

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
Muskuloskelettales Universitätszentrum München
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Böcker

**Etablierung von BMP-überexprimierenden
humanen mesenchymalen Stammzellen
für die zelltherapeutische Anwendung**

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

vorgelegt von

Aminaa Sanchin

aus Halle (Saale)

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Mehdi Shakibaei

Prof. Dr. med. Christian Ries

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

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.10.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Knochenheilung	1
1.2	Vorkommen und Struktur von knochenmorphogenetischen Proteinen (BMPs).....	4
1.3	Rolle von BMPs in der Frakturheilung	6
1.4	Humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs).....	8
1.5	Nicht-viraler Gentransfer.....	10
1.6	Zielsetzung	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Chemikalien	15
2.1.2	Pufferlösungen	17
2.1.3	Enzyme	18
2.1.4	Organismen	18
2.1.5	Medien für Bakterienkulturen	19
2.1.6	Gene und Vektoren	20
2.1.7	Nährmedium und Materialien für Zellkultur.....	21
2.1.8	Standards.....	22
2.1.9	Oligonukleotide	22
2.1.9.1	PCR-Primer	22
2.1.9.2	Sequenzierprimer.....	23
2.1.10	Kits.....	23
2.1.11	Geräte.....	24
2.1.12	Software	25
2.2	Methoden	27
2.2.1	Mikrobiologische Methoden	27
2.2.1.1	Bakterienkultivierung auf Agarplatten	27
2.2.1.2	Bakterienkultivierung im Flüssigmedium	27
2.2.1.3	Kryokonservierung von Bakterienkulturen.....	28
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	28
2.2.2.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	28
2.2.2.2	Transformation in <i>E. coli</i> -Zellen	29
2.2.2.3	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	29
2.2.2.4	Restriktionsverdau von DNA.....	30

2.2.2.5	Gelelektrophorese	30
2.2.2.6	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	31
2.2.2.7	DNA-Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	31
2.2.2.8	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	32
2.2.2.9	Calf-Intestinal-Phosphatase (CIP)	33
2.2.2.10	Ligation von DNA.....	34
2.2.2.11	DNA-Sequenzierung.....	34
2.2.2.12	Nicht-virale Transfektion	34
2.2.2.13	„sleeping beauty“-Transposon-System.....	35
2.2.2.14	Elektroporation	35
2.2.3	Zellkultur.....	36
2.2.3.1	Auftauen von hMSCs.....	36
2.2.3.2	Medienwechsel bei hMSCs mit Standardmedium.....	36
2.2.3.3	Medienwechsel bei der adipogenen Differenzierung	37
2.2.3.4	Passagieren von hMSCs	37
2.2.3.5	Kryokonservierung von hMSCs	38
2.2.4	Expressions- und Aktivitätsbestimmung der BMPs	38
2.2.4.1	RT-PCR.....	38
2.2.4.2	BMP-ELISA.....	39
2.2.4.3	BMP-Reporterzellassay	39
2.2.5	Histologische Methoden	39
2.2.5.1	Zellfixierung mit Formalin vor Anwendung des BODIPY- Fluoreszenzfarbstoffs	39
2.2.5.2	Nachweis von Triglyceriden mittels BODIPY-Fluoreszenzfarbstoffs.....	40
2.2.6	Statistik.....	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Herstellung der BMP-überexprimierenden Zellen	41
3.1.1	Klonierungsstrategien	41
3.1.2	Klonierungsstrategie von pSBbi-GP-hBMP2.....	41
3.1.3	Klonierungsstrategie von pSBbi-GP-hBMP4.....	43
3.1.4	Klonierungsstrategie von pSBbi-GP-hBMP7.....	44
3.1.5	Klonierungsstrategie von pSBbi-GP-hBMP2/7	46
3.1.6	Klonierungsstrategie von pSBbi-GP-hBMP4/7	48
3.2	Charakterisierung der BMP-überexprimierenden Zellen	50
3.2.1	Nachweis der Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS	50
3.2.2	Nachweis der Expression auf RNA-Ebene	54

3.2.3	Nachweis der Expression mittels BMP-ELISA.....	56
3.2.4	Untersuchung der Proteinaktivität mittels BMP-Reporterzellassay.....	57
3.2.5	Adipogene Differenzierung	58
4	Diskussion	61
4.1	Herstellung Zelllinien	61
4.2	BMP-Überexpression.....	62
4.3	BMP-Bioaktivität.....	64
4.4	Einfluss von BMP auf die adipogene Differenzierungskapazität von hMSCs	66
4.5	Ausblick.....	67
5	Zusammenfassung	70
6	Literaturverzeichnis	74
	Abkürzungsverzeichnis.....	81
	Anhang.....	83
	Danksagung	90
	Eidesstattliche Versicherung.....	91

1 Einleitung

1.1 Knochenheilung

Knochen bildet als spezielle Unterform des Bindegewebes den Hauptbestandteil des passiven Bewegungs- und Stützapparats. Zusätzlich schützt er innere Organe wie Gehirn, Rückenmark, Herz und Lunge, dient der Hämatopoese und übernimmt eine Speicherfunktion für Mineralien. Die Therapie von Verletzungen des Skelettsystems zum Erhalt der o. g. lebenswichtigen Funktionen des Knochens fällt in die Domäne der Unfallchirurgie und Orthopädie. Bereits im 19. Jahrhundert war der Effekt biomechanischer Belastung auf die trabekuläre Knochenstruktur bekannt, als der deutsche Chirurg Julius Wolff (1836-1902) das „Wolffsche Gesetz der Transformation der Knochen“ 1892 postulierte. Wolff erkannte als Pionier auf dem Gebiet der orthopädischen Chirurgie den Zusammenhang mechanischer Einflüsse auf die innere Knochengeometrie: Belasteter Knochen nimmt an Knochendichte und Festigkeit zu, nicht oder kaum belasteter Knochen wird hingegen abgebaut. Das Überschreiten der Überlastungsgrenze resultiert in einer Fraktur – der Knochen bricht.

Für gewöhnlich heilen die meisten Knochenbrüche innerhalb weniger Wochen. Eine Besonderheit des Knochens ist – im Gegensatz zu vielen anderen Geweben, die als Narbengewebe von minderer funktionaler Qualität ausheilen – seine Fähigkeit, sich vollständig zu regenerieren. Hierbei wird die primäre von der sekundären Knochenheilung unterschieden. Erstere ist nur bei eng adaptierten Frakturen möglich wie beispielsweise nach plattenosteosynthetischer Versorgung mit Kompression der Frakturen (Schenk und Willenegger, 1971, McKibbin et. al, 1978). Bei der primären oder direkten Knochenheilung kommt es nicht zur Bildung eines äußeren Kallus, die Havers-Kanäle der Osteone beider Frakturen wachsen aufeinander zu und fusionieren. Die sekundäre oder indirekte Knochenheilung ist die deutlich häufigere Form der Frakturheilung und kommt bei Stabilisierung durch Anlage eines Gipses, Fixateurs externe oder Einbringen eines Marknagels vor (Perren et. al, 2002). Hierbei wird das Umgebungshämatom durch ein Granulationsgewebe ersetzt; Chondroblasten wandern ein und führen zur Faserknorpelbildung. Das Knorpelgewebe verknöchert durch osteoblastisch differenzierte mesenchymale Stammzellen. Dieser Kallus wird durch Mineralisation verhärtet und es

entsteht der Geflechtknochen, welcher seinerseits durch einen Kochenumbauprozess zu lamellärem Knochen umgewandelt wird (McKibbin et. al, 1978).

Für eine erfolgreiche Knochenheilung sind nach dem „diamond concept“ folgende vier Faktoren notwendig: Osteogenese, Osteoinduktion, Osteokonduktion und mechanische Stabilität (Giannoudis et al., 2007). Für die Osteogenese wird eine geeignete zelluläre Umgebung benötigt: mesenchymale Stammzellen mit ihrer Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung. Im Umgebungshämatom der Fraktur sind die Anwesenheit sowie der osteoinduktive Effekt von zahlreichen Signal- bzw. Wachstumsfaktoren bekannt, insbesondere „bone morphogenetic proteins“ (BMPs). Osteokonduktion bezeichnet die Fähigkeit eines Gerüstmaterials als Leitschiene für Knochenanbau zu dienen. Die mechanische Stabilität wird durch diverse Osteosyntheseverfahren erreicht. Eine Störung des Zusammenspiels von biologischen und mechanischen Komponenten beeinträchtigt den komplexen, physiologischen Verlauf der Knochenheilung. Zudem unterliegt der Knochen als vitales, durchblutetes Organ kontinuierlichen Remodellierungsprozessen.

Knochenbildung und Knochenresorption führen als dynamische Prozesse zu einem Ersatz von etwa 10 % Knochen im Jahr und einer kompletten Auswechslung etwa alle 10 Jahre (Cohen 2006). Essentiell für die Knochenhomöostase ist das Gleichgewicht zwischen substanzaufbauenden Osteoblasten und substanzabbauenden Osteoklasten. Die mehrere Wochen andauernde Remodellierung des Knochens umfasst fünf Phasen: Aktivierung, Resorption, Umschaltphase, Knochenformation und Abschluss der Mineralisierung (s. Abb. 1.1). Gruppen von Osteoklasten und Osteoblasten organisieren sich temporär als multizelluläre Grundeinheit (BMU, engl.: basic multicellular unit) (Frost 1983). Diese sind von einer Zellschicht bedeckt, von der angenommen wird, dass sie eine geeignete Mikroumgebung für die gekoppelte osteoklastische Resorption und osteoblastische Formation schafft (Hauge, Qvesel et al. 2001, Andersen, Sondergaard et al. 2009).

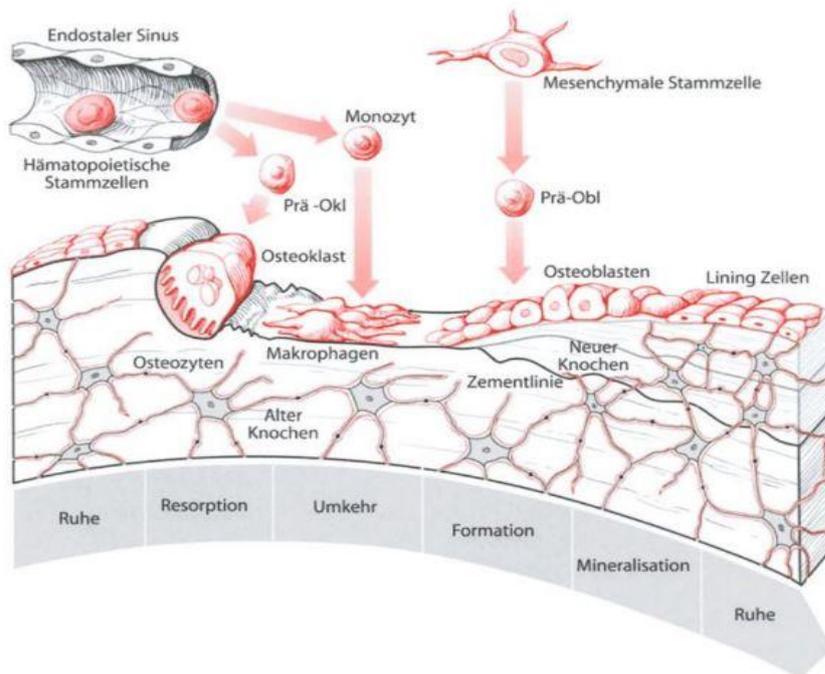


Abb. 1.1: Die Knochenhomöostase ist charakterisiert durch das essentielle Gleichgewicht zwischen substanzaufbauenden Osteoblasten und substanzabbauenden Osteoklasten. Die Remodellierung des Knochens ist in fünf Phasen eingeteilt: Aktivierung aus der Ruhephase, Resorption, Umschaltphase, Knochenformation und Abschluss der Mineralisierung (Bartl R. und Bartl C., 2004).

Bei einem Missverhältnis zwischen Osteogenese und Osteolyse mit einem Überwiegen des Substanzabbaus spricht man von Osteoporose: Sie ist durch eine gestörte Trabekelmikroarchitektur und eine verringerte Knochenmasse gekennzeichnet. Diese negative Knochenbilanz erhöht die Frakturanfälligkeit enorm. In Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei der Osteoporose um die häufigste Knochenerkrankung weltweit handelt und geschätzt 50 % der Frauen und 20 % der Männer über 50 Jahre eine Osteoporose-bedingte Fraktur erleiden, gewinnt die adäquate Therapie solcher oft schwer heilenden Frakturen an immenser Bedeutung (Coughlan and Dockery 2014). Von unumstrittener Wichtigkeit sind Maßnahmen der primären und sekundären Prävention wie Ernährungs-, Lebensstiländerung und Pharmakotherapie. Jedoch sind pathologische Frakturen nicht selten das Schlüsselereignis in der Feststellung einer Osteoporose – dann sind Maßnahmen der tertiären Prävention vorrangig, wie bereits bestehende Frakturen zu therapieren. Allerdings kann Osteoporose als systemische Knochenerkrankung die Frakturheilung verzögern.

Bei einer verzögerten oder ausbleibenden Frakturheilung spricht man nach einem Zeitraum von sechs Monaten von einer Pseudarthrose (im engl. Sprachraum „non union“). Diese unzureichende knöcherne Konsolidierung wird in etwa bei 10 % aller Frakturen beobachtet,

bei offenen Tibiafrakturen wird diese Rate sogar auf bis zu 50 % geschätzt (Ronga, Fagetti et al. 2013). Durch das ungenügende Zusammenwachsen der Frakturrenden kann der Knochen seine physiologische Stützfunktion nicht übernehmen, so dass Pseudarthrosen häufig mit einer eingeschränkten Arbeitsfähigkeit und sportlichen Belastbarkeit des Patienten einhergehen. Durch die oftmals lange Erkrankungsdauer – unter Umständen mit der Entwicklung eines chronischen Schmerzsyndroms – entstehen hohe Kosten für das Gesundheitssystem. Bisheriger Therapiestandard zur Behandlung von vor allem atrophen, avitalen Pseudarthrosen ist die Knochentransplantation, in Kombination mit einer osteosynthetischen Stabilisierung. Es handelt sich in der Mehrzahl der Fälle um ein autologes Knochentransplantat aus dem Beckenkamm. Dies ist offensichtlich durch die geringe Verfügbarkeit von Donorgewebe limitiert; zudem sind Infektion, Taubheitsgefühl und Schmerzen an der Knochenspanentnahmestelle unerwünschte Nebeneffekte (Braddock, Houston et al. 2001). Diese Einschränkungen erfordern neuartige Therapieansätze zur Stimulation der Knochenregeneration bei komplexen Frakturen.

Es ist bekannt, dass eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren wie BMPs (engl.: bone morphogenetic proteins), TGFs- β (engl.: transforming growth factor- β), IGFs (engl.: insulin-like growth factor), PDGFs (engl.: platelet-derived growth factor), FGFs (engl.: fibroblastic growth factors) (Bourque, Gross et al. 1993) sowie VEGFs (engl.: vascular endothelial growth factor) (Collin-Osdoby 1994) physiologisch in die Frakturheilung involviert sind. Hierbei kommt den BMPs, deren Funktionen in der vorliegenden Arbeit beleuchtet werden, eine Schlüsselrolle zu. Es wurde gezeigt, dass bei Pseudarthrosen lediglich eine geringe oder gar keine Expression o.g. Wachstumsfaktoren stattfindet – pathophysiologisch führt ein Mangel dieser Faktoren zu einer beeinträchtigten Frakturheilung (Southwood, Frisbie et al. 2004).

1.2 Vorkommen und Struktur von knochenmorphogenetischen Proteinen (BMPs)

Knochenmorphogenetische Proteine (engl.: bone morphogenetic proteins, BMPs) sind Wachstumsfaktoren mit vielfältigen Funktionen und bilden eine Untergruppe der TGF- β -Superfamilie (Chen, Zhao et al. 2004). 1965 wurde bereits die Aktivität einer bisher unbekannt Gruppe von Proteinen und ihre Bedeutung für die Knochenbildung nachgewiesen: Urist erzeugte eine ektope Knochenneubildung in Kaninchen-Muskelgewebe durch Zugabe eines entmineralisierten Knochenpulvers (Urist 1965). Diese Proteine wurden

als BMPs identifiziert (Wozney, Rosen et al. 1988), derzeit sind über 20 BMP-Typen charakterisiert (Chen, Zhao et al. 2004, da Silva Madaleno, Jatzlau et al. 2020). BMPs wurden nach ihrem ursprünglich entdecktem osteoinduktiven und chondroinduktiven Effekt benannt, spielen jedoch auch in diversen Entwicklungsprozessen wie beispielsweise in der Embryogenese eine fundamentale Rolle. So ist BMP4 in für die Neurulation wichtige Signalwege involviert (Munoz-Sanjuan and Brivanlou 2002), BMP2 begünstigt die Entwicklung bestimmter Neuronentypen aus neuronalen Stammzellen (Yan, Chen et al. 2016) und inhibiert die myogene Differenzierung *in vitro* (Yamaguchi, Katagiri et al. 1991). Der BMP-Signalweg führt durch Apoptose zur Entwicklung der Finger aus dem Handteller (Zou H et. al, 1996).

BMPs werden unter anderem von Osteoblasten als Präkursorprotein mit einer Länge von 400-500 Aminosäuren synthetisiert. Dieses Vorläuferprotein besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid und einem C-terminalen Propeptid, welches mit dem reifen Protein verbunden ist. Das reife Protein weist als strukturelle Gemeinsamkeit aller Mitglieder der TGF- β -Superfamilie einen aus zehn Aminosäuren bestehenden Cystin-Knoten auf. In der Anordnung des Cystin-Knotens fallen drei besondere Bereiche auf (s. Abb. 1.2): zwei Paare antiparalleler β -Stränge, die aufgrund ihrer Gruppierung als „Finger“ bezeichnet werden und eine α -Helix, der sog. „wrist“- Region (engl. für Handgelenk). Zur Interaktion mit Rezeptoren formen die gekrümmten β -Stränge jeweils eine konkave oder konvexe Oberfläche (Lin, Lerch et al. 2006).

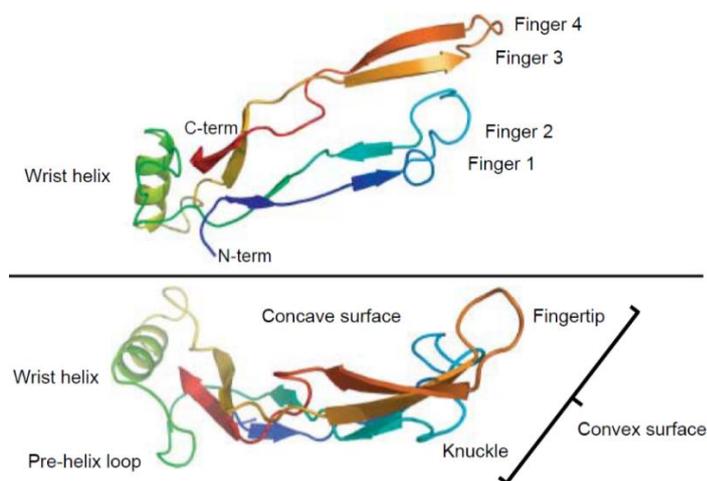


Abb. 1.2: Charakteristische Tertiärstruktur eines BMPs. Strukturelle Gemeinsamkeit aller Mitglieder der TGF- β -Superfamilie ist der aus zehn Aminosäuren bestehende Cystin-Knoten. Hierbei fallen drei charakteristische Bereiche auf: zwei Paare antiparalleler β Stränge, die aufgrund ihrer Gruppierung als „Finger“ bezeichnet werden und eine α -Helix, die sog. „wrist“-Region (engl. für Handgelenk). Die konkaven und konvexen Oberflächen der gekrümmten β -Stränge dienen der Interaktion mit Rezeptoren (Lin, Lerch et al. 2006).

1.3 Rolle von BMPs in der Frakturheilung

BMPs kommen in der Frakturheilung eine Schlüsselrolle zu, weshalb sie von großem Interesse für die klinische Forschung sind (Southwood, Frisbie et al. 2004). Von BMP2, -4, -5, -6 und -7 ist ein starker osteogener Effekt bekannt (Chen, Deng et al. 2012). Die Expression von BMP2 ist notwendig, um die Bildung von Knochen zu induzieren (Noel, Gazit et al. 2004) und den Osteocalcingehalt signifikant zu erhöhen (Huang, Ren et al. 2010). Die Nichtexpression von BMP2 und BMP4 führt zu einer schweren Beeinträchtigung der Osteogenese (Bandyopadhyay, Tsuji et al. 2006). BMP7 ermöglicht sowohl die chondrogene als auch die osteogene Differenzierung von MSCs durch eine gesteigerte Hochregulierung von chondrogenen und osteogenen Differenzierungsmarkern (Shen, Wei et al. 2010). Interessanterweise wurde gezeigt, dass BMP2/BMP7-Heterodimere einen stärkeren induktiven Effekt auf die Knochenregeneration haben als das BMP2- oder das BMP7-Homodimer allein (Morimoto et al, 2015). Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über ausgewählte BMPs und ihre Rolle in der Osteoinduktion.

Protein	generische Bezeichnung	Funktion
BMP-2	BMP2A	Morphogenese von Knochen und Knorpel
BMP-3	Osteogenin	negativer Regulator bezüglich der Knochendichte
BMP-4	BMP2B	Morphogenese von Knochen
BMP-5	BMP-5	Morphogenese von Knochen
BMP-6	Vgr-1	Morphogenese von Knochen, Hypertrophie von Knorpel
BMP-7	OP-1	Morphogenese von Knochen, Augen- und Nierenentwicklung
BMP-8	OP-2	Knochenformation
BMP-13	CDMP-2, GDF-6	keine Beobachtung von Osteoinduktion; ektopische Induktion von Sehnen und Bändern bei Ratten

Tab. 1.1: Überblick von BMPs und ihre Rolle in der Knocheninduktion (aus dem Englischen, nach Luo et al, 2005).

BMPs binden an spezielle Oberflächenrezeptoren und vermitteln ihren osteo- und chondroinduktiven Effekt über eine intrazelluläre Signalkaskade, welche im Folgenden beschrieben wird:

Der BMP-Signalweg

Es sind derzeit zwei Arten von BMP-Rezeptoren bekannt: BMP-Typ-I-Rezeptoren (BMPRI) und BMP-Typ-II-Rezeptoren (BMPRII) mit jeweils einer intrinsischen Serin-Threonin-Kinaseaktivität (Nishimura, Hata et al. 2003). Es wurde gezeigt, dass sog. Smads – eine intrazelluläre Proteingruppe – für die Vermittlung der Effekte von BMPs von großer Relevanz sind (Nishimura, Hata et al. 2003). Diese übermitteln das BMP-Signal zum Zellkern und sorgen somit für eine Regulation von diversen Transkriptionsfaktoren (s. Abb. 1.3). Für die osteogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) sind dabei insbesondere die Transkriptionsfaktoren Runx2 und Osterix von Bedeutung, ersterer beeinflusst auch die Formation reifer Chondrozyten (s. Abb. 1.4).

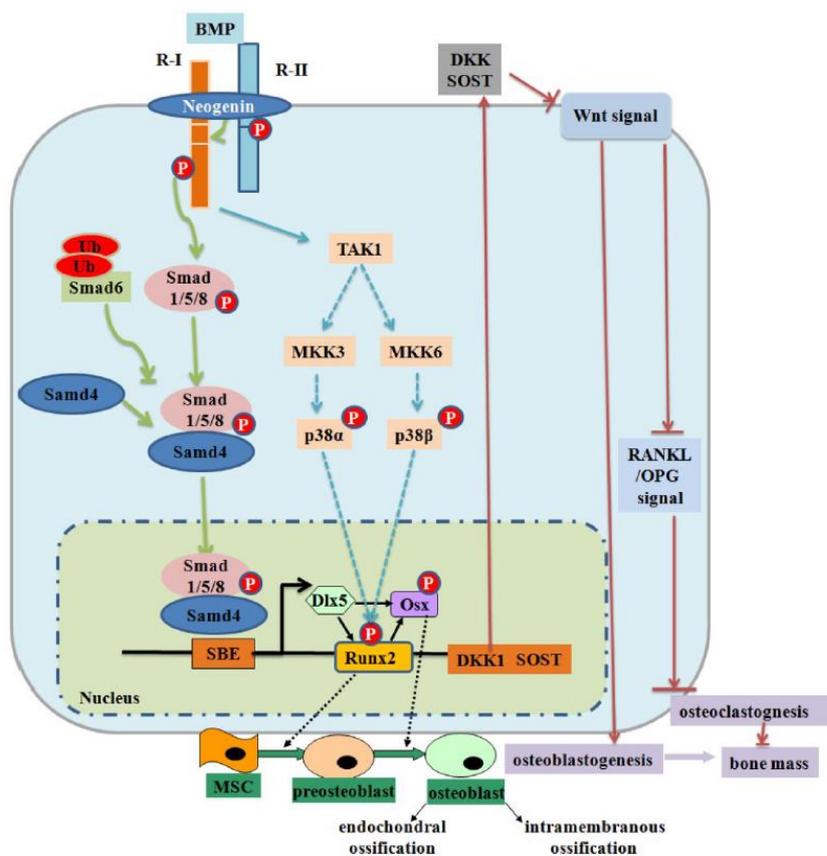


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des BMP-Signalwegs: BMPs binden an BMPRII und verursachen so eine Heterodimerisierung von BMPRI und BMPRII; der von BMPRII phosphorylierte BMPRI phosphoryliert seinerseits diverse SMAD-Proteine. Diese aktivierten SMAD-Proteine verbinden sich mit einem weiteren SMAD-Protein, gelangen in den Nucleus und bestimmen so über eine Regulation von Transkriptionsfaktoren und -koaktivatoren, wie Runx2, Osx und Dlx5, die

Expression bestimmter Zielgene. Diese sind essentiell für die osteogene und teils auch chondrogene Differenzierung (Chen, Deng et al. 2012).

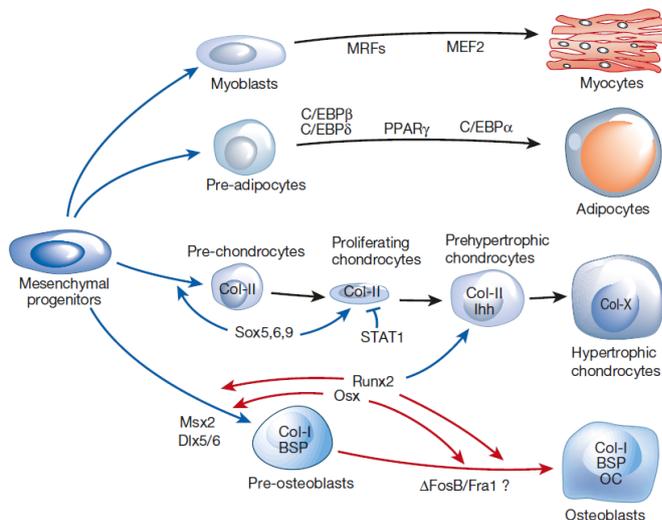


Abb. 1.4: Transkriptionelle Regulation der myogenen, adipogenen, chondrogenen und osteogenen Differenzierung. Runx2 und Osterix sind essentiell für die Bildung von Osteoblasten. Runx2 ist auch an der Bildung von reifen Chondrozyten beteiligt (Harada and Rodan 2003).

Der osteo- und chondroinduktive Effekt von BMPs wird bereits bei speziellen Indikationen klinisch eingesetzt. Zugelassen ist beispielsweise rekombinantes BMP-2 (InductOS®, Wyeth, CHMP, 2015) für den Einsatz bei Tibiafrakturen oder zur Lendenwirbelfusion. Solche BMP-Kits enthalten rhBMP2 als steriles Pulver, welches in Wasser aufgelöst wird. Mit dieser Lösung getränkte Rinderkollagenmatrizes können im Frakturgebiet aufgelegt werden. Jedoch erfolgt die BMP-Zugabe in deutlich supraphysiologischer Menge, die rekombinante Herstellung von BMPs ist zudem teuer und ihre Verweildauer *in vivo* ist abbaubedingt begrenzt (El Bialy, Jiskoot et al. 2017). Eine geeignete Alternative, um dennoch vom positiven Effekt der BMPs auf die Knochenheilung zu profitieren, kann eine lokale BMP-Überexpression durch humane mesenchymale Stammzellen sein.

