

# DNA-Markierung von AD-hMSCs mittels Elektroporation und deren Einfluss auf Zellcharakteristika

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Kathrin von der Haar, M. Sc.

2019

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Institut für Technische Chemie

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferent: Apl. Prof. Dr. Cornelia A. Blume

Institut für Technische Chemie

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 13.05.2019

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich im Laufe dieser Arbeit unterstützt und angeleitet haben.

Zuerst möchte ich Professor Dr. Thomas Scheper meinen Dank ausdrücken, der mir nicht nur mein Forschungsthema anvertraut hat, sondern dessen Unterstützung ich sowohl während meiner Doktorarbeit als auch im Studium genoss.

Mein großer Dank gilt natürlich auch Prof. Dr. Cornelia Blume für die Betreuung. Danke für die unzähligen, wissenschaftlichen Diskussionen sowie die fachliche Anleitung und Unterstützung. Vielen Dank ebenso an Dr. Krings für die Übernahme der Leitung der Prüfungskommission.

Ich möchte auch Dr. Antonina Lavrentieva danken, die mir nicht nur bei praktischen Problemen immer zur Seite stand: Für ihr ehrliches Interesse, ihre tatkräftige, allzeit geleistete Unterstützung und Freundschaft. Ich möchte ebenfalls Dr. Rebecca Jonczyk für Ihre Hilfe im Labor, den Veröffentlichungen sowie beim Lektorat dieser Arbeit danken. Danke an Martin Pähler für Hilfe, Sarkasmus und Humor. Danke Martina Weiß für die freundliche Unterstützung bei experimentellen und administrativen Fragen. Ein besonderer Dank an Ulrike Dreschel und Cornelia Alic, ohne die ich u. a. noch immer nicht ordnungsgemäß zur Promotion angemeldet wäre. Danke an André Jochums, für Freundschaft und Hilfsbereitschaft und nicht zuletzt dafür nicht alleine beim Stickstoff-auffüllen und Chemikalienentsorgen rumstehen zu müssen. Danke an meine Kollegen und Freunde Anne Stamm, Daniel Marquard, Lena Stuckenberg und alle anderen Doktoranden die meine Zeit am TCI unvergesslich gemacht haben. Einen besonderen Dank an das gesamte Institut für die unkomplizierte Unterstützung, Wärme und Großzügigkeit anlässlich der Geburt meiner Tochter Lara.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für ihre Unterstützung während der Promotion und meinem Studium bedanken und dafür, dass sie das Interesse an den Naturwissenschaften geweckt und unterstützt haben. Danke, dass alle meine Interessen von Kindheit an gefördert wurden, auch wenn viele nicht von langer Dauer waren. Danke an meine Geschwister für ihre Unterstützung aber auch ihre vielen dummen Kommentare. Auch möchte ich meiner Tochter Lara danken, die mich auch in schwierigeren Situationen immer zum Lachen gebracht hat. Zu guter Letzt möchte ich meinem Ehemann Marcel danken, der mich zu jeder Zeit bei intellektuellen und emotionalen Herausforderungen der Promotion unterstützt hat. Danke für deine Geduld und Verständnis mit mir und meinen Launen in Stresssituationen und dafür, dass Du mir immer wieder Kraft und neuen Tatendrang gibst. Diese Arbeit wäre ohne die Liebe und Unterstützung meiner gesamten Familie nicht möglich gewesen. Euch gilt mein größter Dank.

**ABSTRACT**

Human mesenchymal stem cells (hMSCs) are widely used in autologous stem cell therapy (donor and recipient are identical) and tissue engineering, since these approaches circumvent possible rejection reactions. The distribution of transplanted cells is crucial for the success of such therapies. Also, in some studies tumor formation occurred in the patient after stem cell transplantation. Therefore, it is necessary to label stem cells prior to autologous transplantation in order to identify them and, if necessary, clarify the origin of degenerative tissue. Likewise, labeled stem cells can also be applied *in vitro* to track them e.g. on opaque substrates (e.g. to examine migration). In the present work, hMSCs from adipose tissue (AD-hMSCs) were labeled using DNA. First, electroporation was established as a DNA transfer method. Here, the cell membrane is perforated by an electrical pulse, which allows DNA transfer from the environment into the target cells. Furthermore, the influence of the following labelling techniques on cell characteristics was investigated: electroporation with an *egfp* (enhanced green fluorescent protein) reporter plasmid as an indirect labeling method, fluorescence-labeled nonsense DNA as a direct labeling method, and lentiviral transduction with an *egfp* reporter plasmid as a viral standard method in cell labelling. Electroporation resulted in high transfection efficiencies (44.5% with nonsense DNA and 29.5% with *egfp* plasmid) and in the case of nonsense DNA, the cell characteristics were preserved. After electroporation with the *egfp* plasmid and after lentiviral transduction, differentiation capacity was reduced and lentiviral transduction also resulted in an altered immunophenotype. Furthermore, the electroporated AD-hMSCs were tracked online *in vitro*. It was found that the signal of the EGFP-labeled AD-hMSCs for fluorescence microscopy was strong enough, while the signal of the nonsense DNA was too weak. These results show that electroporation represents a good alternative to viral methods for labeling AD-hMSCs without raising the same safety concerns (e.g. possible mutagenesis). In particular, nonsense DNA-labeled AD-hMSCs can be used both *in vivo* and *in vitro* because they do not lose typical cell characteristics. In contrast, EGFP-labeled AD hMSCs are limited to studies that do not require differentiation.

**Key Words:** Mesenchymal Stem Cells – Labelling – Electroporation – Lentiviral Transduction

## KURZFASSUNG

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) werden häufig autolog (Donor und Empfänger sind identisch) in der Stammzelltherapie und dem Tissue Engineering angewandt, da hierbei mögliche Abstoßungsreaktionen umgangen werden. Für den Erfolg solcher Therapien ist u.a. die Distribution der transplantierten Zellen entscheidend. Ebenso kam es nach der Stammzell-Transplantation in einigen Studien zur Tumorformation im Patienten. Daher ist eine Markierung vor einer autologen Transplantation notwendig, um sie anschließend zu identifizieren und ggf. den Ursprung von entartetem Gewebe zu klären. Markierte Stammzellen können aber auch *in vitro* angewandt werden, um sie z.B. auf lichtundurchlässigen Trägermaterialien nachzuverfolgen (z.B. in Migrationsstudien). In der vorliegenden Arbeit wurden hMSCs aus dem Fettgewebe (AD-hMSCs) mit DNA markiert. Zunächst wurde die Elektroporation als DNA-Transfermethode etabliert. Hier perforiert ein elektrischer Puls die Zellmembran, was einen DNA-Transfer aus der Umgebung in die Zielzellen erlaubt. Zudem wurden Transfektionseffizienzen und der Einfluss der Elektroporation mit *egfp* (verbessertes grün fluoreszierendes Protein, engl. *enhanced green fluorescent protein*)-Reporterplasmid bzw. fluoreszenzmarkierter Nonsens-DNA auf die Zellcharakteristika untersucht und mit der lentiviralen Transduktion als Standardmethode zur MSC-Markierung verglichen. Die Elektroporation führte zu hohen Transfektionseffizienzen (Nonsens-DNA: 44.5%, *egfp*-Plasmid: 29.5%). Im Falle der Nonsens-DNA blieben alle untersuchten Zellcharakteristika erhalten. Nach *egfp*-Plasmid-Elektroporation und nach lentiviraler Transduktion war die Differenzierungskapazität herabgesetzt und lentivirale Transduktion führte zu einem veränderten Immunophänotyp. Weiterhin wurden die elektroporierten AD-hMSCs *in vitro* nachverfolgt. Hierbei konnten EGFP-markierte AD-hMSCs optisch online nachverfolgt werden, während das Signal der Nonsens-DNA für eine online Beobachtung jedoch zu schwach war.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Elektroporation ohne die gleichen Sicherheitsrisiken (z.B. mögliche Mutagenese) eine gute Alternative zu viralen Methoden zur AD-hMSC-Markierung darstellt. Insbesondere Nonsens-DNA-markierte AD-hMSCs können sowohl *in vivo* als auch *in vitro* angewandt werden, da sie keine typischen Zellcharakteristika verlieren. EGFP-markierte AD-hMSCs hingegen sind beschränkt auf Studien, die keine Differenzierung erfordern.

**Stichwörter:** Mesenchymale Stammzellen – Markierung – Elektroporation – Lentivirale Transduktion

# INHALT

Danksagung.....	I
Abstract .....	II
Kurzfassung.....	III
1 Einleitung.....	1
2 Zielsetzung.....	2
3 Theoretischer Hintergrund.....	3
3.1 Stammzelltypen und deren Bedeutung für die Medizin .....	3
3.1.1 Stammzellen und Krebsentstehung.....	6
3.2 Humane Mesenchymale Stammzellen .....	9
3.2.1 Transplantation von hMSCs.....	10
3.2.2 Wechselwirkungen zwischen hMSCs und Tumoren .....	15
3.3 Zellidentifikation und Tracking von hMSCs.....	17
3.3.1 Ex vivo Zellidentifikation.....	17
3.3.2 In vitro und in vivo Zell-Tracking.....	19
3.4 DNA Transfer Methoden in hMSCs .....	24
3.4.1 Viraler DNA Transfer .....	24
3.4.2 Nicht-viraler DNA-Transfer.....	26
3.4.3 Vergleich der verschiedenen Methoden des DNA-Transfers.....	29
4 Praktischer Teil.....	31
4.1 Zellisolation und Charakterisierung .....	32
4.1.1 Plastikadhärenz und Morphologie.....	32
4.1.2 Differenzierungskapazität der isolierten Zellen.....	32
4.1.3 Immunophänotyp-Charakterisierung der isolierten Zellen .....	34
4.1.4 Zellwachstum.....	36
4.2 Markierung von AD-hMSCs mit DNA.....	37
4.2.1 Lipofektion .....	37
4.2.2 Etablierung der Elektroporation zur AD-hMSC Transfektion .....	37

4.2.3	Elektroporation vs. Lentivirale Transduktion – Markierungseffizienz und Langzeitstabilität.....	39
4.2.4	In vitro Monitoring mittels Fluoreszenzmikroskopie von elektroporierten AD-hMSCs.....	49
4.2.5	Zelleigenschaften nach erfolgtem DNA Transfer .....	50
4.3	Diskussion.....	67
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	80
A	Literaturverzeichnis.....	84
B	Abkürzungsverzeichnis .....	106
C	Materialien.....	109
C.1	Materialien .....	109
C.2	Geräte .....	109
C.3	Chemikalien .....	110
C.4	Zellkulturmedien.....	112
C.5	Lösungen und Puffer .....	112
C.6	Kits.....	113
C.7	Differenzierungsmedien.....	114
C.8	Antikörper .....	114
C.9	Primer .....	114
C.9.1	cDNA-Synthese Primer .....	114
C.9.2	qRT-PCR Primer .....	115
C.10	Nonsens-DNA.....	115
C.11	Vektoren .....	116
D	Methoden.....	118
D.1	Zellisolation.....	118
D.2	Zellkultur .....	118
D.3	Zellrevitalisierung.....	118
D.4	Zellzahlen .....	119

D.5	Population Doubling Level .....	119
D.6	Fixierung von Zellen .....	120
D.7	Immunophänotyp-Analyse .....	120
D.8	Zelldifferenzierung.....	121
D.8.1	Färbeverfahren .....	121
D.8.2	Quantifizierung.....	122
D.9	Colony Forming Units .....	122
D.10	Seneszenz .....	123
D.11	RNA Isolation und cDNA Synthese.....	123
D.12	DNA Isolation .....	123
D.13	qRT-PCR.....	124
D.14	Transfektion der AD-hMSCs.....	124
D.14.1	Lipofektion .....	124
D.14.2	Elektroporation der AD-hMSCs.....	126
D.14.3	Lentivirale Transduktion der AD-hMSCs .....	126
D.15	Durchflusszytometeranalyse .....	127
D.16	Statistische Auswertung.....	128
E	Ergänzendes Material .....	128
E.1	Funktionen der Oberflächenmarker .....	128
E.2	hMSC-Zellausbeute aus verschiedenen Gewebearten vs. benötigte Zellzahlen zur Transplantation in bisherigen Studien .....	129
E.3	Ergebnisse der Lipofektion .....	132
E.4	Aktuelle Studien zu verschiedenen Tracking Methoden .....	133
E.5	Kalibrationskurve qRT-PCR .....	134
E.6	Kalibrationskurve zur Quantifizierung der osteogenen Differenzierung.....	135
F	Tabellenverzeichnis.....	136
G	Abbildungsverzeichnis.....	136

Mitarbeit an Experimenten .....	140
Lebenslauf.....	141
Publikationsliste .....	142

## 1 EINLEITUNG

Stammzellen kommen immer häufiger bei der Behandlung vieler verschiedener Krankheiten und Verletzungen zum Einsatz. Hierbei werden sie entweder als Stammzellen selbst transplantiert (Stammzelltherapie) oder nach der Züchtung zu Geweben (Differenzierung) verschiedener Organe (Tissue Engineering). In dieser sogenannten Regenerativen Medizin sollen funktionsgestörte Zellen, Gewebe oder sogar Organe wiederhergestellt werden. Um möglichst eine Abstoßungsreaktion des Empfängers zu verhindern, wird häufig eine autologe Transplantation durchgeführt. Hierbei stammen die Stammzellen aus dem Empfänger selber. Insbesondere Stammzellen aus dem Fettgewebe sind hierfür interessant, da sie vielen Patienten in hohen Zellzahlen zur Verfügung stehen und sie sich in verschiedene Gewebetypen differenzieren lassen.

Nach einer Transplantation ist die Überwachung dieser Zellen im Empfänger ein wichtiges Kriterium für den Erfolg der Regenerativen Medizin. Hierbei sind insbesondere die Verteilung und das Überleben der transplantierten Zellen wichtig. Außerdem müssen mögliche Risiken vorhergesagt und ausgeschlossen werden können, insbesondere eine mögliche Entartung der AD-hMSCs. Durch die für therapeutische Zwecke notwendigen Manipulationen, wie die Vermehrung der Zellen im Labor (*in vitro* Expansion) und Differenzierung, kann es zum Auftreten von genetischen Veränderungen kommen. In Folge dessen werden verschiedene Gene (u.a. sowohl zur Unterdrückung als auch zu Förderung von Tumorbildung) verändert exprimiert. Aus diesen Gründen ist es immens wichtig, die transplantierten Zellen im Empfänger eindeutig identifizieren zu können. Im Falle der autologen Therapie (Spender gleich Empfänger) können aufgrund des identischen genetischen Ursprungs keine Standardmethoden (beispielsweise der genetische Fingerabdruck) zur Identifikation verwendet werden. Daher müssen die Stammzellen vor einer Transplantation markiert werden. Hierzu werden die Zellen häufig mit einer im Empfänger nicht vorhandenen DNA-Sequenz markiert. Dies erfolgt meist unter Zuhilfenahme von Viren. Diese führen aber häufig selbst zur Transformation der Stammzellen zu Tumorzellen sowie zu einer gesteigerten Immunantwort. Momentan existiert also noch keine ideale Markierungsmethode für Stammzellen.

## 2 ZIELSETZUNG

Im Laufe dieser Arbeit sollte eine DNA-Markierungsmethode von humanen adulten Stammzellen aus dem Fettgewebe (engl. *adipose tissue derived human mesenchymal stem cells*; AD-hMSCs) entwickelt werden, die eine gute Alternative zu den umstrittenen viralen Methoden darstellt. Die Markierung erfolgte auf DNA-Ebene und sollte zunächst mit einem *egfp* (verbessertes grün fluoreszierendes Protein, engl. *enhanced green fluorescent protein*)-Reporterplasmid etabliert werden. Zusätzlich dazu sollte eine nicht-kodierende Nonsens-DNA-Sequenz als Marker verwendet werden.

Die Markierungsmethode sollte dabei möglichst keinen negativen Effekt auf die Zelleigenschaften haben. Hierzu sollten wichtige Zellcharakteristika vor und nach erfolgter Markierung überprüft werden. Außerdem sollte überprüft werden ob der eingebrachte Marker über einen langen Zeitraum ( $\geq 30$  Tage) in den Zellen nachweisbar bleibt.

### 3 THEORETISCHER HINTERGRUND

Diese Arbeit befasst sich mit adulten humanen Stammzellen und dem Einbringen eines Labels via Transduktion/Transfektion, einer Methodik, die auch in das Genom der Zellen eingreifen und die spezifische Zellbiologie der Stammzellen verändern kann. Um diese Vorgänge tiefgehend zu verstehen, wird im theoretischen Teil nun ein kleiner Exkurs über die Abstammung und Charakteristika von Stammzellen vorangestellt.

#### 3.1 STAMMZELLTYPEN UND DEREN BEDEUTUNG FÜR DIE MEDIZIN

Im Allgemeinen sind Stammzellen nicht-spezialisierte Zellen, die sich durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie der Differenzierung zu verschiedenen Zelltypen auszeichnen. Die Selbsterneuerung ist entscheidend, um den Stammzellbestand in einem Organismus zu erhalten. Die Differenzierungsfähigkeit zu einer Progenitorzelle und in der weiteren Entwicklung zu einer terminal ausdifferenzierten Zelle, ist notwendig, um tote oder beschädigte Zellen im Organismus zu ersetzen. Ob eine Stammzelle die Selbsterneuerung oder die Differenzierung durchläuft, hängt von den Signalen ab, die die Stammzelle aus der Umgebung der Stammzellnische erhält. Die Stammzellnische ist eine Mikroumgebung, in der die Stammzelle geschützt und erhalten wird. Nur solange die Zellen sich in der Stammzellnische befinden, erhalten sie Signale um sich weiterhin als Stammzellen zu teilen [1-3].

Eine wichtige Eigenschaft von Stammzellen ist ihre lange Teilungsfähigkeit im Vergleich zu ausdifferenzierten Zelltypen. Alle Stammzellen haben gemein, dass sie einen Telomerasekomplex aufweisen. Telomere sind DNA-Strukturen am Ende aller Chromosomen in Wirbeltieren. Der DNA-Replikationsmechanismus setzt nie direkt am Beginn der DNA-Sequenz ein, sodass die Doppelhelix und damit die Telomere bei jeder Replikation verkürzt werden. Nach einer bestimmten Anzahl an Zellteilungen und DNA-Replikationen führt diese Verkürzung zur Aktivierung der Identifikation von Doppelstrangbrüchen und infolgedessen zum Zelltod. Dies ist ein entscheidender Faktor für die limitierte Zellteilung von Primärzellen und führt zur Seneszenz (irreversibler Stillstand der Zellteilung). Der Telomerasekomplex, der sich in allen Stammzellen findet, führt zur Regeneration der Telomere. Dieser Komplex ist aber je nach Stammzelltyp in unterschiedlichen Mengen vorhanden. So enthalten gewebespezifische, adulte Stammzellen zwar hohe Mengen Telomerasekomplex, um über deren normalen Lebensspanne eine Zellteilung zu garantieren, aber nicht genug, um den Telomerabbau komplett umzukehren. Dies ist auch anhand der unterschiedlichen *in vitro* Teilungsfähigkeiten verschiedener Stammzelltypen und resultierenden Unterschieden im Seneszenz-Verhalten zu erkennen [2, 4, 5].

Stammzellen lassen sich einerseits anhand ihres Differenzierungspotenzials unterscheiden. Dabei werden totipotente Stammzellen von pluripotenten und multipotenten Stammzellen

unterschieden. **Totipotente Stammzellen** können einen kompletten Organismus ausbilden und somit zu allen Zellarten ausdifferenzieren. Diese Zellen sind nur in frühen Embryonen zu finden [6]. Nach weiterer Teilung im Embryo verlieren die Stammzellen ihre Totipotenz. Sie werden zu **pluripotenten embryonalen Stammzellen** (ESCs) und lassen sich zu allen Zellen der drei Keimblätter differenzieren. Die Entwicklung in die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm ist die erste Differenzierung eines Embryos in verschiedene Zellschichten, aus denen in der weiteren Entwicklung unterschiedliche Gewebe und Organe ausgebildet werden. ESCs können aus der Blastozyste isoliert werden [7, 8]. Eine künstlich erzeugte Form pluripotenter Stammzellen sind sogenannte **induzierte pluripotente Stammzellen** (iPSCs). Hierbei werden somatische Zellen durch das Einbringen von Pluripotenz-induzierenden Genen (wie beispielsweise Oct-5) zu pluripotenten Stammzellen, dies geschieht, indem differenzierte humane Zellen durch Einbringen spezifischer Gene dedifferenziert werden und somit auf die Ebene der Stammzellen zurückversetzt werden. iPSCs sind in ihren Eigenschaften sehr ähnlich zu ESCs mit einigen Unterschieden. Sie zeigen epigenetische Charakteristika ähnlich zu den Ursprungszellen und zeigen bei der Differenzierung eine Tendenz in die Richtung der Ursprungszellen [9]. Dieser Methode erweckt die Hoffnung, künftig inform von autologen Stammzellen im Tissue Engineering breit eingesetzt zu werden, allerdings ist nicht klar, ob die genetische Manipulation, die zur Dedifferenzierung führt, für den klinischen Einsatz komplett unbedenklich ist. **Multipotente Stammzellen** kommen physiologisch im Körper des Menschen an verschiedenen Stellen vor und können sich in verschiedene Zelltypen eines Gewebes oder eines Organs differenzieren. Hierzu gehören fetale Stammzellen, die in dem als Fetus bezeichneten reiferen Stadium eines Embryos vorkommen, neonatale Stammzellen aus dem Nabelschnur- oder Plazentablut und adulte Stammzellen, die sich lebenslang im Organismus eines Menschen befinden [2]. Adulte Stammzellen konnten in diversen Organen und Geweben gefunden werden, u.a. im Hirn, Knochenmark, peripheren Blut, im Darm, im Auge, im Innenohr, in der Zahnpulpa und im Fettgewebe. Sie werden eingeteilt nach ihrer Funktion im Körper oder nach ihrem Ursprungsgewebe. So sind beispielsweise hämatopoetische Stammzellen definiert über die Differenzierungsfähigkeit zu Blutzellen, während beispielweise im Knochenmark oder im Fettgewebe vorkommende Stroma-Stammzellen (auch mesenchymale Stammzellen genannt) zu Chondrozyten, Adipozyten oder Osteoblasten differenzieren können, sie können aber je nach Ursprungsgewebe auch noch zu weitere Zelltypen differenziert werden (siehe **Kapitel 3.2.1.1**). Neurale Stammzellen kommen im Gehirn vor und können zu Neuronen, Astrozyten oder Oligodendrozyten differenzieren. Epithelstammzellen aus den tiefen Krypten im Verdauungstrakt lassen sich zu Enterozyten, Becherzellen Panethzellen und enterochromaffine Zellen differenzieren. Hautstammzellen kommen in der Basalschicht der Epidermis und an der Basis von Follikeln vor. Hier unterscheidet man Epidermalstammzellen, die sich in Keratinozyten

differenzieren lassen und Follikel-Stammzellen, die sich zu Haarfollikeln und zur Epidermis entwickeln können [2, 10, 11] Die Stammzellnische gibt also vor, in welcher Richtung sich die nischenspezifischen Stammzellen differenzieren können.

Alle Stammzelltypen haben gewisse Vor- und Nachteile in der klinischen Anwendung. So sind **pluripotente ESCs** differenzierbar in beliebige Körperzellen und können sogar einen Verbund von Organsystemen bilden, sind *in vitro* unbegrenzt teilbar und die Gewinnung ist einfach. Die Pluripotenz ist aber auch mit der gehäuften Bildung z. B. von Teratomen verbunden, die zumindest als semimaligne Tumore gelten. Allerdings gibt es aufgrund der Gewinnung aus Embryos ethische Bedenken und aufgrund der Art der Gewinnung kann nie eine autologe Transplantation (Spender und Empfänger sind identisch) erfolgen. Somit besteht immer die Gefahr der Abstoßung im Empfänger [2, 7, 8].

**iPSCs** sind differenzierbar in beliebige Körperzellen, lassen sich *in vitro* unbegrenzt teilen und sie sind autolog transplantierbar und können somit eine Abstoßung umgehen, die Differenzierung zeigt aber meist eine Tendenz in die Richtung der Ursprungszellen und die Gewinnung erfordert das Einbringen von Pluripotenzgenen, was hohe Risiken wie das der Karzinogenese durch die verwendeten viralen Transduktionsmethoden birgt [9].

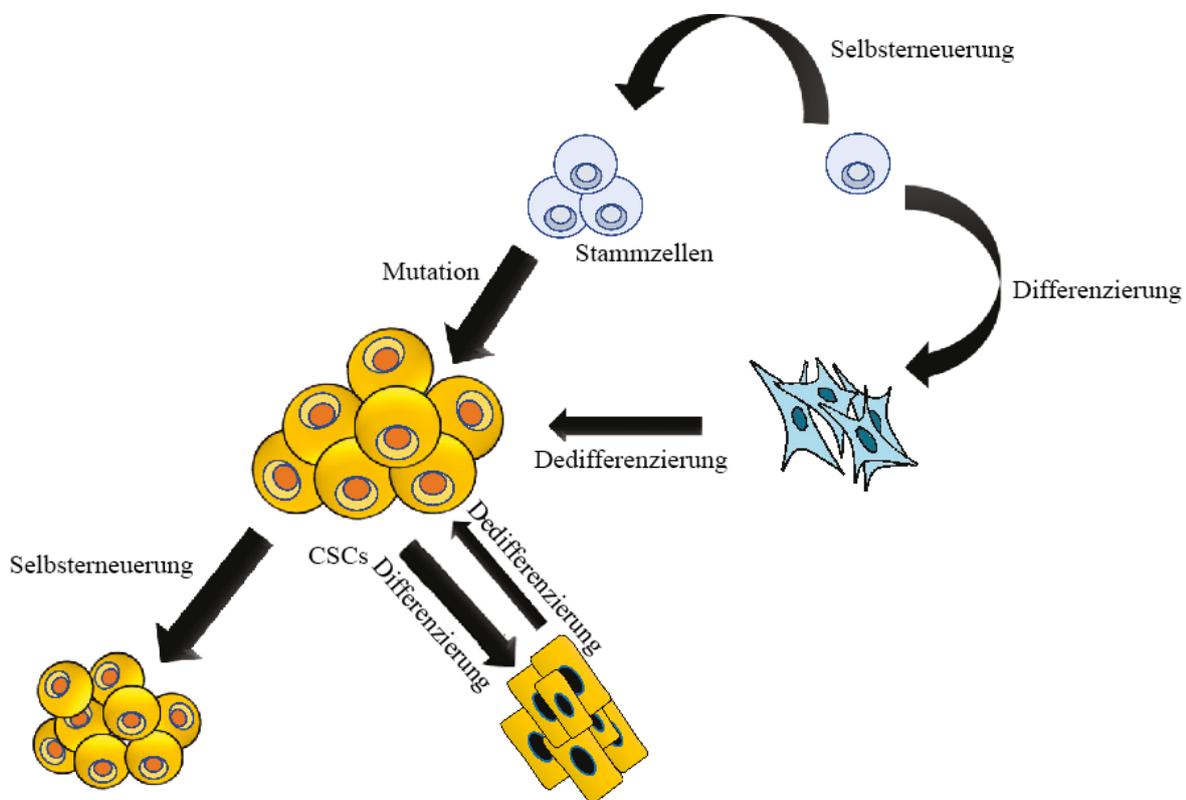
In der hier vorliegenden Arbeit wurden **adulte Stammzellen** als Modellzellsystem ausgewählt, weil diese verschiedene Vorteile gegenüber den anderen Stammzelltypen haben und sich derzeit in vielen klinischen Studien befinden. So sind sie z. B. bei autologer Transplantation immunogen neutral und können sogar eine Abstoßungsreaktion eindämmen. Ihre Entnahme z. B. aus dem Fettgewebe ist ethisch unbedenklich, weil es sich um verzichtbares Restgewebe handelt. Diese adulten Stammzellen können aufgrund der Teilspezialisierung kontrolliert differenzieren. Allerdings sind adulte Stammzellen bisher *in vitro* nicht unendlich teilbar und je nach Alter des Donors eventuell bereits defekt [2, 10, 11].

**Neonatale Stammzellen** sind leicht zu gewinnen, ethisch unbedenklich und lassen sich als relativ immunogen neutrale Zellen transplantieren. Allerdings sind sie in der Differenzierungsfähigkeit zu Gewebe unterschiedlich vom Ursprungsgewebe beschränkter als ESCs und die *in vitro* Kultivierung und in geringeren Mengen vorhanden als adulte Stammzellen. Weiterhin ist ihre Verfügbarkeit begrenzt, da sie nur bei nach Zustimmung der Eltern bei einer Geburt gewonnen werden können [2, 12].

**Fetale Stammzellen** haben im Vergleich zu anderen multipotenten Stammzellen eine höhere Teilungsrate und können Organsysteme bilden. Es bestehen aber ethische Bedenken durch die Gewinnung aus Feten, sie sind auf die Differenzierung in Gewebearten und Organe ihres Ursprungs beschränkt und aufgrund der Gewinnung ist eine autologe Transplantation nicht möglich und somit kann es zu Abstoßungen kommen [2, 13].

### 3.1.1 STAMMZELLEN UND KREBSENTSTEHUNG

Einer neueren Theorie nach spielen manche Stammzelltypen mit ihrer besonderen Wachstumstendenz auch eine für die Krebsentstehung und für den Erhalt von Tumoren eine bestimmende Rolle. Diese Krebsstammzellen (CSCs) allein können den gesamten Tumor mit seiner ursprünglichen Struktur und den ursprünglichen Zelltypen regenerieren. Manche dieser CSCs können anhand spezifischer Zelloberflächenmarkern identifiziert und aus dem Körper mittels spezifischer Methoden isoliert werden. In der Krebstherapie ist das Wissen um die Existenz der CSCs entscheidend, da diese Zellen für eine erfolgreiche Behandlung eliminiert werden müssen. Für den Fall, dass bei der Therapie die CSCs resistent sind, kann dies zum einen zum erneuten Wachstum des Tumors führen und zum anderen zu der Metastasierung und zur Karzinose (diffuse Durchsetzung von Gewebe und dem gesamten Körper durch ein Karzinom) im Patienten. Die Metastasierung und Karzinose erfolgt hierbei insbesondere durch eine Subpopulation der CSCs, die stark migrieren [14, 15]. Es konnte gezeigt werden, dass sich CSCs aus adulten Stammzellen oder adulten Progenitorzellen durch Mutationen entwickeln können bzw., dass sie aus differenzierten Zellen oder Krebszellen entstehen, die durch Dedifferenzierung stammzellähnliche Eigenschaften erlangen. Eine Übersicht zur Entstehung von CSCs ist in der folgenden **Abbildung 3.1** dargestellt.



**Abbildung 3.1: Entstehung von CSCs.** CSCs können ihren Ursprung entweder in mutierten Stammzellen haben, in bereits mutierten Progenitorzellen durch Dedifferenzierung oder in differenzierten Zellen oder Krebszellen, die durch Dedifferenzierung stammzellähnliche Eigenschaften Erlangen. (aus dem Englischen und in Anlehnung an Phi, 2018 [16])

Bei der Krebsentstehung ist weiterhin wichtig, dass alle Zellen im Körper im Laufe ihrer Lebensspanne einer möglichen DNA-Veränderung unterliegen. Stammzellen sind aufgrund ihrer langen Lebensdauer daher besonders anfällig für die Entstehung von Krebszellen, weil diese Zeitspanne, in der karzinogene Wirkungen induziert werden können, besonders lang ist [2, 16-19]. Die lange Lebensdauer der Stammzellen führt gleichzeitig zu einer größeren Anzahl an Zellteilungen. Jede Zellteilung erhöht weiterhin die Wahrscheinlichkeit zu malignen Transformationen. So kann die DNA-Polymerase Fehler einbauen, die Verteilung der DNA auf die Tochterzellen kann fehlerhaft sein und es konnte festgestellt werden, dass sich teilende Zellen besonders sensitiv sind für genotoxische und nicht-genotoxische Schäden durch endogene und exogene Karzinogene [17].

Als Beispielmarker für die Identifikation von CSCs gelten Zellmarker wie beispielsweise CD133 und CD44 für u. a. Lungenkrebs-, Darmkrebs- und Prostatakrebsstammzellen. Weiterhin wurde gezeigt, dass CSCs ähnlich wie normale Stammzellen durch eine Stammzellnischen-ähnliche CSC-Mikroumgebung geschützt und reguliert werden. Diese Mikroumgebung ist insbesondere gekennzeichnet durch Hypoxie, die Anwesenheit von sogenannten Krebs-assoziierten Fibroblasten und deren Chemokin- und Zytokin-Sekretion [18].

Die Implikationen für Stammzell-Transplantationen, die sich aus dem Zusammenhang zwischen Stammzellen und Krebs ergeben, stellen klar, warum es so relevant ist, Identifikationsmethoden für Stammzellen zu entwickeln. Ein Ansatz für diese Markierung und Identifikation von Stammzellen wurde im Laufe dieser Arbeit entwickelt. Hier wurden – wie zuvor erwähnt – adulte humane multipotente mesenchymale Stammzellen (hMSCs) aus dem Fettgewebe verwendet. Sie lassen sich in verschiedene Zelltypen differenzieren und autolog transplantieren [20, 21]. Ein großer Vorteil der aus dem Fettgewebe isolierten hMSCs (AD-hMSCs) ist die hohe Quantität, in der sie im menschlichen Fettgewebe vorkommen und somit der Stammzelltherapie zur Verfügung stehen [21-24]. Trotz des geringeren Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotentials im Vergleich zu ESCs, sind AD-hMSCs via Differenzierung oder parakriner Signalgebung geeignet zur Behandlung diverser Krankheiten oder Verletzungen [25, 26].

Für den Erfolg solcher Behandlungen ist es aber von großer Bedeutung, dass post-transplantational das Überleben, die Biodistribution sowie das Transplantateinwachsen analysiert werden kann. Durch die für therapeutische Zwecke notwendigen substanziellen Manipulationen, wie *in vitro* Expansion und Differenzierung, kann es zum Auftreten von genetischen Aberrationen und veränderten Expressionsleveln von sowohl Tumorsuppressions- wie karzinogenen Faktoren kommen [27-31]. Daher ist auch hier die post-transplantationale Verfolgung bzw. Identifikation von transplantierten Stammzellen ein notwendiger Bestandteil der Therapiekontrolle. Im Falle der autologen Therapie können aufgrund des identischen genetischen

Ursprungs keine Standardmethoden zur Identifikation des genetischen Fingerabdrucks verwendet werden [32]. Um nach einer autologen Stammzelltherapie den Ursprung von Tumorgewebe im Patienten zu bestimmen, müssen die transplantierten Zellen somit zuvor markiert werden. In den folgenden Kapiteln werden verschiedene Aspekte der Stammzelltherapie näher beschrieben. Diese sind: für die Stammzelltherapie wichtige Eigenschaften von hMSCs, verschiedene Methoden zur Identifikation und zur Nachverfolgung von hMSCs sowie unterschiedliche Methoden zur DNA-Markierung.

### 3.2 HUMANE MESENCHYMALE STAMMZELLEN

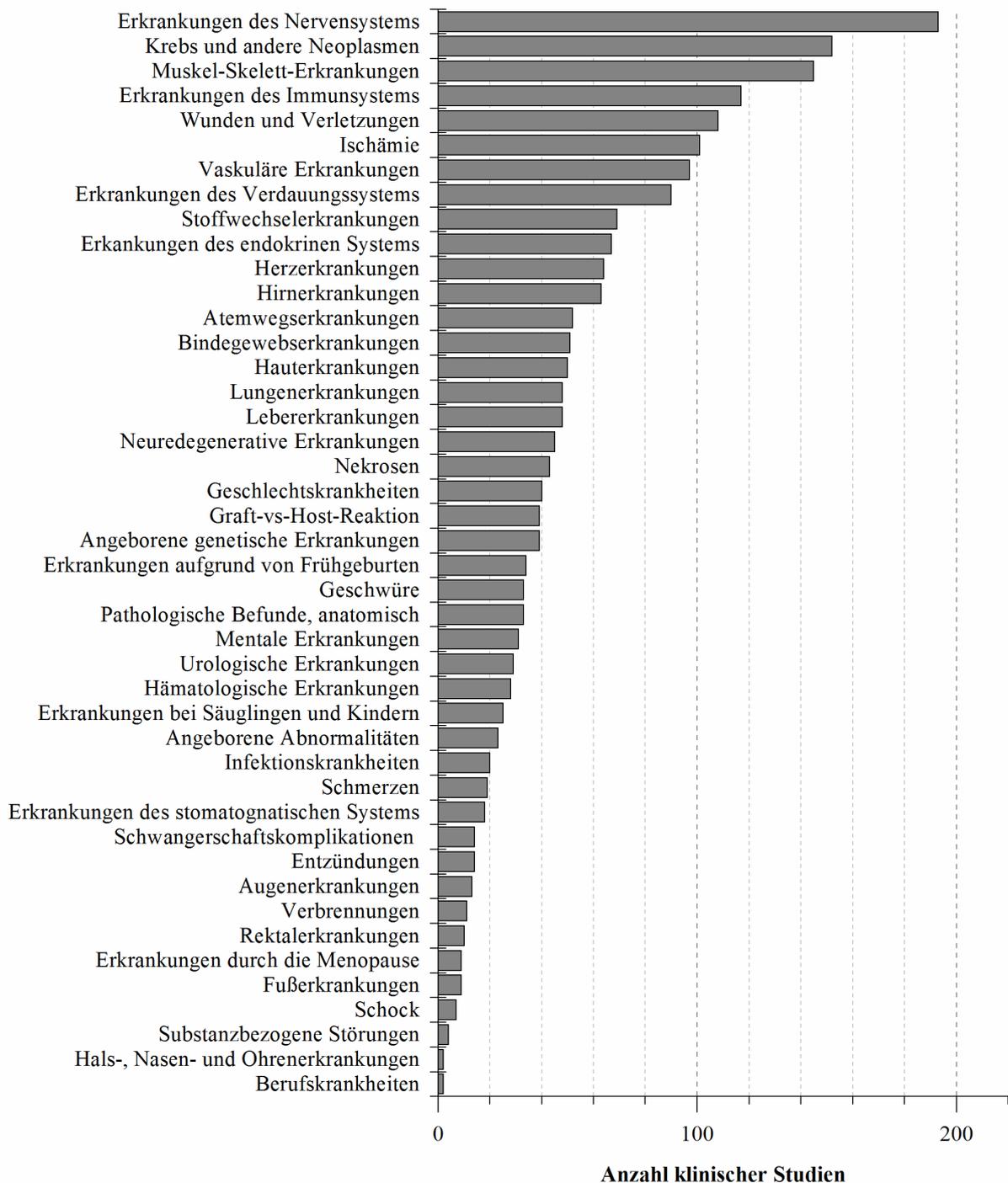
Mesenchymale Stammzellen (MSCs), häufig auch synonym als mesenchymale Stromazellen bezeichnet, stellen eine Gruppe von adulten Stammzellen dar. Adulte Stammzellen werden definiert als undifferenzierte Zellen, die in verschiedenen Organen oder Gewebearten als Vorläufer zu ausdifferenzierten Zellen vorkommen. Sie zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, hohe Proliferationsraten, geringe Immunogenität sowie die Differenzierungsfähigkeit zu einigen oder allen Zelltypen ihres jeweiligen Ursprungsgewebes aus (siehe auch **Tabelle 3.1**). In vielen Studien konnten außerdem immunsuppressive Eigenschaften von MSCs gezeigt werden. Prominente Beispiele sind hier die Proliferations-Suppression der aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen und CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen [33-35]. MSCs können außerdem *in vivo* infolge von Ausdifferenzierung oder durch gezielte Freisetzung von Wachstumsfaktoren, Chemokinen oder antimikrobieller Signalmoleküle zur Geweberegeneration beitragen [25, 26, 36-38] oder nach *ex vivo* Differenzierung für Organ- und Gewebeersatz verwendet werden [39]. Da MSCs als adulte Stammzellen bereits für ihr bestimmtes Ursprungsorgan oder -gewebe spezialisiert sind, ist ihre Differenzierungsfähigkeit gegenüber ESCs und Stammzellen aus der Keimbahn deutlich eingeschränkt. Sie werden daher als multi- oder unipotente Stammzellen bezeichnet. Weiterhin weisen sie eine begrenzte Zellteilungsfähigkeit auf. Auf der anderen Seite unterliegen ESCs aufgrund der Gewinnung aus der lebenden Blastozyste erheblichen ethischen Bedenken und können zur Bildung von speziellen Tumoren, sogenannten Teratomen führen [20, 21, 40].

