

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
Direktor: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

**Genetische Markierung von humanen mesenchymalen Stammzellen mittels
enhanced green fluorescent protein**

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

vorgelegt von

Stephanie Birk
aus Fürth

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler
Mitberichterstatter: Prof. Dr. P. Müller

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Wolfgang Böcker

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Grundlagen und bisherige Forschung	4
1.1.1	Stammzellen	4
1.1.2	Humane mesenchymale Stammzellen	5
1.1.3	hMSC und Tissue Engineering in der Therapie von Knochendefekten	7
1.1.4	Genetische Markierung von Zellen	10
1.2	Aufgabenstellung	14
1.2.1	Herstellung eines Lentiviralen Expressionssystems	14
1.2.2	Lentivirale Transduktion von humanen mesenchymalen Stammzellen mit eGFP	14
1.2.3	Besiedelung von Spongiosa-Leitschienen mit eGFP markierten humanen mesenchymalen Stammzellen	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Methoden	15
2.1.1	Herstellung des lentiviralen Expressionskonstruktes	15
2.1.2	Virusherstellung	21
2.1.3	Transduktion der hMSC	28
2.1.4	Besiedelung der Knochenleitschienen	30
2.2	Material	33
2.2.1	Laborgeräte	33
2.2.2	Labor-Hilfsmittel	34
2.2.3	Materialien und Verbrauchsmaterialien	34
2.2.4	Substanzen allgemein	34
2.2.5	Substanzen Klonierung	34
2.2.6	Substanzen Zellkultur	36
3	Ergebnisse	38
3.1	Ergebnis der Klonierung	38
3.2	Ergebnis der Virusherstellung	40
3.3	Bestimmung der Virustiter	43
3.4	Ergebnisse zum lentiviralen Gentransfer in hMSCs	43
3.5	Ergebnis der Leitschienenbesiedelung	47
4	Diskussion	48
4.1	Stammzellmarker und Stammzellmarkierung	48
4.2	Diskussion der verwendeten Zellen	56
4.3	Diskussion der verwendeten Leitschiene	57
4.4	Diskussion der Ergebnisse	59
5	Zusammenfassung	60
6	Anhang	61
6.1	Zusammensetzung der Puffer	61
6.2	Zusammensetzung der Nährmedien	62
7	Literaturverzeichnis	63
	Danksagung	71
	Lebenslauf	72

1 Einleitung

1.1 Grundlagen und bisherige Forschung

1.1.1 Stammzellen

In den letzten Jahren wuchs zunehmend das Interesse und die Forschung an adulten humanen Stammzellen. Es handelt sich um undifferenzierte, multipotente Vorläuferzellen, die sich unter entsprechenden Bedingungen zu unterschiedlichen ausgereiften Geweben differenzieren können. Als bisher bekannte Einflussfaktoren auf die Richtung der Differenzierung wurden Zytokine, Wachstumsfaktoren, Zelldichte, grundlegende Nährstoffe, räumliche Organisation, sowie mechanische Kräfte identifiziert (Pittenger et al. 1999). Physiologische Aufgaben der Stammzellen scheinen im Bereich der Regeneration nach Trauma, Krankheit sowie im Alterungsprozess zu liegen. Hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark sind Ursprung der Blutzellneubildung (Pittenger et al. 1999). Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen haben adulte Stammzellen ein stärker eingeschränktes Differenzierungspotential, sind jedoch ethisch unproblematischer (Koç et al. 2001), sowie sicherer zu transplantieren mit geringerer Gefahr der malignen Entartung (Serakinci et al. 2004, Körbling et al. 2003). Neben dem Knochenmark konnten adulte Stammzellen bereits in über 20 Organen nachgewiesen werden (Tabelle 1). Unter bestimmten Bedingungen erscheint es jedoch möglich, dass Stammzellen von ihrer primären Differenzierungsrichtung abweichen (so genannte Stammzellplastizität) (Körbling et al. 2003).

Tabelle 1: Adulte humane Stammzellen und ihre primäre Richtung der Differenzierung (Körbling et al. 2003)

Zelltyp	Gewebespezifische Lokalisation	Differenzierte Zellen bzw. Gewebe
Hämatopoetische Stammzellen	Knochenmark, peripheres Blut	lymphohämatopoetische Blutzellen, Endothel und Osteoklasten
Mesenchymale Stammzellen	Knochenmark, peripheres Blut, mesenchymales Gewebe	Knochen, Knorpel, Sehnen, Fettgewebe, Muskel, Knochenmarksstroma, neurale Zellen

Neurale Stammzellen	Ependymzellen, Astrozyten (subventrikuläre Zone) des ZNS	Neurone, Astrozyten, Oligodendrozyten
Hepatische Stammzellen	In oder in der Nähe der terminalen Gallenkanälchen	Ovale Zellen, die anschließend Hepatozyten und duktales Zellen bilden
Pankreatische Stammzellen	Nestin-positive Zellen, ovale Zellen, duktales Zellen	Beta-Zellen
Skellettmuskel-Stammzellen oder Satellitenzellen	Muskelfasern	Skelettmuskelfasern
Stammzellen der Haut (Keratinocyten)	Basale Schicht der Epidermis, Haarzwiebel	Epidermis, Haarfollikel
Epitheliale Stammzellen der Lunge	Tracheale Basalzellen und schleimsezernierende Zellen, bronchioläre Clara-Zellen, alveoläre Typ-2-Pneumozyten	Schleimzellen, Zilien tragende Zellen, Pneumozyten Typ 1 und 2
Stammzellen des intestinalen Epithels	Epitheliale Zellen an der Basis jeder Krypte	Paneth'sche Körnerzellen, Bürstensaum-Enterozyten, schleimproduzierende Becherzellen, enteroendokrine Zellen der Mikrovilli

1.1.2 Humane mesenchymale Stammzellen

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) stellen die multipotenten Vorläuferzellen differenzierter, mesenchymaler Gewebe, wie Knorpel, Knochen, Sehnen, Fett, Bindegewebe und Muskel dar (Yoo et al. 2000). Erstmals berichtete Friedenstein 1976 über „clonogenic stromal cells“, die aus dem Knochenmark isoliert werden konnten (Koç et al. 2001). Sie können aus verschiedenen Geweben, wie Knochenmark, Muskel oder Fett isoliert und *in vitro* manipuliert sowie expandiert werden (Gafni et al. 2004). Man geht davon aus, dass mesenchymale Gewebedefekte zunächst durch lokale Stammzellen ersetzt werden, ist dieser

Pool aufgebraucht, kommt es zu einer Ausschüttung von Zytokinen, die die mesenchymale Stammzellfreisetzung aus dem Knochenmark ins periphere Blut, sowie ihren Transport zu dem entsprechenden Organ steuern (Körbling et al. 2003). Unstimuliert erscheinen hMSC als fusiforme Fibroblasten (Koç et al. 2001). Neben hämatopoetischen Stammzellen, die bereits bei der Knochenmarkstransplantation nach Myeloablation verwendet werden, wurde in den letzten Jahren auch verstärkt das therapeutische Potential humaner mesenchymaler Stammzellen untersucht.

So erhöhen gleichzeitige hMSC-Infusionen die Engraftment-Raten bei allogener Knochenmarkstransplantation (Koç et al. 2001). Sie hemmen das Auftreten einer Graft versus Host Disease (GvHD), einer Zerstörung des Empfängergewebes durch immunkompetente Zellen des Spenders (Le Blanc et al. 2004), durch eine Suppression der Funktion von B- und T-Lymphozyten, sowie dendritischen Zellen. Durch diese antiimmunogene Wirkung sind hMSC auch eine mögliche Therapieoption für Patienten mit Autoimmunerkrankungen (Concione et al. 2005).

Bei Patienten mit angeborenen metabolischen Erkrankungen kann die Progression reduziert werden, da hMSC eine Anzahl lysosomaler Enzyme besitzen, die das Potential haben, Speicherkrankheiten zu korrigieren (Koç et al. 2001).

In weiteren Studien wurde das Potential von hMSC zur Therapie der Osteogenesis imperfecta untersucht. Osteogenesis imperfecta ist ein angeborener Gendefekt, mit über 100 bekannten Mutationen der $\alpha 1/2$ Ketten, einem Bestandteil von Kollagen Typ 1. Klinisch manifestiert sich die Erkrankung in einer abnormen Brüchigkeit der Knochen, blauen Skleren sowie kutanen und extrakutanen Hämorrhagien. Durch Transplantation von hMSC im *in vivo* Modell (Maus) konnte eine geringere Frakturinzidenz, erhöhte Knochenmineralisation sowie verstärktes Größenwachstum erzielt werden (Niyibizi et al. 2004).

Des Weiteren stellen hMSC eine neue therapeutische Option für Patienten mit Myokardischämie dar. Im Tierversuch wurde durch Implantation von hMSC in infarziertes Myokard, Myokardgewebe regeneriert und die Neovaskularisation verstärkt (Leri et al. 2005, Wang et al. 2005). In einer weiteren Studie gelang es einen *in vitro* experimentell erzeugten Leitungsblock zwischen zwei Myokardbündeln mit implantierten hMSC zu überbrücken. Die zuvor asynchron kontrahierenden Bündel konnten resynchronisiert werden. Bisher wurde dabei kein proarrhythmogener Effekt nachgewiesen (Beeres et al. 2005).

Mehrfach wurde in Studien die Verwendung von hMSC in der Therapie größerer Hautdefekte untersucht. Durch intravenöse Infusionen von hMSC, teilweise in Kombination mit bFGF (basic fibroblast growth factor), konnte durch eine Differenzierung der hMSC zu

Epithelzellen eine erhöhte Heilungsrate erzielt werden (Nakagawa et al. 2005, Mansilla et al. 2005).

Da im Blut zirkulierende hMSC von Stress ausgesetzten, bzw. verletzten soliden Organen rekrutiert werden können, stellen sie ein potentielleres Trägervehikel für therapeutische Substanzen, wie zum Beispiel Interferon β , in der Gliom Therapie dar. Durch Injektion von derart manipulierten hMSC in die Arteria Carotis sowie lokal ins ZNS konnte die Überlebensrate von Mäusen mit einem Gliomtransplantat signifikant erhöht werden (Nakamizo et al. 2005).

Auch die Therapie von Schlaganfällen, Schädelhirntraumata und spinalen Rückenmarksverletzungen mit hMSC erscheint möglich, da intravenöse Injektionen von hMSC nach derartigen ZNS-Schädigungen das neurologische Outcome verbessern, vermutlich durch eine Stimulation der Neurogenese, der Synaptogenese sowie der Ausbildung von gap junctions zwischen Astrozyten (Gao et al. 2005, Mahmood et al. 2005, Mansilla et al. 2005).

Da hMSC sehr gut ex vivo manipuliert werden können, stellen sie in Zukunft einen potentiellen Träger für Gentherapien dar.

Auch in der Antiaging-Forschung könnten hMSC zukünftig möglicherweise eine Rolle spielen.

1.1.3 hMSC und Tissue Engineering in der Therapie von Knochendefekten

Tissue Engineering ist per definitionem die Verwendung von Zellen, beeinflusst durch Zytokine bzw. gentechnische Maßnahmen, kombiniert mit biogenen bzw. synthetischen Materialien, zur Herstellung von biologischen Ersatzstoffen zum funktionellen Gewebersatz (Vacanti et al. 1998). Im Rahmen des Tissue Engineering wird derzeit in zahlreichen Studien das therapeutische Potential der hMSC zur Überbrückung von Knochen-, Knorpel- oder Sehndefekten untersucht. Da diese Gewebe, insbesondere Knorpel und Sehnen ein äußerst geringes eigenes Regenerationspotential besitzen (Gafni et al. 2004), stellen größere traumatisch, degenerativ oder tumorös entstandene Defekte weiterhin ein therapeutisches Problem dar. Dem derzeitigen klinischen Standard, der autogenen bzw. allogenen Transplantation, sind Grenzen gesetzt durch die beschränkte Verfügbarkeit, immunologische Abstoßungsreaktionen sowie die Gefahr der Infektionsübertragung (Schieker et al. 2004). Ebenso sind Schmerzen oder Nervenläsionen an der Entnahmestelle möglich (Ahlmann et al. 2002, Banwart et al. 1995, Goulet et al. 1997, Summers et al. 1989).

Alternativ wurde in einigen Studien der Einsatz osteoinduktiver Wachstumsfaktoren teilweise auch in Kombination mit Metallimplantaten zur Therapie größerer Knochendefekte untersucht. Es konnte jedoch kaum signifikant bessere Knochenheilung als mit autologen Transplantaten erreicht werden, zudem ergab sich durch den Bedarf unphysiologisch hoher Dosen der Wachstumsfaktoren eine systemische Exposition mit nicht absehbaren Folgen, sowie ein hoher finanzieller Aufwand (Gamradt et al. 2004).

In den physiologischen Reparaturvorgängen, die durch beide Therapieoptionen unterstützt werden, spielen hMSC eine wichtige Rolle. Bei der autologen Knochentransplantation werden hMSC im Knochenmark des Transplantats sowie des Defekts durch lokale Faktoren an der Fraktur stimuliert, zur osteogenen Differenzierung und damit zur Defektheilung angeregt. Die Injektion osteoinduktiver Wachstumsfaktoren zielt auf die rasche Vermehrung und osteogene Differenzierung am Defekt vorhandener hMSC ab (Yoo et al. 2000). Die Therapie größerer Defekte mit injizierten hMSC, bzw. mit hMSC besiedelten Materialien, wie autologer oder heterologer Knochen, demineralisierte Knochenmatrix sowie osteoinduktiven Keramiken, stellt daher eine mögliche Alternative dar, um eine größere Anzahl hMSC an der Fraktur zu versammeln und dadurch eventuell bessere Heilung zu erzielen (Yoo et al. 2000). Die Sammlung der hMSC durch Punktion des Beckenkammes und Aspiration des Knochenmarks stellt dabei eine atraumatischere und risikoärmere Methode zur Materialgewinnung dar, im Vergleich zum autologen Transplantat (Gamradt et al. 2004). hMSC können durch zwei Mechanismen zur Defektheilung beitragen. Sie besitzen selbst ein großes Regenerationspotential und können unter entsprechenden Bedingungen osteogen bzw. chondrogen differenzieren. Zum anderen können hMSC umliegende Zellen stimulieren und somit zur Regeneration und Vermehrung anregen (Gafni et al. 2004). Ein weiterer Vorteil gegenüber bereits differenzierten Zellen besteht darin, dass hMSC sich selbst orientieren, Defekte lokalisieren und auf lokale Faktoren reagieren können (Gafni et al. 2004). In frühen Studien wurden zunächst alle im Knochenmarksaspirat enthaltenen Zellen perkutan an knöcherne Frakturen injiziert (Connolly et al. 1995), beziehungsweise synthetische Leitschienen mit den aspirierten Zellen besiedelt und in knöcherne Defekte implantiert (Ohgushi et al. 1989). Durch beide Methoden wurde eine gute Defektheilung erzielt, da im Aspirat hMSC enthalten waren, jedoch wurde diese Art der Stammzelltherapie limitiert durch den geringen Anteil der hMSC an allen Knochenmarkszellen, da nur ca. 50 hMSC in einer Million Knochenmarkszellen enthalten sind. Des Weiteren konnten maximal zwei Milliliter Aspirat gewonnen werden, da sonst eine Verdünnung mit peripherem Blut stattfand (Gamradt et al. 2004). So wurden im weiteren Verlauf Methoden entwickelt, hMSC aus einem

Knochenmarksaspirat zu isolieren, *in vitro* zu vermehren und erst anschließend zu transplantieren. Auf diese Weise wurde zum Beispiel in einen Defekt der langen Röhrenknochen von Schafen ein mit hMSC besiedelter Keramikzylinder implantiert. Dadurch wurde signifikant bessere Knochenheilung erzielt als mit Implantation unbesiedelter Keramikzylinder (Kon et al, 2000). Auch an menschlichen Defekten von Humerus, Ulna oder Tibia konnte mit hMSC besiedelten Leitschienen stabile und schnelle Reparaturen erzielt werden (Derubeis et al. 2004). Das Potential der hMSC zur Defektheilung kann durch genetische Manipulation noch zusätzlich gesteigert werden. hMSC wurden derart manipuliert, dass sie Fähigkeit zur Produktion von BMP-2, einem osteogenen Wachstumsfaktor, erhielten. Dadurch wurde eine wesentlich bessere Defektheilung erzielt, als mit im Vergleich verwendeten CHO-Zellen (chinese hamster ovary), obwohl diese selbst mehr BMP-2 produzieren als die manipulierten hMSC. Vor allem an den Defekträndern wurde im Versuch mit den BMP-2 produzierenden hMSC kontinuierlicher Knochen gebildet, während im Ansatz der CHO-Zellen kein Kontakt stattfand. Viel versprechend erscheinen auch hMSC, die eine Kombination von BMP-2 und VEGF, einem Angiogenesefaktor, produzieren (Gafni et al. 2004). Um die BMP-2 Produktion genetisch manipulierter hMSC besser zu kontrollieren, wurde dem entsprechenden Gen ein Tetracyclin-Promotor (tet-off-system) vorangestellt. So konnte durch Zugabe von Tetracyclin die BMP-2 RNA-Synthese und damit die BMP-2-Produktion gestoppt werden, wurde das Antibiotikum weggelassen, kam es zur BMP-2 Sekretion und damit zur osteogenen Differenzierung. Mit derart veränderten hMSC wurden Kollagen-Leitschienen besiedelt und einerseits ektop in die abdominale Muskulatur von C3H/HeN-Mäusen transplantiert, wobei nur bei Abwesenheit des Tetracyclins Knochenformationen gebildet wurden. Andererseits wurden die besiedelten Leitschienen in experimentell erzeugte Radiusfrakturen der Mäuse transplantiert. Auch hier kam es nur in Abwesenheit des Antibiotikums innerhalb von zwei Monaten zur kompletten Defektüberbrückung durch Knochen trabekel und Knochenmark, bei Anwesenheit von Tetracyclin wurde kein kalzifiziertes Knochengewebe gebildet. Die mit hMSC besiedelten Leitschienen führten dabei zu deutlich besserer Knochenheilung als alleinige BMP-2 Injektionen in die Fraktur (Ioannis et al. 2001).

In vielen der therapeutischen Anwendungsoptionen ergab sich das Problem, den Verbleib der injizierten bzw. transplantierten hMSC nachzuweisen, den Zeitraum ihres Überlebens zu bestimmen, sowie eine eventuelle unerwünschte Migration in andere Organe auszuschließen. Eine Möglichkeit hierfür bietet die genetische Markierung der hMSC.

1.1.4 Genetische Markierung von Zellen

Der ideale Zellmarker sollte mehrere Voraussetzungen erfüllen: er sollte in unmarkierten Zellen nicht vorhanden sein, durch die Zellteilung nicht verdünnt werden, einfach zu detektieren sein, sowie keinen Einfluss auf die physiologischen Zellaktivitäten haben (Xia et al. 2005). Das green fluorescent protein (GFP), ursprünglich aus der Qualle *Aequoria Victoria* gewonnen, sowie seine rekombinanten Varianten (eGFP) erfüllen die meisten dieser Kriterien (Xia et al. 2005). GFP ist ein in humanen Zellen nicht vorhandenes Protein, das unter UV-Licht sowie durch Fluoreszenzmikroskopie leicht wahrzunehmen ist (Xia et al. 2005). Mit diesem Protein wurden in der vorliegenden Arbeit die hMSC genetisch markiert.

Zur genetischen Markierung von humanen Zellen stehen unterschiedlichste virale und nicht virale Methoden zur Verfügung. Lipo-, Polyfection, Mikroinjektion, gene-gun oder Elektroporation zählen zu den nicht viralen Transfektionsmethoden. Gemeinsamer Nachteil dieser Techniken ist eine geringe Effizienz (Gamradt et al. 2004, Aluigi et al. 2005, Naldini et al. 1996) sowie eine nur transiente Expression des übertragenen Gens (Naldini et al. 1996), da es bei diesen Methoden nur selten zur Integration ins Genom kommt, weshalb sie zur generellen Markierung der hMSC nicht optimal erscheinen. Ihr Vorteil gegenüber den meisten viralen Vektoren ist jedoch die geringe Immunogenität.