1.4 Humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs)

Stammzellen sind universelle, noch undifferenzierte Zellen, die sich durch die Fähigkeit der Selbstreplikation und Differenzierung in verschiedene Gewebe auszeichnen. Sie werden in embryonale und adulte Stammzellen kategorisiert. Aus ersteren kann jede Zelle des Körpers hervorgehen; dies wird als Totipotenz bezeichnet. Hierbei bestimmen Zytokine und

Wachstumsfaktoren Differenzierungsbeginn und -richtung. Zu den adulten Stammzellen gehören die mesenchymalen Stammzellen – sie sind multipotente, mesodermale Progenitorzellen mit der Fähigkeit zur Differenzierung in Knochen (Bruder et. al, 1998), Fett (Rogers et. al, 1995), Knorpel (Wakitani et. al, 1994), Sehne (Young et. al, 1998) und Muskel (Ferrari et. al, 1998). Außerdem wurde eine Differenzierung in Zellen nicht mesodermalen Ursprungs beobachtet, u.a. in Neuronen oder Hepatozyten (Dezawa, Kanno et al. 2004). Abb. 1.5 bildet das Differenzierungspotential von hMSC ab.

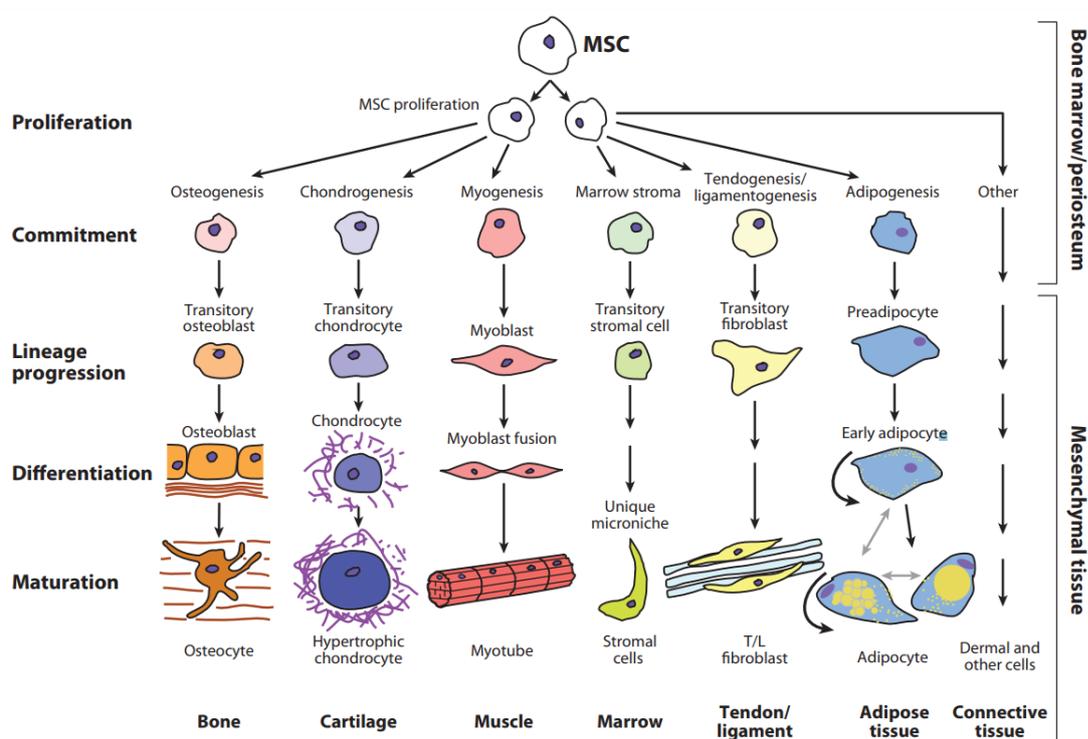


Abb. 1.5: Differenzierungspotential von hMSC: Sie können sich u.a. in Knochen-, Knorpel-, Muskel-, Sehnen- und Fettgewebe differenzieren (Singer and Caplan 2011).

Friedenstein et al. identifizierten und charakterisierten in Russland erstmals aus Knochenmark isolierte, an Plastik adhärenente Zellen mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung – es handelte sich um hMSCs (Owen and Friedenstein 1988). Im Vereinigten Königreich arbeiteten Owen et al. an Zellkultursystemen zur Kultivierung und Expansion von MSCs (Owen and Friedenstein 1988). Im Verlauf wurde beobachtet, dass hMSCs und MSC-ähnliche Zellen sich nicht nur aus Knochenmark, sondern auch aus peripherem Blut (Kuznetsov, Mankani et al. 2001), Nabelschnurblut (Rosada, Justesen et al. 2003),

Milchzähnen (Miura, Gronthos et al. 2003), Synovialmembran (De Bari, Dell'Accio et al. 2001) und Amnionflüssigkeit (De Coppi, Bartsch et al. 2007) isolieren ließen.

MSCs üben eine physiologische Rolle in der Induktion, Regeneration und Reparatur von Knochen und vielen anderen Geweben aus. Der Begriff der mesenchymalen Stammzellen ist aktuell in der Literatur umstritten (Bianco, Robey et al. 2008, Pittenger, Discher et al. 2019) und es wird diskutiert, ob es sich hierbei um Perizyten handelt. Es gibt keine spezifischen Oberflächenmarker für die Identifizierung von MSCs. Dennoch sind MSCs durch ihre multipotente Differenzierungskapazität *in vitro* für zellbasierte Therapieansätze von großem Interesse. Schon in den 90er Jahren entwickelte Caplan das Konzept, patienteneigene hMSCs für die Geweberegeneration von Knochen und Knorpel einzusetzen (Caplan, 1991). MSCs werden von lokalen Faktoren angezogen, können zweckgerichtet im Defektgebiet z.B. osteogen differenzieren und stimulieren zudem benachbarte Zellen zur Regeneration (Gafni et al., 2004). In Kombination mit der Gentherapie eröffnen sich zahlreiche Behandlungsmöglichkeiten: Gene bzw. Proteine können durch genetisch modifizierte, lokal implantierte MSCs gezielt in ein spezifisches Gewebe oder Organ gebracht werden. Die Gentherapie stellt eine Alternative zu herkömmlichen (Ersatz)-Therapien dar, in denen das jeweilige betroffene Protein meist rekombinant hergestellt und anschließend dem Organismus zugeführt wird. Nachteil dieser herkömmlichen Therapien ist, neben der Produktionskosten, die abbaubedingt meist kurze Nachweisbarkeit des zugegeben Proteins *in vivo* (Ramamoorth and Narvekar 2015). Dies erhöht durch die Notwendigkeit einer regelmäßigen Applikation des Proteins die Kosten.

Noch sind nicht alle Mechanismen von hMSCs und ihre genaue Funktionsweise in der Defektregeneration gänzlich erforscht. Jedoch entstehen durch die Gewinnung neuer Erkenntnisse fortwährend neue Konzepte. Diese gilt es zu perfektionieren, damit der Einsatz als fester Bestandteil klinischer Therapien in der Frakturheilung möglich ist.

1.5 Nicht-viraler Gentransfer

Der Begriff Gentransfer bezeichnet die Übertragung von Genen in eine Zielzelle oder Organismus. Zur Einschleusung des genetischen Materials bedarf es eines Vektors. Man unterscheidet hierbei zwischen viralen und nicht-viralen Gentransfermethoden, deren Vor- und Nachteile im Folgenden beleuchtet werden.

Eine optimale Gentransfermethode sollte drei Hauptkriterien erfüllen: sie muss das Transgen vor einem Abbau durch intrazelluläre Nukleasen schützen, sie muss das Transgen durch die Plasmamembran in den Nukleus bringen und sie darf keinen schädlichen Einfluss auf die Zielzelle haben (Gao, Kim et al. 2007). Virale Vektoren erfüllen lediglich die ersten beiden dieser Kriterien. Vorteil ist ihre hohe Effizienz, welche in ihrer natürlichen Fähigkeit liegt, im Rahmen eines Infektionsprozesses Zellmembranen zu durchdringen und Nukleinsäuren zu transferieren (Ivics and Izsvak 2011). Jedoch lösen sie aufgrund ihrer Immunogenität eine Immunantwort im Zielorganismus aus und haben dadurch einen potenziell schädlichen Effekt. Zudem ist die Gefahr von einer malignen Zelltransformation durch eine Insertionsmutagenese bei ektopischer Virus-DNA-Integration bekannt (Ramamoorth and Narvekar 2015). Alternative ist ein nicht-viraler Gentransfer, bei dem physikalische Methoden von chemischen Methoden unterschieden werden. Zu ersteren gehören beispielsweise eine mechanische Mikroinjektion von DNA (Wolff, Malone et al. 1990), Elektroporation (Heller, Ugen et al. 2005), Genkanone (Yang, Burkholder et al. 1990) oder Ultraschall (Lawrie, Brisken et al. 2000) zur Durchdringung der Zellmembran. Zu den chemischen Methoden zählen die Verwendung synthetischer Vektoren oder kationischer Lipide (Liu, Ren et al. 2003, Neu, Fischer et al. 2005). Die Transfektionseffizienz dieser Methoden ist in der Regel im Vergleich zur Verwendung viraler Vektoren geringer (Bono, Ponti et al. 2020). Hauptvorteil ist neben der geringeren Immunogenität und Zytotoxizität nicht-viraler Gentransfermethoden vor allem die höhere biologische Patientensicherheit durch Vermeidung eines viralen Vektors (Ramamoorth and Narvekar 2015). Dies begründet auch die immer weiter zunehmende Verwendung nicht-viraler Vektoren in Publikationen. Tab. 1.2 stellt die am häufigsten angewendeten nicht-viralen Vektoren in der Gentherapie dar.

Vektor/Methode	Beschreibung	Vorteil	Nachteil
„nackte“ DNA	direkte Injektion blanker DNA	einfach, nicht immunogen	möglicherweise nur transiente Expression, geringe Transfektionseffizienz

Liposom	DNA-Phospholipidkomplex, um den Eintritt in die Zelle zu erleichtern	einfache Herstellung, nicht immunogen	möglicherweise nur transiente Expression, geringe Transfektionseffizienz
Elektroporation	Anwendung eines kontrollierten elektrischen Felds zur Erhöhung der Zellmembranpermeabilisierung	einfach, nicht immunogen	Zytotoxizität durch Zellmembranschaden, geringe Transfektionseffizienz, wenig geeignet für Anwendung <i>in vivo</i>
Genkanone	DNA wird mithilfe von Partikeln (z. B. Gold) in die Zelle „geschossen“	nicht immunogen	Zytotoxizität, technisch anspruchsvoll, geringe Transfektionseffizienz

Tab. 1.2: Häufig angewendete nicht-virale Vektoren in der Gentherapie in der ersten Spalte. Nachfolgend aufgelistet sind eine Kurzbeschreibung der Methode sowie Vor- und Nachteile (aus dem Englischen, nach Nauth et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Elektroporation angewendet. Diese physikalische Methode zur Überwindung der Zellmembran für das Einbringen von DNA wurde 1982 in München erstmals beschrieben (Neumann, Schaefer-Ridder et al. 1982). Eine mit einer Zellsuspension und der zu transfizierenden DNA gefüllte Küvette wird in einen sogenannten Elektroporator überführt. Dieses Gerät kann ein elektrisches Feld erzeugen. Ein kurzer elektrischer Impuls erhöht vorübergehend die Permeabilität der Zellmembran, so dass die Fremd-DNA eingeschleust wird. Die Elektroporation ist bei Transfektionen *in vitro* bereits eine weitverbreitete Methode und erreicht hohe Transfektionsraten, wurde aber auch bereits *in vivo* eingesetzt (Heller, Ugen et al. 2005). Für eine stabile Transfektion mit hoher Effizienz wurde die Elektroporation mit dem „sleeping beauty“-Transposonsystem (dt.: Dornröschen; SB-Transposonsystem) kombiniert. Der Name des SB-Transposonsystems rührt von der Tatsache, dass es auf mehrere Millionen Jahren alten, aufgrund vielfacher Mutationen

inaktiven Sequenzen von Fischen beruht. Die SB-Transposase konnte rekonstruiert werden und die SB100X-Transposase ist nun 100 Mal effizienter als die erste funktionstüchtige Generation. DNA-Transposons sind Gen-Abschnitte, die ihre Position im Genom durch Herausschneiden und Einbauen an einer anderen Stelle variieren können (s. Abb. 1.6). Durch diese Eigenschaft eignen sie sich hervorragend als molekularbiologisches Werkzeug für einen Gentransfer. Zudem ist im Vergleich zu viralen Vektoren, welche mindestens die gentechnische Sicherheitsstufe 2 benötigen, die Sicherheitsstufe 1 ausreichend.

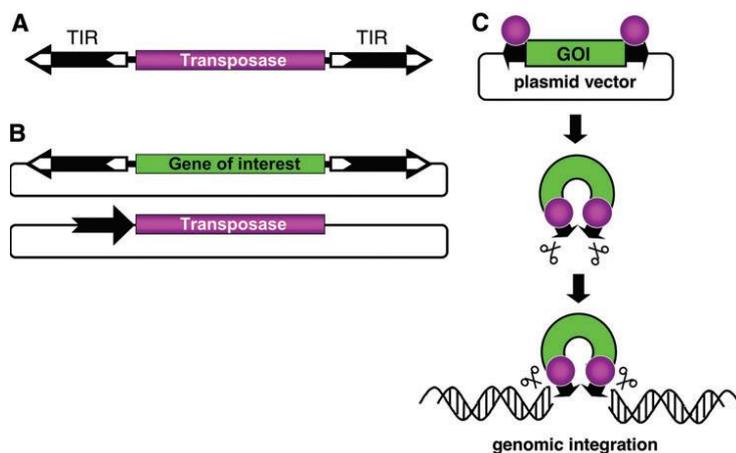


Abb. 1.6: Aufbau, Funktionsweise und Verwendung von transposablen Elementen als Genvektoren. Gegenläufige Wiederholungssequenzen (engl.: terminal inverted repeats, TIRs) flankieren das Transposase-Gen (A). Das Transposon-Vektorsystem beruht auf zwei Komponenten: Ein Plasmid enthält das Zielgen („gene of interest“ (GOI)), ein weiteres das Transposasegen (B). Da GOI wird durch die Transposase aus dem Spenderplasmid herausgeschnitten und in die Ziel-DNA integriert (C) (Ivics and Izsvak 2011).

1.6 Zielsetzung

Wie oben dargestellt verfügen BMPs über einen nachgewiesenen osteo- und chondroinduktiven Effekt. Einige Subtypen werden bereits klinisch in der Frakturheilung eingesetzt. Rekombinantes Protein wird dabei auf einer Trägermatrix auf die Frakturoberfläche gebracht. Jedoch ist die rekombinante Herstellung von BMPs teuer und ihre Verweilzeit *in vivo* beträgt wenige Tage. Eine effektive Alternative, um dennoch vom osteo- und chondroinduktiven Effekt der BMPs in der Frakturheilung zu profitieren, kann eine lokale BMP-Überexpression durch hMSCs sein.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung stabil BMP-überexprimierender humaner mesenchymaler Stammzellen mittels eines nicht-viralen Gentransfers. Hierbei sollten BMP2-, BMP4-, BMP7-, BMP2/7- und BMP4/7-überexprimierende humane mesenchymale Stammzellen hergestellt werden. Hierzu sollten die jeweiligen BMP-Sequenzen mittels klassischer Klonierungsmethoden in das Sleeping-Beauty-Vektorrückgrat pSBbi-GP kloniert werden. Das auf dem Vektorrückgrat befindliche Resistenzgen für Puromycin verleiht den erfolgreich transfizierten hMSCs eine Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum. Auf diese Weise kann eine antibiotische Selektion durchgeführt werden. pSBbi-GP beinhaltet auch die Sequenz der enhanced-Variante des grün fluoreszierenden Proteins (eGFP), weshalb die Expression von BMP mit der Expression von eGFP positiv korreliert. Auf diese Weise sollte mittels Fluoreszenzmikroskopie der Transfektionserfolg beurteilt werden und durchflusszytometrisch mittels FACS (engl.: fluorescence-activated cell sorting) eine Sortierung in stark und schwach BMP-überexprimierende hMSC erfolgen. Anschließend sollte die BMP-Überexpression auf RNA-Ebene mittels RT-PCR untersucht und zur Quantifizierung spezifische BMP-ELISAs verwendet werden. Mittels eines Luciferase-Reporter-Assays sollte unter Verwendung von BMP-sensitiven Reporterzellen die Bioaktivität der von den hMSC sezernierten BMPs nachgewiesen werden.

Parallel zur Herstellung der durch nicht-viralen Gentransfer stabil BMP-überexprimierenden hMSCs wurden bestehende BMP-überexprimierende hMSCs differenziert, welche im ExperiMed-Labor mittels lentiviralen Gentransfer durch Frau Dr. Veronika Schönitzer und Frau Dr. Uta Moll hergestellt wurden. Hierbei wurde eine adipogene Differenzierung durchgeführt und eventuelle Wirkungen von BMP auf die Differenzierungskapazität untersucht.

2 Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden alle in den durchgeführten Experimenten verwendeten Materialien und Methoden aufgeführt.

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	BD, Heidelberg
Bacto-Hefeextrakt	BD, Heidelberg
Bacto-Trypton	BD, Heidelberg
BODIPY-Fluoreszenzfarbstoff (D3922)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
cOmplete, Mini, EDTA-free	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethansäure	Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fetales Kälberserum (FBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gel-Ladepuffer, 6x purple dye	New England BioLabs, Frankfurt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Indomethacin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Insulin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
KCl	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Merck, Darmstadt
3-(N-Morpholino)propansulfonsäureMOPS/NaOH	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaCl	Merck, Darmstadt
NEB-Puffer	New England BioLabs, Frankfurt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin-Streptomycin-Lösung	PAA, Pasching, Österreich
Protease-Inhibitor	Roche, Penzberg
Puromycin	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe

Tris-Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA (10x)	PAA, Pasching, Österreich
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
X-Gal	Roth, Karlsruhe
Zellkulturmedium MEM α high Glucose	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Zellkulturmedium D-MEM high Glucose	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Zeocin	Invitrogen, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.2 Pufferlösungen

Tfb I	30 mM KAc
	50 mM MnCl ₂
	100 mM KCl
	15 % (v/v) Glycerin
	mit 2 M HAc einstellen auf pH 5,8
Tfb II	10 mM MOPS/NaOH
	75 mM CaCl ₂
	10 mM KCl
	15 % (v/v) Glycerin
50x TAE-Puffer	242 g Tris-Base
	57,1 ml reine Essigsäure
	100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
	ad 1 l mit H ₂ O, auf pH 8,3 einstellen

2.1.3 Enzyme

CIP Enzym (Calf Intestine alkaline Phosphatase)	New England BioLabs, Frankfurt/Main
HotStar HiFidelity DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs, Frankfurt/Main

2.1.4 Organismen

Bakterien

DH5 α *E. coli*

Diese Bakterien bildeten die Grundlage für die Herstellung kompetenter Zellen.

Zelllinien

SCP1

SCP1 ist die Abkürzung für „single cell picked clone 1“ – bei diesen Zellen handelt es sich um immortalisierte, humane mesenchymale Stammzellen. Sie wurden im ExperiMed-Labor für Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin über einen lentiviralen Gentransfer von hTERT in hMSCs hergestellt (Bocker, Yin et al. 2008). In der Publikation von Böcker et. al (2008) wurde unter anderem gezeigt, dass die hTERT-überexprimierenden hMSCs auch nach über 60 Passagen ihren Stammzellcharakter behalten und keiner malignen Transformation unterliegen.

SCP1-Zellen waren die Grundlage für die Herstellung BMP2-, BMP4- und BMP7- sowie BMP2/7- und BMP4/7-überexprimierender, GFP-exprimierender hMSCs. Es wurde zudem eine lediglich GFP-exprimierende SCP1-Zelllinie generiert, um mögliche Begleiterscheinungen der Transfektionsmethode sowie der Expression von GFP separat von der BMP-Überexpression untersuchen zu können.

SCP1-BMP2-GFP, SCP1-BMP4-GFP, SCP1-BMP7-GFP, SCP1-BMP2/7-GFP, SCP1-BMP4/7-GFP,
SCP1-GFP

Diese Zelllinien wurden in der vorliegenden Arbeit selbst hergestellt; SCP1-Zellen wurden nicht-viral stabil transfiziert. Mittels FACS-Sorter erfolgte eine Sortierung nach Fluoreszenzintensität in jeweils eine GFP hoch- bzw. niedrigexprimierende Gruppe. Bei diesen Zellen handelt es sich jeweils um die GFP-hochexprimierende Gruppe, die in den weiteren Experimenten verwendet wurde.

SCP1-BMP2, lentiviral hergestellt

Im ExperiMed-Forschungslabor wurden BMP2-überexprimierende hMSCs durch Frau Dr. Moll über einen lentiviralen Gentransfer hergestellt (Moll, 2014). Die Klone 1, 4 sowie die Mock-Variante wurden in der vorliegenden Arbeit adipogen differenziert und anschließend der Einfluss von BMP2 auf die Differenzierungskapazität untersucht.

HepG2BRA-Reporterzellen

Es handelt sich bei den HepG2BRA-Zellen um eine Reporterzelllinie zur Untersuchung der BMP-Bioaktivität. Zur Herstellung dieser wurden humane Hepatomzellen (HepG2) mit einem BMP/Smad-abhängigen Enhancer, welcher von einem Id1-Promoter abgeleitet und mit einem Luciferase-Reportergen verbunden ist, stabil transfiziert (Zilberberg, ten Dijke et al. 2007). Diese Zellen wurden dem ExperiMed-Forschungslabor freundlicherweise durch Daniel B. Rifkin von der New York University (NYU) überlassen. HepG2BRA sind geeignet, die BMP-Aktivität mit hoher Sensitivität zu messen (Zilberberg, ten Dijke et al. 2007).

2.1.5 Medien für Bakterienkulturen

LB-Medium, steril	1 % NaCl
	0,5 % Bacto-Hefeextrakt
	1 % Bacto-Trypton
	ad 1 l H ₂ O, einstellen auf einen pH zwischen 7,2-7,5
	autoklavieren
Ampicillin-LB-Medium	steriles LB abkühlen lassen, ad 100 µg/ml Ampicillin
Kanamycin-LB-Medium	steriles LB abkühlen lassen, ad 100 µg/ml Kanamycin

LB-Agarplatten	LB-Medium mit 1,6 % Agar
SOC-Medium	0,5 % Bacto-Hefeextrakt
	2 % Bacto-Trypton
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	20 mM Glukose nach autoklavieren und abkühlen, anschließend sterile Filtration

2.1.6 Gene und Vektoren

Gen/Vektor	Größe [kb]	Bezugsquelle
pCMV(CAT)T7-SB100X	4,8	freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch PD Dr. Attila Aszódi ExperiMed, München
pSBbi-GP	6,6	Eric Kowarz (Addgene-Plasmid #60511 http://n2t.net/addgene:60511 , RRID:Addgene_60511) Addgene, Cambridge
hBMP2		Wyeth Research, Cambridge
pCMV-SPORT6-BMP4 (Klonname: HsCD00331030)	6,0	Harvard PlasmID, Harvard Medical School, Boston
pDONR221-BMP7 (Klonname: HsCD00043511)	3,9	Harvard PlasmID, Harvard Medical School, Boston
pCR2.1-TOPO	3,9	Invitrogen, Darmstadt

96-well Platte schwarz Thermo Fisher Scientific, Schwerte

2.1.8 Standards

1kb Plus DNA-Marker/ New England BioLabs, Frankfurt/Main

2-Log-DNA-Marker

Gene Ruler 1kb Plus DNA/ Thermo Fisher Scientific, Schwerte

Fermentas G. 1kb Plus DNA

Protein-Marker V VWR, Ismaning

2.1.9 Oligonukleotide

2.1.9.1 PCR-Primer

Bezeichnung	Sequenz von 5' nach 3'	T _M /°C
hBMP2_Sfil_for	GGCCTCTGAGGCCACCATGGTGGCCGGGACC	56,0-78,8°C
hBMP2_Sfil_rev	GGCCTGACAGGCCCTAGCGACACCCACAAC	55,2-75,0°C
hBMP4_PspXI_for	ACTCGAGCTATGATTCTGGTAACCGAATG	66,8°C
hBMP4_HindIII_rev	AAGCTTCAGCGGCACCCACATCC	66°C
hBMP7_Sfil_for	GGCCTCTGAGGCCACCATGCACGTGCGCTCAC	54,3-77,2°C
hBMP7_Sfil_rev	GGCCTGACAGGCCCTAGTGGCAGCCACAG	54,3-75,2°C
BMP2_P2A_7_for	AAGCTTGCTCGAGTGAC	56°C

BMP2_P2A_7_6_rev	CCCGGGGTATCACGC	56°C
BMP4_P2A_7_for	AAGCTTCGCCGGTGGAT	55,2°C
BMP4_P2A_7_rev	CCATGCTGTACCTGGATG	56°C

2.1.9.2 Sequenzierprimer

Plasmid	Primername	Sequenz von 5' nach 3'
pSBbi-GP-hBMP2	hBMP2_seq_01	CAACTCGAACTCGCTCAGG
pSBbi-GP-hBMP2	hBMP2_seq_02	CTGGCTGATCATCTGAACTC
pSBbi-GP-hBMP2- P2A-hBMP7		
pSBbi-GP-hBMP4	hBMP4_seq_01	CTGCAGAAGTGTCGCCTCG
pSBbi-GP-hBMP4	hBMP4_seq_02	GTGCCATCTCCATGCTGTAC
pSBbi-GP-hBMP4- P2A-hBMP7		
pSBbi-GP-hBMP7	hBMP7_seq_01	GATGAAGCTCGAGTGAC
pSBbi-GP-hBMP7	hBMP7-seq_02	CATCGTGCAGACGCTGGTC
pSBbi-GP-hBMP4- P2A-hBMP7		
pSBbi-GP-hBMP4-P2A	BGH_rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG

2.1.10 Kits

Micro BCA Protein Assay	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
BMP2 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis
BMP4 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis

BMP7 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis
HotStar HiFidelity Polymerase Kit	Qiagen, Hilden
Luciferase Assay System	Promega, Madison, Wisconsin
NucleoSpin Gel und PCR clean-up	Kit Macherey-Nagel, Düren
P1 Primary Cell 4D-Nucleofector™ Kit	Lonza, Basel
P3 Primary Cell 4D-Nucleofector™ Kit	Lonza, Basel
PureYield™ Plasmid Miniprep	Promega, Madison, Wisconsin
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
T4-DNA-Ligase-Kit	Invitrogen, Darmstadt
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Darmstadt
Transcriptor First Strand	Roche, Basel
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden

2.1.11 Geräte

4D-Nucleofector™ Core Unit	Lonza, Basel
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Bunsenbrenner, Typ Fireboy eco	Integra Biosciences, Fernwald
Durchflusszytometer BD FACSAria™	BD, Heidelberg
Durchlichtmikroskop, Leica M165 FC	Leica, Germany
Elektrophorese-Spannungsquelle	Peqlab, Erlangen
Elektrophoresekammer	Peqlab, Erlangen
Entwickler für Westernblot-Membran, Typ ImageQuant LAS 4000 mini	GE Healthcare, München
Feinwaage, Typ 770	Kern&Sohn, Balingen
ImageQuant LAS 4000 mini	GE Healthcare, München
Inkubator für Bakterien	Memmert, Schwabach

Inkubator für Zellkulturen, Typ HERAcell 240 i	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Magnetrührer mit Heizplatte	Axon, Kaiserslautern
Mikropipetten	
Mikroskop AxioObserver.Z1, AxioCam MRm Zeiss, Oberkochen	
Mini-Trans-Blot Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Mischer Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Nanodrop Spektralphotometer	Peqlab, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
PCR-Thermocycler	Bio-Rad, München
PCR-Thermocycler	
pH-Meter	WTW Inolab, Weilheim
Pipetboy	Hirschmann, Eberstadt
Plattformschüttler mit Inkubator 1000	Heidolph, Schwabach
Plattformschüttler, Rotamax 120	Heidolph, Schwabach
Spannungsquelle für Western Blot	Consort, Turnhout, Belgien
Tecan-Safire2-Multiplat-Reader	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Thermomixer, Typ comfort mit Thermoblock	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge für Reaktionsgefäße	neoLab, Heidelberg
Tischzentrifuge, Typ Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen
UV-Leuchttisch	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zellkultur-Mikroskop, Typ Diavert	Leitz, Wetzlar
Zellkultur-Zentrifuge, Typ Univ. 16R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge, Typ Jouan BR 4	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

2.1.12 Software

Adobe Photoshop CS6 13.0	Bildbearbeitung
Adobe Illustrator CS6 16.0.0	Bildbearbeitung

BioEdit 7.1.3

Sequenzanalyse

CloneManager 9

Klonierung

GraphPadPrism 8.3.1

Auswertung und Statistik

ImageJ 1.8.0

Bildbearbeitung und Auswertung

Zeiss ZEN 2.3 (blue edition)

Mikroskopsoftware

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

Die mikrobiologischen Arbeiten wurden mit dem DH5 α -*E. coli*-Bakterienstamm, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.2.1.1 Bakterienkultivierung auf Agarplatten

Selbsthergestelltes, mit Agar versetztes, autoklaviertes LB-Medium wurde zum Gießen der Agarplatten verwendet. Je nach Bedarf wurden dem sterilen LB-Medium nach ausreichender Abkühlungszeit aufgrund der Thermosensibilität von einigen Antibiotika jeweils Ampicillin, Chloramphenicol oder Kanamycin in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben.