MSCs wurden das erste Mal im Jahr 1970 von Friedenstein et al. aus dem Knochenmarkgewebe von Meerschweinchen isoliert und zunächst als adhärenz, Fibroblasten-ähnliche Zellen bezeichnet [41]. 1980 wurde Friedensteins Isolationsmethode verwendet, um ähnliche Zellen aus humanem Knochenmarkgewebe zu isolieren [42]. Caplan et al. fanden 1991 heraus, dass es sich hierbei um Zellen aus dem Mesenchym (pluripotentes Füll- und Stützgewebe) handelte und vermuteten, dass diese aufgrund ihrer regenerativen Eigenschaften von therapeutischem Nutzen sein könnten [43]. Derartige Zellen konnten seitdem in vielen Organen und Gewebearten von Säugetieren gefunden werden. Wegen ihres gemeinsamen Zellursprungs aus dem Mesenchym werden sie unter dem Sammelbegriff MSCs zusammengefasst. Bei MSCs handelt es sich immer um eine heterogene Zellpopulation. Die verschiedenen Zellsubtypen dieser Mischpopulation weisen auch verschiedene Eigenschaften auf, wie beispielsweise bzgl. der Differenzierungskapazität und der Expression verschiedener Klassen von regulatorischen Proteinen [17]. So ist u.a. auch die Teilungsfähigkeit und das Seneszenzverhalten innerhalb einer Mischpopulation von MSCs für die einzelnen Zellen unterschiedlich. Weiterhin unterscheiden sich die MSCs verschiedener Gewebearten teilweise deutlich. Zur Bestimmung von MSCs wurden daher im Jahr 2006 u.a.

folgende Minimalkriterien von der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie (*International Society for Cellular Therapy*; ISCT) [20] definiert: Adhärentes Wachstum auf Plastikoberflächen bei Standardkultivierungsbedingungen; *in vitro* Differenzierungskapazität in Adipozyten (Zellen des Fettgewebes), Osteoblasten (Knochenbildende Zellen), und Chondrozyten (Knorpelzellen); spezifische Oberflächenantigenexpression (Expression von CD73, CD90 und CD105; keine Expression von CD34, CD45 und HLA-DR). Je nach Gewebeursprung der MSCs werden aber häufig weitere Differenzierungskapazitäten sowie Oberflächenmarker, die ebenfalls auch einen Hinweis auf die Differenzierungskapazitäten geben, betrachtet. Die Differenzierungskapazitäten verschiedener MSCs werden näher in **Kapitel 3.2.1.1** diskutiert.

### 3.2.1 TRANSPLANTATION VON hMSCs

hMSCs werden aktuell in 884 klinischen Studien für eine Vielzahl an Erkrankungen und Verletzungen eingesetzt (Quelle: [clinicaltrials.org](http://clinicaltrials.org) am 21.09.2018 besucht, Stichwort ‚*mesenchymal stem cells*‘), wovon sich 13 Studien mit dem Tissue Engineering befassen. Die folgende **Abbildung 3.2** zeigt eine Übersicht über aktuelle klinische Studien mit Anwendung von hMSCs.



**Abbildung 3.2: Übersicht aktueller klinischer Studien mit Anwendung von hMSCs** (Quelle: clinicaltrials.org [44] am 21.09.2018 besucht, Stichwortsuche zu ‚*mesenchymal stem cells*‘) für verschiedene Erkrankungen und Verletzungen. Da jede Studie meist mehrere Einzelerkrankungen behandelt, überschreitet die Summe der Studien die Gesamtzahl der Studien (884 Studien). So wird beispielsweise eine Studie zu akuten Herzmuskelinfarkten ebenfalls den Kategorien Ischämie, Herzerkrankungen, Vaskuläre Erkrankungen und Nekrosen zugeordnet.

Am häufigsten finden sich klinische Studien zu Erkrankungen des Nervensystems, was insbesondere auf die hohen Fördermittel in diesem Bereich zurückzuführen ist. In der Betrachtung der einzelnen Krankheiten werden die meisten klinischen Studien zu Arthritis (87

Studien), Diabetes Mellitus (57 Studien), Graft vs. Host Reaktion (GvHR; 39 Studien) und Leberzirrhose (38 Studien) durchgeführt. Bei der Behandlung von Arthritis und GvHR macht man sich die anti-inflammatorische Wirkung von hMSCs zunutze [45, 46]. Bei Diabetes Mellitus sind die B-Zellen der Erkrankten in ihrer Funktion beeinträchtigt. Nach Transplantation von hMSCs konnte im Mausmodell eine Regeneration der Empfänger-B-Zellen gezeigt werden [47]. Zur Behandlung von Leberzirrhose wird mithilfe von hMSCs funktionales Lebergewebe wiederhergestellt [48].

Zu verschiedenen Krankheiten und Verletzungen sind bereits sowohl in Tiermodellen als auch in menschlichen Patienten viele Studien durchgeführt worden, bei denen vielversprechende Ergebnisse erzielt werden konnten. Bevor die Stammzelltherapie als Standardbehandlungsmethode verwendet werden kann, müssen aber umfangreichere Placebo- und Multicenter-kontrollierte Doppelblindstudien für die einzelnen Krankheiten durchgeführt werden. Bisher wurden erst 10 solcher Studien mit 24 bis 220 Probanden bereits durchgeführt, es wurden aber noch keine Ergebnisse veröffentlicht (Quelle: [clinicaltrials.org](http://clinicaltrials.org) am 25.11.2018 besucht, Stichwortsuche zu *„multicenter placebo mesenchymal stem cells“*, Filter: Phase 2 oder höher und abgeschlossene Studien, [44]).

Für eine erfolgreiche therapeutische Anwendung von hMSCs in der Stammzelltherapie und dem Tissue Engineering ist eine passende Differenzierungskapazität sowie eine ausreichend hohe verfügbare Zellzahl notwendig [36, 39]. Ein weiterer wichtiger Aspekt in der Anwendung der Stammzelltherapie ist die Biodistribution der transplantierten hMSCs. So ist es entscheidend, dass hMSCs in ausreichend hohen Zellzahlen das Zielgewebe erreichen (sog. Homing) [49]. Auf diese Aspekte wird im Folgenden näher eingegangen.

### **3.2.1.1 Differenzierungskapazitäten und spezifische Oberflächenmarker von hMSCs**

In der nachfolgenden **Tabelle 3.1** sind die Differenzierungskapazitäten der hMSCs mit verschiedenen Gewebeansprüngen dargestellt, sowie deren spezifische positive und negative Oberflächenmarker, die weiterhin einen Anhaltspunkt über mögliche bzw. nicht mögliche Differenzierungen der hMSCs liefern.

**Tabelle 3.1: Differenzierungskapazitäten und spezifische Oberflächenmarker von MSCs aus verschiedenen humanen Gewebearten.** Funktionen der Oberflächenmarker sind dem **Anhang E.1** zu entnehmen.

Gewebe	Oberflächenmarker		Quellen	Differenzierungskapazität	Quellen
	Positiv	Negativ			
Blut: Periphär	CD44, CD90, CD105, HLA-ABC	CD45, CD133	[50]	Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten Nervenzellen	[50] [50-52]
Blut: Nabel- schnur	CD9, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, HLA- ABC	CD14, CD31, CD34, CD45, CD271, HLA-DR, NG-2	[53]	Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten Endothelzellen Hepatozyten Myozyten Nervenzellen	[53] [54] [55] [56] [57]
Dermis	CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, SSEA-4, Vimentin	CD34, CD45, HLA- DR	[58, 59]	Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten Myozyten	[58, 59] [58]
Fettgewebe	CD73, CD090, CD29, CD44, CD71, CD105, CD13, CD166, STRO-1	CD14, CD31, CD34, CD45	[60-62]	Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten Cardiomyozyten Hepatozyten Myozyten Nervenzellen Pankreaszellen	[53] [63] [64] [61] [65] [66]
Knochen- mark	CD73, CD90, CD105, STRO-1	CD14, CD34, CD45, HLA- DR	[53, 62, 67-69]	Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten Cardiomyozyten Hepatozyten Myozyten Nervenzellen Pankreaszellen	[70, 71] [72] [73] [70] [70, 74] [75, 76]
Knorpel	CD73, CD90, CD105, CD166, Notch-1, Nucleostemin	CD44, CD146	[77-79]	Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten	[78]
Plazenta	CD29, CD73, CD90, CD105	CD34, CD45	[80-82]	Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten Endothelzellen Hepatozyten Myozyten Nervenzellen	[80, 82, 83] [80, 84] [85] [84] [83]
Plazenta: Chorion	CD13, CD29, CD44, CD54, CD73, CD105, CD166, HLA-I	CD3, CD14, CD31, CD34, CD45, HLA- DR	[83, 86]	Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten Endothelzellen Hepatozyten Myozyten Nervenzellen	[87] [88] [85] [87] [87]
Plazenta: Amnion	CD29, CD44, CD90, CD105, HLA-DR	CD10, CD14, CD34, HLA-DR	[89-91]	Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten Endothelzellen Hepatozyten Myozyten Nervenzellen	[88, 92] [88] [93] [88] [52]
Plazenta: Frucht- wasser	CD29, CD73, CD90, CD105, Oct-4, NANOG, SSEA-4	CD45, CD34	[94-96]	Adipozyten, Osteoblasten Cardiomyozyten Endothelzellen Fibroblasten Hepatozyten Myozyten Nervenzellen	[94, 96, 97] [98] [97] [97] [97] [97] [96, 97]

Gewebe	Oberflächenmarker		Quellen	Differenzierungskapazität	Quellen
	Positiv	Negativ			
Wharton-Sulze (Nabelschnur)	CD73, CD90, CD105	CD14, CD34, CD45, CD79, HLA-DR	[81, 99]	Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten Endothelzellen Hepatozyten Nervenzellen	[12, 99] [100] [101] [12, 102, 103]
Zahnmark	CD29, CD44, CD90, CD105	CD14, CD34, CD45	[104-106]	Adipozyten, Osteo-/Odontoblasten Nervenzellen Melanozyten Myozyten	[104-106] [105, 107] [104] [105]

Aufgrund der unterschiedlichen Differenzierungskapazitäten werden die verschiedenen hMSCs zur Behandlung verschiedener Krankheiten eingesetzt. So wurden beispielsweise hMSCs aus dem Zahnmark (DP-hMSCs) für die Geweberegeneration bei oralen Entzündungen und das Tissue Engineering von Zähnen verwendet [105, 108] und hMSCs aus dem Knochenmark (BM-hMSCs) konnten die Knochenheilung bei Distractionsosteogenese beschleunigen [109].

### 3.2.1.2 Zellausbeute von hMSCs nach Isolation aus verschiedenen Gewebearten vs. benötigte Zellzahlen zur Transplantation

Weiterhin notwendig für sowohl die Stammzelltherapie als auch das Tissue Engineering ist eine ausreichend hohe verfügbare Zellzahl der verwendeten MSCs. Aus dem Vergleich der Zellzahlen in aktuellen Studien (**Tabelle E.1** bis **Tabelle E.3** im **Anhang E.2**) ist zu erkennen, dass die minimal mögliche Zellausbeute aus Fettgewebe und Plazenta ausreichend für die Behandlung vieler Krankheiten ist (es werden  $0.5 \times 10^6$  bis  $10^8$  Zellen verwendet, siehe **Tabelle E.3**). Die Isolation aus Knochenmark und Nabelschnur hingegen kann im schlechtesten Fall nicht ausreichend sein für die Anwendung in den meisten Stammzelltherapien. Bei der Isolation aus Knochenmarksgewebe kann diesen geringen Zellzahlen aber entgegengesteuert werden durch eine mehrfache Isolation aus verschiedenen Stellen des Knochenmarks. Dies ist bei der Isolation von hMSCs aus der Nabelschnur jedoch nicht möglich. Die Isolation von BM-hMSCs und AD-hMSCs erfolgt invasiv, wobei die Isolation von BM-hMSCs zudem schmerzhaft und kostenintensiv ist [110, 111]. hMSCs aus Plazentagewebe und der Nabelschnur sind zwar nicht-invasiv zu gewinnen, stehen zur autologen Transplantation momentan aber nur wenigen Patienten zur Verfügung, da sie direkt nach einer Geburt isoliert werden müssen [92, 112]. Im Vergleich mit hMSCs aus anderen Geweben erscheinen daher AD-MSCs vielversprechend für die Anwendung in der autologen Stammzelltherapie.

### 3.2.1.3 Biodistribution von hMSCs

In der Stammzelltherapie werden Stammzellen transplantiert um deren regenerativen oder immunsuppressiven Eigenschaften zu nutzen. Für die Stammzelltherapie ist ein weiterer wichtiger Faktor die Biodistribution der Stammzellen nach ihrer Transplantation: die hMSCs müssen in ausreichend großer Menge das Zielgewebe erreichen können (sog. *Homing*). Je nach

Transplantationsmethode verteilen sich die Zellen im Körper und werden häufig nach großen Zahlen in der Lunge, Leber und der Injektionsstelle gefunden [113-121]. Trotz dieser häufigen Akkumulation von hMSCs in gewissen Organen, konnte gezeigt werden, dass Stammzellen, die zur Gewebeerneuerung transplantiert werden, das Zielgewebe erreichen [122, 123]. Es wird vermutet, dass die Zellen (unabhängig von der Injektionsmethode) ins periphere Blut gelangen und von dort das verletzte Zielgewebe aufgrund von Signalstoffen (Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen) erreichen [123-125].

### 3.2.2 WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN hMSCs UND TUMOREN

Auch wenn viele Untersuchungen in Tiermodellen und in klinischen Studien hMSCs als vielversprechende Therapiemöglichkeit vieler verschiedener Krankheiten darstellen, werden Sicherheitsaspekte in der Stammzelltherapie noch immer kontrovers diskutiert [126-129]. Im Jahr 2009 wurden das erste Mal nach einer allogenen Stammzelltherapie Tumore in Gehirn und Rückenmark gefunden, die ihren Ursprung nachweislich in den transplantierten humanen fetalen Nervenzellen hatten [130]. Seither gibt es immer wieder Berichte, über Tumorentwicklungen nach Stammzelltransplantationen [131-134]. Auf der anderen Seite werden hMSCs aber auch für die Behandlung von Krebs eingesetzt und zeigen anti-Tumor-Effekte [135, 136].

#### 3.2.2.1 Tumorigenese durch hMSCs

Im Wesentlichen werden folgende Wege unterschieden, auf denen hMSCs *in vivo* zum Wachstum von Krebs beiträgt: Direkte Wechselwirkung mit Krebszellen durch die Freisetzung von Zytokinen und inflammatorischen Faktoren wie CXCL1 und IL-6 [134, 137, 138]; Indirekte Wechselwirkung mit Krebszellen durch parakrine Freisetzung von Angiogenese-Faktoren wie VEGF [134, 139, 140]; Immunomodulatorische Effekte durch Hemmung von B-Zellen, T-Zellen und natürlichen Killerzellen [141]. Weiterhin können hMSCs selber einer spontanen malignen Transformation unterliegen. Dies kann *in vivo* durch die Aktivierung verschiedener onkogener Proteine wie SYT-SSX2 in hMSCs erfolgen [134, 142, 143] oder *in vitro* aufgrund von Mutationen und einer chromosomalen Instabilität der hMSCs durch Langzeitkultivierungen [144, 145].

Für hMSCs gilt wie für alle Stammzellen auch, dass sie ein erhöhtes Risiko haben zu Krebszellen zu mutieren. Dies liegt insbesondere an der langen Lebensdauer und der hohen Anzahl an Zellteilungen. Durch die lange Lebensdauer sind die Stammzellen unterliegen sie über einen langen Zeitraum der Möglichkeit zu mutieren [2, 16-19]. Während jeder Zellteilung kann die DNA-Replikation und die Verteilung der DNA auf die Tochterzellen fehlerhaft sein. Weiterhin sind teilende Zellen anfällig für Schäden durch endogene und exogene Karzinogene [17].

### 3.2.2.2 Antitumor-Effekte von hMSCs

Es wurde festgestellt, dass hMSCs durchaus auch zur Bekämpfung von Tumoren beitragen [128]. So konnte gezeigt werden, dass hMSCs im Mausmodell in Brustkrebs die Freisetzung von TIMP-1 und TIMP-2 und infolgedessen die Migration und Tumordinvasion hemmen konnte [146]. Bei chronischer Myelose konnte durch Freisetzung von DKK-1 die Krebszellproliferation gehemmt werden [147]. Außerdem konnte im Widerspruch zu oben genannten Studien gezeigt werden, dass die immunomodulatorischen Effekte von hMSCs auch die Proliferation verschiedener maligner Zellen hemmen [148]. Diese Ergebnisse widersprechen einander. Es ist möglich, dass die verschiedenen Ursprungsgewebe, unterschiedliche *in vitro* Kultivierungsbedingungen und die Injektionsmethode einen Einfluss auf das Verhalten von hMSCs bezüglich der Tumorentwicklung haben [134]. Insgesamt zeigen diese widersprüchlichen Ergebnisse und die daraus folgenden kontroversen Diskussionen in Forscherkreisen, dass die Wirkungsweise und der Einfluss von hMSCs in der Stammzelltherapie und dem Tissue Engineering bisher noch nicht ausreichend verstanden sind.

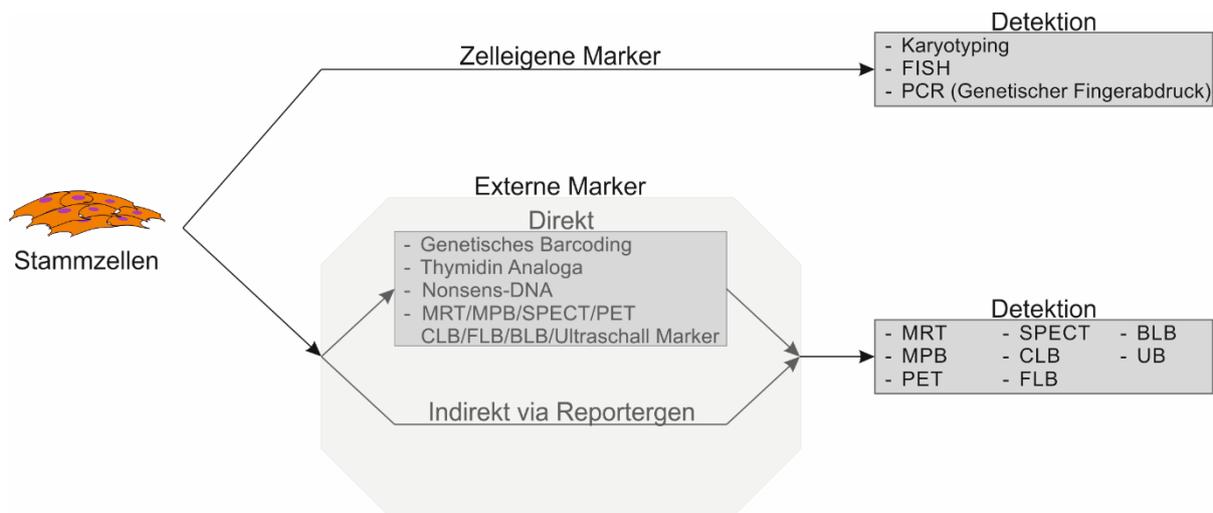
### 3.2.2.3 Homing von hMSCs zu Tumorgewebe

Ein entscheidender Faktor für die möglichen Wechselwirkungen von hMSCs mit Tumoren ist das Homing. Transplantierte hMSCs erreichen Tumorgewebe durch ähnliche Mechanismen (durch inflammatorische Mediatoren) wie bei der Migration von hMSCs zu verletztem Gewebe [149]. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass sich hMSCs in Tumoren akkumulieren [150]. Es konnten bisher einige Faktoren bestimmt werden, die eine Rolle im Homing von hMSCs in Tumorgewebe spielen. Hierzu gehören u.a. IL-6, Wachstumsfaktoren wie VEGF und Chemo- und Zytokine wie CCL-5 und SDF-1 [134]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung einzelner dieser Faktoren zwar zu einer Herunterregulierung des Homings führt, dieses aber nicht vollständig stoppen kann. Dies weist darauf hin, dass die bisher identifizierten Homing-Faktoren ein kompliziertes Netzwerk darstellen [151]. Außerdem wurde gezeigt, dass Bestrahlung von Tumoren und Hypoxie in Tumorgeweben wichtige Faktoren für das Homing von hMSCs zu Tumoren sind [134, 152, 153]. Im Mausmodell schütteten hMSCs in Tumorgeweben nach Bestrahlung verstärkt Wachstumsfaktoren und Zytokine aus, die zu einer verbesserten Migrationsfähigkeit der hMSCs führten [152]. Es konnte auch gezeigt werden, dass in hypoxischem Brustkrebsgewebe IL-6 verstärkt durch Krebszellen ausgeschüttet wird, was zu einer verstärkten Migration von hMSCs zum Tumorgewebe führen kann [134, 153].

Aufgrund der starken Wechselwirkungen von hMSCs mit Tumoren ist es wichtig, hMSCs nach einer erfolgten Transplantation zu verfolgen. Aufgrund der möglichen malignen Transformation der transplantierten hMSCs müssen diese nach einer Biopsie von Tumorgewebe identifiziert werden können, um festzustellen, ob ein Tumor direkt aus hMSCs entstanden ist.

### 3.3 ZELLIDENTIFIKATION UND TRACKING VON hMSCS

Wie oben beschrieben, sind für die Verwendung von Stammzellen in klinischen Studien die Biodistribution und die Identifikation des Zellursprungs beim Auftreten von Tumorbildung wichtig und somit auch Methoden zur Identifikation und zum Tracking der transplantierten Stammzellen. In den folgenden Kapiteln sind verschiedene bestehende Zellidentifikationssysteme beschrieben [32]. Eine Übersicht ist weiterhin in der folgenden **Abbildung 3.3** dargestellt.



**Abbildung 3.3: Verschiedene bestehende Zellidentifikationsmethoden.** FISH= Fluoreszenz in situ Hybridisierung; PCR=Polymerase Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*); MRT=Magnetresonanztomographie; MPB=Magnetpartikelbildung; PET=Positronenemissionstomographie; SPECT=Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie (engl. *single photon emission computed tomography*); CLB=Cerenkov Lumineszenz Bildgebung; FLB=Fluoreszenzbasierte Bildgebung; BLB=Biolumineszenzbasierte Bildgebung; UB=Ultraschallbildung.

#### 3.3.1 EX VIVO ZELLIDENTIFIKATION

##### 3.3.1.1 Karyotyping

Die zu untersuchenden Zellen werden mit einem Konservierungsmittel gemischt und auf Mikroskopträgern aufgetragen. Bilder von Chromosomen in der Metaphase können analysiert werden und die 22 Paar Autosomen sowie die zwei Geschlechtschromosomen können identifiziert werden. Wenn bei einer Transplantation Spender und Empfänger der hMSCs unterschiedliche Geschlechter haben, kann die Identifikation der Geschlechterchromosomen der hMSCs nach einer Biopsie die transplantierten Zellen *ex vivo* eindeutig erkennen [154, 155].

##### 3.3.1.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

FISH kann für die Identifikation von transplantierten hMSCs kann im Falle von verschiedenen Spezies oder verschiedenen Geschlechtern von Spender und Empfänger angewandt werden. Hierbei wird fluoreszenzmarkierte Fänger-DNA verwendet um hochrepetitive spezies- oder geschlechtsspezifische DNA-Sequenzen zu identifizieren (Spezies-spezifisch: *Alu*-Sequenzen; Y-Chromosom: z.B.: alphoid-DNA; X-Chromosom: z.B.: AATGG-Sequenzen) [156, 157]. Die Markierung der Fänger-DNA kann dabei direkt erfolgen oder indirekt über fluoreszenzmarkierte

Antikörper, die spezifisch an die Fänger-DNA binden. Im Gegensatz zum Karyotyping ist der Zellzyklus der analysierten Zellen bei FISH nicht von Bedeutung. FISH erlaubt außerdem die simultane Analyse vieler Zellen. Die Fluoreszenzmarker sind aber anfällig für Photobleaching [158].

### 3.3.1.3 Genetischer Fingerabdruck

Die Analyse des genetischen Fingerabdrucks kann bei Transplantationen von hMSCs von gleicher Spezies und gleichem Geschlecht verwendet werden. Dabei werden verschiedene Individuen-spezifische Sequenzen analysiert. Am häufigsten wird hier die Länge einer tandemartigen Wiederholung einer bestimmten DNA-Sequenz untersucht, der sogenannten VNTRs (engl. *variable number tandem repeats*). Die Anzahl der Wiederholungen dieser Sequenzen (z.B. ATATAT... oder TACTAC...) ist spezifisch für jede individuelle Person. Hierbei wird eine VNTR-spezifische PCR mit Primern für diese Wiederholungssequenzen durchgeführt und die Länge der entstehenden Amplifikate bestimmt [159].

### 3.3.1.4 Genetisches Barcoding

Ein weiterer Ansatz für die Identifikation von Spezies-identischen und Geschlechter-identischen transplantierten hMSCs ist das genetische Barcoding. Hierbei wird in die DNA der zu transplanzierenden Zellen *ex vivo* eine DNA-Sequenz als Marker eingebracht. Diese besteht meist aus einer 6 bp langen Signatur-Sequenz und einer randomisierten individuellen Sequenz, zu beiden Seiten der Signatur-Sequenz, die zur weiteren Analyse Vorwärts- und Rückwärts-Primersequenzen enthält. Das Einbringen der DNA kann beispielsweise durch lentivirale Transduktion erfolgen [160].

### 3.3.1.5 Thymidin-Analoga

Thymidin-Analoga können ebenfalls *ex vivo* in die zu transplanzierenden Zellen eingebracht werden, um so Zellen gleicher Spezies und gleichen Geschlechts zu markieren. Bei der Zellexpansion werden Thymidin-Analoga zum Kultivierungsmedium zugesetzt, die bei der Zellteilung in das Genom eingebaut werden [161-163]. Diese können nach erfolgter Transplantation *ex vivo* identifiziert werden. Ein großer Nachteil dieser Methode ist aber die Übertragung der Thymidin-Analoga auf nicht markierte Zellen. Nach dem Zelltod der markierten Zellen, können die so freiwerdenden Thymidin-Analoga von nicht markierten Zellen aufgenommen und in das Genom integriert werden [161].

Zusätzlich zu den oben beschriebenen individuellen Eigenschaften sind alle *ex vivo* Methoden arbeitsintensiv und benötigen eine Probenahme zur Bestimmung des Zellursprungs [164]. Außerdem sind bei einer autologen Transplantation die genetischen Eigenschaften von Spender-

und Empfängerzellen identisch und das Karyotyping, FISH und die Analyse des genetischen Fingerabdrucks können nicht zur Identifikation verwendet werden. Stattdessen müsste eine *ex vivo* Markierung der hMSCs vor der Transplantation erfolgen.

### 3.3.2 IN VITRO UND IN VIVO ZELL-TRACKING

In den folgenden Abschnitten werden die Eigenschaften eines idealen Bildgebungsverfahrens sowie existierende Zellüberwachungssysteme, die bereits im Tiermodell getestet wurden und vielversprechend für die klinische Anwendung sind oder sogar bereits im Menschen zur Anwendung kommen (siehe auch **Tabelle E.4** im **Anhang E.4**).

#### 3.3.2.1 Ideales Bildgebungsverfahren zur *in vitro* oder *in vivo* Zellüberwachung

Frangioni und Hajjar haben 2004 [165] Eigenschaften eines idealen Bildgebungsverfahrens zur *in vivo* Zellüberwachung folgendermaßen definiert: Am wichtigsten sind hierbei nicht-toxische sowie biokompatible Eigenschaften des Kontrastmittels (KM) und des Bildgebungsverfahrens. Das KM sollte möglichst gar nicht in die Umgebung oder umgebende Zellen abgegeben werden, um die Zellen auch nach langer Zeit noch verlässlich überwachen zu können. Außerdem sollte eine Einzelzelldetektion möglich sein, um die hMSC-Therapie bezüglich Tumorbildung und Biodistribution evaluieren zu können. Um klinische Studien zu erleichtern, sollten zum einen genetische Modifikationen vermieden werden und zum anderen die Belastung der Patienten minimiert werden (durch nicht-invasive Bildgebungsverfahren ohne zusätzlich benötigte Injektion eines Kontrastmittels). Für die *in vitro* Zellüberwachung gelten prinzipiell die gleichen Anforderungen an ein ideales Bildgebungsverfahren mit dem Unterschied, dass es keine Einschränkungen aufgrund der anatomischen Lage oder durch erneute KM Injektion gibt.

Obwohl ein solches ideales System zurzeit nicht existiert, gibt es einige bestehende Systeme, die für die *in vivo* Zellüberwachung verwendet werden (siehe **Abbildung 3.3**). Hierzu gehören die Magnetresonanztomographie, die Magnetpartikelbildung, Positronenemissionstomographie, Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie, Ultraschallbildung und optische Bildgebung.

Die Markierung von Zielzellen erfolgt bei diesen Bildgebungsverfahren direkt oder indirekt [166]. Bei der direkten Markierung werden spezifische Marker auf oder in die Zellen eingebracht, während bei der indirekten Markierung Reportergene in die Zielzellen eingebracht werden und dort zu einer spezifischen Proteinproduktion führen. Diese Proteine sind entweder selber messbar (z.B. fluoreszieren) oder werden durch die Injektion eines KMs nachweisbar (z.B. Luziferase mit Luciferin als KM). Beide Methoden haben Vor- und Nachteile.

Direkte Marker müssen *ex vivo* in die Zielzellen eingebracht werden, können im Zielgewebe an nicht-transplantierte Zellen abgegeben werden und die Anzahl der Markerteilchen in den Zielzellen wird infolge der Zellteilung immer geringer. Außerdem kann hierbei nicht zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden [167]. Indirekte Marker auf der anderen Seite machen diese lebend/tot-Unterscheidung möglich und das Reporter-gen kann im Falle einer genomischen Integration an die Tochterzellen weitergegeben werden [168]. Allerdings kann genau diese genomische Integration zu Problemen führen. Für viele virale Gentransfersysteme konnten Toxizitäten und Tumorbildung nachgewiesen werden [169-173]. Durch transienten Reporter-gentransfer kann diesen Problemen aus dem Weg gegangen werden, was aber wiederum gleichzeitig zum Marker-Transfer an nicht-transplantierte Zellen sowie Signalverlust durch Zellteilung führt (siehe dazu auch **Kapitel 3.4**).

### 3.3.2.2 Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie machen sich den magnetischen Spin bestimmter Moleküle zu Nutze. In einem angelegten Magnetfeld ordnen sich alle Spins parallel an. Durch einen hochfrequenten Impuls werden die magnetischen Spins um  $90^\circ$  rotiert. Die Relaxation zum Ursprungszustand führt zu einem messbaren Stromsignal in einer Detektorspule. Aufgrund der hohen Sensitivität, der Verwendung nicht radioaktiver KMs sowie nicht-ionisierender Strahlung und der daraus vermiedenen Zellschädigung durch die Bildgebung, wird die Magnetresonanztomographie häufig bei der Zellüberwachung verwendet [166, 174-177]. Ein Problem hierbei ist aber die genaue Zellquantifizierung. Häufig verwendet wird die direkte Markierung durch Eisenoxidnanopartikel [178]. Durch die Verwendung von Transfektionsreagenzien, Polyaminen, Dendrimeren oder Lipiden konnte die geringe Partikelaufnahme in Zielzellen erhöht werden [179-181].

### 3.3.2.3 Magnetpartikelbildgebung

Im Gegensatz zur Magnetresonanztomographie, wird bei der Magnetpartikelbildgebung die Magnetisierung direkt gemessen. Hier wird ein sich mit der Zeit veränderndes sinusförmiges magnetisches Anregungsfeld angelegt. Die magnetischen Partikel werden abwechselnd magnetisiert und demagnetisiert, was zu einem messbaren Signal führt. Um den Ort des Signals eindeutig zu bestimmen, wird dabei lokal ein sogenannter Feldfreier Punkt angelegt. Nur an dieser Position sind die betrachteten Partikel nicht magnetisch gesättigt und können mit einer Magnetisierungsänderung auf das Anregungsfeld reagieren und somit detektiert werden. Durch das Verschieben des Feldfreien Punkts über dem Zielgewebe, kann ein räumliches Bild der Partikel entstehen [182-188]. Diese Methode ist limitiert auf magnetische Partikel und wird zumeist mit superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln verwendet [189, 190]. Schwierigkeiten dieser Methode sind eine benötigte Größenhomogenität der Partikel, um

verlässliche Ergebnisse zu liefern, ein hohes Grundrauschen, sowie Probleme durch Agglomeration [191]. Vorteile dieser Methode sind die verwendete nicht-ionisierende Strahlung, bessere Sensitivität im Vergleich zu Magnetresonanztomographie, mögliche Einzelzelldetektion sowie schnellere Bildgebung für eine Echtzeit-Zellüberwachung [182].

#### **3.3.2.4 Emissionscomputertomographie: Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie und Positronenemissionstomographie**

Bei der SPEC Tomographie werden von KMs einzelne Photonen emittiert ( $\gamma$ -Strahlung). Die  $\gamma$ -Strahlung wird dann von sogenannten  $\gamma$ -Kameras detektiert. Durch die Rotation der  $\gamma$ -Kamera kann eine räumliche Karte aller emittierten  $\gamma$ -Strahlen erstellt werden [192]. Bei der Positronen-Emissions-Tomographie werden von KMs Positronen ( $\beta$ -Strahlen) emittiert. Die  $\beta$ -Strahlen interagieren mit den Elektronen im Körper des Patienten und emittieren so zwei Photonen in entgegengesetzte Richtungen und führen an einander gegenüberliegenden Detektoren zu Signalen. Aufgrund der zeitlichen Unterschiede kann dann der Ursprungspunkt der Photonen bestimmt werden. Durch zusammensetzen und zuordnen aller messbaren Signale kann dann eine räumliche Karte aller emittierten  $\beta$ -Strahlen erstellt werden [193].

Beide Techniken zeigen hohe Sensitivitäten und gute Gewebepenetration [194]. Die größten Unterschiede liegen in der besseren räumlichen Auflösung bei der Positronenemissionstomographie und der höheren Langlebigkeit von KMs der Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie [167, 192]. Da durch den radioaktiven Zerfall das Signal über die Zeit stark nachlässt, ist für Langzeitüberwachungen von MSCs eine Kombination mit direkter Markierung nicht geeignet [167]. Durch Kombination mit einer Reporter-gen-Markierung von Stammzellen kann dieses Problem umgangen werden, beispielsweise durch die Nutzung des Gens für einen Transmembranrezeptor und der zusätzlichen Zugabe radioaktiv-markierter Varianten der zugehörigen spezifischen Liganden. Dies führt aber dazu, dass für jede Emissionscomputertomographie-Messung erneut das KM injiziert werden muss [195, 196].

#### **3.3.2.5 Fluoreszenzbasierte Bildgebung**

Fluoreszierende KMs können ebenfalls für die Markierung von hMSCs genutzt werden. Diese Technik ist sehr sensitiv und benötigt keine ionisierende Strahlung. Nichtsdestotrotz ist die Anwendung aufgrund der geringen Gewebepenetration limitiert, blaues Licht durchdringt die menschliche Haut bis 1 mm, rotes Licht bis zu 5 mm [197]. Daher findet die fluoreszenzbasierte Bildgebung bisher hauptsächlich Anwendung in oberflächlichen Geweben, wie dem Mundraum oder in *ex vivo* Analysen. [165, 198, 199]. Eine relativ neue Methode, die zum *in vivo* Tracking angewandt wird, ist die *in vivo* Durchflusszytometrie, bei der markierte Zellen im kontinuierlichen Blut- oder Lymphstrom des Patienten nachgewiesen werden [200]. Sowohl direkte als auch indirekte Markierung von MSCs haben im allgemeinen keinen negativen Einfluss auf die

Zellviabilität oder -proliferation, nur fluoreszierende CdSe/ZnS Quantum Dots haben zu erhöhten inflammatorischen Zytokin-Leveln geführt [201-203].

### **3.3.2.6 Biolumineszenzbasierte Bildgebung**

Biolumineszenzbasierte Bildgebung ist ähnlich der fluoreszenzbasierten Bildgebung, benötigt aber eine zusätzliche Luziferaseproduktion zur Umsetzung von Luciferin zu Oxiluciferin, bei der Photonen freigesetzt werden. Diese Photonen können dann gemessen werden. Bei dieser Methode ist sowohl ein Gentransfer in die Zielzellen als auch die Injektion von Luciferin in den Empfänger nötig. Da es sich hier immer um eine indirekte Markierung der hMSCs handelt, kann man mit dieser Technik lebende und tote Zellen unterscheiden und einen Transfer des Markers zu nicht-Zielzellen ausschließen [204-206].

### **3.3.2.7 Cerenkov Lumineszenz Bildgebung**

Cerenkov Lumineszenz Bildgebung macht sich Cerenkov-Strahlung zunutze. Diese tritt auf, wenn geladene Partikel (z.B.  $\beta$ -Strahler) sich mit einer Geschwindigkeit durch ein dielektrisches Medium bewegen, die höher ist als die spezifische Lichtgeschwindigkeit für dieses Medium. Die geladenen Teilchen können dann eine Polarisation im umgebenden Medium induzieren. Bei der Rückkehr der Medium-Teilchen in ihren Grundzustand werden Photonen freigesetzt [207, 208]. Erst im Jahre 2009 konnte ein sensitiver Detektor entwickelt werden, der die Cerenkov-Strahlung detektieren konnte [209]. Im Jahr 2014 wurde die Cerenkov Lumineszenz Bildgebung zum ersten Mal angewandt um murine MSCs zu markieren und zu detektieren [210]. Da radioaktive Strahler auch zu Cerenkov-Strahlung führen können, können bereits existente Positronenemissionstomographie-Marker für die Cerenkov Lumineszenz Bildgebung zum Einsatz kommen. Da es sich um eine kombinierte Methode handelt, ergeben sich auch die Vor- und Nachteile aus der Emissionscomputertomographie und dem optischen Bildgebungsverfahren.

