene und adipogene Differenzierungskapazität und ihr Proliferationsverhalten gezeigt wurde. *In vitro* konnten mindestens 90% der SCP-1-D2R80A spezifisch ein fluoreszenzmarkiertes Spiperonderivat binden. Die Aktivität der Δ 45-HSV1-TK-eGFP wurde mittels eines sogenannten GCV-Tests gezeigt.

Zudem konnte gezeigt werden, dass das D2R80A-Reportergensystem eine geeignete Methode ist, applizierte Zellen *in vivo* mittels PET und dem Radionuklid ^{18}F -Fallyprid über 7 Tage zu verfolgen. Die Detektion der intramedullär bzw. intramuskulär injizierten Thymidinkinase-überexprimierenden Stammzellen mit Hilfe PET bzw. SPECT/CT und dem radioaktiven Marker ^{18}F -FHBG bzw. ^{123}I -FIAU konnte allerdings nur postoperativ demonstriert werden. Eine Visualisierung über einen längeren Zeitraum konnte noch nicht erfolgreich dargestellt werden.

Schlussfolgerung:

Durch die Charakterisierung der Reportergen-tragenden humanen mesenchymalen Stammzellen konnte eine Beeinflussung des Stammzellcharakters durch die Genmodifikation ausgeschlossen werden. Zudem konnte die Expression, Aktivität, Funktionalität und Viabilität der immortalisierten Stammzellen erfolgreich dargelegt werden. Des Weiteren ist es gelungen das Verhalten von Zellen *in vivo* mittels Reportergensystemen und molekularer Bildgebung zu dokumentieren. Das Dopaminrezeptor-Reportergensystem erscheint hierbei als potente Methode humane mesenchymale Stammzellen über einen prolongierten Zeitraum zu verfolgen. Wohingegen beim HSV1-Thymidinkinase-Reportergensystem noch weitere Versuche notwendig sind, um eine optimale Darstellung der Zellen *in vivo* zu ermöglichen.

Abstract

Background:

The therapy of osseous loss is a great clinical problem. The current opportunities like the autologous bone transplantation are limited because of the huge stress for the patient. By reason of this it is clear that other treatments are necessary. However not all mechanism and the fate of the transplanted cells are known one strategy is the cell-based therapy. In this connection the indirect cell tracking plays an important role. Therefore genetically modified cells were transplanted and visualized by sensitive imaging methods over a prolonged time period. This approach is based on the reporter gene system like the dopamine receptor D2 on whose ligand is linked a radionuclide and thus makes it possible to detect it with techniques like PET or SPECT. Another facility for non-invasive monitoring of implanted cells is the thymidinkinase reporter gene system. The aim of this thesis was to characterize human mesenchymal stem cells which overexpress the dopamine receptor D2 or the enzyme thymidinkinase and to establish their *in vivo* detection.

Methods:

In the forefront of this thesis hTERT immortalized human mesenchymal stem cells were generated over a lentiviral transfer (SCP-1) which overexpress constitutive a mutant dopamine receptor D2 (D2R80A) or a mutant eGFP tagged thymidinkinase ($\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP). The expression of the D2R80A on the mRNA level was confirmed using RT-PCR. The localization of the transmembrane protein was examined with the immunofluorescence. For analyzing the viability of the SCP-1-D2R80A two tests were performed, a WST-1-assay and a BrdU-assay. Furthermore the rate of the cell growth was determined. In addition the stem cell characterization of the modified cells was investigated by stimulation the cells in the osteogenic and adipogenic direction. Moreover the *in vitro* specific binding of a fluorescent derivative of spiperon was appointed by means of FACS. Afterwards the SCP-1-D2R80A were transplanted in the femoral muscle of nude rats and were monitored with PET after injection of ^{18}F -Fallyprid. For generating a stable transduced cell line SCP-1- $\Delta 45$ -HSV1-TK-eGFP were picked. After that the evidence of the expression of the enzyme thymidinkinase on mRNA level and the protein level was achieved by using RT-PCR and western blot. The functionality of the protein was examined via ganciclovir assay. The possible influence of the genetic modification to the origin stem cell character was illustrated with growth curve and the capacity for differentiation. Thereupon the *in vivo* experiments were followed to detect the implanted cells in the medullary cavity of the tibia or the femoral muscle with PET or SPECT/CT.

Results:

The SCP-1-D2R80A as well as the SCP-1- Δ 45-HSV1-TK-eGFP showed a long-term overexpression of their respective transgene product. The fluorescent signal suggest to the localization of the D2R80A in the cell membrane. Both cell lines maintained their stem cell character which could demonstrate with their capacity to differentiate into the osteogene and adipogene direction and their behavior of proliferation. In the *in vitro* study at least 90% of the SCP-1-D2R80A could bind a fluorescent deriviate of spiperon. The activity of Δ 45-HSV1-TK-eGFP was illustrated via a ganciclovir assay. In addition it was possible to reveal that the D2R80A reporter gene system is a suitable method for monitoring implanted cells *in vivo* with PET and the radionuclide ^{18}F -Fallyprid over a time of 7 days. The detection of the thymidinkinase overexpressing stem cells in the medullary cavity or in the femoral muscle via PET or SPECT/CT and the radioactive marker ^{18}F -FHBG or ^{123}I -FIAU could only demonstrate directly after the operation. The monitoring over a longer time period was as yet not feasible.

Conclusion:

With the characterization of the genetically modified human mesenchymal stem cells it was possible to prove that there is no influence of the origin stem cell character. Furthermore it was successfully argued the expression, activity, functionality and viability of the immortalized stem cells. Moreover it is succeeded to document the behavior of cells *in vivo* by using the reporter gene system and molecular imaging. The dopamine receptor reporter gene system appears as a capable method to monitor human mesenchymal stem cells over a prolonged time period. The HSV1-thymidinkinase reporter gene system whereas needs more experiments to enable an ideal cell detection *in vivo*.

6 Literaturverzeichnis

- Acton, P. D. and R. Zhou. "Imaging Reporter Genes for Cell Tracking with Pet and Spect." *Q J Nucl Med Mol Imaging* 49, no. 4 (2005): 349-60.
- Adonai, N., K. N. Nguyen, J. Walsh, M. Iyer, T. Toyokuni, M. E. Phelps, T. McCarthy, D. W. McCarthy and S. S. Gambhir. "Ex Vivo Cell Labeling with ⁶⁴cu-Pyruvaldehyde-Bis(N4-Methylthiosemicarbazone) for Imaging Cell Trafficking in Mice with Positron-Emission Tomography." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, no. 5 (2002): 3030-5.
- Alaee, F., O. Sugiyama, M. S. Virk, H. Tang, H. Drissi, A. C. Lichtler and J. R. Lieberman. "Suicide Gene Approach Using a Dual-Expression Lentiviral Vector to Enhance the Safety of Ex Vivo Gene Therapy for Bone Repair." *Gene Ther* 21, no. 2 (2014): 139-47.
- Alfke, H., F. Nocken, J. T. Heverhagen and K. J. Klose. "[Molecular Radiology. Ii: Molecular Imaging]." *Rofo* 173, no. 5 (2001): 391-8.
- Arbab, A. S., B. Janic, J. Haller, E. Pawelczyk, W. Liu and J. A. Frank. "In Vivo Cellular Imaging for Translational Medical Research." *Curr Med Imaging Rev* 5, no. 1 (2009): 19-38.
- Arthur, A., A. Zannettino and S. Gronthos. "The Therapeutic Applications of Multipotential Mesenchymal/Stromal Stem Cells in Skeletal Tissue Repair." *J Cell Physiol* 218, no. 2 (2009): 237-45.
- Aubin, J. E. "Bone Stem Cells." *J Cell Biochem Suppl* 30-31, (1998): 73-82.
- Aung, W., T. Okauchi, M. Sato, T. Saito, H. Nakagawa, H. Ishihara, N. Ikota, T. Suhara and K. Anzai. "In-Vivo Pet Imaging of Inducible D2r Reporter Transgene Expression Using [¹¹c]Fib 457 as Reporter Probe in Living Rats." *Nucl Med Commun* 26, no. 3 (2005): 259-68.
- Awad, H. A., D. L. Butler, G. P. Boivin, F. N. Smith, P. Malaviya, B. Huibregtse and A. I. Caplan. "Autologous Mesenchymal Stem Cell-Mediated Repair of Tendon." *Tissue Eng* 5, no. 3 (1999): 267-77.
- Baksh, D., L. Song and R. S. Tuan. "Adult Mesenchymal Stem Cells: Characterization, Differentiation, and Application in Cell and Gene Therapy." *J Cell Mol Med* 8, no. 3 (2004): 301-16.
- Banfi, A., A. Muraglia, B. Dozin, M. Mastrogiacomo, R. Cancedda and R. Quarto. "Proliferation Kinetics and Differentiation Potential of Ex Vivo Expanded Human Bone Marrow Stromal Cells: Implications for Their Use in Cell Therapy." *Exp Hematol* 28, no. 6 (2000): 707-15.
- Barlow, S., G. Brooke, K. Chatterjee, G. Price, R. Pelekanos, T. Rossetti, M. Doody, D. Venter, S. Pain, K. Gilshenan and K. Atkinson. "Comparison of Human Placenta- and Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stem Cells." *Stem Cells Dev* 17, no. 6 (2008): 1095-107.