Zur Bakterienkultivierung aus Glycerinkulturen wurde eine sterile Mikropipettenspitze zur Materialgewinnung verwendet und anschließend als Verdünnungsausstrich im Sinne eines Drei-Ösen-Ausstrichs auf eine Agarplatte aufgetragen. Bei Transformationen wurde die Bakteriensuspension mit einem Drygalski-Spatel ausplattiert. Dieser wurde zuvor in 80%igem Ethanol eingetaucht und anschließend mit dem Bunsenbrenner kurz abgeflammt.

Die Agarplatten wurden über Kopf im Bakterieninkubator bei 37 °C über Nacht aufbewahrt. Mit Parafilm versiegelte Platten konnten bei 4 °C bis zu 7 Tage aufgehoben werden.

2.2.1.2 Bakterienkultivierung im Flüssigmedium

Zur Beimpfung von Flüssigkulturen wurde eine sterile Mikropipettenspitze mit einer sterilen Pinzette gefasst und Material von einem auf einer Agarplatte kultivierten Reinheitsausstrich gewonnen. Die Spitze wurde kurz in ein mit 4 ml LB-Selektionsmedium – also LB-Medium versetzt mit dem geeigneten Antibiotikum – gefülltes Kulturröhrchen getaucht und leicht geschüttelt. Anschließend wurde der luftdurchlässige Deckel angeschraubt. Über Nacht wurden die Kulturröhrchen bei 37 °C bei 270 rpm geschüttelt. Zur Beimpfung von großen Bakterienkulturen wurden 99 ml LB-Selektionsmedium und 1 ml Bakterienflüssigkultur in einem 500 ml fassenden Erlenmeyerkolben ebenfalls über Nacht bei 37 °C bei 270 rpm geschüttelt.

2.2.1.3 Kryokonservierung von Bakterienkulturen

Mittels Glycerinkultur konnten Transformanden kryokonserviert werden. Hierfür wurde eine Einzelkolonie in 4 ml LB-Selektionsmedium über Nacht bei 37 °C mit 270 rpm geschüttelt. 850 µl dieser Bakteriensuspension wurde mit 150 µl 100%igem autoklaviertem Glycerin durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren in einem Kryovial gründlich resuspendiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Durch Erhöhung der Permeabilität von Zellwand und Plasmamembran der Bakterien soll die Aufnahme von DNA erleichtert werden. Diese Fähigkeit zur Aufnahme freier DNA wird als Kompetenz bezeichnet.

DH5α-Zellen wurden aus einem bei -80 °C gelagertem Glycerolstock auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden drei Vorkulturen je 4 ml LB-Medium in Kulturröhrchen über Nacht bei 37 °C bei 190 rpm geschüttelt und anschließend drei Mal 50 ml LB-Medium mit jeweils 750 µl Vorkultur in 250 ml fassende Erlenmeyerkolben beimpft. Durch Messung der Absorbanz bei einer Wellenlänge von 578 nm wurde die optische Dichte (O.D.) gemessen; sie steigt von ca. 0,06 auf 0,6 in etwa zwei Stunden. Bei einer O.D. von 0,6 wurden die Bakteriensuspensionen in je ein steriles 50 ml-Falcon überführt und auf Eis gestellt. Bei 4 °C wurden sie für 7 min bei 2000 × g zentrifugiert und der Überstand gut abdekantiert. Nun wurden je 15 ml frisch zubereiteter eisgekühlter Transformationspuffer I (Tfbl) pro Falcon zugegeben, das Zellpellet durch Vortexen resuspendiert und 5-10 min auf Eis inkubiert. Derweil wurden sterile Kryoröhrchen beschriftet und in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 700 × g bei 4 °C abzentrifugiert und gut abdekantiert. Nun wurden je 2 ml frisch zubereiteter eisgekühlter Transformationspuffer II (TfblI) pro Falcon zugegeben. Auf keinen Fall sollten die Zellen gevortext werden; sie wurden daher ca. 10-20 min im Eiswasser bis zur vollständigen Resuspension geschwenkt. Zuletzt wurden die Zellen portionsweise à 200 µl pro Kryoröhrchen

aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei -80 °C sind die kompetenten Zellen problemlos mehrere Monate haltbar. Mittels Testtransformation mit 10 pg pUC19-Vektor wurde die Transformationseffizienz ermittelt.

2.2.2.2 Transformation in *E. coli*-Zellen

Die Transformationen wurden mittels der Hitzeschock-Methode durchgeführt.

Zum Ligationsansatz wurden $50\text{ }\mu\text{l}$ auf Eis aufgetaute chemisch kompetente Zellen (s. 2.2.2.1) gegeben und für 30 min im Eisbad inkubiert; dabei wurden sie zwischendurch mehrmals vorsichtig geschwenkt. Dann erfolgte der Hitzeschock für 90 s bei 42 °C im Wasserbad mit anschließender Kühlung auf Eis. $500\text{ }\mu\text{l}$ SOC-Medium wurden hinzugegeben und die Bakterien-DNA-Suspension im Thermomixer für 60 min bei 37 °C und 300 rpm geschüttelt. Je $20\text{ }\mu\text{l}$, $180\text{ }\mu\text{l}$ und der Rest wurden auf Agarplatten aus dem geeigneten Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Bei Transformationen mit dem PCR2.1-TOPO-Vektor wurden positive Transformanden mittels Blau-Weiß-Screening identifiziert. Hierfür wurden die Agarplatten vor dem Ausplattieren gleichmäßig mit der gelblichen Substanz X-Gal bestrichen. Der oben genannte Vektor enthält an der so genannten „Multiple Cloning Site“ das β -Galaktosidase-Gen *lacZ*, welches den Bakterien durch Expression einer Galaktosidase ermöglicht, X-Gal in einen blauen Farbstoff und Galaktose umzuwandeln. Demzufolge wird bei Einbau des Inserts das *lacZ*-Gen inaktiviert und die Kolonien mit positiven Transformanden bleiben ungefärbt, also weiß. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit sollten X-Gal sowie X-Gal-enthaltende Agarplatten im Dunkeln gelagert werden.

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentrationen erfolgte spektralphotometrisch mit Hilfe eines NanoDrop Spektralphotometers. Mittels der Lambert Beer'schen-Formel kann anhand der Extinktion bei $\text{OD}_{260\text{nm}}$ durch das Gerät die Konzentration an Nukleinsäuren ermittelt werden. Ein Wert zwischen $1,8$ und $2,0$ beim $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ -Quotienten entspricht einer reinen, für die Weiterverarbeitung geeigneten Probe.

2.2.2.4 Restriktionsverdau von DNA

Beim Restriktionsverdau wird DNA mithilfe von Restriktionsenzymen an bestimmten Positionen in Fragmente geschnitten. Dies kann sowohl analytisch zur Plasmididentifikation als auch präparativ zur Gewinnung eines bestimmten DNA-Fragments verwendet werden. Für ersteres wurden anhand der Plasmidkarten bestimmte Enzyme mit definierten Schnittstellen ausgesucht, sodass nur das richtige Plasmid Fragmente mit korrekten Längen aufweist.

<u>Komponente</u>	<u>Analytischer Ansatz</u>	<u>Präparativer Ansatz</u>
Plasmid:	500 ng	2 µg
passender Puffer:	10 %	10 %
Enzym:	0,5 µl	3 µl
H ₂ O:	ad 10 µl	ad 60 µl

Analytische Ansätze wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert. Präparative Ansätze wurden für 2 h bei 37 °C inkubiert. Bei Doppelverdauen wurden zwei Restriktionsenzyme mit übereinstimmenden Puffern und Reaktionstemperaturen ausgewählt. Bei analytischen Ansätzen wurden je 0,5 µl, bei präparativen Ansätzen je 3 µl pro Enzym hinzugegeben. Der Enzymanteil im Ansatz darf 10 % nicht überschreiten, da das enthaltene Glycerin zu Star-Aktivität führen kann. Dies bezeichnet das Schneiden an anderen Stellen als den Standardsequenzen und senkt somit die Spezifität des Enzyms.

2.2.2.5 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese trennt Nukleinsäurefragmente aufgrund ihrer Ladung und Größe in einem elektrischen Feld auf. Als Trägermaterial diente hierbei ein Agarosegel: 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer wurde mit 1-2% iger Agarose aufgeköcht; in flüssigem Zustand wurden 6 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Gel hinzugefügt. Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität kann detektiert werden und ist abhängig von der Menge an Nukleinsäuren. Die geeignete Kammgröße wurde ausgewählt, das Gel gegossen und

mindestens 30 min ausgehärtet. In die Geltaschen wurden die verdauten DNA-Ansätze mitsamt 6x Purple Dye pipettiert. Dieser farbige Gelladepuffer dient als optische Kontrolle beim Auftragen der Proben und Verfolgen der Laufgeschwindigkeit sowie -strecke. Ein sogenannter Standard diente zur Abschätzung der Fragmentlänge; hierbei handelt es sich um ein Gemisch von DNA-Fragmenten definierter Längen. Die Elektrophorese erfolgte mit 1x TAE als Laufpuffer bei einer Spannung von 120-130 V. Unter UV-Licht kommt es zur Anregung der Fluoreszenz. Nukleinsäurehaltige Bereiche imponieren als helle, leuchtende Bereiche – sog. Banden. Bereiche ohne Nukleinsäuren erscheinen dunkel.

2.2.2.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Unter möglichst kurzer UV-Licht-Durchleuchtung zur Vermeidung von Mutationen wurden die benötigten Nukleinsäurefragmente nach präparativen Verdauen identifiziert und diese mithilfe eines Skalpells aus dem Gel geschnitten und in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Extraktion aus dem Gelstück erfolgte mit dem NucleoSpin Gel und PCR-clean-up-Kits nach Anleitung des Herstellers. Die eluierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.2.7 DNA-Plasmidisolierung aus *E. coli*

Mit Material von auf einer Agarplatte kultiviertem Reinheitsausstrich wurden 4 ml-LB-Selektionsmedium beimpft. Die flüssige Übernachtskultur wurde mehrmals in einem 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert und das Bakterienzellpellet in 600 µl TE-Puffer resuspendiert. Mit dem PureYield-Plasmid-Miniprep-Kit wurde nach Angaben des Herstellers die DNA im analytischen Maßstab isoliert. Für höher konzentrierte, reinere und endotoxinfreie DNA – wie beispielsweise bei der Transfektion benötigt – erfolgte die DNA-Isolierung mittels des QIAGEN-Maxiprep-Kits. Hierfür wurden Bakterien von großen Übernachtskulturen à 100 ml geerntet und nach Aufreinigung und Isolierung der DNA in 150 µl endotoxinfreiem Wasser eluiert. Die Proben wurden analytisch verdaut und der Rest bei -20 °C gelagert.

2.2.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (engl.: polymerase chain reaction) dient der Vervielfältigung von DNA und wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl analytisch als auch präparativ eingesetzt. Es wurde das HotStar-HiFidelity-PCR-Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet.

<u>Komponente</u>	<u>Analytischer Ansatz</u>	<u>Präparativer Ansatz</u>
Template-DNA:	10-50 ng	100-200 ng
5x HotStar HiFidelity-PCR-Puffer inkl. dNTPs und 7,5 mM MgSO ₄ :	5 µl	10 µl
ggf. 5x Q-Solution:	5 µl	10 µl
Sense-Primer:	2,5 µl	5 µl
Antisense-Primer:	2,5 µl	5 µl
HotStar-HiFidelity-DNA-Polymerase (2,5 units/µ):	0,5 µl	1 µl
PCR-Wasser:	ad 25 µl	ad 50 µl

Alle Komponenten wurden in 0,2 ml-Reaktionsgefäßen auf Eis angesetzt. Zur Qualitätsüberprüfung wurde jeweils eine Negativkontrolle durchgeführt. Bei diesem Ansatz wurde statt einer Template-DNA PCR-Wasser verwendet. Zur Verbesserung der Amplifikation wurde bei manchen Reaktionen Q-Solution, welche Einfluss auf das Schmelzverhalten von Nukleinsäuren hat, hinzugefügt. Hierfür wurden jeweils Ansätze mit oder ohne Q-Solution vorbereitet und die Ergebnisse verglichen.

Folgendes Standardprogramm wurde für die Amplifizierung der Template-DNA im PCR-Thermocycler verwendet:

	<u>Zeit</u>	<u>Temperaturoptimum</u>	<u>Bemerkung</u>
Initialer Aktivierungsschritt:	5 min	95 °C	Zur Aktivierung der HotStar-DNA-Polymerase
Denaturierung:	15 s	94 °C	
Annealing:	1 min	50-68 °C	etwa 5°C unter T _m des Primers
Elongation:	1 min	72 °C	
Zyklen: (Wiederholung von Denaturierung, Annealing und Elongation)	30-45		abhängig von Template-DNA-Menge
Endelongation:	10 min	72 °C	
Ende des PCR-Programms:	unlimitiert	8 °C	empfohlen zur Kühlung nach Ende des PCR-Programms

Das Primerpaar gibt die Annealing-Temperatur vor. Teile der Ansätze wurden anschließend direkt mit 6x Purple-Dye-Ladepuffer gemischt und einer Gelelektrophorese unterzogen. Der Rest wurde gegebenenfalls bei -20 °C gelagert.

2.2.2.9 Calf-Intestinal-Phosphatase (CIP)

Zur Vermeidung einer Selbstligation nach Schnitt durch das Restriktionsenzym wurden die Vektorenden dephosphoryliert. Dies geschah mithilfe des CIP-Enzyms (engl: calf intestine alkaline phosphatase), einer alkalischen Phosphatase. Hierfür wurde der nach Restriktionsverdau und Gelelektrophorese aus dem Gel extrahierte Vektor mit 1 µl CIP-Enzym, 2 µl 10xcutsmart-Puffer, 1 pmol DNA-Enden und ad 20 µl H₂O für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Die Reaktion wurde mit 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt und der Vektor mittels Nucleospin-clean-up-Kit erneut aufgereinigt.

2.2.2.10 Ligation von DNA

Zur Erhöhung der Ligationseffizienz wurden Vektor und Insert im Verhältnis 1:3 eingesetzt; berechnet nach folgender Formel:

$$\text{Masse Insert [ng]} = \frac{3 * \text{MasseVektor[ng]} * \text{LängeInsert[bp]}}{\text{LängeVektor [bp]}}$$

Anschließend wurden 1 µl 10x Ligasepuffer, 1 µl Ligase und Wasser ad 10 µl hinzugefügt, gemischt und bei 16 °C im Thermomixer über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde der komplette Ligationsansatz für die Transformation verwendet. Alternativ ist eine Lagerung bei -20 °C möglich.

2.2.2.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt. Hierzu benötigte die Firma 100 ng DNA der zu sequenzierenden DNA ad 15 µl H₂O. Es wurden sowohl Standard-Sequenzierprimer der Firma als auch selbstdesignte Sequenzierprimer verwendet. Die Sequenzanalyse erfolgte mit BioEdit.

2.2.2.12 Nicht-virale Transfektion

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von freier DNA in eukaryotische Zellen. Es existieren verschiedene Transfektionsmethoden; in der vorliegenden Arbeit wurde die Elektroporation angewandt. Ziel war eine stabile Transfektion – also ein dauerhafter Einbau in das Genom – mittels „sleeping beauty“-Transposon-System, welches sich als vorteilhaftes molekularbiologisches Werkzeug gegenüber viralen Vektoren herausstellte: „The newly developed transposase yields unprecedented stable gene transfer efficiencies following nonviral gene delivery that compare favorably to stable transduction efficiencies with integrating viral vectors.” (Mates, Chuah et al. 2009).

Vorteil ist unter anderem die geringere Immunogenität gegenüber lentiviralen Transfektionsmethoden.

2.2.2.13 „sleeping beauty“-Transposon-System

Transposons sind DNA-Abschnitte, die ihre Position im Genom im Sinne eines so genannten „cut-and-paste“-Mechanismus verändern können; sie kodieren auch die Transposase-Sequenz, welche von gegenläufigen Wiederholungssequenzen umgeben ist (engl.: inverted terminal repeats, ITRs) (Mates, Chuah et al. 2009). ITRs sind notwendig für das Erkennen der Bindungsstellen durch das Transposase-Enzym. Jedes von diesen ITRs umgebene Zielgen kann transpositioniert werden, weshalb DNA-Transposon-Systeme ein ideales molekularbiologisches Werkzeug für Gentherapien sind (Mates, Chuah et al. 2009).

Es existieren zwei Vektortypen: pSBbi-Derivate für eine konstitutive Expression, pSBtet-Derivate für eine induzierbare Expression. In der vorliegenden Arbeit wurde pSBbi-GP verwendet, ein SB-Transposon-Plasmid mit einem konstitutiven, bidirektionalen Promoter: auf der einen Seite befindet sich die SfiI-cloning-site für das GOI und auf der anderen Seite das GFP- und Puromycinresistenzgen. Zur Verwendung der SB-Transposase für eine Genübertragung wird ein transposables Element benötigt. Dafür wird das Transposase-Gen durch das GOI ersetzt. Ein zweites Plasmid dient nun als Quelle für das Transposase-Enzym (Kowarz, Loscher et al. 2015).

2.2.2.14 Elektroporation

Bei der Elektroporation handelt es sich um eine physikalische Transfektionsmethode. Sie wurde jeweils mithilfe des Nucleofector-Kits von Lonza durchgeführt. Hierfür wurden die hMSCs bis zu einer Konfluenz von 70-85 % kultiviert. Zu hohe Zelldichten führten zu einer Verringerung der Transformationseffizienz. Die Zellen wurden trypsinisiert und für 10 min bei $200 \times g$ zentrifugiert. Nach gründlicher Aspiration des Überstandes ohne Aufwirbeln des Zellpellets wurde dieses in 20 μ l Nucleofector-Lösung resuspendiert. Nun wurden maximal 2 μ l von Transposase- und kloniertem Transposonplasmid in einem Verhältnis von 1:2 hinzugegeben – beispielsweise 0,4 μ g und 0,8 μ g. Außerdem wurde ein Ansatz mit dem pmaxGFP-Vektor zur Überprüfung des Transfektionserfolgs vorbereitet. Je 20 μ l des

Zellsuspensions-DNA-Gemischs wurden in Nucleovetten-Strips überführt. Dabei ist eine Bildung von Luftblasen zu verhindern, denn die Proben müssen den kompletten Boden der Nucleovette bedecken. Anschließend wurden die Nucleovetten-Strips in den Nucleofector gestellt und das Programm FF104 gestartet. Nach Beendigung des Programms wurden die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen mit 80 µl vorgewärmtem Medium gemischt und in je ein Well einer 6-well-Platte ausgesät. Die 6-well-Platten wurden bei 37 °C im Zellkultur-Inkubator gelagert. Nach einer Erholungsphase von sieben Tagen erfolgte eine Selektion mit Puromycin 1µg/ml Medium über 14 Tage. Die Medienwechsel erfolgten zwei Mal pro Woche.

Der Transfektionserfolg konnte fluoreszenzmikroskopisch ab dem ersten Tag nach Elektroporation überprüft werden: Transfizierte Zellen erscheinen grün aufgrund des exprimierten GFPs. Nicht transfizierte oder abgestorbene Zellen zeigen keine Fluoreszenz.

2.2.3 Zellkultur

Für die adhärent wachsenden hMSCs wurden Zellkulturflaschen und -platten verschiedener Größen verwendet. Wenn nicht anders angegeben wurden die Zellen bei 37 °C und in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre im Zellkultur-Inkubator kultiviert.

2.2.3.1 Auftauen von hMSCs

Zunächst wurde eine Zellkulturflasche mit Medium vorbereitet und zum Vorwärmen in den Inkubator gelegt. Das jeweils korrekte Kryovial wurde aus dem Stickstofftank entnommen und sofort auf Trockeneis gegeben. Dann wurden die Zellen im Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut und sofort in die vorgewärmte Zellkulturflasche gegeben.

2.2.3.2 Medienwechsel bei hMSCs mit Standardmedium

Medienwechsel erfolgten, wenn nicht anders angegeben, zweimal die Woche. Das Standardmedium für die SCP1-Zellen und Derivate enthielt 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin in MEM α -Medium. Bei den HepG2BRA-Reporterzellen wurde anstelle

des MEM α -Mediums DMEM-Medium verwendet. Gegebenenfalls wurden Zeocin bzw. Puromycin zur Selektion hinzugefügt. Es wurde jeweils das alte Medium mit autoklavierten Glaspipetten abgesaugt und das vorgewärmte, neue Medium dazugegeben.

2.2.3.3 Medienwechsel bei der adipogenen Differenzierung

Für die adipogene Differenzierung wurden die Zellen in 6-well-Platten mit einer Dichte von $3,2 \times 10^4$ Zellen/cm² ausgesät und die adipogene Stimulation bei einer Konfluenz von 100 % begonnen. Drei „wells“ erhielten das Induktionsmedium und drei weitere das Standardmedium als Kontrolle. Für das Induktionsmedium der adipogenen Differenzierung wurden zum Standardmedium 1 μ M Dexamethason, 0,2 mM Indomethacin, 1 mM IBMX und 0,1 mg/ml Insulin hinzugegeben und für je fünf Tage auf den Zellen belassen. Das Erhaltungsmedium der adipogenen Differenzierung enthielt zusätzlich zum Standardmedium 0,1 mg/ml Insulin und wurde für zwei Tage auf den Zellen belassen. Die Medienwechsel wurden für insgesamt drei Wochen durchgeführt.

2.2.3.4 Passagieren von hMSCs

Die Zellen wurden jeweils vor Erreichen ihrer Konfluenz trypsiniert, gezählt und anschließend die benötigte Zellzahl in die gewünschte Kulturflasche bzw. -platte ausgesät. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS-Puffer) gewaschen, um überschüssiges Serum aus dem Medium zu entfernen, welches die Aktivität des Trypsins hemmen könnte. Der PBS-Puffer wurde ebenfalls abgesaugt und nun das 1x-Trypsin zugegeben. Die Zellen wurden für 5 min bei 37 °C inkubiert und die Ablösung der Zellen unter dem Lichtmikroskop überprüft. Dann wurde die Aktivität des Trypsins durch Zugabe des doppelten Volumens an Medium gestoppt.

10 μ l der Zellsuspension wurden in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und die vier äußeren Quadranten ausgezählt. Der Mittelwert multipliziert mit 1×10^4 ergab die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension – mithilfe dieses Werts konnten Kulturflaschen und -platten mit der gewünschten Zelldichte ausgesät werden.

2.2.3.5 Kryokonservierung von hMSCs

Für die längere Lagerung der Zellen – in der Regel in flüssigem Stickstoff bei -196 °C – eignet sich eine Kryokonservierung in speziellem Einfriermedium. Hierfür wurden die Zellen zunächst abgelöst mittels 1x Trypsin und anschließend wie oben beschrieben gezählt. Die gewünschte Zellzahl – für gewöhnlich 1×10^6 Zellen – wurde in einem Milliliter des Einfriermediums resuspendiert und in einem Kryovial aufbewahrt und sofort in Trockeneis gestellt. Das Einfriermedium besteht aus 80 % normalem Zellkulturmedium, 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) sowie 10 % FBS.

2.2.4 Expressions- und Aktivitätsbestimmung der BMPs

2.2.4.1 RT-PCR

Die Reverse-Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche RNA in cDNA umschreiben kann. In Kombination mit der PCR kann die Expression bestimmter Gene in Zellen nachgewiesen werden.

Zunächst wurden hMSCs in T25-Flaschen bis zur Konfluenz kultiviert. Mithilfe des RNeasy-Mini-Kits wurde nun die RNA aus den hMSCs nach Angaben des Herstellers isoliert. Je $1\text{ }\mu\text{g}$ RNA wurde für die cDNA-Synthese mittels Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit benötigt. Die synthetisierte cDNA wurde 1:10 verdünnt für PCR-Ansätze nach folgendem Programm verwendet:

	<u>Temperaturoptimum</u>	<u>Zeit</u>
Initiale Denaturierung:	94 °C	10 min
Denaturierung:	94 °C	30 s
Annealing:	individuell, abhängig von den verwendeten Primern: 50-62 °C	30 s
Elongation:	72 °C	1 min
Zyklen:		30-41

Finale Elongation:	72 °C	10 min
Kühlung:	8 °C	unlimitiert

2.2.4.2 BMP-ELISA

Die BMP-ELISAs wurden mit dem Medienüberstand jeweils nach Angaben des Kit-Herstellers durchgeführt. Zuvor wurden die Zellen für 3 Tage kultiviert.

2.2.4.3 BMP-Reporterzellassay

Nach dem Nachweis der BMP-Überexpression wurde die BMP-Bioaktivität mithilfe eines BMP-Reporterzellassays ermittelt.

Am ersten Tag wurden 1×10^4 HepG2BRA-Zellen pro well in eine 96-well-Titerplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Reporterzellen mit PBS gewaschen und anschließend 150 μ l der BMP-Überstände bzw. Kontrollen in Dubletten hinzugegeben. Die Kontrollen waren die Überstände der SCP1-GFP-Zellen, angereichert mit rekombinantem BMP in einer Konzentration von 500 ng/ml. Nach weiteren 16-18 Stunden wurden die Überstände abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Pro well wurden 20 μ l 1x Reporterlysepuffer hinzugefügt und die 96-well-Titerplatte für eine Stunde bei -20 °C gelagert. Die aufgetauten Proben wurden anschließend in eine schwarze 96-well-Titerplatte überführt und zum Tecan-Safire2-Multiplatte-Reader getragen. Dort erfolgte nach Zugabe von 100 μ l Luciferase-assay-Reagenz pro well unmittelbar die Messung im Tecan-Gerät. Mit diesem wurde die aus der Luciferaseaktivität resultierende Lumineszenz bestimmt.

2.2.5 Histologische Methoden

2.2.5.1 Zellfixierung mit Formalin vor Anwendung des BODIPY-Fluoreszenzfarbstoffs

Nach zwei Wochen adipogener Stimulation mittels Induktion- und Erhaltungsmedium wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden zu jedem Well der 6-well-Platte 500 μ l gekühltes, 4%iges Paraformaldehyd (PFA) hinzugegeben und für

25 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde das PFA entfernt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen.

2.2.5.2 Nachweis von Triglyzeriden mittels BODIPY-Fluoreszenzfarbstoffs

Zur Lipidfärbung wurde der BODIPY-Fluoreszenzfarbstoff angewandt. Hierfür wurde zunächst eine 5 mM-Stocklösung in DMSO hergestellt, aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Zur Anwendung als Farbstofflösung wurden 0,04 % der aufgetauten Stocklösung mit 99,96 % destilliertem H_2O verdünnt und pro Well 500 μl hinzugegeben und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 15 min inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen dreimal mit $1\times$ PBS gewaschen.

2.2.6 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde die Software GraphPad Prism 8.3.1 verwendet. Zur Untersuchung der statistischen Signifikanz wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt, als statistisch signifikant wurde ein p-Wert $< 0,05$ angesehen. Sämtliche Experimente wurden in mindestens zwei unabhängigen Durchläufen und in Duplikaten durchgeführt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung der BMP-überexprimierenden Zellen

3.1.1 Klonierungsstrategien

Es wurden fünf verschiedene BMP-überexprimierende Zelllinien mittels nicht-viralen Gentransfers generiert. Hierfür wurde jeweils ein eigenes Expressionsplasmid mittels Klonierung hergestellt: pSBbi-GP-hBMP2, pSBbi-GP-hBMP4 und pSBbi-GP-hBMP7 für die BMP-Homodimer-überexprimierenden Zellen sowie pSBbi-GP-hBMP2-P2A-hBMP7 und pSBbi-GP-hBMP4-P2A-hBMP7 für die BMP-Heterodimer-überexprimierenden Zellen. Als Vektorrückgrat diente pSBbi-GP, ein SB-Transposon mit einem konstitutiven bidirektionalen EF1 α -Promoter (s. Vektorkarte im Anhang) – auf der einen Seite befindet sich die SfiI-Klonierungsstelle für das Zielgen, auf der anderen Seite das eGFP-Fluoreszenzgen sowie das Puromycin-Resistenzgen (Kowarz et al., 2015). Zur Untersuchung der Einflüsse des Transfektionsprozesses und der Expression von eGFP wurde eine Negativkontrolle mit dem reinen Vektorrückgrat ohne BMP-Gen durchgeführt.