### **3.3.2.8 Ultraschallbasierte Bildgebung**

Bei der echokardiographischen Markierung können die Zielzellen direkt mit Mikrobläschen (z.B. aus Stickstoffmonoxid) markiert werden. In Konzentrationen, die zur Markierung ausreichen, haben Stickstoffmonoxid-Mikrobläschen keinen negativen Effekt auf die Zellviabilität oder -proliferation [211]. Dieses Verfahren ist sehr sensitiv, günstig und biokompatibel, erlaubt aber keine Zellquantifizierung. Da es sich hierbei um eine direkte Markierungsmethode handelt, kann es außerdem zum Transfer der Mikrobläschen auf nicht-Zielzellen kommen und die Anzahl der Mikrobläschen wird mit voranschreitender Zellteilung immer kleiner [165, 212].

### 3.3.2.9 Multimodale Bildgebung

Die multimodale Bildgebung beschreibt die Kombination aus verschiedenen einzelnen Bildgebungsverfahren. Dies kann entweder durch KMs erreicht werden, die von verschiedenen Detektoren erkannt werden können oder durch eine Kombination von verschiedenen Markern [213]. Multimodale Bildgebung erlaubt das Erfassen von komplementären Informationen eines einzelnen Experiments. Daher kann man hierdurch die spezifischen Stärken einzelner Techniken nutzen und gleichzeitig ihre Schwächen umgehen [206, 210, 213, 214]. Biolumineszenzbasierte Bildgebung und die Emissionscomputertomographien zeigen beispielsweise höhere Sensitivitäten aber geringere Auflösungen als eine Magnetresonanztomographie. Eine Kombination der Magnetresonanztomographie mit einer der anderen Techniken kann so zu einem Bildgebungsverfahren mit hohen Sensitivitäten und hohen Auflösungen führen. Außerdem können auch direkte und indirekte Markierungsmethoden miteinander kombiniert werden, um so Informationen über Zellviabilität und die molekulare Funktionalität zu liefern.

In **Tabelle E.4** im **Anhang E.4** sind aktuelle Studien mit den verschiedenen Bildgebungsverfahren zusammengefasst.

### 3.4 DNA TRANSFER METHODEN IN hMSCs

Da zellinherente native Sequenzen (siehe **Kapitel 3.3.1**, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, genetisches Barcoding, genetischer Fingerabdruck und Karyotyping) für die Zellidentifikation autolog transplanteder AD-hMSCs aufgrund des gleichen Zellursprungs nicht verwendet werden können, müssen für die DNA-Markierung nicht-native Sequenzen in die Zielzellen eingebracht werden. Für den DNA-Transfer stehen verschiedenste virale Methoden, aber auch nicht-virale Methoden (Reagenz-basierte, physikalische oder biologische Methoden) zur Verfügung. Diese werden in den folgenden Kapiteln diskutiert.

#### 3.4.1 VIRALER DNA TRANSFER

Die meisten Viren, die für den DNA Transfer verwendet werden, sind aus Sicherheitsgründen Replikations-defizient und exprimieren gewisse Strukturproteine nicht, um Immunreaktion zu verringern [215, 216]. Häufig verwendete Viren und virale Vektoren basieren auf Adenoviren, Adeno-assoziierten Viren, Herpes-Simplex-Viren, Vaccinia Viren,  $\gamma$ -Retroviren oder Lentiviren.

Das **Adenovirus** wird nach Endozytose im Zytoplasma entpackt und in den Nukleus der Wirtszelle transportiert [217, 218]. Obwohl nur selten eine Integration in das Wirtszellgenom stattfindet, wurde in einigen klinischen Studien ein hohes Mutagenese-Risiko durch Adenovirus-Vektoren festgestellt [219, 220]. Weiterhin kommt es zu starken Immunantworten und Zytotoxizitäten, was eine Anwendung in der hMSC-Markierung erschwert [173, 219-222].

Der Wildtyp des Adeno-assoziierten Virus ist replikationsdefizient und benötigt Adenoviren als Helfervirus für die Vermehrung [223]. Im Gegensatz zum Adenovirus, kommt es hier zur stabilen Integration der DNA ins Wirtszellgenom [224, 225]. Das Adeno-assoziierte Virus folgt in Anwesenheit des Helfervirus dessen Infektionsweg und in Abwesenheit eines Helfervirus Clathrin-vermittelter Endozytose [226]. Nach Freisetzung ins Zytoplasma akkumulieren sich die Viruspartikel perinuklear und durchdringen die Nukleusmembran [227]. Die Integration der Virus-DNA im Nukleus erfolgt an einer spezifischen Stelle auf dem Chromosom 19, kann aber auch zur Schädigung von Genabschnitten führen [216, 225, 228, 229]. In wissenschaftlichen und klinischen Studien werden meist Vektoren verwendet, die auf dem Serotyp AAV-2 beruhen und nur einen Promotor, die Ziel-DNA und eine Polyadenylierungssequenz enthalten [223, 229]. AAV-2 basierte Vektoren zeigen Langzeitstabilität der Ziel-DNA in der Zielzelle, sowie eine geringe Immunogenität und Pathogenität [229]. Sie zeigen aber häufig nur geringe Transduktionseffizienzen [229, 230].

Bei der Infektion nicht-neuronaler Zellen im lytischen Zyklus bindet das humane **Herpes Simplex Virus** mittels Glykoproteinen an die Wirtszellmembran, wobei das Nukleokapsid ins Zytoplasma

freigesetzt wird und anschließend via Mikrotubuli zum Nukleus transportiert. Hier dockt das Kapsid an Nukleus-Poren an und die virale DNA wird in den Nukleus freigesetzt, wo sie unmittelbar zirkularisiert [231]. Für die Transduktion von hMSCs werden meist HSV-1 Amplikon Vektoren benutzt [232-234]. In ihrer Struktur und Immunogenität sind diese identisch zu dem HSV-1 Wildtyp, enthalten aber ein Concatemer-Plasmid anstelle des viralen Genoms und sind defektive, Helfer-abhängige Vektoren [235]. Eine Besonderheit von Herpes Simplex Virus-Vektoren ist die Möglichkeit bis zu 40-50 kb Ziel-DNA in das virale Genom zu integrieren [216].

Das **Vaccinia Virus** gelangt mittels Endozytose in die Wirtszelle gefolgt von der Freisetzung des Virions in das Zytoplasma [236, 237]. Hier erfolgt in sogenannten Virusfabriken die Replikation der viralen DNA [215, 238, 239]. Diese transiente Transfektion führt infolge der Zellteilung zu geringerer Nachweisbarkeit nach längeren Zeiträumen. Weiterhin ist ein Vaccinia Virus vermittelter DNA-Transfer auf sich teilende Zellen beschränkt [215, 240-246].

Bei  **$\gamma$ -Retroviren** erfolgt die Infektion der Wirtszelle ebenfalls über Endozytose gefolgt von der Kapsidfreisetzung im Zytoplasma. Hier werden die virale RNA und die Reverse Transkriptase freigesetzt. Durch die Nutzung der Wirtszellkapazitäten und der Reversen Transkriptase wird die virale RNA in dsDNA umgesetzt, die im weiteren Verlauf in das Wirtszellgenom integriert wird [170, 247-250]. Da diese Integration zufällig und insbesondere an Promotorstellen geschieht, kommt es häufig zum unbeabsichtigten Gen-Silencing und Insertionsmutagenese mit anschließender Malignität [249, 251-253]. Außerdem führt der Replikationsmechanismus von  $\gamma$ -Retroviren häufig zu Mutationen und verursachte im Mausmodell Krebs [170, 172, 247, 248]. Aufgrund dessen werden derzeit häufig Integrase- oder Replikationsdefiziente  $\gamma$ -Retroviren entwickelt und untersucht [251]. Ein weiterer Nachteil besteht in der Einschränkung des DNA-Transfers auf sich teilende Zellen [249]. Nichtsdestotrotz werden  $\gamma$ -Retroviren in einigen Studien zur Stammzellmarkierung und -monitoring verwendet [254-256].

**Lentiviren** sind ein Teil der Retroviren-Familie mit ähnlich aufgebautem Genom [257]. Im Gegensatz zu anderen Retroviren ist das Lentivirus in der Lage die Nukleusmembran zu passieren und infiziert nicht nur sich teilende Zellen [257-259]. Die Nukleus-Infektion durch Lentiviren ist noch nicht vollständig erforscht, ein verbreitetes Modell ist aber der Wirtszell-Importweg über eine Nukleus-Lokalisationssequenz, über den Wirtszellproteine mit einer spezifischen Kernimportsequenz durch Kanalproteine in den Nukleus gelangen. Hierbei wird die Nukleus-Lokalisationssequenz abgetrennt. Nichtsdestotrotz haben aber auch andere Proteine (wie das Virale Protein R, das lentivirale Matrixprotein GAG) einen Einfluss auf den Transport der Lentivirus-DNA in den Nukleus [257, 260]. Diese Systeme sind redundante Nukleusimportwege des Lentivirus und erlauben den Import trotz einer möglichen Deletion eines einzelnen Importweges [260]. Aufgrund der Langzeitstabilität im Genom der Zielzelle wird der Lentivirus-

vermittelte DNA-Transfer häufig für die hMSC-Markierung eingesetzt. Jedoch integrieren Lentivirus-Vektoren zufällig in das Zielzellgenom und können so zu unbeabsichtigtem Gen Silencing und Insertionsmutagenese mit folgender Malignität führen [171]. Im Vergleich zum  $\gamma$ -Retroviren ist dies aber unwahrscheinlicher, da Lentiviren bevorzugt in Transkriptionseinheiten und nicht regulatorische Stellen integrieren [252, 253, 261, 262]. Die erste Generation an nutzbaren lentiviralen Vektoren war HIV-1 basiert, dessen ursprüngliches Hüll-Glykoprotein durch VSV-G ersetzt wurde, einem Hüllprotein des Vesikulären Stomatitis-Virus. Dies führte u.a. zu einem breiteren Wirtszellspektrum; zuvor waren HIV-1-Vektoren beschränkt auf CD4+ Zellen, während VSV-G an Phosphatidylserin, einem ubiquitären Bestandteil der Lipidmembran, bindet [258, 259, 263]. In der zweiten LV-Generation wurden weitere Gene entfernt, so dass ein Vektor nur die *gag*, *pol*, *tat*, und *rev* Gene enthielt, ein zweiter Vektor die Hüllproteine und ein drittes sogenanntes Transfer-Plasmid die Ziel-DNA [264, 265]. Bei Lentivirus-Vektoren der dritten Generation befinden sich *gag*, *pol*, und *rev* Gene aufgeteilt auf zwei verschiedenen sogenannten Packaging Plasmiden, während das *tat* Gen entfernt wurde [266]. Diese Art des lentiviralen Vektor-Systems wurde ebenfalls für andere Lentiviren entwickelt wie HIV-2 und FIV [258, 267]. Das Prinzip der lentiviralen Transduktion ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

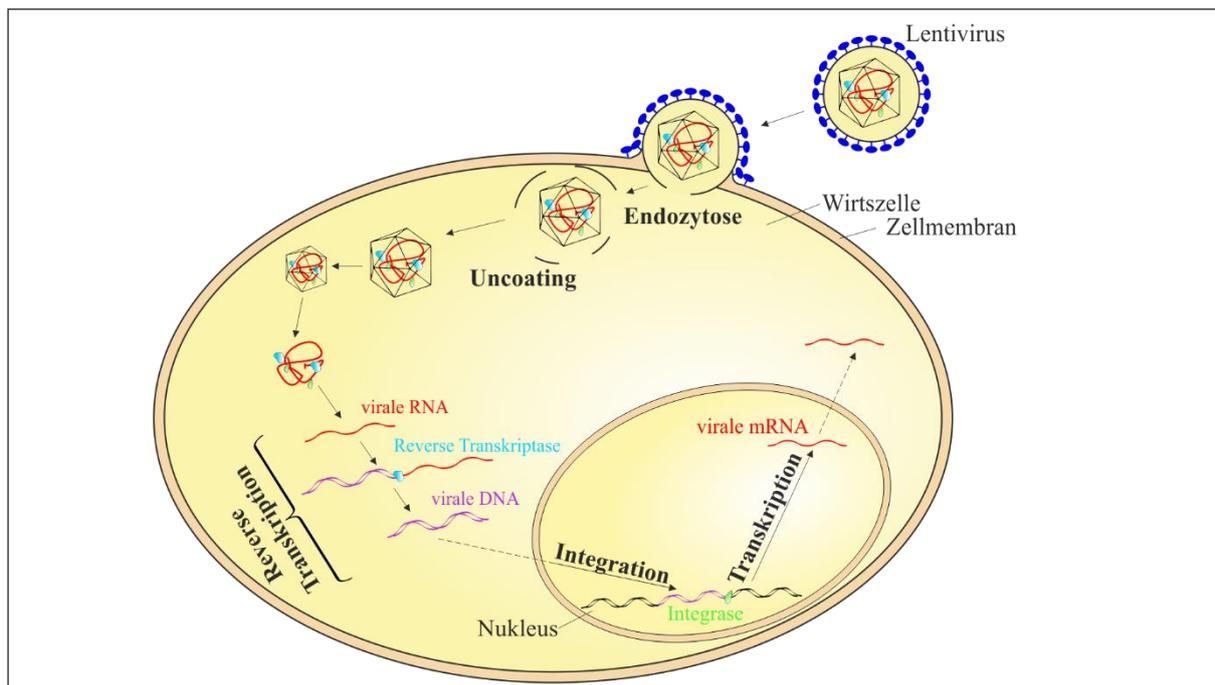


Abbildung 3.4: Prinzip der lentiviralen Transduktion nach Kajaste-Rudnitski 2015 [268].

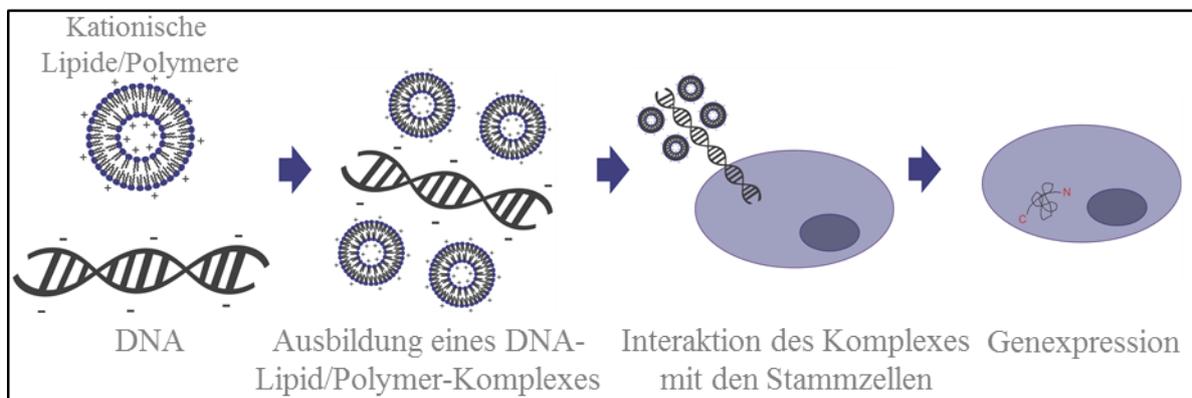
### 3.4.2 NICHT-VIRALER DNA-TRANSFER

Nicht-viraler DNA-Transfer kann in drei Gruppen eingeteilt werden: Reagenz-basierte Transfektion, physikalische Transfektion und biologische Transfektion.

### 3.4.2.1 Reagenz-basierte Transfektion

Die *Lipofektion* wird in einem breiten Spektrum für den DNA-Transfer verwendet. Hierbei handelt es sich um eine simple Methode, bei der kationische Lipide einen Komplex mit dem negativ geladenen DNA-Rückgrat bilden. Dieser Komplex interagiert mit der Zellmembran der Zielzelle und kann so in die Zelle gelangen. Dies kann zum einen liposomal geschehen (es bilden sich Liposomen, Vesikel oder Mizellen) oder durch eine non-liposomale Komplexbildung mittels kationischer Lipide [269, 270].

Auch *kationische Polymere* sind positiv geladen und können ebenfalls wie auch die kationischen Lipide mit dem negativ geladenen DNA Rückgrat interagieren. Der entstehende Polymer-DNA-Komplex kann dann über Endozytose oder Makropinozytose in die Zielzellen gelangen. Das am häufigsten verwendete kationische Polymer zur hMSC Transfektion ist Polyethylenimin (PEI) [271, 272]. Diese Methoden führen zu einem transienten DNA-Transfer und können in Hochdurchsatzsystemen verwendet werden. Nichtsdestotrotz erreicht man hiermit bei hMSCs nur geringe Transfektionseffizienzen und es wurden in einigen Studien zytotoxische Effekte und ein veränderter Phänotyp der hMSCs festgestellt [271, 273, 274]. Weiterhin sind beide Methoden sensitiv für verwendete Medium-Bestandteile wie Antibiotika und Serum, was die klinische Anwendung stark erschwert [271]. Das Prinzip der Transfektion mittels Lipofektion bzw. kationischer Lipide ist in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 3.5: Schematischer Ablauf der Transfektion mittels Lipofektion bzw. kationischer Polymere.**

Eine weit verbreitete chemische Transfektionsmethode ist die Verwendung von *Calciumchlorid* und Ziel-DNA in einer Saline/Phosphat-Pufferlösung. Das entstehende Präzipitat kann via Endozytose oder Phagozytose von den Zielzellen aufgenommen werden. Diese Methode ist einfach und kostengünstig, aber erreicht nur geringe Transfektionseffizienzen in hMSCs, die sich weiterhin bei kleinen pH-Wert-Änderungen deutlich verringern [271, 275].

### 3.4.2.2 Physikalische Transfektion

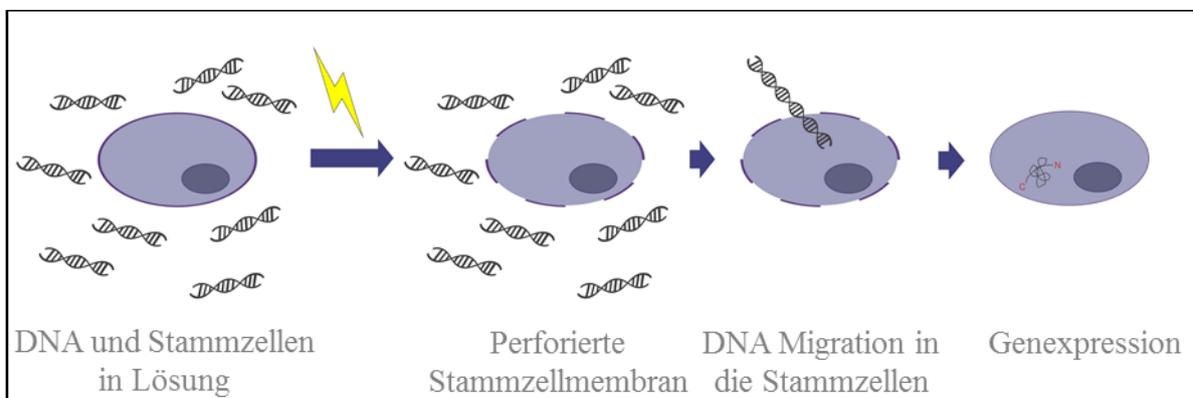
Bei der *Magnetofektion* wird die Ziel-DNA an magnetische Nanopartikel gebunden. Durch ein angelegtes Magnetfeld wird der DNA-Nanopartikel-Komplex in adhärenente Zielzellen eingebracht. Diese transiente Methode ist schnell und führt zu hohen Transfektionseffizienzen, jedoch werden spezifische Partikelgrößen (50 nm bis 5 µm) benötigt, die Herstellung der mit reiner DNA komplexierten Nanopartikel ist schwierig und je nach Abstand der einzelnen Zellen in der Probe zum Magneten verändert sich die Transfektionseffizienz [276-280].

Die sogenannte *Genkanone* ist eine relativ neue, einfache und schnelle Methode des DNA-Transfers. Mikropartikel werden mit der Ziel-DNA beschichtet und mit hoher Geschwindigkeit auf die Zielzellen „geschossen“. Diese Methode hat eine hohe Reproduzierbarkeit, führt aber zu niedrigen Transfektionseffizienzen und ist arbeitsintensiv [281-283].

Bei der *Mikroinjektion* wird reine DNA direkt in die einzelnen Zielzellen injiziert [284]. Da jede einzelne Zelle separat transfiziert werden muss, ist diese Methode mit einem hohen Arbeitsaufwand verbunden [281, 284].

Bei der *Laserfektion* wird mithilfe eines Laserstrahls eine große Anzahl an adhärenenten Zellen permeabilisiert. Dies erlaubt den DNA-Transfer aus dem umgebenden Medium in die Zielzellen und führt zu hohen Transfektionseffizienzen [285, 286].

Alle oben genannten physikalischen Transfektionsmethoden benötigen spezielles Equipment und sind kostenintensiv [281, 282, 286]. Eine günstigere physikalische Transfektionsmethode ist die *Elektroporation*. Die Membranen der Zielzellen werden in einer Küvette durch ein angelegtes elektrisches Feld permeabilisiert, wodurch DNA aus der Umgebung in die Zielzellen gelangt. Einige Studien konnten zeigen, dass diese Methode selbst keinen negativen Einfluss auf die Zellstrukturen und die biologische Funktion von humanen Primärzellen hat [287-290]. Der schematische Ablauf der Elektroporation ist in **Abbildung 3.6** dargestellt.



**Abbildung 3.6: Schematischer Ablauf der Transfektion mittels Elektroporation.**

Eine spezielle aber kostenintensivere Variante der Elektroporation ist die *Nukleofektion*, bei der durch einen elektrischen Puls und zellspezifische Reagenzien die Ziel-DNA in den Nukleus der Zielzellen gelangen kann [291-294].

#### 3.4.2.3 Biologische Transfektion

CRISPR-Cas9-HDR ist eine neue Methode aus dem Jahr 2015 für die Änderung und das Einbringen von DNA in Zielzellen. Cas-Proteine enthalten sogenannte Guide-DNA, über die sie bestimmte Nukleotidsequenzen in den Zielzellen erkennen, binden und schneiden können. Die geschnittene DNA wird anschließend mithilfe der Homologie-geregelten Reparatur repariert, wobei die Ziel-DNA in das Genom eingebaut wird [295, 296]. Die Guide-DNA kann für den gezielten Einbau von DNA in der Zielzelle spezifisch an die Zielposition im Genom angepasst werden [295, 296]. Trotz erster vielversprechender Ergebnisse in der Gentherapie wurden bereits in einigen Studien ungewollte DNA Modifikationen an nicht angezielten Stellen im Genom festgestellt [297-300].

#### 3.4.3 VERGLEICH DER VERSCHIEDENEN METHODEN DES DNA-TRANSFERS

Jede der oben beschriebenen DNA-Transfermethoden hat Vor- und Nachteile für die Anwendung in der hMSC-Markierung. Eine ideale Methode existiert nicht. Daher müssen die Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden für jede Anwendung abgewogen werden. Am wichtigsten für diese Anwendung ist der Ausschluss von Toxizitäten, eine hohe Transfektionseffizienz, eine hohe Langzeit-Nachweisbarkeit, ein mögliches *in vivo* Monitoring und die Vermeidung einer Genom-Veränderung. Ein Vergleich der verschiedenen DNA-Transfermethoden bezüglich dieser Eigenschaften findet sich in der nachfolgenden **Tabelle 3.2**.

**Tabelle 3.2: Vorteile (“+”) und Nachteile (“-“) der verschiedenen DNA-Transfermethoden.** (“-/+“= Es existieren Studien, die jeweils entweder positive oder negative Eigenschaften der beschriebenen Methode bzgl. der betrachteten Eigenschaft beschreiben; [169-173, 215, 273, 274, 276, 287-290, 301-306]).

	DNA Transfer Methode	Toxizität	Transfektions-effizienz (>50 %)	Langzeit Nachweis-barkeit	<i>In vivo</i> Monitoring	Genetische Modifikation
<b>Virale Transduktion</b>	Adenovirus	-	-	-	+	-/+
	Adeno-assoziierter Virus	-/+	+	+	+	-
	Herpes Simplex Virus	-	+	-	+	+
	Vaccinia Virus	-	+	-	+	+
	Retrovirus	-	+	+	+	-
	Lentivirus	-	+	+	+	-
<b>Reagenz-basierte Transfektion</b>	Lipofektion	+	-	-	+	+
	Kationische Polymere	+	-	-	+	+
	CaCl <sub>2</sub>	+	-	-	+	+
<b>Physikalische Transfektion</b>	Magnetofektion	+	+	-	+	+
	Genkanone	+	-	-	+	+
	Mikroinjektion	+	+	-	+	+
	Laserfektion	+	+	-	+	+
	Elektroporation	+	-	-/+	+	+
<b>Biologische Transfektion</b>	CRISPR-Cas9/HDR	-/+	+	+	+	-

#### 4 PRAKTISCHER TEIL

Um autolog transplantierte hMSCs nach der Injektion zu identifizieren, ist es nötig, ein verlässliches System zur Zellmarkierung zu entwickeln. Diese Zellmarkierung sollte möglichst **(1) effizient und verlässlich sein, (2) nachweisbar sein über die gesamte Lebensdauer der hMSCs im Patienten oder für die Dauer der in vitro Anwendung und (3) den biologischen Phänotyp nicht verändern**. Hierbei sind nicht-virale DNA-Transfer-Methoden besonders vielversprechend, da sie nicht die hohen Sicherheitsbedenken aufwerfen wie virale Methoden (z.B. Mutagenese, Zytotoxizität, mögliche immunologische Reaktionen). In der vorliegenden Arbeit wurden eine reagenzbasierte und eine physikalische Methode des DNA-Transfers für aus Fettgewebe isolierte humane mesenchymale Stammzellen (AD-hMSCs) untersucht: Die Lipofektion und die Elektroporation. Diese Methoden wurden ausgewählt, da sie einfache und kostengünstige Methode darstellen, die häufig für Primärzellen verwendet werden und dort zu keinen Veränderungen in den Zellcharakteristika führen [287-290]. Zusätzlich zu diesen nicht-viralen Methoden wurde eine lentivirale Transduktion der AD-hMSCs durchgeführt, die trotz der hohen Risiken aufgrund von gebildeten Malignitäten eine Standardmethode des DNA-Transfers in hMSCs darstellt [307].

Als DNA für die Markierung von AD-hMSCs kommen zwei DNA Varianten infrage: Reportergene oder Nonsens-DNA, die wiederum eigene Vor- und Nachteile mit sich bringen. Der Reportergen-Transfer erlaubt *in vivo* und *in vitro* Monitoring, und markiert nur lebende Zellen, während Nonsens-DNA eine Identifikation von sowohl lebenden als auch toten Zellen zulässt, aber prinzipiell nur *ex vivo* Zell-Identifikation zulässt. Durch eine zusätzliche Markierung von Nonsens-DNA könnte aber ein *in vivo* und *in vitro* Monitoring ermöglicht werden (beispielsweise in oberflächlichem Gewebe mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen und Fluoreszenzbasierter Bildgebung; siehe **Kapitel 3.4**).

Nach Etablierung und Optimierung der Elektroporationsmethode (siehe **Kapitel 4.2.1**) und dem Vergleich mit dem lentiviralen Gentransfer (siehe **Kapitel 4.2.3**), wurde in dieser Arbeit sowohl ein Reportergentransfer als auch ein Nonsens-DNA-Transfer durchgeführt und der Einfluss der verschiedenen DNA-Varianten auf die Zelleigenschaften der AD-hMSCs überprüft (siehe **Kapitel 4.2.5**). Weiterhin wurde darauf geachtet, dass die Markierung multimodal nachgewiesen werden kann. Hierzu wurde eine fluoreszenzmarkierte Nonsens-DNA verwendet, die sowohl durch quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) als auch über das Fluoreszenzsignal per Durchflusszytometrie nachweisbar ist.

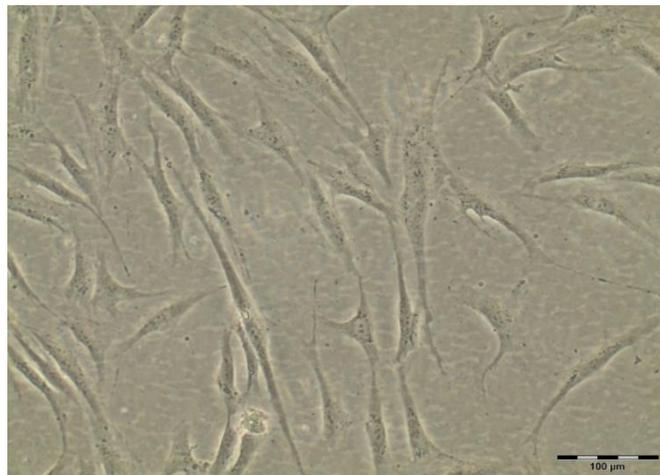
#### 4.1 ZELLISOLATION UND CHARAKTERISIERUNG

Die Isolation von AD-hMSCs aus dem Fettgewebe erfolgte nach dem Protokoll im **Anhang D.1**. Die isolierten Zellen wurden untersucht hinsichtlich charakteristischer MSC-Eigenschaften. Hierzu gehörte adhärentes Wachstum auf Plastikoberflächen, die Differenzierungskapazität hin zu Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten sowie ein charakteristisches Profil der Oberflächenantigenexpression [20]. Um weiterhin die Passagen zu bestimmen, in denen ein exponentielles Wachstum stattfindet, wurde das Zellwachstum über 20 Passagen untersucht.

##### 4.1.1 PLASTIKADHÄRENZ UND MORPHOLOGIE

Im Laufe der Isolation wurden nur die Zellen selektiert, die auf Plastik adhärent waren (siehe **Anhang D.1**). Weiterhin wurden die isolierten und kryokonservierten Zellen der Passage 2 revitalisiert und drei Tage unter kultiviert. Die Bewertung erfolgte mittels Phasenkontrastmikroskopie.

Die folgende **Abbildung 4.1** zeigt adhärentes Wachstum der isolierten Zellen auf einer Plastikoberfläche. Die Zellen zeigen die typische Fibroblasten-ähnliche Morphologie von MSCs.

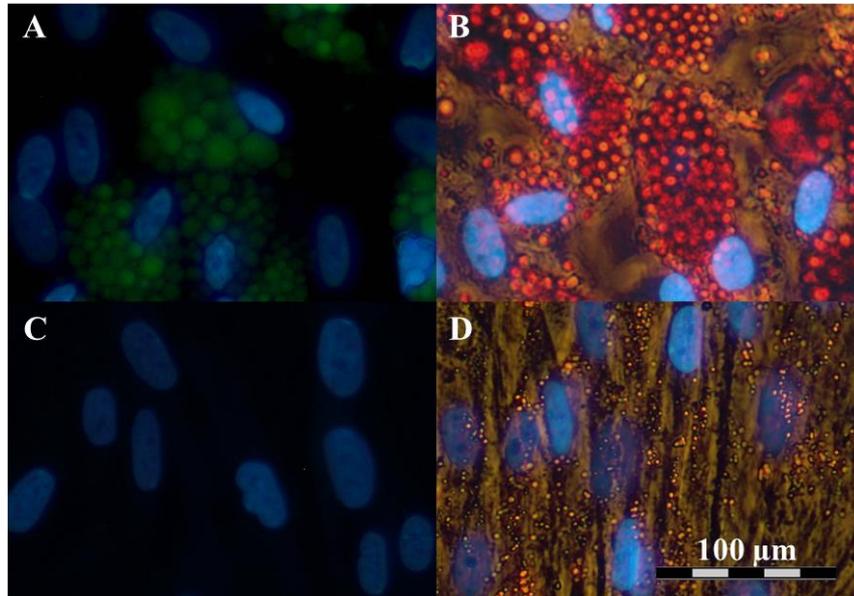


**Abbildung 4.1: Zellwachstum der isolierten Zellen in Passage 2.** Die Phasenkontrastaufnahme erfolgte nach drei Tagen Kultivierung in Vollmedium unter Standardkultivierungsbedingungen nach Revitalisierung mit 20x Vergrößerung, Messbalken entspricht 100 µm.

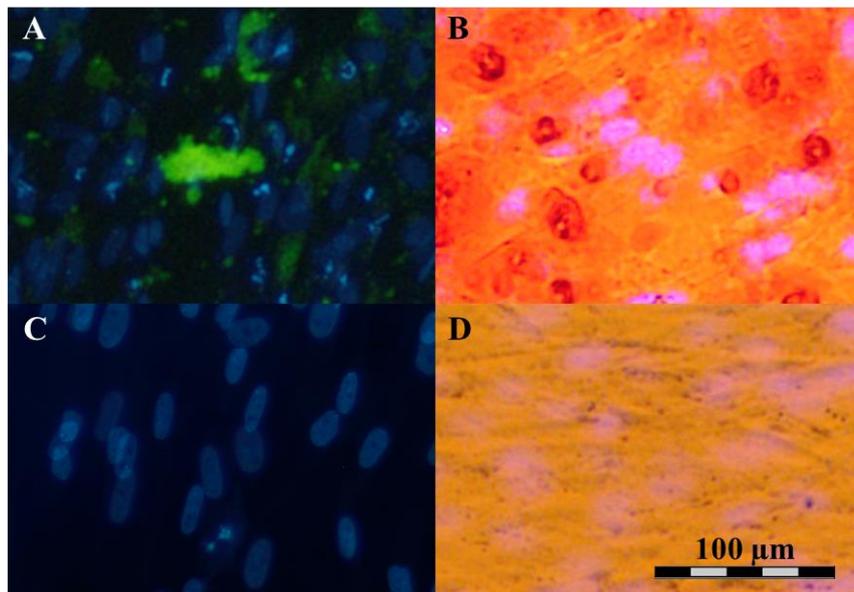
##### 4.1.2 DIFFERENZIERUNGSKAPAZITÄT DER ISOLIERTEN ZELLEN

Als zweites Kriterium zur Identifikation von MSCs wurde die Fähigkeit der *in vitro* Differenzierung zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten untersucht (siehe **Anhang D.8**). Hierzu wurden die isolierten Zellen bei Standardbedingungen bis zur nahezu vollständigen Konfluenz kultiviert. Nach weiteren 21 Tagen in Differenzierungsmedium wurden die Zellen fixiert und mithilfe von zelltypspezifischen Farbstoffen gefärbt. Die Färbung von in Adipozyten gebildeten Lipidtröpfchen erfolgte mittels Oil Red O und BODIPY, die von Kalziumakkumulationen durch gebildete

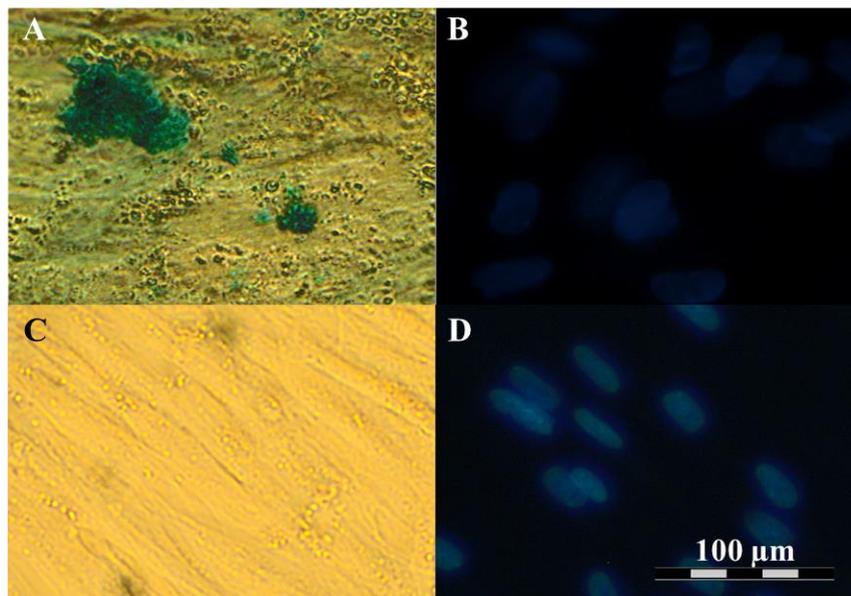
Osteoblasten erfolgte mittels von Kossa und Calcein-Färbung, die und die von durch Chondrozyten gebildeten Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix mittels Alcianblau (siehe Anhang D.8)



**Abbildung 4.2: Adipogene Differenzierungskapazität der isolierten Zellen in Passage 2.** Die isolierten Zellen wurden nach Revitalisierung in Passage 2 drei Tage bis zur vollständigen Konfluenz in Vollmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in adipogenem Differenzierungsmedium (A, B) oder zur Kontrolle in Vollmedium (C, D) kultiviert. Nach 21 Tagen erfolgte die Visualisierung intrazellulärer Lipidtröpfchen mittels BODIPY (A, C) und Oil Red O (B, D); Die Zellkerne wurden mithilfe von DAPI (A, C; blau) gefärbt; Messbalken entspricht 100 µm.



**Abbildung 4.3: Osteogene Differenzierungskapazität der isolierten Zellen in Passage 2.** Die isolierten Zellen wurden nach Revitalisierung in Passage 2 drei Tage bis zur vollständigen Konfluenz in Vollmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium (A, B) oder zur Kontrolle in Vollmedium (C, D) kultiviert. Nach 21 Tagen erfolgte die Visualisierung von extrazellulären Kalziumakkumulationen mittels Calcein (A, C; grün) und Alizarin Rot (B, D; rot); Die Zellkerne wurden mithilfe von DAPI (A, C; blau) gefärbt; Messbalken entspricht 100 µm.



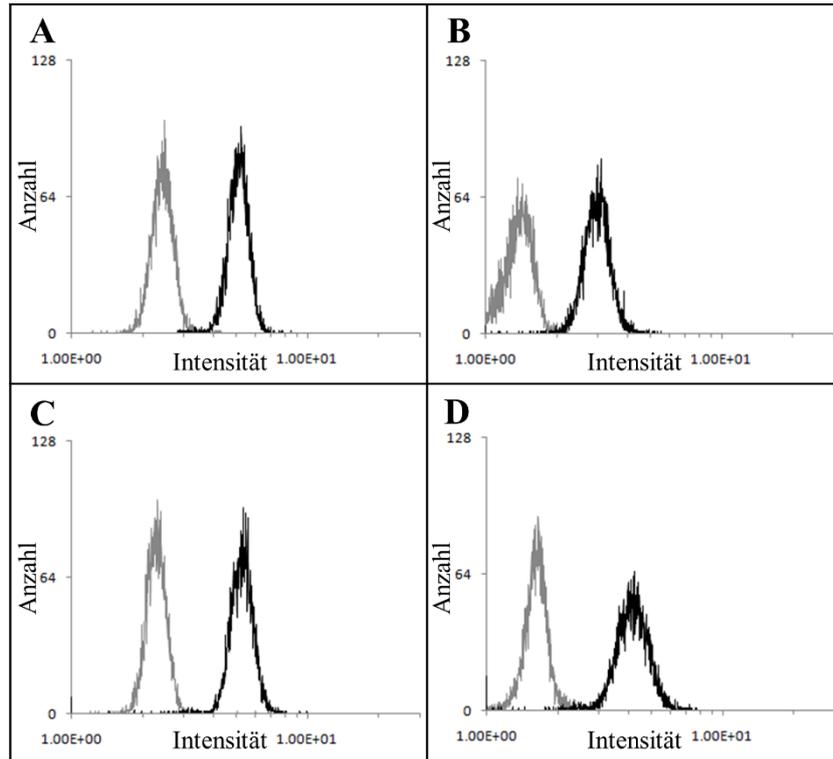
**Abbildung 4.4: Chondrogene Differenzierungskapazität der isolierten Zellen in Passage 2.** Die isolierten Zellen wurden nach Revitalisierung in Passage 2 drei Tage bis zur vollständigen Konfluenz in Vollmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in chondrogenem Differenzierungsmedium (A, B) oder zur Kontrolle in Vollmedium (C, D) kultiviert. Nach 21 Tagen erfolgte die Visualisierung von Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix mittels Alcianblau (A; blau); Die Zellkerne wurden mithilfe von DAPI (B, D; blau) gefärbt; Messbalken entspricht 100 µm.