- Baxter, M. A., R. F. Wynn, S. N. Jowitt, J. E. Wraith, L. J. Fairbairn and I. Bellantuono. "Study of Telomere Length Reveals Rapid Aging of Human Marrow Stromal Cells Following in Vitro Expansion." *Stem Cells* 22, no. 5 (2004): 675-82.
- Beard, B. C., D. Dickerson, K. Beebe, C. Gooch, J. Fletcher, T. Okbinoglu, D. G. Miller, M. A. Jacobs, R. Kaul, H. P. Kiem and G. D. Trobridge. "Comparison of Hiv-Derived Lentiviral and Mlv-Based Gammaretroviral Vector Integration Sites in Primate Repopulating Cells." *Mol Ther* 15, no. 7 (2007): 1356-65.
- Bianco, P. "Stem Cells and Bone: A Historical Perspective." *Bone* 70, (2015): 2-9.
- Bianco, P., X. Cao, P. S. Frenette, J. J. Mao, P. G. Robey, P. J. Simmons and C. Y. Wang. "The Meaning, the Sense and the Significance: Translating the Science of Mesenchymal Stem Cells into Medicine." *Nat Med* 19, no. 1 (2013): 35-42.
- Bianco, P. and P. Gehron Robey. "Marrow Stromal Stem Cells." *J Clin Invest* 105, no. 12 (2000): 1663-8.
- Bianco, P. and P. G. Robey. "Skeletal Stem Cells." *Development* 142, no. 6 (2015): 1023-7.
- Bianco, P., P. G. Robey and P. J. Simmons. "Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays." *Cell Stem Cell* 2, no. 4 (2008): 313-9.
- Biberthaler, P. and M. van Griensven. *Knochendefekte Und Pseudarthrosen*: Springer Berlin Heidelberg, 2016.
- Bischoff, D. S., N. S. Makhijani and D. T. Yamaguchi. "Constitutive Expression of Human Telomerase Enhances the Proliferation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells." *Biores Open Access* 1, no. 6 (2012): 273-9.
- Blasberg, R. G. and J. G. Tjuvajev. "Molecular-Genetic Imaging: Current and Future Perspectives." *J Clin Invest* 111, no. 11 (2003): 1620-9.
- Bocker, W., Z. Yin, I. Drosse, F. Haasters, O. Rossmann, M. Wierer, C. Popov, M. Locher, W. Mutschler, D. Docheva and M. Schieker. "Introducing a Single-Cell-Derived Human Mesenchymal Stem Cell Line Expressing Htert after Lentiviral Gene Transfer." *J Cell Mol Med* 12, no. 4 (2008): 1347-59.
- Brader, P., I. Serganova and R. G. Blasberg. "Noninvasive Molecular Imaging Using Reporter Genes." *J Nucl Med* 54, no. 2 (2013): 167-72.
- Breer, S., M. Auerswald, S. Fuchs, C. Jürgens, M. Faschingbauer and O. Dannenberg. "Versorgung Von Pseudarthrosen Der Langen Röhrenknochen." *Trauma und Berufskrankheit* 17, no. 4 (2015): 233-243.
- Brooke, G., M. Cook, C. Blair, R. Han, C. Heazlewood, B. Jones, M. Kambouris, K. Kollar, S. McTaggart, R. Pelekanos, A. Rice, T. Rossetti and K. Atkinson. "Therapeutic Applications of Mesenchymal Stromal Cells." *Semin Cell Dev Biol* 18, no. 6 (2007): 846-58.
- Brooks, A. R., R. N. Harkins, P. Wang, H. S. Qian, P. Liu and G. M. Rubanyi. "Transcriptional Silencing Is Associated with Extensive Methylation of the Cmv Promoter Following Adenoviral Gene Delivery to Muscle." *J Gene Med* 6, no. 4 (2004): 395-404.

- Bruder, S. P., D. J. Fink and A. I. Caplan. "Mesenchymal Stem Cells in Bone Development, Bone Repair, and Skeletal Regeneration Therapy." *J Cell Biochem* 56, no. 3 (1994): 283-94.
- Bruder, S. P., N. Jaiswal and S. E. Haynesworth. "Growth Kinetics, Self-Renewal, and the Osteogenic Potential of Purified Human Mesenchymal Stem Cells During Extensive Subcultivation and Following Cryopreservation." *J Cell Biochem* 64, no. 2 (1997): 278-94.
- Bruder, S. P., A. A. Kurth, M. Shea, W. C. Hayes, N. Jaiswal and S. Kadiyala. "Bone Regeneration by Implantation of Purified, Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells." *J Orthop Res* 16, no. 2 (1998): 155-62.
- Buchsacher, G. L., Jr. and F. Wong-Staal. "Development of Lentiviral Vectors for Gene Therapy for Human Diseases." *Blood* 95, no. 8 (2000): 2499-504.
- Burns, J. S., B. M. Abdallah, P. Guldborg, J. Rygaard, H. D. Schroder and M. Kassem. "Tumorigenic Heterogeneity in Cancer Stem Cells Evolved from Long-Term Cultures of Telomerase-Immortalized Human Mesenchymal Stem Cells." *Cancer Res* 65, no. 8 (2005): 3126-35.
- Cancedda, R., B. Dozin, P. Giannoni and R. Quarto. "Tissue Engineering and Cell Therapy of Cartilage and Bone." *Matrix Biol* 22, no. 1 (2003): 81-91.
- Caplan, A. I. "Adult Mesenchymal Stem Cells: When, Where, and How." *Stem Cells Int* 2015, (2015): 628767.
- Caplan, A. I. "Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!" *Stem Cells Transl Med* 6, no. 6 (2017): 1445-1451.
- Caplan, A. I. and S. P. Bruder. "Mesenchymal Stem Cells: Building Blocks for Molecular Medicine in the 21st Century." *Trends Mol Med* 7, no. 6 (2001): 259-64.
- Caplan, A. I. and D. Correa. "The Msc: An Injury Drugstore." *Cell Stem Cell* 9, no. 1 (2011): 11-5.
- Caplan, A. I. and J. E. Dennis. "Mesenchymal Stem Cells as Trophic Mediators." *J Cell Biochem* 98, no. 5 (2006): 1076-84.
- Castro-Malaspina, H., R. E. Gay, G. Resnick, N. Kapoor, P. Meyers, D. Chiarieri, S. McKenzie, H. E. Broxmeyer and M. A. Moore. "Characterization of Human Bone Marrow Fibroblast Colony-Forming Cells (Cfu-F) and Their Progeny." *Blood* 56, no. 2 (1980): 289-301.
- Chamberlain, G., J. Fox, B. Ashton and J. Middleton. "Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing." *Stem Cells* 25, no. 11 (2007): 2739-49.
- Chatziioannou, A. F., S. R. Cherry, Y. Shao, R. W. Silverman, K. Meadors, T. H. Farquhar, M. Pedarsani and M. E. Phelps. "Performance Evaluation of Micropet: A High-Resolution Lutetium Oxyorthosilicate Pet Scanner for Animal Imaging." *J Nucl Med* 40, no. 7 (1999): 1164-75.
- Chavez-Munoz, C., K. T. Nguyen, W. Xu, S. J. Hong, T. A. Mustoe and R. D. Galiano. "Transdifferentiation of Adipose-Derived Stem Cells into Keratinocyte-Like Cells: Engineering a Stratified Epidermis." *PLoS One* 8, no. 12 (2013): e80587.

- Chen, I. Y., J. C. Wu, J. J. Min, G. Sundaresan, X. Lewis, Q. Liang, H. R. Herschman and S. S. Gambhir. "Micro-Positron Emission Tomography Imaging of Cardiac Gene Expression in Rats Using Bicistronic Adenoviral Vector-Mediated Gene Delivery." *Circulation* 109, no. 11 (2004): 1415-20.
- Cho, S. Y., L. Ravasi, L. P. Szajek, J. Seidel, M. V. Green, H. A. Fine and W. C. Eckelman. "Evaluation of (76)Br-Fbau as a Pet Reporter Probe for Hsv1-Tk Gene Expression Imaging Using Mouse Models of Human Glioma." *J Nucl Med* 46, no. 11 (2005): 1923-30.
- Colter, D. C., R. Class, C. M. DiGirolamo and D. J. Prockop. "Rapid Expansion of Recycling Stem Cells in Cultures of Plastic-Adherent Cells from Human Bone Marrow." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, no. 7 (2000): 3213-8.
- Conget, P. A. and J. J. Minguell. "Phenotypical and Functional Properties of Human Bone Marrow Mesenchymal Progenitor Cells." *J Cell Physiol* 181, no. 1 (1999): 67-73.
- Contag, P. R., I. N. Olomu, D. K. Stevenson and C. H. Contag. "Bioluminescent Indicators in Living Mammals." *Nat Med* 4, no. 2 (1998): 245-7.
- Corn, D. J., Y. Kim, M. D. Krebs, T. Mounts, J. Molter, S. Gerson, E. Alsberg, J. E. Dennis and Z. Lee. "Imaging Early Stage Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells." *J Orthop Res* 31, no. 6 (2013): 871-9.
- Daley, G. Q., M. A. Goodell and E. Y. Snyder. "Realistic Prospects for Stem Cell Therapeutics." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, (2003): 398-418.
- Dawson, J. I., J. Kanczler, R. Tare, M. Kassem and R. O. Oreffo. "Concise Review: Bridging the Gap: Bone Regeneration Using Skeletal Stem Cell-Based Strategies - Where Are We Now?" *Stem Cells* 32, no. 1 (2014): 35-44.
- de Paulis, T. "The Discovery of Epidepride and Its Analogs as High-Affinity Radioligands for Imaging Extrastriatal Dopamine D(2) Receptors in Human Brain." *Curr Pharm Des* 9, no. 8 (2003): 673-96.
- de Vries, I. J., W. J. Lesterhuis, J. O. Barentsz, P. Verdijk, J. H. van Krieken, O. C. Boerman, W. J. Oyen, J. J. Bonenkamp, J. B. Boezeman, G. J. Adema, J. W. Bulte, T. W. Scheenen, C. J. Punt, A. Heerschap and C. G. Figdor. "Magnetic Resonance Tracking of Dendritic Cells in Melanoma Patients for Monitoring of Cellular Therapy." *Nat Biotechnol* 23, no. 11 (2005): 1407-13.
- Delorme, B., S. Chateauvieux and P. Charbord. "The Concept of Mesenchymal Stem Cells." *Regen Med* 1, no. 4 (2006): 497-509.
- DiGirolamo, C. M., D. Stokes, D. Colter, D. G. Phinney, R. Class and D. J. Prockop. "Propagation and Senescence of Human Marrow Stromal Cells in Culture: A Simple Colony-Forming Assay Identifies Samples with the Greatest Potential to Propagate and Differentiate." *Br J Haematol* 107, no. 2 (1999): 275-81.
- Dobrossy, M. D., F. Braun, S. Klein, J. Garcia, K. J. Langen, W. A. Weber, G. Nikkhah and P. T. Meyer. "[18f]Desmethoxyfallypride as a Novel Pet Radiotracer for Quantitative in Vivo Dopamine D2/D3 Receptor Imaging in Rat Models of Neurodegenerative Diseases." *Nucl Med Biol* 39, no. 7 (2012): 1077-80.