Zur viralen genetischen Markierung stehen Adenoviren, Adenoassoziierte Viren, Herpesviren, Onkoretroviren und Lentiviren zur Verfügung. Vor allem Adenoviren, ein häufiger Erreger von Infekten der oberen Atemwege (Wilson et al. 2004), wird in seiner Anwendung durch die Auslösung einer Immunantwort limitiert (Gamradt et al. 2004, Kim et al. 2004, Naldini et al. 1996, Wilson et al. 2004). Durch eine Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten werden infizierte Zellen rasch zerstört, wodurch eine stabile, längerfristige Expression verhindert wird (Wilson et al. 2004). Des Weiteren werden ebenso B-Lymphozyten zur Antikörperbildung stimuliert, somit wird eine wiederholte Infektion desselben Organismus erschwert (Wilson et al. 2004).

Ebenfalls häufig als Vektor verwendet werden Adenoassoziierte Viren (AAV), die auf der Familie des primaten Parvovirus basieren (Wilson et al. 2004). Primär wurden sie als Kontamination adenoviraler Laborvorräte isoliert und in sechs verschiedene Typen eingeteilt, die Unterschiede in der Transduktionseffizienz verschiedener Gewebe zeigen. So zeigt Typ 5 eine besonders hohe Effizienz an respiratorischen Epithelzellen sowie an Zellen des ZNS, während Typ 1 Muskelzellen besser transduziert (Auricchio et al. 2001). Obwohl der größte Teil der menschlichen Population schon Kontakt mit Adenoassoziiertem Virus hatte, sind die exakte Natur sowie das klinische Korrelat dieser Infektion noch unbekannt (Wilson et al.

2004). In Abwesenheit eines Helfervirus, wie zum Beispiel Adenovirus, kann AAV nicht-teilende Zellen infizieren und sich in das Genom integrieren (latente Phase), während in Anwesenheit des Helfervirus das AAV-Genom vermehrt wird (Vermehrungsphase) (Sandoval et al. 2005, Wilson et al. 2004). Da Adenoassoziierte Viren zytotoxische T-Lymphozyten nicht aktivieren, kommt es zu keiner immunologischen Inflammation und infizierte Zellen werden nicht zerstört, über eine Stimulation der B-Lymphozyten wird jedoch ebenso wie bei Adenoviren eine wiederholte Infektion erschwert (Wilson et al. 2004).

Eine wenig immunogene Variante zu Adenoviren oder Adenoassoziierten Viren stellen Retroviren dar. Es handelt sich um eine Virusfamilie mit einzelsträngiger RNA, die über das Enzym Reverse Transkriptase in eine doppelsträngige DNA-Zwischenstufe transkribiert und als Provirus in das Genom der Wirtszelle eingebaut wird (Pschyrembel, 1998). Durch die Integration ins Genom kommt es zu einer stabilen, langfristigen Expression (Lu et al. 2005) ohne immunologische Zerstörung der infizierten Zellen. Ein Vertreter dieser Gruppe ist der Moloney Murine Leukemia Virus. Dieser hat jedoch den Nachteil, nur Zellen zu infizieren, die sich sehr kurz nach der Infektion teilen (Reiser et al. 1996, Naldini et al. 1996, Wilson et al. 2004) und erscheint damit für die Stammzellmarkierung nicht ideal. Lentiviren dagegen, ebenfalls zu den Retroviren gehörend, können sowohl teilende als auch nicht teilende Zellen infizieren (Kim et al. 2004, Auricchio et al. 2001, Mitsuhashi et al. 2005, Kurre et al. 2005, Strappe et al. 2005, Kuate et al. 2004, Kim et al. 2005, Lu et al. 2005, Naldini et al. 1996, Wilson et al. 2004). Die meisten für den Gentransfer eingesetzten Lentiviren basieren auf Sequenzen des Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1) (Auricchio et al. 2001, Strappe et al. 2005, Lu et al. 2005, Wilson et al. 2004). In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Lentiviren humane Stammzellen effizient transduzieren und keine Auswirkung auf das Differenzierungspotential oder die Proliferation haben (Xia et al. 2005, Kim et al. 2005, Kurre et al. 2005, Mitsuhashi et al. 2005). Die effiziente Infektion auch nicht teilender Zellen, die Integration ins Genom der infizierten Zellen und die damit verbundene lang anhaltende, stabile Expression (Wilson et al. 2004, Lu et al. 2005, Kim et al. 2005, Mitsuhashi et al. 2005, Auricchio et al. 2001), die hohe Klonierungskapazität sowie die fehlende Immunogenität (Gamradt et al. 2004, Strappe et al. 2005) machen Lentiviren zu idealen Vektoren für die genetische Markierung der hMSC.

Tabelle 2: Virale und nicht-virale Vektoren (Gamradt et al. 2004)

Vektor	Beschreibung	Kapazität (kb)	Vorteile	Nachteile
<i>viral</i>				
Adenovirus	Infiziert viele Zelltypen (teilende und nicht-teilende Zellen); die eingefügten Gene bleiben episomal	35	Hohe Kapazität; leichte Herstellung	Stark immunogen; DNA bleibt episomal und kann mit der Zeit verloren gehen
Adenoassoziierter Virus	Infiziert teilende und nicht-teilende Zellen; löst keine bekannten Erkrankungen an Menschen aus; rekombinanter Adenoassoziierter Virus bleibt episomal	5,2	Integriert in das Empfängerzellgenom; leichte Herstellung	Kleine Kapazität; kann in teilenden Zellen verloren gehen; teilweise Transduktionsschwierigkeiten während der Doppelstrangsynthese
Herpes simplex virus	Infiziert teilende und nicht-teilende Zellen; Latenz in neuronalen Zellen	30	Hoch infektiös; hohe Kapazität	Zytotoxisch; immunogen
Moloney murine leukemia virus (Retrovirus)	Eingefügte Gene integrieren zufällig in das Empfängerzellgenom, infiziert nur teilende Zellen	8	Wenig immunogen	Indirekte Methode nötig um die Zielzelle zu testen; Insertionsmutagenese
Lentivirus (Retrovirus)	Infiziert teilende und nicht-teilende Zellen	8	Wenig immunogen	
<i>Nichtviral</i>				
Reine DNA	Reine DNA wird von der Empfängerzelle aufgenommen; reine		Leichte Herstellung; nicht	Geringe Effizienz

	DNA kann mit einem Gerüst verwendet werden (Gen-aktivierte Matrix) oder gekoppelt an einen Rezeptor/Liganden		immunogen	
Liposomen	Gen-transport in einem Phospholipid-Bläschen das mit der Empfängerzelle verschmilzt		Leichte Herstellung; nicht immunogen	Geringe Effizienz; transiente Expression
Biolistics (gene gun)	DNA umhüllt von Partikeln wird in die Zelle getrieben			Geringe Effizienz; technisch schwierig

1.2 Aufgabenstellung

1.2.1 Herstellung eines Lentiviralen Expressionssystems

Ziel dieser Arbeit war die permanente genetische Markierung humaner mesenchymaler Stammzellen. Wie bereits in der Einleitung dargestellt, eignen sich besonders Lentiviren für den effektiven Gentransfer in hMSCs. Deshalb sollte in einem ersten Schritt der lentivirale Gentransfer für die Transduktion humaner mesenchymaler Stammzellen neu etabliert werden. Wir entschieden uns für eGFP als Markergen, da dieses sowohl *in vitro* als auch *in vivo* leicht detektiert werden kann. Dazu musste zunächst das entsprechende eGFP-Gen in ein lentivirales Expressionskonstrukt kloniert werden. Nach Etablierung und Optimierung der Virusherstellung sollte ein Protokoll zur effizienten Transduktion von hMSCs erstellt werden.

1.2.2 Lentivirale Transduktion von humanen mesenchymalen Stammzellen mit eGFP

In der Zellkultur wollten wir nun humane mesenchymale Stammzellen mit Lentiviren transduzieren. Nach der erfolgreichen Etablierung des lentiviralen Gentransfers in humane mesenchymale Stammzellen unter Verwendung des Markergens eGFP, würde hiermit auch eine hoch effiziente und neuartige Gentransfer-Methode für die Untersuchung von Funktionsgenen in hMSCs zur Verfügung stehen.

1.2.3 Besiedelung von Spongiosa-Leitschienen mit eGFP markierten humanen mesenchymalen Stammzellen

In einem weiteren Schritt sollten nun klinisch bereits zur Knochendefektfüllung zugelassene Spongiosa-Leitschienen mit den markierten humanen mesenchymalen Stammzellen besiedelt werden. Durch die Markierung der Zellen bot sich die Möglichkeit die Stammzellen in geringer Anzahl quantitativ zu erfassen und sie nach Implantation *in vivo* zu lokalisieren, ihre Überlebensdauer zu bestimmen, sowie eine eventuelle unerwünschte Migration in andere Organe auszuschließen.

2 Material und Methoden

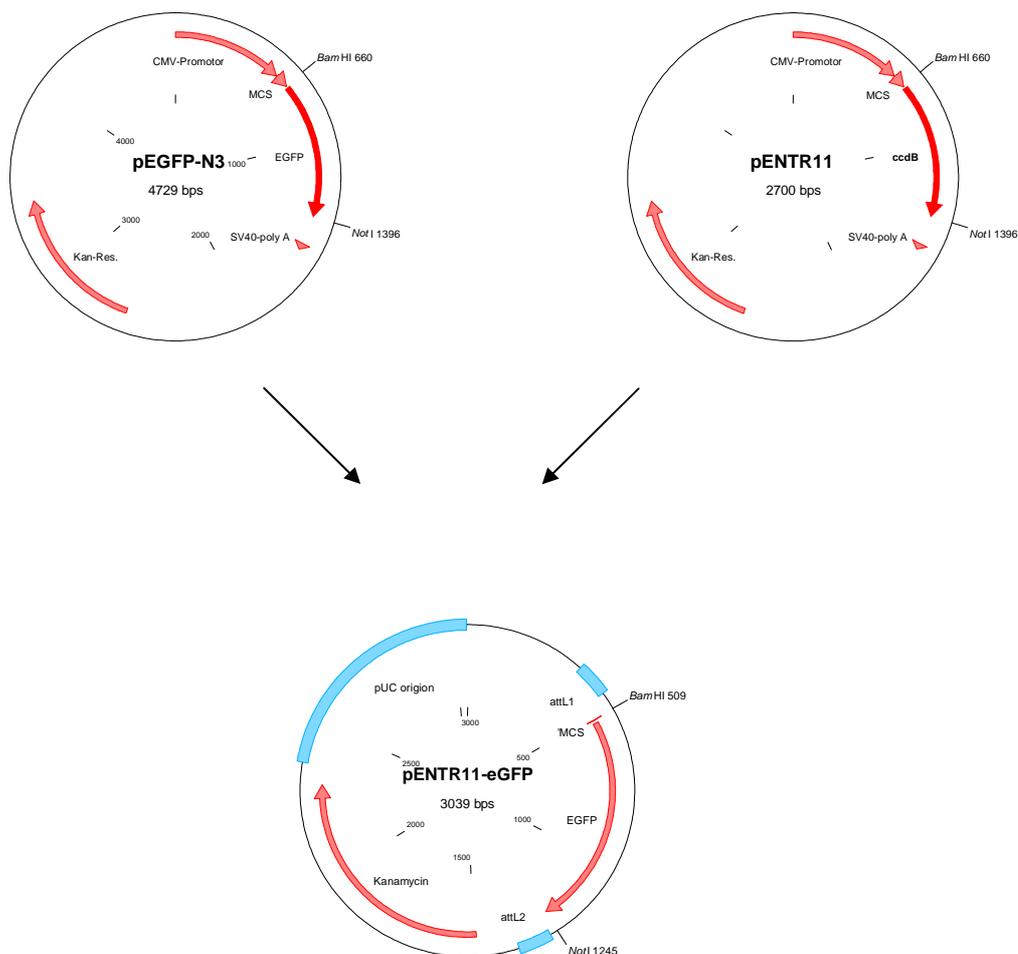
2.1 Methoden

2.1.1 Herstellung des lentiviralen Expressionskonstruktes

Zunächst wurde das lentivirale Expressionskonstrukt, welches das eGFP-Gen enthielt, hergestellt. Das lentivirale Expressionskonstrukt war die Grundlage für die anschließende Herstellung der lentiviralen Vektoren.

2.1.1.1 Restriktionsverdau von pEGFP-N3 und pENTR11

Abbildung 1: Ausgangsplasmide pEGFP-N3 und pENTR11 werden durch Restriktion und Ligation zu pENTR11-eGFP



Bevor eGFP in das lentivirale Expressionskonstrukt kloniert werden konnte, musste zunächst das Gen in einen so genannten „Entry-Vektor“ (pENTR11) überführt werden. Mit Hilfe des „Entry-Vektors“ war es möglich das eGFP-Gen mittels homologer Rekombination in das lentivirale Expressionskonstrukt einzuschleusen.

Aus dem Plasmid pEGFP-N3 (Clontech™) wurde das eGFP-Gen herausgeschnitten und in das Plasmid pENTR11 (Invitrogen™) kloniert. Beide Plasmide wurden mit denselben Restriktionsenzymen *Bam*H1 und *Not*1 in Anwesenheit von Puffer B zwei Stunden bei 37°C verdaut. Dadurch entstanden vier DNA-Fragmente mit so genannten „sticky ends“, das heißt kurzen Abschnitten einzelsträngiger DNA an den Enden, die später leicht wieder verbunden werden konnten.

2.1.1.2 Präparative Gelelektrophorese

Um die beiden gewünschten DNA-Fragmente von den Übrigen zu trennen, wurden die unterschiedlich langen Fragmente durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt, die jeweiligen Banden herausgeschnitten, sowie die linearen DNA-Fragmente aus der Gelbande extrahiert. Zur Herstellung des 1% Agarosegels wurden 800 mg Agarose mit 80 ml TAE Puffer (Zusammensetzung der Puffer siehe Anhang) in der Mikrowelle 2 Minuten erhitzt, kurz abgekühlt und anschließend 4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben. Die visköse Flüssigkeit wurde in eine vorgefertigte Form gegossen und ca. dreißig Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt, bis sie erhärtet war. Das Gel wurde in die mit TAE Puffer gefüllte Gelkammer gelegt und das DNA-Gemisch in eine der Geltaschen gegeben, daneben ein DNA-Marker mit Fragmenten definierter Länge. Anschließend wurde eine Spannung von 100 mV angelegt, wodurch die negativ geladenen DNA-Fragmente, entsprechend ihrer Länge, mit unterschiedlicher Geschwindigkeit zum Pluspol wanderten. Unter dem UV-Licht konnten anschließend anhand des Markers die gewünschten DNA-Fragmente identifiziert und mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten werden. Die beiden Gelstücke wurden gewogen (in mg) und isoliert (Quiagen™ gel extraction kit II). Hierfür wurden die Gelfragmente entsprechend des Herstellerprotokolls jeweils in der dreifachen Menge Puffer QG (in µl) durch zehn Minuten Inkubation im 50°C Wasserbad und intermittierendes Vortexen aufgelöst. Dazu kam die einfache Menge (in µl) Isopropanol. Die Mischung wurde jeweils auf eine Säule gegeben und 1 Minute zentrifugiert, wodurch die DNA im Filter der Säule gebunden wurde. Anschließend wurde der Filter mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen und zweimal eine Minute zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Mit 50 µl destilliertem

H₂O wurde die DNA durch eine weitere Minute Zentrifugation in ein neues Eppendorf Gefäß eluiert.

2.1.1.3 Ligation

Die beiden geschnittenen Fragmente wurden mit dem Enzym T4-DNA-Quick-Ligase zu einem zirkulären Plasmid verbunden. Dazu wurden zunächst 50 ng des geschnittenen Plasmids pENTR (Invitrogen) und die dreifache molare Menge des eGFP Fragments in 10 µl H₂O mit 10 µl Quick Ligase Puffer und 1 µl T4-DNA-Quick-Ligase vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Beenden der Reaktion wurde der Ansatz auf Eis gelagert.

2.1.1.4 Transformation

Das entstandene Plasmid wurde anschließend zur quantitativen Vermehrung in kompetente E. coli (Top 10, InvitrogenTM) transformiert. Unter Transformation versteht man das Einbringen nackter DNA in vorbehandelte, so genannte „kompetente“ Zellen. 50 µl der bei -80°C gelagerten Bakterien wurden hierzu auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit 2 µl der Ligation vermengt. Anschließend wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgten 30 Sekunden im 42°C warmen Wasserbad und erneut 2 Minuten Kühlzeit auf dem Eis.

2.1.1.5 Selektive Vermehrung

Zur Vermehrung derjenigen Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten, wurden zu dem Ansatz zunächst 250 µl SOC-Medium (0.5% Hefeextrakt, 2.0% Trypton, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂, 20mM MgSO₄, 20mM Glucose) gegeben, 1 Stunde bei 37°C inkubiert und dabei zur besseren Sauerstoffversorgung geschüttelt. In dieser Phase hatten die Bakterien Zeit das auf dem Plasmid enthaltene Kanamycin-Resistenz-Gen zu exprimieren, so dass sie anschließend auf einer Kanamycin haltigen Agar-Platte selektiert werden konnten. Dazu wurden die Kolibakterien mit einem sterilen Spatel auf der Nährplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach 12 Stunden hatten diejenigen Bakterien, die durch Aufnahme des Plasmids auch die Kanamycin-Resistenz erworben hatten, je eine makroskopisch sichtbare Kolonie gebildet. Eine Kolonie wurde mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in 5 ml DYT-Medium (1.5% Pepton, 1% Hefeextrakt, 0.5% NaCl, 0.2%

Glucose, pH 7.4) mit 2500 µg Kanamycin (500 µg/ml) suspendiert. Die plasmidhaltigen Bakterien wurden weitere 12 Stunden bei 37°C unter Schütteln vermehrt.

2.1.1.6 DNA-Präparation (geringe Menge)

Zur Identifizierung derjenigen Bakterienklone mit korrekter Plasmidexpression, wurde zunächst eine geringe Menge Plasmid-DNA präpariert, die anschließend durch Zerlegung in definierte Bruchstücke mittels Restriktionsenzymen und Auftrennung im Agarosegel überprüft wurde. Zur DNA-Präparation wurde das QuiagenTM Plasmid Mini Kit verwendet. Zunächst wurden 1,5 ml der Bakterienkultur in einem Eppendorf-Gefäß 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 200 µl Puffer P1 resuspendiert und die gelösten Bakterien durch weitere Zugabe von 200 µl Puffer P2 lysiert. Die im Lysat vorhandenen Bakterienbestandteile, außer der DNA wurden durch 200 µl Puffer P3 präzipitiert und durch 10 Minuten Zentrifugation von der im Überstand gelösten DNA getrennt. Dieser wurde in einem neuen Eppendorf-Gefäß mit 600 µl Isopropanol vermischt und wiederum 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde verworfen und das übrige DNA-Pellet mit 400 µl Ethanol 70 % vermischt. Nach weiteren 10 Minuten Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen, die verbliebene Plasmid-DNA wurde an der Luft getrocknet und in 50 µl destilliertem H₂O resuspendiert.

2.1.1.7 Testverdau

Die präparierte Plasmid-DNA der einzelnen Klone wurde nun mittels zweier Restriktionsenzyme in lineare Fragmente definierter Länge zerlegt und im Agarosegel analog zu 2.1.1.2 aufgetrennt. Die Größe der in den jeweiligen DNA-Banden enthaltenen Bruchstücke konnte anschließend anhand eines DNA-Markers mit Banden bekannter Fragmente verglichen und analysiert werden. So konnten anhand des richtigen Bandenmusters diejenigen Klone mit korrekter pENTR11-eGFP-Plasmidexpression identifiziert und in den nächsten Arbeitsschritten weiter verwendet werden.

2.1.1.8 Anlegen einer Stammkultur

Zur Erhaltung der transformierten Bakterien wurde eine E. coli Stammkultur angelegt. 3ml der Bakterienkultur wurden mit 530 µl Glycerol 100% gemischt und auf zwei Kryoröhrchen aufgeteilt. Die Stammkulturen wurden bei -80°C gelagert.