Aus **Abbildung 4.2** bis **Abbildung 4.4** ist eindeutig eine positive Differenzierungskapazität zu Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten zu erkennen. Nach erfolgter Kultivierung in den Differenzierungsmedien sind die gebildeten intrazellulären Lipidtröpfchen (adipogene Differenzierung), extrazellulärer Kalziumakkumulation (osteogene Differenzierung) bzw. extrazellulärer Proteoglykanansammlungen (chondrogene Differenzierung) anhand von spezifischen Färbungen in den untersuchten Proben eindeutig als positiv zu erkennen, während in den Negativkontrollen keine zelltypspezifischen Färbungen zu sehen sind.

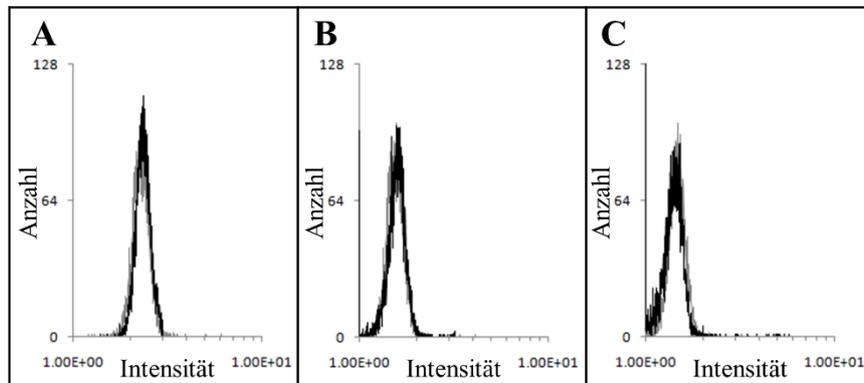
#### 4.1.3 IMMUNOPHÄNOTYP-CHARAKTERISIERUNG DER ISOLIERTEN ZELLEN

Zur Immunophänotyp-Charakterisierung von MSCs empfiehlt die ISCT eine Expression bestimmter Oberflächenantigene in  $\geq 95\%$  der untersuchten Zellpopulation (CD105, CD73 und CD90) sowie eine fehlende Expression bestimmter Oberflächenantigene in  $\geq 98\%$  der untersuchten Zellpopulation (CD31, CD34 und HLA Klasse II). Isolierte Zellen in der Passage 2 wurden nach Kultivierung unter Standardbedingungen mithilfe von spezifischen PE-, PE-Cy5- oder FITC- konjugierten Antikörpern mittels Durchflusszytometrie untersucht (siehe **Anhang D.7** und **D.15**).

In den folgenden **Abbildung 4.5** und **Abbildung 4.6** sind die Histogramme der Immunophänotypcharakterisierung dargestellt. In **Tabelle 4.1** wurden die zugehörigen Expressionsraten zusammengefasst.



**Abbildung 4.5: Durchflusszytometer-Analyse der Oberflächenantigenexpression der isolierten Zellen in Passage 2.** Graue Linien zeigen die Isotypkontrollen, schwarze Linien die spezifischen Antikörper: CD44 (A), CD73 (B), CD90 (C), CD105 (D).



**Abbildung 4.6: Durchflusszytometer-Analyse der Oberflächenantigenexpression der isolierten Zellen in Passage 2.** Graue Linien zeigen die Isotypkontrollen, schwarze Linien die spezifischen Antikörper: CD31 (A), CD34 (B), CD45 (C).

**Tabelle 4.1: Oberflächen-Immunphänotyp-Charakterisierung der isolierten Zellen in Passage 2**

Antigen	Expressionsrate [%]
CD44	99.31
CD73	99.86
CD90	99.62
CD105	99.23
CD31	0.04
CD34	0.03
CD45	0.00

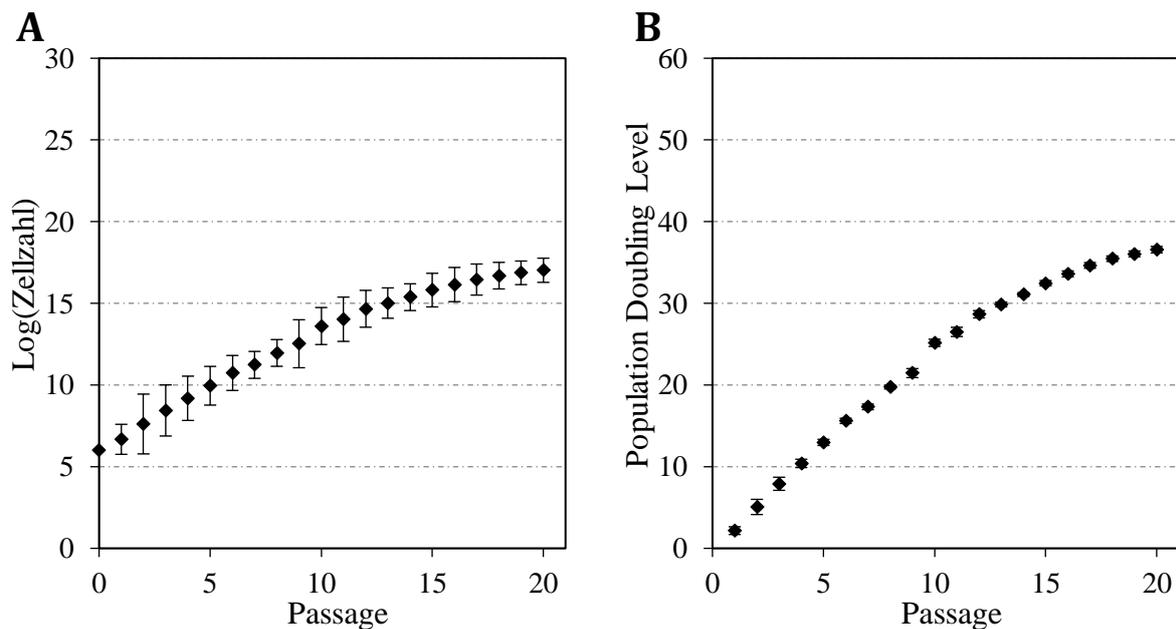
Anhand dieser Ergebnisse ist zu erkennen, dass die isolierten Zellen den von der ISCT als charakteristisch definierten Immunphänotyp aufweisen: CD44, CD73, CD90 und CD105 werden

jeweils von  $\geq 95\%$  der untersuchten Zellen exprimiert, während  $\leq 2\%$  der untersuchten Zellen CD31, CD34 und CD45 exprimieren.

Insgesamt erfüllen die isolierten Zellen alle MSC-spezifischen Charakteristika: adhärenes Wachstum auf Plastikoberflächen, Differenzierung zu Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten sowie der typische MSC-Immunophänotyp. Daher wurden die isolierten Zellen als MSCs definiert und werden fortan als AD-hMSCs bezeichnet.

#### 4.1.4 ZELLWACHSTUM

Zusätzlich zu diesen MSC-spezifischen Zellcharakteristika wurde das Zellwachstum der AD-hMSCs untersucht, um die Passagen eines exponentiellen Zellwachstums zu bestimmen. Hierzu wurde das sogenannte Population Doubling Level und die Verdopplungszeit bestimmt. (siehe **Anhang D.5, Gleichungen (D-1) und (D-2)**). Das Population Doubling Level beschreibt die gesamte kumulierte Anzahl der Verdopplungen seit Beginn der Kultivierung; die Verdopplungszeit beschreibt die durchschnittliche Zeit, in der sich die Zellzahl verdoppelt hat. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.



**Abbildung 4.7: Zellwachstum der AD-hMSCs (A) und deren Population Doubling Levels (B).** Die isolierten AD-hMSCs wurden über 20 Passagen unter Standardbedingungen in Vollmedium kultiviert, N=3.

Es ist gut zu erkennen, dass bis zur 14. Passage ein exponentielles Wachstum mit einem Bestimmtheitsmaß von durchschnittlich größer 0.99 stattfindet. Daher wurden AD-hMSCs in den nachfolgenden Versuchen aus Passage 2 verwendet und bis maximal Passage 14 kultiviert. Außerdem wurde mittels **Gleichung (D-3)** eine durchschnittliche Verdopplungszeit von 36.7 Stunden innerhalb des exponentiellen Wachstums bestimmt.

## 4.2 MARKIERUNG VON AD-hMSCs MIT DNA

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Systems zur Markierung von AD-hMSCs und der Vergleich der Transfektionseffizienzen mit der lentiviralen Transduktion als Standardmethode des Gentransfers in AD-hMSCs. Weiterhin soll der Einfluss der optimierten Elektroporationsmethode auf die Zellcharakteristika überprüft werden und mit der lentiviralen Transduktion verglichen werden. Alle nachfolgenden Versuche erfolgten mit kryokonservierten AD-hMSCs der Passage 2, die nach Revitalisierung 3 Tage in Vollmedium unter Standardbedingungen (siehe **Anhang D.2**) kultiviert und anschließend passagiert wurden.

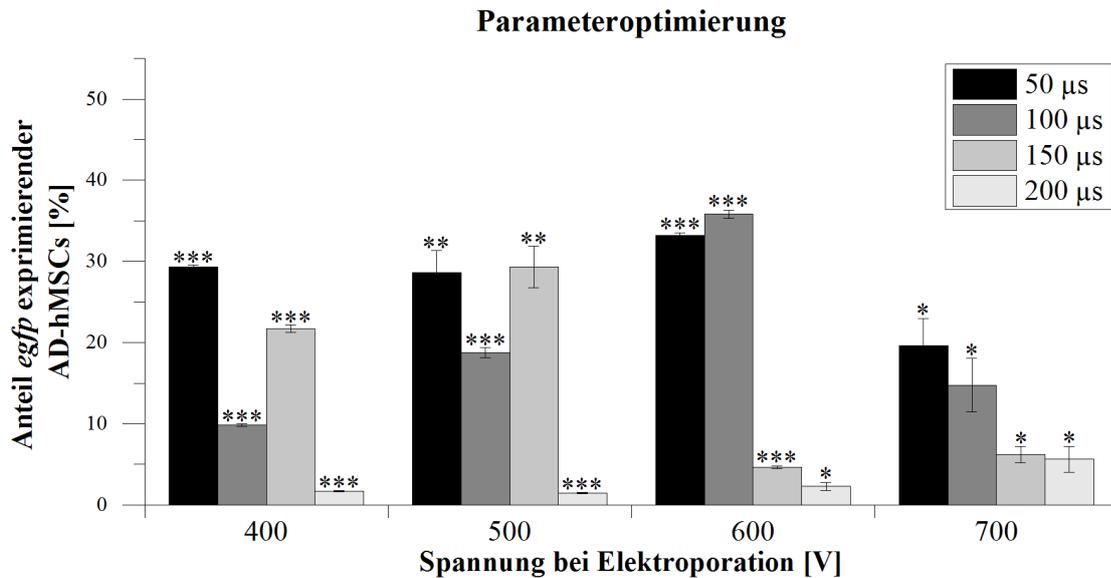
### 4.2.1 LIPOFEKTION

Eine non-liposomale Lipofektion wurde mit drei verschiedenen kommerziell erhältlichen Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt (FuGene HD von Promega sowie Promofectin und Promofectin-HUVEC von PromoCell; siehe **Anhang D.14.1**). Hierfür wurden die Zellen in 24-Well-Platten bis zu einer 70-90%igen bzw. 50-60%igen Konfluenz expandiert. Anschließend wurde ein Mix mit Konzentrationsverhältnissen von 1,5:1 bis 4:1 von Lipid-Komplex zu der Reporterplasmid-DNA (pEGFP-N1) zugegeben. Zusätzlich wurde die gesamte eingesetzte DNA-Menge für jedes Konzentrationsverhältnis in einem Wertebereich der Empfehlung des Herstellers variiert. Eine Analyse erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Alle getesteten Kits führten zu sehr niedrigen Transfektionseffizienzen mit nur vereinzelt EGFP-positiven AD-hMSCs, während in den Positivkontrollen die NIH-3T3-Zellen erfolgreich transfiziert werden konnten (siehe **Anhang E.3**). Daher wurde die Lipofektion als DNA-Transfermethode in AD-hMSCs als ungeeignet verworfen.

### 4.2.2 ETABLIERUNG DER ELEKTROPORATION ZUR AD-hMSC TRANSFEKTION

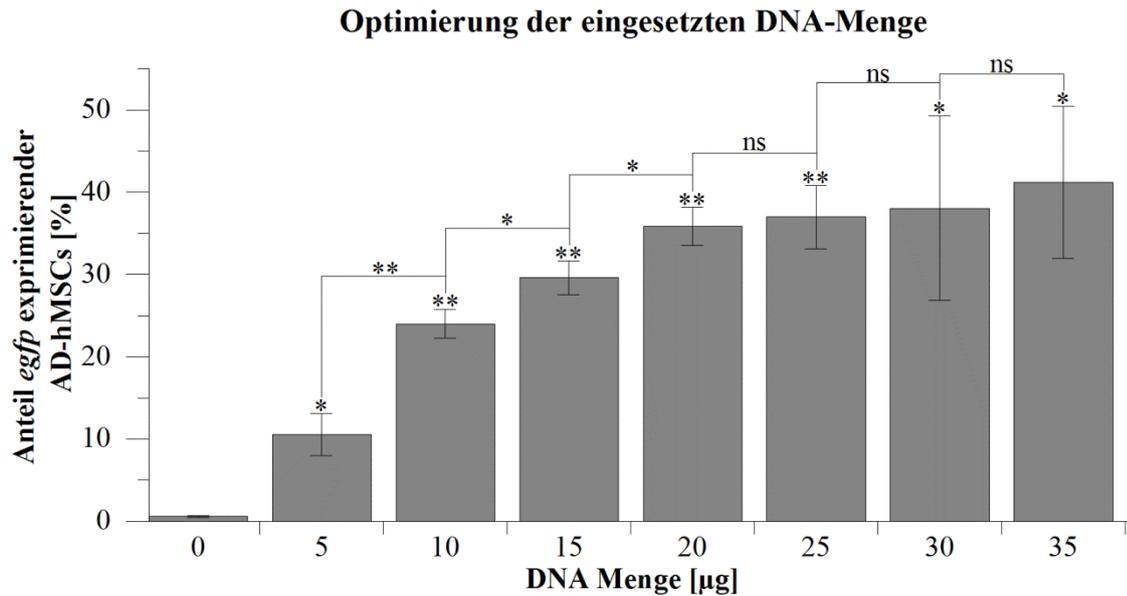
Die Transfektion mittels Elektroporation erfolgte mit  $10^6$  AD-hMSCs, 20  $\mu\text{g}$  des Reporterplasmids pEGFP-N1 und einem elektrischen Rechteckimpuls (siehe **Anhang D.14.2**). Zunächst wurden die Elektroporationsparameter Voltzahl (400-700 V) und Impulslänge (50-200  $\mu\text{s}$ ) variiert. Im Anschluss wurde die eingesetzte DNA-Menge des Reporterplasmids variiert (5-35  $\mu\text{g}$ ). Nach drei Tagen der Zellregeneration nach erfolgter Transfektion wurden die AD-hMSCs am Fluoreszenzmikroskop und mithilfe von Durchflusszytometrie untersucht (siehe **Anhang D.15**).

Die Ergebnisse der Transfektionseffizienz-Analyse mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich der verschiedenen Elektroporationsparameter sind in der nachfolgenden **Abbildung 4.9** dargestellt.



**Abbildung 4.8: Optimierung der Parameter der Elektroporation von AD-hMSCs mit dem Reporterplasmid pEGFP-N1.** Die Anzahl der *egfp* exprimierenden Zellen [in % der Gesamtzellzahl] wurde 72 h nach erfolgter Elektroporation mittels Durchflusszytometrie bestimmt. N=3, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Die Elektroporation wurde mit einem Rechteckimpuls unterschiedlicher Länge und verschiedenen Voltzahlen mit 20  $\mu$ g Marker-DNA durchgeführt.

In **Abbildung 4.8** ist zu erkennen, dass die höchste Transfektionsrate von  $35.8 \pm 0.5\%$  bei einer Voltzahl von 600 V und einer Impulslänge von 100  $\mu$ s erreicht wurde. Niedrigere Voltzahlen und Impulslängen führten zu einer geringeren Anzahl positiv markierter AD-hMSCs. Nach der Elektroporation mit Voltzahlen > 600 V und gleichzeitigen Impulslängen > 150  $\mu$ s sowie bei allen Voltzahlen und Impulslängen  $\geq$  200  $\mu$ s ist die Anzahl positiv markierter AD-hMSCs sehr stark gesunken. Die bei einem Impuls von 600 V und 100  $\mu$ s erreichte Transfektionsrate konnte außerdem mittels T-Test als signifikant unterschiedlich von allen anderen Transfektionsraten bestimmt werden. Daher wurden alle nachfolgenden Versuche mit diesen Einstellungen durchgeführt.



**Abbildung 4.9: Optimierung der eingesetzten DNA-Menge für die Elektroporation von AD-hMSCs mit dem Reporterplasmid pEGFP-N1.** Die Anzahl der *egfp* exprimierenden Zellen [in % der Gesamtzellzahl] wurde 72 h nach erfolgter Elektroporation mittels Durchflusszytometrie bestimmt. N=3, Mittelwert ± Standardabweichung. Die Elektroporation wurde mit einer Voltzahl von 600 V und einer Pulslänge von 100 µs durchgeführt. =3, Mittelwert ± Standardabweichung. \* zeigt die Ergebnisse des T-Tests im Vergleich zur Negativkontrolle; \*\*\* P≤0.001; \*\* P≤0.01; \* P≤0.05; ns = nicht signifikant unterschiedlich, P>0.05.

In **Abbildung 4.9** sind die Ergebnisse bezüglich der optimalen Menge der eingesetzten Marker-DNA dargestellt. Allgemein kann festgestellt werden, dass die Transfektionsrate mit größerer DNA-Menge ansteigt. Weiterhin ist aber zu erkennen, dass die Werte der positiv markierten AD-hMSCs ab einer eingesetzten DNA-Menge von 20 µg und höher, nicht signifikant unterschiedlich sind. In allen folgenden Elektroporationsversuchen wurde daher diese DNA-Menge von 20 µg entsprechenden 6.8 nmol eingesetzt

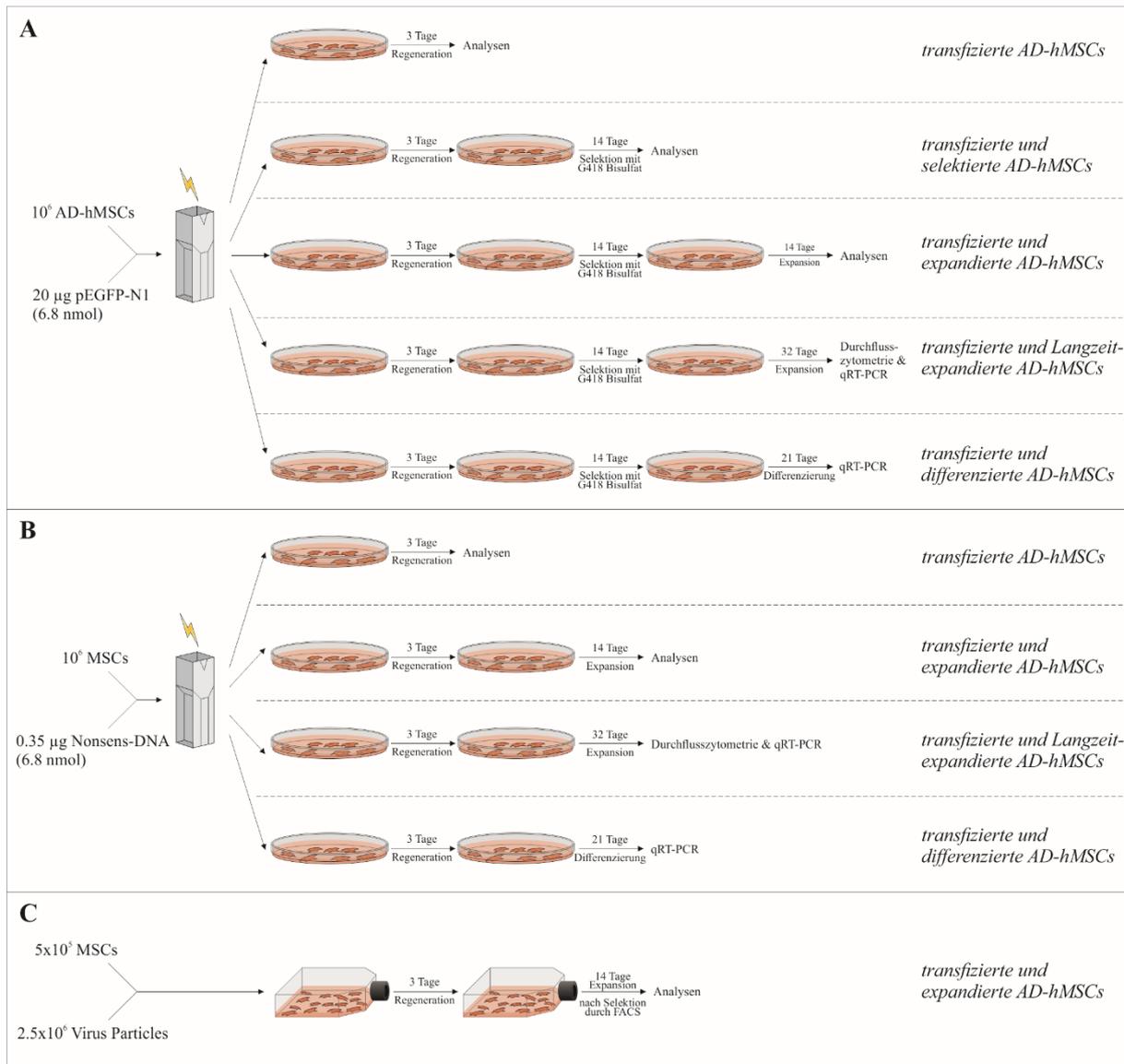
#### 4.2.3 ELEKTROPORATION VS. LENTIVIRALE TRANSDUKTION – MARKIERUNGSEFFIZIENZ UND LANGZEITSTABILITÄT

Nach erfolgter Etablierung der Elektroporation als Transfektionsmethode für AD-hMSCs, wurden die AD-hMSCs zusätzlich zur Elektroporation ebenfalls mit einem anderen *egfp*-Reporterplasmid pLVTHM lentiviral transduziert (siehe **Anhang D.14.3**), da dies eine Standardmethode in der MSC-Markierung darstellt. Weiterhin erfolgte die Elektroporation mit einem Cy3-markierten und gegen Exonuklease-Abbau geschützten dsDNA-Strang (siehe **Anhang C.10**), um eine indirekte DNA-Markierungsmethode mit der *egfp*-Markierung zu vergleichen. Nonsens-DNA-Markierung erlaubt im Gegensatz zur Reportermarkierung eine Identifikation von sowohl lebenden als auch toten Zellen, aber lässt prinzipiell nur *ex vivo* Zell-Identifikation zu. Durch eine zusätzliche Fluoreszenz-Markierung von Nonsens-DNA kann aber ein *in vivo* und *in vitro* Monitoring

ermöglicht werden (beispielsweise in oberflächlichem Gewebe mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen und Fluoreszenzbasierter Bildgebung; siehe **Kapitel 3.4**). Der Schutz gegen Exonukleasen verhindert den DNA-Abbau durch zelleigene Mechanismen der Zielzellen und dient somit der Langzeitstabilität in den AD-hMSCs.

Diese drei Methoden wurden verglichen hinsichtlich ihrer Markierungseffizienzen. Hierzu wurde der Anteil der erfolgreich markierten AD-hMSCs mittels Durchflusszytometrie untersucht (siehe **Anhang D.15**). Die Anzahl der DNA-Stränge pro Marker-positiver Zelle wurde mittels qRT-PCR bestimmt (siehe **Anhang D.13**). Weiterhin wurde die *egfp*-Expression nach Elektroporation oder lentiviraler Transduktion mit dem jeweiligen *egfp*-Plasmid qualitativ über Fluoreszenzmikroskopie und quantitativ über die mRNA-Level bestimmt und verglichen (siehe **Anhang D.13**).

Diese Untersuchungen wurden immer zu den in der folgenden **Abbildung 4.10** beschriebenen Zeitpunkten nach dem erfolgten DNA-Transfer durchgeführt.



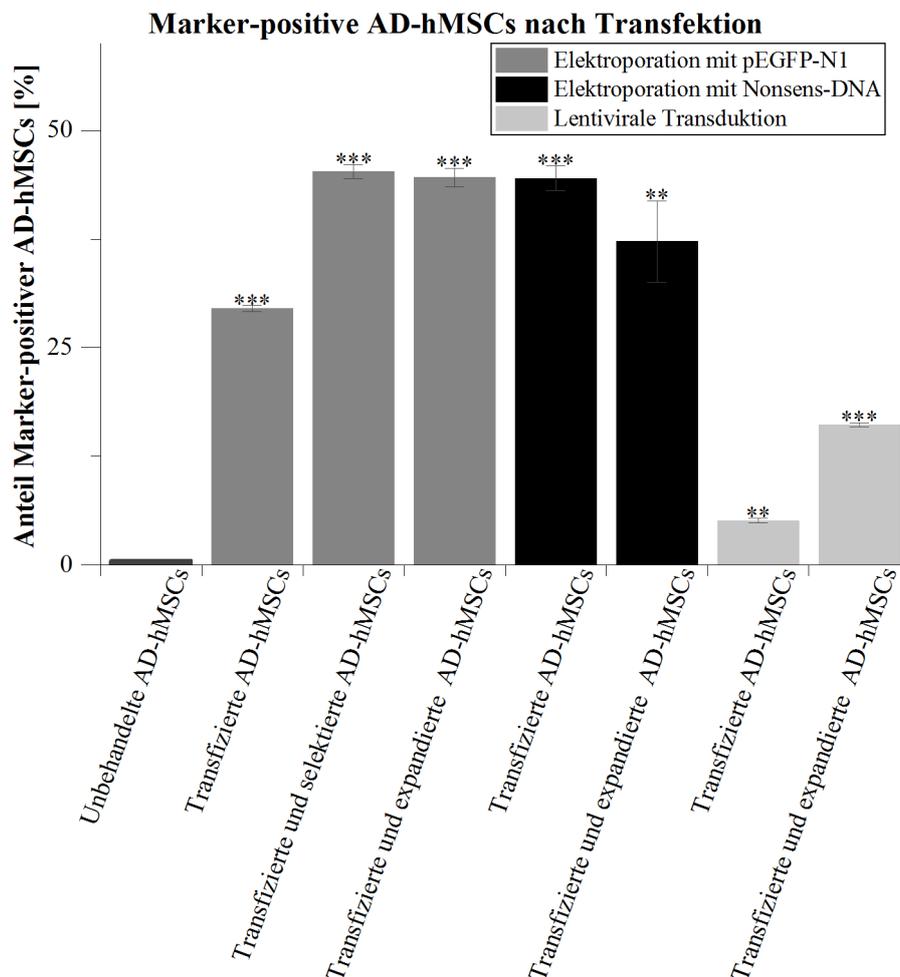
**Abbildung 4.10: Schematische Darstellung der Versuche** zum Vergleich der Elektroporation mit pEGFP-N1, die Selektion erfolgte mittels G418 Bisulfat (A), mit Nonsens-DNA (B) und Lentiviraltransduktion, die Selektion erfolgte mittels Fluoreszenz-aktivierter-Zellsortierung (engl. *fluorescence activated cell sorting*, FACS) (C).

Nach Elektroporation mit pEGFP-N1 erfolgten die Untersuchungen 3 Tage nach erfolgter Transfektion, nach anschließender 14-tägiger Selektion, sowie nach weiteren 14 Tagen unter Standardkultivierungsbedingungen (siehe **Abbildung 4.10A**). Die Selektion erfolgte dabei in Vollmedium unter Zugabe von 200 µg/ml G418 Bisulfat mit folgender Selektionswirkungsweise. Allgemein inhibiert G418 Bisulfat die Proteinsynthese in Prokaryoten und Eukaryoten und ist ab 10-100µg/ml u.a. toxisch für Säugetierzellen. Das *neo/kan* Gen, das sich auf dem verwendeten pEGFP-N1 Plasmid befindet, führt zur Produktion der Aminoglykosidase Phosphotransferase, die G418 durch Phosphorylierung deaktiviert, bevor es zum Zelltod führen kann. Für erfolgreich transfizierte Zellen ist das G418 Bisulfat somit nicht toxisch, für nicht-erfolgreich transfizierte Zellen schon. Nach Elektroporation mit Nonsens-DNA erfolgten die Analysen 3 Tage nach

Transfektion sowie nach 14 weiteren Tagen der Expansion (siehe **Abbildung 4.10B**). Nach lentiviraler Transduktion erfolgte die Selektion mittels FACS (engl. *fluorescence activated cell sorting*), was zu einer reinen EGFP-positiven Zellpopulation für die weiteren Untersuchungen führte. Die Analyse der spezifischen Zelleigenschaften erfolgte nach weiteren 14 Tagen Kultivierung bei Standardbedingungen (siehe **Abbildung 4.10C**), da die Analyse unter S1-Bedingungen erfolgte, die lentiviral transduzierten AD-hMSCs aber 14 Tage unter S2-Bedingungen kultiviert werden mussten, um sie anschließend unter S1-Bedingungen kultivieren und analysieren zu können.

#### 4.2.3.1 Markierungseffizienz und Anteil Marker-positiver AD-hMSCs nach weiterer Expansion

In der folgenden **Abbildung 4.11** sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen zur Bestimmung des Anteils der Marker-positiven Zielzellen dargestellt.



**Abbildung 4.11: Anteil erfolgreich markierter AD-hMSCs [in %] zu verschiedenen Zeitpunkten nach erfolgter Elektroporation mit dem Reporterplasmid pEGFP-N1, mit Nonsens-DNA oder nach lentiviraler Transduktion mit dem Reporterplasmid pLVTHM zu folgenden Zeitpunkten: 3 Tage nach erfolgter Transfektion (Transfizierte Zellen), nach weiteren 14 Tagen im Selektionsmedium (Transfizierte und selektierte Zellen), nach weiteren 14 Tagen Expansion in Vollmedium (Transfizierte und expandierte Zellen). N=3, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. \* zeigt die Ergebnisse des T-Tests im Vergleich zur Negativkontrolle; \*\*\*  $P \leq 0.001$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*  $P \leq 0.05$ ; ns = nicht signifikant unterschiedlich,  $P > 0.05$ .**

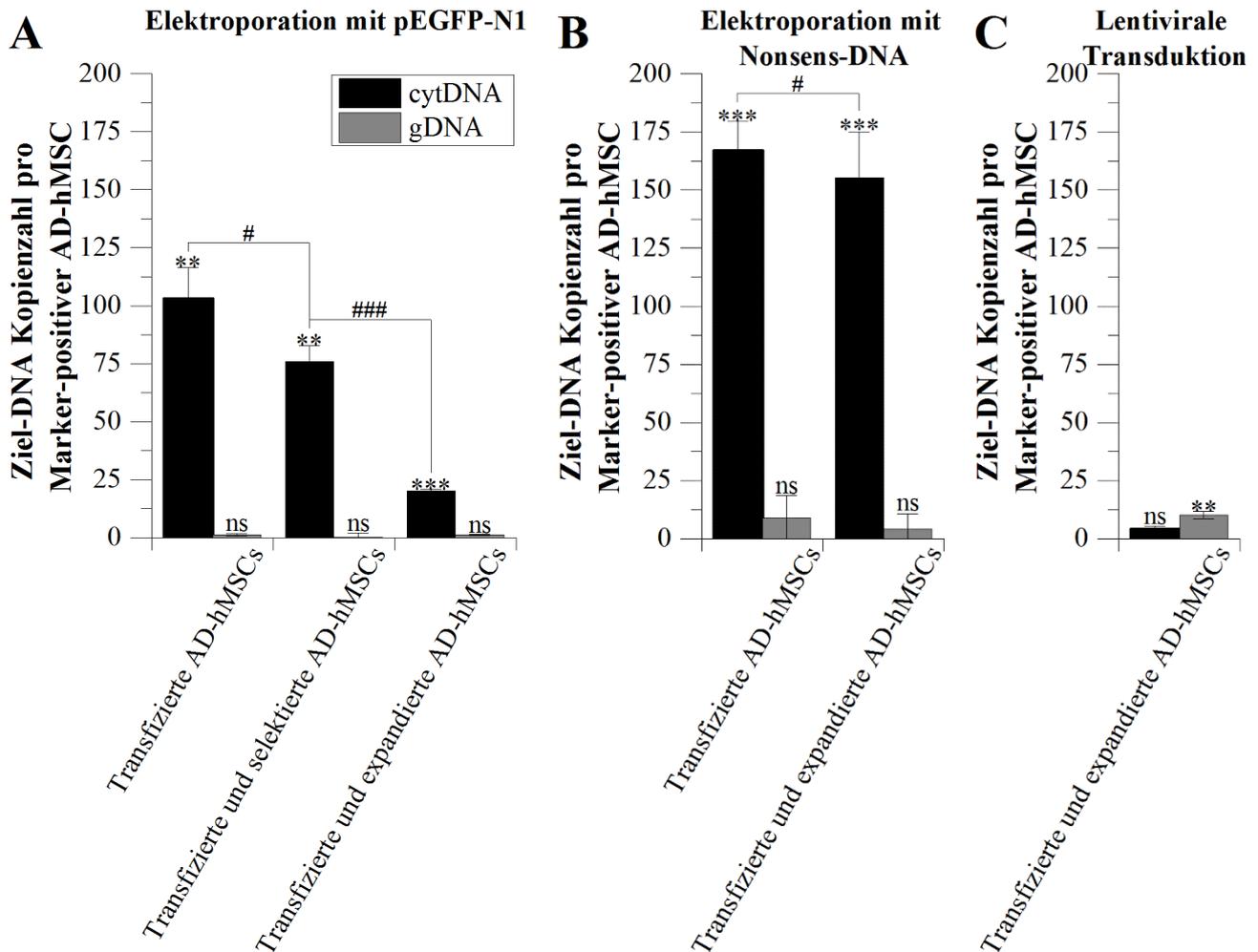
In **Abbildung 4.11** ist zu erkennen, dass die Elektroporation zu einer höheren Transfektionseffizienz führte als die lentivirale Transduktion, wobei die höchste Transfektionseffizienz von  $44.5 \pm 1.4\%$  nach Elektroporation mit Nonsens-DNA erreicht wurde. Im Vergleich waren nach Elektroporation mit dem *egfp*-Plasmid  $29.5 \pm 0.4\%$  und nach lentiviraler Transduktion  $5.1 \pm 0.3\%$  der Zielzellen Marker-positiv.

Nach Elektroporation mit dem *egfp*-Plasmid erfolgte eine 14-tägige Selektion durch G418 Bisulfat, die zu  $45.3 \pm 0.8\%$  Marker-positiver Zielzellen führte, und eine anschließende 14-tägige Expansion, nach der noch  $44.6 \pm 1.1\%$  der Zielzellen Marker-positiv waren. Nach lentiviraler Transduktion und Elektroporation mit Nonsens-DNA erfolgte anschließend ebenfalls eine Expansion von 14 Tagen. Hiernach waren  $37.2 \pm 4.7\%$  der mit Nonsens-DNA elektroporierten Zielzellen Marker-positiv und nur  $16.1 \pm 0.3\%$  der lentiviral transduzierten Zielzellen. Es konnte also gezeigt werden, dass die Elektroporation von AD-hMSCs zu höheren Transfektionseffizienzen führt als die lentivirale Transduktion. Weiterhin sind sowohl die EGFP-Marker als auch die Cy3-markierte Nonsens-DNA noch nach 14-tägiger nicht-selektiver Expansion in einer großen Prozentzahl der Zielzellen nachweisbar.

#### 4.2.3.2 Kopienzahl der Ziel-DNA in den Zielzellen

Nicht nur der Anteil der Marker-positiven Zellen ist ein Bewertungskriterium für die erfolgreiche Markierung, sondern auch die Menge der Ziel-DNA, die sich in jeder Marker-positiven Zielzelle befindet. Dieser Wert ist insbesondere dann wichtig, wenn es sich um eine transiente Transfektion handelt, da hierbei die Anzahl der Marker-DNA mit jeder Zellteilung verringert wird. Insbesondere für langfristiges Tracking von markierten Zellen ist dementsprechend eine hohe Ausgangsmenge an Marker-DNA nötig, um zu späteren Zeitpunkten eine Nachweisbarkeit in den Zellen zu garantieren.

In der folgenden **Abbildung 4.12** sind die Ergebnisse der qRT-PCR zur Untersuchung der jeweiligen Marker-DNA-Kopienzahl pro Marker-positiver Zielzelle dargestellt, jeweils aus DNA-Isolaten der zytosolischen DNA (cytDNA) und den DNA-Isolaten der totalen DNA abzüglich der Kopienzahl aus der cytDNA (gDNA). Die Konzentrationen wurden mittels Kalibrationskurve bestimmt (siehe **Anhang E.5**).