- Docheva, D., D. Padula, C. Popov, W. Mutschler, H. Clausen-Schaumann and M. Schieker. "Researching into the Cellular Shape, Volume and Elasticity of Mesenchymal Stem Cells, Osteoblasts and Osteosarcoma Cells by Atomic Force Microscopy." *J Cell Mol Med* 12, no. 2 (2008): 537-52.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. "Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement.
." *Cytotherapy.* ;8(4):315-7, (2006).
- Doudna, J. A. and E. Charpentier. "Genome Editing. The New Frontier of Genome Engineering with Crispr-Cas9." *Science* 346, no. 6213 (2014): 1258096.
- Drosse, I., E. Volkmer, R. Capanna, P. De Biase, W. Mutschler and M. Schieker. "Tissue Engineering for Bone Defect Healing: An Update on a Multi-Component Approach." *Injury* 39 Suppl 2, (2008): S9-20.
- Dupont, K. M., K. Sharma, H. Y. Stevens, J. D. Boerckel, A. J. Garcia and R. E. Gulberg. "Human Stem Cell Delivery for Treatment of Large Segmental Bone Defects." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, no. 8 (2010): 3305-10.
- Eissenberg, L. G., M. Rettig, F. Dehdashti, D. Piwnica-Worms and J. F. DiPersio. "Suicide Genes: Monitoring Cells in Patients with a Safety Switch." *Front Pharmacol* 5, (2014): 241.
- Elrick, R. H. and R. P. Parker. "The Use of Cerenkov Radiation in the Measurement of Beta-Emitting Radionuclides." *Int J Appl Radiat Isot* 19, no. 3 (1968): 263-71.
- England, C. G., E. B. Ehlerding and W. Cai. "Imaging the Biodistribution and Performance of Transplanted Stem Cells with Pet." *J Nucl Med* 57, no. 9 (2016): 1331-2.
- Ferrari, G., G. Cusella-De Angelis, M. Coletta, E. Paolucci, A. Stornaiuolo, G. Cossu and F. Mavilio. "Muscle Regeneration by Bone Marrow-Derived Myogenic Progenitors." *Science* 279, no. 5356 (1998): 1528-30.
- Frangioni, J. V. and R. J. Hajjar. "In Vivo Tracking of Stem Cells for Clinical Trials in Cardiovascular Disease." *Circulation* 110, no. 21 (2004): 3378-83.
- Frasca, S., F. Norol, C. Le Visage, J. M. Collombet, D. Letourneur, X. Holy and E. Sari Ali. "Calcium-Phosphate Ceramics and Polysaccharide-Based Hydrogel Scaffolds Combined with Mesenchymal Stem Cell Differently Support Bone Repair in Rats." *J Mater Sci Mater Med* 28, no. 2 (2017): 35.
- Friedenstein. "Heterotopic of Bone Marrow. Analysis of Precursor Cells for Osteogenic and Hematopoietic Tissues.
." (1968).
- Friedenstein. "Precursor Cells of Mechanocytes." *Int Rev Cytol.* , (1976).
- Friedenstein, A. J., J. F. Gorskaja and N. N. Kulagina. "Fibroblast Precursors in Normal and Irradiated Mouse Hematopoietic Organs." *Exp Hematol* 4, no. 5 (1976): 267-74.
- Friedenstein, A. J., K. V. Petrakova, A. I. Kurolesova and G. P. Frolova. "Heterotopic of Bone Marrow. Analysis of Precursor Cells for Osteogenic and Hematopoietic Tissues." *Transplantation* 6, no. 2 (1968): 230-47.

- Friedenstein, A. J., Shapiro Piatetzky, II and K. V. Petrakova. "Osteogenesis in Transplants of Bone Marrow Cells." *J Embryol Exp Morphol* 16, no. 3 (1966): 381-90.
- Friedenstein AJ, Ivanov-Smolenski AA, Chajlakjan RK, Gorskaya UF, Kuralesova AI, Latzinik NW, Gerasimow UW. "Origin of Bone Marrow Stromal Mechanocytes in Radiochimeras and Heterotopic Transplants." *Exp Hematol.*, (1978 May).
- Funk, T., M. Sun and B. H. Hasegawa. "Radiation Dose Estimate in Small Animal Spect and Pet." *Med Phys* 31, no. 9 (2004): 2680-6.
- Gallezot, J. D., J. D. Beaver, R. N. Gunn, N. Nabulsi, D. Weinzimmer, T. Singhal, M. Slifstein, K. Fowles, Y. S. Ding, Y. Huang, M. Laruelle, R. E. Carson and E. A. Rabiner. "Affinity and Selectivity of [(1)(1)C]-(+)-Phno for the D3 and D2 Receptors in the Rhesus Monkey Brain in Vivo." *Synapse* 66, no. 6 (2012): 489-500.
- Galmiche, M. C., V. E. Koteliansky, J. Briere, P. Herve and P. Charbord. "Stromal Cells from Human Long-Term Marrow Cultures Are Mesenchymal Cells That Differentiate Following a Vascular Smooth Muscle Differentiation Pathway." *Blood* 82, no. 1 (1993): 66-76.
- Gambhir, S. S., E. Bauer, M. E. Black, Q. Liang, M. S. Kokoris, J. R. Barrio, M. Iyer, M. Namavari, M. E. Phelps and H. R. Herschman. "A Mutant Herpes Simplex Virus Type 1 Thymidine Kinase Reporter Gene Shows Improved Sensitivity for Imaging Reporter Gene Expression with Positron Emission Tomography." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, no. 6 (2000): 2785-90.
- Gholamrezanezhad, A., S. Mirpour, J. M. Ardekani, M. Bagheri, K. Alimoghadam, S. Yarmand and R. Malekzadeh. "Cytotoxicity of 111In-Oxine on Mesenchymal Stem Cells: A Time-Dependent Adverse Effect." *Nucl Med Commun* 30, no. 3 (2009): 210-6.
- Gildehaus, F. J., F. Haasters, I. Drosse, E. Wagner, C. Zach, W. Mutschler, P. Cumming, P. Bartenstein and M. Schieker. "Impact of Indium-111 Oxine Labelling on Viability of Human Mesenchymal Stem Cells in Vitro, and 3d Cell-Tracking Using Spect/Ct in Vivo." *Mol Imaging Biol* 13, no. 6 (2011): 1204-14.
- Gimble, J. M., A. J. Katz and B. A. Bunnell. "Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine." *Circ Res* 100, no. 9 (2007): 1249-60.
- Ginn, S. L., A. K. Amaya, I. E. Alexander, M. Edelstein and M. R. Abedi. "Gene Therapy Clinical Trials Worldwide to 2017: An Update." *J Gene Med* 20, no. 5 (2018): e3015.
- Gleich, B. and J. Weizenecker. "Tomographic Imaging Using the Nonlinear Response of Magnetic Particles." *Nature* 435, no. 7046 (2005): 1214-7.
- Gong, X., Z. Sun, D. Cui, X. Xu, H. Zhu, L. Wang, W. Qian and X. Han. "Isolation and Characterization of Lung Resident Mesenchymal Stem Cells Capable of Differentiating into Alveolar Epithelial Type II Cells." *Cell Biol Int*, (2014).
- Granero-Molto, F., J. A. Weis, M. I. Miga, B. Landis, T. J. Myers, L. O'Rear, L. Longobardi, E. D. Jansen, D. P. Mortlock and A. Spagnoli. "Regenerative Effects of Transplanted Mesenchymal Stem Cells in Fracture Healing." *Stem Cells* 27, no. 8 (2009): 1887-98.
- Grimm, J., M. F. Kircher and R. Weissleder. "[Cell Tracking. Principles and Applications]." *Radiologe* 47, no. 1 (2007): 25-33.