2.1.1.9 DNA-Präparation

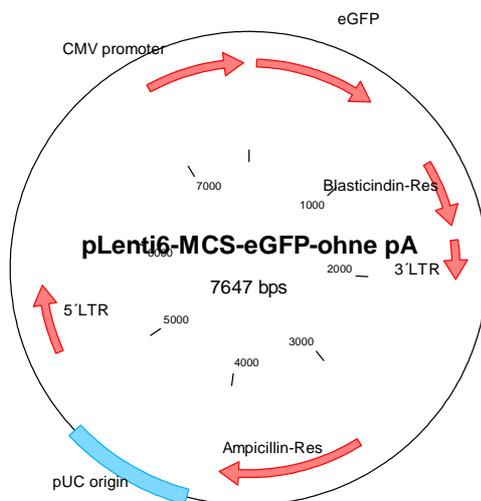
Aus der Bakteriensuspension konnte nach der Inkubation die massenhaft vermehrte Plasmid-DNA gewonnen werden. Dazu wurde das Qia Filter Plasmid Midi Kit verwendet. Zunächst wurden die Bakterien bei 4°C 15 Minuten aus dem Medium abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Bakterienpellet mit 4 ml Puffer P1 (Zusammensetzung der Puffer siehe Anhang) resuspendiert. Mit weiteren 4 ml Puffer P2 wurden die Bakterien lysiert und mit 4 ml Puffer P3 präzipitiert. Bei 4°C wurde das Lysat 60 Minuten zentrifugiert, das Präzipitat verworfen, der Überstand weitere 15 Minuten zentrifugiert und das Präzipitat wiederum verworfen. Dadurch wurden die Bakterienbestandteile entfernt, während die DNA in der Lösung verblieb. Ein Filter (Tip 100) wurde mit 2 mal 10 ml Puffer QBT äquilibriert, anschließend wurde die DNA-Lösung darauf gegeben. Weiterhin wurde zweimal mit je 10 ml Puffer QC gewaschen, so dass nur noch die Plasmid-DNA im Filter verblieb, die daraufhin mit 5 ml Puffer QF in ein neues Eppendorf-Gefäß ausgewaschen werden konnte. Die Lösung wurde mit 3,5 ml Isopropanol vermischt und 60 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen werden, das Pellet wurde mit 2 ml 70% Ethanol vermischt und wiederum 45 Minuten zentrifugiert. Durch diese Schritte wurde die Plasmid-DNA ausgefällt und verblieb im Pellet, der Überstand wurde verworfen. Das DNA-Pellet wurde in 100 µl destilliertem H₂O resuspendiert.

2.1.1.10 LR-Clonase Reaktion

Im letzten Klonierungsschritt wurde eGFP mittels LR-Clonase von pENTR11 auf den lentiviralen Vektor pLENTI6/V5-DEST (InvitrogenTM) übertragen. Dazu wurden 300 ng pENTR11-eGFP und 300 ng pLENTI6/V5-DEST in 4 µl Clonase-Puffer gelöst und mit TE-Puffer zu einem Endvolumen von 10 µl aufgefüllt. Der bei -80°C gelagerte LR-Clonase Enzym Mix wurde zwei Minuten auf Eis aufgetaut, daraufhin zweimal je zwei Sekunden durchmischt und 4 µl zu den Plasmiden gegeben. Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 25°C inkubiert, anschließend wurden 2 µl Proteinase K zur Beendigung der Reaktion zugegeben

und weitere 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Das resultierende Plasmid pLenti-eGFP wurde wiederum in E. coli transformiert, unter Ampicillinselektion vermehrt und die DNA mittels Präparation gewonnen.

Abbildung 2: Vektor pLenti-eGFP nach der LR-Clonase Reaktion



2.1.1.11 Sequenzierung

Zur Kontrolle der Klonierung wurde das Plasmid pLenti6-MCS-eGFP-ohne pA sequenziert. Hierzu wurden in vier Ansätzen je 350 ng des Plasmids mit 3,2 pmol eines der folgenden Primer CMV-f-492, pENTR11-f-451, pENTR11-r-989 und CMV-r-556 kombiniert und mit destilliertem H₂O zu je 20 µl aufgefüllt. Big Dye wurde lichtgeschützt auf Eis aufgetaut und je 2 µl zu jedem Ansatz gegeben. In der PCR wurde die DNA eine Minute auf 96°C erhitzt und anschließend 25 Zyklen folgenden Schemas durchgeführt.

Tabelle 3: PCR-Schema zur Sequenzierung eines DNA-Plasmids

Temperatur	Dauer
96°C	10 sec
50°C	5 sec
60°C	4 min
4°C	∞

Die weitere Sequenzierung erfolgte bei der Firma Sequiserve, Vaterstetten.

2.1.2 Virusherstellung

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Virusherstellung mit dem Virapower Lentiviral Expression System, Bildquelle Invitrogen



2.1.2.1 Kultivierung der 293FT Zellen

2.1.2.1.1 Ansatz von Zellkulturen zur Zellvermehrung

Zur Herstellung der Lentiviren wurde die Produktionszelllinie 293 FT verwendet. Die Zellen wurden in definierter Zellzahl, nach folgendem Schema in der Zellkultur vermehrt:

Tabelle 4: Ansatz der 293FT-Zellkultur

Kulturbehältnis	Fläche	Zellzahl	Mediumzugabe
Zellkulturflasche	25 cm ²	0,5 x 10 ⁶	5 ml
Zellkulturflasche	75 cm ²	1 x 10 ⁶	12 ml

Das Medium wurde jeweils nach 48 Stunden gewechselt. Das Passagieren wurde in Abhängigkeit der Zelldichte, bei ca. 80-90% Konfluenz durchgeführt, der Zeitpunkt schwankte zwischen dem 6. -8. Tag nach Ansatz, bzw. dem letzten Passagevorgang.

2.1.2.1.2 Auftauen der Zellen

Die in Kryotubes in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden in ein Wasserbad (+37°C) überführt. Sofort nachdem sich der komplette Inhalt verflüssigt hatte, wurde das Einfrierröhrchen unter der Sterilbank geöffnet und der Inhalt in eine 75 cm² Kulturflasche mit 12 ml Kulturmedium (+37°C) überführt. Anschließend wurden die Zellen 2-4 Stunden im CO₂-Inkubator kultiviert, nach dieser Phase waren die Zellen am Boden des Kulturgefäßes adhärent. Daraufhin konnte der DMSO-haltige Überstand abgesaugt werden und die Zellen wurden mit 12 ml frischem Medium bedeckt.

2.1.2.1.3 Herstellung von Nährmedien

Es wurden zwei Arten von Nährmedien unterschieden, eines zur Zellvermehrung mit Antibiotikazusatz, sowie eines zur Virusherstellung ohne Antibiotika. Für einen Ansatz von 500 ml wurde folgende Medienformulierung verwendet:

Tabelle 5: 293FT-Nährmedium

Inhaltsstoffe	Konzentration	Volumen
DMEM		438 ml
FBS (hitzeinaktiviert)	10 %	50 ml
NEAA (non essential amino acids)	0,1 mM	
L-Glutamin	2 mM	5 ml (einer 200 mM Lösung)
(Penicillin-Streptomycin)	40 IU/ml	2 ml (einer 10000IU/ml Lösung)
(Geneticin)	50 mg/ml	5 ml

2.1.2.1.4 Inaktivieren und Aliquotieren von FBS

Fetal Bovine Serum (FBS) wurde vor Zugabe zu den Nährmedien hitzeinaktiviert. Dazu wurde das bei -20°C gelagerte Serum zunächst bei +4°C langsam aufgetaut und anschließend 20 Minuten im Wasserbad bei +56°C erwärmt. Das inaktivierte Serum wurde in Portionen zu 50 ml aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.1.2.1.5 Passagieren der Zellen

Sind die auf einer Kulturfläche ausgesäten Zellen soweit proliferiert, dass sie die Fläche nahezu vollständig einnehmen, wird der Zellrasen als konfluent bezeichnet. Dieses Stadium muss bei 293 Zellen unbedingt vermieden werden, weshalb die Zellen vorher abgelöst und in Suspension überführt werden müssen.

Die Zellsuspension wurde nach Ermittlung der Zellzahl ggf. in neue Kulturbehältnisse in verdünnter Zellkonzentration (1:10 – 1:20) ausgesät.

Um die Zellen zu passagieren musste zunächst sämtliches Medium sowie Schwebstoffe wie beispielsweise avitale Zellen durch Absaugen entfernt werden. Durch anschließendes Spülen mit PBS wurden Reste des serumhaltigen Mediums eliminiert, um die Funktion des im nachfolgenden Schritt verwendeten Enzyms Trypsin zu gewährleisten. Mittels einer auf den Zellrasen aufgetragenen Trypsin/EDTA Lösung in PBS (1:10) lösten sich die adhären Zellen ab. Für eine 75 cm² Kulturflasche wurden 5 ml Lösung benötigt, für kleinere

Kulturgefäße entsprechend weniger. Die Einwirkzeit variierte um 5 Minuten bei Raumtemperatur und wurde definitiv durch lichtmikroskopische Kontrolle des Ablösevorgangs festgelegt. Sobald sich die Zellen abgerundet und in der aufgebracht Lösung schwebend zeigten, wurde der Ablösevorgang mittels Zugabe einer der Trypsin/EDTA Lösung äquivalenten Menge Serum-haltigen Mediums gestoppt. Die Trypsinwirkung wurde durch das im Medium enthaltene Serum weitgehend inaktiviert. Die Zellsuspension wurde anschließend aufgenommen und Trypsin/EDTA und PBS durch Zentrifugation und Resuspension in Nährmedium entfernt.

2.1.2.1.6 Tryptanblaufärbung und Zellzahlbestimmung

Während des Passagierens der Zellen, aber auch zur Virusherstellung war es erforderlich die definitive Zellzahl zu bestimmen. Dies erfolgte manuell in einer Neubaur-Zählkammer, in der unter lichtmikroskopischer Betrachtung die Anzahl der Zellen in einem definierten Volumen über einem Gitternetz ausgezählt wurden. Hierzu wurden 0,5 ml Zellsuspension mit 0.5 ml Tryptanblau verdünnt. Avitale Zellen, mit nichtintakter Zellmembran wurden dadurch angefärbt, was bei der Zellzählung entsprechend berücksichtigt wurde.

2.1.2.1.7 Kryokonservieren von Zellen

Die Zellen wurden zur Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff bei -196°C kryokonserviert. Dazu wurden $0,5 - 1,0 \times 10^6$ Zellen direkt nach der Passagierung abzentrifugiert und in einem Gesamtvolumen von 1 ml, bestehend aus Nährmedium mit einem Zusatz von 10% Dimethylsulfoxid resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryotubes aliquotiert, zunächst 2 Stunden bei -20°C eingefroren, anschließend über Nacht bei -80°C und schließlich in flüssigen Stickstoff überführt.

2.1.2.1.8 Reinigung und Desinfektion

Unerlässliche Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung von experimentellen Laborarbeiten sind saubere bzw. sterile Bedingungen zur Vermeidung von Kontaminationen. Dies gilt insbesondere für Arbeiten im Bereich der Zell- und Gewebekultur. Folgende Verfahren wurden angewendet:

70 % Ethanol in Aqua dest.

Vor Beginn der Arbeiten wurden jeweils die benötigten Arbeitsflächen, insbesondere die der Sterilbank, gründlich mit 70 % Ethanol in Aqua dest. abgewischt, ebenso die erforderlichen Geräte und Labor-Hilfsmittel.

Autoklavieren

Nicht hitzeempfindliche Labor-Hilfsmittel, bzw. Materialien wurden im Autoklaven für die Dauer von 20 Minuten bei feuchter Hitze (+ 105 °C) und Überdruck (+ 0,3 bar) autoklaviert.

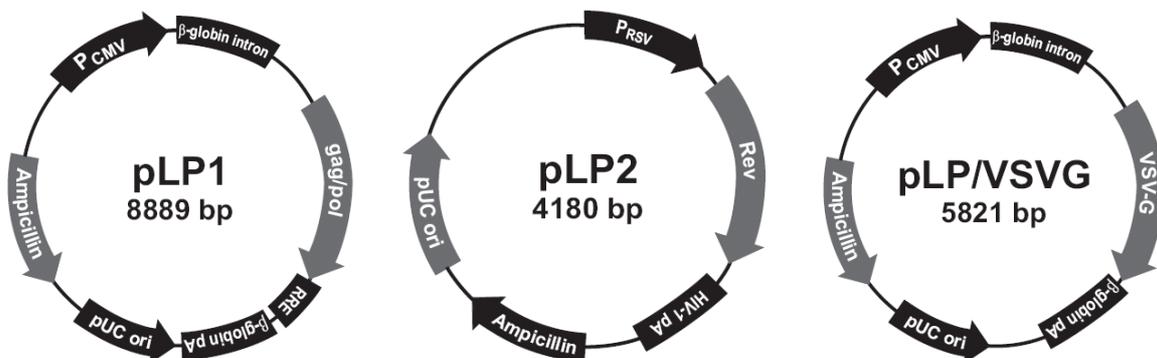
Sterilfiltration

Hitzeempfindliche, flüssige Substanzen wurden unter Verwendung geeigneter Filtervorrichtungen (0,2 µm Porengröße) sterilfiltriert.

2.1.2.2 Transfektion

Zur Herstellung der Viren erfolgte eine Kotransfektion der 293FT Zellen mit dem hergestellten Plasmid pLenti-eGFP, sowie den Plasmiden pLP1, pLP2 und pLP/VSVG (Invitrogen™, packaging mix), mit Hilfe von Lipofektamin 2000. Die Herstellung der Lentiviren wurde dabei in der S2 gentechnologischen Anlage des Max-von-Pettenkofer-Institutes (München) durchgeführt. Die gentechnologischen Arbeiten zu diesen Versuchen wurden zuvor von der Regierung Oberbayern genehmigt.

Abbildung 4: Plasmide pLP1, pLP2, pLP/VSVG (packaging mix); Bildquelle Invitrogen



Die Verteilung der viralen Strukturgene auf mehrere Transportplasmide dient dabei der biologischen Sicherheit. Alle vier Plasmide besitzen keine homologen Regionen, so dass unerwünschte Rekombination, sowie die Entstehung eines neuen vermehrungsfähigen Virus sehr unwahrscheinlich ist.

2.1.2.2.1 Herstellung der Lipofektamin-DNA-Komplexe

Das Lipofektamin-Reagenz enthält zwei positiv geladene Komponenten: DOSPA (2,3-dioleoyloxy-N-[2(spermincarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate), ein polykationisches Lipid und DOPE (dioleoyl phosphatidylethanolamine), ein Phospholipid. Beide Reagenzien umhüllen die Plasmid-DNA und ermöglichen über ihre hydrophoben Anteile die Fusion mit der Zellmembran. Dadurch wird die Komplexierung und Aufnahme der negativ geladenen DNA in die Zellen erleichtert. Zur Herstellung der Komplexe wurden zunächst 3 µg pLenti-eGFP mit 15 µg Packaging Mix in 1,5 ml Opti-MEM (ohne Serum, 37°C) gelöst. In einem zweiten Ansatz wurden 54 µl Lipofektamin ebenfalls in 1,5 ml OPTI-MEM (ohne Serum, 37°C) gelöst. Beide Ansätze wurden 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend zusammengefügt und weitere 20 Minuten ebenfalls bei Raumtemperatur inkubiert.

2.1.2.2.2 Vorbereitung der 293FT Zellen

Während der Inkubationszeit der DNA-Lipofektamin-Komplexe wurden die 293FT Zellen vorbereitet. Die verwendeten Zellen mussten sich in einer niedrigen Passage befinden (<20) und vor der Passagierung 80% konfluent sein. Die Zellen wurden während der Inkubationszeit der DNA-Lipofektamin-Komplexe trypsiniert, mit PBS gewaschen, gezählt und 10×10^6 Zellen in 7 ml Nährmedium resuspendiert.

2.1.2.2.3 Transfektion

Nach Abschluss der 20 Minuten Inkubationszeit wurden die DNA-Lipofektamin-Komplexe vorsichtig in eine 10 cm Rundschale gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe der resuspendierten Zellen, so dass sich ein Endvolumen von 10ml ergab. Die Kulturschale wurde über Nacht im CO₂-Inkubator aufbewahrt.

2.1.2.2.4 Virusherstellung

Während der folgenden 72 Stunden erfolgte die Replikation und Verpackung der Virusbestandteile durch die 293FT Zellen. 24 Stunden nach Transfektion wurde der Überstand über den adhärennten Zellen abgesaugt und durch frisches Nährmedium (37°C) ersetzt. Zu diesem Zeitpunkt konnte die erfolgreiche Transfektion durch Betrachtung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop und Beobachtung der transienten GFP-Expression kontrolliert werden.

Als Zeichen der Virusreplikation konnte unter dem Lichtmikroskop die Bildung von Synzytien beobachtet werden.

2.1.2.2.5 Virusgewinnung

72 Stunden nach der Transfektion konnten die Lentiviren, die sich nun im Überstand der Kulturplatte befanden, geerntet werden. Dazu wurde der Überstand gesammelt und zur Entfernung der Zellbestandteile 15 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen, der gewonnene Überstand zu je 1ml aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.1.2.2.6 Virustiterbestimmung

Zur Quantifizierung der Virusausbeute und Produktion reproduzierbarer Ergebnisse wurde der Titer des Virusüberstandes bestimmt. Hierzu wurden 2×10^5 HT1080 Zellen (humane Fibrosarkomzellen) in einem 6-well-Kulturgefäß ausgesät und über Nacht inkubiert. Nach 24 Stunden wurde eine Verdünnungsreihe des Virusüberstandes (10^{-2} bis 10^{-8}) hergestellt und jeweils mit Kulturmedium bis zu einem Volumen von 1 ml aufgefüllt. Anschließend wurde das Kulturmedium über den HT1080 Zellen abgesaugt, durch den verdünnten Virusüberstand ersetzt und mit je 6 µg/ml Polybrene ergänzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde wiederum der Überstand abgesaugt, 2 ml frisches Kulturmedium zugegeben und wiederum über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium wieder abgesaugt und durch neues Kulturmedium mit einem Zusatz von 5 µg/ml Blastocidin ersetzt. Die nächsten 12 Tage wurde das Blastocidin-haltige Medium alle 3-4 Tage erneuert. Am 12. Tag wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Kristallviolett zugegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung des Kristallvioletts wurde wiederum zweimal mit PBS gewaschen. Durch Auszählen der blau angefärbten Kolonien konnte der Virustiter bestimmt werden.

2.1.3 Transduktion der hMSC

2.1.3.1 Kultivierung der hMSC

2.1.3.1.1 Ansatz von Zellkulturen zur Zellvermehrung

Für die Versuche wurden kommerziell erwerbzbare humane mesenchymale Stammzellen der Firma Cambrex™ verwendet.

hMSC wurden nach folgendem Schema ausgesät:

Tabelle 6: Ansatz der hMSC-Zellkultur

Kulturbehältnis	Fläche	Zellzahl	Medium
Zellkulturflasche	75 cm ²	100000	10 ml
Zellkulturflasche	25 cm ²	20000	5 ml

2.1.3.1.2 Nährmedium

Für die Kultivierung wurde das vom Hersteller empfohlene MSCGM hMSC Medium Bullet Kit (Cambrex™) verwendet. Vorversuche hatten gezeigt, dass alternative Standard-Medien zu einer vorzeitigen Seneszenz der hMSC führen.

2.1.3.1.3 Auftauen der hMSC

Die im Stickstofftank gelagerten Kryoröhrchen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, bis der Inhalt homogen verflüssigt war. Ohne Zeitverzögerung wurde die Suspension in 5ml frisches Nährmedium (37°C) überführt und zur Entfernung des DMSO 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in frischem Nährmedium resuspendiert und in 3-4 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät.

2.1.3.1.4 Passagieren der hMSC

Das Trypsinieren der hMSC wurde analog dem Vorgang bei 293FT-Zellen (siehe 2.1.2.1.5) durchgeführt.

2.1.3.1.5 Tryptanblaufärbung und Zellzahlbestimmung

Das Färben und Zählen der hMSC erfolgte in der Neubaur-Zählkammer, wie unter 2.1.2.1.6 beschrieben.