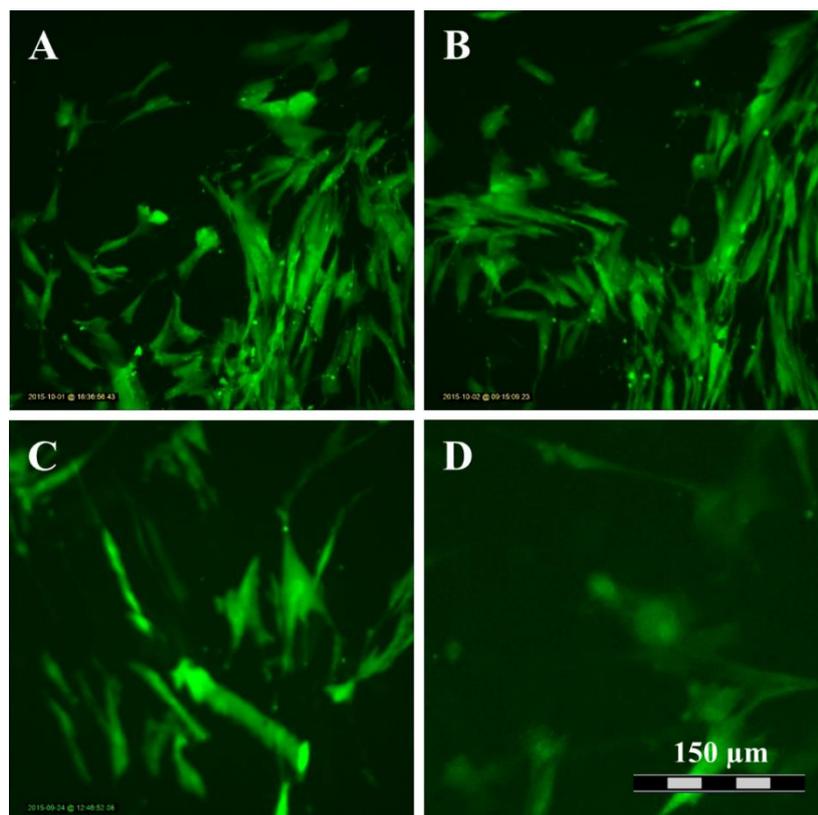
**Abbildung 4.12: Anzahl der gDNA- (genomische DNA) und cytDNA- (cytosolische DNA) Kopien pro Marker-positiver Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten.** Nach Elektroporation mit pEGFP-N1 (A), mit Nonsense-DNA (B) oder nach lentiviraler Transduktion mit pLVTHM (C); hierzu erfolgte eine qRT-PCR mit den verschiedenen DNA-Isolaten zu folgenden Zeitpunkten: 3 Tage nach erfolgter Transfektion (Transfizierte Zellen), ggf. nach weiteren 14 Tagen im Selektionsmedium (Transfizierte und selektierte Zellen), nach weiteren 14 Tagen Expansion in Vollmedium (Transfizierte und expandierte Zellen). N=3, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. \* zeigt die Ergebnisse des T-Tests im Vergleich zur Negativkontrolle; # zeigt die Ergebnisse des T-Test im Vergleich zwischen zwei verschiedenen Proben: \*\*\*/###  $P \leq 0.001$ ; \*\*/##  $P \leq 0.01$ ; \*/#  $P \leq 0.05$ ; ns = nicht signifikant unterschiedlich,  $P > 0.05$ .

Aus dem Vergleich zwischen **Abbildung 4.12A, B und C** ist zu erkennen, dass die Elektroporation zu einer hohen DNA-Kopienzahl im Zytoplasma führte (mit *egfp*-Plasmid  $103.0 \pm 13.4$  und mit Nonsense-DNA  $166.8 \pm 12.7$  DNA-Stränge pro Marker-positiver Zielzelle). Im Gegensatz dazu war die Anzahl der Ziel-DNA im Zytoplasma der Marker-positiven, lentiviral transduzierten AD-hMSCs nicht signifikant unterschiedlich zur Negativkontrolle, was aufgrund der stabilen Transfektion durch lentiviralen Gentransfer zu erwarten war. Die gDNA-Proben zeigen ebenfalls, dass der DNA-Transfer bei der Elektroporation transient erfolgte, bei der lentiviralen Transduktion hingegen stabil war. Die Anzahl der Marker-DNA nach Elektroporation unterschied sich nicht signifikant von der Negativkontrolle, nach lentiviraler Transduktion war aber Marker-DNA im Zellkern der Ziel-Zellen nachweisbar ( $10.2 \pm 1.6$  DNA-Stränge pro Marker-positiver Zielzelle).

Mit weiterer Expansion nach erfolgter Elektroporation mit *egfp*-Plasmid und Nonsens-DNA ist außerdem zu erkennen, dass die Ziel-DNA-Kopienzahl pro Marker-positiver Zielzelle zwar abnimmt, aber noch immer signifikant verschieden zu der Negativkontrolle und somit eindeutig nachweisbar ist. Im Falle der Nonsens-DNA ist sogar nur eine geringe Abnahme der Kopienzahl von  $166.8 \pm 12.7$  drei Tage nach Elektroporation auf  $155.3 \pm 19.7$  nach weiterer 14-tägiger Expansion festzustellen.

#### 4.2.3.3 *egfp*-Expression nach Elektroporation oder Lentiviraler Transduktion

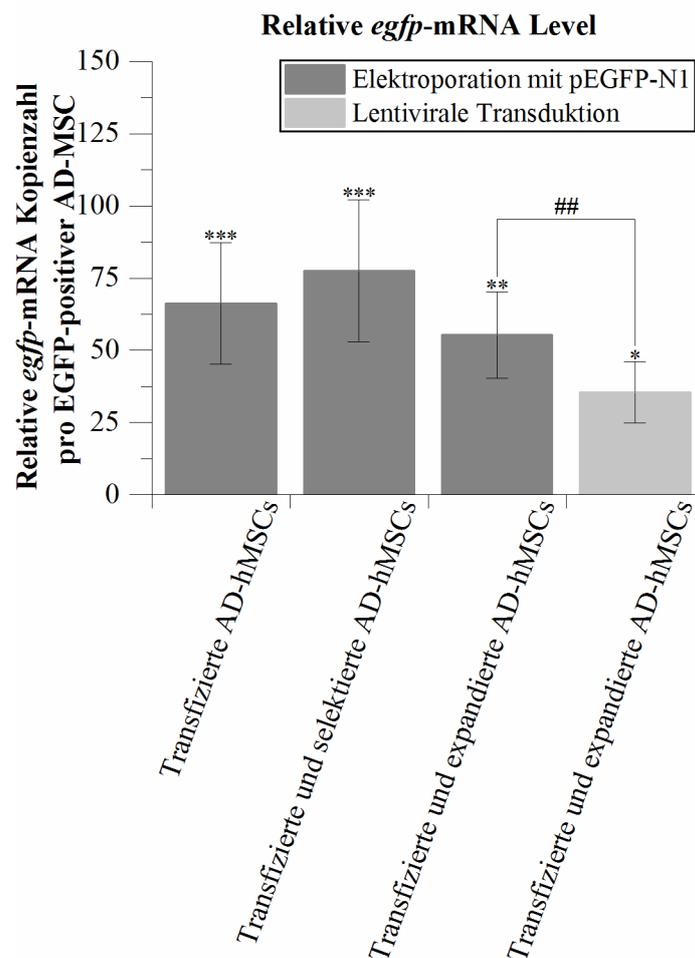
Da es sich bei der lentiviralen Transduktion um eine stabile und bei der Elektroporation um eine transiente Transfektion handelt, ist zum Vergleich des DNA-Transfer-Erfolges der Vergleich der Ziel-DNA-Stränge pro Marker-positiver Zelle nicht aussagekräftig. Viel interessanter ist hier der Vergleich der Expressionslevel des Zielgens. Daher wurde im Falle des *egfp*-Plasmid-Transfers die erfolgreiche Transfektion bzw. Transduktion auf zwei weiteren Ebene überprüft: qualitativ auf Proteinebene mittels Fluoreszenz-Mikroskop-Aufnahmen (siehe folgende **Abbildung 4.13**) und quantitativ mittels qRT-PCR auf mRNA-Ebene (siehe **Abbildung 4.14**).



**Abbildung 4.13: EGFP-Produktion nach Elektroporation mit pEGFP-N1 (A-C) oder lentiviraler Transduktion mit pLVTHM (D).** (A) Transfizierte AD-hMSCs, (3 Tage nach Elektroporation mit pEGFP-N1), (B) Transfizierte und selektierte AD-hMSCs (nach 14-tägiger Selektion mit G418 Bisulfat), (C) Transfizierte und expandierte AD-hMSCs (nach weiteren 14 Tagen Expansion in Vollmedium), (D) Transfizierte und expandierte AD-hMSCs nach lentiviraler Transduktion (nach FACS-Selektion und 14 Tagen Expansion). Alle Aufnahmen wurden mit dem Inkubator-Mikroskop LumaScope 600 (Etaluma, Inc., USA) und einem 40x Objektiv (LUCPlanFLN40X, Olympus, Japan) aufgenommen. Der Messbalken entspricht 150  $\mu\text{m}$ .

Anhand der Aufnahmen in **Abbildung 4.13** sind drei Tage nach Elektroporation (A) und nach anschließender Selektion und 14-tägiger Expansion (C) deutlich mehr EGFP-positive AD-hMSCs zu erkennen, als nach lentiviraler Transduktion und 14-tägiger Expansion (D).

Für einen quantitativen Vergleich wurden die *egfp*-mRNA-Level der transfizierten bzw. transduzierten AD-hMSCs bestimmt und miteinander verglichen. Hierzu wurde die isolierte mRNA in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR durchgeführt. Die Expressionslevel wurden mittels delta-delta-CT-Methode ermittelt (siehe **Anhang D.13**).



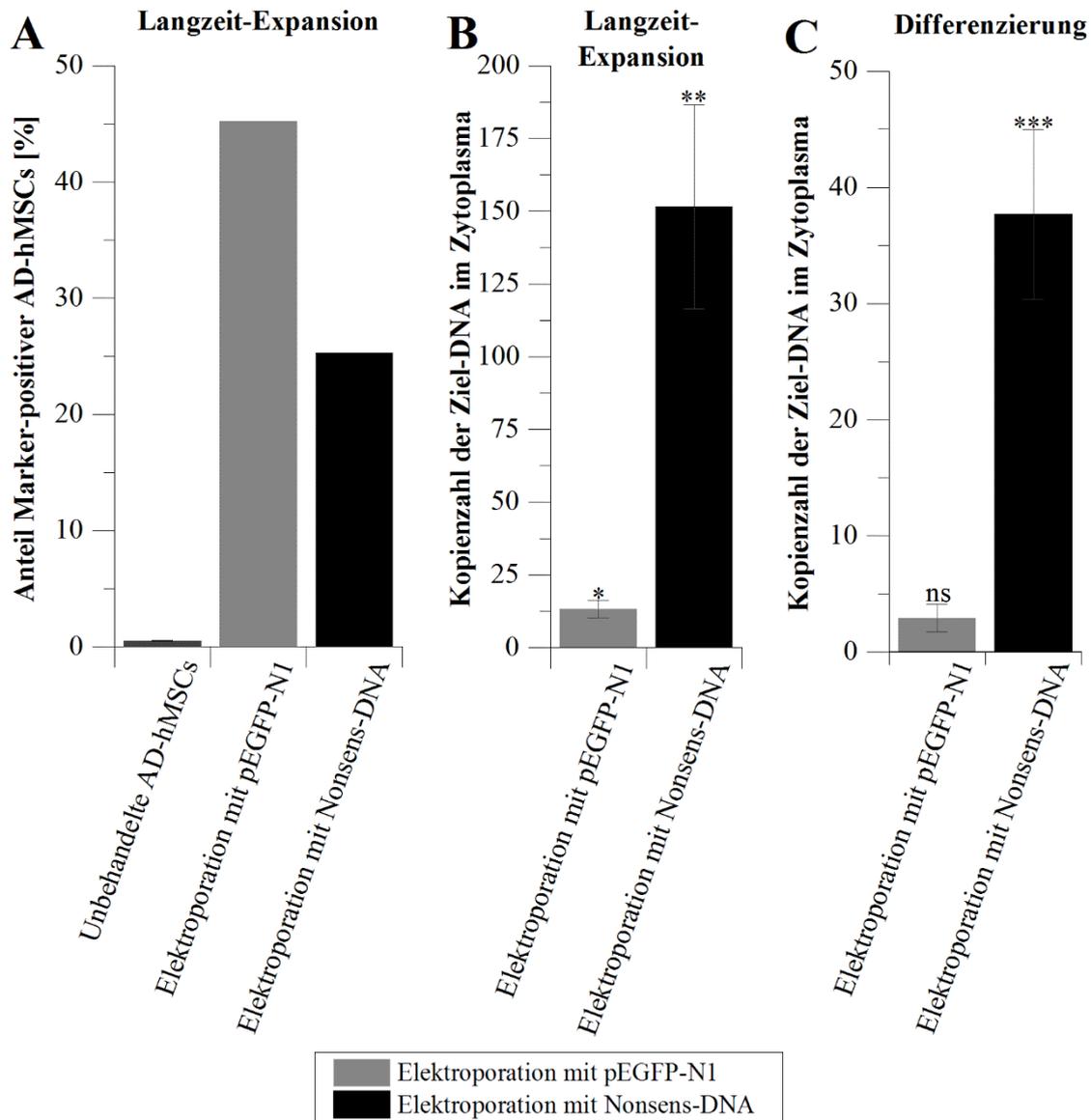
**Abbildung 4.14: Anzahl der *egfp*-mRNA-Kopien pro Marker-positiver Zelle nach Elektroporation mit pEGFP-N1 oder nach lentiviraler Transduktion mit pLVTHM.** Hierzu erfolgte eine qRT-PCR mit zu cDNA transkribierter mRNA zu folgenden Zeitpunkten: 3 Tage nach erfolgter Transfektion (Transfizierte Zellen), ggf. nach weiteren 14 Tagen im Selektionsmedium (Transfizierte und selektierte Zellen), nach weiteren 14 Tagen Expansion in Vollmedium (Transfizierte und expandierte Zellen). Werte wurden mittels delta-delta-CT-Methode ermittelt (siehe **Anhang D.13**). N=3, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. \* zeigt die Ergebnisse des T-Tests im Vergleich zur Negativkontrolle; # zeigt die Ergebnisse des T-Test im Vergleich zwischen zwei verschiedenen Proben: \*\*\*/###  $P \leq 0.001$ ; \*\*/##  $P \leq 0.01$ ; \*/#  $P \leq 0.05$ ; ns = nicht signifikant unterschiedlich,  $P > 0.05$ .

Anhand der cDNA-Proben aus den verschiedenen mRNA-Isolaten (**Abbildung 4.14**) lassen sich die Genexpressionslevel des Reportergens *egfp* vergleichen. Hierbei ist zum einen zu erkennen, dass das Expressionslevel von *egfp*-mRNA nach der Selektion am höchsten ist und mit weiterer

Expansion abnimmt. Weiterhin ist anhand des T-Test-Vergleichs zu erkennen, dass die *egfp*-Expression bei den transfizierten, expandierten AD-hMSCs nach Elektroporation signifikant höher ist als nach lentiviraler Transduktion.

#### **4.2.3.4 Langzeit-Nachweisbarkeit nach Elektroporation**

Da es sich bei der Elektroporation um einen transienten DNA-Transfer in das Zytoplasma handelt, muss die Langzeit-Nachweisbarkeit der Marker-DNA für den Vergleich mit dem Standard der lentiviralen Transduktion gezeigt werden. Hierzu wurden nach erfolgter Elektroporation mit pEGFP-N1 in einem Langzeitversuch transfizierte und selektierte AD-hMSCs für 32 weitere Tage (10 Passagen) kultiviert. Ebenso (mit Ausnahme der Selektion) wurde nach der Elektroporation mit Nonsense-DNA verfahren. Bei der klinischen Anwendung von AD-hMSCs ist nicht nur die Dauer der Marker-Nachweisbarkeit entscheidend, sondern auch, dass die Ziel-DNA nach einer gegebenenfalls notwendigen Differenzierung in den Zielzellen nachweisbar ist. Um dies überprüfen, wurde eine adipogene Differenzierung durchgeführt und ebenfalls die Ziel-DNA-Menge mittels qRT-PCR bestimmt. Die Konzentrationen der Ziel-DNA pro Marker-positiver Zelle wurden mittels Kalibrationskurve bestimmt (siehe **Anhang E.5**).



**Abbildung 4.15: Langzeit-Nachweisbarkeit mittels Elektroporation markierter AD-hMSCs.** (A) Anteil Marker-positiver AD-hMSCs [in %] nach erfolgter Elektroporation und Langzeit-Expansion mit dem Reporterplasmid pEGFP-N1 oder Nonsens-DNA, N=1; (B) Kopienzahl der Ziel-DNA im Zytoplasma pro Marker-positiver 35 Tage langzeitexpandierter Zielzelle bestimmt durch qRT-PCR, N=3; (C) Kopienzahl der Ziel-DNA im Zytoplasma pro isolierter adipogen differenzierter Zielzelle bestimmt durch qRT-PCR, Differenzierung erfolgte jeweils 3 Tage nach Elektroporation; N=3; Mittelwert ± Standardabweichung. \* zeigt die Ergebnisse des T-Tests im Vergleich zur Negativkontrolle; # zeigt die Ergebnisse des T-Test im Vergleich zwischen zwei verschiedenen Proben: \*\*/### P≤0.001; \*\*/## P≤0.01; \*/# P≤0.05; ns = nicht signifikant unterschiedlich, P>0.05.

Aus **Abbildung 4.15** ist zu erkennen, dass nach einer Langzeit-Expansion noch 45.2% der AD-hMSCs Marker-positiv mit durchschnittlich 13.2±2.9 Marker-DNA-Strängen pro EGFP-positiver Zelle im Zytoplasma waren. Nach Langzeit-Expansion der mit Nonsens-DNA elektroporierten AD-hMSCs waren 25.3% der AD-hMSCs Marker-positiv mit durchschnittlich 151.5±35.1 Marker-DNA-Strängen im Zytoplasma pro Marker-positiver Zelle. Zum Vergleich: Drei Tage nach erfolgter Nonsens-DNA-Elektroporation waren 44.5 ± 1.4% der Zielzellen Marker-positiv mit durchschnittlich 166.8 ± 12.7 Ziel-DNA-Strängen pro Marker-positiver Zielzelle; drei Tage nach

Elektroporation mit dem *egfp*-Plasmid waren  $29.5 \pm 0.4\%$  der Zielzellen Marker-positiv mit durchschnittlich  $103.0 \pm 13.4$  Ziel-DNA-Strängen pro Marker-positiver Zielzelle (siehe **Kapitel 4.2.3.1** und **4.2.3.2**).

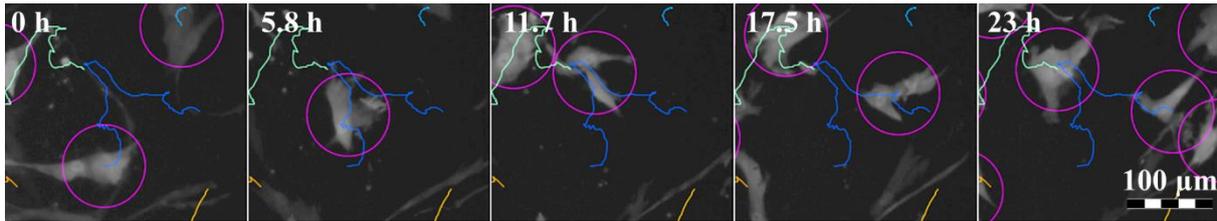
Um außerdem die Nachweisbarkeit der Marker-DNA nach einer Differenzierung zu überprüfen, wurden AD-hMSCs drei Tage nach erfolgter Elektroporation mit pEGFP-N1 bzw. Nonsens-DNA 21 Tage lang adipogen differenziert. Da nach erfolgter Differenzierung aufgrund von Zellagglomeraten keine Durchflusszytometeranalysen durchgeführt werden konnten, wurden die Zellen nur mittels qRT-PCR untersucht, bei der statt pro positiver Zelle über die Anzahl isolierter Zellen normiert wurde. Danach waren noch  $2.9 \pm 1.2$  pEGFP-N1-DNA-Stränge und  $37.7 \pm 7.3$  Nonsens-DNA-Stränge im Zytoplasma pro isolierter Zelle nachweisbar.

Diese Experimente zeigen, dass sowohl die pEGFP-N1- als auch die Nonsens-DNA nach Elektroporation nach einem langen Expansionszeitraum von 35 Tagen mittels qRT-PCR nachweisbar waren. Zudem war nach adipogener Differenzierung über 21 Tage die Nonsens-DNA in deutlich höheren Kopienzahlen als das pEGFP-N1 nachweisbar. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass im Laufe der erfolgten Zellteilung eine Verringerung der Marker-DNA im Zytoplasma stattgefunden hat.

#### 4.2.4 *IN VITRO* MONITORING MITTELS FLUORESZENZMIKROSKOPIE VON ELEKTROPORIERTEN AD-hMSCs

Die in dieser Arbeit etablierten Methoden zur AD-hMSC-Markierung sollen in zukünftigen Studien sowohl zur Erleichterung des *in vivo* als auch des *in vitro* Monitorings führen. Hierzu wurde *in vitro* ein erster Test mittels Fluoreszenz-Mikroskopie durchgeführt. Die elektroporierten AD-hMSCs wurden über einen Zeitraum von 23 Stunden mithilfe eines Inkubator-Mikroskops (LumaScope 600; Etaluma, Inc., USA) und Fijis ImageJ mit dem Plugin TrackMate verfolgt [308].

Die Nonsens-DNA-Markierung erlaubte keine Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen, da die Fluoreszenzsignale zu schwach waren. Für die EGFP-markierten AD-hMSCs hingegen, konnten Fluoreszenzaufnahmen aufgezeichnet werden. **Abbildung 4.16** zeigt exemplarische Ausschnitte einer Zeitrafferaufnahme des *in vitro* Monitorings von EGFP-markierten AD-hMSCs. In diesen Aufnahmen liegt der Fokus beispielhaft auf einer migrierenden Zelle (lilafarbener Kreis).



**Abbildung 4.16: Ausschnitte aus einer online *in vitro* Überwachung der mittels Elektroporation EGFP-markierten AD-hMSCs.** Transfizierte und selektierte AD-hMSCs wurden in Vollmedium 23 Stunden kultiviert. Mittels Inkubator-Mikroskop LumaScope 600 (Etaluma, Inc., USA) und einem 40x Objektiv wurde alle 2 Minuten ein Fluoreszenzbild aufgenommen. Einzelne EGFP-markierte Zellen (hier in hellgrau dargestellt) wurden mittels Fijis ImageJ und dem Plugin TrackMate [308] verfolgt. Dabei wurden folgende Einstellungen verwendet: LoG-Detektor mit Blob Size von 200 px; LAP-Tracker mit 25 px Abstand, Abstand zum Lückenschließen von 25 px und einer maximalen Lücke von 2 Einzelbildern. Die lilafarbenen und gelben Kreise zeigen einzelne identifizierte Zellen, die farbigen Linien zeigen die Zellmigration der einzelnen Zellen. In diesem Ausschnitt liegt der Fokus auf der migrierenden Zelle im lilafarbenen Kreis und der entsprechenden blauen Linie. Der Messbalken entspricht 100 µm.



Aus **Abbildung 4.16** geht hervor, dass die mittels Elektroporation EGFP-markierten AD-hMSCs *in vitro* erfolgreich nachverfolgt werden können. Der Weg der Zelle, die sich im lilafarbenen Kreis befindet, wurde erkannt und ist als blaue Linie dargestellt. Dies gilt auch für andere Zellen im Bildausschnitt der Aufnahmen dieses Experiments.

#### 4.2.5 ZELLEIGENSCHAFTEN NACH ERFOLGTEM DNA TRANSFER

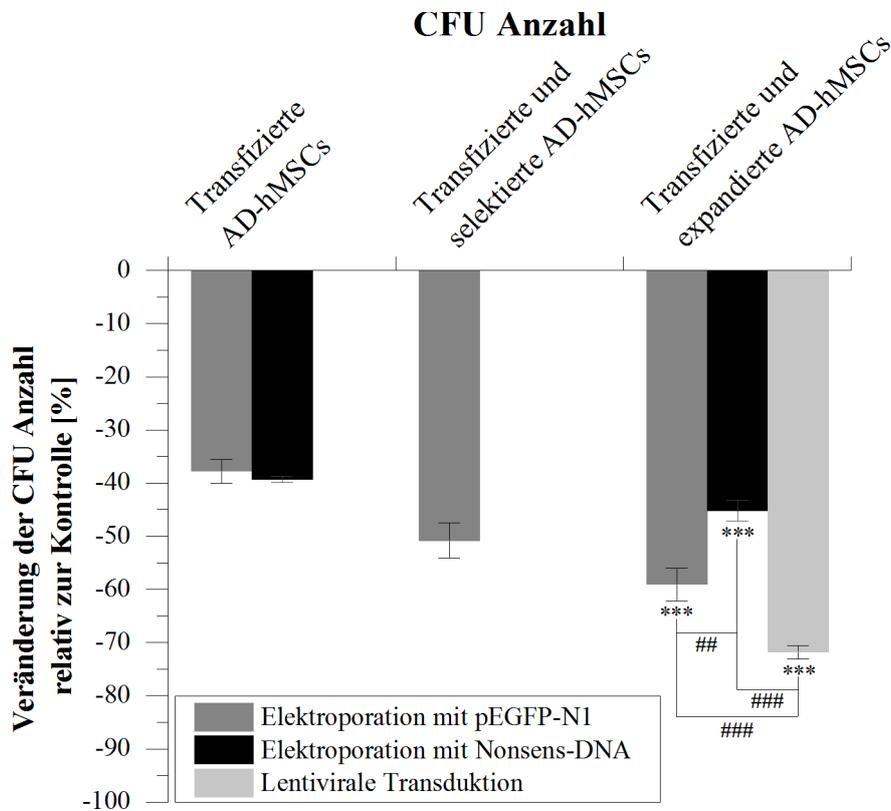
Für eine Anwendung *in vitro* und *in vivo* ist wichtig, dass die Zelleigenschaften der verwendeten AD-hMSCs erhalten bleiben. Daher wurden die Elektroporation mit pEGFP-N1 bzw. Nonsens-DNA sowie die lentivirale Transduktion hinsichtlich ihres Einflusses auf die folgenden spezifischen Zellcharakteristika der transfizierten AD-hMSCs untersucht und mit unbehandelten, nicht transfizierten Zellen verglichen: Die Anzahl der Koloniebildenden Einheiten (engl. *colony forming units*; CFUs), Seneszenz, Immunophänotyp und die Differenzierungskapazität zu Adipozyten und Osteoblasten.

Für eine übersichtliche Darstellung wurden für die verschiedenen Zeitpunkte der durchgeführten Analysen folgende Bezeichnungen verwendet (siehe auch **Kapitel 4.2.3** und **Abbildung 4.10**):

„transfizierte AD-hMSCs“	3 Tage nach erfolgtem DNA-Transfer
„transfizierte und selektierte AD-hMSCs“	Nach weiteren 14 Tagen Selektion (für egfp-Plasmid-Elektroporation)
„transfizierte und expandierte AD-hMSCs“	Nach weiteren 14 Tagen Expansion in Vollmedium

#### 4.2.5.1 Anzahl der Koloniebildenden Einheiten

Die Anzahl der Koloniebildenden Einheiten (engl. *colony forming units*, CFUs) ist ein Maß für die *in vitro* Selbsterneuerungskapazität und das Zellwachstum von MSCs [309]. Dies sind wichtige Eigenschaften für die klinische Anwendung und für *in vitro* Anwendungen. Daher wurde zu den o.g. Zeitpunkten nach erfolgtem DNA-Transfer die Anzahl der CFUs bestimmt. Hierzu wurden die Zielzellen mit einer Konzentration von 50 Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert und für 8 Tage in Vollmedium kultiviert. Nach der Fixierung wurden die Zellkolonien mit einer Kristallviolettlösung sichtbar gemacht, gezählt und mit nicht-transfizierten AD-hMSCs verglichen (siehe **Anhang D.9**). Die Ergebnisse sind in **Abbildung 4.17** dargestellt.



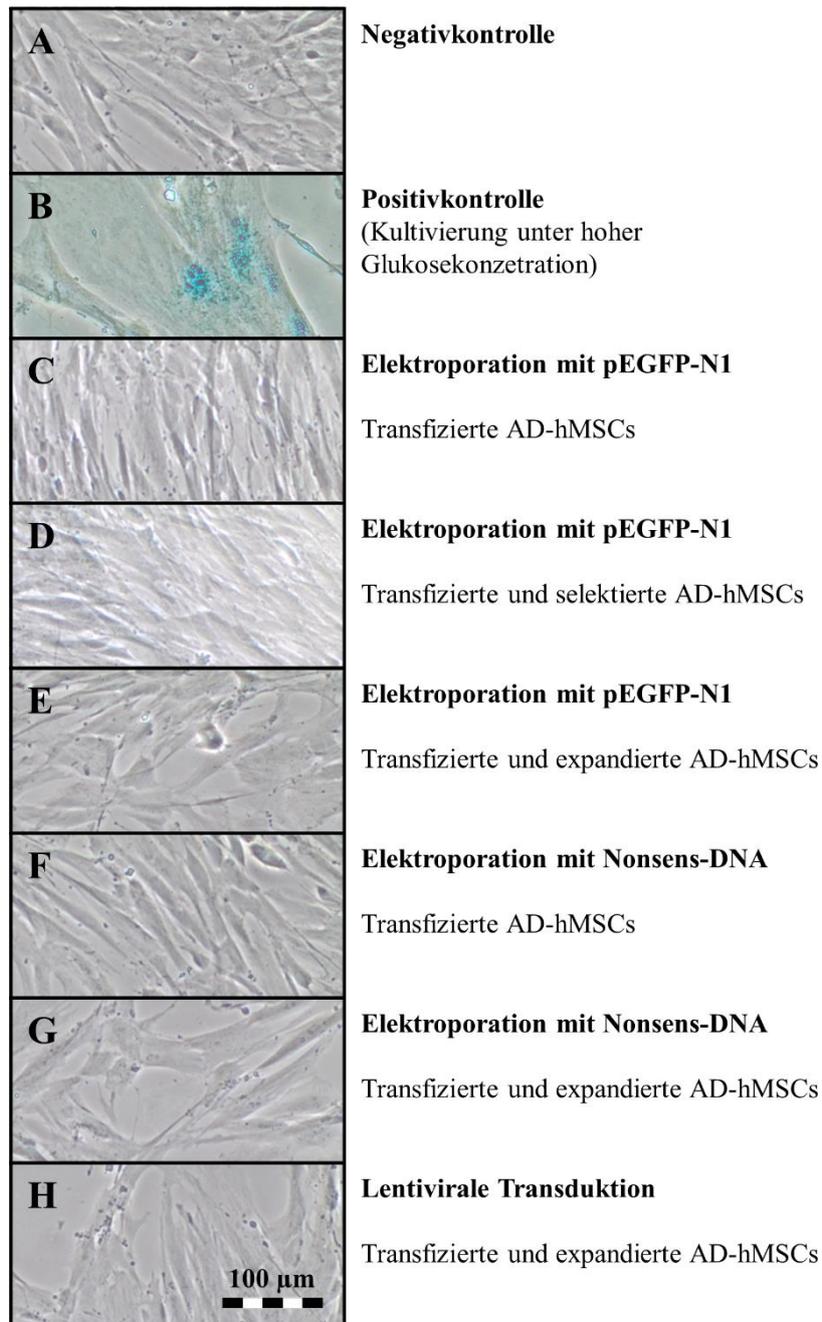
**Abbildung 4.17: Veränderung der CFU-Anzahl relativ zur Kontrolle** zu den verschiedenen Zeitpunkten nach erfolgtem DNA-Transfer mittels Elektroporation oder lentiviraler Transduktion: 3 Tage nach erfolgter Transfektion (Transfizierte Zellen), ggf. nach weiteren 14 Tagen im Selektionsmedium (Transfizierte, selektierte Zellen), nach weiteren 14 Tagen Expansion in Vollmedium (Transfizierte, expandierte Zellen). Als Kontrolle dienten nicht-transfizierte AD-hMSCs. N=3, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. \* zeigt die Ergebnisse des T-Tests im Vergleich zur Negativkontrolle; # zwischen zwei verschiedenen Proben: \*\*\*/### P $\leq$ 0.001; \*\*/## P $\leq$ 0.01; \*/# P $\leq$ 0.05; ns = nicht signifikant unterschiedlich, P>0.05.

Die CFU-Anzahl nach der Elektroporation mit pEGFP-N1 ist um 37.8% geringer als die Kontrolle, nach nachfolgender Selektion um 50.8% und nach weiterer 14-tägiger Expansion um 59.1%. Nach der Elektroporation mit Nonsens-DNA ist die CFU-Anzahl um 39.3% im Vergleich zur Kontrolle gesunken und nach weiteren 14 Tagen der Expansion um 45.2%. Nach lentiviraler Transduktion und 14-tägiger Expansion ist die CFU-Anzahl im Vergleich zur Kontrolle um 71.8% gesunken. Die

Werte nach lentiviraler Transduktion sind dabei signifikant unterschiedlich zu den Werten nach einer Elektroporation.

#### **4.2.5.2 Seneszenz**

Seneszenz beschreibt den irreversiblen Stillstand der Zellteilung, ist eine Antwort auf endogenen und exogenen Stress und wird u.a. durch onkogenen Stress ausgelöst [310]. Für die klinische Anwendung von markierten AD-hMSCs ist es wichtig, dass sie nicht aufgrund des DNA-Transfers spontan in maligne Zellen transformieren. Um zu überprüfen, ob die transfizierten bzw. transduzierten AD-hMSCs seneszent geworden sind, erfolgte zu den o.g. Zeitpunkten die Färbung seneszenten Zellen mittels  $\beta$ -Galaktosidase (siehe **Anhang D.10**). Die Ergebnisse sind in der folgenden **Abbildung 4.18** dargestellt.



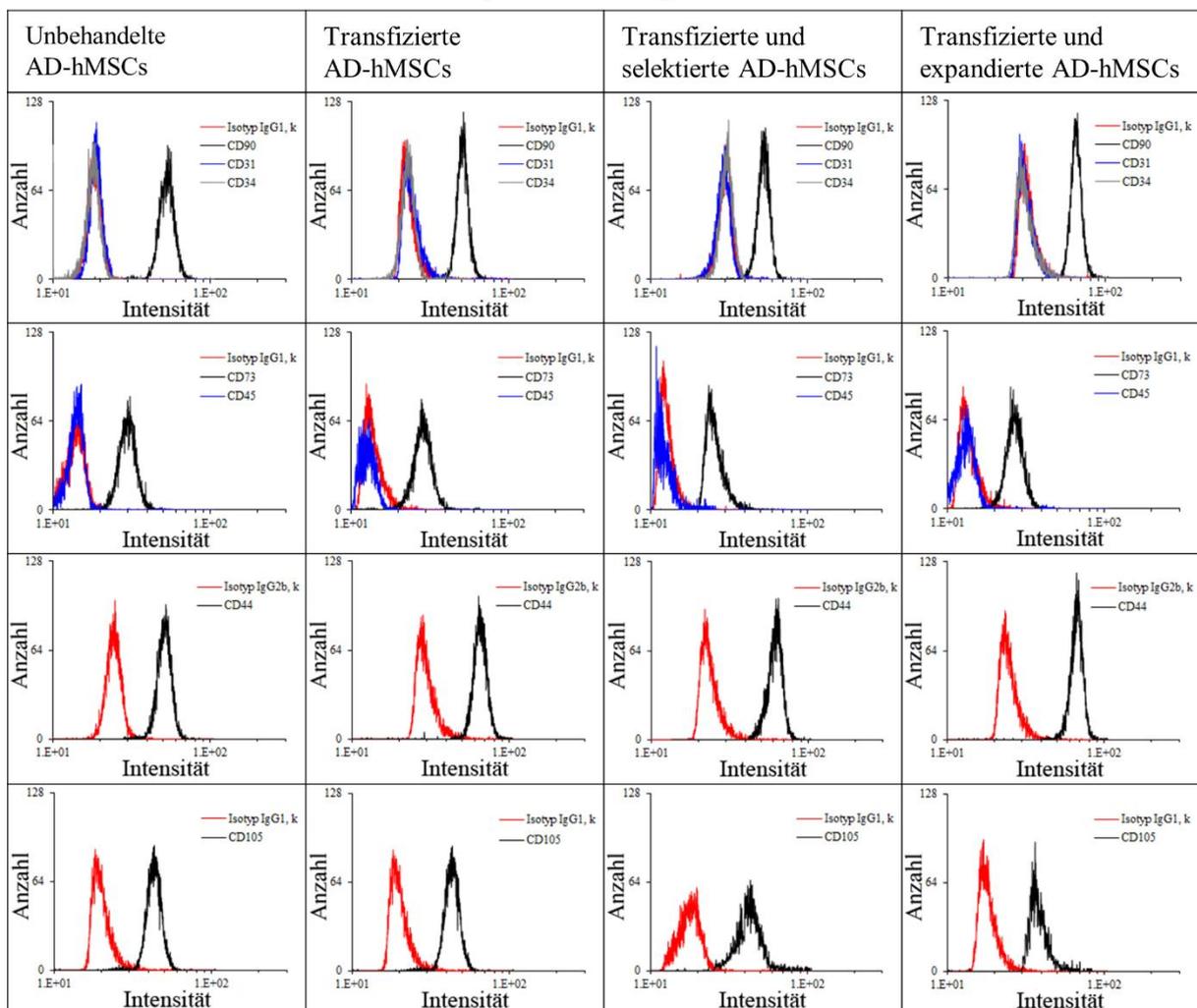
**Abbildung 4.18: Repräsentative Darstellung von Seneszenz-assoziiierter  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung**, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Elektroporation mit dem Reporterplasmid pEGFP-N1 (C-E), mit der Nonsens-DNA (F, G) oder lentiviraler Transduktion mit dem Reporterplasmid pLVTHM (H) erfolgte: 3 Tage nach erfolgter Transfektion (Transfizierte Zellen; C, F), ggf. nach weiteren 14 Tagen im Selektionsmedium (Transfizierte, selektierte Zellen; D), nach weiteren 14 Tagen Expansion in Vollmedium (Transfizierte, expandierte Zellen; E, G, H). Nicht-transfizierte AD-hMSCs dienen als Negativkontrolle (A); AD-hMSCs, die 21 Tage in hochkonzentriertem-Glukose-Medium (4.5 g/L) kultiviert wurden, dienen als Positivkontrolle (B). Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung ist anhand einer Blaufärbung der Zellen zu erkennen. Der Messbalken entspricht 100  $\mu$ m.

Anhand der fehlenden Blaufärbung in allen Proben außer der Positivkontrolle geht hervor, dass sowohl die Elektroporation als auch die lentivirale Transduktion keinen erkennbaren Effekt auf die Seneszenz der AD-hMSCs hatten.