- Haralampieva, D., T. Betzel, I. Dinulovic, S. Salemi, M. Stoelting, S. D. Kramer, R. Schibli, T. Sulser, C. Handschin, D. Eberli and S. M. Ametamey. "Noninvasive Pet Imaging and Tracking of Engineered Human Muscle Precursor Cells for Skeletal Muscle Tissue Engineering." *J Nucl Med* 57, no. 9 (2016): 1467-73.
- Haynesworth, S. E., M. A. Baber and A. I. Caplan. "Cell Surface Antigens on Human Marrow-Derived Mesenchymal Cells Are Detected by Monoclonal Antibodies." *Bone* 13, no. 1 (1992): 69-80.
- Herbst, F., C. R. Ball, F. Tuorto, A. Nowrouzi, W. Wang, O. Zavidij, S. M. Dieter, S. Fessler, F. van der Hoeven, U. Kloz, F. Lyko, M. Schmidt, C. von Kalle and H. Glimm. "Extensive Methylation of Promoter Sequences Silences Lentiviral Transgene Expression During Stem Cell Differentiation in Vivo." *Mol Ther* 20, no. 5 (2012): 1014-21.
- Herschman, H. R., D. C. MacLaren, M. Iyer, M. Namavari, K. Bobinski, L. A. Green, L. Wu, A. J. Berk, T. Toyokuni, J. R. Barrio, S. R. Cherry, M. E. Phelps, E. P. Sandgren and S. S. Gambhir. "Seeing Is Believing: Non-Invasive, Quantitative and Repetitive Imaging of Reporter Gene Expression in Living Animals, Using Positron Emission Tomography." *J Neurosci Res* 59, no. 6 (2000): 699-705.
- Horwitz, E. M., P. L. Gordon, W. K. Koo, J. C. Marx, M. D. Neel, R. Y. McNall, L. Muul and T. Hofmann. "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, no. 13 (2002): 8932-7.
- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; "Clarification of the Nomenclature for Msc: The International Society for Cellular Therapy Position Statement." *Cytotherapy*. 7(5):393-5., (2005).
- Hung, S. C., W. P. Deng, W. K. Yang, R. S. Liu, C. C. Lee, T. C. Su, R. J. Lin, D. M. Yang, C. W. Chang, W. H. Chen, H. J. Wei and J. G. Gelovani. "Mesenchymal Stem Cell Targeting of Microscopic Tumors and Tumor Stroma Development Monitored by Noninvasive in Vivo Positron Emission Tomography Imaging." *Clin Cancer Res* 11, no. 21 (2005): 7749-56.
- Hwang, D. W., S. J. Jang, Y. H. Kim, H. J. Kim, I. K. Shim, J. M. Jeong, J. K. Chung, M. C. Lee, S. J. Lee, S. U. Kim, S. Kim and D. S. Lee. "Real-Time in Vivo Monitoring of Viable Stem Cells Implanted on Biocompatible Scaffolds." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35, no. 10 (2008): 1887-98.
- Hwang, D. W., J. H. Kang, Y. S. Chang, J. M. Jeong, J. K. Chung, M. C. Lee, S. Kim and D. S. Lee. "Development of a Dual Membrane Protein Reporter System Using Sodium Iodide Symporter and Mutant Dopamine D2 Receptor Transgenes." *J Nucl Med* 48, no. 4 (2007): 588-95.
- In 't Anker, P. S., S. A. Scherjon, C. Kleijburg-van der Keur, W. A. Noort, F. H. Claas, R. Willemze, W. E. Fibbe and H. H. Kanhai. "Amniotic Fluid as a Novel Source of Mesenchymal Stem Cells for Therapeutic Transplantation." *Blood* 102, no. 4 (2003): 1548-9.
- Ittrich, H., K. Peldschus, N. Raabe, M. Kaul and G. Adam. "Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles in Biomedicine: Applications and Developments in Diagnostics and Therapy." *Rofa* 185, no. 12 (2013): 1149-66.

- Ivics, Z., P. B. Hackett, R. H. Plasterk and Z. Izsvak. "Molecular Reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-Like Transposon from Fish, and Its Transposition in Human Cells." *Cell* 91, no. 4 (1997): 501-10.
- Javazon, E. H., K. J. Beggs and A. W. Flake. "Mesenchymal Stem Cells: Paradoxes of Passaging." *Exp Hematol* 32, no. 5 (2004): 414-25.
- Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. C. Low, D. A. Largaespada and C. M. Verfaillie. "Pluripotency of Mesenchymal Stem Cells Derived from Adult Marrow." *Nature* 418, no. 6893 (2002): 41-9.
- Jiang, Y., B. Vaessen, T. Lenvik, M. Blackstad, M. Reyes and C. M. Verfaillie. "Multipotent Progenitor Cells Can Be Isolated from Postnatal Murine Bone Marrow, Muscle, and Brain." *Exp Hematol* 30, no. 8 (2002): 896-904.
- Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna and E. Charpentier. "A Programmable Dual-Rna-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity." *Science* 337, no. 6096 (2012): 816-21.
- Jones, B. J., G. Brooke, K. Atkinson and S. J. McTaggart. "Immunosuppression by Placental Indoleamine 2,3-Dioxygenase: A Role for Mesenchymal Stem Cells." *Placenta* 28, no. 11-12 (2007): 1174-81.
- Kadiyala, S., R. G. Young, M. A. Thiede and S. P. Bruder. "Culture Expanded Canine Mesenchymal Stem Cells Possess Osteochondrogenic Potential in Vivo and in Vitro." *Cell Transplant* 6, no. 2 (1997): 125-34.
- Kallifatidis, G., B. M. Beckermann, A. Groth, M. Schubert, A. Apel, A. Khamidjanov, E. Ryschich, T. Wenger, W. Wagner, A. Diehlmann, R. Saffrich, U. Krause, V. Eckstein, J. Mattern, M. Chai, G. Schutz, A. D. Ho, M. M. Gebhard, M. W. Buchler, H. Friess, P. Buchler and I. Herr. "Improved Lentiviral Transduction of Human Mesenchymal Stem Cells for Therapeutic Intervention in Pancreatic Cancer." *Cancer Gene Ther* 15, no. 4 (2008): 231-40.
- Kang, J. H. and J. K. Chung. "Molecular-Genetic Imaging Based on Reporter Gene Expression." *J Nucl Med* 49 Suppl 2, (2008): 164S-79S.
- Kang, J. H., D. S. Lee, J. C. Paeng, J. S. Lee, Y. H. Kim, Y. J. Lee, D. W. Hwang, J. M. Jeong, S. M. Lim, J. K. Chung and M. C. Lee. "Development of a Sodium/Iodide Symporter (Nis)-Transgenic Mouse for Imaging of Cardiomyocyte-Specific Reporter Gene Expression." *J Nucl Med* 46, no. 3 (2005): 479-83.
- Kang, X. Q., W. J. Zang, L. J. Bao, D. L. Li, T. S. Song, X. L. Xu and X. J. Yu. "Fibroblast Growth Factor-4 and Hepatocyte Growth Factor Induce Differentiation of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells into Hepatocytes." *World J Gastroenterol* 11, no. 47 (2005): 7461-5.
- Kean, T. J., P. Lin, A. I. Caplan and J. E. Dennis. "Mscs: Delivery Routes and Engraftment, Cell-Targeting Strategies, and Immune Modulation." *Stem Cells Int* 2013, (2013): 732742.
- Kebriaei, P., Z. Izsvak, S. A. Narayanavari, H. Singh and Z. Ivics. "Gene Therapy with the Sleeping Beauty Transposon System." *Trends Genet* 33, no. 11 (2017): 852-870.

- Kircher, M. F., S. S. Gambhir and J. Grimm. "Noninvasive Cell-Tracking Methods." *Nat Rev Clin Oncol* 8, no. 11 (2011): 677-88.
- Knopp, Tobias and Thorsten M Buzug. *Magnetic Particle Imaging: An Introduction to Imaging Principles and Scanner Instrumentation*: Springer Science & Business Media, 2012.
- Koehne, G., M. Doubrovin, E. Doubrovina, P. Zanzonico, H. F. Gallardo, A. Ivanova, J. Balatoni, J. Teruya-Feldstein, G. Heller, C. May, V. Ponomarev, S. Ruan, R. Finn, R. G. Blasberg, W. Bornmann, I. Riviere, M. Sadelain, R. J. O'Reilly, S. M. Larson and J. G. Tjuvajev. "Serial in Vivo Imaging of the Targeted Migration of Human Hsv-Tk-Transduced Antigen-Specific Lymphocytes." *Nat Biotechnol* 21, no. 4 (2003): 405-13.
- Kon, E., A. Muraglia, A. Corsi, P. Bianco, M. Marcacci, I. Martin, A. Boyde, I. Ruspantini, P. Chistolini, M. Rocca, R. Giardino, R. Cancedda and R. Quarto. "Autologous Bone Marrow Stromal Cells Loaded onto Porous Hydroxyapatite Ceramic Accelerate Bone Repair in Critical-Size Defects of Sheep Long Bones." *J Biomed Mater Res* 49, no. 3 (2000): 328-37.
- Korbling, M. and Z. Estrov. "Adult Stem Cells for Tissue Repair - a New Therapeutic Concept?" *N Engl J Med* 349, no. 6 (2003): 570-82.
- Krabbe, C., J. Zimmer and M. Meyer. "Neural Transdifferentiation of Mesenchymal Stem Cells--a Critical Review." *APMIS* 113, no. 11-12 (2005): 831-44.
- Kraitchman, D. L., A. W. Heldman, E. Atalar, L. C. Amado, B. J. Martin, M. F. Pittenger, J. M. Hare and J. W. Bulte. "In Vivo Magnetic Resonance Imaging of Mesenchymal Stem Cells in Myocardial Infarction." *Circulation* 107, no. 18 (2003): 2290-3.
- Krause, D. S., N. D. Theise, M. I. Collector, O. Henegariu, S. Hwang, R. Gardner, S. Neutzel and S. J. Sharkis. "Multi-Organ, Multi-Lineage Engraftment by a Single Bone Marrow-Derived Stem Cell." *Cell* 105, no. 3 (2001): 369-77.
- Krestel, H. E., A. L. Mihaljevic, D. A. Hoffman and A. Schneider. "Neuronal Co-Expression of Egfp and Beta-Galactosidase in Mice Causes Neuropathology and Premature Death." *Neurobiol Dis* 17, no. 2 (2004): 310-8.
- Kummer, C., A. Winkeler, C. Dittmar, B. Bauer, M. A. Rueger, B. Rueckriem, M. T. Heneka, S. Vollmar, K. Wienhard, C. Fraefel, W. D. Heiss and A. H. Jacobs. "Multitracer Positron Emission Tomographic Imaging of Exogenous Gene Expression Mediated by a Universal Herpes Simplex Virus 1 Amplicon Vector." *Mol Imaging* 6, no. 3 (2007): 181-92.
- La Russa, M. F. and L. S. Qi. "The New State of the Art: Cas9 for Gene Activation and Repression." *Mol Cell Biol* 35, no. 22 (2015): 3800-9.
- Lee, R. H., S. C. Hsu, J. Munoz, J. S. Jung, N. R. Lee, R. Pochampally and D. J. Prockop. "A Subset of Human Rapidly Self-Renewing Marrow Stromal Cells Preferentially Engraft in Mice." *Blood* 107, no. 5 (2006): 2153-61.
- Lee, S. W., P. Padmanabhan, P. Ray, S. S. Gambhir, T. Doyle, C. Contag, S. B. Goodman and S. Biswal. "Stem Cell-Mediated Accelerated Bone Healing Observed with in Vivo Molecular and Small Animal Imaging Technologies in a Model of Skeletal Injury." *J Orthop Res* 27, no. 3 (2009): 295-302.
- Lee, Z., J. E. Dennis and S. L. Gerson. "Imaging Stem Cell Implant for Cellular-Based Therapies." *Exp Biol Med (Maywood)* 233, no. 8 (2008): 930-40.