2.1.3.1.6 Kryokonservieren der hMSC

Das Einfrieren der hMSC wurde nach dem unter 2.1.2.1.7 beschriebenen Protokoll durchgeführt, unter Verwendung folgenden Mediums:

Tabelle 7: hMSC-Kryokonservationsmedium

Inhaltsstoffe	Volumenanteil
MSCGM hMSC Medium Bullet Kit	85 %
DMSO	10 %
BSA cell culture tested	5 %

2.1.3.2 Transduktion

Als Transduktion wird der Vorgang bezeichnet, bei dem mit Hilfe von Viren genetisches Material in die Zielzelle eingeschleust werden kann. In unserem Fall verwendeten wir Lentiviren, um das eGFP-Gen in hMSC zu transferieren. Hierzu wurde der gewonnene Virusüberstand aufgetaut und in einer 1:1 Verdünnung mit hMSC-Medium auf die kultivierten Zellen pipettiert. Nach 24 Stunden wurde der verdünnte Virusüberstand abgesaugt und durch frisches hMSC -Medium ersetzt. Bereits zu diesem Zeitpunkt ließ sich unter dem Fluoreszenzmikroskop die e-GFP Expression von 70% der hMSC nachweisen. Neben dem eGFP-Gen enthielten die lentiviralen Expressionskonstrukte das eukariontische Resistenzgen Blastocidin. Dieses konnte dazu benutzt werden erfolgreich transduzierte hMSCs zu selektionieren. Hierfür wurde dem Medium zwei bis drei Tage nach Transduktion circa 10 Tage lang Blastocidin in einer Konzentration von 10 µg/ml zugesetzt, um die nicht transduzierten und damit nicht Blastocidin-resistenten Zellen zu eliminieren. Durch diese Selektion konnte eine e-GFP Expression von 98% der Zellen erreicht werden.

2.1.3.3 Differenzierung und Färbung nach Kossa

Um den Stammzellcharakter der transduzierten hMSC zu verifizieren, wurden mit eGFP infizierte hMSC osteogen differenziert. Nicht transduzierte Zellen wurden als Positivkontrolle verwendet. Als Negativkontrolle wurden sowohl transduzierte als auch nicht transduzierte Zellen in Standardmedium (D-MEM high glucose, +Glutamin, +Pyruvat) mit 10 % FBS und 1 % Penicillin-Streptomycin ohne Differenzierungszusätze kultiviert. Die *in vitro* Differenzierung der hMSC wurde nach Jaiswal durchgeführt. Osteogene Zusätze wurden dem Standardmedium in folgenden Konzentrationen zugesetzt: 100 nM Dexamethason, 10 mM β -Glycerophosphat, 50 μ M L-Ascorbinsäure-2-Phosphat. 5×10^3 Zellen/well wurden in einer 6-well-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde frisches Standardmedium zugegeben. Die Stimulation wurde begonnen, nachdem die Zellen eine Konfluenz von 80 % erreicht hatten, indem sie in Anwesenheit oder Abwesenheit der osteogenen Zusätze kultiviert wurden. Das Medium wurde 2-3 mal pro Woche gewechselt, 2 ml Medium pro Kulturfläche. Nach 16 Tagen wurden stimulierte und nicht stimulierte Zellen mit der von Kossa Färbung getestet. Die Zellen wurden zunächst 15 Minuten bei -20°C in 100 % Methanol fixiert und anschließend in destilliertem Wasser 20 Minuten rehydriert. Um den Calcium-Phosphat Niederschlag zu färben, wurden die Kulturbehältnisse 10 Minuten mit 5 % Silbernitratlösung inkubiert und anschließend zweimal 3 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen, gefolgt von 10 Minuten Inkubation mit 1 % Pyrogallollösung. Nach einem weiteren Waschvorgang für 3 Minuten in destilliertem Wasser und Inkubation mit 5 % Natrium-Hydroxid-Lösung für 4-5 Minuten wurden die Zellkulturgefäße zweimal 3 Minuten in Wasser gewaschen.

2.1.4 Besiedelung der Knochenleitschienen

2.1.4.1 Vorinkubation der Knochenleitschienen

Verwendet wurde eine bereits für klinische Anwendung zugelassene bovine Spongiosa (Tutobone® von Tutogen™, siehe Abbildung 4). Vorversuche in unserem Labor hatten gezeigt, dass die verwendeten Knochenleitschienen zunächst vorbehandelt werden mussten, um eine möglichst effiziente Besiedlung mit hMSC zu erreichen. Dazu wurde je ein Tutobone Zylinder unter sterilen Bedingungen in die Vertiefungen einer 48-well-Platte gelegt. Jeder Zylinder wurde mit 600-800 μ l hMSC-Medium vollständig bedeckt und für 4-8 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, 600-800 μ l hitzeinaktiviertes FBS zugegeben und wiederum über Nacht im Brutschrank inkubiert.

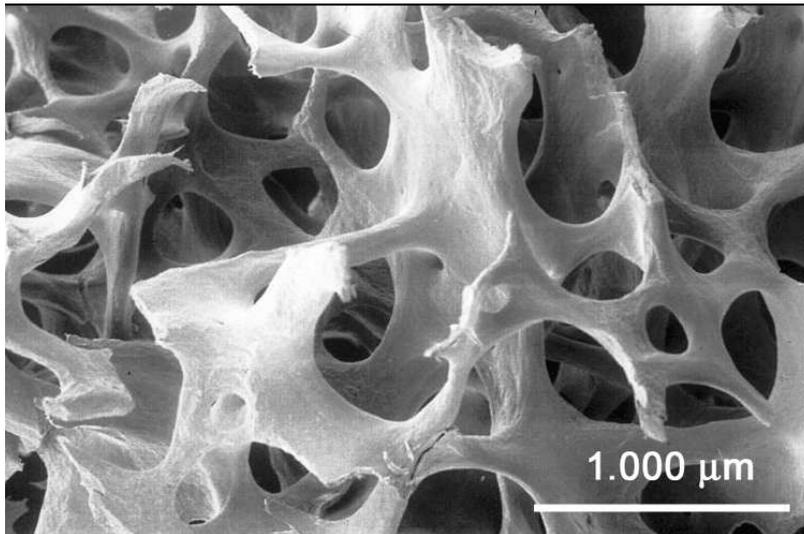


Abbildung 4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der verwendeten Leitschienenstruktur (Tutobone, Fa. Tutogen Medical), Bildquelle: Fa. Tutogen Medical

2.1.4.2 Besiedelung der Knochenleitschienen

Zur Besiedelung wurde das FBS von den vorinkubierten Leitschienen abgesaugt. Auf jede Leitschiene wurde eine Zellsuspension von 1×10^6 GFP-markierten hMSC in 600 μl Medium gegeben. Durch auf- und abpipettieren wurde die Zellsuspension neben dem Zylinder homogenisiert und wieder auf die Leitschiene gegeben. In den folgenden zwei Stunden wurde dieser Vorgang alle 20 Minuten wiederholt, davor die Leitschiene einmal gewendet. Zwischen den Arbeitsschritten wurde 48-well-Platte im Brutschrank gelagert. In der 3. und 4. Stunde wurde noch je einmal homogenisiert, anschließend wurde die Knochenleitschiene in eine neue Platte überführt und über Nacht im Brutschrank weiterinkubiert.

2.1.4.3 Bestimmung der Besiedlungseffizienz

Durch Auszählen der in der ersten 48-well-Platte verbliebenen und somit nicht an der Leitschiene adhären Zellen, konnte die Besiedlungseffizienz bestimmt werden. Dazu wurde zunächst das Medium aus der Vertiefung abgesaugt und gründlich mit 200 μl PBS gespült. Anschließend wurden 100 μl Trypsin/EDTA (1x) zugegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Trypsinat wurde in ein Eppendorfgefäß überführt, die Vertiefung nochmals mit 100 μl PBS gespült und die Spülflüssigkeit ebenfalls in das Gefäß gegeben. Das Eppendorfgefäß wurde bei 2000 U/min 3 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in 100 μl PBS resuspendiert und in der Neubaur-Zählkammer gezählt.

Durch Subtraktion der erhaltenen Zellzahl von den ursprünglich eingesetzten 1×10^6 Zellen, konnte nun die Anzahl der auf der Knochenleitschiene adhärenen Zellen bestimmt werden. Der Nachweis der Fluoreszenz der hMSC erfolgte im jeweiligen Zellkulturgefäß unter dem Fluoreszenzmikroskop. Der Vergleich zur Gesamtzellzahl erfolgte lichtmikroskopisch.

2.2 Material

2.2.1 Laborgeräte

<u>Gerät</u>	<u>Firma</u>
Abzug 2-454-FBND	Köttermann
Analysenwaage LC 621 P	Sartorius
Autoklav Varioklav 300	H+P Labortechnik
Brutschrank (+37°C, 5% CO ₂) IG 150	Jouan
DNA-Separations-Gelkammer	Peqlab Biotechnologie GmbH
Flüssigkeitsabsaugsystem	Roth
Fluoreszenzmikroskop 3X70	Olympus
Geltrocknungsrahmen	Roth
Kamera Sensicam QE	TCO Imaging
Kühl-Gefrierkombination (+4°C, -20°C)	Liebherr
Laborwaage Kern GJ	Kern
Mikroskop Diavert	Leitz
Mikrowelle	Siemens
Pipettierhilfe Pipetus akku	Hirschmann
PCR PTC-200	MJ-Research
Schüttler Unimax 1010 + Inkubator 1000	Heidolph
Sterilbank Antares 72	Steril S.p.a.
Sterilbank Hera safe 12/2	Haraeus instruments
Tiefkühlschrank (-86°C)	Jouan
UV-Lampe	Vilbert Lourmat
UV-Lampe BH2-RFL-T3	Olympus
Vertikal-Umluftarbeitsplatz- Personenschutz UVF II/73/32-630 B	BDK Luft- und Reinraumtechnik
Vortex-Schüttler	Heidolph
Wasserbad	Jouan
Wasserbad	GFL
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge BR 4	Jouan
Zentrifuge CT 422	Jouan

2.2.2 Labor-Hilfsmittel

Neubauer-Zählkammer	Brand
Mikroliterpipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson Pipetman

2.2.3 Materialien und Verbrauchsmaterialien

Einfrierröhrchen	Nalgene
Einmal – Skalpelle	Feather
Einmal – Spritzen (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Becton Dickinson
Eppendorf – Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf
Pasteurpipetten aus Glas	Volac
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf
Rundschale (10 cm)	Sarstedt
Zellkulturflaschen (T75, T25)	Nunc
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Serologische Pipetten (2,5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt

2.2.4 Substanzen allgemein

Aqua dest.	Noll
Ethanol 70% in Aqua dest	Klinikapotheke
Isopropanol	Klinikapotheke

2.2.5 Substanzen Klonierung

Ampicillin (stock 200 mg/ml)	Roth
Bacto™ Hefeextrakt	Becton Dickinson
Bacto™ Agar	Becton Dickinson
Bacto™ Trypton	Becton Dickinson
Clonase Puffer	Invitrogen

DNA-Gel-Extraktions-Kit (Quiaex II Gel Extraction kit)	Quiagen
DNA-Präparations-Kit (Qia Filter Plasmid Midi Kit + Quiagen Plasmid Mini kit)	Quiagen
DNA Marker (100 bp, 250 bp)	Invitrogen
EDTA	Sigma
Ethidiumbromid 10 mg/ml	Sigma
Gelpuffer Blue juice 10 x	Invitrogen
Glukose D+	Sigma
Glycerol	Sigma
Kanamycin (stock 50 mg/ml)	Sigma
KCl	Merck
LR Clonase Enzym Mix	Invitrogen
MgCl ₂	Merck
MgSO ₄	Sigma
NaCl zur Analyse	Merck
Plasmid peGFP-N3	Clontech
Plasmid pENTR 11	Invitrogen
Plasmid pLenti6/V5-Dest	Invitrogen
Proteinase K	Invitrogen
Puffer für Restriktionsenzyme B	Roche
Ligationsenzym (T4 Quick Ligase)	NEB
Ligationspuffer (Quick ligase)	NEB
Restriktionsenzym BamH1	Roche
Restriktionsenzym Not1	NEB
Seakern LE Agarose	Cambrex
Sequenzierungsfarbstoff (Bigdye terminator ready reaction mix)	Applied. Biosystems
Top 10 E. coli	Invitrogen
TrisCl	Sigma
Trisma base	Sigma

2.2.6 Substanzen Zellkultur

β-Glycerophosphat	Sigma
Blasticidin (5 mg/ml)	Invitrogen
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma
Dexamethason	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Fetales bovines Serum (FBS)	Sigma
Geneticin (50 mg/ml)	Gibco
Humane Fibrosarkomzellen (HT1080)	Invitrogen
Humane mesenchymale Stammzellen	Cambrex
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	Sigma
L-Glutamin (200 mM)	Gibco
Leitschiene (Tutobone Platte 75 x 25 x 1 mm)	Tutogen Medical
Lipofektamin 2000	Invitrogen
Methanol 100 %	Merck
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Gibco
PBS (10x), Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ frei	Merck
Penicillin (10000 U/ml)- Streptomycin (10000 µg/ml)	Gibco
Polybrene	Invitrogen
Pyrogallol-Lösung 1 %	Klinikapotheke
Silbernitrat 5 %	Roth
Sodiumhydroxid	Merck
Tryptanblau 0,5 %	Life Technologies
Trypsin 0,05 %/ EDTA 0,02 % (1x in PBS)	Life Technologies
ViraPower packaging mix (Plasmide pLP1, pLP2, pLP/VSVG in TE Puffer, ph 8,0)	Invitrogen
Zellen 293FT	Invitrogen
Zellkulturmedium (Dulbecco`s Modified Eagle Medium, high glucose; DMEM)	Gibco

Zellkulturmedium (OptiMEM)	Gibco
Zellkulturmedium (MSCGM	
hMSC Medium Bullet Kit)	Cambrex

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnis der Klonierung

Zur Beurteilung der exakten Sequenz wurde eine Sequenzierung des Plasmids pLenti-eGFP durchgeführt. Der Vergleich der erwarteten Basenfolge mit dem Ergebnis der Sequenzierung ergab eine 100 prozentige Übereinstimmung in allen untersuchten Teilstücken.

Abbildung 5: Ausschnitt aus der Basensequenz des Plasmids pLenti-eGFP. MSC: Sequenz einer multiple cloning site; eGFP: Sequenz des eGFP-Gens.

AGT TCC GCG TTA CAT AAC TTA CGG TAA ATG GCC CGC CTG GCT GAC CGC
TCA AGG CGC AAT GTA TTG AAT GCC ATT TAC CGG GCG GAC CGA CTG GCG
<.....CMV-Promotor.....

CCA ACG ACC CCC GCC CAT TGA CGT CAA TAA TGA CGT ATG TTC CCA TAG
GGT TGC TGG GGG CGG GTA ACT GCA GTT ATT ACT GCA TAC AAG GGT ATC
.....

TAA CGC CAA TAG GGA CTT TCC ATT GAC GTC AAT GGG TGG AGT ATT TAC
ATT GCG GTT ATC CCT GAA AGG TAA CTG CAG TTA CCC ACC TCA TAA ATG
.....

GGT AAA CTG CCC ACT TGG CAG TAC ATC AAG TGT ATC ATA TGC CAA GTA
CCA TTT GAC GGG TGA ACC GTC ATG TAG TTC ACA TAG TAT ACG GTT CAT
.....

CGC CCC CTA TTG ACG TCA ATG ACG GTA AAT GGC CCG CCT GGC ATT ATG
GCG GGG GAT AAC TGC AGT TAC TGC CAT TTA CCG GGC GGA CCG TAA TAC
.....

CCC AGT ACA TGA CCT TAT GGG ACT TTC CTA CTT GGC AGT ACA TCT ACG
GGG TCA TGT ACT GGA ATA CCC TGA AAG GAT GAA CCG TCA TGT AGA TGC
.....

TAT TAG TCA TCG CTA TTA CCA TGG TGA TGC GGT TTT GGC AGT ACA TCA
ATA ATC AGT AGC GAT AAT GGT ACC ACT ACG CCA AAA CCG TCA TGT AGT
.....

ATG GGC GTG GAT AGC GGT TTG ACT CAC GGG GAT TTC CAA GTC TCC ACC
TAC CCG CAC CTA TCG CCA AAC TGA GTG CCC CTA AAG GTT CAG AGG TGG
.....

CCA TTG ACG TCA ATG GGA GTT TGT TTT GGC ACC AAA ATC AAC GGG ACT
GGT AAC TGC AGT TAC CCT CAA ACA AAA CCG TGG TTT TAG TTG CCC TGA
.....

TTC CAA AAT GTC GTA ACA ACT CCG CCC CAT TGA CGC AAA TGG GCG GTA
AAG GTT TTA CAG CAT TGT TGA GGC GGG GTA ACT GCG TTT ACC CGC CAT

GGC GTG TAC GGT GGG AGG TCT ATA TAA GCA GAG CTC GTT TAG TGA ACC
CCG CAC ATG CCA CCC TCC AGA TAT ATT CGT CTC GAG CAA ATC ACT TGG

GTC AGA TCG CCT GGA GAC GCC ATC CAC GCT GTT TTG ACC TCC ATA GAA
CAG TCT AGC GGA CCT CTG CGG TAG GTG CGA CAA AAC TGG AGG TAT CTT

GAC ACC GAC TCT AGA GGA TCC ACT AGT CCA GTG TGG TGG
CTG TGG CTG AGA TCT CCT AGG TGA TCA GGT CAC ACC ACC

.....>

AAT TCT GCA GTC GAC GGT ACC GCG GGC CCG GGA TCC ATC GCC ACC ATG
TTA AGA CGT CAG CTG CCA TGG CGC CCG GGC CCT AGG TAG CGG TGG TAC
<.....MCS.....> <.....

GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC GGG GTG GTG CCC ATC CTG GTC
CAC TCG TTC CCG CTC CTC GAC AAG TGG CCC CAC CAC GGG TAG GAC CAG
.....eGFP.....

GAG CTG GAC GGC GAC GTA AAC GGC CAC AAG TTC AGC GTG TCC GGC GAG
CTC GAC CTG CCG CTG CAT TTG CCG GTG TTC AAG TCG CAC AGG CCG CTC

GGC GAG GGC GAT GCC ACC TAC GGC AAG CTG ACC CTG AAG TTC ATC TGC
CCG CTC CCG CTA CGG TGG ATG CCG TTC GAC TGG GAC TTC AAG TAG ACG

ACC ACC GGC AAG CTG CCC GTG CCC TGG CCC ACC CTC GTG ACC ACC CTG
TGG TGG CCG TTC GAC GGG CAC GGG ACC GGG TGG GAG CAC TGG TGG GAC

ACC TAC GGC GTG CAG TGC TTC AGC CGC TAC CCC GAC CAC CAC ATG AAG
TGG ATG CCG CAC GTC ACG AAG TCG GCG ATG GGG CTG GTG GTG TAC TTC

CAG CAC GAC TTC TTC AAG TCC GCC ATG CCC GAA GGC TAC GTC CAG GAG
GTC GTG CTG AAG AAG TTC AGG CGG TAC GGG CTT CCG ATG CAG GTC CTC

CGC ACC ATC TTC TTC AAG GAC GAC GGC AAC TAC AAG ACC CGC GCC GAG
GCG TGG TAG AAG AAG TTC CTC CTC CCG TTG ATG TTC TGG GCG CGG CTC

GTG AAG TTC GAG GGC GAC ACC CTG GTG AAC CGC ATC GAG CTG AAG GGC
CAC TTC AAG CTC CCG CTG TGG GAC CAC TTG GCG TAG CTC GAC TTC CCG

ATC GAC TTC AAG GAG GAC GGC AAC ATC CTG GGG CAC AAG CTG GAG TAC
TAG CTG AAG TTC CTC CTG CCG TTG TAG GAC CCC GTG TTC GAC CTC ATG

.....

AAC TAC AAC AGC CAC AAC GTC TAT ATC ATG GCC GAC AAG CAG AAG AAC
TTG ATG TTG TCG GTG TTG CAG ATA TAG TAC CGG CTG TTC GTC TTC TTG

.....

GGC ATC AAG GTG AAC TTC AAG ATC CGC CAC AAC ATC GAG GAC GGC AGC
CCG TAG TTC CAC TTG AAG TTC TAG GCG GTG TTG TAG CTC CTG CCG TCG

.....