### 4.2.5.3 Immunophänotyp

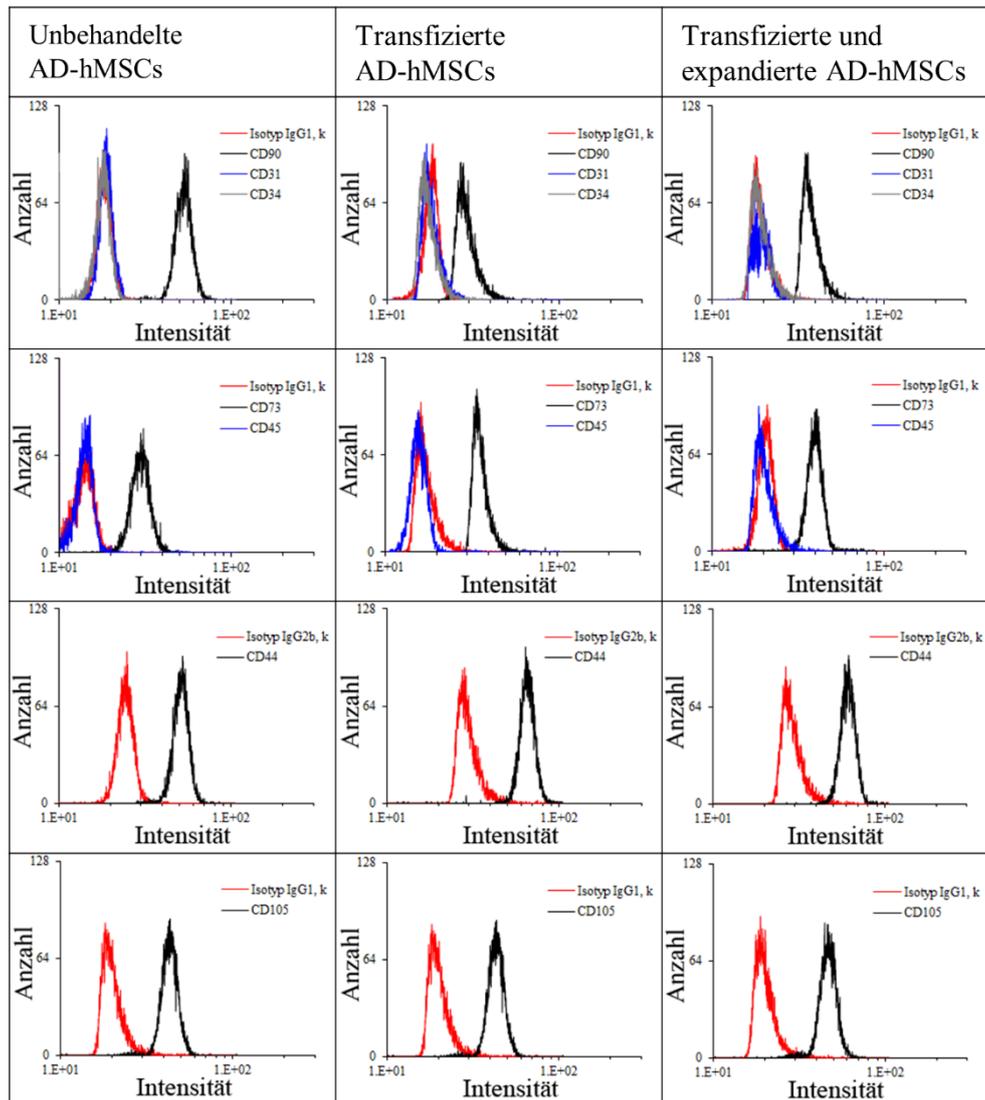
Für die Anwendung der markierten AD-hMSCs ist wichtig, dass alle charakteristischen Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen nach der Markierung erhalten bleiben. Wie bereits beschrieben, gibt es keinen einheitlichen Zellmarker, der MSCs eindeutig als solche charakterisiert. Daher wird zur Bestimmung des MSC-Immunophänotyps eine Kombination verschiedener Oberflächenantigene herangezogen: Expression in  $\geq 95\%$  der untersuchten Zellpopulation von CD105, CD73 und CD90, sowie eine fehlende Expression bestimmter Oberflächenantigene in  $\geq 98\%$  der untersuchten Zellpopulation (CD31, CD34 und HLA Klasse II) [20]. Markierte AD-hMSCs wurden zu den verschiedenen oben beschriebenen Zeitpunkten mithilfe von spezifischen PE-, PE-Cy5- oder FITC- konjugierten Antikörpern mittels Durchflusszytometrie untersucht (siehe **Anhang D.7** und **D.15**). Die Ergebnisse sind in den **Abbildung 4.19** bis **Abbildung 4.21** dargestellt.

#### Elektroporation mit pEGFP-N1



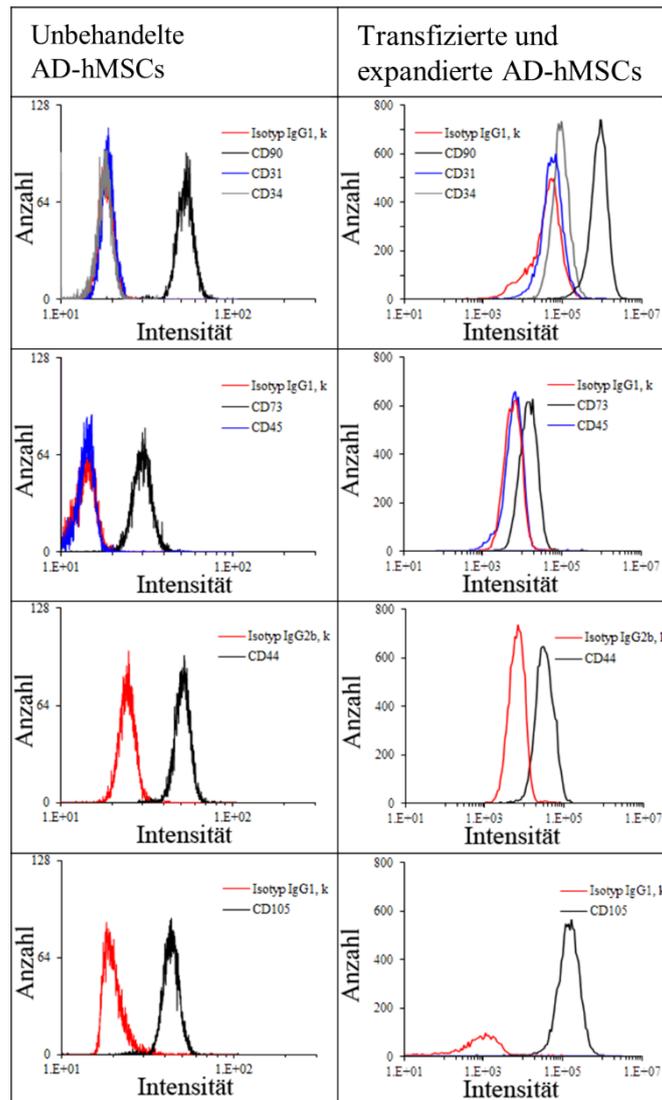
**Abbildung 4.19:** Durchflusszytometeranalyse der Oberflächenantigene der mit pEGFP-N1 elektroporierten AD-hMSCs zu verschiedenen Zeitpunkten nach erfolgreichem DNA-Transfer un behandelter AD-hMSCs in Passage 2 (vgl. Kapitel 4.1.3). Rote Linien zeigen die Isotypkontrollen, andersfarbige Linien zeigen die verschiedenen spezifischen Oberflächenantigene.

## Elektroporation mit Nonsens-DNA



**Abbildung 4.20:** Durchflusszytometeranalyse der Oberflächenantigene der mit Nonsens-DNA elektroporierten AD-hMSCs zu verschiedenen Zeitpunkten nach erfolgtem DNA-Transfer un behandelter AD-hMSCs in Passage 2 (vgl. Kapitel 4.1.3). Rote Linien zeigen die Isotypkontrollen, andersfarbige Linien zeigen die verschiedenen spezifischen Oberflächenantigene.

## Lentivirale Transduktion



**Abbildung 4.21:** Durchflusszytometeranalyse der Oberflächenantigene der mit pLVTHM lentiviral transduzierten AD-hMSCs zu verschiedenen Zeitpunkten nach erfolgreichem DNA-Transfer unbehandelter AD-hMSCs in Passage 2 (vgl. Kapitel 4.1.3). Rote Linien zeigen die Isotypkontrollen, andersfarbige Linien zeigen die verschiedenen spezifischen Oberflächenantigene.

Diese Abbildungen zeigen eine qualitative Abbildung der spezifischen Oberflächenantigenexpressionen. Eine quantitative Übersicht und ein Vergleich dieser Daten ist in der **Tabelle 4.2** dargestellt.

**Tabelle 4.2: Vergleich der Oberflächenantigenexpression** vor und nach dem DNA-Transfer zu den oben genannten verschiedenen Zeitpunkten. Diese Übersicht ergibt sich aus den Ergebnissen in den **Abbildung 4.19 bis Abbildung 4.21**.

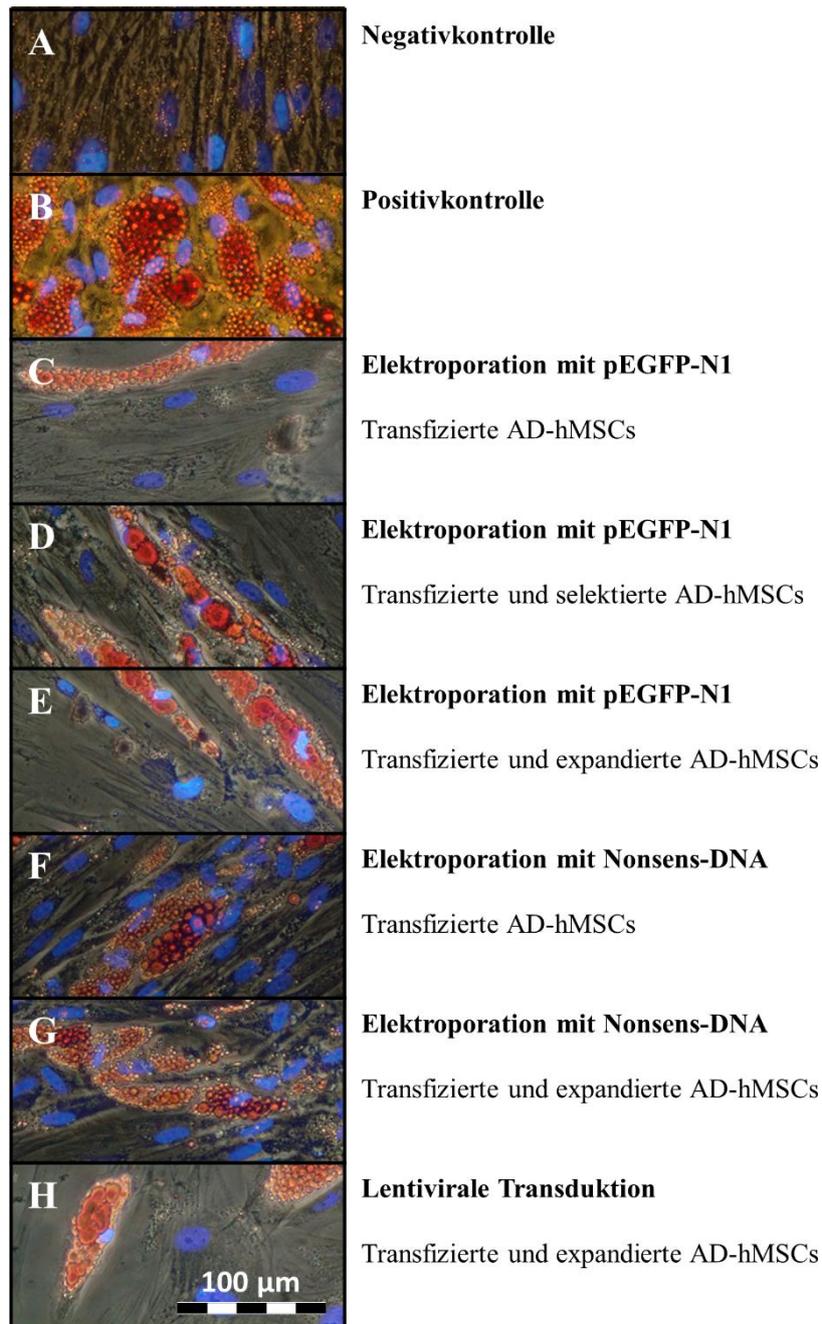
Anti-körper	Unbehandelte AD-hMSCs	Elektroporation mit pEGFP-N1			Elektroporation mit Nonsens-DNA		Lentivirale Transduktion
		Transfizierte AD-hMSCs	Transfizierte und selektierte AD-hMSCs	Transfizierte und expandierte AD-hMSCs	Transfizierte AD-hMSCs	Transfizierte und expandierte AD-hMSCs	
<b>CD44</b>	99.75%	99.99%	100.00%	99.87%	98.42%	97.68%	77.73%
<b>CD73</b>	99.86%	95.40%	97.34%	98.98%	99.66%	98.74%	43.04%
<b>CD90</b>	99.85%	98.00%	98.32%	92.56%	99.75%	98.14%	98.44%
<b>CD105</b>	99.14%	98.73%	98.85%	98.43%	97.32%	97.67%	100.00%
<b>CD31</b>	0.06%	0.50%	1.67%	0.70%	2.56%	0.13%	0.93%
<b>CD34</b>	0.49%	0.21%	0.24%	1.50%	2.03%	0.51%	0.79%
<b>CD45</b>	0.49%	0.25%	0.69%	1.10%	0.34%	4.05%	0.58%

Der Immunphänotyp nach der Elektroporation mit pEGFP-N1 bzw. mit Nonsens-DNA blieb unverändert. Die Zielzellen exprimierten CD44, CD73, CD90 und CD105, aber nicht CD31, CD34 und CD45. Nach lentiviraler Transduktion hingegen, war die Expression zweier MSC-spezifischer Antigene reduziert (CD44 auf 77.73% und CD73 auf 43.04%).

#### 4.2.5.4 Differenzierungskapazität

Für die Transplantation von Stammzellen im Zuge der Stammzelltherapie oder des Tissue Engineering ist wichtig, dass die AD-hMSCs ihre Differenzierungskapazität nach erfolgtem DNA-Transfer beibehalten. Dies gilt zum einen, wenn die Zellen vor der Transplantation *in vitro* differenziert werden sollen, und zum anderen, wenn die Zellen in der Stammzelltherapie zur Geweberegeneration durch *in vivo* Differenzierung nach der Transplantation eingesetzt werden sollen. Die Differenzierungskapazität zu Adipozyten und Osteoblasten nach erfolgtem DNA-Transfer wurde zu den o. g Zeitpunkten untersucht (siehe **Anhang D.8**). Hierzu erfolgte eine Kultivierung in 6-Well-Platten bis zu einer nahezu vollständigen Konfluenz. Anschließend wurden die Zielzellen für 21 Tage in Differenzierungsmedium oder als Negativkontrolle in Vollmedium unter Standardbedingungen kultiviert, fixiert und zelltypspezifisch gefärbt.

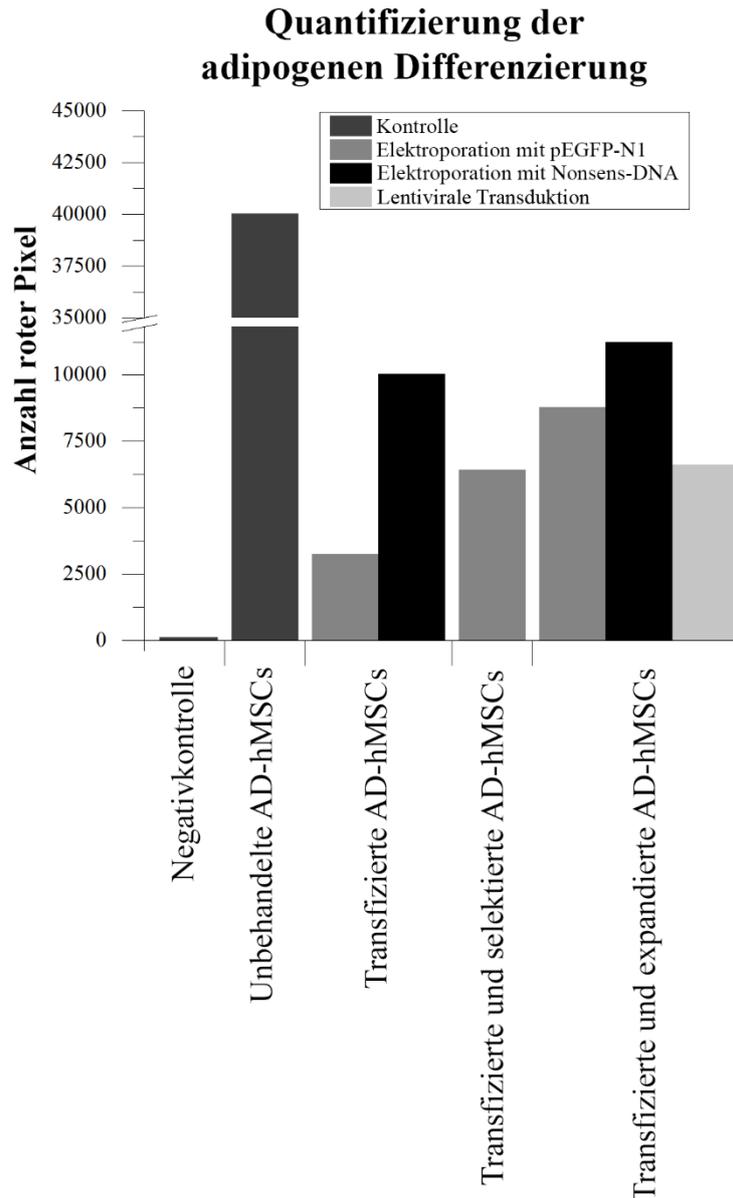
Zur Bewertung der adipogenen Differenzierungskapazität wurden intrazelluläre Lipidtröpfchen nach adipogener Differenzierung mit dem roten Farbstoff Oil Red O gefärbt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 4.22** dargestellt.



**Abbildung 4.22: Adipogene Differenzierungskapazität von AD-hMSCs nach erfolgtem DNA-Transfer.** Die Analyse erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Elektroporation mit dem Reporterplasmid pEGFP-N1 (C-E), mit der Nonsens-DNA (F, G) oder lentiviraler Transduktion mit dem Reporterplasmid pLVTHM (H) erfolgte: 3 Tage nach erfolgter Transfektion (Transfizierte Zellen; C, F), ggf. nach weiteren 14 Tagen im Selektionsmedium (Transfizierte, selektierte Zellen; D), nach weiteren 14 Tagen Expansion in Vollmedium (Transfizierte, expandierte Zellen; E, G, H). Nicht transfizierte und nicht adipogen differenzierte AD-hMSCs dienten als Negativkontrolle (A); Nicht-transfizierte und adipogen differenzierte AD-hMSCs dienten als Positivkontrolle (B). AD-hMSCs wurden in adipogenem Differenzierungsmedium (B-H) oder Vollmedium (A) für 21 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Lipidtröpfchen wurden mit dem roten Farbstoff Oil Red O visualisiert, Nuklei wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die Abbildungen stellen repräsentative Ausschnitte der Mikroskopaufnahmen dar. Der Messbalken entspricht 100 µm.

Die exemplarischen Abbildungen der Differenzierungen und Färbungen in **Abbildung 4.22C-H** zeigen rot eingefärbte Lipidtröpfchen im Vergleich zur Negativ- und Positivkontrolle in **Abbildung 4.22A und B**. Zu allen Zeitpunkten nach den verschiedenen DNA-Transfermethoden konnten die Zellen in Adipozyten differenziert werden. Der Grad der Differenzierung ist aber bereits mit dem bloßen Auge zu unterscheiden: Je länger die AD-hMSCs nach erfolgter Elektroporation kultiviert wurden, desto größer ist die Anzahl der Lipidtröpfchen nach adipogener Differenzierung. Dabei ist nach einer Elektroporation mit Nonsens-DNA eine stärkere Färbung mittels Oil Red O zu sehen. Hier wurden also mehr Lipidtröpfchen im Laufe der adipogenen Differenzierung gebildet. Die adipogene Differenzierungskapazität der mit Nonsens-DNA elektroporierten AD-hMSCs ist somit am höchsten. Nach lentiviraler Transduktion und anschließender Expansion hingegen, ist die Differenzierungskapazität stark gemindert.

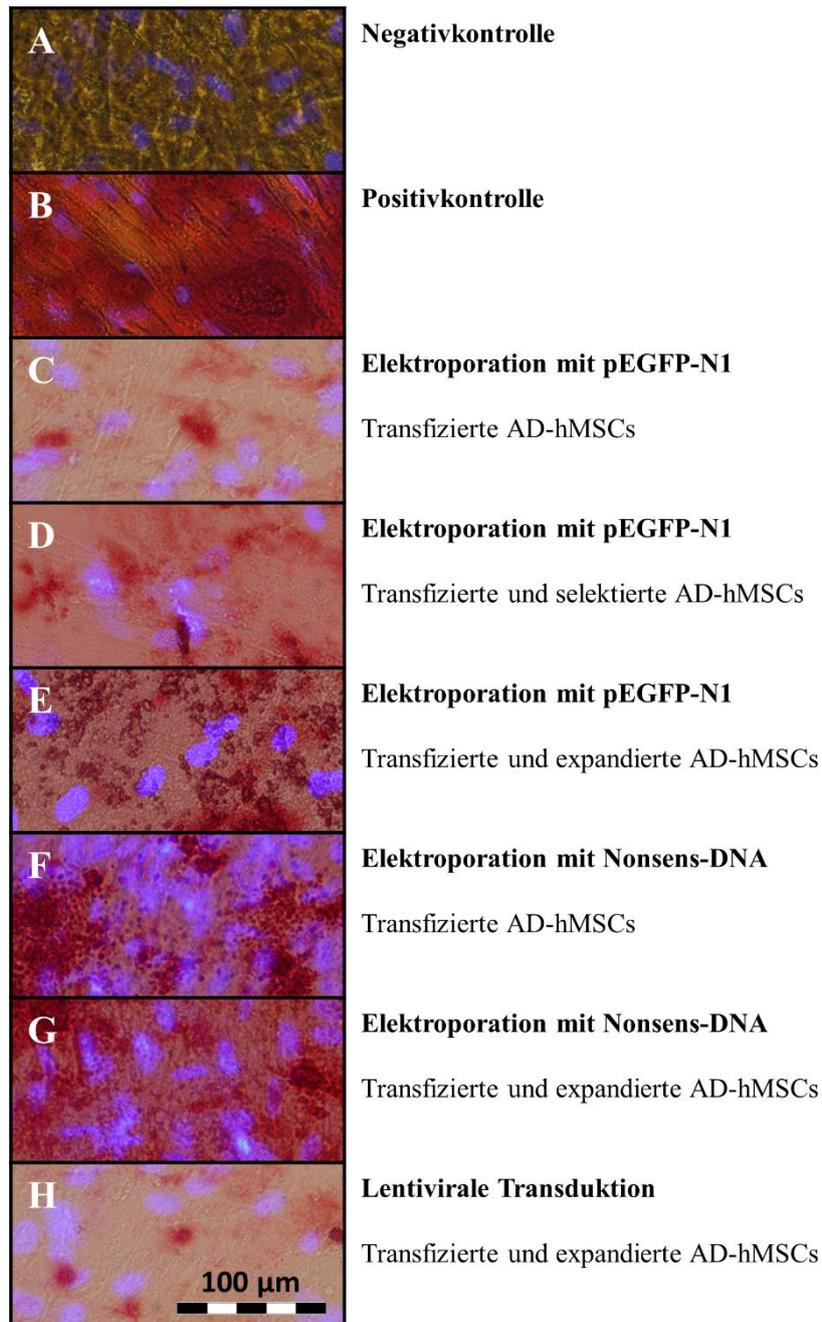
Für eine semiquantitative Auswertung der adipogenen Differenzierung wurde die Anzahl der roten Pixel in den betrachteten Mikroskop-Bildern in **Abbildung 4.22** bestimmt. Diese Auswertung ist in **Abbildung 4.23** dargestellt.



**Abbildung 4.23** Semi-quantitative Analyse der adipogenen Differenzierung aus **Abbildung 4.22**, gezeigt durch Anzahl der roten Pixel in den Mikroskopaufnahmen; N=1.

Die semiquantitative Auswertung in **Abbildung 4.23** bestätigt die oben beschriebenen Beobachtungen zu **Abbildung 4.22**. Je länger nach dem DNA-Transfer kultiviert wurde, desto höher ist die adipogene Differenzierungskapazität. Nach Elektroporation mit Nonsens-DNA wird die höchste adipogene Differenzierungskapazität erreicht, gefolgt von der Elektroporation mit pEGFP-N1 und der lentiviralen Transduktion.

Die Visualisierung extrazellulärer Kalziumakkumulationen nach osteogener Differenzierung erfolgte mit dem roten Farbstoff Alizarin Rot. Die Ergebnisse der Färbung wurden mittels Mikroskop überprüft und dokumentiert und sind in **Abbildung 4.24** dargestellt.

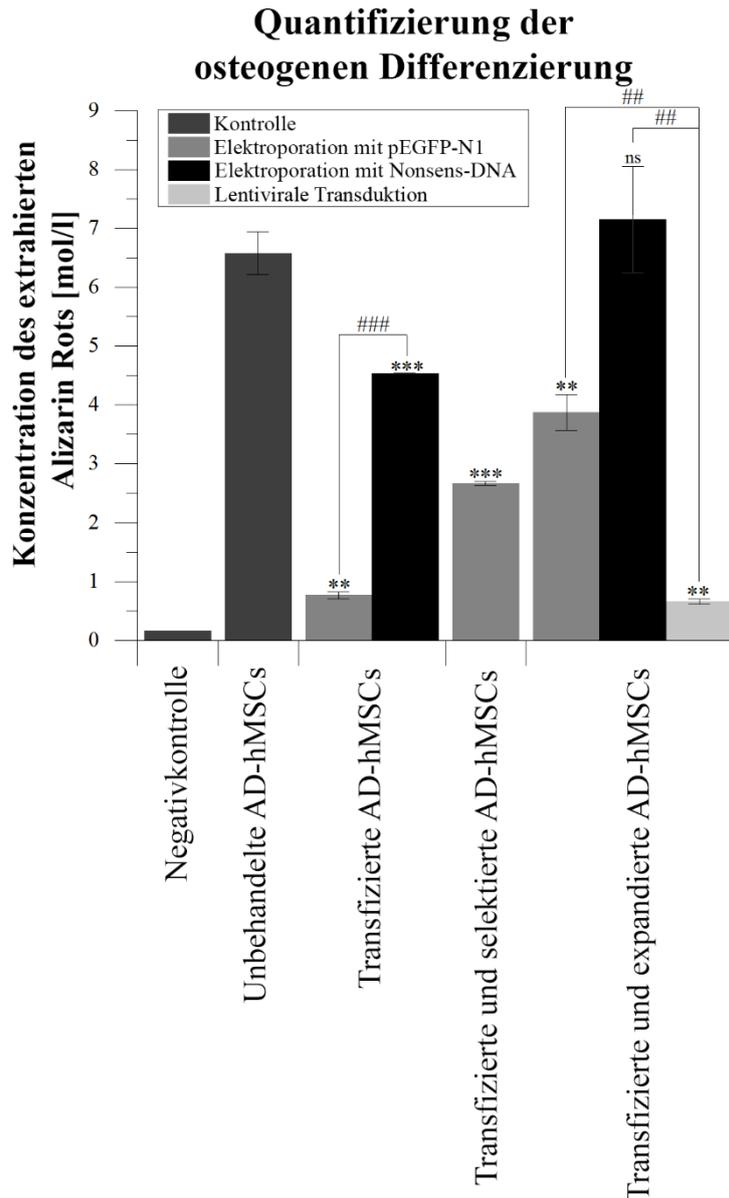


**Abbildung 4.24: Osteogene Differenzierungskapazität von AD-hMSCs nach erfolgtem DNA-Transfer.** Die Analyse erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Elektroporation mit dem Reporterplasmid pEGFP-N1 (C-E), mit der Nonsens-DNA (F, G) oder lentiviraler Transduktion mit dem Reporterplasmid pLVTHM (H) erfolgte: 3 Tage nach erfolgter Transfektion (Transfizierte Zellen; C, F), ggf. nach weiteren 14 Tagen im Selektionsmedium (Transfizierte, selektierte Zellen; D), nach weiteren 14 Tagen Expansion in Vollmedium (Transfizierte, expandierte Zellen; E, G, H). Nicht transfizierte und nicht adipogen differenzierte AD-hMSCs dienten als Negativkontrolle (A); Nicht-transfizierte und adipogen differenzierte AD-hMSCs dienten als Positivkontrolle (B). AD-hMSCs wurden in osteogenem Differenzierungsmedium (B-H), oder Vollmedium (A) für 21 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Extrazelluläre Kalziumakkumulation wurde mit Alizarin Rot visualisiert; Nuklei wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die Abbildungen stellen repräsentative Ausschnitte der Mikroskopaufnahmen dar. Der Messbalken entspricht 100 µm.

Die exemplarischen Abbildungen der Differenzierungen und Färbungen in **Abbildung 4.24C-H** zeigen rot eingefärbte Kalziumakkumulationen im Vergleich zur Negativ- und Positivkontrolle in

**Abbildung 4.24A und B.** Zu allen Zeitpunkten nach den verschiedenen DNA-Transfers konnten die Zellen in Osteoblasten differenziert werden. Mit bloßem Auge ist in den Mikroskopaufnahmen bereits zu erkennen, dass die Kalziumakkumulation stärker ist, je länger nach erfolgter Elektroporation kultiviert wurde. Die mit Nonsens-DNA elektroporierten AD-hMSCs zeigen insgesamt stärkere Färbungen mittels Alizarin Rot als nach Elektroporation mit pEGFP-N1 aufgrund einer stärkeren Kalziumakkumulation. Die osteogene Differenzierungskapazität der mit Nonsens-DNA elektroporierten AD-hMSCs ist somit am höchsten. Nach lentiviraler Transduktion und anschließender Expansion ist die Differenzierungskapazität stark gemindert.

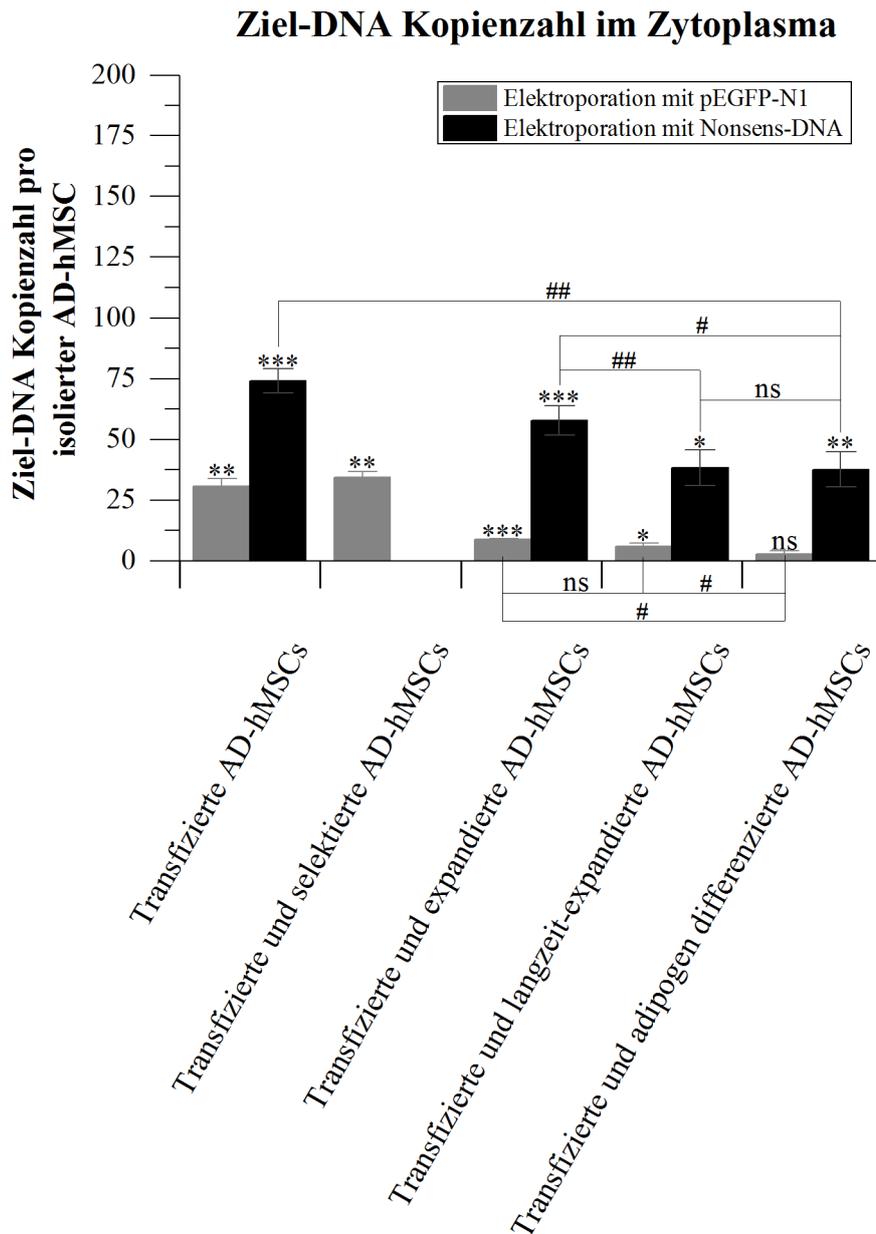
Die Quantifizierung der osteogenen Differenzierung erfolgte durch 20 minütiges Auswaschen des Farbstoffes Alizarin Rots mittels Cetylpyridiniumchlorid bei 37°C und Messung im Plattenlesegerät bei 550 nm verglichen mit einer Alizarin-Rot-Konzentrationsreihe (siehe **Anhang E.6**). Die Ergebnisse sind in der folgenden **Abbildung 4.25** dargestellt.



**Abbildung 4.25** Quantitative Analyse der osteogenen Differenzierung aus **Abbildung 4.24**. Alizarin Rot wurde aus den Proben in **Abbildung 4.24** ausgewaschen und quantifiziert über die Absorption von 550nm im Vergleich mit einer Kalibrationsgerade. N=3. \* zeigt die Ergebnisse des T-Tests im Vergleich zur Negativkontrolle; # zeigt die Ergebnisse des T-Test im Vergleich zwischen zwei verschiedenen Proben: \*\*\*/### P≤0.001; \*\*/## P≤0.01; \*/# P≤0.05; ns = nicht signifikant unterschiedlich, P>0.05.

Die quantitative Auswertung in **Abbildung 4.25** bestätigt die oben beschriebenen Beobachtungen zu **Abbildung 4.24**. Je länger nach erfolgtem DNA-Transfer kultiviert wurde, desto höher ist die osteogene Differenzierungskapazität. Die lentivirale Transduktion mindert die osteogene Differenzierungskapazität am stärksten, danach die pEGFP-N1-Elektroporation und die höchsten adipogenen Differenzierungskapazitäten werden nach Nonsens-DNA-Elektroporation erreicht. Hier ist außerdem auffällig, dass die mit Nonsens-DNA transfizierten und expandierten Zellen in ihrem Differenzierungsgrad keinen signifikanten Unterschied zu der Positivkontrolle zeigen. Nach Elektroporation mit Nonsens-DNA und anschließender 14-tätiger Expansion haben die AD-hMSCs also eine vergleichbare Differenzierungskapazität wie nicht-transfizierte AD-hMSCs.

Bei der Betrachtung der Differenzierungsergebnisse muss berücksichtigt werden, dass die Differenzierungen nach der Elektroporation mit der gemischten Zellpopulation von Marker-positiven und Marker-negativen AD-hMSCs erfolgte. Daher wurden die transfizierten und expandierten AD-hMSCs adipogen differenziert und anschließend die cytDNA mittels qRT-PCR untersucht. Da die Anzahl Marker-positiver Zellen aufgrund von Zellagglomeraten durchflusszytometrisch nicht bestimmt werden konnte, war keine Berechnung der Marker-DNA-Menge pro markierter Zelle möglich, sondern nur pro isolierter Zelle. Daher wurden zum Vergleich nicht die Marker-DNA-Menge pro Marker-positiver Zelle betrachtet (dargestellt in **Abbildung 4.12**). Stattdessen erfolgte eine Normierung pro isolierter Zelle nach Elektroporation mit Nonsens-DNA bzw. pEGFP-N1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach erfolgter Elektroporation. Dieser Vergleich ist in der folgenden **Abbildung 4.26** dargestellt.

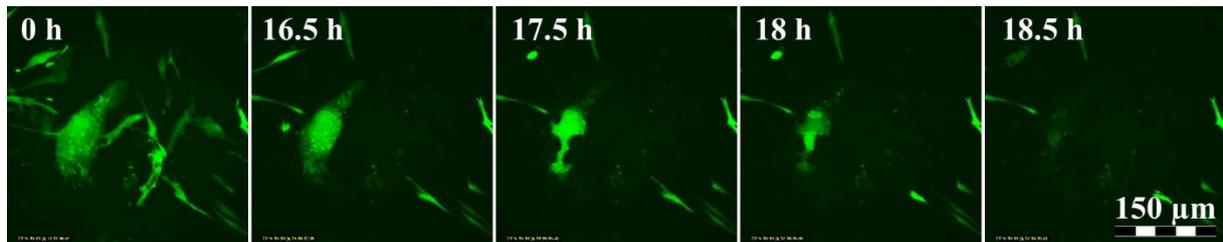


**Abbildung 4.26 Vergleich der Marker-DNA-Menge in den transfizierten AD-hMSCs pro isolierter Zelle.** Konzentrationen wurden mittels Kalibrationskurve (siehe **Anhang E.5**) bestimmt; N=3, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. \* zeigt die Ergebnisse des T-Tests im Vergleich zur Negativkontrolle; # zwischen zwei verschiedenen Proben: \*\*\*/###  $P \leq 0.001$ ; \*\*/##  $P \leq 0.01$ ; \*/#  $P \leq 0.05$ ; ns = nicht signifikant unterschiedlich,  $P > 0.05$ .

Anhand der **Abbildung 4.26** ist zu erkennen, dass nach adipogener Differenzierung mit Nonsens-DNA eine vergleichbare Menge der Marker-DNA im Zytoplasma der AD-hMSCs nachweisbar ist wie nach einer Langzeitkultivierung (bei 25.3% Marker-positiver Zellen). Der T-Test zeigte, dass die beiden Proben nicht signifikant unterschiedlich sind. Da weiterhin in **Abbildung 4.23** gezeigt werden konnte, dass die untersuchten Zellen vergleichbar erfolgreich differenziert wurden wie nicht-transfizierte AD-hMSCs, kann davon ausgegangen werden, dass auch die transfizierten AD-hMSCs erfolgreich adipogen differenziert werden konnten.

Nach Elektroporation mit pEGFP-N1 und anschließender Langzeitkultivierung wurde im Vergleich zu den transfizierten und expandierten AD-hMSCs kein signifikant unterschiedliches Niveau an Marker-DNA gemessen. Nach adipogener Differenzierung hingegen, ist der Unterschied signifikant zu den transfizierten und expandierten AD-hMSCs wie auch zur Langzeit-Expansion.

Zur osteogenen Differenzierung wurde eine weitere Untersuchung der transfizierten und selektierten AD-hMSCs am Inkubator-Fluoreszenz-Mikroskop durchgeführt. Während der ersten 23 Stunden der osteogenen Differenzierung wurde alle 2 min ein Bild aufgenommen. Ausschnitte dieser Aufnahmen sind in der folgenden **Abbildung 4.27** dargestellt.



**Abbildung 4.27: Osteogene Differenzierung der mittels Elektroporation EGFP-markierten AD-hMSCs.** Transfizierte und selektierte AD-hMSCs wurden in osteogenem Differenzierungsmedium unter Standardkultivierungsbedingungen differenziert. Mittels Inkubator-Mikroskop LumaScope 600 (Etaluma, Inc., USA) und einem 40x Objektiv wurde alle 2 Minuten ein Fluoreszenz-Bild aufgenommen. Hier dargestellt sind verschiedene Aufnahmen aus der so entstandenen Zeitrafferaufnahme.