- Leten, C., V. D. Roobrouck, T. Struys, T. C. Burns, T. Dresselaers, G. Vande Velde, J. Santermans, A. Lo Nigro, A. Ibrahimi, R. Gijssbers, K. Eggermont, I. Lambrichts, C. M. Verfaillie and U. Himmelreich. "Controlling and Monitoring Stem Cell Safety in Vivo in an Experimental Rodent Model." *Stem Cells* 32, no. 11 (2014): 2833-44.
- Lewis, C. M., S. A. Graves, R. Hernandez, H. F. Valdovinos, T. E. Barnhart, W. Cai, M. E. Meyerand, R. J. Nickles and M. Suzuki. "(5)(2)Mn Production for Pet/Mri Tracking of Human Stem Cells Expressing Divalent Metal Transporter 1 (Dmt1)." *Theranostics* 5, no. 3 (2015): 227-39.
- Li, L. Q., F. Shen, X. Y. Xu, H. Zhang, X. F. Yang and W. G. Liu. "Gene Therapy with Hsv1-Sr39tk/Gcv Exhibits a Stronger Therapeutic Efficacy Than Hsv1-Tk/Gcv in Rat C6 Glioma Cells." *ScientificWorldJournal* 2013, (2013): 951343.
- Li, Y., J. Chen, X. G. Chen, L. Wang, S. C. Gautam, Y. X. Xu, M. Katakowski, L. J. Zhang, M. Lu, N. Janakiraman and M. Chopp. "Human Marrow Stromal Cell Therapy for Stroke in Rat: Neurotrophins and Functional Recovery." *Neurology* 59, no. 4 (2002): 514-23.
- Liang, Q., N. Satyamurthy, J. R. Barrio, T. Toyokuni, M. P. Phelps, S. S. Gambhir and H. R. Herschman. "Noninvasive, Quantitative Imaging in Living Animals of a Mutant Dopamine D2 Receptor Reporter Gene in Which Ligand Binding Is Uncoupled from Signal Transduction." *Gene Ther* 8, no. 19 (2001): 1490-8.
- Lin, P., Y. Lin, D. P. Lennon, D. Correa, M. Schluchter and A. I. Caplan. "Efficient Lentiviral Transduction of Human Mesenchymal Stem Cells That Preserves Proliferation and Differentiation Capabilities." *Stem Cells Transl Med* 1, no. 12 (2012): 886-97.
- Liu, H. S., M. S. Jan, C. K. Chou, P. H. Chen and N. J. Ke. "Is Green Fluorescent Protein Toxic to the Living Cells?" *Biochem Biophys Res Commun* 260, no. 3 (1999): 712-7.
- Lucignani, G. and M. Rodriguez-Porcel. "In Vivo Imaging for Stem Cell Therapy: New Developments and Future Challenges." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 38, no. 2 (2011): 400-5.
- Mach, R. H. and R. R. Luedtke. "Challenges in the Development of Dopamine D2- and D3-Selective Radiotracers for Pet Imaging Studies." *J Labelled Comp Radiopharm* 61, no. 3 (2018): 291-298.
- MacLaren, D. C., S. S. Gambhir, N. Satyamurthy, J. R. Barrio, S. Sharfstein, T. Toyokuni, L. Wu, A. J. Berk, S. R. Cherry, M. E. Phelps and H. R. Herschman. "Repetitive, Non-Invasive Imaging of the Dopamine D2 Receptor as a Reporter Gene in Living Animals." *Gene Ther* 6, no. 5 (1999): 785-91.
- Mak, G. W., C. H. Wong and S. K. Tsui. "Green Fluorescent Protein Induces the Secretion of Inflammatory Cytokine Interleukin-6 in Muscle Cells." *Anal Biochem* 362, no. 2 (2007): 296-8.
- Massoud, T. F. and S. S. Gambhir. "Molecular Imaging in Living Subjects: Seeing Fundamental Biological Processes in a New Light." *Genes Dev* 17, no. 5 (2003): 545-80.
- Mathiasen, A. B. and J. Kastrup. "Non-Invasive in-Vivo Imaging of Stem Cells after Transplantation in Cardiovascular Tissue." *Theranostics* 3, no. 8 (2013): 561-72.

- Mendez-Ferrer, S., T. V. Michurina, F. Ferraro, A. R. Mazloom, B. D. Macarthur, S. A. Lira, D. T. Scadden, A. Ma'ayan, G. N. Enikolopov and P. S. Frenette. "Mesenchymal and Haematopoietic Stem Cells Form a Unique Bone Marrow Niche." *Nature* 466, no. 7308 (2010): 829-34.
- Mihara, K., C. Imai, E. Coustan-Smith, J. S. Dome, M. Dominici, E. Vanin and D. Campana. "Development and Functional Characterization of Human Bone Marrow Mesenchymal Cells Immortalized by Enforced Expression of Telomerase." *Br J Haematol* 120, no. 5 (2003): 846-9.
- Mille, E., P. Cumming, A. Rominger, C. La Fougere, K. Tatsch, B. Wangler, P. Bartenstein and G. Boning. "Compensation for Cranial Spill-in into the Cerebellum Improves Quantitation of Striatal Dopamine D₂/D₃ Receptors in Rats with Prolonged [(1)(8)F]-Dmfp Infusions." *Synapse* 66, no. 8 (2012): 705-13.
- Milone, M. C. and U. O'Doherty. "Clinical Use of Lentiviral Vectors." *Leukemia* 32, no. 7 (2018): 1529-1541.
- Min, J. J., M. Iyer and S. S. Gambhir. "Comparison of [18f]Fhbg and [14c]Fiau for Imaging of Hsv1-Tk Reporter Gene Expression: Adenoviral Infection Vs Stable Transfection." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30, no. 11 (2003): 1547-60.
- Minguell, J. J., A. Erices and P. Conget. "Mesenchymal Stem Cells." *Exp Biol Med (Maywood)* 226, no. 6 (2001): 507-20.
- Mitsui, M., M. Nishikawa, L. Zang, M. Ando, K. Hattori, Y. Takahashi, Y. Watanabe and Y. Takakura. "Effect of the Content of Unmethylated CpG Dinucleotides in Plasmid DNA on the Sustainability of Transgene Expression." *J Gene Med* 11, no. 5 (2009): 435-43.
- Muraglia, A., R. Cancedda and R. Quarto. "Clonal Mesenchymal Progenitors from Human Bone Marrow Differentiate in Vitro According to a Hierarchical Model." *J Cell Sci* 113 (Pt 7), (2000): 1161-6.
- Murphy, M. B., K. Moncivais and A. I. Caplan. "Mesenchymal Stem Cells: Environmentally Responsive Therapeutics for Regenerative Medicine." *Exp Mol Med* 45, (2013): e54.
- Nakahara, H., S. P. Bruder, S. E. Haynesworth, J. J. Holecek, M. A. Baber, V. M. Goldberg and A. I. Caplan. "Bone and Cartilage Formation in Diffusion Chambers by Subcultured Cells Derived from the Periosteum." *Bone* 11, no. 3 (1990): 181-8.
- Niedermayr, A., "Fluoreszenzmikroskopie" <https://lp.uni-goettingen.de/get/text/6741>.
- Ntziachristos, V. "Fluorescence Molecular Imaging." *Annu Rev Biomed Eng* 8, (2006): 1-33.
- Oreffo, R. O., C. Cooper, C. Mason and M. Clements. "Mesenchymal Stem Cells: Lineage, Plasticity, and Skeletal Therapeutic Potential." *Stem Cell Rev* 1, no. 2 (2005): 169-78.
- Orlic, D., J. Kajstura, S. Chimenti, I. Jakoniuk, S. M. Anderson, B. Li, J. Pickel, R. McKay, B. Nadal-Ginard, D. M. Bodine, A. Leri and P. Anversa. "Bone Marrow Cells Regenerate Infarcted Myocardium." *Nature* 410, no. 6829 (2001): 701-5.
- Ozeki, N., T. Muneta, S. Matsuta, H. Koga, Y. Nakagawa, M. Mizuno, K. Tsuji, Y. Mabuchi, C. Akazawa, E. Kobayashi, T. Saito and I. Sekiya. "Synovial Mesenchymal Stem Cells Promote Meniscus Regeneration Augmented by an Autologous Achilles Tendon Graft in a Rat Partial Meniscus Defect Model." *Stem Cells* 33, no. 6 (2015): 1927-38.