3.1.2 Klonierungsstrategie von pSBbi-GP-hBMP2

Das BMP2-Gen wurde von Bobby Bangoura, Wyeth freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Mittels PCR konnte der gewünschte Abschnitt amplifiziert werden und über die Oligonukleotide hBMP2_SfiI_for und hBMP2_SfiI_rev wurde sowohl am 5'-Ende als auch am 3'-Ende eine SfiI-Schnittstelle eingeführt. Durch die Ligation des PCR-Produkts in das pCR2.1-Plasmid entstand ein TOPO-hBMP2-Zwischenprodukt. Dieses wurde mittels analytischer Restriktionsverdauung von drei unter Blau-Weiß-Selektion ausgesuchten Klonen unter Verwendung folgender Enzyme überprüft: EcoRI (Fragmentgrößen: 3931bp + 1220bp), SfiI (Fragmentgrößen: 3931bp + 1220bp), HindIII/NotI (Fragmentgrößen: 3931bp + 1220bp). Ein ausgewählter Klon wurde zur Überprüfung auf Richtigkeit sequenziert. Im letzten Schritt wurde das hBMP2-Gen aus dem Zwischenprodukt TOPO-hBMP2 in den Zielvektor pSBbi-GP ligiert. Hierfür wurde das Zwischenprodukt mit SfiI (Fragmentgrößen: 3931bp + 1220bp) präparativ verdaut und das kleinere DNA-Fragment – das Insert – aus dem Gel exzidiert und

aufgereinigt. Der Zielvektor wurde ebenfalls mit SfiI (Fragmentgröße: 6431bp) präparativ verdaut. Zur Vermeidung einer Selbstligation des geschnittenen Zielvektors wurden dessen freien Enden mithilfe des CIP-Enzyms dephosphoryliert. Zuletzt wurde das Insert mit einer DNA-Ligase in den Zielvektor überführt. Zur Überprüfung des Endprodukts pSBbi-GP-hBMP2 wurden Kontrollverdaue mit SphI (Fragmentgrößen: 7269bp + 369bp) und FspI (Fragmentgrößen: 3501bp + 2245bp + 1892bp) durchgeführt (s. Abb. 3.2) und die Richtigkeit des Plasmids mittels Sequenzierung bestätigt.

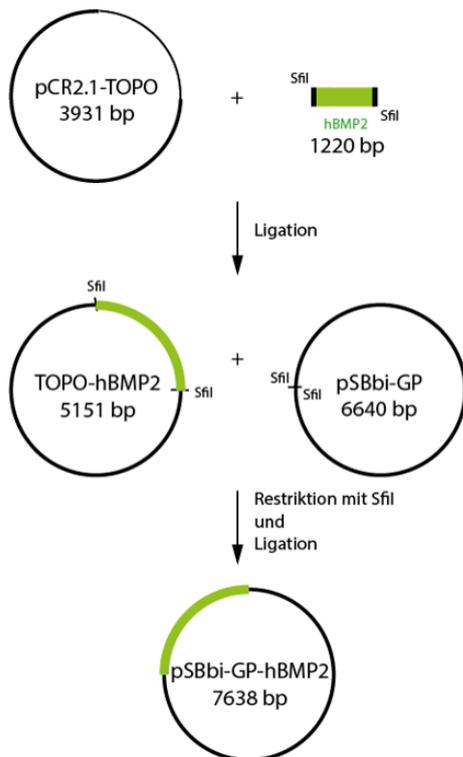


Abb. 3.1: Klonierungsstrategie von pSBbi-GP-hBMP2.

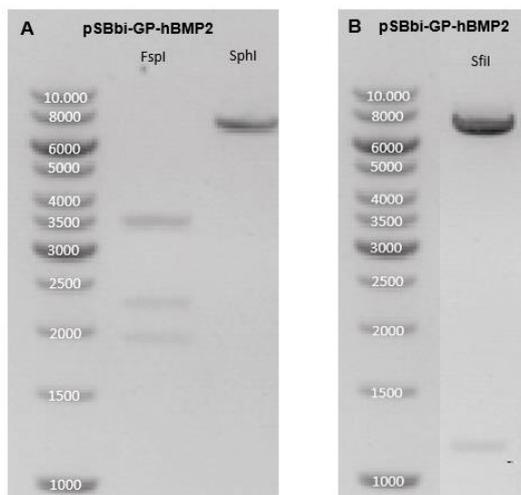


Abb. 3.2. Überprüfung des klonierten pSBbi-GP-hBMP2-Plasmids mittels analytischer Restriktionsverdau mit einer DNA-Leiter als Komigrationsstandard linksseitig, Angabe in Basenpaaren (bp). Bei Anwendung der Enzyme FspI und SphI wurden Fragmentgrößen von 3501bp + 2245bp + 1892bp bzw. 7269bp + 369bp erwartet (A). Da sich die kleine Bande bei der Verwendung von SphI nur sehr schwach identifizieren ließ, wurde ein weiterer Restriktionsverdau mit SfiI durchgeführt mit erwarteten Fragmentgrößen von 6431bp + 1207bp (B).

3.1.3 Klonierungsstrategie von pSBbi-GP-hBMP4

Das BMP4-Gen wurde bei PlasmID, dem Plasmidrepositorium der Harvard Medical School, gekauft (s. 2.1.6). Bei der PCR zur Amplifikation des benötigten Gens wurden mit den Primern hBMP4_PspXI_for und hBMP4_HindIII_rev Schnittstellen eingeführt: am 5'-Ende eine PspXI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine HindIII-Schnittstelle. Durch Ligation des PCR-Produkts in den pCR2.1-Klonierungsvektor entstand ein TOPO-hBMP4-Zwischenprodukt. Mithilfe des Blau-Weiß-Screenings wurden drei Klone für analytische Verdau mit HindIII/PspXI (Fragmentgrößen: 3931bp + 1231bp) und EcoRI (Fragmentgrößen: 3931bp + 1231bp) ausgewählt. Der vielversprechendste Klon wurde mittels Sequenzierung verifiziert. Anschließend wurde das hBMP4-Gen aus dem TOPO-hBMP4-Zwischenprodukt in den Zielvektor pSBbi-GP überführt. Dafür wurden beide Plasmide präparativ mit PspXI und HindIII doppelverdaut, also TOPO-BMP4 (Fragmentgrößen: 3931bp + 1231bp) und pSBbi-GP (Fragmentgröße: 6439bp). Das kleinere DNA-Fragment aus dem Verdau des Zwischenproduktes entspricht dem Insert, welches in den geschnittenen Zielvektor ligiert wurde. Zur Überprüfung des Endprodukts pSBbi-GP-hBMP4 wurden Kontrollverdau mit HindIII/PspXI (Fragmentgrößen: 6439bp + 1207bp) und Nco I (Fragmentgrößen: 6648bp + 1024bp) durchgeführt (s. Abb. 3.4) und das Plasmid mittels Sequenzierung verifiziert.

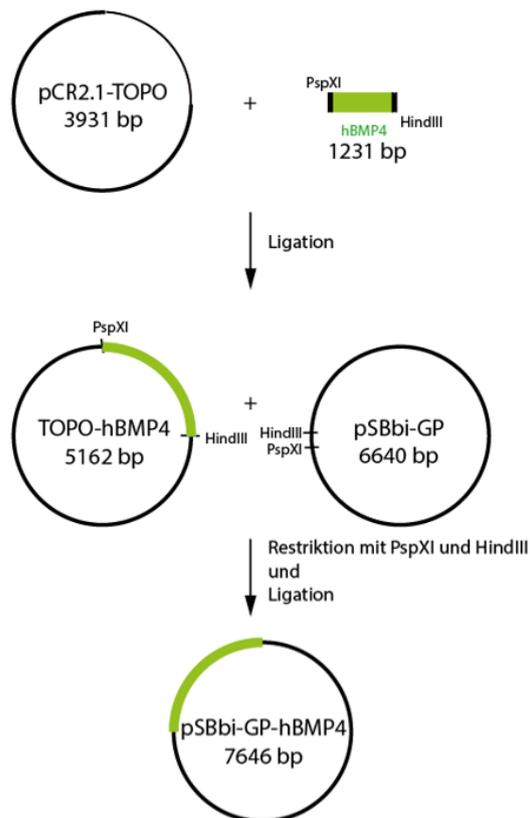


Abb. 3.3: Klonierungsstrategie von pSBbi-GP-hBMP4.

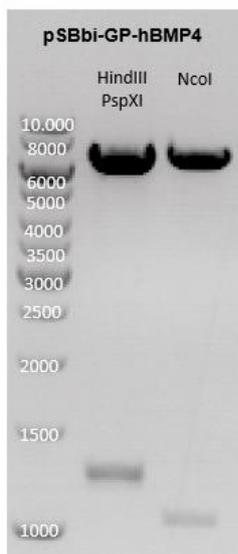


Abb. 3.4. Überprüfung des klonierten pSBbi-GP-hBMP4-Plasmids mittels analytischer Restriktionsverdau. Die erwarteten Fragmentgrößen bei Verwendung der Enzyme HindIII/PspXI bzw. NcoI betragen 6439bp + 1233bp respektive 6648bp + 1024bp.

3.1.4 Klonierungsstrategie von pSBbi-GP-hBMP7

Das BMP7-Gen wurde ebenfalls über PlasmID, dem Plasmidrepositorium der Harvard Medical School, erworben (s. 2.1.6). Das zu klonierende Gen wurde mittels PCR vervielfältigt. Über die

Primer hBMP7_SfiI_for und hBMP7_SfiI_rev wurden sowohl am 3'-Ende als auch am 5'-Ende eine SfiI-Schnittstelle eingefügt. Das PCR-Produkt wurde ebenfalls in den pCR2.1-TOPO-Klonierungsvektor zwischenkloniert und das TOPO-hBMP7-Zwischenprodukt aus drei blau-weiß-selektionierten Klonen mit SfiI (Fragmentgrößen: 3931bp + 1325bp) und HindIII/NotI (Fragmentgrößen: 3931bp + 1325bp) analytisch verdaut. Ein ausgesuchter Klon wurde sequenziert und das hBMP7-Gen aus dem TOPO-hBMP7-Zwischenprodukt in den Zielvektor pSBbi-GP eingeführt. Hierfür wurden präparative Verdauungen mit SfiI durchgeführt: TOPO-hBMP7 (Fragmentgrößen: 3931bp + 1325bp), pSBbi-GP (Fragmentgröße: 6431bp). Das kleinere DNA-Fragment aus dem Verdau des Zwischenproduktes entspricht wieder dem Insert, welches in den geschnittenen Zielvektor ligiert wurde. Dessen freie Enden wurden zuvor – um eine Selbstligation nach Restriktion zu vermeiden – durch das CIP-Enzym dephosphoryliert. Zur Überprüfung des Endprodukts pSBbi-GP-hBMP7 wurden Kontrollverdauungen mit SfiI (Fragmentgrößen: 6431bp + 1312bp) und XhoI (Fragmentgrößen: 7385bp + 358) durchgeführt (s. Abb. 3.6) und das Plasmid zur Kontrolle sequenziert.

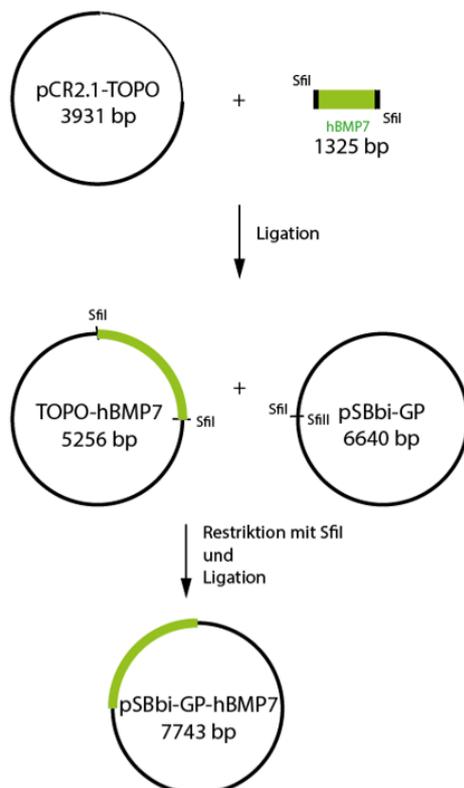


Abb. 3.5: Klonierungsstrategie von pSBbi-GP-hBMP7.



Abb. 3.6. Überprüfung des klonierten pSBbi-GP-hBMP7-Plasmids mittels analytischer Restriktionsverdau. Die erwarteten Fragmentgrößen bei Verwendung der Enzyme XhoI und SfiI betragen 7385bp + 358bp respektive 6431bp + 1312bp. Die kleinere Bande bei der Verwendung von XhoI war nach einer kurzen Elektrophoresezeit von 30 min in der korrekten Größe zu sehen, jedoch nach längerer Laufzeit, welche zur vollständigen Verteilung der DNA-Leiter als Komigrationsstandard benötigt wird, nur schwach sichtbar. Zur besseren Erkennbarkeit ist diese Bande mit einer Ellipse umrandet.

3.1.5 Klonierungsstrategie von pSBbi-GP-hBMP2/7

Als Grundlage für die Klonierung von pSBbi-GP-hBMP2/7 dienten die jeweiligen BMP-Homodimer-Plasmide; demnach also pSBbi-GP-hBMP2 und pSBbi-GP-hBMP7.

Zunächst wurde ein BMP2-P2A-BMP7-Oligo hergestellt, welches als Template-DNA für die erste PCR diente. Durch die verwendeten Primer BMP2_P2A_for und BMP2_P2A_7_6_rev wurden jeweils eine HindIII- und SmaI-Schnittstelle eingeführt, das PCR-Produkt wurde in den pCR2.1-TOPO-Vektor ligiert. Mithilfe des Blau-Weiß-Screening wurden drei ausgewählte Klone des ersten Zwischenprodukts TOPO-hBMP2-P2A analytisch unter Verwendung folgender Enzyme verdaut: NcoI (Fragmentgrößen: 7138bp + 670bp) und HindIII/SmaI (Fragmentgrößen: 7382bp + 426bp). Nun wurde das Zwischenprodukt in pSBbi-GP-hBMP2 ligiert. Hierfür wurden Zwischenprodukt (Fragmentgrößen: 7382bp + 426bp) und Zielvektor (Fragmentgröße: 7382bp) präparativ mit HindIII/SmaI doppelverdaut. Die kleinere Bande des Zwischenprodukts entsprach dem Insert und wurde im Verhältnis 3:1 zum Vektor zur Ligation angesetzt. Das zweite Zwischenprodukt pSBbi-GP-hBMP2-P2A wurde mittels folgender Restriktionsendonukleasen überprüft: BamHI (Fragmentgrößen: 5793bp + 2015bp) und NcoI (Fragmentgrößen: 7138bp + 670bp). Zuletzt erfolgte ein Doppelverdau mit HindIII/PspXI und

das Endprodukt pSBbi-GP-hBMP2-P2A-hBMP7 wurde zur Kontrolle analytisch mit NcoI (Fragmentgrößen: 7476bp + 851bp + 670bp) und HindIII/PspXI (Fragmentgrößen: 7802bp + 1195bp) verdaut (s. Abb. 3.8) und die Richtigkeit des Plasmids mittels Sequenzierung überprüft.

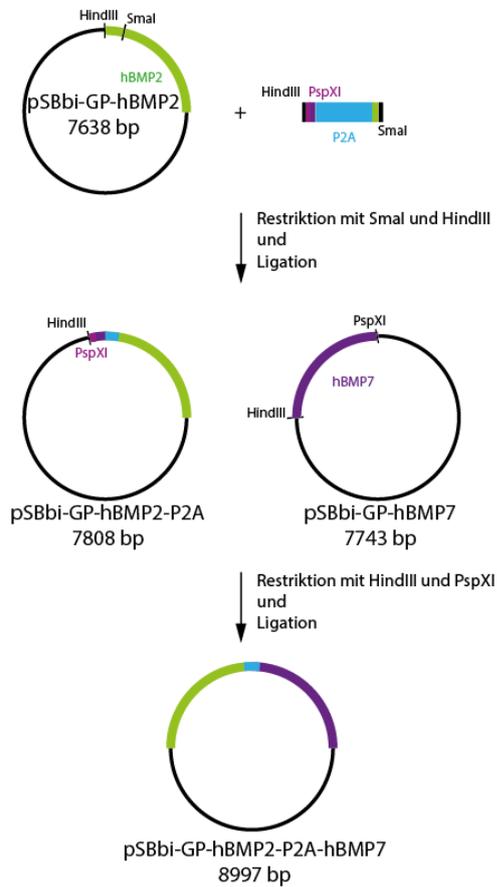


Abb. 3.7: Klonierungsstrategie des Plasmids pSBbi-GP-hBMP2/7 (vereinfacht).

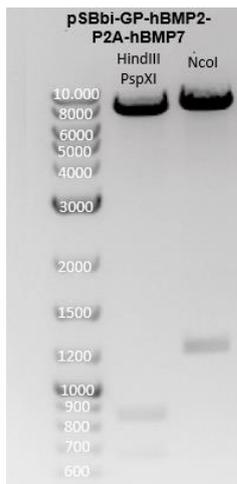


Abb. 3.8. Überprüfung des klonierten pSBbi-GP-hBMP2-P2A-hBMP7-Plasmids mittels analytischer Restriktionsverdaue. Bei NcoI waren Fragmentgrößen von 7802bp + 1195bp zu erwarten, bei der Verwendung von HindIII/PspXI sollten sich drei Fragmente à 7476bp + 851bp + 670bp.

3.1.6 Klonierungsstrategie von pSBbi-GP-hBMP4/7

Als Grundlage für die Klonierung von pSBbi-GP-hBMP4/7 dienten die jeweiligen BMP-Homodimer-Plasmide; demnach also pSBbi-GP-hBMP4 und pSBbi-GP-hBMP7.

Zuerst wurde ebenfalls ein PCR-Produkt hergestellt: BMP4-P2A-BMP7. Durch die PCR wurden mittels der Primer BMP4_P2A_for und BMP4_P2A_rev eine BamHI- bzw. HindIII-/XcmI-Schnittstelle eingeführt und das PCR-Produkt in pCR2.1-TOPO zwischenligiert. Aus mehreren Klonen wurde Plasmid-DNA isoliert und das erste Zwischenprodukt TOPO-BMP4-P2A mit Restriktionsverdauen durch die Enzyme BamHI (Fragmentgrößen: 5849bp + 2015bp) und XcmI (Fragmentgrößen: 7592bp + 272bp) überprüft. Dieses wurde gemeinsam mit dem Zielvektor pSBbi-GP-hBMP4 durch HindIII/XcmI präparativ doppelverdaut und in den Zielvektor ligiert. Das zweite Zwischenprodukt pSBbi-GP-hBMP4-P2A wurde durch NcoI (Fragmentgröße: 6840bp + 1024bp) und HindIII/XcmI (Fragmentgrößen: 8136bp + 272bp) analytisch verdaut und ein ausgewählter Klon zur Überprüfung sequenziert. Zuletzt wurden das zweite Zwischenprodukt und pSBbi-GP-hBMP7 mit HindIII/SgrAI präparativ doppelverdaut und ligiert (s. Abb. 3.9). Das Endprodukt pSBbi-GP-hBMP4-P2A-hBMP7 wurde durch analytische Verdaue mit HindIII/SgrAI (Fragmentgrößen: 7858bp + 1181bp) und NcoI (Fragmentgrößen: 7476bp + 1024bp + 539bp, s. Abb. 3.10) sowie mittels Sequenzierung eines ausgewählten Klons verifiziert.

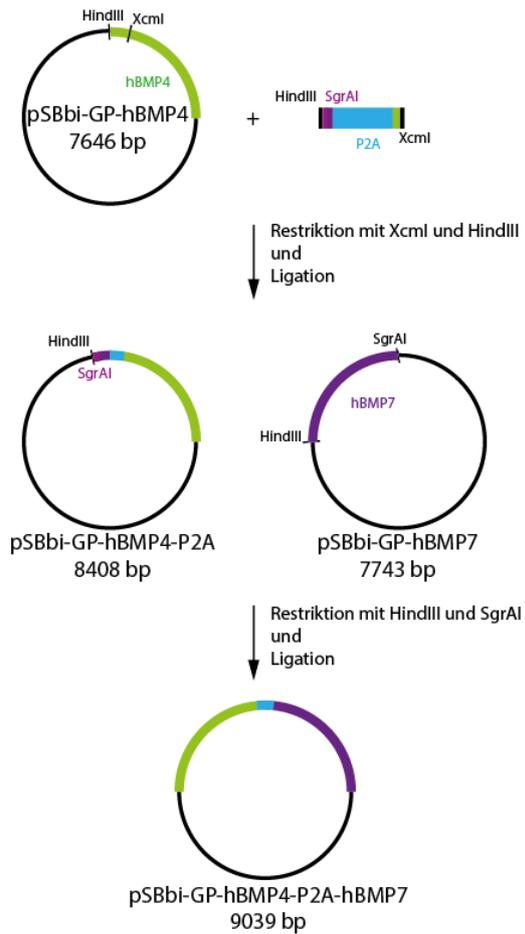


Abb. 3.9: Klonierungsstrategie des Plasmids pSBbi-GP-hBMP4/7 (vereinfacht).

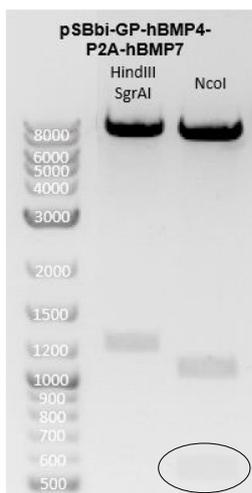


Abb. 3.10. Überprüfung des klonierten pSBbi-GP-hBMP4-P2A-hBMP7-Plasmids mittels analytischer Restriktionsverdaue. Die Verwendung der Enzyme HindIII/SgrAI führten zu erwarteten Fragmentgrößen von 7858bp + 1181bp, hingegen NcoI zu 7476bp + 1024bp + 539bp. Zur besseren Erkennbarkeit ist die kleinste Bande mit einer Ellipse umrandet.

3.2 Charakterisierung der BMP-überexprimierenden Zellen

3.2.1 Nachweis der Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS

Da die BMP-Gene in das oben beschriebene pSBbi-GP-Vektorrückgrat kloniert wurden, konnte angenommen werden, dass die Expression von GFP mit der Expression von BMP positiv korreliert. So war eine direkte Beurteilung des Transfektionserfolgs durch Fluoreszenzmikroskopie möglich. Abb. 3.6 zeigt die Zelllinien drei Tage nach Transfektion und noch vor der Antibiotikaselektion. In der oberen Zeile sind jeweils korrespondierend zu den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen die Phasenkontrastbilder dargestellt.

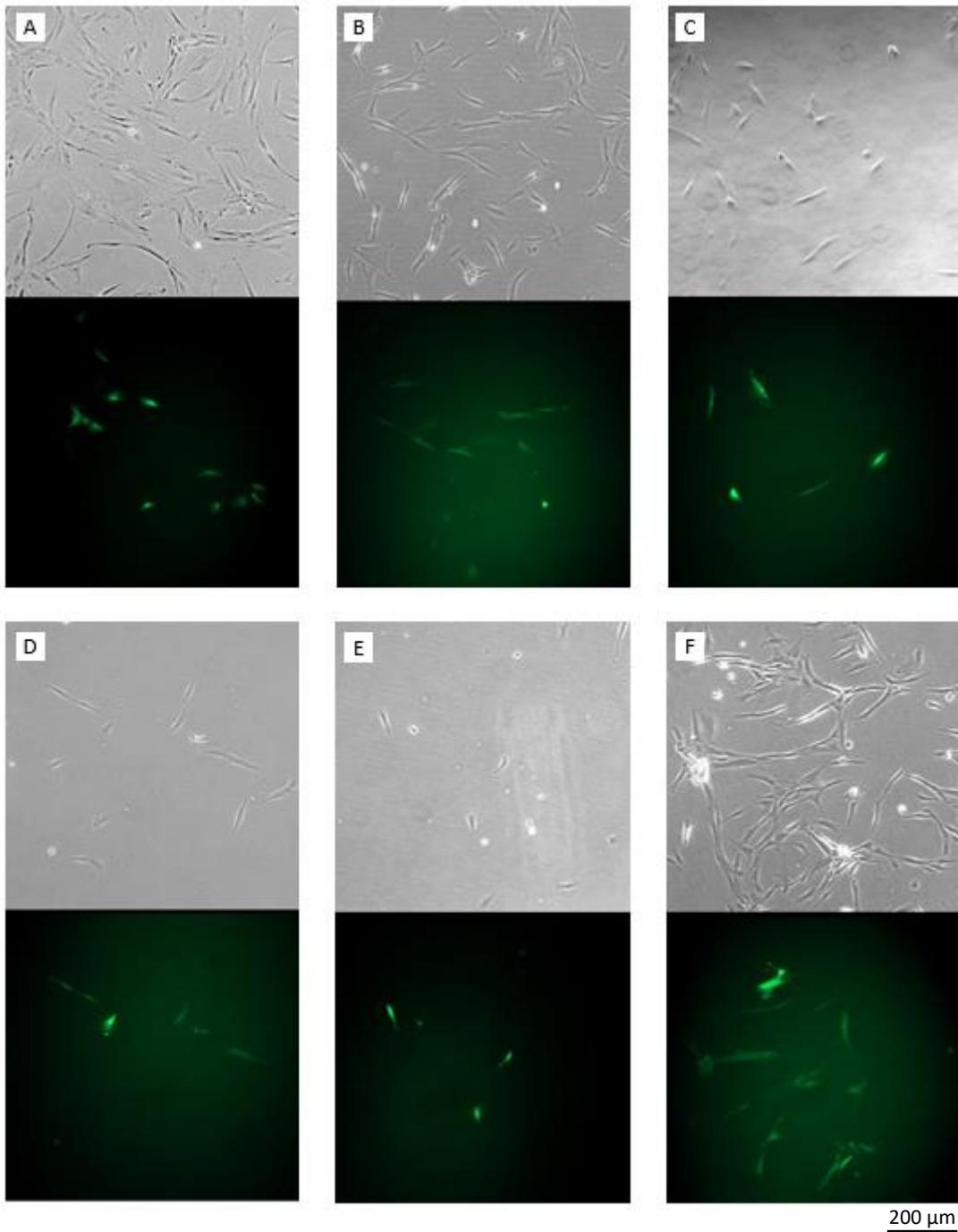


Abb. 3.6: Untersuchung der Expression von eGFP in den klonalen Zelllinien drei Tage nach Transfektion. In der oberen Zeile zeigen sich die jeweiligen Phasenkontrastaufnahmen zu den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen: SCP1-BMP2-GFP (A), SCP1-BMP4-GFP (B), SCP1-BMP7-GFP (C), SCP1-BMP2/7-GFP (D), SCP1-BMP4/7-GFP (E) und SCP1-GFP (F).

Es erfolgte eine zweiwöchige Selektion erfolgreich transfizierter Zellen durch das Antibiotikum Puromycin. In Folge starben nicht transfizierte Zellen, die nicht das Puromycin-Resistenzgen enthielten, ab. Transfizierte Zellen verfügen hingegen über das auf dem Vektorrückgrat befindliche Puromycinresistenzgen (s. Abb. 3.7).