GTG CAG CTC GCC GAC CAC TAC CAG CAG AAC ACC CCC ATC GGC GAC GGC
CAC GTC GAG CGG CTG GTG ATG GTC GTC TTG TGG GGG TAG CCG CTG CCG

.....

CCC GTG CTG CTG CCC GAC AAC CAC TAC CTG AGC ACC CAG TCC GCC CTG
GGG CAC GAC GAC GGG CTG TTG GTG ATG GAC TCG TGG GTC AGG CGG GAC

.....

AGC AAA GAC CCC AAC GAG AAG CGC GAT CAC ATG GTC CTG CTG GAG TTC
TCG TTT CTG GGG TTG CTC TTC GCG CTA GTG TAC CAG GAC GAC CTC AAG

.....

GTG ACC GCC GCC GGG ATC ACT CTC GGC ATG GAC GAG CTG TAC AAG TAA
CAC TGG CGG CGG CCC TAG TGA GAG CCG TAC CTG CTC GAC ATG TTC ATT

.....>

3.2 Ergebnis der Virusherstellung

Die erfolgreiche Transfektion des Plasmids pLenti-eGFP in die 293FT-Zellen wurde indirekt über den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der transienten eGFP-Expression in den 293FT-Zellen nachgewiesen. Des Weiteren gab der Nachweis einer Synzytienbildung zwischen den Zellen unter dem Lichtmikroskop einen weiteren Hinweis auf die erfolgte Transfektion.

24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion wurde die eGFP Expression der 293FT Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen.

Abbildung 6: lichtmikroskopische Darstellung der 293FT-Zellen nach Transfektion mit pLenti-eGFP

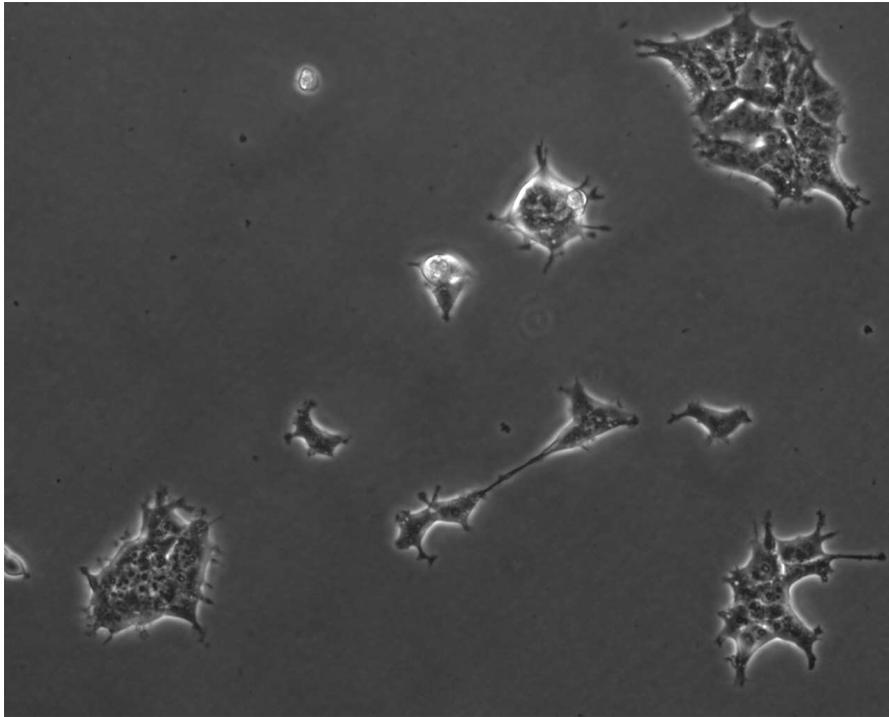


Abbildung 7: fluoreszenzmikroskopische Darstellung der 293FT Zellen nach Transfektion mit pLenti-eGFP

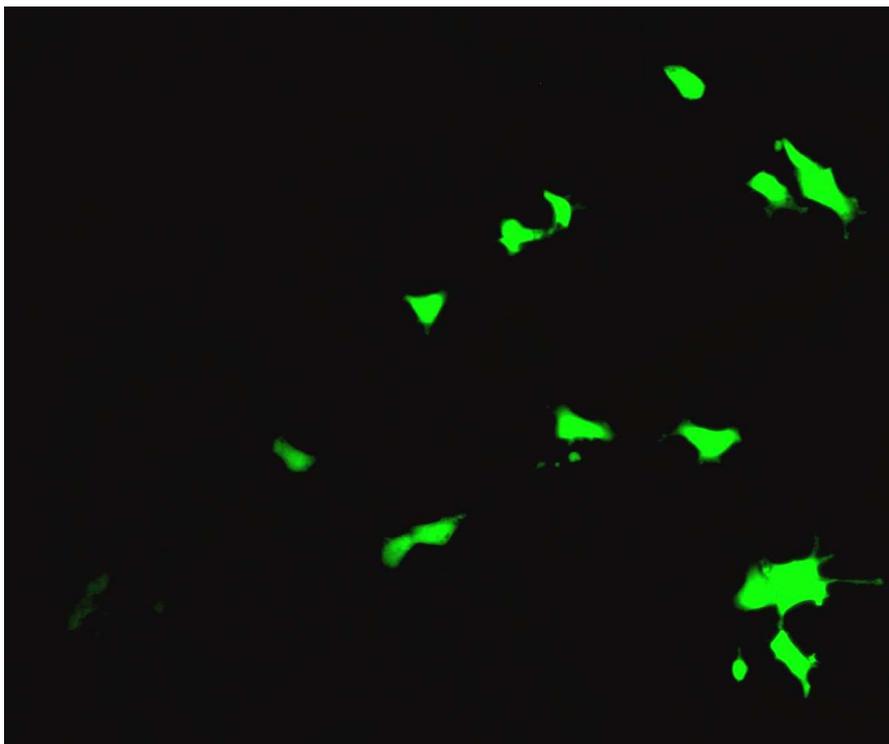


Abbildung 8: Überlagerungsbild der lichtmikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der 293FT Zellen nach Transfektion mit pLenti-eGFP

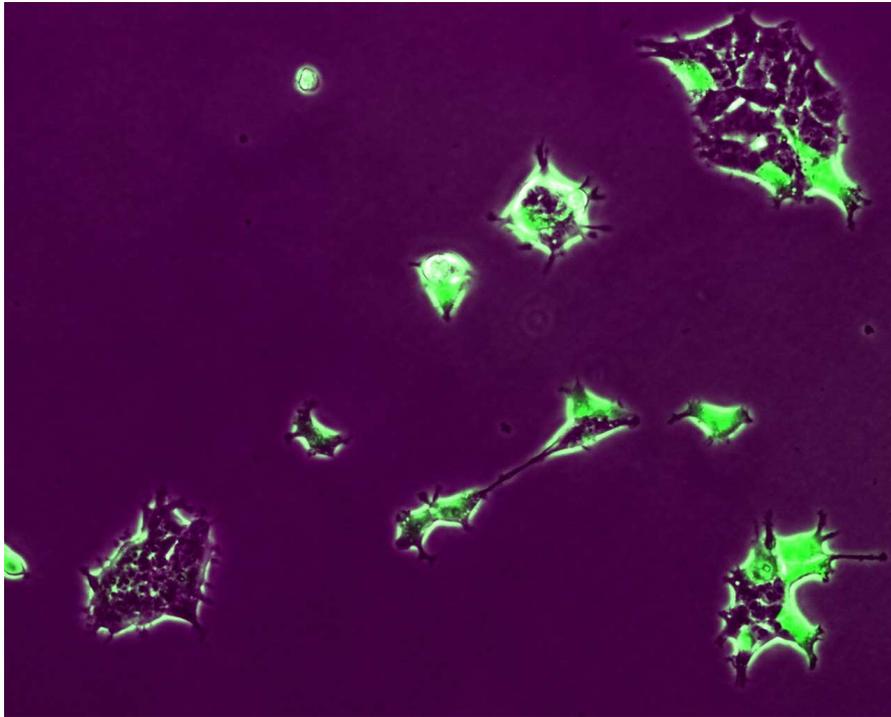
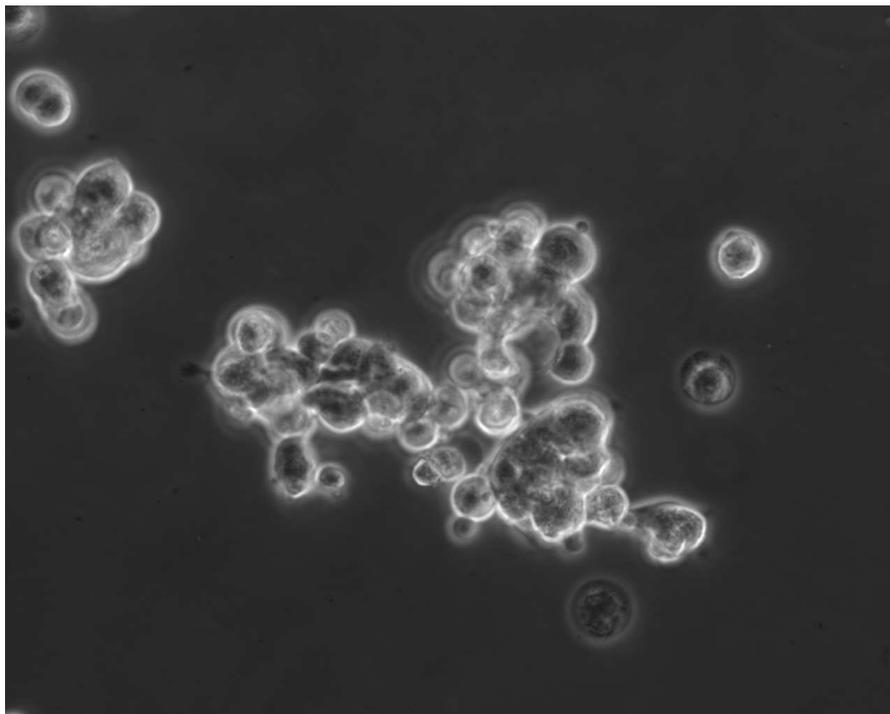


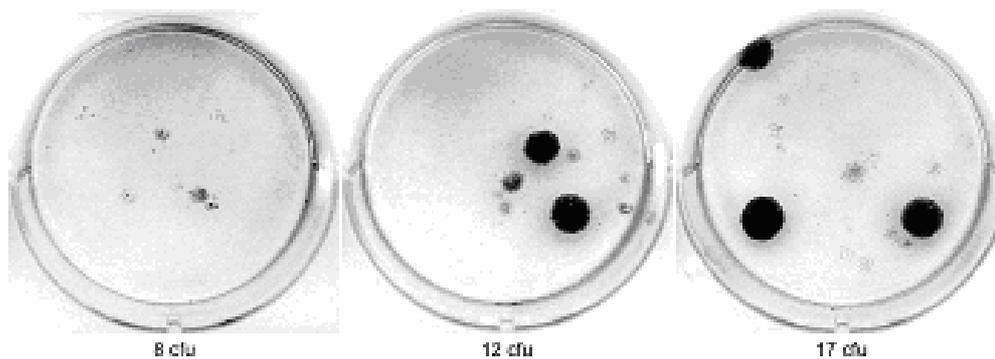
Abbildung 9: Synzytienbildung der 293FT Zellen unter dem Lichtmikroskop nach Transfektion mit pLenti-eGFP während der Virusherstellung



3.3 Bestimmung der Virustiter

Zunächst wurde der lentivirale Titer in der HT1080 Zelllinie bestimmt. Hiermit konnte ein für lentivirale Präparationen hoher Titer von $2,47 \times 10^5$ CFU/ml erreicht werden.

Abbildung 10: Bestimmung der Virustiter von pLenti-eGFP in HT1080 Zellen. Titer $2,47 \times 10^5$ CFU/ml.



3.4 Ergebnisse zum lentiviralen Gentransfer in hMSCs

Die Beurteilung der erfolgreichen Transduktion erfolgte 24, 36 und 72 Stunden nach Virusexposition unter dem Fluoreszenzmikroskop, durch Nachweis der eGFP Expression in hMSC.

Abbildung 11: lichtmikroskopische Darstellung der hMSC nach Transduktion mit dem eGFP-Lentivirus und Selektion mit Blastizidin

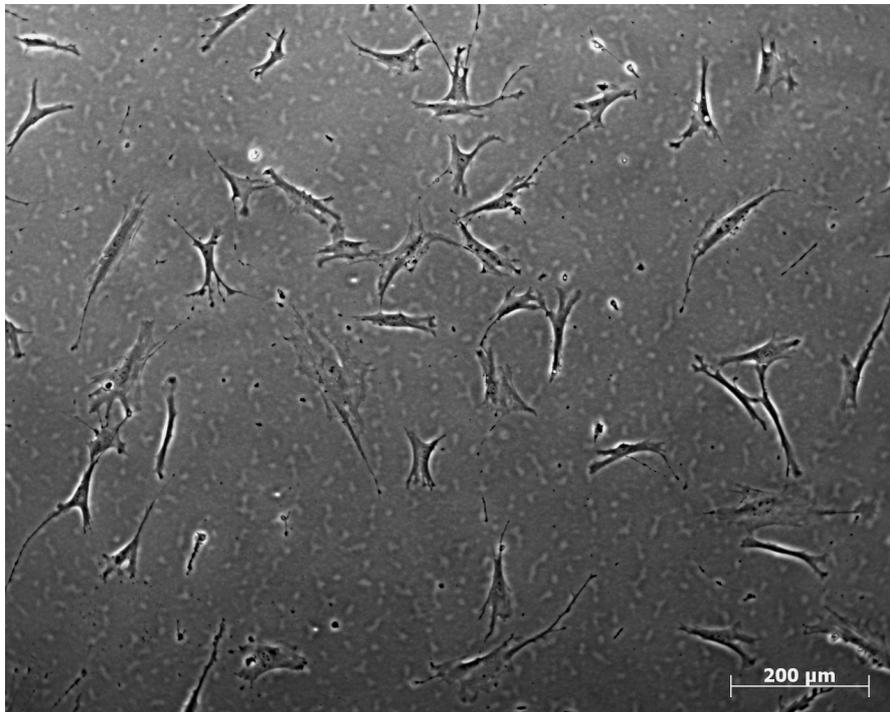


Abbildung 12: fluoreszenzmikroskopische Darstellung der hMSC nach Transduktion mit dem eGFP-Lentivirus und Selektion mit Blastizidin

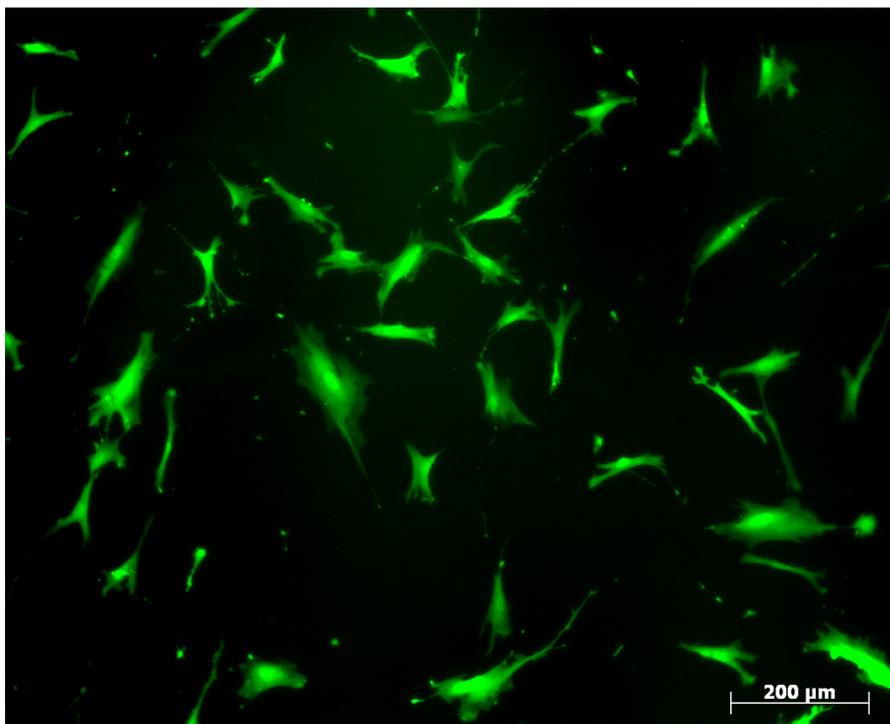


Abbildung 13: lichtmikroskopische Darstellung von eGFP-exprimierenden humanen mesenchymalen Stammzellen. eGFP wurde mit Hilfe des lentiviralen Gentransfers in die Zellen eingeschleust.

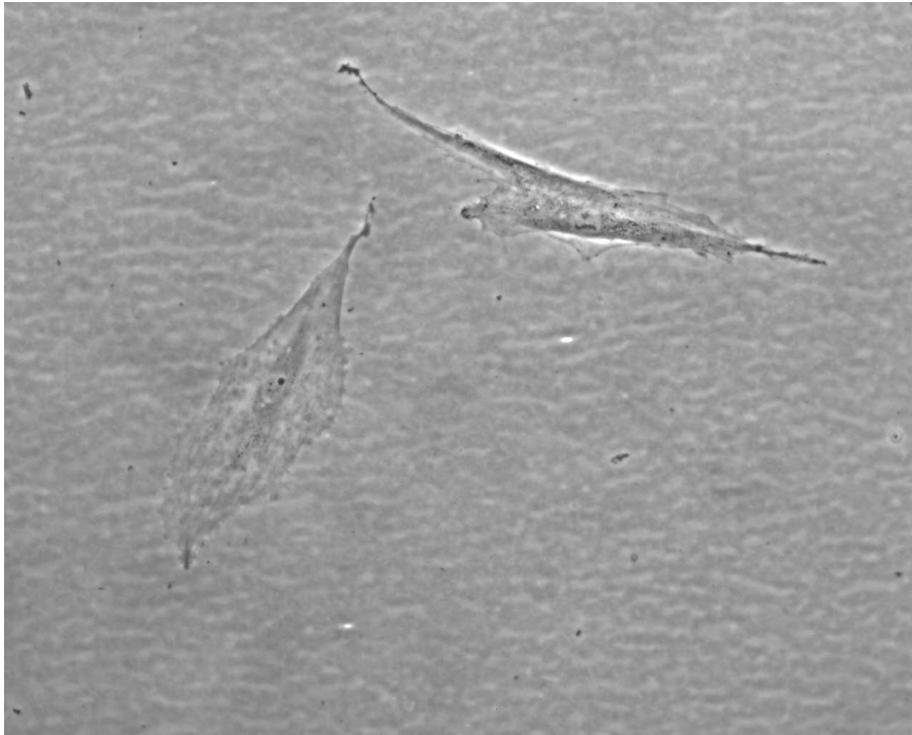


Abbildung 14: fluoreszenzmikroskopische Darstellung der hMSC nach Transduktion mit dem eGFP-Lentivirus

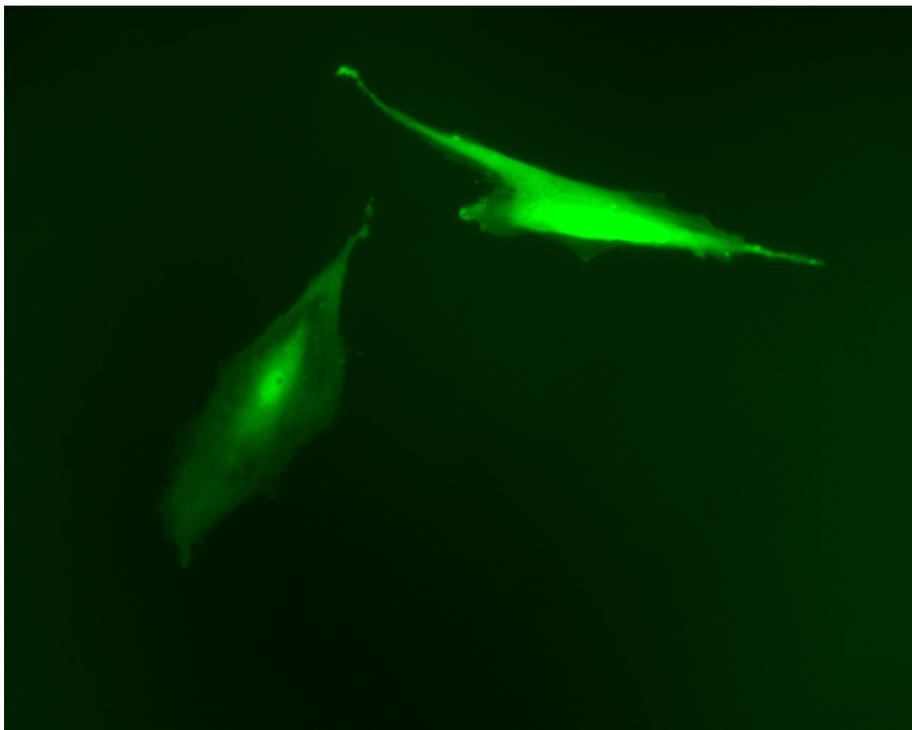


Abbildung 15: Überlagerungsbild der lichtmikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der hMSC nach Transduktion mit dem eGFP-Lentivirus