- Pablico-Lansigan, M. H., S. F. Situ and A. C. Samia. "Magnetic Particle Imaging: Advancements and Perspectives for Real-Time in Vivo Monitoring and Image-Guided Therapy." *Nanoscale* 5, no. 10 (2013): 4040-55.
- Patel, D. M., J. Shah and A. S. Srivastava. "Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine." *Stem Cells Int* 2013, (2013): 496218.
- Pei, Z., X. Lan, Z. Cheng, C. Qin, P. Wang, Y. He, T. C. Yen, Y. Tian, F. P. Mghanga and Y. Zhang. "A Multimodality Reporter Gene for Monitoring Transplanted Stem Cells." *Nucl Med Biol* 39, no. 6 (2012): 813-20.
- Pelekanos, R. A., V. S. Sardesai, K. Futrega, W. B. Lott, M. Kuhn and M. R. Doran. "Isolation and Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Human Placenta Tissue." *J Vis Exp*, no. 112 (2016).
- Penn, M. S. "Importance of the Sdf-1:Cxcr4 Axis in Myocardial Repair." *Circ Res* 104, no. 10 (2009): 1133-5.
- Penn, M. S. and M. K. Khalil. "Exploitation of Stem Cell Homing for Gene Delivery." *Expert Opin Biol Ther* 8, no. 1 (2008): 17-30.
- Perin, E. C., M. Tian, F. C. Marini, 3rd, G. V. Silva, Y. Zheng, F. Baimbridge, X. Quan, M. R. Fernandes, A. Gahremanpour, D. Young, V. Paolillo, U. Mukhopadhyay, A. T. Borne, R. Uthamanthil, D. Brammer, J. Jackson, W. K. Decker, A. M. Najjar, M. W. Thomas, A. Volgin, B. Rabinovich, S. Soghomonyan, H. J. Jeong, J. M. Rios, D. Steiner, S. Robinson, O. Mawlawi, T. Pan, J. Stafford, V. Kundra, C. Li, M. M. Alauddin, J. T. Willerson, E. Shpall and J. G. Gelovani. "Imaging Long-Term Fate of Intramyocardially Implanted Mesenchymal Stem Cells in a Porcine Myocardial Infarction Model." *PLoS One* 6, no. 9 (2011): e22949.
- Petite, H., V. Viateau, W. Bensaid, A. Meunier, C. de Pollak, M. Bourguignon, K. Oudina, L. Sedel and G. Guillemain. "Tissue-Engineered Bone Regeneration." *Nat Biotechnol* 18, no. 9 (2000): 959-63.
- Phadnis, S. M., M. V. Joglekar, M. P. Dalvi, S. Muthyala, P. D. Nair, S. M. Ghaskadbi, R. R. Bhonde and A. A. Hardikar. "Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Cells Differentiate and Mature into Endocrine Pancreatic Lineage in Vivo." *Cytotherapy* 13, no. 3 (2011): 279-93.
- Phinney, D. G. and D. J. Prockop. "Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair--Current Views." *Stem Cells* 25, no. 11 (2007): 2896-902.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig and D. R. Marshak. "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells." *Science* 284, no. 5411 (1999): 143-7.
- Plumton, G., I. Adjei, A. Martin-Pena, G. D. Palmer and B. Sharma. "Macroporous 3d Scaffolds for Studying Msc Migration and Differentiation within Cartilage Defects." *Osteoarthritis and Cartilage* 24: S162-S163.
- Polzer, H., E. Volkmer, M. M. Saller, W. C. Prall, F. Haasters, I. Drosse, D. Anz, W. Mutschler and M. Schieker. "Long-Term Detection of Fluorescently Labeled Human Mesenchymal Stem Cell in Vitro and in Vivo by Semi-Automated Microscopy." *Tissue Eng Part C Methods* 18, no. 2 (2012): 156-65.

- Polzer, H., E. Volkmer, M. M. Saller, W. C. Prall, F. Haasters, I. Drosse, A. Wilhelmi, W. Mutschler and M. Schieker. "Comparison of Different Strategies for in Vivo Seeding of Prevascularized Scaffolds." *Tissue Eng Part C Methods* 20, no. 1 (2014): 11-8.
- Ponomarev, V., M. Doubrovin, I. Serganova, T. Beresten, J. Vider, A. Shavrin, L. Ageyeva, J. Balatoni, R. Blasberg and J. G. Tjuvajev. "Cytoplasmically Retargeted Hsv1-Tk/Gfp Reporter Gene Mutants for Optimization of Noninvasive Molecular-Genetic Imaging." *Neoplasia* 5, no. 3 (2003): 245-54.
- Prockop, D. J. "Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues." *Science* 276, no. 5309 (1997): 71-4.
- Prockop, D. J., I. Sekiya and D. C. Colter. "Isolation and Characterization of Rapidly Self-Renewing Stem Cells from Cultures of Human Marrow Stromal Cells." *Cytherapy* 3, no. 5 (2001): 393-6.
- Puppi, J. and M. Modo. "Use of Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents to Detect Transplanted Liver Cells." *Top Magn Reson Imaging* 20, no. 2 (2009): 113-20.
- Ray, P., E. Bauer, M. Iyer, J. R. Barrio, N. Satyamurthy, M. E. Phelps, H. R. Herschman and S. S. Gambhir. "Monitoring Gene Therapy with Reporter Gene Imaging." *Semin Nucl Med* 31, no. 4 (2001): 312-20.
- Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. "Purification and Ex Vivo Expansion of Postnatal Human Marrow Mesodermal Progenitor Cells. Blood. 2001;98:2615-2625." *Blood* 113, no. 10 (2009): 2370.
- River, Charles, "Rnu Rat" <https://www.criver.com/products-services/find-model/rnu-rat?region=23>.
- Robertson, R., M. S. Germanos, C. Li, G. S. Mitchell, S. R. Cherry and M. D. Silva. "Optical Imaging of Cerenkov Light Generation from Positron-Emitting Radiotracers." *Phys Med Biol* 54, no. 16 (2009): N355-65.
- Rodriguez-Porcel, M. "In Vivo Imaging and Monitoring of Transplanted Stem Cells: Clinical Applications." *Curr Cardiol Rep* 12, no. 1 (2010): 51-8.
- Roelants, V., D. Labar, C. de Meester, X. Havaux, A. Tabilio, S. S. Gambhir, M. Di Ianni, A. Bol, L. Bertrand and J. L. Vanoverschelde. "Comparison between Adenoviral and Retroviral Vectors for the Transduction of the Thymidine Kinase Pet Reporter Gene in Rat Mesenchymal Stem Cells." *J Nucl Med* 49, no. 11 (2008): 1836-44.
- Rosada, C., J. Justesen, D. Melsvik, P. Ebbesen and M. Kassem. "The Human Umbilical Cord Blood: A Potential Source for Osteoblast Progenitor Cells." *Calcif Tissue Int* 72, no. 2 (2003): 135-42.
- Rosset, P., F. Deschaseaux and P. Layrolle. "Cell Therapy for Bone Repair." *Orthop Traumatol Surg Res* 100, no. 1 Suppl (2014): S107-12.
- Rubsam, L. Z., P. D. Boucher, P. J. Murphy, M. KuKuruga and D. S. Shewach. "Cytotoxicity and Accumulation of Ganciclovir Triphosphate in Bystander Cells Cocultured with Herpes Simplex Virus Type 1 Thymidine Kinase-Expressing Human Glioblastoma Cells." *Cancer Res* 59, no. 3 (1999): 669-75.

- Rudin, M. *Molecular Imaging: Basic Principles and Applications in Biomedical Research*: Imperial College Press, 2013.
- Ruggiero, A., D. L. Thorek, J. Guenoun, G. P. Krestin and M. R. Bernsen. "Cell Tracking in Cardiac Repair: What to Image and How to Image." *Eur Radiol* 22, no. 1 (2012): 189-204.
- Sacchetti, B., A. Funari, S. Michienzi, S. Di Cesare, S. Piersanti, I. Saggio, E. Tagliafico, S. Ferrari, P. G. Robey, M. Riminucci and P. Bianco. "Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment." *Cell* 131, no. 2 (2007): 324-36.
- Salomon, B., S. Maury, L. Loubiere, M. Caruso, R. Onclercq and D. Klatzmann. "A Truncated Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Phosphorylates Thymidine and Nucleoside Analogs and Does Not Cause Sterility in Transgenic Mice." *Mol Cell Biol* 15, no. 10 (1995): 5322-8.
- Saritas, E. U., P. W. Goodwill, L. R. Croft, J. J. Konkle, K. Lu, B. Zheng and S. M. Conolly. "Magnetic Particle Imaging (Mpi) for Nmr and Mri Researchers." *J Magn Reson* 229, (2013): 116-26.
- Schaefer, DJ, C Klemt, XH Zhang and GB Stark. "[Tissue Engineering with Mesenchymal Stem Cells for Cartilage and Bone Regeneration]." *Der Chirurg; Zeitschrift fur alle Gebiete der operativen Medizen* 71, no. 9 (2000): 1001-1008.
- Schnabel, L. V., M. E. Lynch, M. C. van der Meulen, A. E. Yeager, M. A. Kornatowski and A. J. Nixon. "Mesenchymal Stem Cells and Insulin-Like Growth Factor-I Gene-Enhanced Mesenchymal Stem Cells Improve Structural Aspects of Healing in Equine Flexor Digitorum Superficialis Tendons." *J Orthop Res* 27, no. 10 (2009): 1392-8.
- Schneiders, W., A. Reinstorf, M. Ruhnnow, S. Rehberg, J. Heineck, I. Hinterseher, A. Biewener, H. Zwipp and S. Rammelt. "Effect of Chondroitin Sulphate on Material Properties and Bone Remodelling around Hydroxyapatite/Collagen Composites." *J Biomed Mater Res A* 85, no. 3 (2008): 638-45.
- Schreckenberger, M., S. Hagele, T. Siessmeier, H. G. Buchholz, H. Armbrust-Henrich, F. Rosch, G. Grunder, P. Bartenstein and T. Vogt. "The Dopamine D2 Receptor Ligand 18f-Desmethoxyfallypride: An Appropriate Fluorinated Pet Tracer for the Differential Diagnosis of Parkinsonism." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31, no. 8 (2004): 1128-35.
- Schwartz, R. E., M. Reyes, L. Koodie, Y. Jiang, M. Blackstad, T. Lund, T. Lenvik, S. Johnson, W. S. Hu and C. M. Verfaillie. "Multipotent Adult Progenitor Cells from Bone Marrow Differentiate into Functional Hepatocyte-Like Cells." *J Clin Invest* 109, no. 10 (2002): 1291-302.
- Serakinci, N., P. Guldberg, J. S. Burns, B. Abdallah, H. Schroder, T. Jensen and M. Kassem. "Adult Human Mesenchymal Stem Cell as a Target for Neoplastic Transformation." *Oncogene* 23, no. 29 (2004): 5095-8.
- Shah, K. and R. Weissleder. "Molecular Optical Imaging: Applications Leading to the Development of Present Day Therapeutics." *NeuroRx* 2, no. 2 (2005): 215-25.
- Shake, J. G., P. J. Gruber, W. A. Baumgartner, G. Senechal, J. Meyers, J. M. Redmond, M. F. Pittenger and B. J. Martin. "Mesenchymal Stem Cell Implantation in a Swine Myocardial Infarct Model: Engraftment and Functional Effects." *Ann Thorac Surg* 73, no. 6 (2002): 1919-25; discussion 1926.