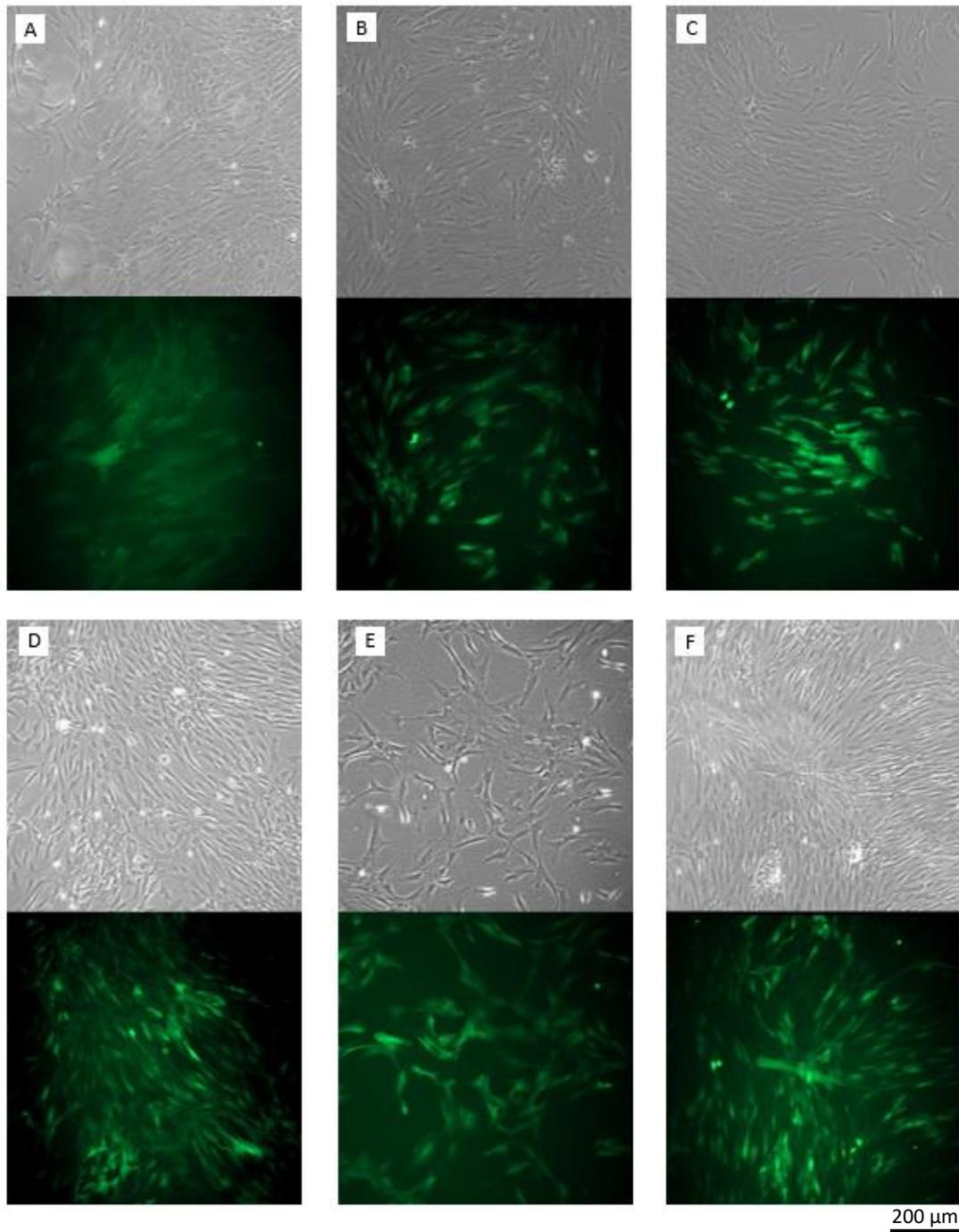


Abb. 3.7: Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen klonaler Zelllinien nach zweiwöchiger Antibiotikaselektion mittels Puromycin: SCP1-BMP2-GFP (A), SCP1-BMP4-GFP (B), SCP1-BMP7-GFP (C), SCP1-BMP2/7-GFP (D), SCP1-BMP4/7-GFP (E) und SCP1-GFP (F).

Die selektionierten Zellen wurden durchflusszytometrisch unter Verwendung eines FACS-Sorting-Geräts (engl.: fluorescence-activated cell sorting) anhand ihrer Fluoreszenzintensität jeweils in eine hoch und in eine niedrig eGFP-exprimierende Gruppe eingeteilt (FACS-Sorter-Daten aller Zelllinien im Anhang). Die Transfektionseffizienz konnte im Rahmen des FACS-

Sortings ermittelt werden und betrug nahezu 100 % (s. Tab. 3.1). Die weiteren Experimente wurden mit den hoch eGFP-exprimierenden Zelllinien fortgeführt: SCP1-BMP2-GFP, SCP1-BMP4-GFP, SCP1-BMP7-GFP, SCP1-BMP2/7-GFP, SCP1-BMP4/7-GFP, SCP1-GFP (s. Abb. 3.8).

Zelllinie	Transfektionseffizienz
SCP1-BMP2-GFP	99,8 %
SCP1-BMP4-GFP	99,8 %
SCP1-BMP7-GFP	99,8 %
SCP1-BMP2/7-GFP	99,3 %
SCP1-BMP4/7-GFP	99,5 %
SCP1-GFP	100 %

Tab. 3.1. Transfektionseffizienzen der einzelnen Zelllinien.

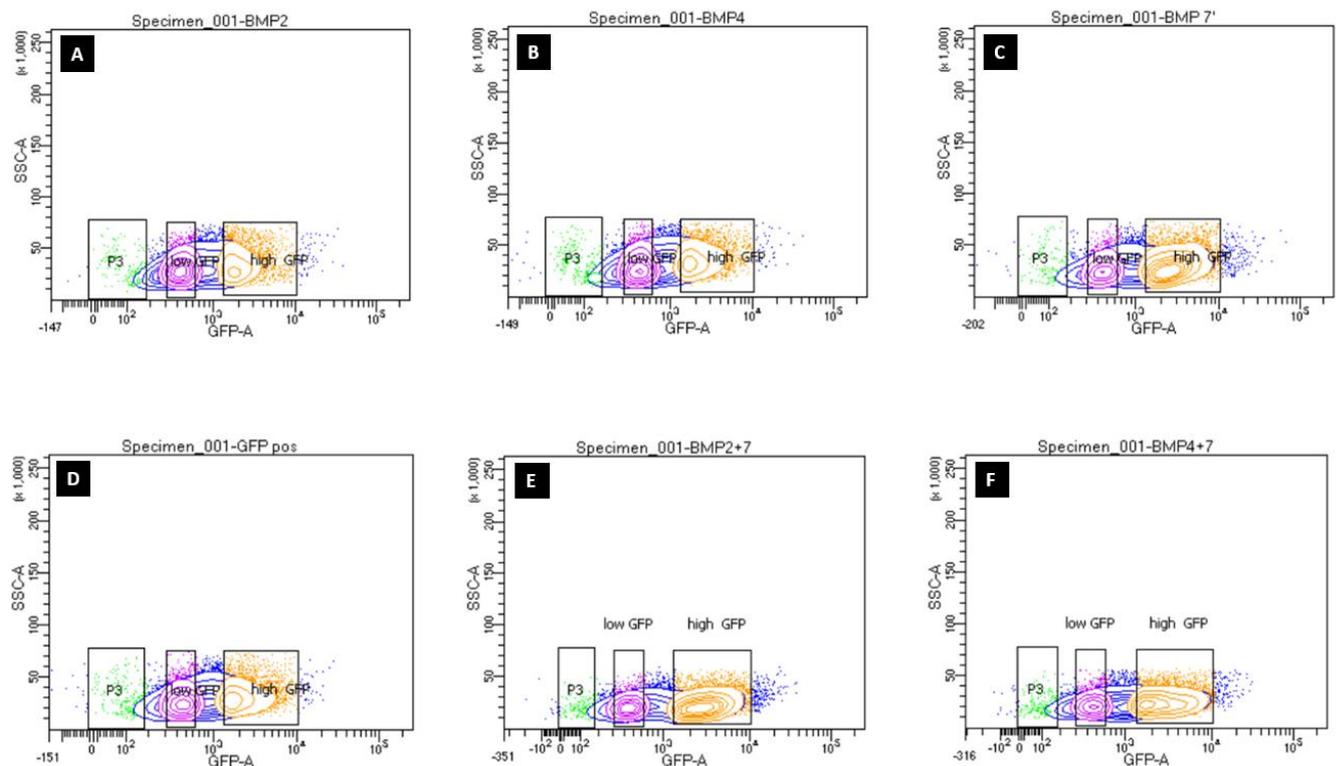


Abb. 3.8: Darstellung des FACS-Zellsortings und Einteilung in jeweils eine „low“ und „high“-Gruppe: SCP1-BMP2-GFP high (A), SCP1-BMP4-GFP high (B), SCP1-BMP7-GFP high (C), SCP1-GFP high (D), SCP1-BMP2/7-GFP high (E), SCP1-BMP4/7-GFP high (F). Es erfolgte eine Einteilung in stark und schwach fluoreszierende Zellen, welche jeweils einer hohen respektive schwachen eGFP-Expression mit jeweils positiv korrelierender höheren bzw. geringeren BMP-Überexpression entsprechen. Die weiteren

Experimente wurden mit den stark fluoreszierenden Zellen fortgeführt, um eine möglichst hohe BMP-Überexpression zu erzielen.

3.2.2 Nachweis der Expression auf RNA-Ebene

Zum Nachweis der Expression der BMP-Gene auf RNA-Ebene diente die RT-PCR. Hierfür wurde zunächst die einzusetzende cDNA-Menge mittels Expression eines Haushaltsgens – in der vorliegenden Arbeit GAPDH – normalisiert. Anschließend wurden BMP2-, BMP4- sowie BMP7-spezifische Primerpaare bei allen Zelllinien angewendet (s. Abb. 3.9).

Bei spezifisch an die BMP2-Sequenz bindenden Primern konnte eine Bande richtiger Größe bei der Verwendung der cDNA von SCP1-BMP2-GFP und eine stärkere Bande bei SCP1-BMP2/7-GFP gesehen werden. Bei spezifisch an die BMP4-Sequenz bindenden Primern ließen sich starke Banden richtiger Größe bei SCP1-BMP4-GFP und SCP1-BMP4/7-GFP darstellen. Es waren jedoch auch schwache Banden derselben Größe bei SCP1-BMP7-GFP, SCP1-BMP2/7-GFP und SCP1-GFP sowie eine sehr schwache Bande bei SCP1-BMP2-GFP sichtbar. Bei spezifisch an die BMP7-Sequenz bindenden Primern wurden gleich starke Banden richtiger Größe bei SCP1-BMP7-GFP, SCP1-BMP2/7-GFP-high sowie SCP1-BMP4/7-GFP dargestellt. Es konnte demnach die Expression des jeweils transfizierten BMP-Gens bzw. BMP-Gene für alle BMP-Zelllinien bewiesen werden.

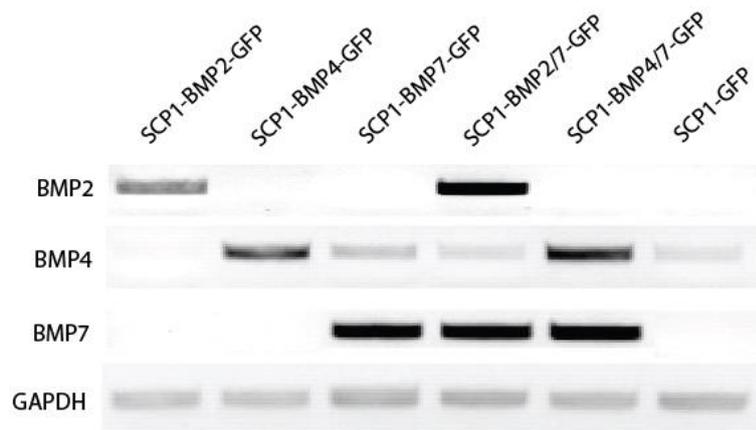


Abb. 3.9: RT-PCRs zum Nachweis der BMP-Expression auf RNA-Ebene. Die Darstellung einer Bande weist unter Verwendung spezifisch bindender Primerpaare die Expression des jeweiligen BMPs nach. Es wurde bewiesen, dass jede Zelllinie spezifisch ihr jeweiliges BMP bzw. ihre jeweiligen BMPs auf RNA-Ebene exprimiert. Zusätzlich lässt sich für BMP4 eine intrinsische Expression durch SCP1-Zellen ableiten.

Des Weiteren erfolgte eine semiquantitative Analyse der Genexpressionslevel mittels ImageJ nach Normalisierung auf das Haushaltsgen GAPDH (s. Tab. 3.2 und Abb. 3.10).

Genexpression nach Normalisierung
auf das Haushaltsgen GAPDH ($\triangleq 100\%$)

BMP2	SCP1-BMP2-GFP	146,43 %
	SCP1-BMP2/7 GFP	228,01 %
BMP4	SCP1-BMP2-GFP	3,50 %
	SCP1-BMP4-GFP	379,35 %
	SCP1-BMP7-GFP	44,41 %
	SCP1-BMP2/7-GFP	39,73 %
	SCP1-BMP4/7-GFP	222,17 %
	SCP1-GFP	28,21 %
BMP7	SCP1-BMP7-GFP	290,94 %
	SCP1-BMP2/7-GFP	249,01 %
	SCP1-BMP4/7-GFP	309,54 %

Tab. 3.2. Genexpression nach Normalisierung auf das Haushaltsgen GAPDH, welches 100 % entspricht.

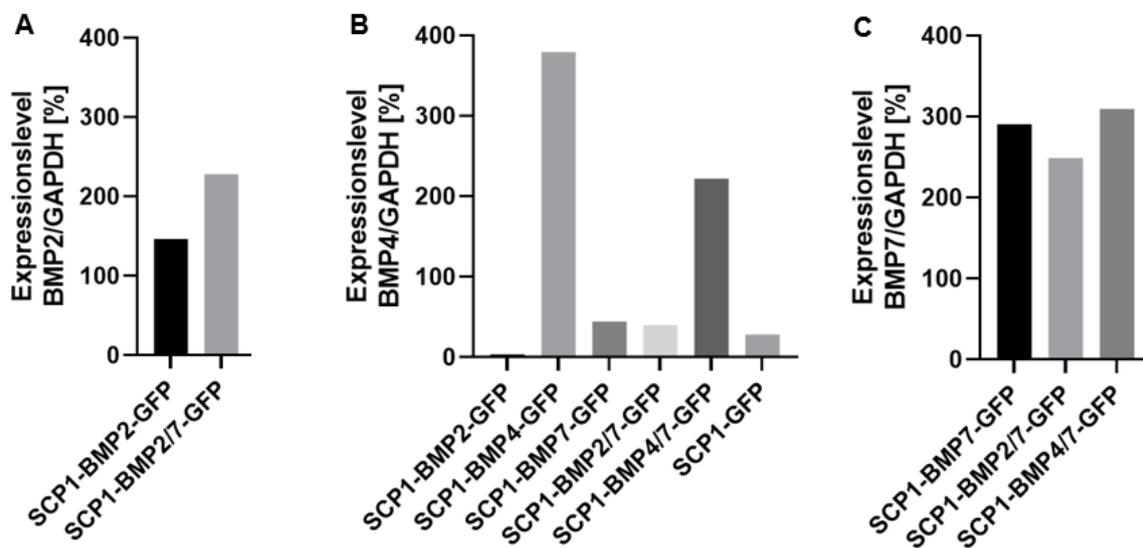


Abb. 3.10. Genexpressionslevel von BMP2 (A), BMP4 (B) und BMP7 (C) nach Normalisierung auf GAPDH. Alle Zelllinien überexprimierten ihr jeweiliges BMP als Homo- respektive Heterodimer. Auffällig ist eine intrinsische BMP4-Expression in allen Zelllinien (aufgrund des Maßstabes ist der Wert von 3,50 % bei der Zelllinie SCP1-BMP2-GFP kaum wahrnehmbar).

3.2.3 Nachweis der Expression mittels BMP-ELISA

Unter Verwendung von kommerziellen ELISAs wurde das von den Zellen in den Zellkulturüberstand sezernierte BMP auf Proteinebene untersucht. Hierzu wurden die Zelllinien in einer Dichte von 5000 Z./cm² in eine T75-Flasche ausgesät und für fünf Tage kultiviert. Anschließend wurden die Überstände gesammelt und in Aliquots schockgefroren sowie die Zellen in den T75-Flaschen zur besseren Vergleichbarkeit gezählt. Die sezernierte BMP-Menge im Medium wurde mit spezifischen BMP-ELISAs quantifiziert; anhand der Zellzahl konnte die BMP-Konzentration in [ng/10000 Zellen] umgerechnet werden und so die Syntheseleistung verglichen werden. Zum Nachweis der Spezifität der BMP-ELISAs wurden jeweils Überstände aller Zelllinien aufgetragen: So wurden beim BMP2-ELISA Überstände von SCP1-BMP2-GFP, SCP1-BMP4-GFP, SCP1-BMP7-GFP, SCP1-BMP2/7-GFP, SCP1-BMP4/7-GFP und SCP1-GFP aufgetragen, ebenso beim BMP4- und BMP7-ELISA. Die BMP-ELISAs erwiesen sich als spezifisch für ihr jeweiliges BMP. Es zeigten sich höhere Expressionslevel bei BMP4 und BMP7 im Vergleich zu den jeweiligen Heterodimeren; bei BMP2 hingegen war das Expressionslevel geringer als zum dazugehörigen Heterodimer (s. Abb. 3.10 und Tab. 3.3).

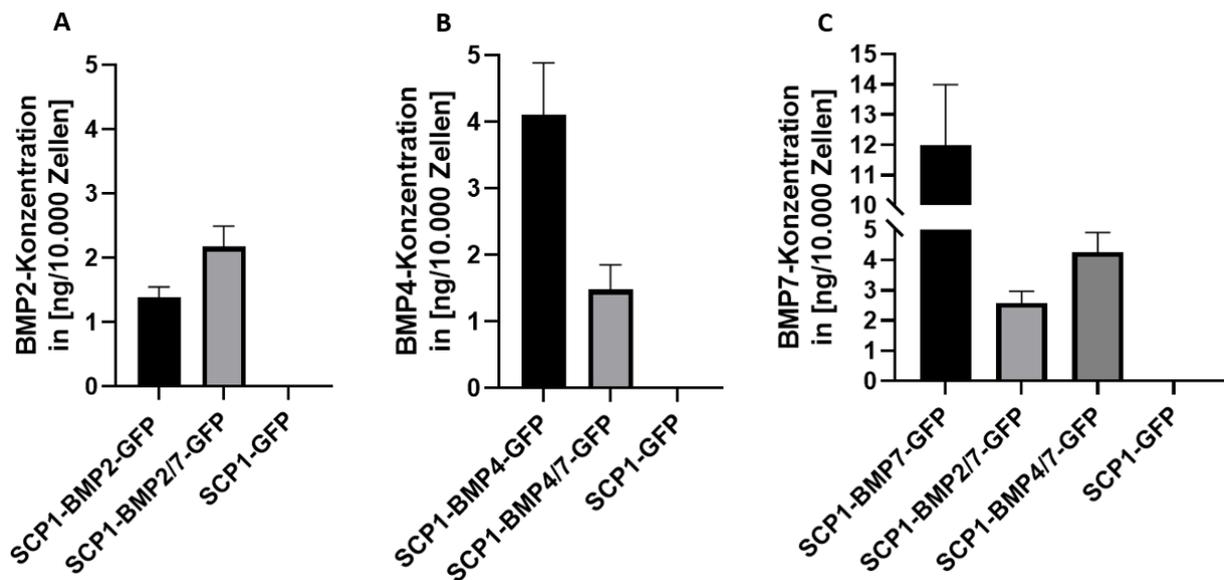


Abb. 3.10: Untersuchung der BMP-Überexpression mittels BMP-ELISAs: BMP2-ELISA (A), BMP4-ELISA (B) und BMP7-ELISA (C). Die BMP-Konzentration ist in [ng/10.000 Zellen] angegeben. (n=2)

BMP-Protein	Zelllinie	mittlere BMP-Konzentration [ng/10.000 Zellen]
BMP2	SCP1-BMP2-GFP	1,38 ± 0,11
	SCP1-BMP2/7-GFP	2,17 ± 0,22
BMP4	SCP1-BMP4-GFP	4,10 ± 0,63
	SCP1-BMP4/7-GFP	1,47 ± 0,30
BMP7	SCP1-BMP7-GFP	11,99 ± 1,63
	SCP1-BMP2/7-GFP	2,58 ± 0,31
	SCP1-BMP4/7-GFP	4,26 ± 0,53

Tab. 3.3. BMP-Konzentration in den Medienüberständen über ELISA [ng/10.000 Zellen]. n=2

3.2.4 Untersuchung der Proteinaktivität mittels BMP-Reporterzellassay

Zur Untersuchung der BMP-Bioaktivität wurde die HepG2BRA-Reportzelllinie verwendet, ihr BMP/Smad-abhängiger Enhancer ist mit einem Luciferase-Reportergen verbunden. Die Exposition dieser Zellen gegenüber BMPs führt daher zur Luciferaseexpression. Die mittels Luminometer gemessenen dimensionslosen Werte wurden in RLU (engl.: relative light units) mit SCP1-GFP entsprechend 1 normalisiert. Als Kontrolle dienten Überstände der SCP1-GFP, angereichert mit rekombinantem humanem BMP2, BMP4 bzw. BMP7 in einer Konzentration von 500 ng/ml. Der BMP-Reporterzellassay weist unspezifisch für diverse BMPs ihre jeweilige Bioaktivität nach. Anhand der Abb. 3.11 zeigt sich, dass der Assay je nach Art des BMPs unterschiedlich sensitiv ist. Hier wurden Kontrollen von BMP2, BMP4 und BMP7 in gleicher Konzentration eingesetzt und verschiedene RLU-Werte ermittelt, sodass davon auszugehen ist, dass der Assay sensitiver für BMP2 und BMP4 im Vergleich zu BMP7 ist. Die gemessene Luziferase-Aktivität von den Überständen der SCP1-BMP2-GFP-Zellen war mit $25,9 \pm 4,5$ RLU, von den SCP1-BMP4-GFP-Zellen mit $23,1 \pm 8,8$ RLU und von den SCP1-BMP7-GFP-Zellen mit $25,1 \pm 2,6$ jeweils signifikant höher ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test) als bei den SCP1-GFP-Zellen. Die Luziferase-Aktivität bei den Heterodimer-Zelllinien war bei den SCP1-BMP2/7-Zellen mit $11,4 \pm 6,4$ RLU nicht signifikant höher, bei den SCP1-BMP4/7 mit $9,2 \pm 1,1$ RLU jedoch wieder signifikant höher als bei den SCP1-GFP-Zellen.

Insgesamt ist die BMP-Bioaktivität der BMP-Homodimer-überexprimierenden Zelllinien höher als jene der BMP-Heterodimer-überexprimierenden Zelllinien.

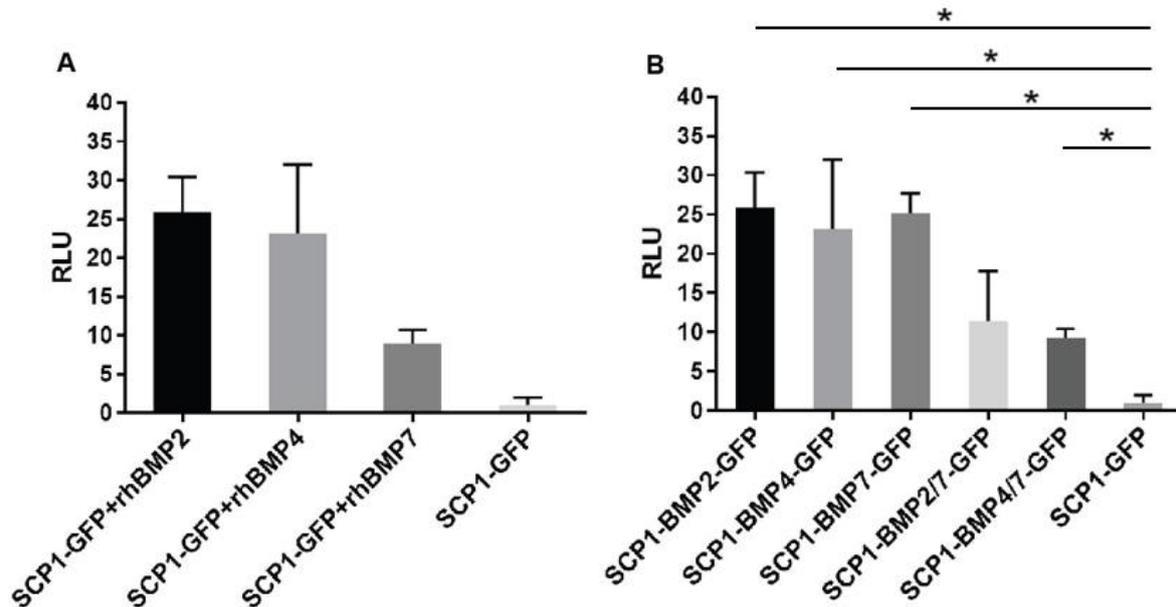


Abb. 3.11: MP-Reporterzellassay zur Untersuchung der BMP-Aktivität. Alle mittels Luminometer gemessenen dimensionslosen Werte wurden zur Luciferaseaktivität nach Inkubation auf SCP1-GFP-Zellen, welche mit 1 RLU (engl.: relative light unit) gleichgesetzt wurde, in Bezug gesetzt. Als Positivkontrollen dienten die Überstände der SCP1-Zellen, jeweils versetzt mit 500 ng/ml rhBMP2, rhBMP4 oder rhBMP7 (A). Die BMP-Bioaktivität der BMP-Homodimer-überexprimierenden Zelllinien ist höher als jene der BMP-Heterodimer-überexprimierenden Zelllinien (B). Es handelt sich bei den dargestellten Werten um Mittelwerte. n=3

3.2.5 Adipogene Differenzierung

Nach adipogener Stimulierung der SCP1-rh-BMP- und SCP-1-mock Zellen wurden die gebildeten Lipidvakuolen mit dem BODIPY (D3922)-Fluoreszenzfarbstoffs angefärbt. Anschließend wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der gesamten Wells angefertigt (s. Abb. 3.12). Mittels ImageJ wurde für jeden Klon respektive für die Mock-Variante die Fluoreszenzintensität quantifiziert und der Anteil der gefärbten Lipidtropfen in Bezug zur gesamten Wellfläche errechnet. Für die SCP1-mock-Zelllinie, also jene Zellen, welche BMP nicht überexprimieren, zeigte sich eine deutlich höhere Intensität und ein bis zu siebenmal größerer Anteil der Lipidtropfen an der Gesamtfläche des Wells im Vergleich zu den BMP-überexprimierenden Zellen (s. Abb. 3.13.): Bei den SCP1-mock-Zellen war der Anteil mit 41,2

% \pm 2,4 % signifikant höher als für die SCP1-rhBMP2-Klon1-Zelllinie mit einem Anteil von 6,4 % \pm 1,6 % und die SCP1-rh-BMP2-Klon4-Zelllinie mit 13,4 % \pm 4,0 % ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test).