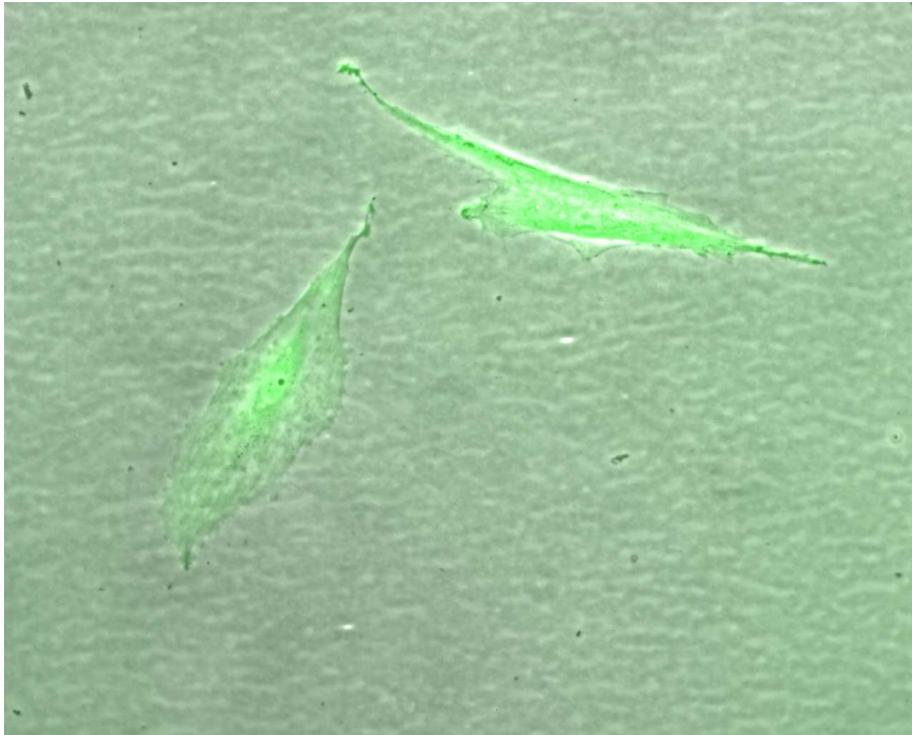
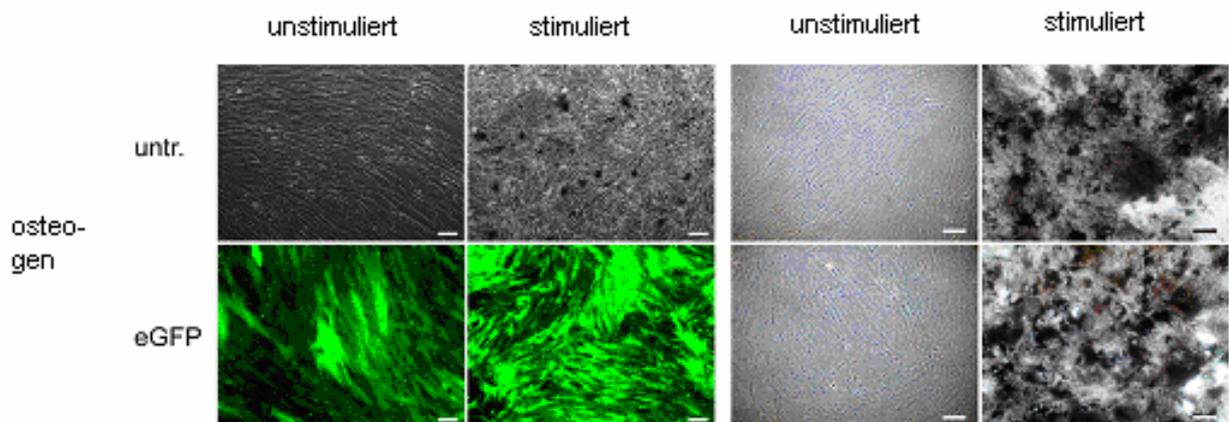


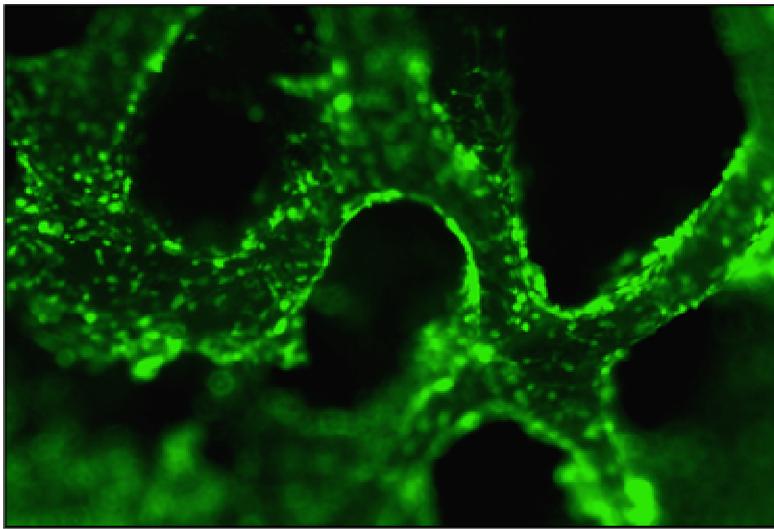
Abbildung 16: Die lentivirale Transduktion hatte keinen Einfluss auf das osteogene Differenzierungspotential der Zellen. Obere Reihe zeigt nicht transduzierte Zellen, die untere Reihe mit eGFP transduzierte Zellen. Rechte Spalte von Kossa Färbung



3.5 Ergebnis der Leitschienenbesiedelung

Die *in vitro* Besiedelung der Leitschienen erfolgte mit einer Effizienz von 60 – 80%. Die eGFP-exprimierenden Stammzellen konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop auf der Knochenleitschiene nachgewiesen werden.

Abbildung 17: fluoreszenzmikroskopische Darstellung der mit eGFP-exprimierenden Stammzellen besiedelten Knochenleitschiene



4 Diskussion

4.1 Stammzellmarker und Stammzellmarkierung

Bei der Besiedelung von Leitschienen, aber auch in vielen anderen therapeutischen Anwendungen der hMSC erscheint es notwendig den Verbleib der transplantierten Zellen nachzuweisen, sowie den Zeitraum ihres Überlebens zu bestimmen. Dies gestaltet sich insofern schwierig, da kein spezifischer humaner mesenchymaler Stammzellmarker bekannt ist (Foster et al. 2005). Auf der Oberfläche der hMSC lassen sich eine Vielzahl von Oberflächenmolekülen nachweisen. Unter den insgesamt 463 Proteinen befinden sich 148 integrale oder verankerte Membranproteine, sowie 159 membranassoziierte Proteine (Foster et al. 2005). Des Weiteren wurden 29 Integrine und Zelladhäsionsmoleküle, 20 Rezeptoren und 18 Ras verwandte kleine GTPasen nachgewiesen (Foster et al. 2005). Keiner dieser Oberflächenmarker zeigt für sich allein genommen eine Spezifität für mesenchymale Stammzellen. Vielmehr ist die Kombination verschiedener Marker charakteristisch für hMSCs. Welche Kombination von Markern charakteristisch für mesenchymale Stammzellen ist, wird aber weiter intensiv in der Literatur diskutiert. In dieser Studie wurden die in der Literatur allgemein anerkannten Marker CD166, CD29, CD105 und CD 44 verwendet, wobei die Stammzellen die hämatopoetischen Marker CD34, CD14 and CD45 nicht exprimieren durften. So konnten die verwendeten hMSCs vor der lentiviralen Transduktion in vitro ausreichend charakterisiert werden. Allerdings ist der kombinierte Nachweis dieser Oberflächenmarker auf hMSCs für die Untersuchung differenzierter oder transplantierte Zellen wenig geeignet, da sich, das Muster der Oberflächenmarker mit der Differenzierung dieser Zellen verändert und somit der Verbleib transplantierte hMSC langfristig nicht beurteilt werden kann.

Des Weiteren muss bei der Bestimmung von Oberflächenmarkern berücksichtigt werden, dass sich je nach Herkunft der hMSC aus Knochenmark des Beckenkamms (Risbud et al. 2006), der Wirbelkörper (Risbud et al. 2006), aus Fettgewebe, Nabelschnurblut (Lu et al. 2005, Wang et al. 2005), peripherem Blut (Cao et al. 2005), Plazenta (Zhang et al. 2004), Peridontium (Trubiani et al. 2005, Pierdomenico et al. 2005) oder Synovium (Fickert et al. 2003, Gimeno et al. 2005) geringe Unterschiede im Muster der Oberflächenproteine ergeben, so dass nur unter Schwierigkeiten ein einheitliches Identifizierungsschema festgelegt werden kann. Auch ergibt sich durch den Nachweis der Oberflächenproteine kaum eine Möglichkeit zwischen transplantierten hMSC und eigenen Stammzellen des Empfängers zu unterscheiden.

Tabelle 8: Auswahl positiver und negativer Oberflächenmarker der hMSC

Oberflächenprotein	Synonym	Markierter Zelltyp	Quellen
<i>positiv</i>			
CD 166		multipotent	Xu et al. 2005, Lu et al. 2005, Mareschi et al. 2005, Foster et al. 2005, Cao et al. 2005, Wang et al. 2005, Trubiani et al. 2005, Zhang et al. 2004, Guo et al. 2001, Fickert et al. 2003, Risbud et al. 2006, Gimeno et al. 2005, Pierdomenico et al. 2005
CD 105	SH 2		Xu et al. 2005, Lu et al. 2005, Mareschi et al. 2005, Foster et al. 2005, Cao et al. 2005, Wang et al. 2005, Trubiani et al. 2005, Zhang et al. 2004, Risbud et al. 2006, Pierdomenico et al. 2005
CD 44		MSC	Xu et al. 2005, Lu et al. 2005, Mareschi et al. 2005, Foster et al. 2005, Cao et al. 2005, Trubiani et al. 2005, Zhang et al. 2004, Guo et al.

			2001, Fickert et al. 2003, Risbud et al. 2006, Gimeno et al. 2005
CD 73	SH 4	MSC	Xu et al. 2005, Wang et al. 2005, Zhang et al. 2004, Gimeno et al. 2005, Pierdomenico et al. 2005
CD 90	Thy 1	MSC	Lu et al. 2005, Mareschi et al. 2005, Foster et al. 2005, Wang et al. 2005, Trubiani et al. 2005, Fickert et al. 2003, Gimeno et al. 2005
CD 29		MSC	Lu et al. 2005, Mareschi et al. 2005, Foster et al. 2005, Wang et al. 2005, Trubiani et al. 2005, Zhang et al. 2004, Guo et al. 2001, Gimeno et al. 2005, Pierdomenico et al. 2005
CD 71	SH 3		Foster et al. 2005, Wang et al. 2005, Pierdomenico et al. 2005
CD 63	HOP 26		Foster et al. 2005, Risbud et al. 2006
CD 54			Cao et al. 2005,

			Fickert et al. 2003
CD 13			Wang et al. 2005, Trubiani et al. 2005
CD 106			Mareschi et al. 2005
CD 95			Lu et al. 2005
CD 9			Fickert et al. 2003
CD 49a			Risbud et al. 2006
CD 117	c-kit	multipotent	Gimeno et al. 2005
STRO-1		multipotent	Gimeno et al. 2005
PAX-7		multipotent	Gimeno et al. 2005
HLA-ABC			Zhang et al. 2004
MHC-Klasse (nicht II)			Lu et al. 2005
<i>negativ</i>			
CD 34		hämatopoetisch	Xu et al. 2005, Lu et al. 2005, Cao et al. 2005, Wang et al. 2005, Zhang et al. 2004, Guo et al. 2001, Gimeno et al. 2005
CD 45		hämatopoetisch	Xu et al. 2005, Lu et al. 2005, Cao et al. 2005, Wang et al. 2005, Zhang et al. 2004, Guo et al. 2001, Gimeno et al. 2005
CD 14			Lu et al. 2005, Cao et al. 2005, Wang et al. 2005
CD 40			Lu et al. 2005
CD 80			Lu et al. 2005
CD 86			Lu et al. 2005

CD 152			Lu et al. 2005
CD 11b		hämatopoetisch	Gimeno et al. 2005
HLA-DR			Zhang et al. 2004, Guo et al. 2001
MHC Klasse II			Lu et al. 2005

Eine weitere wesentliche Eigenschaft von mesenchymalen Stammzellen ist deren Fähigkeit sich adipogen, chondrogen und osteogen differenzieren zu lassen. Neben der Bestimmung der Oberflächenmarker ist die Differenzierungsfähigkeit wesentliche Voraussetzung zur Identifizierung von mesenchymalen Stammzellen. Für die in dieser Studie verwendeten hMSC wurden zunächst nicht nur die charakteristischen Oberflächenmarker, sondern auch deren adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierungsfähigkeit untersucht. Das Differenzierungspotential der hMSCs kann in vitro durch Zugabe von induzierendem Medium problemlos untersucht werden, ist aber für die Untersuchung von in vivo transplantierten Zellen nicht geeignet.

Andere Arbeitsgruppen haben versucht aufgrund von zellmorphologischen Analysen mesenchymale Stammzellen zu identifizieren. Obwohl hMSCs durch ihre lange, fusiforme und fibroblastenähnliche Form eine relativ typische Morphologie haben (Xu et al. 2005), ist die Identifizierung von hMSC allein durch die Zellmorphologie nicht möglich. Da hMSCs ihre Form und Größe durch Differenzierung verändern, können die Zellen morphometrisch in vivo nicht nachgewiesen werden.

Es konnte durch Kokultivierung PHA-stimulierter allogener Zellen gezeigt werden, dass hMSCs eine immunsuppressive Wirkung haben (Pierdomenico et al. 2005). Darüber hinaus zeigen hMSCs eine hohe Proliferationskapazität, mit allerdings hoher altersabhängiger Variabilität und Unterschieden je nach Herkunft der hMSCs (Mareschi et al. 2005, Pierdomenico et al. 2005). Aufgrund fehlender Spezifität ist eine Identifizierung mesenchymaler Stammzellen anhand der immunsupprimierenden Eigenschaft oder der Proliferationskinetik in vitro und in vivo allerdings nicht möglich.

Eine weitere unspezifische Methode ist der zytochemische positive Nachweis von acid alpha naphthyl acetate esterase (ANAE), Glykogen, Stammzellfaktor (SCF), Interleukin 6 oder TNF- α im Überstand (Wang et al. 2005) sowie der negative Befund bei acid phosphatase (ACP) oder der Sudan black Reaktion (Guo et al. 2001).

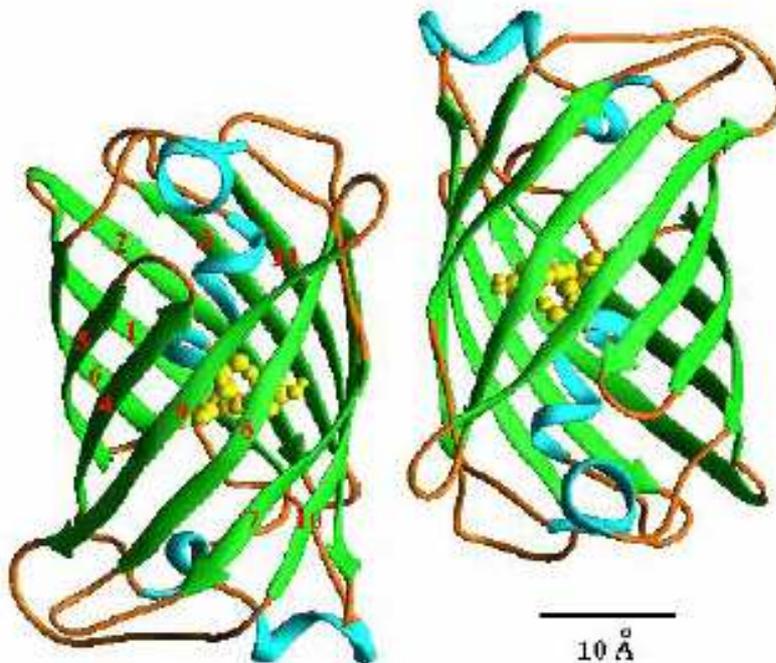
Monoklonale Antikörper zur Identifizierung osteogen differenzierender Zellen (AML-3, SB-10, SB-20) (Devlin et al. 2002) sind äußerst kostenintensiv und bieten keinen sicheren Nachweis unerwünscht in andere Richtungen differenzierender Zellen. Auch spendereigene Zellen können durch sie nicht von transplantierten Stammzellen unterschieden werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass keine der oben beschriebenen Methoden alleine dazu geeignet ist, mesenchymale Stammzellen zu identifizieren. Als Goldstandard für die in vitro Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen gilt heute in der Literatur die Kombination von Oberflächenmarkern mit dem Nachweis der Differenzierungsfähigkeit. Für die in vivo Anwendung sind diese Methoden allerdings aus oben genannten Gründen nicht geeignet, so dass die zuvor in vitro charakterisierten hMSCs zunächst markiert werden müssen, um deren Verbleib weiter verfolgen zu können. Eine Möglichkeit ist die genetische Markierung dieser Zellen. Hierbei muss der Marker jedoch mehrere Kriterien erfüllen:

1. einfach zu detektieren sein
2. über längere Zeit stabil exprimiert werden
3. durch die Zellteilung nicht verdünnt werden
4. in unmarkierten Zellen nicht vorhanden sein
5. keinen Einfluss auf die Zellaktivitäten haben (Xia et al. 2005, Xu et al. 2005)
6. nach Differenzierung noch nachweisbar sein

Eine Möglichkeit bietet die Markierung der Zellen mit dem lacZ-Gen, dessen Produkt die β -Galaktosidase ist (Xu et al. 2005). Durch dieses Enzym erhalten die markierten Zellen die Fähigkeit ein farbloses Substrat X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid) zu spalten und dadurch das tiefblaue Produkt 5-Brom-4-Chlor-Indigo zu bilden (Kabisch 2001). Für die Detektierung der β -Gal-Expression ist jedoch eine vorhergehende Fixierung und Färbung notwendig. Eine Färbung in lebenden Zellen kann nicht durchgeführt werden. Eine Alternative bietet die genetische Markierung von Zellen mit Genen für biolumineszierende Enzyme wie Luziferase. Luziferase, zuerst nachgewiesen in Organismen wie Renilla und Glühwürmchen, ist in der Lage in Anwesenheit des Substrates Luziferin und Sauerstoff Photonen zu emittieren (Negrin et al. 2006, Greer III et al. 2002). Der Nachweis Luziferase-exprimierender und damit leuchtender Zellen kann in vivo nach Injektion des Substrates mit hochsensitiven CCD-Kameras erfolgen (Contag et al. 2002, Negrin et al. 2006). Luziferase bietet somit eine nichtinvasive Methode der Detektion markierter Zellen in intakten, lebenden Zellen oder Organismen (Contag et al. 2002), ohne eine externe Lichtquelle zur Lumineszenzanregung zu benötigen (Contag et al. 2002).