- Sharma, V., G. D. Luker and D. Piwnica-Worms. "Molecular Imaging of Gene Expression and Protein Function in Vivo with Pet and Spect." *J Magn Reson Imaging* 16, no. 4 (2002): 336-51.
- Simmons, P. J. and B. Torok-Storb. "Identification of Stromal Cell Precursors in Human Bone Marrow by a Novel Monoclonal Antibody, Stro-1." *Blood* 78, no. 1 (1991): 55-62.
- Simonsen, J. L., C. Rosada, N. Serakinci, J. Justesen, K. Stenderup, S. I. Rattan, T. G. Jensen and M. Kassem. "Telomerase Expression Extends the Proliferative Life-Span and Maintains the Osteogenic Potential of Human Bone Marrow Stromal Cells." *Nat Biotechnol* 20, no. 6 (2002): 592-6.
- Singer, N. G. and A. I. Caplan. "Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Inflammation." *Annu Rev Pathol* 6, (2011): 457-78.
- Somoza, R. A., D. Correa and A. I. Caplan. "Roles for Mesenchymal Stem Cells as Medicinal Signaling Cells." *Nature Protocols* 11, no. 1 (2016).
- Stenderup, K., J. Justesen, C. Clausen and M. Kassem. "Aging Is Associated with Decreased Maximal Life Span and Accelerated Senescence of Bone Marrow Stromal Cells." *Bone* 33, no. 6 (2003): 919-26.
- Swart, J. F., S. de Roock, F. M. Hofhuis, H. Rozemuller, T. van den Broek, P. Moerer, F. Broere, F. van Wijk, W. Kuis, B. J. Prakken, A. C. Martens and N. M. Wulffraat. "Mesenchymal Stem Cell Therapy in Proteoglycan Induced Arthritis." *Ann Rheum Dis* 74, no. 4 (2015): 769-77.
- Tatebe, M., R. Nakamura, H. Kagami, K. Okada and M. Ueda. "Differentiation of Transplanted Mesenchymal Stem Cells in a Large Osteochondral Defect in Rabbit." *Cytotherapy* 7, no. 6 (2005): 520-30.
- Templin, C., R. Zweigerdt, K. Schwanke, R. Olmer, J. R. Ghadri, M. Y. Emmert, E. Muller, S. M. Kuest, S. Cohrs, R. Schibli, P. Kronen, M. Hilbe, A. Reinisch, D. Strunk, A. Haverich, S. Hoerstrup, T. F. Luscher, P. A. Kaufmann, U. Landmesser and U. Martin. "Transplantation and Tracking of Human-Induced Pluripotent Stem Cells in a Pig Model of Myocardial Infarction: Assessment of Cell Survival, Engraftment, and Distribution by Hybrid Single Photon Emission Computed Tomography/Computed Tomography of Sodium Iodide Symporter Transgene Expression." *Circulation* 126, no. 4 (2012): 430-9.
- Terrovitis, J., K. F. Kwok, R. Lautamaki, J. M. Engles, A. S. Barth, E. Kizana, J. Miake, M. K. Leppo, J. Fox, J. Seidel, M. Pomper, R. L. Wahl, B. Tsui, F. Bengel, E. Marban and M. R. Abraham. "Ectopic Expression of the Sodium-Iodide Symporter Enables Imaging of Transplanted Cardiac Stem Cells in Vivo by Single-Photon Emission Computed Tomography or Positron Emission Tomography." *J Am Coll Cardiol* 52, no. 20 (2008): 1652-60.
- Terrovitis, J. V., R. R. Smith and E. Marban. "Assessment and Optimization of Cell Engraftment after Transplantation into the Heart." *Circ Res* 106, no. 3 (2010): 479-94.
- Timmins, N. E., M. Kiel, M. Gunther, C. Heazlewood, M. R. Doran, G. Brooke and K. Atkinson. "Closed System Isolation and Scalable Expansion of Human Placental Mesenchymal Stem Cells." *Biotechnol Bioeng* 109, no. 7 (2012): 1817-26.

- Tjuvajev, J. G., N. Avril, T. Oku, T. Sasajima, T. Miyagawa, R. Joshi, M. Safer, B. Beattie, G. DiResta, F. Daghighian, F. Augensen, J. Koutcher, J. Zweit, J. Humm, S. M. Larson, R. Finn and R. Blasberg. "Imaging Herpes Virus Thymidine Kinase Gene Transfer and Expression by Positron Emission Tomography." *Cancer Res* 58, no. 19 (1998): 4333-41.
- Tuan, R. S., G. Boland and R. Tuli. "Adult Mesenchymal Stem Cells and Cell-Based Tissue Engineering." *Arthritis Res Ther* 5, no. 1 (2003): 32-45.
- Van Damme, A., L. Thorrez, L. Ma, H. Vandeburgh, J. Eyckmans, F. Dell'Accio, C. De Bari, F. Luyten, D. Lillcrap, D. Collen, T. VandenDriessche and M. K. Chuah. "Efficient Lentiviral Transduction and Improved Engraftment of Human Bone Marrow Mesenchymal Cells." *Stem Cells* 24, no. 4 (2006): 896-907.
- Villa, C., S. Erratico, P. Razini, F. Fiori, F. Rustichelli, Y. Torrente and M. Belicchi. "Stem Cell Tracking by Nanotechnologies." *Int J Mol Sci* 11, no. 3 (2010): 1070-81.
- von der Haar, K., A. Lavrentieva, F. Stahl, T. Scheper and C. Blume. "Lost Signature: Progress and Failures in in Vivo Tracking of Implanted Stem Cells." *Appl Microbiol Biotechnol* 99, no. 23 (2015): 9907-22.
- Warlich, M., K. Weber, H. Wege, A. W. Lohse, B. Fehse and D. Bente. "Effizienter Lentiviraler Ex-Vivo Gentransfer in Leberzellen Für Die Zelltransplantation." *Z Gastroenterol* 48, no. 01 (2010): P2_87.
- Wei, C. C., A. B. Lin and S. C. Hung. "Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine for Musculoskeletal Diseases: Bench, Bedside, and Industry." *Cell Transplant* 23, no. 4-5 (2014): 505-12.
- Williams, A. R. and J. M. Hare. "Mesenchymal Stem Cells: Biology, Pathophysiology, Translational Findings, and Therapeutic Implications for Cardiac Disease." *Circ Res* 109, no. 8 (2011): 923-40.
- Williams, J. T., S. S. Southerland, J. Souza, A. F. Calcutt and R. G. Cartledge. "Cells Isolated from Adult Human Skeletal Muscle Capable of Differentiating into Multiple Mesodermal Phenotypes." *Am Surg* 65, no. 1 (1999): 22-6.
- Wolfs, E., B. Holvoet, R. Gijssbers, C. Casteels, S. J. Roberts, T. Struys, M. Maris, A. Ibrahim, Z. Debyser, K. Van Laere, C. M. Verfaillie and C. M. Deroose. "Optimization of Multimodal Imaging of Mesenchymal Stem Cells Using the Human Sodium Iodide Symporter for Pet and Cerenkov Luminescence Imaging." *PLoS One* 9, no. 4 (2014): e94833.
- Wu, C., J. Li, P. Pang, J. Liu, K. Zhu, D. Li, D. Cheng, J. Chen, X. Shuai and H. Shan. "Polymeric Vector-Mediated Gene Transfection of Mscs for Dual Bioluminescent and Mri Tracking in Vivo." *Biomaterials* 35, no. 28 (2014): 8249-60.
- Wu, J. C., M. Inubushi, G. Sundaresan, H. R. Schelbert and S. S. Gambhir. "Optical Imaging of Cardiac Reporter Gene Expression in Living Rats." *Circulation* 105, no. 14 (2002): 1631-4.
- Wu, J. C., G. Sundaresan, M. Iyer and S. S. Gambhir. "Noninvasive Optical Imaging of Firefly Luciferase Reporter Gene Expression in Skeletal Muscles of Living Mice." *Mol Ther* 4, no. 4 (2001): 297-306.