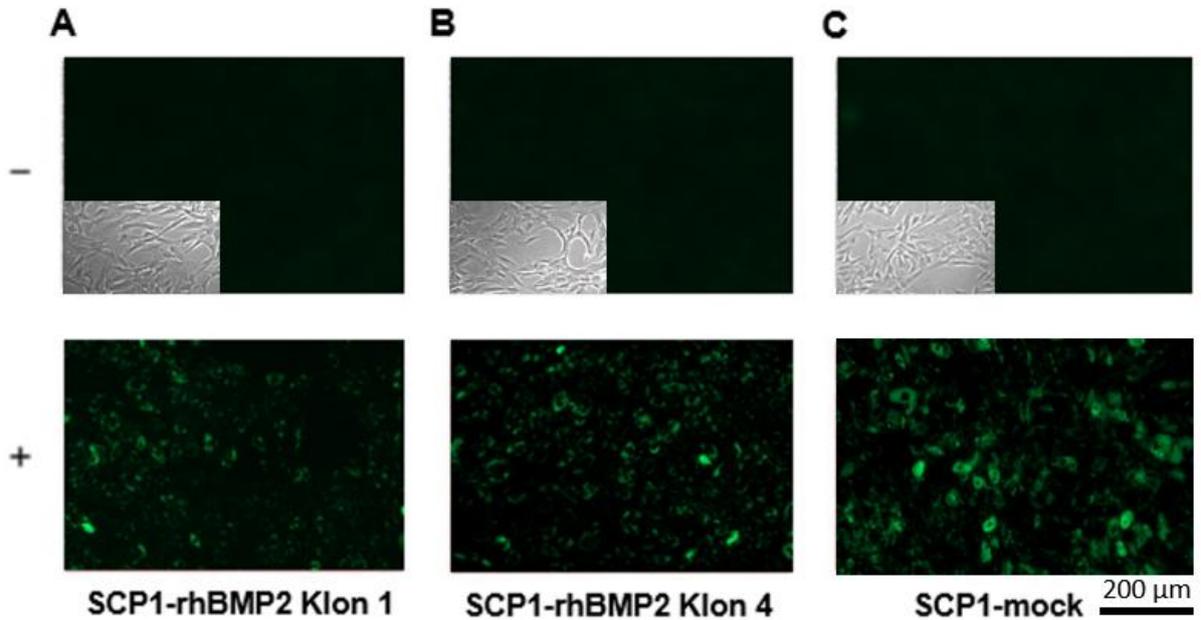


Abb. 3.12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach adipogener Stimulation. Die obere Reihe zeigt die Kontrollen (-): Bei diesen Zellen wurden die Medienwechsel mit einem Kontrollmedium ohne adipogene Zusätze durchgeführt. Die untere Reihe stellt die adipogen stimulierten Zellen dar (+): Im Wechsel wurden Induktions- und Erhaltungsmedium verwendet. Die gefärbten Lipidtropfen erscheinen grün fluoreszierend. In der oberen Reihe wurden die entsprechenden Phasenkontrastbilder eingefügt, um die Zellkonfluenz zu verdeutlichen, welche aufgrund der fehlenden Fluoreszenz nicht sichtbar ist. In der unteren Reihe zeigt sich, dass bei der SCP1-mock-Zelllinie ein höherer Anteil an Lipidtropfen vorliegt und diese auch größer waren; der Unterschied wurde mittels ImageJ quantifiziert und in der Abbildung 3.13 dargestellt. $n=3$

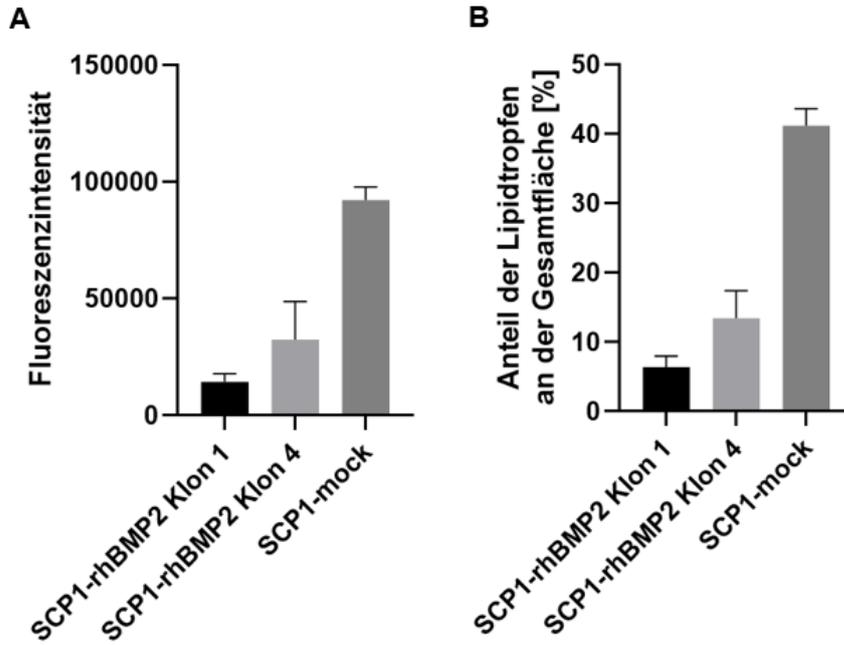


Abb. 3.13. Quantifikation der dimensionslosen Fluoreszenzintensität (A). Da es sich bei BODIPY um einen Fluoreszenzfarbstoff handelt, erscheinen die gefärbten Lipidtropfen bei Betrachtung mit dem Fluoreszenzmikroskop grün. So kann der Anteil der Lipidtropfen an der Gesamtfläche der Wells berechnet werden und als weiteres Maß zur Beurteilung der BMP-Wirkung auf die adipogene Differenzierung wirken. Für die SCP1-rhBMP-Klon1-Zelllinie zeigte sich ein Anteil von $6,4 \% \pm 1,6 \%$, für die SCP1-rh-BMP2-Klon4-Zelllinie $13,4 \% \pm 4,0 \%$ und für die SCP1-mock-Zellen $41,2 \% \pm 2,4 \%$. n=3

4 Diskussion

4.1 Herstellung Zelllinien

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, BMP-überexprimierende humane mesenchymale Stammzellen herzustellen: Es wurden hierbei BMP2, -4 und -7-Homodimer-überexprimierende Zellen sowie BMP2/7- und BMP4/7-Heterodimer-überexprimierende hMSCs generiert. Es wurden verschiedene BMPs kloniert, um ihre individuellen Eigenschaften zu charakterisieren und zu vergleichen. Von den aktuell ca. 20 bekannten BMP-Typen sind insbesondere BMP2, -4 und -7 durch ihren starken osteogenen Effekt hervorzuheben (Chen et al., 2012). Unumstritten ist ihre Rolle in der Knochenbildung und Frakturheilung. Für BMP-Heterodimere wurde ein größerer osteoinduktiver Effekt beschrieben als für BMP-Homodimere (Morimoto et. al, 2015). Deshalb sollten zusätzlich Heterodimer-überexprimierende Zelllinien generiert werden.

Zur besseren Visualisierung und um die transfizierten, BMP-überexprimierenden Zellen direkt mittels Fluoreszenzmikroskopie untersuchen zu können, wurden mit dem Vektor, der die jeweiligen BMPs und BMP-Heterodimere-Sequenzen codiert, die eGFP-Sequenz miteingeführt. GFP wurde initial 1961 in der Quallenart *Aequorea victoria* von Shimomura entdeckt (Shimomura et. al, 1962). In den folgenden Jahren entwickelte sich GFP zu einem weitverbreiteten Protein in der Zellbiologie und Biochemie und ist auch heutzutage ein unverzichtbares Werkzeug in der Molekularbiologie und dient als Marker für die Genexpression (Tsien et. al, 1998). Das Wildtyp-GFP wurde modifiziert und bietet in der „enhanced“-Version zahlreiche Vorteile gegenüber anderen fluoreszierenden Proteinen: Es überzeugt mit einer starken Leuchtkraft und Stabilität über Monate hinweg, mit nur geringer Ausbleichung. Zudem eignet es sich sowohl für *in vivo* als auch für *in vitro* Untersuchungen (Lippincott-Schwartz et. al, 2003).

Für einen optimalen Gentransfer wurde eine nicht-virale, physikalische Methode verwendet. Wie in der Einleitung erläutert sollten drei Hauptkriterien für einen sicheren, effizienten Gentransfer erfüllt sein: das Transgen muss vor einem Abbau durch intrazelluläre Nukleasen geschützt sein, durch die Plasmamembran in den Nukleus gebracht werden und der Transfer

darf dabei keinen schädlichen Einfluss auf die Zielzelle haben (Gao et al., 2007). Nach ausführlicher Literaturrecherche und unter Abwägen der Vor- und Nachteile wurde eine nicht-virale Gentransfermethode ausgewählt. Virale Vektoren verfügen zwar über eine hohe Effizienz, haben jedoch aufgrund ihrer Immunogenität einen potenziell schädlichen Effekt auf den Zielorganismus. Zusätzlich sind bereits maligne Zelltransformationen im Fall einer ektopischen Virus-DNA-Integration bekannt und beschrieben worden (Ramamoorth und Narvekar, 2015). Innerhalb des nicht-viralen Gentransfers existieren wiederum verschiedene Methoden mit jeweiligen Vor- und Nachteilen. Als vielversprechend zeigte sich die Elektroporation aufgrund ihrer technisch einfachen Anwendung und Möglichkeit zur stabilen Transfektion. Nachteilig erwies sich jedoch ein Absterben der elektrotransfizierten Zellen von ca. 75 % nach Zellenausählung in der Neubauerzählkammer. Für eine möglichst hohe Transfektionseffizienz ist selbstverständlich das Überleben einer großen Anzahl von Zellen essenziell. Es erholten sich alle Zelllinien zügig und nach der Puromycinselektion nach 2 Wochen war eine Transfektionsrate von bis zu 100 % anzunehmen, da sämtliche Zellen fluoreszierten. Dies wurde im anschließend erfolgten Zellsorting mittels FACS bestätigt (s. Tab. 3.1). Dies liegt deutlich über den in der Literatur beschriebenen Werten bezüglich der Transfektionseffizienz mittels Elektroporation bei hMSCs von 44,6 % bis zu 90 % (Helledie T et al., 2008, von der Haar K et. al, 2019). Die nicht-virale Transfektion mittels Sleeping-Beauty-Transposon-System liefert zudem sehr gute Effizienzen im Vergleich zur lentiviralen Transduktion von hMSC, hier sind variable Werte von 39 % bis 89 % beschrieben (Lin P et. al, 2012).

4.2 BMP-Überexpression

In der vorliegenden Arbeit wurden erfolgreich stabil BMP-überexprimierende Zelllinien hergestellt: SCP1-BMP2-GFP, SCP1-BMP4-GFP, SCP1-BMP7-GFP, SCP1-BMP2/7-GFP und SCP1-BMP4/7-GFP. Unter Anwendung von FACS-Sorting und Fluoreszenzmikroskopie wurde die eGFP-Expression bewiesen, welche aufgrund der beschriebenen Klonierungstechnik mit der BMP-Expression korreliert. Mittels RT-PCR und ELISA konnte nachgewiesen werden, dass jede Zelllinie ihr jeweiliges bzw. ihre jeweiligen BMP-Gene sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene überexprimiert. In weiteren Experimenten wurde die Bioaktivität der überexprimierten BMPs bestätigt, dies wird separat im nächsten Abschnitt beleuchtet.

Um besonders stark BMP-überexprimierende Zellen zu detektieren und mit ihnen die Folgeexperimente durchzuführen, wurden die Zelllinien nach der Transfektion zunächst mittels dem Antibiotikum Puromycin selektioniert. Wir erinnern uns, dass als Vektorrückgrat für die Klonierung das Plasmid pSBbi-GP ausgesucht wurde: Hierbei handelt es sich um ein Sleeping-Beauty-Transposon mit einem bidirektionalen Promoter mit einer Sfil-Klonierungsstelle für das Zielgen einerseits und einem eGFP-Fluoreszenzgen sowie Puromycin-Resistenzgen andererseits. Nur die stabil transfizierten Zellen waren in der Lage, neben der BMP- und eGFP-Expression auch das Puromycin-Resistenzgen zu bilden. Der Erfolg der Selektionsmethode konnte unmittelbar durch Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden: Die erfolgreich transfizierten Zellen fluoreszierten grün. Der unmittelbare Vergleich mit den Phasenkontrastbildern bestätigte, dass nach der Puromycin-Selektion alle Zellen fluoreszierten. Im Anschluss erfolgte eine RT-PCR-Analyse, hierbei konnten bei allen Zelllinien nach Bindung der spezifischen Primer an die jeweiligen BMP-Sequenzen Banden korrekter Größe gesehen werden. Die semiquantitative Auswertung der Level der Genexpression erfolgte über ImageJ nach Normalisierung auf GAPDH (s. Tab. 3.2).

Bezüglich der Genexpression von BMP2 zeigte sich, dass die Heterodimer-Zelllinie SCP1-BMP2/7-GFP mit 228,0 % ein höheres Expressionslevel als die Homodimer-Zelllinie SCP1-BMP2-GFP mit 146,4 % aufwies. Jedoch war bei der BMP4-Expression das Level der Homodimer-Zelllinie mit 379,3 % höher als jenes der dazugehörigen Heterodimer-Zelllinie SCP1-BMP4/7-GFP mit 222,1 %. Auffällig war zudem, dass auch die nicht BMP4-überexprimierenden Zelllinien SCP1-BMP2-GFP, SCP1-BMP7-GFP, SCP1-BMP2/7-GFP und SCP1-GFP eine Bande in der RT-PCR aufwiesen, jedoch zeigte sich nach Normalisierung auf GAPDH lediglich eine geringe Genexpression von 3,5 % bis max. 44,4 %. Dies spricht für eine bereits intrinsisch vorhandene BMP4-Expression in der SCP1-Zelllinie und die stärkeren Banden bei SCP1-BMP4-GFP und SCP1-BMP4/7-GFP beweisen die Überexpression im Vergleich zum Ausgangslevel. Bei SCP1-BMP7-GFP, SCP1-BMP2/7-GFP und SCP1-BMP4/7-GFP zeigten sich jeweils gleich starke Banden, dies bestätigte sich nach Normalisierung auf GAPDH in ähnlich hohen Expressionsleveln von 249,0 % bis 309,5 % (s. Abb. 3.1.).

Im ELISA bestätigte sich die BMP-Überexpression auf Proteinebene mittels Untersuchung der Medienüberstände der verschiedenen Zelllinien. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Zellen gezählt und die Proteinsyntheseleistung als BMP-Konzentration in ng/10.000 Zellen

ermittelt. Die BMP2-Konzentration war bei der Heterodimer-Zelllinie SCP1-BMP2/BMP7-GFP mit $2,17 \pm 0,22$ ng/10.000 Zellen höher als bei der Homodimer-Zelllinie SCP1-BMP2-GFP mit $1,38 \pm 0,11$ ng/10.000 Zellen. Hingegen zeigte sich die BMP4-Konzentration bei der Homodimer-Zelllinie SCP1-BMP4-GFP mit $4,10 \pm 0,63$ ng/10.000 Zellen höher als bei der zugehörigen Heterodimer-Zelllinie SCP1-BMP4/7-GFP mit $1,47 \pm 0,30$ ng/10.000 Zellen. Für BMP7 ließ sich bei der Homodimer-Zelllinie die höchste Proteinkonzentration mit $11,99 \pm 1,63$ ng/10.000 Zellen nachweisen, gefolgt von den Heterodimer-Zelllinien SCP1-BMP4/7-GFP mit $4,26 \pm 0,53$ ng/10.000 Zellen und SCP1-BMP2/7-GFP mit $2,58 \pm 0,31$ ng/10.000 Zellen. Bei BMP2 und BMP4 korrelierte das in der RT-PCR ermittelte Expressionslevel mit dem Ausmaß der Überexpression auf Proteinebene: Bei BMP2 zeigte die Heterodimer-Zelllinie eine höhere Genexpression und Proteinüberexpression als die Homodimer-Zelllinie, für BMP4 war das Gegenteil der Fall. Bemerkenswert ist, dass sich die allerhöchste BMP-Konzentration mit der SCP1-BMP7-GFP-Homodimer-Zelllinie erzeugen ließ, obwohl BMP7 mit 49,3 kDa das größte Protein ist, gefolgt von BMP2 mit 26,0 kDa und BMP4 mit 23,9 kDa.

In der vorliegenden Arbeit wurden nach bisherigem Kenntnisstand erstmalig BMP-überexprimierende humane mesenchymale Stammzellen mittels nicht-viraler Transfektion hergestellt und etabliert. In der Literatur sind derzeit lediglich Angaben zur BMP-Überexpression von viral transduzierten hMSCs bzw. MSCs tierischen Ursprungs bekannt. So beschrieb Stice für hMSCs eine BMP2-Expression von $0,488 \pm 0,358$ pg/Zelle, entsprechend $4,88 \pm 3,58$ ng/10.000 Zellen (Stice et al., 2018). Mumaw erzeugte mittels Adenovirus-transduzierter MSCs von Schafen eine BMP2-Expression von bis zu 0,7 pg/Zelle, dies entspricht 7 ng/10.000 Zellen (Mumaw et. al, 2012). Damit liegen die in der Literatur beschriebenen Werte in einer ähnlichen Größenordnung wie bei den hMSCs in der vorliegenden Studie ohne den potenziell immunogenen Effekt eines viralen Vektors.

4.3 BMP-Bioaktivität

In der Einleitung wurde beschrieben, wie BMPs an Oberflächenrezeptoren binden und über eine intrazelluläre Signalkaskade im Nucleus die Transkription diverser Zielgene regulieren. Die Bioaktivität der BMPs selbst ist reguliert durch extrazelluläre inhibitorische Moleküle wie

Chordin, Noggin oder Follistatin (Balemans et al., 2002). Gut etabliert und häufig angewandt wurde der Alkalische-Phosphatase-Assay (ALP-Assay) zur Quantifikation der BMP-Bioaktivität, jedoch wurde auch gezeigt, dass der Reporterzellassay sensitiver und schneller und damit besser geeignet ist (Zilberberg et al., 2007). Der ALP-Assay umfasst ein meist zwei- bis fünftägiges Protokoll und ist weniger sensitiv gegenüber dem BMP-Reporterzellassay, dessen Durchführung maximal 48 h benötigt. Der Reporterzellassay ist zudem in der Lage, die Bioaktivität vieler verschiedener BMPs nachzuweisen. Als Nachweis hierfür und auch zur Kontrolle der Sensitivität wurden Überstände von SCP1-GFP-Zellen verwendet, welche mit einer fixen Konzentration von jeweils BMP2, BMP4 respektive BMP 7 versetzt waren. Bei gleicher BMP-Sensitivität wäre eine ähnlich dimensionierte RLU zu erwarten gewesen, jedoch zeigten sich bei der Zugabe von rekombinantem BMP2 und BMP4 Werte um 25 RLU und bei rekombinantem BMP7 ein Wert um 10 RLU. Der Reporterzellassay ist demnach in der Lage, die Bioaktivität von allen drei BMP-Arten zu bestimmen, scheint jedoch gleichermaßen hochsensitiv für BMP2 und BMP4 zu sein und in geringerem Maße sensitiv für BMP7. Interessanterweise zeigte sich in der Vermessung der Reporterzellen, welche den Überständen der BMP-überexprimierenden Zelllinien ausgesetzt waren, für alle BMP-Homodimere eine ähnliche RLU im Bereich von 23 bis 26 trotz der geringeren Sensitivität für BMP7. Dies liegt am ehesten in der starken BMP7-Überexpression begründet: Der ELISA zeigte für BMP7-überexprimierende Zellen eine Konzentration von 12 ng/10.000 Zellen und war damit drei- bis sechsfach erhöht im Vergleich zu den BMP2- und BMP4-Konzentrationen, welche zwischen 2 und 4 ng/10.000 Zellen lagen. Unter Berücksichtigung dessen ist also neben der BMP7-Überexpression auch bewiesen, dass das exprimierte BMP7 aktiv ist. Insgesamt zeigte sich bei den BMP-Homodimer-überexprimierenden BMPs eine höhere RLU im Vergleich zu den BMP-Heterodimer-überexprimierenden BMPs. In unserem Labor wurden zuvor BMP2-überexprimierende Zellen über einen lentiviralen Gentransfer hergestellt und ebenfalls die BMP-Bioaktivität untersucht und in RLU gemessen (Moll, 2014). Im Vergleich zeigen die neuen nicht-viral transfizierten Zelllinien eine bis zu 17 Mal höhere RLU mit $25,6 \pm 4,9$ im Vergleich zu der RLU der lentiviral hergestellten Zelllinien $1,47 \pm 0,45$.

4.4 Einfluss von BMP auf die adipogene Differenzierungskapazität von hMSCs

In der Einleitung wurde der gut untersuchte, namensgebende osteoinduktive Effekt von BMPs beschrieben. hMSCs als adulte Stammzellen haben jedoch auch die Fähigkeit sich neben Knochen u.a. in Knorpel oder Fett zu differenzieren. In der vorliegenden Arbeit wurden lentiviral hergestellte stabil BMP2-überexprimierende hMSCs adipogen differenziert und der Einfluss der BMP-Überexpression auf die Differenzierungskapazität untersucht. Hierbei wurden zwei verschiedene Klone BMP-überexprimierender Zelllinien differenziert sowie eine SCP1-mock-Zelllinie als Kontrolle. Bei allen Zelllinien gelang die adipogene Differenzierung nach zwei Wochen adipogener Stimulation mithilfe eines Induktions- und Erhaltungsmediums. Es zeigten sich in der Phasenkontrastmikroskopie bereits nach der ersten Woche die klassischen Fettvakuolen, welche nach Abschluss der Differenzierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff BODIPY spezifisch gefärbt wurden, um weitere quantitative Analysen zu ermöglichen. Als Vergleichsparameter dienten die dimensionslose Fluoreszenzintensität sowie der Anteil des von Lipidtropfen bedeckten Wells. Bemerkenswert ist, dass die SCP1-mock-Zelllinie als einzige nicht BMP-überexprimierende Zelllinie den größten Anteil an Lipidtropfen aufwies. Mit im Schnitt 41,2 % war dieser Anteil sogar bis zu siebenmal größer als jener der SCP1-rhBMP2-Klon1-Zelllinie mit 6,4 %. Möglicherweise liegt hier ein negativer Effekt von BMP auf die adipogene Differenzierungskapazität von hMSCs vor. Die Literatur zeigt jedoch, dass BMP2 den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor gamma (PPAR γ) aktiviert und somit die Adipogenese begünstigt (Jeon et al., 2003, Liu et al., 2014). Dieser beschriebene proadipogene Effekt könnte sich nachteilig auf die starke osteoinduktive Kapazität von BMP auswirken, da hierdurch die Qualität des gebildeten Knochens vermindert würde: Anstelle der trabekulären Knochenstruktur könnten zystenartige, mit Fettmark gefüllte Hohlräume im Knochen entstehen (Zara et al., 2011). Letztlich zeigte sich, dass auch die Art des BMP-Rezeptors über Osteo- und Adipogenese bestimmt: Die Signalübertragung durch BMPR-IA wirkt adipogen während die Signalübertragung über BMPR-IB einen osteogenen Effekt ausübt (Chen D et al., 1998, McArdle A et al., 2014). Ebenfalls beschrieben ist eine durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg bedingte inverse Wechselbeziehung zwischen osteogener und adipogener Differenzierung: Durch die Aktivierung dieses Signalweges wird die Osteogenese zu Ungunsten der Adipogenese induziert und umgekehrt (Li et. al, 2008, James et. al, 2013). BMP2 wiederum kann die Wnt-Signalübertragung durch Hochregulierung diverser Wnt-Liganden verstärken (Chen et, al, 2007, Lin et. al, 2011). Letztlich ist der gemeinsame

Einfluss multipler Signalwege auf das Schicksal der mesenchymalen Zelldifferenzierung zu berücksichtigen und ihr Wechselspiel komplex. So könnten grundlegende Unterschiede in den Versuchsbedingungen zu scheinbaren Widersprüchen in der Literatur führen, zudem verfügt die losgelöste Untersuchung eines Signalweges unter Laborbedingungen *in vitro* über eine nur bedingte Aussagekraft über die tatsächlichen Effekte *in vivo*.

4.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden erfolgreich BMP-überexprimierende Zelllinien hergestellt, welche durch eine stabile Expression des jeweiligen BMP-Gens sowie durch die Bioaktivität und Funktionalität des jeweiligen BMP-Proteins charakterisiert sind. Es gelang, immortalisierte humane mesenchymale Stammzellen mit eigens klonierten Plasmiden nicht-viral zu transfizieren, um eine Überexpression von BMP zu induzieren. Soweit uns bekannt ist, wurden in dieser Arbeit zum allerersten Mal BMP-überexprimierende hMSCs durch einen Gentransfer mittels Sleeping-Beauty-Transposonsystem hergestellt und ein elementarer Grundstein für weitere Untersuchungen zur zelltherapeutischen Anwendung gelegt.

Zu Beginn wurde beschrieben, dass rekombinante BMPs 2 und 7 (rhBMP2 und rhBMP7) bereits klinisch in der Frakturheilung eingesetzt werden. Allerdings führt die deutlich supraphysiologische Gabe in großen Mengen zu hohen Kosten, zudem sind die BMPs lediglich 4-8 Tage *in vivo* nachweisbar. Die zelltherapeutische Verwendung von BMPs-überexprimierenden Zellen stellt daher eine kostengünstigere und effizientere Alternative für die Behandlung vor allem von schlecht heilenden Frakturen dar. Hierdurch wird nicht die hohe BMP-Konzentration wie durch die Zugabe von rekombinanten BMPs erreicht, jedoch käme es zu einer lokalen Expression über einen längeren Zeitraum. So beschrieb Zhang für BMP2 ein osteogenes Potenzial auch bei Zugabe in physiologischen Dosen *in vitro* (Zhang et. al, 2019).

Als wesentliches Gegenargument bezüglich einer BMP-überexprimierenden Zelltherapie wird der Sicherheitsaspekt genannt. Dieser Gedanke entstand jedoch vor allem vor dem Hintergrund der Immunogenität bei Verwendung eines viralen Vektors, bei der die Immunantwort der Zielzelle potenziell einen schädlichen Effekt ausübt. Dieser unerwünschte

Nebeneffekt der Immunogenität im Rahmen einer Transfektion wurde durch die erstmalige Verwendung des nicht-viralen Sleeping-Beauty-Transposonsystems, für das die Sicherheitsstufe 1 im Labor genügt, zur Herstellung BMP-überexprimierender Zellen umgangen. Hiermit wurde ein weiterer, wichtiger Schritt zur Erhöhung der Sicherheit von Zelltherapien bei schwer heilenden Frakturen bewerkstelligt.

Zu diesen schwer heilenden Frakturen gehören insbesondere osteoporotische Frakturen, welche aufgrund der stetig ansteigenden Lebenserwartung immer mehr an klinischer Bedeutung gewinnen. Problematisch bei der Heilung von osteoporotischen Frakturen ist die verzögerte Callusbildung und die reduzierte endochondrale Ossifikation. Humane mesenchymale Stammzellen, die die Frakturheilung unterstützen, werden unter anderem durch Zytokine wie BMPs zur Frakturstelle rekrutiert. In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass hMSCs aus osteoporotischen Patienten zu BMP-2 in einem Chemotaxis- sowie in einem Transwell-Invasionstest zu BMP-2 bzw. BMP-7 migrieren, auch wenn ihre Migrations- bzw. Invasionskapazität signifikant schwächer als bei hMSCs aus gesunden Patienten ist (Haasters et al., BBRC, 2014). Damit besitzen die BMPs therapeutisches Potential sowohl als Chemoattraktanden als auch als Stimulatoren der osteogenen Differenzierung.

Zunächst kann man in weiteren Studien die hier etablierten hMSC-Zelllinien osteogen, aber auch adipogen und chondrogen differenzieren und Einflüsse der jeweiligen überexprimierten BMPs auf die Differenzierung ableiten. So ist es möglich, das bereits bekannte osteoinduktive Potential von BMPs und insbesondere das Potential der verschiedenen BMP-Isodimere *in vitro* untereinander zu vergleichen. In einem Migrations- sowie in einem Transwell-Invasions-Test kann das BMP in den Zellkulturüberständen als Chemoattraktand untersucht werden. Mit dem Plasmid des vielversprechendsten BMP-Homodimers oder BMP-Heterodimers kann man in einem nächsten Schritt zur besseren Anwendbarkeit beim und Übertragbarkeit auf den Menschen nicht immortalisierte hMSC transfizieren. Hier gilt es sicherlich vor allem im Rahmen des Elektroporations-Transfektionsprozesses Versuchsschritte zu optimieren, denn nicht immortalisierte hMSC reagieren empfindlicher auf die Elektroporation als immortalisierte hMSC. Ein möglicher potentieller auslösender Faktor ist hierbei, dass die permeabilisierten Zellmembranen vulnerabel sind und infolgedessen zur Aufnahme von toxischen Metallionen führen. Der überragende Vorteil, den die Elektroporation als physikalische, nicht-virale Methode bietet, durch den sie sich auszeichnet und weshalb sie

ausgewählt wurde, ist die fehlende Immunogenität im Vergleich zu viralen Vektoren. Von den hier verwendeten Vektoren pSBbi-Vektoren gibt es auch Vektoren, die erlauben die Expression des Transgens über das so genannte TetOn-System zu induzieren. Dies könnte für künftige *in vivo*-Anwendungen interessant werden, um die gewünschte Zeit der Expression kontrollieren zu können. Hervorzuheben ist noch der in dieser Arbeit gezeigte mögliche inhibierende Effekt auf die adipogene Differenzierung der BMP-überexprimierenden hMSCs. Da einer Verfettung des Knochenmarks entgegengewirkt wird, welche vor allem bei geriatrischen oder osteoporotischen Patientinnen und Patienten problematisch ist, kann sich dies begünstigend auf die Knochenheilung auswirken (Astudillo et. al, 2008, Rodríguez JP et. al, 2000).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern richtungsweisende Erkenntnisse für zelltherapie-basierte Therapien mit humanen mesenchymalen Stammzellen.