In der **Abbildung 4.27** ist zu erkennen, dass bereits nach den ersten 18.5 Stunden nach Beginn der Differenzierung nahezu alle EGFP-produzierenden AD-hMSCs absterben. EGFP-positive Zellen nach einer Elektroporation lassen sich also weder in Osteoblasten noch in Adipozyten differenzieren.

### 4.3 DISKUSSION

Aus dem humanen Fettgewebe konnten zunächst erfolgreich fibroblastenähnliche Zellen isoliert und hinsichtlich aller relevanter von der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie (*International Society for Cellular Therapy*; ISCT) definierter Eigenschaften von MSCs charakterisiert wurden. Es handelt sich somit bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen um MSCs aus dem humanen Fettgewebe (AD-hMSCs, siehe **Kapitel 3.2** und **4.1**).

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde an der Entwicklung einer DNA-Zellmarkierung der AD-hMSCs gearbeitet. Hierzu wurden zum einen verschiedene Lipofektions-Kits getestet, sowie die Elektroporation. Dabei stellte sich zunächst heraus, dass die Lipofektion bei den untersuchten AD-hMSCs nicht erfolgreich war. Dementsprechend wurde dieser Ansatz verworfen und der Fokus auf die Elektroporation gelegt. Wie in **Kapitel 4** beschrieben, sollte eine Zellmarkierung effizient (1) und nachhaltig nachweisbar sein (2) und einen geringen Einfluss auf die biologischen Zelleigenschaften haben (3).

**Zu (1) – Effizienz:** Die hier etablierte Elektroporationsmethode konnte mit bis zu 44.5% (3 Tage nach Elektroporation) deutlich höhere Transfektionseffizienzen erzielen als andere bisher publizierte Methoden der transienten Transfektion (siehe **Tabelle 4.3** und **Kapitel 4.2.2** und **4.2.3**). So konnten in hMSCs aus Fettgewebe (AD-hMSCs) mittels kationischer Polymere nur Transfektionseffizienzen von unter 9% erreicht werden [311, 312]. Mittels Lipofektion konnten Transfektionseffizienzen von bis zu 58% in UC-hMSCs erreicht werden, wobei in AD-hMSCs deutlich geringere Transfektionseffizienzen von  $\leq 33\%$  erreicht wurden [313]. Die Elektroporation ist also im Vergleich die Methode der Wahl für den nicht-viralen DNA-Transfer in AD-hMSCs. Weiterhin konnte mithilfe der Elektroporation in anderen humanen Stammzelltypen, wie hMSCs aus Knochenmarksgewebe (BM-hMSCs) oder humane embryonale Stammzellen (hESCs) deutlich geringere Transfektionsraten erzielt werden [314, 315]. Die Elektroporation von AD-hMSCs wurde in der Literatur noch nicht erfolgreich durchgeführt und die direkte Übertragbarkeit von Transfektionseffizienzen und Elektroporationsparametern anderen Stammzelltypen auf AD-hMSCs ist nicht zulässig, da die verschiedenen Stammzelltypen sich in einigen Zellcharakteristika unterscheiden. Bei BM-hMSCs konnten Transfektionseffizienzen von 12.0% erreicht werden und bei Ratten-BM-MSCs 29.0%. In humanen embryonalen Stammzellen konnten ebenfalls nur 17.6% Marker-positive Zellen durch eine Elektroporation erzielt werden. Der Spezialfall einer Elektroporation, die Nukleofektion, bei der die Marker-DNA in den Zellkern eingeschleust wird, wurde bei AD-hMSCs bereits erfolgreich durchgeführt. Hier konnten Transfektionseffizienzen von 30% bis zu 76% erreicht werden; nach 8 Tagen Kultivierung war der Anteil der Marker-positiven Zellen aber bereits von 76% auf 22% gesunken [291, 316].

Ausgehend von einem publizierten Protokoll für BM-hMSCs wurde in dieser Arbeit die Elektroporation für AD-hMSCs optimiert, so dass die o.g. hohe Effizienz erreicht wurde. Für die Optimierung wurden Voltzahl, Impulslänge und die eingesetzte DNA-Menge betrachtet. Der Verlauf der Transfektionsraten mit einem Optimum bei 600 V und 100  $\mu$ s und starkem Abfall bei höheren und längeren Pulsen, ist damit zu erklären, dass die Wahrscheinlichkeit, alle Zellmembranen zu perforieren steigt, je stärker und länger der Puls ist. Wird aber eine Pulslänge und -stärke über diesem Optimum angelegt, kommt es zu hohen Zellschädigungen, die sich im drastischen Abfall der Transfektionseffizienz zeigen.

Um möglichst kosteneffizient zu arbeiten, sollte mit einer möglichst geringen DNA-Menge gearbeitet werden, ohne dabei die hohe Transfektionseffizienz einzubüßen. Die DNA-Menge für die ein höchstmöglicher Anteil an Marker-positiven Zellen erzielt wurde bei gleichzeitig geringstmöglicher eingesetzter DNA-Menge wurde als 20  $\mu$ g bestimmt und für alle nachfolgenden Versuche verwendet.

Sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene konnte eine erfolgreiche Transfektion mittels Elektroporation nachgewiesen werden. Nach Elektroporation waren 66.2 *egfp*-mRNA-Stränge nachweisbar, nach Selektion und weiterer 14-tägiger Expansion noch 55.4 Stränge und nach lentiviraler Transduktion und Expansion 35.5 Stränge. Die Genexpressionslevel transfizierter und expandierter AD-hMSCs pro EGFP-positiver Zelle nach Elektroporation waren im Vergleich höher als nach lentiviraler Transduktion (29.5% vs. 5.1%; siehe **Kapitel 4.2.3.3**).

Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass die *egfp* Expression beim pEGFP-N1 CMV-abhängig und beim lentiviralen Vektor pLVTHM EF1 $\alpha$ -abhängig erfolgte. Beide Promotoren werden aufgrund hoher Expressionslevel häufig zur Proteinproduktion in Stammzellen verwendet, wobei der EF1 $\alpha$ -Promotor zu höheren Expressionsleveln führt [317-321]. Daher kann angenommen werden, dass die große Diskrepanz zwischen den Transfektionseffizienzen nicht durch die unterschiedlichen Promotoren auftritt, sondern aufgrund der unterschiedlichen DNA-Transfer-Methoden. Obwohl der lentivirale Gen-Transfer eine Standardmethode für die Stammzelltherapie darstellt, gibt es wenige Studien zu Transfektionseffizienzen bei AD-hMSCs. Da eine lentivirale Transduktion zur stabilen Genexpression führt und dementsprechend durch FACS und weiterer Expansion für die Stammzelltherapie benötigte Zellzahlen erreicht werden, sind solche Studien selten. Daher wurde bei der Ausarbeitung des Protokolls zur lentiviralen Transduktion Studien herangezogen, die entweder AD-MSCs anderer Spezies betrachteten oder BM-hMSCs [322-324]. Im Vergleich zu diesen Studien (siehe **Tabelle 4.3**), konnten in der hier vorliegenden Arbeit deutlich geringere Transfektionseffizienzen erreicht werden. Inzwischen wurden Studien durchgeführt, die bei ähnlichen MOIs in AD-hMSCs zu ähnlichen Transfektionseffizienzen führten, aber bei deutlich

höheren MOIs auch zu deutlich höheren Transfektionsraten von bis zu 75.7% (siehe **Tabelle 4.3**). Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass mithilfe von lentiviraler Transduktion höhere Transfektionsraten als durch Elektroporation möglich sind. Nichtsdestotrotz stellt die Elektroporation eine gute Alternative zum lentiviralen Gentransfer dar, da hierbei die geschädlichen Effekte durch den Einbau ins Genom der Zielzelle umgangen werden können. Weiterhin müssen lentiviral transduzierte Zellen vor der weiteren Anwendung außerhalb der S2-Umgebung eine 14-tägige Quarantäne unter S2-Bedingungen durchlaufen, um eine virusfreie Kultur sicherzustellen. Dies führt zu einem erhöhten Aufwand, höheren Passagenzahlen und einem längeren Zeitraum vor einer weiteren Anwendung.

**Zu (2) – Langzeit-Nachweisbarkeit:** Da anhand der qRT-PCR die Ziel-DNA nach Elektroporation im Zytoplasma nachgewiesen wurde und nach lentiviraler Transduktion in der gDNA, kann bei der Elektroporation von einer transienten Methode ausgegangen werden, bei lentiviraler Transduktion vom DNA-Transfer in den Nukleus. Da die Elektroporation eine transiente Transfektionsmethode ist, wird die vorhandene Marker-DNA bei der Zellteilung auf die beiden Tochterzellen aufgeteilt und somit statistisch halbiert. Nichtsdestotrotz waren nach erfolgter Langzeit-Expansion von 35 Tagen 45.2% der Zielzellen weiterhin Marker-positiv mit durchschnittlich 13.2 Marker-DNA-Strängen pro EGFP-positiver Zelle. Die Nonsens-DNA war ebenfalls nach erfolgter Langzeit-Expansion nachweisbar mit 151.5 Marker-DNA-Strängen pro Marker-positiver Zielzelle (25.3%). Die höchsten Kopienzahlen der Marker-DNA konnten zu allen verglichenen Zeitpunkten mittels Nonsens-DNA erreicht werden. Dies ist mit der unterschiedlichen Marker-DNA Größe zu erklären. Ribeiro et al. beobachteten 2012, dass bei nicht-viraler Transfektion mit kleineren Plasmiden höhere Ziel-DNA-Kopienzahlen erzielt werden können [325]. Obwohl mit längerer Expansion ein Verdünnungseffekt aufgrund der transienten Transfektion zu erkennen war, war die Marker-DNA in ausreichenden Mengen vorhanden, um sie mittels qRT-PCR nachzuweisen (siehe **Kapitel 4.2.3.4**).

Im Vergleich zu anderen Transfektionsmethoden in bisherigen Studien, konnten in dieser Arbeit höhere Anteile EGFP-positiver bzw. Nonsens-DNA-positiver AD-hMSCs nach Langzeit-Expansion erreicht werden, so wurde beispielsweise nach der Lipofektion bereits nach 10 Tagen ein Abfall des Anteils von Marker-positiven Zellen von etwa 33% auf etwa 10% nach weiterer 10-tägiger Kultivierung festgestellt (siehe **Tabelle 4.3**) [291, 313, 326, 327]. In der Literatur konnten aber durch lentivirale Transduktion Anteile von Marker-positiver AD-hMSCs von 80% erreicht werden, die auch nach 12 Passagen bei 81% lagen [328]. Die lentivirale Transduktion birgt aber, wie oben beschrieben, hohe Risiken, was sich ebenfalls in den benötigten Sicherheitsmaßnahmen widerspiegelt. Aufgrund dieser Ergebnisse können die markierten AD-hMSCs zur *in vitro* Nachverfolgung verwendet werden, was insbesondere dann nötig wird, wenn AD-hMSCs auf

Trägermaterialien kultiviert werden, die nicht transparent sind und dementsprechend keine Durchlicht-Mikroskop-Aufnahmen zulassen [329].

**Tabelle 4.3: Transfektionseffizienzen und Anteil Marker-positiver Zellen** nach längerer Kultivierung bei verschiedenen Transfektionsmethoden und Stammzelltypen in aktuellen wissenschaftlichen Studien

Transfektionsmethode	Stammzelltyp	Ursprungsorganismus	Marker	DNA Menge und Plasmid/ MOI	Start-Zellzahl	Transfektionseffizienz	Anteil Marker-positive Zellen nach längerer Kultivierung	Referenz
Lipofektion	BM-MSCs	Mensch	EGFP	1 µg pVAX-GFP	1900 → 72 Stunden	50.0±2.8%	~10% (nach 10 Tagen)	[313]
					5700 → 72 Stunden	<50%		
	AD-MSCs	Mensch	EGFP	1 µg pVAX-GFP	1900 → 72 Stunden	33.0±4.7%	~10% (nach 10 Tagen)	
					5700 → 72 Stunden	<30%		
	UC-MSCs	Mensch	EGFP	1 µg pVAX-GFP	1900 → 72 Stunden	<45%	~10% (nach 10 Tagen)	
					5700 → 72 Stunden	58±7.1%		
Kat. Polymer: PEI	AD-MSCs	Mensch	EGFP	1 µg pEGFP-C2	1.5×10 <sup>5</sup> → 24 Stunden	≤7.1%	-	[311]
Kat. Polymer: PAMAM Dendrimere	AD-MSCs	Mensch	EGFP	1 µg pEGFP-C2	1.8×10 <sup>5</sup> → 24 Stunden	≤8.6%	-	[312]
Elektroporation	BM-MSCs	Ratte	β-Gal	8 µg pDRIVE2-CMV	5×10 <sup>5</sup>	29.0±3.0%	β-Gal Produktion um ~80 % verringert (nach 7 Tagen)	[327]
	BM-MSCs	Mensch	EGFP	10 µg pEGFP-N1	10 <sup>6</sup>	12.0%	-	[314]
	ESCs	Mensch	EGFP	10-60 µg pCAG-EGFP	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>	≤17.6%	-	[315]

Transfektionsmethode	Stammzelltyp	Ursprungsorganismus	Marker	DNA Menge und Plasmid/ MOI	Start-Zellzahl	Transfektions-effizienz	Anteil Marker-positive Zellen nach längerer Kultivierung	Referenz
Nukleofektion	AD-MSCs	Mensch	GFP	2 µg Plasmid*	10 <sup>6</sup>	≤40%	-	[316]
	AD-MSCs	Mensch	GFP	3 µg pmaxGFP	6×10 <sup>5</sup>	≤76.1±1.3%	21.8±2.3% (nach 8 Tagen)	[291]
	BM-MSCs	Mensch	EGFP	5 µg pCMV-EGFP-N1	5×10 <sup>5</sup>	68.2±4.1%	-	[326]
	BM-MSCs	Mensch	hBMP-2	5 µg pCMV-CDNA3-hBMP2	5×10 <sup>5</sup>	-	Genexpression um ~99 % verringert (nach 14 Tagen)	
Lentivirale Transduktion	AD-MSCs	Mensch	EGFP	MOI: 2-141; pLVTH	4.8×10 <sup>5</sup>	2.7%-75.7%	Bis ~81% (nach 12 Passagen)	[328]
	BM-MSCs	Mensch	MRFP	MOI: 1-50; pLV-MND-LR	10 <sup>5</sup> → 24 Stunden	20%-98%	-	[323]
	BM-MSCs	Mensch	EGFP	MOI: 1, 10	k. A.	~53%, 71.1%	-	[322]
	AD-MSCs	Pferd	VSV-GFP	MOI: 1, 5, 10; psPAX2	10 <sup>5</sup> → 24 Stunden	25%, 65%, 85%	Stabil über 4 Passagen	[324]

"Kat. = "Kationisch"; PEI = Polyethylenimin; PAMAM = Polyamidoamin; β-Gal = β-Galaktosidase; hBMP-2 = human bone morphogenetic protein; MRFP=Monomerisches Rot Fluoreszierendes Protein" → = "gefolgt von".\* nicht genauer definiert.

Für die klinische Anwendung ist ein Vergleich der Langzeit-Nachweisbarkeit zu anderen Transfektionsmethoden zwar interessant, viel wichtiger ist aber der Vergleich der Lebensdauer von AD-hMSCs im menschlichen Körper. In diversen Studien wurde eine Lebensdauer der AD-hMSCs zwischen 24 Stunden und 4 Wochen erreicht, wobei die Zellen in manchen Studien auf Patches oder Scaffolds aufgebracht wurden [330-334]. Da sowohl in den mit Nonsense-DNA als auch mit pEGFP-N1 markierten AD-hMSCs die Marker-DNA in der vorliegenden Arbeit noch nach über 35 Tagen in großen Mengen nachweisbar waren, kann davon ausgegangen werden, dass die Elektroporation für die Markierung von AD-hMSCs sehr gut für die Anwendung in der (autologen) Stammzelltherapie geeignet ist. Weiterhin war die Nonsense-DNA auch nach erfolgter adipogener Differenzierung in hohen Mengen nachweisbar, nicht aber pEGFP-N1. Dementsprechend kann Nonsense-DNA Markierung von AD-hMSCs mittels Elektroporation auch im Tissue Engineering Anwendung finden.

Wichtig ist weiterhin, dass der *in vitro* Monitoring Test mittels Fluoreszenz-Mikroskopie zeigte, dass das EGFP-Signal für diese Messmethode ausreichend intensiv ist, das Nonsense-DNA-Signal hingegen nicht. In bisherigen Studien wird eine Fluoreszenzmarkierung zum *in vitro* Monitoring häufig durch lentivirale Transduktion mittels Reporter gen erreicht [201, 202, 335]. Da aber in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass die EGFP-Markierung zu einer Änderung des zellbiologischen Verhaltens führt, sollte Nonsense-DNA als Marker für *in vitro* und *in vivo* Monitoring von AD-hMSCs bevorzugt verwendet werden. Mit Hilfe von *in vivo* Durchflusszytometrie besteht hier wie auch bei der EGFP-Markierung die Möglichkeit eines *in vivo* Monitorings [32]. Das Fluoreszenzsignal der in dieser Arbeit verwendeten Cy3-markierten Nonsense-DNA war aber zu schwach, um diese mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen. Dementsprechend müssten diesbezüglich Anpassungen getroffen werden. So könnte zum einen die Anzahl des Farbstoffes innerhalb des DNA-Stranges erhöht werden (hier wurden nur zwei Cy3-Moleküle pro Nonsense-DNA-Doppelstrang verwendet), zum anderen könnten intensivere Farbstoffe verwendet werden, wie beispielsweise Alexa-Fluor-Farbstoffe [336].

Im Vergleich zu anderen Bildgebungsverfahren zeigt die hier verwendete optische Methode der fluoreszenzbasierten Bildgebung verschiedene Vor- und Nachteile. So wird in der bisherigen Literatur die schlechte intraoperative Nachweisbarkeit aufgrund einer geringen Auflösung und der geringen Gewebepenetration durch Licht in die Haut von etwa 1 mm für blaues Licht und bis zu 5 mm für rotes Licht als großer Nachteil gehandelt (siehe **Tabelle 4.4**)[197]. Dadurch war dieses Bildgebungsverfahren zumeist auf oberflächliche Gewebearten wie die Haut oder die Mundhöhle beschränkt. Aufgrund der Entwicklung der *in vivo* Durchflusszytometrie kann die Anwendung aber auf den Blut- und Lymphfluss ausgeweitet werden [200]. Im Vergleich zu anderen Bildgebungsverfahren zeigen optische Methoden aber auch deutliche Vorteile: Die

verwendeten Signalmoleküle führen nicht zu Zellschäden, die Detektion ist sehr sensitiv und eine erneute Injektion eines Kontrastmittels ist nicht nötig. Ein weiterer Nachteil ist, dass es zu einer Verdünnung des Signalmoleküls im Verlauf der Zellteilung kommt. In dieser Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass trotz dieser Verdünnung über einen Zeitraum von 35 Tagen ein ausreichend hohes Signal für die *ex vivo* Durchflusszytometrie erreicht wurde.

Ebenso wie die fluoreszenzbasierte Bildgebung haben aber auch alle anderen Bildgebungsverfahren eigene Vor- und Nachteile, aufgrund dessen für jede spezielle Anwendung neu abgewogen werden muss, welches Verfahren am sinnvollsten ist. So können beispielsweise Marker für die Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie und Positronenemissionstomographie Zellschäden hervorrufen, Magnetresonanztomographie und Magnetpartikelbildung sind im Vergleich zu anderen Verfahren nicht sensitiv und im Falle der indirekten Markierung müssen bei all diesen Verfahren Kontrastmittel erneut injiziert werden (für eine detaillierte Darstellung der Vor- und Nachteile der verschiedenen Bildgebungsverfahren siehe **Tabelle 4.4**).

**Tabelle 4.4: *In vivo* Tracking Methoden und deren Vor- (“+”) und Nachteile (“-“) in bisherigen Studien (Teil einer bereits bestehenden Veröffentlichung: von der Haar et al., 2015, Applied Microbiology and Biotechnology [32])**

Bildgebungsverfahren	Kontrastmittel	Markierung	Zell Schäden	Genetische Modifikation	Auflösung	Sensitivität	Verdünnung	Transfer in andere Zellen	Mittelfristiges Tracking (<3 d)	Langfristiges Tracking	Injektion des KMs	viable vs. non-viable Zellen	Zusätzliche Limitationen
MRT	SPIONs; Gd; <sup>52</sup> Mn; <sup>19</sup> F	Direkt	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	<i>In vivo</i> Quantifizierung ist möglich aber schwierig; Manche KMs sind insensitiv; Kontraindiziert mit manchen medizinischen Geräten;
		Indirekt	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>In vivo</i> Quantifizierung ist möglich aber schwierig; Manche KMs sind insensitiv; Kontraindiziert mit manchen medizinischen Geräten.
MPB	SPIONs	Direkt	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	Quantifizierung von Nanopartikel-Signalen ist unzuverlässig; <i>In vivo</i> Quantifizierung ist möglich aber schwierig; Manche KMs sind insensitiv; Kontraindiziert mit manchen medizinischen Geräten.
PET	<sup>64</sup> Cu; <sup>18</sup> F; <sup>89</sup> Zr	Direkt: <sup>64</sup> Cu; <sup>18</sup> F	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	Strahlenexposition; Radionuklid Aufnahme durch normales Gewebe.
		Direkt: <sup>89</sup> Zr	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	Strahlenexposition; Radionuklid Aufnahme durch normales Gewebe.
		Indirekt: lentiviral	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	Mögliche Mutationen; Strahlenexposition; Radionuklid Aufnahme durch normales Gewebe.
		Indirekt: transient	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
SPECT	<sup>111</sup> In; <sup>99m</sup> Tc	Direkt	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	Strahlenexposition.
		Indirekt: lentiviral	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	Strahlenexposition; Mögliche Mutationen.
		Indirekt: transient	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+

Bildgebungsverfahren	Kontrastmittel	Markierung	Zell Schäden	Gene-tische Modi-fikation	Auf-lösung	Sensi-tivität	Ver-dünnung	Transfer in andere Zellen	Mittel-fristiges Tracking (<3 d)	Lang-fristiges Tracking	In-jektion des KMs	viable vs. non-viable Zellen	Zusatztliche Limitationen
CLB	<sup>64</sup> Cu; <sup>18</sup> F	Direkt	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	Strahlenexposition Mögliche Mutationen.
		Indirekt: lentiviral	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	Strahlenexposition Mögliche Mutationen.
		Indirekt: transient	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Optisch (FLB/BLB)	EGFP; Nano-partikel; QDs; (BLB: Luzi-ferase)	Direkt	+	+	-	+	-	-	-/+	-	+	-	Auto-Fluoreszenz; Intraoperative Nutzung.
		Indirekt: lentiviral	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Mögliche Mutationen; Intraoperative Nutzung.
		Indirekt: transient	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	Mögliche Mutationen; Intraoperative Nutzung.
UB	Mikro-bläschen	Direkt	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	Nicht robust; Mögliche Effekte auf Zellmotilität unbekannt; Viele anatomische Bereiche nicht zugänglich.

MRT=Magnetresonanztomographie; MPB=Magnetpartikelbildgebung; PET=Positronenemissionstomographie; SPECT=Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie (engl.: *single photon emission computed tomography*); CLB=Cerenkov Lumineszenz Bildgebung; FLB=Fluoreszenzbasierte Bildgebung; BLB=Biolumineszenzbasierte Bildgebung; UB=Ultraschallbildgebung.

Ein weiterer wichtiger Diskussionspunkt in den Ergebnissen ist der geringe Anstieg Marker-positiver AD-hMSCs nach erfolgter Selektion (siehe **Kapitel 4.2.3.1**). Obwohl in der Literatur ähnliche Konzentrationen von G418 Bisulfat zur Selektion verwendet werden, ist die Anzahl der EGFP-positiven Zellen nach erfolgter Selektion vergleichsweise gering. Peister et al. konnten bis zu 97% Marker-positive Zellen erzielen [314]. Andere Studien hingegen zeigten stark erhöhte Mortalitätsraten von resistenten wie auch nicht-resistenten Zellen. Diese wurden durch Zellstress aufgrund von Zytokinen begründet, die durch getötete Zellen in der Umgebung ausgeschüttet wurden [337, 338]. Daher müssen zukünftige Studien zeigen, ob der Zusatz höherer G418 Bisulfat Konzentrationen die Anzahl EGFP positiver AD-hMSCs erhöht oder die Proliferation aufgrund der Zytotoxizität verstärkt negativ beeinflusst. Wäre letzteres der Fall, könnte in der Zukunft eine Selektion durch FACS erfolgen.

Insgesamt konnte eine Transfektionseffizienz von bis zu 44.5% (3 Tage nach Elektroporation) und Langzeit-Nachverfolgbarkeit von bis zu 32 weiteren Tagen nicht-selektiver Expansion erreicht werden. Da diese Werte deutlich über denen anderer wissenschaftlicher Studien mit verschiedenen Stammzelltypen und transienten Transfektionsmethoden liegen, stellt das hier etablierte System eine vielversprechende Methode zur AD-hMSC-Markierung und anschließendem *in vitro* und *in vivo* Monitoring/Zellidentifikation dar. Nach Nonsens-DNA-Elektroporation konnte Marker-DNA außerdem nach adipogener Differenzierung nachgewiesen werden. Dementsprechend wäre eine Markierung von AD-hMSCs mit Nonsens-DNA mit anschließender Differenzierung für beispielsweise Tissue-Engineering-Anwendungen möglich.

**Zu (3) – Einfluss auf die biologischen Zelleigenschaften:** Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Elektroporation von AD-hMSCs zu einer relativ hohen Transfektionseffizienz führt und die markierten Zellen noch nach mindestens 35 Tagen Expansion identifizierbar sind, wurde der Einfluss auf die Zellbiologie der transfizierten Zellen untersucht. Für eine Anwendung zur AD-hMSC-Markierung, müssen die Zellen – je nach Anwendung – bestimmte Eigenschaften erfüllen, wie beispielsweise in eine mögliche Richtung differenzierbar sein, bestimmte Zellzahlen oder bestimmte Genexpressionen aufweisen.

Die Elektroporation mit Nonsens-DNA führte zu dem geringsten negativen Effekt auf das Zellwachstum – gezeigt durch die relative Änderung der Anzahl der CFUs im Vergleich zu nicht-transfizierten AD-hMSCs; relative Änderung von 45.2% durch Nonsens-DNA-Elektroporation, gefolgt von Elektroporation mit pEGFP-N1 – relative Änderung von 59.1% – und lentiviraler Transduktion mit pLVTHM – relative Änderung von 71.8%. Hierbei ist wichtig, dass der Abfall des Zellwachstums nicht durch Seneszenz hervorgerufen wurde, da die  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung als Nachweis für Seneszenz in allen Proben nach Elektroporation oder lentiviraler Transduktion

negativ ausfiel (siehe **Abbildung 4.18**). Daher ist anzunehmen, dass es aufgrund von Stress durch die DNA-Transfermethoden und insbesondere durch die zusätzliche EGFP-Produktion zu einer verringerten Anzahl der CFUs gekommen ist (siehe **Kapitel 4.2.5.1**).

Die Untersuchung des Immunophänotyps hat ergeben, dass nach Elektroporation mit pEGFP-N1 oder Nonsens-DNA die Expression der charakteristischen MSC-Oberflächenantigene erhalten bleibt. Nach lentiviraler Transduktion war dies nicht der Fall: CD44 wurde noch von 77.73%, CD73 sogar nur von 43.04% der Zellen exprimiert (siehe **Kapitel 4.2.5.3**). Die beiden betroffenen Antigene sind wichtige Faktoren für die MSC Zellmigration [339, 340]. Weiterhin ist CD73 beteiligt an der adaptiven Immunantwort und es wurde in der Literatur gezeigt, dass eine schwächere CD73-Genexpression sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu einer Autoimmun-Inflammation führen kann [341-344]. Da beide Marker spezifische positive Oberflächenantigene von menschlichen MSCs darstellen, ist davon auszugehen, dass die lentivirale Transduktion zu einer Veränderung der MSC-Zellcharakteristik führte. Dieses wird auch von aktuellen Studien bestätigt [20, 345-348].

Als ein weiteres Charakteristikum von MSCs wurde untersucht, ob die markierten Zellen sich adipogen und osteogen differenzieren lassen (siehe **Kapitel 4.2.5.4**). Hierbei konnte festgestellt werden, dass Nonsens-DNA-transfizierte AD-hMSCs sich in so starkem Maße differenzieren lassen wie unbehandelte AD-hMSCs (siehe **Abbildung 4.22** bis **Abbildung 4.25**). Weiterhin war die Ziel-DNA noch in hohen Mengen in den isolierten Zellen nachweisbar (37.7 DNA-Stränge pro isolierte Zelle). Nach Elektroporation mit pEGFP-N1 war nach Langzeit-Expansion über 35 Tage die Ziel-DNA noch nachweisbar (6.0 DNA-Stränge pro isolierter Zelle), nach adipogener Differenzierung über einen kürzeren Zeitraum aber nicht signifikant unterschiedlich zur Negativkontrolle. Daher ist davon auszugehen, dass nicht die Länge der Kultivierung den Grund für den Unterschied in der Ziel-DNA-Menge darstellt, sondern die Differenzierung. Weiterhin zeigen die Zeitrafferaufnahmen der osteogenen Differenzierung das Absterben EGFP-markierter AD-hMSCs (siehe **Abbildung 4.27**). Mit pEGFP-N1 transfizierte AD-hMSCs lassen sich somit nicht adipogen oder osteogen differenzieren. Stattdessen kam es zum Zelltod der Marker-positiven Zellen. Diese EGFP-markierten Zellen zeigen aber keine Stress-bedingte *in vitro* Seneszenz (siehe **Kapitel 4.2.5.2**) und auch die Langzeit-Expansion hat nicht zu einem vermehrten Absterben der EGFP-positiven Zellen geführt. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass nach lentiviraler Transduktion mit einem *egfp*-Reporterplasmid die Differenzierungskapazitäten zu Adipozyten und Osteoblasten deutlich herabgesetzt waren. Weiterhin ist die Differenzierungskapazität nach Nonsens-DNA-Transfektion nicht herabgesetzt. Aufgrund der Kombination dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass das Zellsterben weder auf das Zellalter noch auf die Elektroporation zurückzuführen ist. Stattdessen lässt sich vermuten, dass die gleichzeitige Differenzierung und EGFP-Produktion die Zellen überfordert und es so zum Zelltod kommt.

---

Insgesamt ist zu erkennen, dass nach Elektroporation mit Nonsens-DNA die AD-hMSCs ihre spezifischen Zelleigenschaften beibehalten. Dies ist nicht der Fall nach Elektroporation mit pEGFP-N1 oder lentiviraler Transduktion. In beiden Fällen war die Differenzierungskapazität eingeschränkt. Außerdem war nach erfolgter lentiviraler Transduktion eine Veränderung in der Expression der MSC-spezifischen Oberflächenantigene festzustellen. Dementsprechend ist eine Anwendung der mittels EGFP-markierten AD-hMSCs *in vivo* und *in vitro* möglich, solange keine Differenzierung notwendig ist. Der am besten für alle *in vivo* und *in vitro* Anwendungen geeignete Zell-Marker ist die Nonsens-DNA, da hier alle charakteristischen Eigenschaften der AD-hMSCs erhalten bleiben.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer zu den umstrittenen viralen Methoden alternative DNA-Markierungsmethode von humanen adulten Stammzellen aus dem Fettgewebe (engl. *adipose tissue derived human mesenchymal stem cells*; AD-hMSCs). Die Markierung auf DNA-Ebene sollte zunächst mit einem *egfp* (verbessertes grün fluoreszierendes Protein, engl. *enhanced green fluorescent protein*)-Reporterplasmid etabliert werden. Außerdem sollte eine nicht-kodierende Nonsens-DNA-Sequenz als Marker verwendet werden. Da diese Markierungsmethode möglichst keinen negativen Effekt auf die Zelleigenschaften haben sollte, sollten wichtige Zellcharakteristika vor und nach erfolgter Markierung überprüft werden. Außerdem sollte eine Langzeitnachweisbarkeit ( $\geq 30$  Tage) des eingebrachten Markers überprüft werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden zunächst fibroblastenähnliche Zellen aus dem humanen Fettgewebe isoliert und nach Anforderungen der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie (engl. *International Society for Cellular Therapy*, ISCT) als AD-hMSCs charakterisiert.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde eine DNA-Markierungsmethode für die isolierten AD-hMSCs entwickelt. Die AD-hMSCs wurden mithilfe von vier Methoden markiert: Lipofektion mit einem *egfp*-Reporterplasmid, Elektroporation mit *egfp*-Reporterplasmid, Elektroporation mit Nonsens-DNA und lentiviraler Transduktion mit *egfp*-Reporterplasmid.

Hier wurde zunächst die Lipofektion – als eine einfache und günstige Reagenz-basierte DNA-Transfermethode – mithilfe verschiedener kommerziell erhältlicher Kits untersucht. Dieser Ansatz wurde aber aufgrund der schlechten Transfektionseffizienzen verworfen. Im nächsten Schritt wurde eine physikalische Methode – die Elektroporation – untersucht. Die Elektroporation wurde zunächst mittels *egfp*-Reporterplasmid etabliert und hinsichtlich der Parameter Voltzahl, Pulslänge und eingesetzter DNA-Menge optimiert. Hierbei zeigte sich, dass ein Puls der Länge 100  $\mu$ s mit einer Voltzahl von 600  $\mu$ s und eine DNA-Menge von 20  $\mu$ g Plasmid-DNA (6.84 nmol) zur besten Transfektionseffizienz bei AD-hMSCs führte.

Anschließend wurde eine mögliche *in vitro* und *in vivo* Anwendbarkeit der AD-hMSC-Markierung mittels DNA überprüft. Hierzu wurden die verschiedenen DNA-Transfermethoden hinsichtlich dreier Eigenschaften untersucht und miteinander verglichen: Transfektionseffizienz, Langzeit-Nachweisbarkeit und ihr Einfluss auf spezifische Zellcharakteristika.

Mit den oben beschriebenen Parametern konnte mit *egfp*-Plasmid eine Transfektionseffizienz von 29.5% erzielt werden und mit Nonsens-DNA von 44.5%, während eine zum Vergleich durchgeführte lentivirale Transduktion nur zu 5.1% Marker-positiven Zellen führte. Weiterhin war die Marker-DNA sowohl nach Elektroporation mit dem *egfp*-Reporterplasmid, als auch mit Nonsens-DNA noch nach 35 Tagen in hohen Mengen nachweisbar: 45.2% der AD-hMSCs waren

Marker-positiv mit durchschnittlich 13.2 DNA-Strängen pro Marker-positiver Zelle. Somit konnte im Laufe dieser Arbeit eine Methode zur DNA-basierten Markierung der AD-hMSCs erfolgreich etabliert werden. Ebenfalls konnte die zu erzielende Langzeitnachweisbarkeit von über 30 Tagen mithilfe der Elektroporation mit dem *egfp*-Reporterplasmid oder Nonsens-DNA erreicht werden. Dementsprechend lassen sich die AD-hMSCs in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien. Dementsprechend sind die hier markierten AD-hMSCs über einen ausreichend langen Zeitraum eindeutig identifizierbar, um sie in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien zu verwenden.

Nach Markierung mit Nonsens-DNA und anschließender Differenzierung konnte die Marker-DNA ebenfalls erfolgreich mittels qRT-PCR nachgewiesen werden. Die Marker-DNA ist somit auch in genügend hohen Mengen in den Zielzellen vorhanden, um in zukünftigen Studien zu einer erfolgreichen Identifikation der markierten AD-hMSCs zu führen. Im Gegensatz dazu enthielten die *egfp*-Plasmid-markierten und anschließend differenzierten Zellen keine von der Negativkontrolle signifikant unterscheidbaren Mengen Marker-DNA. In zukünftigen Studien, bei denen eine Differenzierung nötig ist, kommt daher nur die Nonsens-DNA-Elektroporation in Frage. Bei Studien, bei denen dies nicht von Bedeutung ist, können auch EGFP-markierte AD-hMSCs angewandt werden.

Anschließend wurde der Einfluss der DNA-Markierung mittels Elektroporation und lentiviraler Transduktion auf spezifische Zellcharakteristika untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Elektroporation mit Nonsens-DNA als einzige hier verwendete Methode auf alle untersuchten Zelleigenschaften keinen negativen Einfluss hat: CFU Anzahl, Seneszenz, der Immunophänotyp wie auch die Differenzierungskapazitäten blieben nach dem erfolgten DNA-Transfer erhalten. Im Gegensatz dazu war nach Elektroporation mit *egfp*-Plasmid zwar die CFU Anzahl, die Seneszenz und der Immunophänotyp vergleichbar zu den ursprünglichen isolierten und charakterisierten AD-hMSCs; die EGFP-produzierenden Zellen ließen sich aber weder in Osteoblasten noch in Adipozyten differenzieren. Stattdessen konnte in einer Zeitraffer-Aufnahme sogar das Absterben von EGFP-positiven Zellen während der ersten 18.5 Stunden einer osteogenen Differenzierung beobachtet werden. Auch die lentiviral transduzierten, EGFP-produzierenden Zellen wiesen die gleiche stark herabgesetzte Differenzierungskapazität auf. Zusätzlich waren nach lentiviraler Transduktion zwar die CFU Anzahl wie auch die Seneszenz vergleichbar zu denen der AD-hMSCs vor erfolgtem DNA-Transfer, aber der Immunophänotyp unterschied sich in zwei MSC-charakteristischen Oberflächenantigenen deutlich (CD44 wurde nur von 77.73% der Zellen, CD73 sogar nur von 43.04% der Zellen exprimiert).

Weiterhin erfolgte ein erstes *in vitro* Monitoring von elektroporierten AD-hMSCs, um die Anwendbarkeit der DNA-Markierung mittels Elektroporation zu zeigen. Hier konnte die Migration einzelner EGFP-markierter AD-hMSCs erfolgreich und unkompliziert online mittels Inkubator-

Fluoreszenzmikroskop nachverfolgt werden. Für die Nonsense-DNA-markierten AD-hMSCs konnten jedoch keine Fluoreszenzaufnahmen aufgezeichnet werden, da das Fluoreszenz-Signal für eine Mikroskop-Aufnahme zu schwach war. Daher sollten hier Optimierungen stattfinden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Elektroporation eine gute Alternative zum viralen Gentransfer ist, da eine gute Transfektionseffizienz erreicht wurde und hohe Mengen der Marker-DNA nachweisbar waren. Außerdem war die Marker-DNA noch lange nachweisbar. Gleichzeitig wirft die Elektroporation nicht die gleichen Sicherheitsbedenken auf wie virale DNA-Transfermethoden. Das Ziel eine DNA-Markierungsmethode für AD-hMSCs zu entwickeln, die als Alternative zu den umstrittenen viralen Methoden verwendet werden kann, wurde also erreicht. Weiterhin ist erfüllt die Nonsense-DNA-Markierung das gestellte Ziel, keine Zellcharakteristika negativ zu beeinflussen, während die mit *egfp*-Plasmid elektroporierten Zellen eine verschlechterte Differenzierungskapazität zeigen.