- Xian, C. J. and B. K. Foster. "Repair of Injured Articular and Growth Plate Cartilage Using Mesenchymal Stem Cells and Chondrogenic Gene Therapy." *Curr Stem Cell Res Ther* 1, no. 2 (2006): 213-29.
- Yaghoubi, S. S., D. O. Campbell, C. G. Radu and J. Czernin. "Positron Emission Tomography Reporter Genes and Reporter Probes: Gene and Cell Therapy Applications." *Theranostics* 2, no. 4 (2012): 374-91.
- Yakushev, I. Y., E. Dupont, H. G. Buchholz, J. Tillmanns, F. Debus, P. Cumming, A. Heimann, A. Fellgiebel, H. J. Luhmann, C. Landvogt, K. J. Werhahn, M. Schreckenberger, H. Potschka and P. Bartenstein. "In Vivo Imaging of Dopamine Receptors in a Model of Temporal Lobe Epilepsy." *Epilepsia* 51, no. 3 (2010): 415-22.
- Youn, H. and J. K. Chung. "Reporter Gene Imaging." *AJR Am J Roentgenol* 201, no. 2 (2013): W206-14.
- Young, H. E., T. A. Steele, R. A. Bray, J. Hudson, J. A. Floyd, K. Hawkins, K. Thomas, T. Austin, C. Edwards, J. Cuzzourt, M. Duenzl, P. A. Lucas and A. C. Black, Jr. "Human Reserve Pluripotent Mesenchymal Stem Cells Are Present in the Connective Tissues of Skeletal Muscle and Dermis Derived from Fetal, Adult, and Geriatric Donors." *Anat Rec* 264, no. 1 (2001): 51-62.
- Yu, Y., A. J. Annala, J. R. Barrio, T. Toyokuni, N. Satyamurthy, M. Namavari, S. R. Cherry, M. E. Phelps, H. R. Herschman and S. S. Gambhir. "Quantification of Target Gene Expression by Imaging Reporter Gene Expression in Living Animals." *Nat Med* 6, no. 8 (2000): 933-7.
- Zaidi, H. "Navigating Beyond the 6th Dimension: A Challenge in the Era of Multi-Parametric Molecular Imaging." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 36, no. 7 (2009): 1025-8.
- Zhang, H., X. Zheng, X. Yang, S. Fang, G. Shen, C. Zhao and M. Tian. "¹¹C-Nmsp/ ¹⁸F-Fdg Micropet to Monitor Neural Stem Cell Transplantation in a Rat Model of Traumatic Brain Injury." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35, no. 9 (2008): 1699-708.
- Zhao, L. R., W. M. Duan, M. Reyes, C. D. Keene, C. M. Verfaillie and W. C. Low. "Human Bone Marrow Stem Cells Exhibit Neural Phenotypes and Ameliorate Neurological Deficits after Grafting into the Ischemic Brain of Rats." *Exp Neurol* 174, no. 1 (2002): 11-20.
- Zhou, R., P. D. Acton and V. A. Ferrari. "Imaging Stem Cells Implanted in Infarcted Myocardium." *J Am Coll Cardiol* 48, no. 10 (2006): 2094-106.
- Zimmermann, S., M. Voss, S. Kaiser, U. Kapp, C. F. Waller and U. M. Martens. "Lack of Telomerase Activity in Human Mesenchymal Stem Cells." *Leukemia* 17, no. 6 (2003): 1146-9.
- Zipori, D. "The Stem State: Plasticity Is Essential, Whereas Self-Renewal and Hierarchy Are Optional." *Stem Cells* 23, no. 6 (2005): 719-26.
- Zuk, P. A., M. Zhu, P. Ashjian, D. A. De Ugarte, J. I. Huang, H. Mizuno, Z. C. Alfonso, J. K. Fraser, P. Benhaim and M. H. Hedrick. "Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells." *Mol Biol Cell* 13, no. 12 (2002): 4279-95.
- Zuk, P. A., M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, A. J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz and M. H. Hedrick. "Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies." *Tissue Eng* 7, no. 2 (2001): 211-28.

Zvaifler, N. J., L. Marinova-Mutafchieva, G. Adams, C. J. Edwards, J. Moss, J. A. Burger and R. N. Maini. "Mesenchymal Precursor Cells in the Blood of Normal Individuals." *Arthritis Res* 2, no. 6 (2000): 477-88.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ad	Dazu
APS	Adenosinphosphosulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BLI	Biolumineszenzbildgebung (englisch: Bioluminescence imaging)
Br	Brom
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
BP	Bindungspotential
C	Kohlenstoff
Ca ²⁺	Calcium
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLI	Cerenkov Lumineszenzbildgebung (englisch: Cerenkov luminescence imaging)
CMV	Cytomegalievirus
cpg	5'-Cytosin-Phosphat-Guanin-3'
DAPI	Diamidinpenylindol
D2R	Dopamin 2 Rezeptor
DEPC	Diethyldicarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	Englisch: enhanced green fluorescent protein
ELISA	Englisch: Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F	Fluor
FACS	Englisch: Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetales Kälberserum (englisch: fetal bovine serum)
FC	Abgeflachte Zellen (englisch: flat cells)
FFP	Feldfreier Punkt, Nullstelle (englisch: field-free point)
FLI	Fluoreszenzbildgebung (englisch: fluorescence imaging)

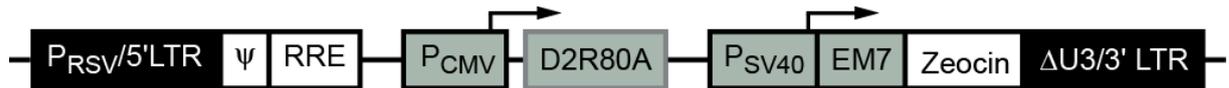
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCV	Ganciclovir
GOT	Glasobjektträger
HCl	Chlorwasserstoff
hD2R	Humaner Dopamin-2-Rezeptor (englisch: human dopamine D2 receptor)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus (englisch: human immunodeficiency virus)
H ₂ O	Wasser
hMSC	Humane mesenchymale Stammzelle (englisch: human mesenchymal stem cell)
HRP	Meerrettichperoxidase
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HSV1	Humanes simplex Virus 1
hTERT	Humane Telomerase Reverse Transkriptase
I	Iod
i.m.	Intramuskulär
i.p.	Intraperitoneal
KCl	Kaliumchlorid
M	Molar
MBq	Megabecquerel
mM	Millimol
mA	Milliampere
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MPI	Magnetpartikelbildgebung (englisch: magnetic particle imaging)
mRFP	Monomer rot fluoreszierendes Protein (englisch: monomeric red fluorescent protein)
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
nM	Nanomol
OD	Optische Dichte
OP	Operation
PET	Positronenemissionstomographie
pH	pH-Wert
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (englisch: phosphate buffered saline)
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
RIPA-Puffer	Radioimmunoprecipitation assay- Puffer

rpm	Umdrehungen pro Minute (englisch: revolutions per minute)
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s.	siehe
SCP	Englisch: Single cell picked
SDS	Natriumdodecylsulfat (englisch: sodium dodecyl sulfate)
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TBS-T	Englisch: TRIS-buffered Saline
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TK	Thymidinkinase
UV	Ultraviolett
V	Volt
WST	Wasserlösliches Tetrazoliumsalz (englisch: water-soluble tetrazolium salt)
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein (englisch: Yellow-fluorescent protein)

8 Anhang

8.1 Vektorkarten

8.1.1 D2R80A



8.1.2 Δ45-HSV1-TK-eGFP



8.2 RT-PCR-Programme

8.2.1 Programm für die cDNA-Synthese

Temperatur	Dauer
25 °C	10 Minuten
50 °C	50 Minuten
85 °C	5 Minuten
4 °C	forever

8.2.2 Programm für die Polymerasekettenreaktion

GAPDH

Temperatur	Dauer
(1) 95 °C	4 Minuten
(2) 95 °C	30 Sekunden
(3) 50 °C	30 Sekunden
(4) 72 °C	1 Minute
(5) 72 °C	10 Minuten
(6) 4 °C	forever

D2R80A

Temperatur	Dauer
(1) 95 °C	4 Minuten
(2) 95 °C	30 Sekunden
(3) 58,8 °C	30 Sekunden
(4) 72 °C	1 Minute
(5) 72 °C	10 Minuten
(6) 4 °C	forever

 Δ 45-HSV1-TK-eGFP

Temperatur	Dauer
(1) 95 °C	4 Minuten
(2) 95 °C	30 Sekunden
(3) 55 °C	30 Sekunden
(4) 72 °C	1 Minute
(5) 72 °C	10 Minuten
(6) 4 °C	forever

Schritt 2-4: 30 Zyklen

9 Publikation

Schönitzer, V., F. Haasters, **S. Käsbauer**, V. Ulrich, E. Mille, F. J. Gildehaus, J. Carlsen, M. Pape, R. Beck, A. Delker, G. Boning, W. Mutschler, W. Böcker, M. Schieker and P. Bartenstein.

"In vivo mesenchymal stem cell tracking with PET using the dopamine type 2 receptor and 18 F-fallypride." J Nucl Med 55, no. 8 (2014): 1342-7

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei allen bedanken, die mitgewirkt haben diese Doktorarbeit fertig zu stellen.

Vielen Dank an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker, der durch seine Anregungen und Ideen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Veronika Schönitzer. Durch ihre Ratschläge, ihre Anregungen und ihr Fachwissen hat sie mir zu jedem Zeitpunkt ihre kompetente und herzliche Unterstützung zukommen lassen.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Matthias Schiecker für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Geräte des ExperiMed-Labors und der Unterstützung bedanken. Auch dem gesamten Laborteam möchte ich für die gute Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und die stets tolle Atmosphäre danken.

Für die gut funktionierende Kooperation zwischen PD Dr. med. Florian Haasters (Durchführung der Operationen an den Nacktratten), der Nuklearmedizin Großhadern (Bereitstellung der radioaktiven Tracer, Dipl. Chem. Dr. rer. medic. Franz Josef Gildehaus) und dem ExperiMed-Labor möchte ich mich auch bedanken. Für die Betreuung der Labortiere möchte ich Frau Dr. med. vet. Janette M. Carlsen ein Dankeschön aussprechen.

Zum Schluss möchte ich ganz besonders meiner Familie danken, die mich stets in meiner Arbeit unterstützt hat.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung und Zelltracking von Reporter-gen-tragenden humanen mesenchymalen Stammzellen“ selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ingolstadt, 25.05.2020

Stefanie Elisabeth Wotzlaw