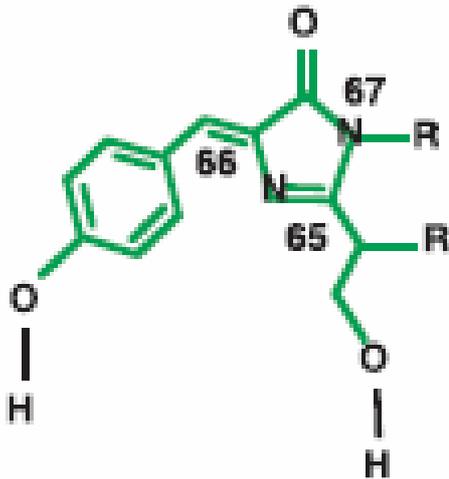
In der vorliegenden Arbeit wurde enhanced green fluorescent protein (eGFP) als genetischer Zellmarker verwendet. Der Wildtyp des Proteins wurde ursprünglich aus der Qualle *Aequorea Victoria* gewonnen, kommt jedoch auch in verschiedenen Coelenteraten vor (u.a. *Obelia*, *Renilla*, *Phialidium*) (Tsien 1998). Am Biolumineszenzprozess der Qualle *Aequorea Victoria* sind zwei verschiedene Proteine beteiligt, GFP und Aequorin. Aequorin ist ein Komplex, der aus dem Apoprotein Coelenterazin und Sauerstoff besteht. Es kann durch Calciumionen aktiviert werden, dabei wird Coelenterazin zu Coelenteramid oxidiert. Bei der Rückkehr in den Grundzustand wird blaues Licht emittiert, oder, in Kombination mit GFP, grüne Fluoreszenz (Castro et al. 1998). Erst später wurde festgestellt, dass GFP auch ohne weitere Hilfsstoffe mit blauem Licht (395 nm, 475 nm) zur grünen Fluoreszenzemission (510 nm) angeregt werden kann (Reichel et al. 1996). Durch seine äußerst kompakte Tertiärstruktur besitzt GFP eine hohe Stabilität gegenüber den unterschiedlichsten chemischen und physikalischen Einflüssen (Jatsch 2001). Das Protein liegt in einer Fassetstruktur vor, 11 β -Stränge sind um einen Molekulkern, bestehend aus einer α -Helix die das Chromophor trägt, angeordnet (Tsien 1998, Lippincott-Schwartz et al. 2003).

Abbildung 18: Tertiärstruktur des GFP (Yang et al. 1996)



Das Chromophor besteht aus 4-p-hydroxy-benzylidenimidazolin-5 und ist ausschlaggebend für die Fluoreszenz (Tsien 1998).

Abbildung 19: Chemische Struktur des Chromophor (Lippincott-Schwartz et al. 2003)



Im letzten Schritt der Chromophorherstellung entsteht Wasserstoffperoxyd, ein starkes Zellgift (Tsien 1998), weshalb GFP in sehr hohen Dosen zelltoxisch ist, in vielen klinischen Versuchen mit GFP wurde jedoch keine Toxizität nachgewiesen. GFP kann sowohl als Monomer, als auch als Dimer vorliegen (Tsien 1998). Aufgrund von unterschiedlichen Komponenten im Chromophor können sieben Klassen unterschieden werden, jedoch sind zahlreiche Mutationen bekannt.

Tabelle 9: GFP-Klassen in Abhängigkeit unterschiedlicher Chromophor-Komponenten
(Tsien 1998)

GFP-Klasse	Chromophor
Klasse 1	Wild-type mixture (neutrales Phenol und anionisches Phenolat)
Klasse 2	Phenolat-Anion (eGFP)
Klasse 3	Neutrales Phenol
Klasse 4	Phenolat-Anion mit π -Elektronensystem (gelb fluoreszierende Proteine)
Klasse 5	Indol (cyan fluoreszierende Proteine)
Klasse 6	Imidazol (blau fluoreszierende Proteine)
Klasse 7	Phenyl

Für seine Biosynthese benötigt GFP keine speziesspezifischen Substrate, weshalb es in den verschiedensten heterologen Systemen exprimierbar ist (Jatsch 2001). Die Detektion ist denkbar einfach, ohne vorherige Fixierung der Zellen oder Substratzugabe (Reichel et al. 1996, Jatsch 2001). Da eGFP viele Vorteile in sich vereint, scheint es, innerhalb einer nichttoxischen Dosierung, der ideale Marker zur genetischen Markierung von hMSC zur Besiedelung einer Leitschiene zu sein. Durch die in dieser Arbeit etablierte Methode der genetischen Markierung humaner mesenchymaler Stammzellen hat man erstmals die Möglichkeit diese Zellen sowohl *in vitro* auch *in vivo* weiter zu verfolgen. Mit diesen Zellen kann nicht nur der Verbleib der hMSC in tissue-engineerten Konstrukten und im gesamten Organismus untersucht werden, sondern auch deren potentielle Beteiligung am Knochenaufbau nach Differenzierung geklärt werden.

4.2 Diskussion der verwendeten Zellen

hMSC werden zumeist aus dem Knochenmark des Beckenkamms gewonnen (Xu et al. 2005, Guo et al. 2001, Pittenger et al. 1999, Yoo et al. 1998, Lee et al. 2003). Da jedoch eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden zur Verfügung steht und sich noch kein standardisiertes Verfahren durchgesetzt hat, ist es oftmals schwierig die Ergebnisse unterschiedlicher Forschungsgruppen zu vergleichen (Pautke 2004, Stengele 2004). Das Knochenmark des Beckenkamms wird zumeist mittels Punktion und Aspiration von ungefähr 10 ml in eine

heparinbenetzte Spritze gewonnen. Das Punktat enthält ein heterogenes Zellgemisch, bestehend aus Fibroblasten, hMSC, Osteoblasten, Endothelzellen und Erythrozyten (Pautke 2004). Anschließend werden die aspirierten Zellen entweder direkt, nach Dichtegradientenfraktionierung (ca. 6 min. bei 600 g) oder Percoll-Gradienten-Zentrifugation (Lee et al. 2003) in geeignetem Medium mit einem Zusatz von fetalem bovines Serum (FBS) kultiviert (Pittenger et al. 1999, Yoo et al. 1998, Lee et al. 2003). Teilweise wird vorher noch eine Lyse der Erythrozyten durchgeführt (Lee et al. 2003). Durch Mediumwechsel werden während der Kultivierung hämatopoetische Stammzellen und andere nicht adhärenente Zellen entfernt (Pittenger et al. 1999). Die adhärenenten hMSC können aufgrund ihrer Morphologie oder Oberflächenmarker identifiziert und selektioniert werden (Pittenger et al. 1999). Obwohl berichtet wurde, dass sich kein Unterschied im Differenzierungspotential der hMSC ergibt, je nachdem ob sie durch Percoll-Gradienten-Zentrifugation oder alleinige Zentrifugation für 6 min. bei 600 g gewonnen wurden (Lee et al. 2003), steht doch ein endgültiger Beweis der Vergleichbarkeit unterschiedlich gewonnener Zellen noch aus. Es scheint durchaus Hinweise darauf zu geben, dass hMSC des Knochenmarks sowohl heterogen in der Größe als auch im Stadium der Differenzierung sind (Lee et al. 2003) und damit durch minimale Abweichungen in der Zentrifugation unterschiedliche Zellen erhalten werden. Daher wurden bei der vorliegenden Arbeit kommerziell erworbene hMSC verwendet, die durch ein etabliertes und standardisiertes Verfahren einen hohen Anteil an hMSC enthalten. Die hMSC der Firma Cambrex werden durch Durchflusszytometrie positiv für CD105, CD166, CD29, CD44 und negativ für CD14, CD34 sowie CD45 getestet. Außerdem wird die osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierung nachgewiesen.

4.3 Diskussion der verwendeten Leitschiene

Für das Tissue Engineering von Knochenersatz ist die Struktur der verwendeten Leitschiene essentiell. Das ideale Material sollte in Struktur und Form dem zu ersetzenden Knochen angepasst sein, mechanisch auf Druck-, Biege- und Scherkräfte belastbar und durch Zellbesiedelung und langsame Degradation, mit letztlich möglichst vollständiger Resorption, in die Knochen- und Weichteilumgebung gut integrierbar sein (Skodacek 2005, Vunjak-Novakovic et al. 2005). Des Weiteren sollte das Material möglichst selbst osteoinduktive Eigenschaften besitzen (Arinzeh et al. 2005), keine Immun- oder Entzündungsreaktion auslösen (Mastrogiacomo et al. 2005) sowie durchlässig für vaskuläre Invasion sein (Mastrogiacomo et al. 2005). Eine Möglichkeit zur Erstellung der optimalen, dem jeweiligen

Defekt entsprechenden Form, bietet das Rapid-Prototyping-Verfahren, bei dem aus Schichtaufnahmen des Defekts durch ein Bildverarbeitungsprogramm am Computer ein dreidimensionales Modell generiert wird (CAD-Daten). Das Programm zerlegt für den Produktionsprozess die dreidimensionalen geometrischen Daten wieder in dünne Schichten, aus denen anschließend das individuell maßgeschneiderte Modell Schicht für Schicht aufgebaut werden kann (Zeilhofer 2005). Dieses Verfahren stellt jedoch hohe Anforderungen an die Materialeigenschaften.

Am häufigsten verwendet werden derzeit Kalziumphosphatkeramiken, mit der Grundsubstanz Hydroxylapatit (Arinzeh et al. 2005, Mastrogiacomo et al. 2005, Chowdhury et al. 2005, Chen et al. 2005), einer anorganischen Komplexverbindung, in der ein Ca^{2+} -Ion von drei neutralen tertiären Calciumphosphatmolekülen umgeben ist. Die Substanz bildet ein hexagonales Kristallgitter und ist ein Hauptbestandteil von Knochen und Zähnen (Pschyrembel, 1998). Hydroxylapatit löst weder Immun- noch Entzündungsreaktionen aus, wird jedoch innerhalb von fünf Jahren nicht resorbiert (Mastrogiacomo et al. 2005).

Hydroxylapatit wird oft in Kombination mit beta-Tricalciumphosphat angewendet (Arinzeh et al. 2005, Mastrogiacomo et al. 2005, Chowdhury et al. 2005), einem Calcium- und Phosphatdonor, der zu 100% abbaubar ist (Arinzeh et al. 2005). Auch eine Kombination mit Titan, zur Erhöhung der Stabilität, ist möglich (Chen et al. 2005).

Eine Alternative zu Kalziumphosphatkeramiken stellen synthetische Polymere dar. Polylactide (PLA) wie Poly(epsilon-caprolactone) (PCL), Polyglykolsäuren (PGA) wie poly(ethylene-glycol) (PEG) oder deren Kombination als Copolymer Poly-D,L-lactid-Coglycolid (PLGA) sind Gegenstand aktueller Studien (Huang et al. 2004, Wang et al. 2003). Um die Vorteile hoher Stabilität und Osteoinduktivität mit dem Vorteil vollständiger biologischer Abbaubarkeit zu verbinden, und den Nachteil hoher Brüchigkeit und eingeschränkter Formbarkeit reiner Kalziumphosphatkeramiken zu überwinden (Kim et al. 2006) wurden Kombinationsmaterialien aus synthetischen Polymeren mit Kalziumphosphatkeramiken hergestellt (Wang et al. 2001, Kim et al. 2006, Zhao et al. 2006). Natürliche Polymere, unter anderem Kollagen I, das am häufigsten vorkommende Protein der extrazellulären Knochenmatrix, zeigt alleine kaum osteoinduktive Eigenschaften, in Kombination mit Hydroxylapatit erscheinen sie jedoch ebenfalls als Leitschienenmaterial geeignet zu sein. (Parikh 2002, Stengele 2004)

Neue Ansätze zeigen viel versprechende Ergebnisse bei der Verwendung hoch poröser Seidenfilme (Vunjak-Novakovic et al. 2005, Meinel et al. 2005), müssen jedoch noch weiter evaluiert werden.

Spezielle Beschichtung der einzelnen Materialien, zum Beispiel mit Fibrinkleber (Le Nihouannen et al. 2005), kann hierbei zu einer Verbesserung der Zelladhäsion oder osteoinduktiven Eigenschaften führen.

Zum heutigen Zeitpunkt ist noch kein Material bekannt, das alle Vorteile in sich vereint. Daher wurde bei der vorliegenden Arbeit lösungsmittelkonservierte und γ -Strahlen-sterilisierte bovine Spongiosa (Tutobone, Tutogen medical) verwendet. Die bovine Spongiosa ist in ihrer Struktur der menschlichen sehr ähnlich und ist als Knochenersatzmaterial bereits zur klinischen Anwendung zugelassen (Stengele 2004). Die verwendete bovine Spongiosa ist frei von bovinen Zellen und besteht aus mineralisierter Knochenmatrix. Ein wesentlicher Schritt zur Herstellung tissue-engineerter Gewebe besteht in der Vitalisierung der avitalen Gewebematrix. Hierfür haben wir die Spongiosa mit humanen mesenchymalen Stammzellen besiedelt.

4.4 Diskussion der Ergebnisse

Als Vehikel für den Gentransfer in mesenchymale Stammzellen wurden in dieser Studie Lentiviren verwendet, welche eine sehr hohe Transduktionseffizienz in diesen Zellen zeigten. Bereits 24 Stunden nach der lentiviralen Transduktion von hMSCs zeigte sich fluoreszenzmikroskopisch eine deutliche eGFP-Expression. Diese war lang anhaltend und stabil über den beobachteten Zeitraum von 4 Wochen. Auch einen Monat nach Transduktion und Expression von eGFP konnten die Zellen osteogen, chondrogen und adipogen differenziert werden, womit gezeigt werden konnte, dass der Stammzellcharakter auch nach lentiviraler Transduktion und Expression von eGFP erhalten bleibt. Mithilfe der Blasticidin-Selektion exprimierten mehr als 97% der mesenchymalen Stammzellen dauerhaft eGFP. Hieraus ergibt sich in Zukunft ein enormes Potential der genetisch markierten hMSCs für die in vivo Anwendung. Durch die Verwendung dieser Zellen wird es erstmals möglich, den Verbleib der Zellen nach der Besiedelung von Leitschienen im lebenden Tiermodell zu verfolgen. Für die Anwendung am Menschen werden aber weiterhin biotechnologische Bedenken bestehen bleiben.

5 Zusammenfassung

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs), die undifferenzierten Vorläuferzellen mesenchymaler Gewebe wie Knochen, Knorpel, Fett und Muskel, versprechen ein hohes Potential zur Therapie vieler Erkrankungen. Im Rahmen des Tissue Engineering werden hMSC stimuliert und zur Differenzierung angeregt, so dass in vitro und in vivo die Ausbildung differenzierter mesenchymaler Gewebe zum Knorpel-, Knochen oder Muskelerersatz möglich ist. Gerade in der Therapie ausgedehnter Knochendefekte bieten mit hMSC besiedelte, in den Defekt transplantierte Leitschienen eine bemerkenswerte Alternative zu autologen Knochentransplantaten. Eine Möglichkeit, den Verbleib der transplantierten Stammzellen nachzuweisen, den Überlebenszeitraum zu bestimmen, sowie eine unerwünschte Migration in andere Organe auszuschließen, bietet die genetische Markierung der hMSC. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit hMSCs mit Enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) markiert, einem unter blauem Licht grün fluoreszierenden, nicht humanen Protein. eGFP erfüllt alle Kriterien eines idealen Zellmarkers, es ist einfach zu detektieren, in nicht markierten humanen Zellen nicht vorhanden, kann über längere Zeit stabil exprimiert werden und nimmt keinen Einfluss auf die physiologischen Zellaktivitäten. eGFP wurde mittels eines lentiviralen Vektors, einem Virus aus der Gruppe der Retroviren, in die humanen mesenchymalen Stammzellen transferiert. Lentivirale Markierung bietet den Vorteil einer lang anhaltenden, stabilen Expression des transduzierten Proteins. Des Weiteren sind Lentiviren, im Gegensatz zu den häufig verwendeten Adenoviren, nicht immunogen. Anhand der im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten Lentiviren konnten hMSCs effektiv mit eGFP transduziert und anschließend Spongiosa-Leitschienen mit den markierten Stammzellen besiedelt werden. Hierdurch wurde eine einfache und kostengünstige Beobachtung der auf der Leitschiene angesiedelten hMSC sowohl in vitro als auch in vivo möglich.

6 Anhang

6.1 Zusammensetzung der Puffer

P1:	50 mM Tris-Cl ph 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml Rnase A
P2:	200 mM NaOH 1% SDS
P3:	3,0 M Potassiumazetat ph 5,5
QBT:	750 mM NaCl 50 mM MOPS ph 7,0 15 % Isopropanol 0,15 % Triton X-100
QC:	1,0 M NaCl 50 mM MOPS ph 7,0 15 % Isopropanol
QF:	1,25 M NaCl 50 mM TrisCl ph 8,5 15 % Isopropanol
TE:	10 mM TrisCl ph 8,0 1 mM EDTA
QG:	Firma Quiagen, genaue Zusammensetzung vertraulich
PE:	Firma Quiagen, genaue Zusammensetzung vertraulich
Restriktionspuffer B:	10 mM TrisHCl 5 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl 1 mM 2-Mercaptoethanol ph 8,0
TAE 50x (11):	242 g Trisbase 57,1 ml Eisessig 0,5 M EDTA 100 ml (ph 8,0)

6.2 Zusammensetzung der Nährmedien

SOC:	0,5 % Hefeextrakt 2,0 % Trypton 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose
DYT (11):	16 g Trypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl (15 g Agar) ph 7,0 (NaOH)
LB (11):	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 15 g Agar ph 7,0
SOC (11):	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 250 mM KCl 10 ml ph 7,0 1 M Glucose vor Gebrauch 2 M MgCl ₂

7 Literaturverzeichnis

1. Abonour R, Williams DA, Einhorn L, Hall KM, Chen J, Coffman J, Traycoff CM, Bank A, Kato I, Ward M, Williams SD, Hromas R, Robertson MJ, Smith FO, Woo D, Mills B, Srouf EF, Cornetta K (2000); Efficient retrovirus-mediated transfer of the multidrug resistance 1 gene into autologous human long-term repopulating hematopoietic stem cells; *Nature Medicine* 6(6)
2. Ahlmann E, Patzakis M, Roidis N, Shepherd L, Holtom P (2002); Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes; *J. Bone Joint Surg Am.* 84A:716-720
3. Aluigi M, Fogli M, Curti A, Isidori A, Gruppioni E, Chiodini C, Colombo MP, Versura P, D'Errico-Grigioni A, Ferri E, Baccarani M, M- Lemoli R (2005); Nucleofection is an efficient non-viral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells; *Stem Cell Express*
4. Arinzeh TL, Tran T, Mcalary J, Daculsi G (2005); A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation; *Biomaterials* 26(17): 3631-8
5. Auricchio A, Kobinger G, Anand V, Hildinger M, O'Connor E, Maguire AM, Wilson JM, Bennett J (2001); Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics: the retina as a model; *Human Molecular Genetics* 10(26): 3075-3081
6. Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS (1995); Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation; *Spine* 20: 1055-1060
7. Beeres SLMA, Atsma DE, van der Laarse A, Pijnappels DA, van Tuyn J, Fibbe WE, de Vries AAF, Ypey DL, van der Wall EE, Schaliij MJ (2005); Human Adult Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Repair Experimental Conduktion Block in Rat Cardiomyocyte Cultures; *Journal of the American College of Cardiology* 46(10): 1943-1952
8. Cao C, Dong Y, Dong Y (2005); Study on culture and in vitro osteogenesis of blood-derived human mesenchymal stem cells; *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 19(8): 642-7
9. Castro M, Huber R, Astner S, Gamarra F, Stepp H, Hoener M (1998); Das grün fluoreszierende Protein GFP für das Bronchialkokulturmodell; *Laser-Forschungslabor, LMU München: Forschungsbericht 1998*