5 Zusammenfassung

Hintergrund: BMPs als Wachstumsfaktoren und Untergruppe der TGF- β -Superfamilie kommen zahlreiche Funktionen in der Embryogenese und diverser Entwicklungsprozesse zu; sie sind aber vor allem für ihren namensgebenden osteoinduktiven Effekt bekannt. Durch ihre Schlüsselrolle in der Knochenbildung sind sie essenziell für die Frakturheilung und deshalb von großem klinischem Interesse. Es gibt derzeit über 20 bekannte Typen und es wurde gezeigt, dass BMP-Heterodimere über einen größeren osteoinduktiven Effekt verfügen als BMP-Homodimere (Morimoto et al., 2015). BMPs werden bereits klinisch in der Frakturheilung eingesetzt, jedoch ist die Produktion von rekombinantem BMP mit hohen Kosten verbunden und es muss in supraphysiologischen Dosierungen angewandt werden. Lösung wäre hier ein zelltherapeutisch-basierter Ansatz: Humane mesenchymale Stammzellen werden transfiziert und so modifiziert, dass sie BMP überexprimieren. Hierfür wurden sowohl Plasmide mit BMP-Homodimerengen als auch mit BMP-Heterodimerengen kloniert und die hMSC stabil, nicht-viral transfiziert.

Methoden: Es wurden sechs Zelllinien hergestellt: SCP1-BMP2-GFP, SCP1-BMP4-GFP und SCP1-BMP7-GFP mit einer jeweiligen BMP-Überexpression als Homodimer. Zusätzlich wurden SCP1-BMP2/7-GFP und SCP1-BMP4/7-GFP hergestellt, welche jeweils BMP2/7 respektive BMP 4/7 überexprimieren. Als Kontrolle diente eine SCP1-GFP-Zelllinie, die ebenfalls einer Elektroporation zugeführt wurde, um mögliche Einflüsse des Transfektionsprozesses auszuschließen. Anschließend erfolgte eine Überprüfung der stabilen und funktionalen BMP-Überexpression anhand von Fluoreszenzmikroskopie, RT-PCR, ELISA und BMP-Reporterzellassay.

Ergebnisse: Es gelang der Nachweis einer stabilen Transfektion sowohl auf RNA-, als auch auf Proteinebene mittels der genannten Methoden. Die Zelllinien SCP1-BMP2-GFP, SCP1-BMP4-GFP und SCP1-BMP7-GFP sowie SCP1-BMP2/7-GFP und SCP1-BMP4/7-GFP exprimierten ausnahmslos stabil ihr jeweiliges respektive ihre jeweiligen BMP-Gene. Die RT-PCR deutete zusätzlich auf eine intrinsische BMP4-Expression von SCP1-Zellen hin. Fluoreszenzmikroskopisch bestätigte sich der Transfektionserfolg und es gelang eine weitere Selektion durch das Antibiotikum Puromycin, da nur die transfizierten Zellen über das Puromycinresistenzgen verfügen. Der BMP-ELISA wies für alle Zelllinien eine signifikant

erhöhte BMP-Produktion im Vergleich zu der Kontroll-Zelllinie SCP1-GFP nach. Die BMP7-überexprimierende Zelllinie zeichnete sich durch die höchste BMP-Konzentration aus. Es zeigten sich bei BMP4 und BMP7 höhere BMP-Konzentrationen im Vergleich zum jeweiligen Heterodimer. Zudem konnte durch den Luciferase-BMP-Reporterzellassay gezeigt werden, dass sämtliche produzierte BMPs bioaktiv sind. Bei den BMP-Homodimer-überexprimierenden BMPs ist aufgrund der höheren RLU im Vergleich zu den BMP-Heterodimer-überexprimierenden BMPs eine höhere Bioaktivität zu erwarten.

Konklusion: In der vorliegenden Arbeit wurden erfolgreich BMP-überexprimierende hMSCs hergestellt und etabliert. Die hier gezeigten Erkenntnisse liefern einen wichtigen Impuls für zelltherapie-basierte, neuartige, zukünftige Therapien zur Frakturheilung und Behandlung von Knochenerkrankungen wie der Osteoporose.

Abstract

Background: BMPs as growth factors and a subgroup of the TGF- β superfamily have numerous functions in embryogenesis and various developmental processes; however, they are mainly known for their eponymous osteoinductive effect. Their key role in bone formation makes them essential for fracture healing and therefore of great clinical interest. There are currently over 20 known types and it has been shown that BMP heterodimers have a greater osteoinductive effect than BMP homodimers (Morimoto et al., 2015). BMPs are already used clinically in fracture healing, but the production of recombinant BMP is associated with high costs and it must be applied in supraphysiological doses. The solution here would be a cell therapy-based approach: human mesenchymal stem cells are transfected and modified to overexpress BMP. For this purpose, plasmids with BMP homodimer genes as well as with BMP heterodimer genes were cloned and the hMSCs were stably, non-virally transfected.

Methods: Six cell lines were generated: SCP1-BMP2-GFP, SCP1-BMP4-GFP and SCP1-BMP7-GFP, each with BMP overexpression as a homodimer. In addition, SCP1-BMP2/7-GFP and SCP1-BMP4/7-GFP were generated, each overexpressing BMP2/7 and BMP 4/7, respectively. An SCP1-GFP cell line, which was also subjected to electroporation, served as a control in order to exclude possible influences of the transfection process. Subsequently, stable and functional BMP overexpression was verified by fluorescence microscopy, RT-PCR, ELISA and BMP reporter cell assay.

Results: Evidence of stable transfection at both the RNA and protein levels was obtained using the above-mentioned methods. The cell lines SCP1-BMP2-GFP, SCP1-BMP4-GFP and SCP1-BMP7-GFP as well as SCP1-BMP2/7-GFP and SCP1-BMP4/7-GFP all stably expressed their respective BMP genes. RT-PCR additionally indicated an intrinsic BMP4 expression of SCP1 cells. Fluorescence microscopy confirmed the transfection success and further selection by the antibiotic puromycin was successful, as only the transfected cells had the puromycin resistance gene. The BMP ELISA demonstrated significantly increased BMP production for all cell lines compared to the control cell line SCP1-GFP. The BMP7-overexpressing cell line was characterized by the highest BMP concentration. BMP4 and BMP7 showed higher BMP concentrations compared to the respective heterodimer. In addition, the luciferase-BMP reporter cell assay demonstrated that all BMPs produced were bioactive. The BMP

homodimer-overexpressing BMPs are expected to have higher bioactivity due to the higher RLU compared to the BMP heterodimer-overexpressing BMPs.

Conclusion: In the present work, BMP-overexpressing hMSCs were successfully generated and established. The findings shown here provide an important impetus for cell therapy-based novel future therapies for fracture healing and treatment of bone diseases such as osteoporosis.

6 Literaturverzeichnis

Andersen, T. L., T. E. Sondergaard, K. E. Skorzynska, F. Dagnaes-Hansen, T. L. Plesner, E. M. Hauge, T. Plesner and J.-M. Delaisse (2009). "A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone." *The American journal of pathology* 174(1): 239-247.

Astudillo P, Ríos S, Pastenes L, Pino AM, Rodríguez JP. Increased adipogenesis of osteoporotic human-mesenchymal stem cells (MSCs) characterizes by impaired leptin action. *J Cell Biochem.* 2008 Mar 1;103(4):1054-65. doi: 10.1002/jcb.21516. PMID: 17973271.

Bandyopadhyay, A., K. Tsuji, K. Cox, B. D. Harfe, V. Rosen and C. J. Tabin (2006). "Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis." *PLoS Genet* 2(12): e216.

Bartl R, Bartl C. *Osteoporose-Manual*. Springer-Verlag Heidelberg. 2004.

Bianco, P., P. G. Robey and P. J. Simmons (2008). "Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays." *Cell stem cell* 2(4): 313-319.

Bocker, W., Z. Yin, I. Drosse, F. Haasters, O. Rossmann, M. Wierer, C. Popov, M. Locher, W. Mutschler, D. Docheva and M. Schieker (2008). "Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer." *J Cell Mol Med* 12(4): 1347-1359.

Bono, N., F. Ponti, D. Mantovani and G. Candiani (2020). "Non-Viral in Vitro Gene Delivery: It is Now Time to Set the Bar!" *Pharmaceutics* 12(2): 183.

Bourque, W. T., M. Gross and B. K. Hall (1993). "Expression of four growth factors during fracture repair." *The International journal of developmental biology* 37(4): 573-579.

Braddock, M., P. Houston, C. Campbell and P. Ashcroft (2001). "Born again bone: tissue engineering for bone repair." *News in physiological sciences: an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 16: 208-213.

Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1998;16(2):155–162. doi:10.1002/jor.1100160202

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641–650. doi:10.1002/jor.1100090504

Chen, D., M. Zhao and G. R. Mundy (2004). "Bone morphogenetic proteins." *Growth Factors* 22(4): 233-241.

Chen D, Ji X, Harris MA, Feng JQ, Karsenty G, Celeste AJ, Rosen V, Mundy GR, Harris SE. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *J Cell Biol.* 1998 Jul 13;142(1):295-305. doi: 10.1083/jcb.142.1.295. PMID: 9660882; PMCID: PMC2133031.

Chen, G., C. Deng and Y. P. Li (2012). "TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation." *Int J Biol Sci* 8(2): 272-288.

Chen Y, Whetstone HC, Youn A, Nadesan P, Chow EC, Lin AC, Alman BA. Beta-catenin signaling pathway is crucial for bone morphogenetic protein 2 to induce new bone formation. *J Biol Chem*. 2007 Jan 5;282(1):526-33. doi: 10.1074/jbc.M602700200. Epub 2006 Nov 3. PMID: 17085452.

Cohen, M. M., Jr. (2006). "The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates." *Am J Med Genet A* 140(23): 2646-2706.

Collin-Osdoby, P. (1994). "Role of vascular endothelial cells in bone biology." *Journal of cellular biochemistry* 55(3): 304-309.

Coughlan, T. and F. Dockery (2014). "Osteoporosis and fracture risk in older people." *Clinical medicine (London, England)* 14(2): 187-191.

da Silva Madaleno, C., J. Jatzlau and P. Knaus (2020). "BMP signalling in a mechanical context – Implications for bone biology." *Bone* 137: 115416.

De Bari, C., F. Dell'Accio, P. Tylzanowski and F. P. Luyten (2001). "Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane." *Arthritis and rheumatism* 44(8): 1928-1942.

De Coppi, P., G. Bartsch, Jr., M. M. Siddiqui, T. Xu, C. C. Santos, L. Perin, G. Mostoslavsky, A. C. Serre, E. Y. Snyder, J. J. Yoo, M. E. Furth, S. Soker and A. Atala (2007). "Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy." *Nature biotechnology* 25(1): 100-106.

Dezawa, M., H. Kanno, M. Hoshino, H. Cho, N. Matsumoto, Y. Itokazu, N. Tajima, H. Yamada, H. Sawada, H. Ishikawa, T. Mimura, M. Kitada, Y. Suzuki and C. Ide (2004). "Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation." *J Clin Invest* 113(12): 1701-1710.

El Bialy, I., W. Jiskoot and M. Reza Nejadnik (2017). "Formulation, Delivery and Stability of Bone Morphogenetic Proteins for Effective Bone Regeneration." *Pharmaceutical research* 34(6): 1152-1170.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors [published correction appears in *Science* 1998 Aug 14;281(5379):923]. *Science*. 1998;279(5356):1528–1530. doi:10.1126/science.1998.279.5356.1528
Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76(4):579–592. doi:10.2106/00004623-199404000-00013e.279.5356.1528

Frost, H. M. (1983). "The skeletal intermediary organization." *Metabolic bone disease & related research* 4(5): 281-290.

Gao, X., K. S. Kim and D. Liu (2007). "Nonviral gene delivery: what we know and what is next." *Aaps j* 9(1): E92-104.

Gafni Y, Turgeman G, Liebergal M, Pelled G, Gazit Z, Gazit D. Stem cells as vehicles for orthopedic gene therapy. *Gene Ther*. 2004;11(4):417–426. doi:10.1038/sj.gt.3302197

Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury*. 2007;38 Suppl 4:S3–S6. doi:10.1016/s0020-1383(08)70003-2

Haasters F, Docheva D, Gassner C, Popov C, Böcker W, Mutschler W, Schieker M, Prall WC. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients reveal reduced migration and invasion upon stimulation with BMP-2 or BMP-7. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Sep 12;452(1):118-23. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.055. Epub 2014 Aug 21. PMID: 25152406.

Harada, S.-i. and G. A. Rodan (2003). "Control of osteoblast function and regulation of bone mass." *Nature* 423(6937): 349-355.

Hauge, E. M., D. Qvesel, E. F. Eriksen, L. Mosekilde and F. Melsen (2001). "Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers." *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 16(9): 1575-1582.

Helledie T, Nurcombe V, Cool SM. A simple and reliable electroporation method for human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008 Aug;17(4):837-48. doi: 10.1089/scd.2007.0209. PMID: 18752428.

Heller, L. C., K. Ugen and R. Heller (2005). "Electroporation for targeted gene transfer." *Expert Opin Drug Deliv* 2(2): 255-268.

Huang, Z., P. G. Ren, T. Ma, R. L. Smith and S. B. Goodman (2010). "Modulating osteogenesis of mesenchymal stem cells by modifying growth factor availability." *Cytokine* 51(3): 305-310.

Ivics, Z. and Z. Izsvak (2011). "Nonviral gene delivery with the sleeping beauty transposon system." *Hum Gene Ther* 22(9): 1043-1051.

James AW. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica (Cairo)*. 2013;2013:684736. doi: 10.1155/2013/684736. Epub 2013 Dec 12. PMID: 24416618; PMCID: PMC3874981.

Jeon MJ, Kim JA, Kwon SH, Kim SW, Park KS, Park SW, Kim SY, Shin CS. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits the Runx2-mediated transcription of osteocalcin in osteoblasts. *J Biol Chem*. 2003 Jun 27;278(26):23270-7. doi: 10.1074/jbc.M211610200. Epub 2003 Apr 18. PMID: 12704187.

Kowarz, E., D. Loscher and R. Marschalek (2015). "Optimized Sleeping Beauty transposons rapidly generate stable transgenic cell lines." *Biotechnol J* 10(4): 647-653 und Plasmidkarte pSBbi-GP: https://www.addgene.org/60511/?gclid=EAlaIQobChMIk_ben8qT9wIVxIXVCh1ZKgKjEAAAYASAAEgLwX_D_BwE (Stand: 14.04.2022, 14:49 Uhr).

Kuznetsov, S. A., M. H. Mankani, S. Gronthos, K. Satomura, P. Bianco and P. G. Robey (2001). "Circulating skeletal stem cells." *The Journal of cell biology* 153(5): 1133-1140.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.

Lawrie, A., A. F. Brisken, S. E. Francis, D. C. Cumberland, D. C. Crossman and C. M. Newman (2000). "Microbubble-enhanced ultrasound for vascular gene delivery." *Gene therapy* 7(23): 2023-2027.

Li HX, Luo X, Liu RX, Yang YJ, Yang GS. Roles of Wnt/beta-catenin signaling in adipogenic differentiation potential of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2008 Sep 10;291(1-2):116-24. doi: 10.1016/j.mce.2008.05.005. Epub 2008 May 17. PMID: 18584948.

Lippincott-Schwartz, J. and G. H. Patterson (2003). "Development and use of fluorescent protein markers in living cells." *Science* 300(5616): 87-91.

Lin GL, Hankenson KD. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* 2011 Dec;112(12):3491-501. doi: 10.1002/jcb.23287. PMID: 21793042; PMCID: PMC3202082.

Lin P, Lin Y, Lennon DP, Correa D, Schluchter M, Caplan AI. Efficient lentiviral transduction of human mesenchymal stem cells that preserves proliferation and differentiation capabilities. *Stem Cells Transl Med.* 2012 Dec;1(12):886-97. doi: 10.5966/sctm.2012-0086. Epub 2012 Nov 29. PMID: 23283550; PMCID: PMC3659678.

Lin, S. J., T. F. Lerch, R. W. Cook, T. S. Jardetzky and T. K. Woodruff (2006). "The structural basis of TGF-beta, bone morphogenetic protein, and activin ligand binding." *Reproduction* 132(2): 179-190.

Liu, D., T. Ren and X. Gao (2003). "Cationic transfection lipids." *Current medicinal chemistry* 10(14): 1307-1315.

Liu J, Chen L, Zhou Y, Liu X, Tang K. Insulin-like growth factor-1 and bone morphogenetic protein-2 jointly mediate prostaglandin E2-induced adipogenic differentiation of rat tendon stem cells. *PLoS One.* 2014 Jan 9;9(1):e85469. doi: 10.1371/journal.pone.0085469. PMID: 24416413; PMCID: PMC3887066.

Lowery JW, Rosen V. The BMP Pathway and Its Inhibitors in the Skeleton. *Physiol Rev.* 2018 Oct 1;98(4):2431-2452. doi: 10.1152/physrev.00028.2017. PMID: 30156494.

Luo J, Sun MH, Kang Q, Peng Y, Jiang W, Lu HH, Luo Q, Park JY, Li Y, Haydon RC, He TC. Gene therapy for bone regeneration. *Curr Gene Ther.* 2005 Apr;5(2):167-79. doi: 10.2174/1566523053544218. PMID: 15853725.

Mates, L., M. K. Chuah, E. Belay, B. Jerchow, N. Manoj, A. Acosta-Sanchez, D. P. Grzela, A. Schmitt, K. Becker, J. Matrai, L. Ma, E. Samara-Kuko, C. Gysemans, D. Pryputniewicz, C. Miskey, B. Fletcher, T. VandenDriessche, Z. Ivics and Z. Izsvak (2009). "Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates." *Nat Genet* 41(6): 753-761.

McArdle A, Chung MT, Paik KJ, Duldulao C, Chan C, Rennert R, Walmsley GG, Senarath-Yapa K, Hu M, Seo E, Lee M, Wan DC, Longaker MT. Positive selection for bone morphogenetic protein receptor type-1B promotes differentiation and specification of human adipose-derived stromal cells toward an osteogenic lineage. *Tissue Eng Part A.* 2014 Nov;20(21-22):3031-40. doi: 10.1089/ten.TEA.2014.0101. Epub 2014 Jun 30. PMID: 24854876; PMCID: PMC4229710.

McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br.* 1978;60-B(2):150-162. Nauth A, Miclau T 3rd, Li R, Schemitsch EH. Gene therapy for fracture healing. *J Orthop Trauma.* 2010;24 Suppl 1:S17-S24. doi:10.1097/BOT.0b013e3181cec6fb

Miura, M., S. Gronthos, M. Zhao, B. Lu, L. W. Fisher, P. G. Robey and S. Shi (2003). "SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(10): 5807-5812.

Morimoto T, Kaito T, Matsuo Y, et al. The bone morphogenetic protein-2/7 heterodimer is a stronger inducer of bone regeneration than the individual homodimers in a rat spinal fusion model. *Spine J*. 2015;15(6):1379–1390. doi:10.1016/j.spinee.2015.02.034

Mumaw J, Jordan ET, Sonnet C, Olabisi RM, Olmsted-Davis EA, Davis AR, Peroni JF, West JL, West F, Lu Y, Stice SL. Rapid Heterotrophic Ossification with Cryopreserved Poly(ethylene glycol-) Microencapsulated BMP2-Expressing MSCs. *Int J Biomater*. 2012;2012:861794. doi: 10.1155/2012/861794. Epub 2012 Feb 7. PMID: 22500171; PMCID: PMC3296315.

Munoz-Sanjuan, I. and A. H. Brivanlou (2002). "Neural induction, the default model and embryonic stem cells." *Nat Rev Neurosci* 3(4): 271-280.

Neu, M., D. Fischer and T. Kissel (2005). "Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives." *The journal of gene medicine* 7(8): 992-1009.

Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang and P. H. Hofschneider (1982). "Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields." *Embo j* 1(7): 841-845.

Nishimura, R., K. Hata, F. Ikeda, T. Matsubara, K. Yamashita, F. Ichida and T. Yoneda (2003). "The role of Smads in BMP signaling." *Front Biosci* 8: s275-284.

Noel, D., D. Gazit, C. Bouquet, F. Apparailly, C. Bony, P. Ponce, V. Millet, G. Turgeman, M. Perricaudet, J. Sany and C. Jorgensen (2004). "Short-term BMP-2 expression is sufficient for in vivo osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells." *Stem Cells* 22(1): 74-85.

Owen, M. and A. J. Friedenstein (1988). "Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors." *Ciba Found Symp* 136: 42-60.

Pittenger, M. F., D. E. Discher, B. M. Péault, D. G. Phinney, J. M. Hare and A. I. Caplan (2019). "Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress." *NPJ Regenerative medicine* 4: 22-22.

Ramamoorth, M. and A. Narvekar (2015). "Non viral vectors in gene therapy- an overview." *J Clin Diagn Res* 9(1): Ge01-06.

Rodríguez JP, Montecinos L, Ríos S, Reyes P, Martínez J. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation. *J Cell Biochem*. 2000 Sep 14;79(4):557-65. doi: 10.1002/1097-4644(20001215)79:4<557::aid-jcb40>3.0.co;2-h. PMID: 10996846.

Rogers JJ, Young HE, Adkison LR, Lucas PA, Black AC Jr. Differentiation factors induce expression of muscle, fat, cartilage, and bone in a clone of mouse pluripotent mesench Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res*. 1998;16(4):406–413. doi:10.1002/jor.1100160403ymal stem cells. *Am Surg*. 1995;61(3):231–236.

Ronga, M., A. Fagetti, G. Canton, E. Paiusco, M. F. Surace and P. Cherubino (2013). "Clinical applications of growth factors in bone injuries: experience with BMPs." *Injury* 44 Suppl 1: S34-S39.

Rosada, C., J. Justesen, D. Melsvik, P. Ebbesen and M. Kassem (2003). "The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells." *Calcified tissue international* 72(2): 135-142.

Seth Andrews, Huiling Wei, Christina Elling, Biao He and Steve Stice (2018): "Overexpression of BMP-2 in mesenchymal stem cells with amplifying virus-like particles." *International Journal of Regenerative Medicine*. DOI: 10.31487/j.RGM.2018.02.007.

Shen, B., A. Wei, S. Whittaker, L. A. Williams, H. Tao, D. D. Ma and A. D. Diwan (2010). "The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro." *J Cell Biochem* 109(2): 406-416.

Singer, N. G. and A. I. Caplan (2011). "Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation." *Annu Rev Pathol* 6: 457-478.

Southwood, L. L., D. D. Frisbie, C. E. Kawcak and C. W. McIlwraith (2004). "Delivery of growth factors using gene therapy to enhance bone healing." *Veterinary surgery: VS* 33(6): 565-578.

Tsien, R. Y. (1998). "The green fluorescent protein." *Annu Rev Biochem* 67: 509-544.

Urist, M. R. (1965). "Bone: formation by autoinduction." *Science* 150(3698): 893-899.

von der Haar K, Jonczyk R, Lavrentieva A, Weyand B, Vogt P, Jochums A, Stahl F, Scheper T, Blume CA. Electroporation: A Sustainable and Cell Biology Preserving Cell Labeling Method for Adipogenous Mesenchymal Stem Cells. *Biores Open Access*. 2019 Mar 29;8(1):32-44. doi: 10.1089/biores.2019.0001. PMID: 30944770; PMCID: PMC6445215.

Wolff, J. A., R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani and P. L. Felgner (1990). "Direct gene transfer into mouse muscle in vivo." *Science (New York, N.Y.)* 247(4949 Pt 1): 1465-1468.

Wozney, J. M., V. Rosen, A. J. Celeste, L. M. Mitsock, M. J. Whitters, R. W. Kriz, R. M. Hewick and E. A. Wang (1988). "Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities." *Science* 242(4885): 1528-1534.

Yamaguchi, A., T. Katagiri, T. Ikeda, J. M. Wozney, V. Rosen, E. A. Wang, A. J. Kahn, T. Suda and S. Yoshiki (1991). "Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro." *J Cell Biol* 113(3): 681-687.

Yan, W., Z. Y. Chen, J. Q. Chen and H. M. Chen (2016). "BMP2 promotes the differentiation of neural stem cells into dopaminergic neurons in vitro via miR-145-mediated upregulation of Nurr1 expression." *Am J Transl Res* 8(9): 3689-3699.

Yang, N. S., J. Burkholder, B. Roberts, B. Martinell and D. McCabe (1990). "In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(24): 9568-9572.

Zara JN, Siu RK, Zhang X, Shen J, Ngo R, Lee M, Li W, Chiang M, Chung J, Kwak J, Wu BM, Ting K, Soo C. High doses of bone morphogenetic protein 2 induce structurally abnormal bone and inflammation in vivo. *Tissue Eng Part A*. 2011 May;17(9-10):1389-99. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0555. Epub 2011 Mar 3. PMID: 21247344; PMCID: PMC3079169.

Zhang Y, Yang W, Devit A, van den Beucken JJJP. Efficiency of coculture with angiogenic cells or physiological BMP-2 administration on improving osteogenic differentiation and bone formation of MSCs. *J Biomed Mater Res A*. 2019 Mar;107(3):643-653. doi: 10.1002/jbm.a.36581. Epub 2018 Dec 5. PMID: 30458064.

Zilberberg, L., P. ten Dijke, L. Y. Sakai and D. B. Rifkin (2007). "A rapid and sensitive bioassay to measure bone morphogenetic protein activity." *BMC Cell Biol* 8: 41.

Zou H, Niswander L. Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science*. 1996 May 3;272(5262):738-41. doi: 10.1126/science.272.5262.738. PMID: 8614838.