10. Chen CC, Huang TH, Kao CT, Ding SJ (2005); Characterization of funktionally graded hydroxyapatite/titanium composite coatings plasma-sprayed on Ti alloys; *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* (Epub ahead of print)
11. Chowdhury S, Thomas V, Dean D, Catledge SA, Vohra YK (2005); Nanoindentation on porous bioceramic scaffolds for bone tissue engineering; *J Nanosci Nanotechnol.* 5(11): 1816-20
12. Contag CH, Bachmann MH (2002); Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression; *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4: 235-260
13. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A (2005); Human Mesenchymal Stem Cells Modulate B Cell Functions; *Blood First Edition Paper*
14. Derubeis AR, Cancedda R (2004); Bone Marrow Stromal Cells (BMSCs) in Bone Engineering: Limitations and Recent Advances; *Annals of Biomedical Engineering* 32(1): 160-165
15. Devine MJ, Mierisch CM, Jang E, Anderson PC, Balian G (2002); Transplanted bone marrow cells lokalize to fracture callus in a mouse model; *Journal of Orthopaedic Research* 20(2002): 1232-1239
16. Devlin H, Sloan P (2002); Early bone healing events in the human extraction socket; *Int J Oral Maxillofac Surg.* 31(6): 641-5
17. Fagioli F (2005); Expansion of mesenchymal stem cells, isolated from pediatric and adult donor bone marrow; *J Cell Biochem.* (Epub ahead of print)
18. Fickert S, Fiedler J, Brenner RE (2003); Identification, quantification and isolation of mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic synovium by fluorescence automated cell sorting; *Osteoarthritis Cartilage* 11(11): 790-800
19. Foster LJ, Zeemann PA, Li C, Mann M, Jensen ON, Massem M (2005); Differential expression profiling of membrane proteins by quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation; *Stem Cells* 23(9): 1367-77
20. Gafni Y, Turgeman G, Liebergal M, Pelled G, Gazit Z, Gazit D (2004); Stem cells as vehicles for orthopedic gene therapy; *Gene Therapy* 11: 417-426
21. Gamradt SC, Lieberman JR (2004); Genetic Modification of Stem Cells to Enhance Bone Repair; *Annals of Biomedical Engineering* 32(1): 136-147

22. Gao Q, Katakowski M, Chen X, Li Y, Chopp M (2005); Human marrow stromal cells enhance connexin43 gap junction intercellular communication in cultured astrocytes; *Cell Transplant* 14(2-3): 109-17
23. Gimeno MJ, Maneiro E, Rendal E, Ramallal M, Sanjurjo L, Blanco FJ (2005); Cell therapy: a therapeutic alternative to treat focal cartilage lesions; *Transplant Proc* 37(9): 4080-3
24. Goulet JA, Senunas GL, DeSilva GL, Greenfield ML (1997); Autogenous iliac crest bone graft. Complications and functional assessment; *Clin. Orthop.* 339: 76-81
25. Greer III LF, Aladar AS (2002); Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review; *Luminescence* 17: 43-74
26. Guo Z, Yang Y, Liu X, Li X, Hou C, Tang PH, Mao N (2001); Biological features of mesenchymal stem cells from human bone marrow; *Chin Med J* 114(9): 950-3
27. He Xu, Li Yu-lin, Wang Xin-rui, Guo Xin, Niu Yun (2005); Mesenchymal stem cells transduced by PLEGFP-N1 retroviral vector maintain their biological features and differentiation; *Chinese Medical Journal* 118(20): 1728-1734
28. Hoelters J, Ciccarella M, Drechsel M, Geissler C, Gülcan H, Böcker W, Schieker M, Jochum M, Neth P (2005); Nonviral genetic modification mediates effective transgene expression and functional RNA interference in human mesenchymal stem cells; *The Journal of Gene Medicine* 7(6): 718-728
29. Huang MH, Li S, Hutmacher DW, Schantz JT, Vacanti CA, Braud C, Vert M (2004); Degradation and cell culture studies on block copolymers prepared by ring opening polymerization of epsilon-caprolactone in the presence of poly(ethylene glycol); *J Biomed Mater Res A* 69(3): 417-27
30. Jatsch L (2001); Green Fluorescent Protein (GFP), ein Molekül mit Eigenfluoreszenz ~ zur Etablierung eines in vivo Reporters für zell- und molekularbiologische Untersuchungen; Dissertation Promotionsfach Hygiene, Universität Heidelberg
31. Kabisch U (2001); Proteinchemische und molekularbiologische Charakterisierung der D-Prolin-Reduktase aus *Clostridium sticklandii*: Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium vorgelegt der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
32. Kim EY, Hong YB, Lai Z, Cho YH, Brady RO, Jung SC (2005); Long-term expression of the human glucocerebrosidase gene in vivo after transplantation of

- bone-marrow-derived cells transformed with a lentivirus vector; *The Journal of Gene Medicine* 7: 878-887
33. Kim EY, Hong YB, Lai Z, Kim HJ, Cho YH, Brady RO, Jung SC (2004); Expression and secretion of human glucocerebrosidase mediated by recombinant lentivirus vectors in vitro and in vivo: implications for gene therapy of Gaucher disease; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 318(2): 381-390
 34. Kim SS, Sun Park M, Jeon O, Yong Choi C, Kim BS (2006); Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering; *Biomaterials* 27(8): 1399-409
 35. Koç ON, Lazarus HM(2001); Mesenchymal stem cells: heading into the clinic; *Bone Marrow Transplantation* 27: 235-239
 36. Körbling M, Estrov Z(2003); Adult Stem Cells for Tissue Repair - A New Therapeutic Concept?; *N Engl J Med* 349: 570-82
 37. Kuate S, Stefanou D, Hoffmann D, Wildner O, Überla K (2004); Production of lentiviral vectors by transient expression of minimal packaging genes from recombinant adenoviruses; *The Journal of Gene Medicine* 6: 1197-1205
 38. Kurre P, Anandakumar P, Kiem HP (2005); Rapid 1-hour transduction of whole bone marrow leads to longterm repopulation of murine recipients with lentivirus-modified hematopoietic stem cells; *Gene Therapy*
 39. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B et al (2004); Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells; *Lancet*. 363: 1439-1441
 40. Lee HS, Huang GT, Chiang H, Chiou LL, Chen MH, Hsieh CH, Jiang CC (2003); Multipotential Mesenchymal Stem Cells from Femoral Bone Marrow Near the Site of Osteonecrosis; *Stem Cells* 21: 190-199
 41. Le Nihouannen D, Guehennec LL, Rouillon T, Pilet P, Bilban M, Layrolle P, Daculsi G (2005); Micro-architecture of calcium phosphate granules and fibrin glue composites for bone tissue engineering; *Biomaterials* (Epub ahead of print)
 42. Leri A, Kajstura J, Quaini F, Urbanek K, Bolli R, Anversa P (2005); Repair of the damaged heart; *Kidney International* 68:1962
 43. Lippincott-Schwartz J, Patterson GH (2003); Development and use of fluorescent protein markers in living cells; *Science* 300: 87-91
 44. Lu FZ, Fujino M, Kitazawa Y, Uyama T, Hara Y, Funeshima N, Jiang JY, Umezawa A, Li XK (2005); Characterization and gene transfer in mesenchymal stem cells

- derived from human umbilical-cord blood; *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 146(5): 271-278
45. Mahmood A, Lu D, Qu C, Goussev A, Chopp M (2005); Human marrow stromal cell treatment provides long-lasting benefit after traumatic brain injury in rats; *Neurosurgery* 57(5): 1026-31
 46. Mansilla E, Marin GH, Sturla F, Drago HE, Gil MA, Salas E, Gardiner MC, Piccinelli G, Bossi S, Salas E, Petrelli L, Iorio G, Ramos CA, Soratti C (2005); Human Mesenchymal Stem Cells Are Tolerized by Mice and Improve Skin and Spinal Cord Injuries; *Transplantation Proceedings* 37: 292-294
 47. Mareschi K, Ferrero I, Rustichelli D, Aschero S, Gammaitoni L, Aglietta M, Madon E, Wang LJ, Zhang YP, Wang JF, Wu YF, Xiang Y, Xie CG, Jia BB, Harrington J, McNiece IK (2005); Biological characteristics of mesenchymal stem cells in human umbilical cord blood and their supporting capacities in ex vivo expansion of CD34+ hematopoietic stem cells; *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 26(2): 65-8
 48. Mastrogiacomo M, Muraglia A, Komlev V, Peyrin F, Rustichelli F, Crovace A, Cancedda R (2005); Tissue engineering of bone: search for a better scaffold; *Orthod Craniofac Res.* 8(4): 277-84
 49. Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, Kirker-Head C, McCool J, Gronowicz G, Zichner L, Langer R, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL (2005); The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo; *Biomaterials* 26(2): 147-55
 50. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Halvorsen YD, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM (2005); The immunophenotype of human adipose derived cells: Temporal changes in stromal- and stem cell-associated markers; *Stem Cells* (Epub ahead of print)
 51. Mitsuhashi N, Fischer-Lougheed J, Shulkin I, Kleihauer A, Kohn DB, Weinberg KI, Starnes VA, Kearns-Jonker M (2005); Tolerance induction by lentiviral gene therapy with a non-myeloablative regimen; *Blood First Edition Paper*
 52. Moutsatsos IK, Turgeman G, Zhou S, Kurkalli BG, Pelled G, Tzur L, Kelley P, Stumm N, Mi S, Müller R, Zilberman Y, Gazit D (2001); Exogenously Regulated Stem Cell-Mediated Gene Therapy for Bone Regeneration; *Molecular Therapy* 3(4)
 53. Nakagawa H, Akita S, Fukui M, Fujii T, Akino K (2005); Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing; *British Journal of Dermatology* 153: 29-36

54. Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J, Chen J, Hentschel S, Vecil G, Dembinski J, Andreeff M, Lang FF (2005); Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Gliomas; *Cancer Res.* 65(8):3307-18
55. Naldini L, Blömer U, Gage FH, Trono D, Verma IM (1996); Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11382-11388
56. Negrin RS, Contag CH (2006); In vivo imaging using bioluminescence: a tool for probing graft-versus-host disease; *Nature* 6: 484-490
57. Niyibizi C, Wang S, Mi Z, Robbins PD(2004); Gene therapy approaches for osteogenesis imperfecta; *Gene Therapy* 11: 408-416
58. Pautke C (2004); Charakterisierung von humanen mesenchymalen Stammzellen und Zellen der osteoblastären Differenzierungskaskade; Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät
59. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, Becchetti E, Marchionni C, Alviano F, Fossati V, Staffolani N, Franchina M, Grossi A, Bagnara GP (2005); Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp; *Transplantation* 80(6): 836-42
60. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999); Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells; *Science* 284(5411): 143-147
61. Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch*; 258. Auflage, Berlin – de Gruyter, 1998
62. Rapaport DH, Rakic P, LaVail MM (1996); Spatiotemporal gradients of cell genesis in the primate retina; *Perspect Dev Neurobiol* 3(3): 147-59
63. Reichel C, Mathur J, Eckes P, Langenkemper K, Koncz C, Schell J, Reiss B, Maas C (1996); Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea Victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells; *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5888-5893
64. Reiser J, Harmison G, Kluepfel-Stahl S, Karlsson R, Schubert M (1996); Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles; *Proc Natl Acad Sci USA* 93(26): 15266-15271
65. Risbud MV, Shapiro IM, Guttapalli A, Di Martino A, Danielson KG, Beiner JM, Hillibrand A, Albert TJ, Anderson DG, Vaccaro AR (2006); Osteogenic potential of adult human stem cells of the lumbar vertebral body and the iliac crest; *Spine* 31(1): 83-9

66. Rodriguez S, Montes S, Armendariz-Borunda J (2005), Viral vectors in gene therapy. Advantages of the adenoassociated vectors; *Rev Gastroenterol Mex.* 70(2): 192-202
67. Schieker M, Seitz S, Gülkan H, Nentwich M, Horvath G, Regauer M, Milz S, Mutschler W, Arbeitsgruppe Tissue Engineering Knochen (2004); Tissue Engineering von Knochen Integration und Migration von humanen mesenchymalen Stammzellen in besiedelten Konstrukten im Mausmodell; *Der Orthopäde*
68. Serakinci N, Guldborg P, Burns JS, Abdallah B, Schrødder H, Jensen T, Kassem M (2004); Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation; *Oncogene* 23: 5095-5098
69. Skodacek D (2005); Der Einfluss von IGF-1 und TGFβ-2 auf Tissue-Engineerten Humanen Septumknorpel; Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät
70. Stengele M (2004); Knochenzellwachstum im dreidimensionalen Zellsystem; Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
71. Strappe PM, Hampton DW, Cachon-Gonzalez B, Fawcett JW, Lever A (2005); Delivery of a lentiviral vector in a Pluronic F127 gel to cells of the central nervous system; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 61(3): 126-133
72. Summers BN, Eisenstein SM (1989); Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion; *J. Bone Joint Surg. Br.* 71: 677-680
73. Trubiani O, Di Primio R, Traini T, Pizzicannella J, Scarano A, Piattelli A, Caputi S (2005); Morphological and cytofluorimetric analysis of adult mesenchymal stem cells expanded ex vivo from periodontal ligament; *Int J Immunopathol Pharmacol* 18(2): 213-21
74. Tsien RY (1998); The green fluorescent protein; *Annu. Rev. Biochem.* 67: 509-44
75. Vellinga J, Uil TG, de Vrij J, Rabelink MJWE, Lindholm L, Hoeben RC (2005); A system for efficient generation of adenovirus protein XI-producing helper cell lines; *The Journal of Gene Medicine*
76. Vunjak-Novakovic G, Meinel L, Altman G, Kaplan D (2005); Bioreactor cultivation of osteochondral grafts; *Orthod Craniofac Res* 8(3): 209-18
77. Wang DA, Williams CG, Li Q, Sharma B, Elisseeff JH (2003); Synthesis and characterization of a novel degradable phosphate-containing hydrogel; *Biomaterials* 24(22): 3969-80

78. Wang J, Fan Y, Li C, H, Sun Y, Lv B (2005); Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplanted into damaged rabbit heart to improve heart function; *J Zhejiang Univ SCI* 6B(4): 242-248
79. Wang M, Chen LJ, Ni J, Weng J, Yue CY (2001); Manufacture and evaluation of bioactive and biodegradable materials and scaffolds for tissue engineering; *J Mater Sci Mater Med* 12(10-12): 855-60
80. Wilson JM (2004); Adeno-associated Virus and Lentivirus Pseudotypes for Lung-directed Gene Therapy; *The Proceedings of the American Thoracic Society* 1: 309-314
81. Xia Z, Ye H, Locklin RM, Ferguson DJP, Cui Z, Triffitt JT (2005); Efficient karakterisation of human cell-bioceramic interactions in vitro and in vivo by using enhanced GFP-labelled mesenchymal stem cells; *Biomaterials* 26: 5790-5800
82. Yang F, Moss LG, Phillips GN jr (1996); The molecular structure of green fluorescent protein; *Nat. Biotechnol* 14: 1246 - 1251
83. Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, Johnstone B (1998); The Chondrogenic Potential of Human Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells; *The Journal of Bone and Joint Surgery* 80: 1745-57
84. Yoo JU, Johnstone B (2000); Mesenchymal stem cells and muskuloskeletal repair; *Current Opinion in Orthopedics* 11: 391-396
85. Zhang Y, Li CD, Jiang XX, Li HL, Tang PH, Mao N (2004); Comparison of mesenchymal stem cells from human placenta and bone marrow; *Chin Med J* 117(6): 882-7
86. Zhao F, Grayson WL, Ma T, Bunnell B, Lu WW (2006); Effekts of hydroxyapatite in 3-D chitosan-gelatin polymer network on human mesenchymal stem cell construct development; *Biomaterials* 27(9): 1859-67
87. Zeilhofer HF (2005); Implantate werden lebendig; *Uni Nova Wissenschaftsmagazin der Universität Basel - Medizin und Technik* 101: 19-21

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit ergreifen, mich bei all denjenigen zu bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben.

An erster Stelle sei Herrn Prof. Dr. med. Wolf Mutschler gedankt, für die Übernahme und formelle Betreuung meiner Arbeit, sowie die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten des experimentellen Forschungslabors.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei dem Leiter unserer Arbeitsgruppe, Herrn Dr. med. Wolfgang Böcker, für das interessante Thema, die ausgesprochen engagierte, sowohl fachliche als auch menschliche Unterstützung, sowie seine immerwährende Bereitschaft für inspirierende Diskussionen und wertvolle Ratschläge bedanken.

Zu sehr großem Dank bin ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Gentransfer verpflichtet, allen voran Herrn Oliver Rossmann. Seine fachliche Beratung und Hilfsbereitschaft waren für die Erstellung dieser Arbeit von sehr hohem Wert.

Herrn Prof. Dr.med. Ulrich Koszinowski und Priv.Doiz. Dr.med. Dr.rer.nat. Jürgen Haas (Max-von-Pettenkofer-Institut, Virologie) danke ich für die freundliche Bereitstellung des S2-Arbeitsplatzes und ihre wertvollen Ratschläge alle Themen der Virusherstellung betreffend. Allen Mitarbeitern des chirurgischen Forschungslabors, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und nicht namentlich erwähnt wurden, sei mein herzlicher Dank ausgesprochen.

Insbesondere möchte meinen Eltern und Geschwistern Danke sagen, die mich mit ihrer Kraft und Liebe von jeher in jeder Hinsicht unterstützt haben. Danke auch meinem lieben Freund Stefan Barth für die Geduld, Unterstützung und Aufmunterung während allen Höhen und Tiefen dieser Arbeit.

Die Studien wurden finanziert durch Gelder der Friedrich-Baur-Stiftung (Ludwig-Maximilians-Universität).

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 22.08.1981

Geburtsort: Fürth

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Konfession: evangelisch

Dissertation:

„Genetische Markierung von humanen mesenchymalen Stammzellen mittels enhanced green fluorescent protein“: Humane mesenchymale Stammzellen wurden durch lentiviralen Gentransfer mit enhanced green fluorescent protein markiert, um die Stammzellen bei der anschließenden Besiedelung von Knochenleitschienen einfach detektieren zu können.

Methoden: Klonierung, Herstellung von Lentiviren, Zellkultur, Fluoreszenzmikroskopie, Tissue engineering

Prof. Dr. med. W. Mutschler

Ludwig-Maximilian-Universität München

Chirurgische Klinik, Innenstadt

Praktisches Jahr:

Mai 2006 – September 2006

3. Tertial des Praktischen Jahres

Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde

Prof. Dr. med. A. Berghaus

Ludwig-Maximilian-Universität, Großhadern

Februar 2006 - Mai 2006

2. Tertial des Praktischen Jahres

Unfallchirurgie

Dr. med. E.F.J. Höcherl

Visceralchirurgie

Prof. Dr. med. H. Waldner

Städtisches Klinikum München Schwabing

Oktober 2005 – Februar 2006

1. Tertial des Praktischen Jahres

Hämato-Onkologie

Prof. Dr. med. B. Emmerich

Prof. Dr. med. M. Reincke

Ludwig-Maximilian-Universität, Medizinische Klinik
Innenstadt

Berufliche Tätigkeiten:

Seit 2007

Assistenzärztin an der Universitätsklinik für Hals-,
Nasen-, Ohrenkrankheiten, Kopf- und Halschirurgie
Erlangen

Studium:

November 2006

Approbation

Oktober 2006

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

September 2005

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Ludwig-Maximilian-Universität München

September 2003

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Ludwig-Maximilian-Universität München

September 2002

Ärztliche Vorprüfung
Ludwig-Maximilian-Universität München

September 2000

Beginn des Studiums der Humanmedizin
Ludwig-Maximilian-Universität München

Famulaturen und Praktika:

Februar - März 2005

Praxisfamulatur Pädiatrie
Dr. med. J. Rosenfeld
Emsdetten

September – Oktober 2004

Praxisfamulatur Dermatologie
Prof. Dr. Dr. M. Dorn
München

März 2004	Famulatur Chirurgie Prof. Dr. med. W. Mutschler Ludwig-Maximilian-Universität München Chirurgische Klinik, Innenstadt
Februar – März 2003	Famulatur Gynäkologie Prof. Dr. med. E. Grischke Städtisches Krankenhaus München Schwabing
Februar – April 2001	Krankenpflegepraktikum Chirurgie Städtisches Krankenhaus Weilheim
Schulbildung:	
Juni 2000	Allgemeine Hochschulreife
1991 – 2000	Gymnasium Weilheim
1987-1991	Grundschule am Hardt, Weilheim