Abkürzungsverzeichnis

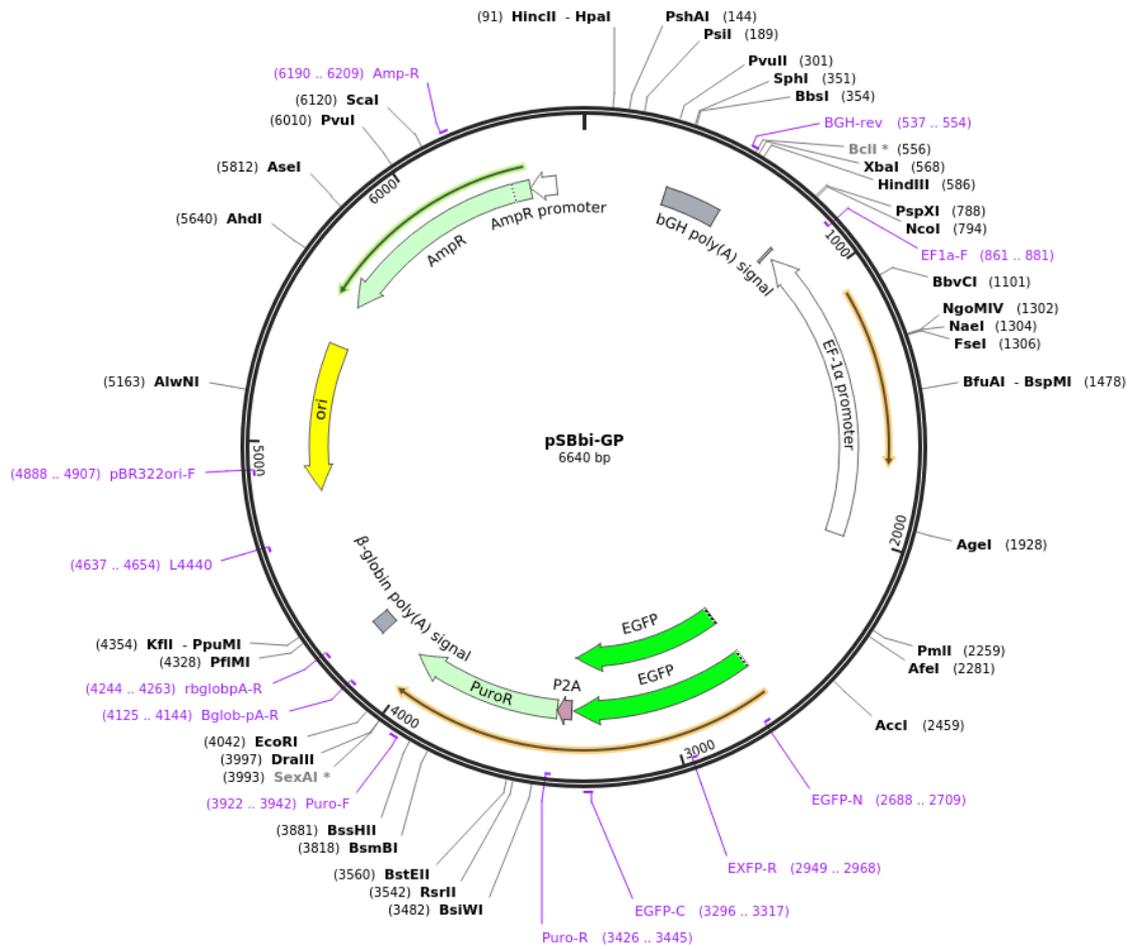
Abb.	Abbildung
BMP	Knochenmorphogenetisches Protein (engl.: bone morphogenetic protein)
bp	Basenpaar, DNA-Einheit
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	komplementäre DNA (engl.: complementary DNA)
CIP	Calf-Intestinal-Phosphatase-Enzym
Da	Dalton, Einheit der molekularen Masse
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
E. coli	Escherichia coli
eGFP	engl.: enhanced green fluorescent protein
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (engl.: enzyme linked immunosorbent assay)
FACS	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (engl.: fluorescent activated cell sorting)
FBS	Fetales Rinderserum (engl.: fetal bovine serum)
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor (engl.: fibroblast growth factor)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein

hMSC	humane mesenchymale Stammzelle (engl.: human mesenchymal stem cell)
hTERT	humane Telomerase-Reverse Transkriptase
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (engl.: insulin like growth factor)
LB-Medium	Bakterien-Nährmedium, (engl.: lysogeny broth)
OD	Optische Dichte
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
rhBMP	rekombinantes humanes BMP
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SCP1-Zellen	immortalisierte hMSCs (engl.: single cell picked clone 1)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOC-Medium	Bakterienkultur-Medium (engl.: super optimal broth medium)
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor β (engl.: transforming growth factor)
U	Units (Enzymeinheit)
α - MEM	alpha minimum essential Medium

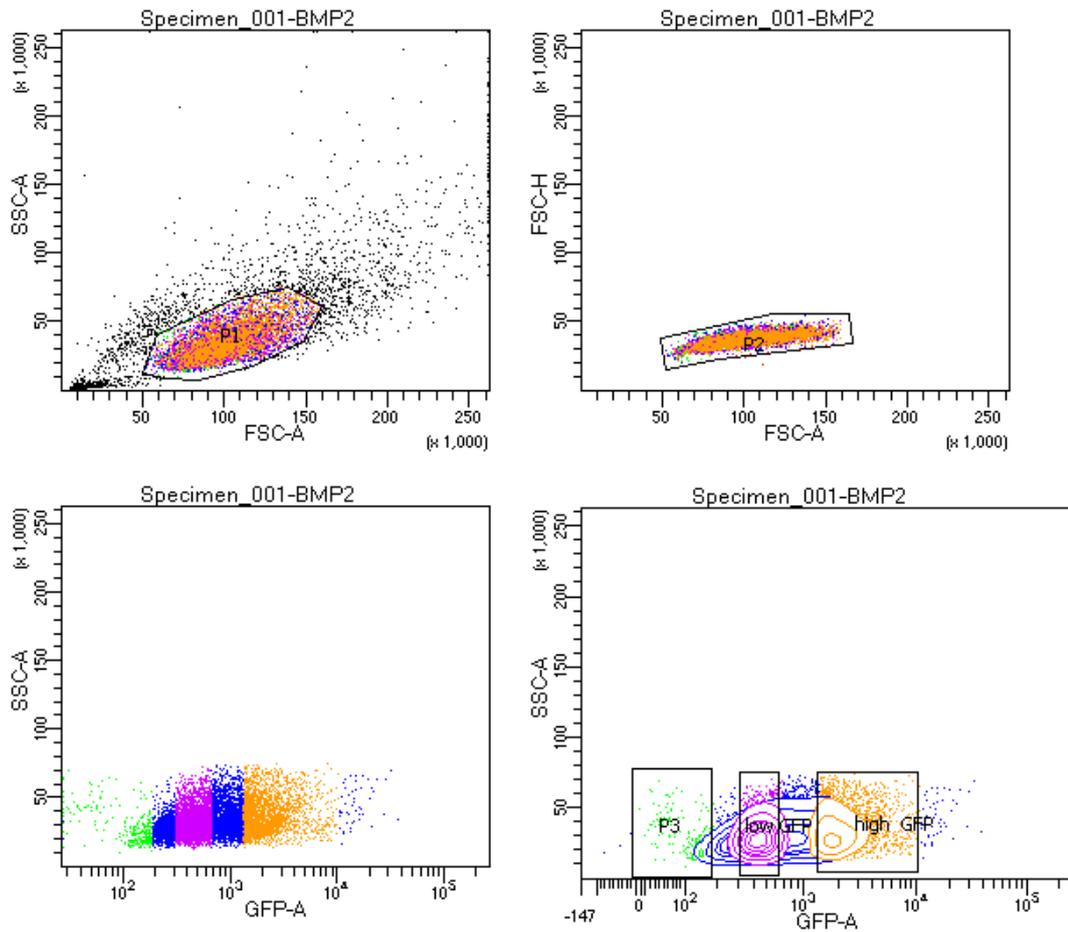
Anhang

1. pSBbi-GP (Kowarz et al., 2015).

Created with SnapGene®



2. FACS-Sorting Daten für SCP1-BMP2-GFP



Tube: BMP2

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	7,907	79.1	79.1
P2	7,895	99.8	79.0
P3	299	3.8	3.0
low GFP	2,515	31.9	25.2
high GFP	2,072	26.2	20.7

Experiment Name: 2018-11-14 Sanchin Aminaa AG...

Specimen Name: Specimen_001

Tube Name: BMP2

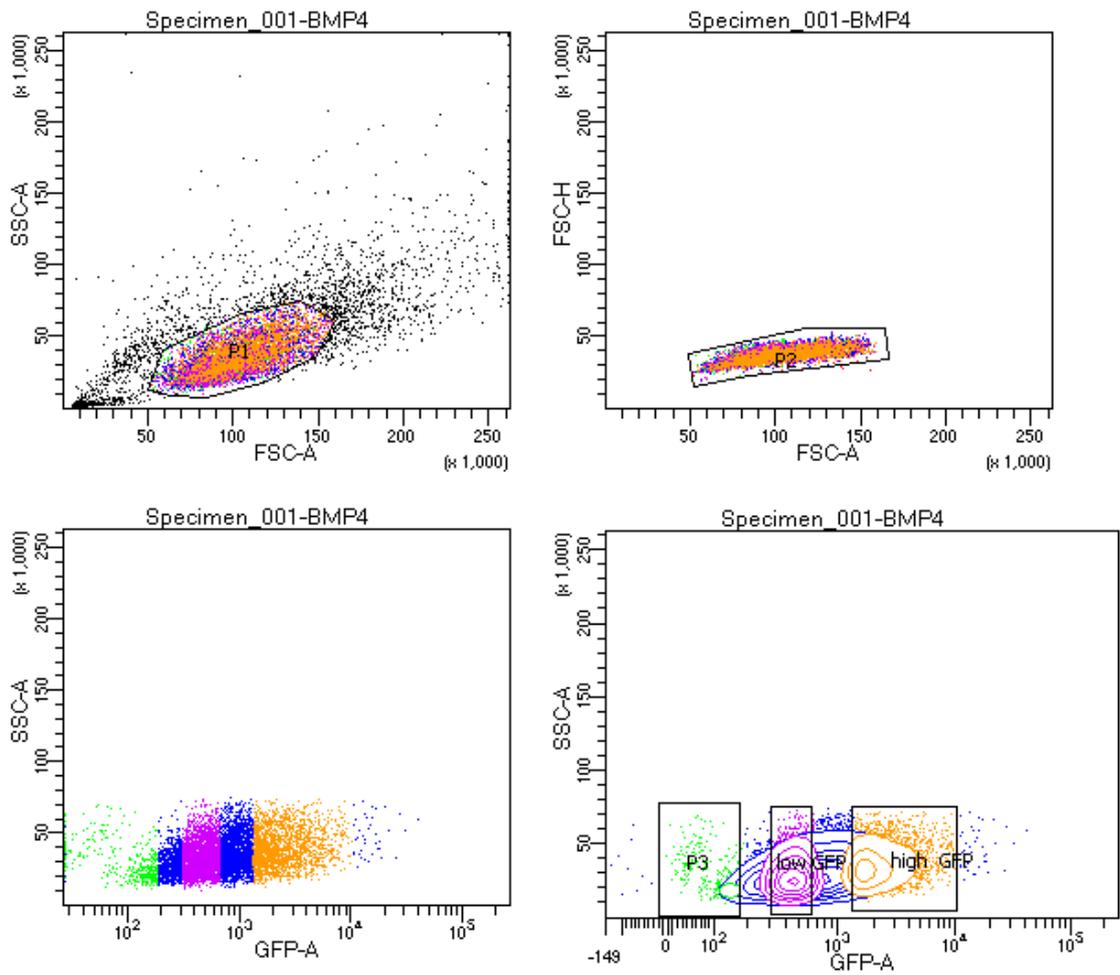
Record Date: Nov 14, 2018 9:48:09 AM

SOP: Administrator

GUID: bcc4fc9d-041e-4ae1-8cce-8817...

Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean	SSC-A Mean
All Events	10,000	####	99,987	38,179
P1	7,907	79.1	99,937	34,054
P2	7,895	99.8	99,915	34,028
P3	299	3.8	84,824	27,206
low GFP	2,515	31.9	98,693	33,100
high GFP	2,072	26.2	104,810	37,804

3. FACS-Sorting Daten für SCP1-BMP4-GFP

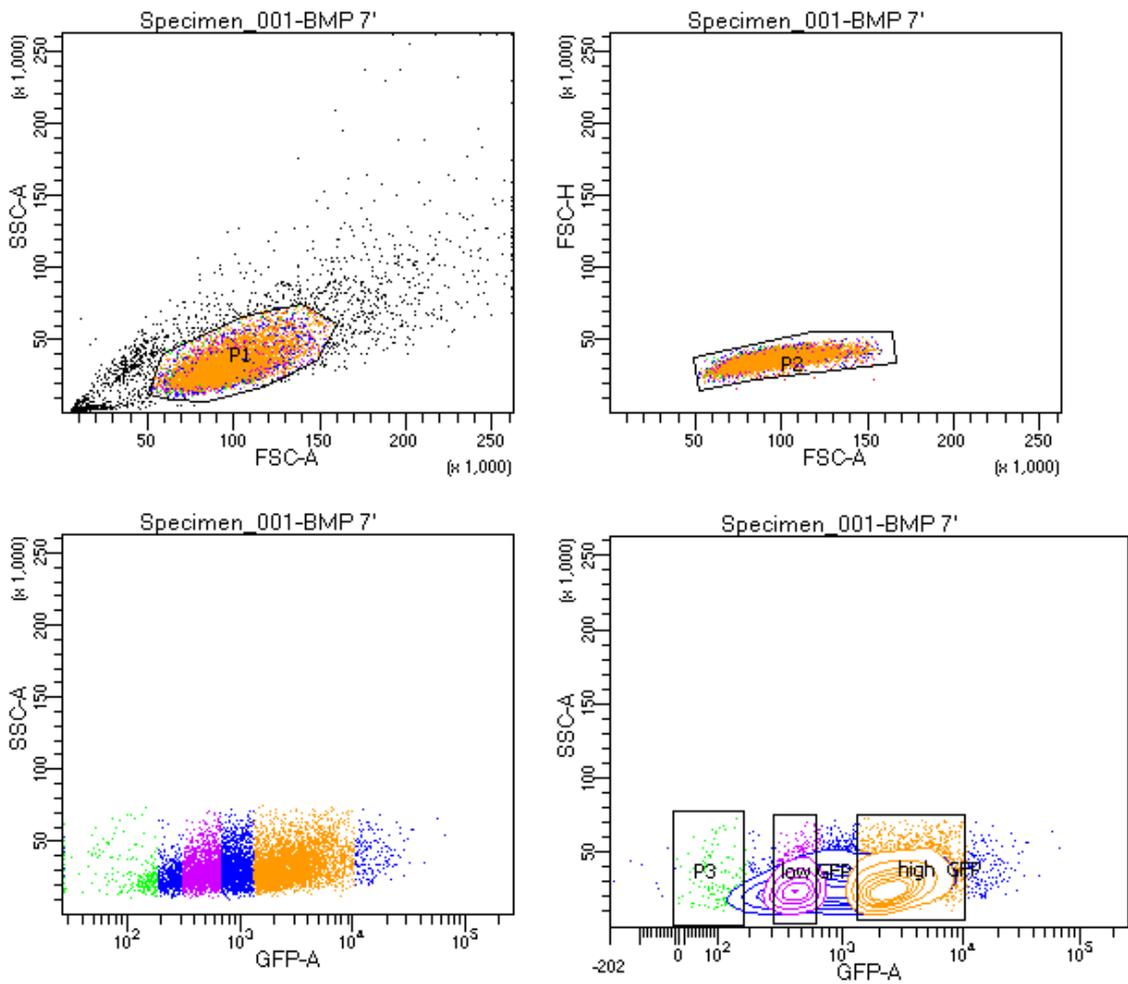


Tube: BMP4

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,075	####	100.0
P1	7,881	78.2	78.2
P2	7,868	99.8	78.1
P3	383	4.9	3.8
low GFP	2,415	30.7	24.0
high GFP	2,006	25.5	19.9

Experiment Name:	2018-11-14 Sanchin Aminaa AG...			
Specimen Name:	Specimen_001			
Tube Name:	BMP4			
Record Date:	Nov 14, 2018 9:49:15 AM			
\$OP:	Administrator			
GUID:	3bd4a247-d393-415f-bb35-3c7...			
Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean	SSC-A Mean
All Events	10,075	####	103,259	39,229
P1	7,881	78.2	101,046	34,314
P2	7,868	99.8	101,020	34,285
P3	383	4.9	89,513	28,478
low GFP	2,415	30.7	98,830	32,321
high GFP	2,006	25.5	107,324	39,064

4. FACS-Sorting Daten für SCP1-BMP7-GFP

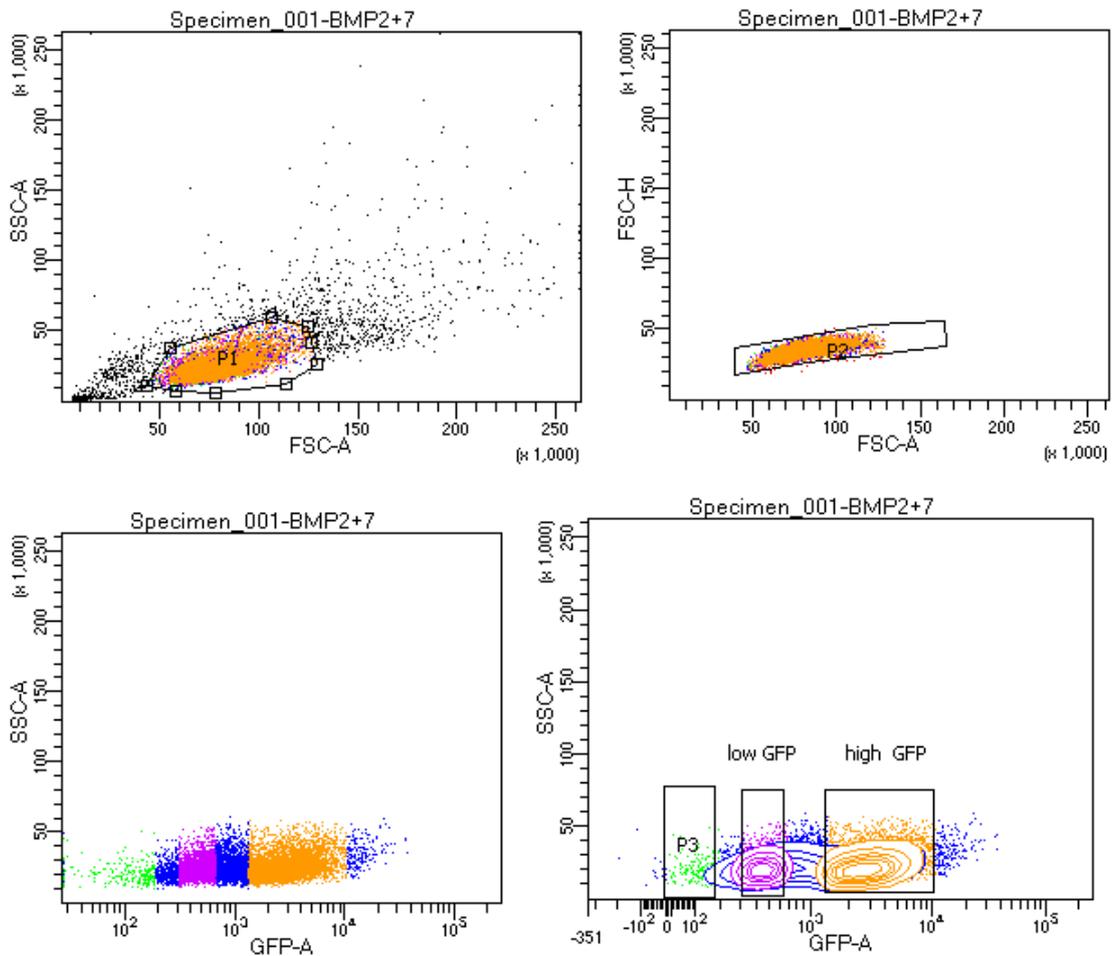


Tube: BMP 7'

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	8,303	83.0	83.0
P2	8,287	99.8	82.9
P3	246	3.0	2.5
low GFP	1,707	20.6	17.1
high GFP	3,878	46.8	38.8

Experiment Name:	2018-11-14 Sanchin Aminaa AG...			
Specimen Name:	Specimen_001			
Tube Name:	BMP 7'			
Record Date:	Nov 14, 2018 9:50:23 AM			
SOP:	Administrator			
GUID:	be66eef2-60e1-49f3-a00c-dbae...			
Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean	SSC-A Mean
All Events	10,000	####	93,972	33,813
P1	8,303	83.0	95,467	31,541
P2	8,287	99.8	95,437	31,504
P3	246	3.0	84,892	27,456
low GFP	1,707	20.6	92,891	29,723
high GFP	3,878	46.8	97,410	33,268

5. FACS-Sorting Daten für SCP1-BMP2/7-GFP



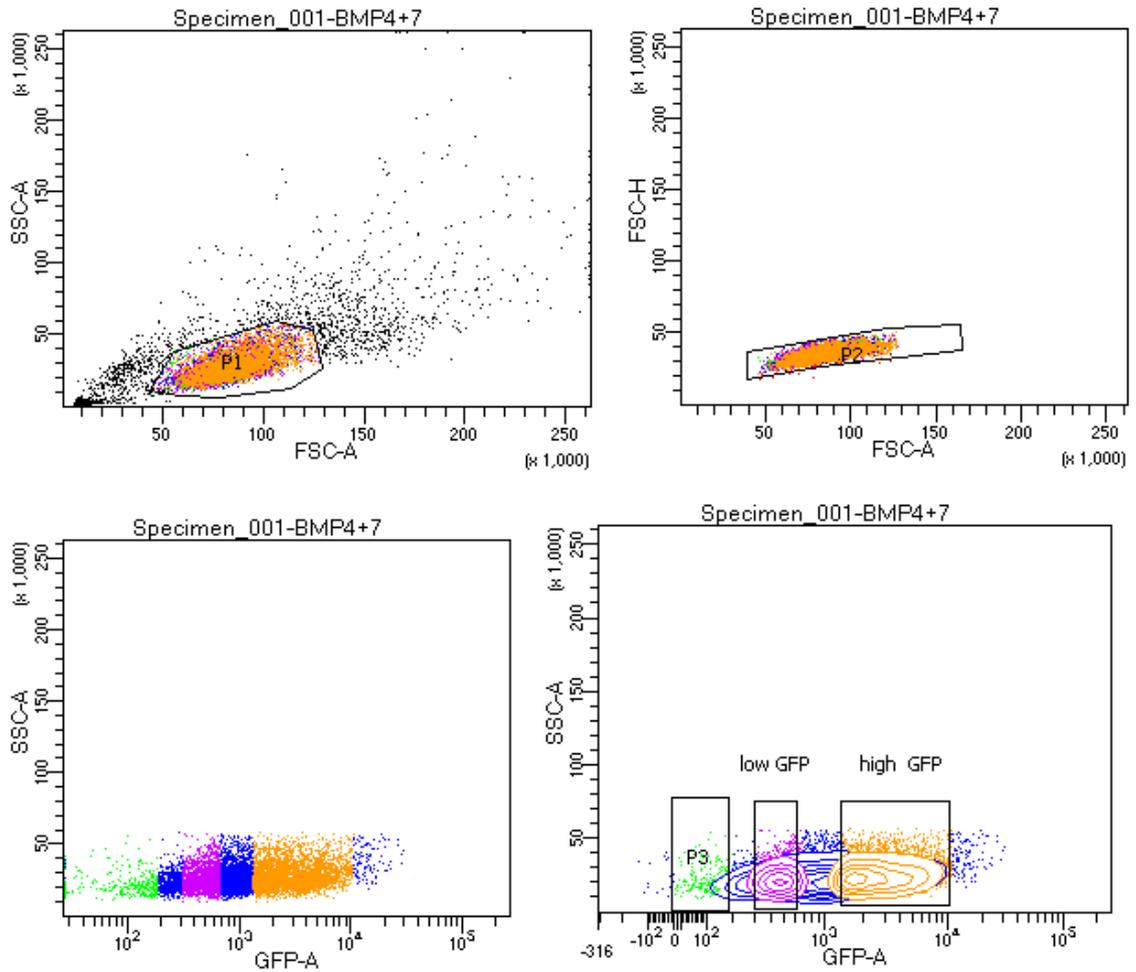
Tube: BMP2+7

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	8,548	85.5	85.5
P2	8,484	99.3	84.8
P3	226	2.7	2.3
low GFP	1,933	22.8	19.3
high GFP	4,215	49.7	42.2

Experiment Name:	2018-12-13 Sanchin Aminaa AG...			
Specimen Name:	Specimen_001			
Tube Name:	BMP2+7			
Record Date:	Dec 13, 2018 2:20:09 PM			
SOP:	Administrator			
GUID:	499a2f44-c758-401f-a53e-9855...			

Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean	SSC-A Mean
All Events	10,000	####	81,255	27,997
P1	8,548	85.5	79,700	25,366
P2	8,484	99.3	79,670	25,311
P3	226	2.7	70,287	20,089
low GFP	1,933	22.8	78,070	24,185
high GFP	4,215	49.7	80,761	25,929

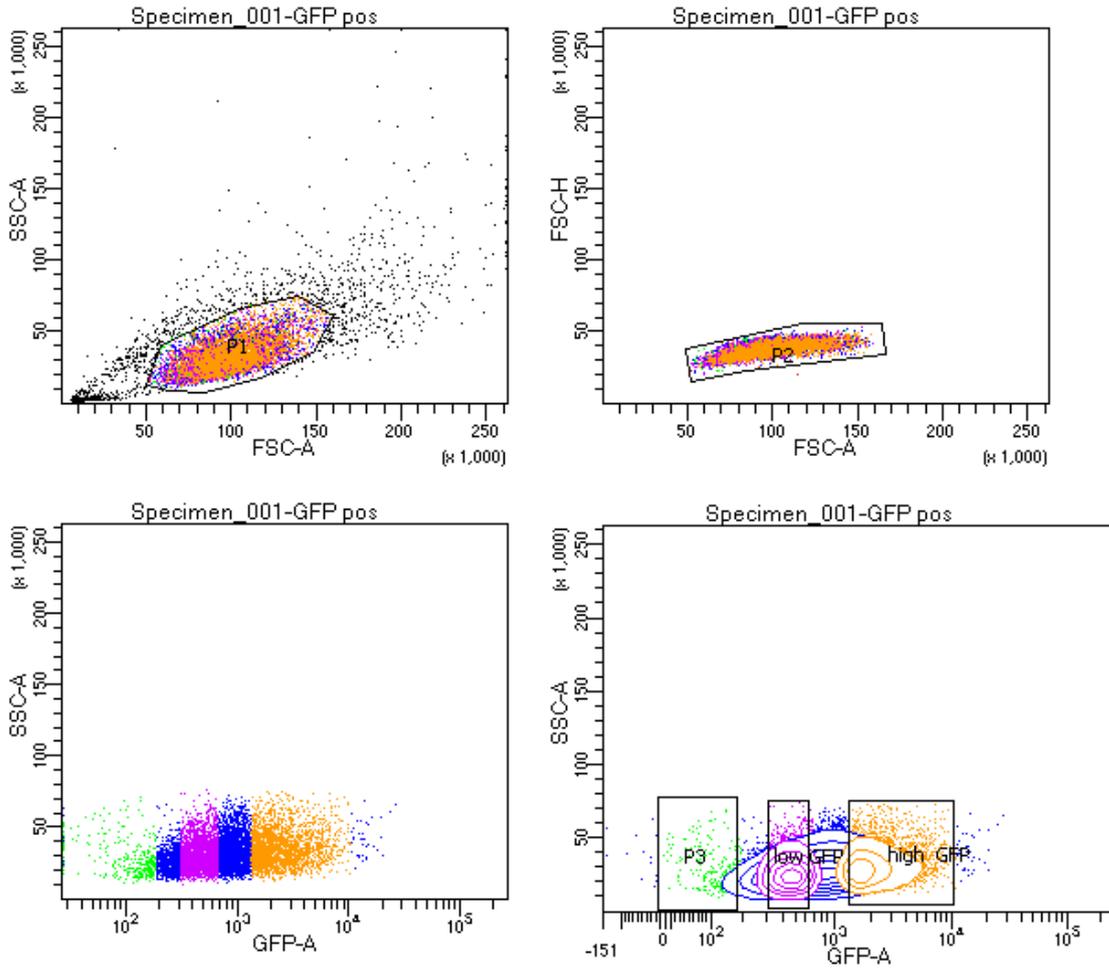
6. FACS-Sorting Daten für SCP1-BMP4/7-GFP



Tube: BMP4+7			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	8,368	83.7	83.7
P2	8,329	99.5	83.3
P3	305	3.7	3.0
low GFP	1,734	20.8	17.3
high GFP	3,461	41.6	34.6

Experiment Name:	2018-12-13 Sanchin Aminaa AG...			
Specimen Name:	Specimen_001			
Tube Name:	BMP4+7			
Record Date:	Dec 13, 2018 2:32:19 PM			
\$OP:	Administrator			
GUID:	38629654-08b3-485d-ad43-9b...			
Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean	SSC-A Mean
All Events	10,000	####	82,817	29,325
P1	8,368	83.7	81,917	26,309
P2	8,329	99.5	81,932	26,286
P3	305	3.7	72,888	21,459
low GFP	1,734	20.8	79,850	25,139
high GFP	3,461	41.6	85,042	28,105

7. FACS-Sorting Daten für SCP1-GFP



Tube: GFP pos

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	8,635	86.4	86.4
P2	8,631	100.0	86.3
P3	311	3.6	3.1
low GFP	2,496	28.9	25.0
high GFP	2,411	27.9	24.1

Experiment Name:	2018-11-14 Sanchin Aminaa AG...			
Specimen Name:	Specimen_001			
Tube Name:	GFP pos			
Record Date:	Nov 14, 2018 9:43:45 AM			
SOP:	Administrator			
GUID:	d011fa44-db58-49b4-a6c7-3f63...			
Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean	SSC-A Mean
All Events	10,000	####	96,802	33,906
P1	8,635	86.4	97,208	31,787
P2	8,631	100.0	97,218	31,789
P3	311	3.6	86,000	27,624
low GFP	2,496	28.9	94,338	29,717
high GFP	2,411	27.9	101,970	35,022

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen meinen Dank aussprechen, die maßgeblich zum Erfolg der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Im Speziellen möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker danken, welcher ermöglichte, an diesem interessanten Thema zu forschen und mit seiner wertvollen fachlichen Unterstützung immer zur Seite stand.

Insbesondere und sehr herzlich bedanke ich mich bei Dr. rer. nat. Veronika Schönitzer für ihre exzellente Betreuung und tatkräftige Unterstützung. Auf fachlicher und auf persönlicher Ebene hat sie mich stets positiv beeinflusst und ermutigt und entscheidend zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Im Weiteren bedanke ich mich sehr bei Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Attila Aszódi, dem Leiter von Experimed, und dem gesamten ExperiMed-Team, welches mich vom ersten Tag an mit offenen Armen in ihren Reihen begrüßte. Ich danke für die Hilfsbereitschaft, Professionalität und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Abschließend danke ich meinen Eltern und Brüdern sowie meinen Freunden für ihre kontinuierliche Unterstützung in meinem Werdegang.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel: „Etablierung von BMP-überexprimierenden humanen mesenchymalen Stammzellen für die zelltherapeutische Anwendung“ selbständig 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.

Berlin, 19.10.2023

Aminaa Sanchin