In zukünftigen Studien können die mittels Elektroporation markierten AD-hMSCs in *in vitro* und *in vivo* Studien genutzt werden. So können markierte Zellen beispielsweise *in vivo* in der autologen Stammzelltherapie zum Einsatz kommen. Nach eventueller Entartung im Patienten kann *ex vivo* überprüft werden, ob die transplantierten Stammzellen der Auslöser dieser Entartung waren. Für die Nonsense-DNA- und EGFP-Markierungen mittels Elektroporation ist eine Kombination mit *in vivo* Durchflusszytometrie besonders interessant, um beispielsweise die Biodistribution und das Überleben von AD-hMSCs in der Stammzelltherapie zu überprüfen. Für alle Anwendungen sollten in zukünftigen Studien die Marker-positiven Zellen mittels FACS sortiert werden, um eine eindeutige Identifikation der transplantierten AD-hMSCs zu gewährleisten. Außerdem sollte für die *in vivo* Anwendungen zunächst auch in *in vivo* Tiermodellen ein negativer Einfluss durch die Markierung auf die Zellen in Stammzelltherapie und Tissue Engineering ausgeschlossen werden.

Die durch Elektroporation EGFP-markierten AD-hMSCs können in Zukunft ebenfalls *in vitro* und *in vivo* verwendet werden. Da aber die Differenzierungskapazität negativ beeinflusst wird, können diese Zellen nur in Studien zur Anwendung kommen, bei denen keine Differenzierung nötig ist. Da das Fluoreszenz-Signal hier so hoch ist, dass Zeitraffer-Mikroskop-Aufnahmen möglich sind, ist eine Anwendung insbesondere für das Monitoring von AD-hMSCs bei Wachstum auf lichtundurchlässigen Trägermaterialien interessant, da diese keine Durchlichtmikroskopie erlauben und so ein online-Monitoring erschweren. Da die Zellcharakteristika nicht negativ beeinflusst wurden, sollten aber Nonsense-DNA markierte AD-hMSCs bevorzugt gegenüber den EGFP-markierten AD-hMSCs verwendet werden. Um auch *in vitro* Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen zu erlauben, sollte die Marker-DNA weiter optimiert und so das Fluoreszenzsignal verstärkt werden. So können zum einen intensivere Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden, die

---

ebenfalls schwächer durch Lichteinstrahlung bleichen wie beispielsweise die Alexa-Fluor-Farbstoffe, und zum anderen kann die Anzahl der Farbstoffmoleküle pro DNA-Strang erhöht werden.

Insgesamt kann die hier etablierte Methode der AD-hMSC-Markierung zur Aufklärung vom Verhalten der Stammzellen in *in vivo* und *in vitro* Studien beitragen, ohne die Zelleigenschaften zu verändern.

## A LITERATURVERZEICHNIS

1. Omole, A.E. and A.O.J. Fakoya, *Ten years of progress and promise of induced pluripotent stem cells: historical origins, characteristics, mechanisms, limitations, and potential applications*. PeerJ, 2018. **6**: p. e4370.
2. Böcker, W., et al., *Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer*. J Cell Mol Med, 2008. **12**(4): p. 1347-59.
3. Soto, D.A. and P.J. Ross, *Pluripotent stem cells and livestock genetic engineering*. Transgenic Res, 2016. **25**(3): p. 289-306.
4. Piper, S.L., et al., *Inducible immortality in hTERT-human mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 2012. **30**(12): p. 1879-85.
5. Turinetto, V., E. Vitale, and C. Giachino, *Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(7).
6. Morrison, S.J., N.M. Shah, and D.J. Anderson, *Regulatory mechanisms in stem cell biology*. Cell, 1997. **88**(3): p. 287-98.
7. Morrison, S.J. and A.C. Spradling, *Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life*. Cell, 2008. **132**(4): p. 598-611.
8. Ji, L., J.J. de Pablo, and S.P. Palecek, *Cryopreservation of adherent human embryonic stem cells*. Biotechnology and Bioengineering, 2004. **88**(3): p. 299-312.
9. López-Lázaro, M., *The migration ability of stem cells can explain the existence of cancer of unknown primary site. Rethinking metastasis*. Oncoscience, 2015. **2**(5): p. 467-75.
10. Boyette, L.B. and R.S. Tuan, *Adult Stem Cells and Diseases of Aging*. J Clin Med, 2014. **3**(1): p. 88-134.
11. Goodell, M.A., H. Nguyen, and N. Shroyer, *Somatic stem cell heterogeneity: diversity in the blood, skin and intestinal stem cell compartments*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015. **16**(5): p. 299-309.
12. Weiss, M.L., et al., *Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease*. Stem Cells, 2006. **24**(3): p. 781-92.
13. Ishii, T. and K. Eto, *Fetal stem cell transplantation: Past, present, and future*. World J Stem Cells, 2014. **6**(4): p. 404-20.
14. Rahimi, M., et al., *An integrated analysis to predict micro-RNAs targeting both stemness and metastasis in breast cancer stem cells*. J Cell Mol Med, 2019.
15. Hermann, P.C., et al., *Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(3): p. 313-23.
16. Phi, L.T.H., et al., *Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment*. Stem Cells Int, 2018. **2018**: p. 5416923.
17. Phinney, D.G., *Biochemical heterogeneity of mesenchymal stem cell populations: clues to their therapeutic efficacy*. Cell Cycle, 2007. **6**(23): p. 2884-9.
18. Slack, J., *The Science of Stem Cells*. 2018: John Wiley & Sons, Inc.
19. Sell, S., *On the stem cell origin of cancer*. Am J Pathol, 2010. **176**(6): p. 2584-494.
20. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-317.
21. Gimble, J.M. and F. Guilak, *Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential*. Cytotherapy, 2003. **5**(5): p. 362-369.
22. Gimble, J.M., A.J. Katz, and B.A. Bunnell, *Adipose-derived stem cells for regenerative medicine*. Circulation Research, 2007. **100**(9): p. 1249-1260.

23. Stocchero, I.N. and G.F. Stocchero, *Isolation of Stem Cells from Human Adipose Tissue: Technique, Problems, and Pearls*, in *Adipose Stem Cells and Regenerative Medicine*, Y.-G. Illouz and A. Sterodimas, Editors. 2011, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 13-18.
24. Francis, M.P., et al., *Isolating adipose-derived mesenchymal stem cells from lipoaspirate blood and saline fraction*. *Organogenesis*, 2010. **6**(1): p. 11-14.
25. Parekkadan, B. and J.M. Milwid, *Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics*, in *Annual Review of Biomedical Engineering, Vol 12*, M.L. Yarmush, J.S. Duncan, and M.L. Gray, Editors. 2010, Annual Reviews: Palo Alto. p. 87-117.
26. Mizuno, H., M. Tobita, and A.C. Uysal, *Concise Review: Adipose-Derived Stem Cells as a Novel Tool for Future Regenerative Medicine*. *Stem Cells*, 2012. **30**(5): p. 804-810.
27. Conrad, C., et al., *Linking Transgene Expression of Engineered Mesenchymal Stem Cells and Angiopoietin-1-induced Differentiation to Target Cancer Angiogenesis*. *Annals of Surgery*, 2011. **253**(3): p. 566-571.
28. Nguyen, T.A., et al., *Improvement of cyclophosphamide activation by CYP2B6 mutants: from in silico to ex vivo*. *Mol Pharmacol*, 2008. **73**(4): p. 1122-33.
29. Amariglio, N., et al., *Donor-Derived Brain Tumor Following Neural Stem Cell Transplantation in an Ataxia Telangiectasia Patient*. *Plos Medicine*, 2009. **6**(2): p. 221-231.
30. Peters, B.A., et al., *Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature*. *Nature Medicine*, 2005. **11**(3): p. 261-262.
31. Djouad, F., et al., *Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals*. *Blood*, 2003. **102**(10): p. 3837-3844.
32. von der Haar, K., et al., *Lost signature: progress and failures in in vivo tracking of implanted stem cells*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015. **99**(23): p. 9907-9922.
33. Tse, W.T., et al., *Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation*. *Transplantation*, 2003. **75**(3): p. 389-97.
34. Di Nicola, M., et al., *Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli*. *Blood*, 2002. **99**(10): p. 3838-43.
35. Gao, F., et al., *Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects*. *Cell Death Dis*, 2016. **7**(1): p. e2062-.
36. Gnecci, M., et al., *Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy*. *Circulation research*, 2008. **103**(11): p. 1204-1219.
37. Caplan, A.I. and D. Correa, *The MSC: An Injury Drugstore*. *Cell Stem Cell*, 2011. **9**(1): p. 11-15.
38. Liechty, K.W., et al., *Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep*. *Nat Med*, 2000. **6**(11): p. 1282-6.
39. Caplan, A.I., *Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine*. *J Cell Physiol*, 2007. **213**(2): p. 341-7.
40. Lee, A.S., et al., *Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies*. *Nat Med*, 2013. **19**(8): p. 998-1004.
41. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhjan, and K.S. Lalykina, *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. *Cell Tissue Kinet*, 1970. **3**(4): p. 393-403.
42. Castro-Malaspina, H., et al., *Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny*. *Blood*, 1980. **56**(2): p. 289-301.
43. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. *J Orthop Res*, 1991. **9**(5): p. 641-50.
44. *ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine* Identifier NCT02365142, Treatment of Osteoarthritis by Intra-articular

- Injection of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells With Platelet Rich Plasma (CMM-PRGF/ART) 2018 Jan 27; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02365142>.
45. Karaöz, E., et al., *Comparative Analyses of Immunosuppressive Characteristics of Bone-Marrow, Wharton's Jelly, and Adipose Tissue-Derived Human Mesenchymal Stem Cells*. Turk J Haematol, 2017. **34**(3): p. 213-25.
  46. Castro-Manrreza, M.E. and J.J. Montesinos, *Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications*. J Immunol Res, 2015. **2015**.
  47. Zang, L., et al., *Mesenchymal stem cell therapy in type 2 diabetes mellitus*. Diabetol Metab Syndr, 2017. **9**.
  48. Alfaifi, M., et al., *Mesenchymal stromal cell therapy for liver diseases*. Journal of Hepatology, 2018. **68**(6): p. 1272-1285.
  49. Eggenhofer, E., et al., *The Life and Fate of Mesenchymal Stem Cells*. Frontiers in Immunology, 2014. **5**: p. 148.
  50. Ab Kadir, R., et al., *Characterization of mononucleated human peripheral blood cells*. ScientificWorldJournal, 2012. **2012**: p. 843843.
  51. O'Neill, D.W. and N. Bhardwaj, *Differentiation of peripheral blood monocytes into dendritic cells*. Curr Protoc Immunol, 2005. **Chapter 22**: p. Unit 22F 4.
  52. Magatti, M., et al., *Amniotic mesenchymal tissue cells inhibit dendritic cell differentiation of peripheral blood and amnion resident monocytes*. Cell Transplant, 2009. **18**(8): p. 899-914.
  53. Zhang, X., et al., *Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue*. J Cell Biochem, 2011. **112**(4): p. 1206-18.
  54. Jeong, Y., et al., *Integrative analysis of DNA methylation and mRNA expression during differentiation of umbilical cord blood derived mononuclear cells to endothelial cells*. Gene, 2017. **635**: p. 48-60.
  55. An, S.Y., et al., *Valproic acid promotes differentiation of hepatocyte-like cells from whole human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells*. Tissue Cell, 2014. **46**(2): p. 127-35.
  56. Jazedje, T., et al., *Stem cells from umbilical cord blood do have myogenic potential, with and without differentiation induction in vitro*. J Transl Med, 2009. **7**: p. 6.
  57. Zhao, F., et al., *Umbilical cord blood mesenchymal stem cells co-modified by TERT and BDNF: a novel neuroprotective therapy for neonatal hypoxic-ischemic brain damage*. Int J Dev Neurosci, 2014. **38**: p. 147-54.
  58. Bartsch, G., et al., *Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors*. Stem Cells Dev, 2005. **14**(3): p. 337-48.
  59. Riekstina, U., et al., *Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions*. Cytotechnology, 2008. **58**(3): p. 153-62.
  60. Gronthos, S., et al., *Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells*. J Cell Physiol, 2001. **189**(1): p. 54-63.
  61. Baglioni, S., et al., *Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue*. FASEB J, 2009. **23**(10): p. 3494-505.
  62. Pendleton, C., et al., *Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue vs bone marrow: in vitro comparison of their tropism towards gliomas*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e58198.
  63. Choi, Y.S., et al., *Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(4): p. 878-89.

64. Wang, Y., et al., *Human adipose-derived mesenchymal stem cells are resistant to HBV infection during differentiation into hepatocytes in vitro*. *Int J Mol Sci*, 2014. **15**(4): p. 6096-110.
65. Safford, K.M., et al., *Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **294**(2): p. 371-9.
66. Timper, K., et al., *Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **341**(4): p. 1135-40.
67. Stewart, K., et al., *Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells*. *J Bone Miner Res*, 1999. **14**(8): p. 1345-56.
68. Mamidi, M.K., et al., *Comparative cellular and molecular analyses of pooled bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells during continuous passaging and after successive cryopreservation*. *J Cell Biochem*, 2012. **113**(10): p. 3153-64.
69. Gronthos, S., et al., *The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors*. *Blood*, 1994. **84**(12): p. 4164-73.
70. Tuan, R.S., G. Boland, and R. Tuli, *Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering*. *Arthritis Res Ther*, 2003. **5**(1): p. 32-45.
71. Ranera, B., et al., *Expansion under hypoxic conditions enhances the chondrogenic potential of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. *Vet J*, 2013. **195**(2): p. 248-51.
72. Xu, W., et al., *Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2004. **229**(7): p. 623-31.
73. Lee, K.D., et al., *In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells*. *Hepatology*, 2004. **40**(6): p. 1275-84.
74. Barzilay, R., et al., *Lentiviral delivery of LMX1a enhances dopaminergic phenotype in differentiated human bone marrow mesenchymal stem cells*. *Stem Cells Dev*, 2009. **18**(4): p. 591-601.
75. Phadnis, S.M., et al., *Human bone marrow-derived mesenchymal cells differentiate and mature into endocrine pancreatic lineage in vivo*. *Cytotherapy*, 2011. **13**(3): p. 279-93.
76. Gabr, M.M., et al., *Insulin-producing cells from adult human bone marrow mesenchymal stem cells control streptozotocin-induced diabetes in nude mice*. *Cell Transplant*, 2013. **22**(1): p. 133-45.
77. Mazor, M., et al., *Progenitor Cells from Cartilage: Grade Specific Differences in Stem Cell Marker Expression*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(8).
78. Alsalameh, S., et al., *Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(5): p. 1522-32.
79. Campbell, D.D. and M. Pei, *Surface Markers for Chondrogenic Determination: A Highlight of Synovium-Derived Stem Cells*. *Cells*, 2012. **1**(4): p. 1107-20.
80. Raynaud, C.M., et al., *Comprehensive characterization of mesenchymal stem cells from human placenta and fetal membrane and their response to osteoactivin stimulation*. *Stem Cells Int*, 2012. **2012**: p. 658356.
81. Witkowska-Zimny, M. and E. Wrobel, *Perinatal sources of mesenchymal stem cells: Wharton's jelly, amnion and chorion*. *Cell Mol Biol Lett*, 2011. **16**(3): p. 493-514.
82. Timmins, N.E., et al., *Closed system isolation and scalable expansion of human placental mesenchymal stem cells*. *Biotechnol Bioeng*, 2012. **109**(7): p. 1817-26.
83. Igura, K., et al., *Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta*. *Cytotherapy*, 2004. **6**(6): p. 543-553.
84. Park, T.S., et al., *Placental Perivascular Cells for Human Muscle Regeneration*. *Stem Cells Dev*, 2011. **20**(3): p. 451-63.

85. Chien, C.C., et al., *In vitro differentiation of human placenta-derived multipotent cells into hepatocyte-like cells*. Stem Cells, 2006. **24**(7): p. 1759-68.
86. Zhang, Y., et al., *Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture-initiating cells from cord blood CD34+ cells*. Exp Hematol, 2004. **32**(7): p. 657-64.
87. Portmann-Lanz, C.B., et al., *Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2006. **194**(3): p. 664-673.
88. Alviano, F., et al., *Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro*. BMC Dev Biol, 2007. **7**: p. 11.
89. Tsai, M.S., et al., *Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol*. Hum Reprod, 2004. **19**(6): p. 1450-6.
90. In 't Anker, P.S., et al., *Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation*. Blood, 2003. **102**(4): p. 1548-9.
91. Cai, J., et al., *Generation of human induced pluripotent stem cells from umbilical cord matrix and amniotic membrane mesenchymal cells*. J Biol Chem, 2010. **285**(15): p. 11227-34.
92. In 't Anker, P.S., et al., *Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta*. Stem Cells, 2004. **22**(7): p. 1338-45.
93. Tamagawa, T., et al., *Differentiation of mesenchymal cells derived from human amniotic membranes into hepatocyte-like cells in vitro*. Hum Cell, 2007. **20**(3): p. 77-84.
94. Shaw, S.W.S., et al., *Human amniotic fluid stem cells have better potential in early second trimester of pregnancy and can be reprogramed to iPS*. Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology, 2017. **56**(6): p. 770-774.
95. Antonucci, I., et al., *Isolation of osteogenic progenitors from human amniotic fluid using a single step culture protocol*. BMC Biotechnol, 2009. **9**: p. 9.
96. Tsai, M.S., et al., *Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells*. Biol Reprod, 2006. **74**(3): p. 545-51.
97. De Coppi, P., et al., *Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(1): p. 100-6.
98. Markmee, R., et al., *Differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic fluid to cardiomyocyte-like cells*. Molecular Medicine Reports, 2017. **16**(5): p. 6068-6076.
99. Hou, T., et al., *Umbilical cord Wharton's Jelly: a new potential cell source of mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering*. Tissue Eng Part A, 2009. **15**(9): p. 2325-34.
100. Chen, M.Y., et al., *Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Exp Hematol, 2009. **37**(5): p. 629-40.
101. Anzalone, R., et al., *New emerging potentials for human Wharton's jelly mesenchymal stem cells: immunological features and hepatocyte-like differentiative capacity*. Stem Cells Dev, 2010. **19**(4): p. 423-38.
102. Datta, I., et al., *Neuronal plasticity of human Wharton's jelly mesenchymal stromal cells to the dopaminergic cell type compared with human bone marrow mesenchymal stromal cells*. Cytotherapy, 2011. **13**(8): p. 918-32.
103. Mitchell, K.E., et al., *Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia*. Stem Cells, 2003. **21**(1): p. 50-60.
104. Seifrtova, M., et al., *The response of human ectomesenchymal dental pulp stem cells to cisplatin treatment*. Int Endod J, 2012. **45**(5): p. 401-12.

105. Huang, G.T., S. Gronthos, and S. Shi, *Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine*. J Dent Res, 2009. **88**(9): p. 792-806.
106. Kadar, K., et al., *Differentiation potential of stem cells from human dental origin - promise for tissue engineering*. J Physiol Pharmacol, 2009. **60 Suppl 7**: p. 167-75.
107. Wang, J., et al., *Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells*. Stem Cells Dev, 2010. **19**(9): p. 1375-83.
108. El Alami, M., et al., *Activation of p38, p21, and NRF-2 Mediates Decreased Proliferation of Human Dental Pulp Stem Cells Cultured under 21% O<sub>2</sub>*. Stem Cell Reports, 2014. **3**(4): p. 566-73.
109. Lee, D.H., et al., *Bone marrow aspirate concentrate and platelet-rich plasma enhanced bone healing in distraction osteogenesis of the tibia*. Clin Orthop Relat Res, 2014. **472**(12): p. 3789-97.
110. Juneja, S.C., et al., *A Simplified Method for the Aspiration of Bone Marrow from Patients Undergoing Hip and Knee Joint Replacement for Isolating Mesenchymal Stem Cells and In Vitro Chondrogenesis*. Bone Marrow Research, 2016. **2016**: p. 18.
111. Zhu, Y., et al., *Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC*. Cell Biochem Funct, 2008. **26**(6): p. 664-75.
112. Bongso, A. and C.Y. Fong, *The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord*. Stem Cell Rev, 2013. **9**(2): p. 226-40.
113. Schmuck, E.G., et al., *Biodistribution and Clearance of Human Mesenchymal Stem Cells by Quantitative Three-Dimensional Cryo-Imaging After Intravenous Infusion in a Rat Lung Injury Model*. Stem Cells Transl Med, 2016. **5**(12): p. 1668-75.
114. Fischer, U.M., et al., *Pulmonary Passage is a Major Obstacle for Intravenous Stem Cell Delivery: The Pulmonary First-Pass Effect*. Stem Cells Dev, 2009. **18**(5): p. 683-91.
115. Francois, S., et al., *Long-Term Quantitative Biodistribution and Side Effects of Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs) Engraftment in NOD/SCID Mice following Irradiation*. Stem Cells International, 2014. **2014**: p. 13.
116. Rochefort, G.Y., et al., *Influence of hypoxia on the domiciliation of mesenchymal stem cells after infusion into rats: possibilities of targeting pulmonary artery remodeling via cells therapies?* Respir Res, 2005. **6**: p. 125.
117. Tajiri, N., et al., *Intravenous Transplants of Human Adipose-Derived Stem Cell Protect the Brain from Traumatic Brain Injury-Induced Neurodegeneration and Motor and Cognitive Impairments: Cell Graft Biodistribution and Soluble Factors in Young and Aged Rats*. Journal of Neuroscience, 2014. **34**(1): p. 313-326.
118. Wang, W., et al., *Efficacy and biodistribution of autologous, allogeneic, and xenogeneic adipose mesenchymal stem cells on osteoarthritis*. Osteoarthritis and Cartilage, 2017 **25**: p. S422-S423.
119. Kang, W.J., et al., *Tissue distribution of 18F-FDG-labeled peripheral hematopoietic stem cells after intracoronary administration in patients with myocardial infarction*. J Nucl Med, 2006. **47**(8): p. 1295-301.
120. Wu, C.G., et al., *In vivo tracking of human placenta derived mesenchymal stem cells in nude mice via (1)(4)C-TdR labeling*. BMC Biotechnol, 2015. **15**: p. 55.
121. Yun, J.W., et al., *Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in acute liver injury: Hepatoprotective efficacy, subchronic toxicity, tumorigenicity, and biodistribution*. Regul Toxicol Pharmacol, 2016. **81**: p. 437-447.
122. Wang, Y., et al., *Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention*. Heart, 2006. **92**(6): p. 768-74.

123. Taghavi, S. and J.C. George, *Homing of stem cells to ischemic myocardium*. Am J Transl Res, 2013. **5**(4): p. 404-11.
124. Michalicka, M., et al., *Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cell-Derived Osteoblasts Promote the Expansion of Hematopoietic Progenitors Through Beta-Catenin and Notch Signaling Pathways*. Stem Cells Dev, 2017. **26**(24): p. 1735-1748.
125. Qiao, S.M., et al., *[Research Advance on Role of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell in Hematopoietic Stem Cells Transplantation-Review]*. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2017. **25**(6): p. 1847-1850.
126. Mohseny, A.B. and P.C.W. Hogendoorn, *Concise Review: Mesenchymal Tumors: When Stem Cells Go Mad*. Stem Cells, 2011. **29**(3): p. 397-403.
127. Ridge, S.M., F.J. Sullivan, and S.A. Glynn, *Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression*. Molecular Cancer, 2017. **16**.
128. Lazennec, G. and C. Jorgensen, *Concise review: Adult multipotent stromal cells and cancer: Risk or benefit?* Stem Cells, 2008. **26**(6): p. 1387-1394.
129. Cuiffo, B.G. and A.E. Karnoub, *Mesenchymal stem cells in tumor development: Emerging roles and concepts*. Cell Adh Migr, 2012. **6**(3): p. 220-30.
130. Amariglio, N., et al., *Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient*. PLoS Med, 2009. **6**(2): p. e1000029.
131. Yang, K.Q., et al., *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced by inflammatory cytokines produce angiogenic factors and promote prostate cancer growth*. BMC Cancer, 2017. **17**.
132. Jeong, J.O., et al., *Malignant tumor formation after transplantation of short-term cultured bone marrow mesenchymal stem cells in experimental myocardial infarction and diabetic neuropathy*. Circ Res, 2011. **108**(11): p. 1340-7.
133. Heslop, J.A., et al., *Concise Review: Workshop Review: Understanding and Assessing the Risks of Stem Cell-Based Therapies*. Stem Cells Transl Med, 2015. **4**(4): p. 389-400.
134. Yagi, H. and Y. Kitagawa, *The role of mesenchymal stem cells in cancer development*. Front Genet, 2013. **4**: p. 261.
135. Wong, R.S.Y., *Mesenchymal Stem Cells: Angels or Demons?* Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2011.
136. Goldman, S.A., *Stem and Progenitor Cell-Based Therapy of the Central Nervous System: Hopes, Hype, and Wishful Thinking*. Cell Stem Cell, 2016. **18**(2): p. 174-88.
137. Halpern, J.L., A. Kilbarger, and C.C. Lynch, *Mesenchymal stem cells promote mammary cancer cell migration in vitro via the CXCR2 receptor*. Cancer Lett, 2011. **308**(1): p. 91-9.
138. Liu, S., et al., *Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks*. Cancer Res, 2011. **71**(2): p. 614-24.
139. Burns, J.S., et al., *Decellularized matrix from tumorigenic human mesenchymal stem cells promotes neovascularization with galectin-1 dependent endothelial interaction*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21888.
140. Chen, L., et al., *Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e1886.
141. Castro-Manrreza, M.E., *Participation of mesenchymal stem cells in the regulation of immune response and cancer development*. Boletin Medico Del Hospital Infantil De Mexico, 2016. **73**(6): p. 380-387.
142. Lee, H.Y. and I.S. Hong, *Double-edged sword of mesenchymal stem cells: Cancer-promoting versus therapeutic potential*. Cancer Science, 2017. **108**(10): p. 1939-1946.

143. Cironi, L., et al., *Epigenetic Features of Human Mesenchymal Stem Cells Determine Their Permissiveness for Induction of Relevant Transcriptional Changes by SYT-SSX1*. PLoS One, 2009. **4**(11).
144. Gunes, C. and K.L. Rudolph, *The role of telomeres in stem cells and cancer*. Cell, 2013. **152**(3): p. 390-3.
145. Nikitina, V., et al., *Clonal chromosomal and genomic instability during human multipotent mesenchymal stromal cells long-term culture*. PLoS One, 2018. **13**(2): p. e0192445.
146. Clarke, M.R., F.M. Imhoff, and S.K. Baird, *Mesenchymal Stem Cells Inhibit Breast Cancer Cell Migration and Invasion Through Secretion of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 and-2*. Molecular Carcinogenesis, 2015. **54**(10): p. 1214-1219.
147. Zhu, Y., et al., *Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1*. Leukemia, 2009. **23**(5): p. 925-933.
148. Ramasamy, R., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth*. Leukemia, 2007. **21**(2): p. 304-310.
149. Spaeth, E., et al., *Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells*. Gene Therapy, 2008. **15**(10): p. 730-738.
150. Hall, B., M. Andreeff, and F. Marini, *The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles*. Handb Exp Pharmacol, 2007(180): p. 263-83.
151. Spaeth, E.L. and F.C. Marini, *Dissecting mesenchymal stem cell movement: migration assays for tracing and deducing cell migration*. Methods Mol Biol, 2011. **750**: p. 241-59.
152. Klopp, A.H., et al., *Tumor irradiation increases the recruitment of circulating mesenchymal stem cells into the tumor microenvironment*. Cancer Research, 2007. **67**(24): p. 11687-11695.
153. Rattigan, Y., et al., *Interleukin 6 mediated recruitment of mesenchymal stem cells to the hypoxic tumor milieu*. Exp Cell Res, 2010. **316**(20): p. 3417-24.
154. Treff, N.R. and R.T. Scott, Jr., *Methods for comprehensive chromosome screening of oocytes and embryos: capabilities, limitations, and evidence of validity*. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2012. **29**(5): p. 381-390.
155. Brown, J.C., *Exploring Contemporary Issues in Genetics & Society: Karyotyping, Biological Sex, & Gender*. American Biology Teacher, 2013. **75**(9): p. 692-697.
156. Staessen, C., et al., *Clinical experience of sex determination by fluorescent in-situ hybridization for preimplantation genetic diagnosis*. Mol Hum Reprod, 1999. **5**(4): p. 382-9.
157. Prahlow, J.A., et al., *Gender identification of human hair using fluorescence in situ hybridization*. J Forensic Sci, 1996. **41**(6): p. 1035-7.
158. Moter, A. and U.B. Gobel, *Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms*. J Microbiol Methods, 2000. **41**(2): p. 85-112.
159. Panneerchelvam, S. and M. Norazmi, *Forensic DNA Profiling and Database*. Malays J Med Sci, 2003. **10**(2): p. 20-6.
160. Lu, R., et al., *Tracking single hematopoietic stem cells in vivo using high-throughput sequencing in conjunction with viral genetic barcoding*. Nat Biotech, 2011. **29**(10): p. 928-933.
161. Burns, T.C., et al., *Thymidine analogs are transferred from prelabeled donor to host cells in the central nervous system after transplantation: a word of caution*. Stem Cells, 2006. **24**(4): p. 1121-7.
162. McConnell, S.K., *MIGRATION AND DIFFERENTIATION OF CEREBRAL CORTICAL-NEURONS AFTER TRANSPLANTATION INTO THE BRAINS OF FERRETS*. Science, 1985. **229**(4719): p. 1268-1271.

163. Adrian, E.K. and B.E. Walker, *Incorporation of Thymidine-H3 by Cells in Normal and Injured Mouse Spinal Cord*. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 1962. **21**(4): p. 597-609.
164. Bulte, J.W.M., et al., *MR microscopy of magnetically labeled neurospheres transplanted into the Lewis EAE rat brain*. Magnetic Resonance in Medicine, 2003. **50**(1): p. 201-205.
165. Frangioni, J.V. and R.J. Hajjar, *In vivo tracking of stem cells for clinical trials in cardiovascular disease*. Circulation, 2004. **110**(21): p. 3378-3383.
166. Kraitchman, D.L. and J.W.M. Bulte, *In Vivo Imaging of Stem Cells and Beta Cells Using Direct Cell Labeling and Reporter Gene Methods*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2009. **29**(7): p. 1025-U103.
167. Rodriguez-Porcel, M., *In vivo imaging and monitoring of transplanted stem cells: clinical applications*. Curr Cardiol Rep, 2010. **12**(1): p. 51-8.
168. Kircher, M.F., S.S. Gambhir, and J. Grimm, *Noninvasive cell-tracking methods*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2011. **8**(11): p. 677-688.
169. Bangari, D.S. and S.K. Mittal, *Current strategies and future directions for eluding adenoviral vector immunity*. Current Gene Therapy, 2006. **6**(2): p. 215-226.
170. Bushman, F., et al., *Genome wide analysis of retroviral DNA integration*. Nature Reviews Microbiology, 2005. **3**(11): p. 848-858.
171. Flotte, T.R., *Gene therapy: The first two decades and the current state-of-the-art*. Journal of Cellular Physiology, 2007. **213**(2): p. 301-305.
172. Li, Z.X., et al., *Murine leukemia induced by retroviral gene marking*. Science, 2002. **296**(5567): p. 497-497.
173. Marshall, E., *Clinical trials - Gene therapy death prompts review of adenovirus vector*. Science, 1999. **286**(5448): p. 2244-2245.
174. Guo, R.M., et al., *Controllable labelling of stem cells with a novel superparamagnetic iron oxide-loaded cationic nanovesicle for MR imaging*. European Radiology, 2012. **22**(11): p. 2328-2337.
175. Fernandez-Fernandez, A., R. Manchanda, and A.J. McGoron, *Theranostic Applications of Nanomaterials in Cancer: Drug Delivery, Image-Guided Therapy, and Multifunctional Platforms*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011. **165**(7-8): p. 1628-1651.
176. Ludtke-Buzug, K., D.H. Rapoport, and D. Schneider, *Characterization of Iron-Oxide Loaded Adult Stem Cells for Magnetic Particle Imaging in Targeted Cancer Therapy*, in *8th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*, U. Hafeli, W. Schutt, and M. Zborowski, Editors. 2010, Amer Inst Physics: Melville. p. 244-248.
177. Cho, J.H., et al., *Detection of iron-labeled single cells by MR imaging based on intermolecular double quantum coherences at 14 T*. Journal of Magnetic Resonance, 2012. **217**: p. 86-91.
178. Weisskoff, R.M., et al., *MICROSCOPIC SUSCEPTIBILITY VARIATION AND TRANSVERSE RELAXATION - THEORY AND EXPERIMENT*. Magnetic Resonance in Medicine, 1994. **31**(6): p. 601-610.
179. Frank, J.A., et al., *Magnetic intracellular labeling of mammalian cells by combining (FDA-approved) superparamagnetic iron oxide MR contrast agents and commonly used transfection agents*. Academic Radiology, 2002. **9**: p. S484-S487.
180. Bulte, J.W.M., et al., *Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells*. Nature Biotechnology, 2001. **19**(12): p. 1141-1147.
181. Toyoda, K.I., et al., *Effective magnetic labeling of transplanted cells with HVJ-E for magnetic resonance imaging*. Neuroreport, 2004. **15**(4): p. 589-593.
182. Knopp, T. and T.M. Buzug, *Magnetic Particle Imaging: An Introduction to Imaging Principles and Scanner Instrumentation*. 2012: Springer.
183. Borgert, J., et al., *Fundamentals and applications of magnetic particle imaging*. Journal of Cardiovascular Computed Tomography, 2012. **6**(3): p. 149-153.

184. Goodwill, P.W., et al., *Narrowband Magnetic Particle Imaging*. Ieee Transactions on Medical Imaging, 2009. **28**(8): p. 1231-1237.
185. Weizenecker, J., et al., *Three-dimensional real-time in vivo magnetic particle imaging*. Physics in Medicine and Biology, 2009. **54**(5): p. L1-L10.
186. Sattel, T.F., et al., *Single-sided device for magnetic particle imaging*. Journal of Physics D-Applied Physics, 2009. **42**(2).
187. Goodwill, P.W. and S.M. Conolly, *The X-Space Formulation of the Magnetic Particle Imaging Process: 1-D Signal, Resolution, Bandwidth, SNR, SAR, and Magnetostimulation*. Ieee Transactions on Medical Imaging, 2010. **29**(11): p. 1851-1859.
188. Gleich, B. and R. Weizenecker, *Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles*. Nature, 2005. **435**(7046): p. 1214-1217.
189. Saritas, E.U., et al., *Magnetic Particle Imaging (MPI) for NMR and MRI researchers*. Journal of Magnetic Resonance, 2013. **229**: p. 116-126.
190. Ittrich, H., et al., *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles in Biomedicine: Applications and Developments in Diagnostics and Therapy*. Rofo-Fortschritte Auf Dem Gebiet Der Rontgenstrahlen Und Der Bildgebenden Verfahren, 2013. **185**(12): p. 1149-1166.
191. Publico-Lansigan, M.H., S.F. Situ, and A.C.S. Samia, *Magnetic particle imaging: advancements and perspectives for real-time in vivo monitoring and image-guided therapy*. Nanoscale, 2013. **5**(10): p. 4040-4055.
192. Dammacco, F., et al., *F-18-FDG PET/CT: a review of diagnostic and prognostic features in multiple myeloma and related disorders*. Clinical and Experimental Medicine, 2015. **15**(1): p. 1-18.
193. Gambhir, S.S., *Molecular imaging of cancer with positron emission tomography*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(9): p. 683-693.
194. Thompson, M., et al., *In vivo tracking for cell therapies*. Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2005. **49**(4): p. 339-348.
195. Ghosh, S.C., et al., *Comparison of DOTA and NODAGA as chelators for Cu-64-labeled immunoconjugates*. Nuclear Medicine and Biology, 2015. **42**(2): p. 177-183.
196. Cooper, M.S., et al., *Comparison of Cu-64-Complexing Bifunctional Chelators for Radioimmunoconjugation: Labeling Efficiency, Specific Activity, and in Vitro/in Vivo Stability*. Bioconjugate Chemistry, 2012. **23**(5): p. 1029-1039.
197. Ash, C., et al., *Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods*. Lasers Med Sci, 2017. **32**(8): p. 1909-1918.
198. Welling, M.M., et al., *In vivo Biodistribution of Stem Cells Using Molecular Nuclear Medicine Imaging*. Journal of Cellular Physiology, 2011. **226**(6): p. 1444-1452.
199. Crosignani, V., et al., *Deep tissue fluorescence imaging and in vivo biological applications*. Journal of Biomedical Optics, 2012. **17**(11).
200. Tuchin, V.V., A. Tarnok, and V.P. Zharov, *In vivo flow cytometry: a horizon of opportunities*. Cytometry A, 2011. **79**(10): p. 737-45.
201. Shah, L.S., et al., *Labeling of mesenchymal stem cells by bioconjugated quantum dots*. Nano Letters, 2007. **7**(10): p. 3071-3079.
202. Muller-Borer, B., et al., *Quantum dot labeling of mesenchymal stem cells*. Journal of Nanobiotechnology, 2007. **5**(1): p. 9.
203. Ranjbarvaziri, S., et al., *Quantum dot labeling using positive charged peptides in human hematopoietic and mesenchymal stem cells*. Biomaterials, 2011. **32**(22): p. 5195-5205.
204. de Almeida, P.E., J.R.M. van Rappard, and J.C. Wu, *In vivo bioluminescence for tracking cell fate and function*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2011. **301**(3): p. H663-H671.
205. Huang, N.F., et al., *Bioluminescence Imaging of Stem Cell-Based Therapeutics for Vascular Regeneration*. Theranostics, 2012. **2**(4): p. 346-354.

206. De Vocht, N., et al., *Multimodal Imaging of Stem Cell Implantation in the Central Nervous System of Mice*. Jove-Journal of Visualized Experiments, 2012(64).
207. Jelley, J.V., *CERENKOV RADIATION AND ITS APPLICATIONS*. British Journal of Applied Physics, 1955. **6**(7): p. 227-232.
208. Elrick, R.H. and R.P. Parker, *Use of Cerenkov Radiation in Measurement of beta-Emitting Radionuclides*. International Journal of Applied Radiation and Isotopes, 1968. **19**(3): p. 263-&.
209. Robertson, R., et al., *Optical imaging of Cerenkov light generation from positron-emitting radiotracers*. Physics in Medicine and Biology, 2009. **54**(16): p. N355-N365.
210. Wolfs, E., et al., *Optimization of Multimodal Imaging of Mesenchymal Stem Cells Using the Human Sodium Iodide Symporter for PET and Cerenkov Luminescence Imaging*. Plos One, 2014. **9**(4).
211. Tong, J.Y., et al., *Mesenchymal Stem Cell Transplantation Enhancement in Myocardial Infarction Rat Model under Ultrasound Combined with Nitric Oxide Microbubbles*. Plos One, 2013. **8**(11).
212. Pieroni, D.R., et al., *The sensitivity of contrast echocardiography in detecting intracardiac shunts*. Cathet Cardiovasc Diagn, 1979. **5**(1): p. 19-29.
213. Srinivas, M., et al., *Cell tracking using multimodal imaging*. Contrast Media & Molecular Imaging, 2013. **8**(6): p. 432-438.
214. Tang, Y.H., et al., *MRI/SPECT/Fluorescent Tri-Modal Probe for Evaluating the Homing and Therapeutic Efficacy of Transplanted Mesenchymal Stem Cells in a Rat Ischemic Stroke Model*. Advanced Functional Materials, 2015. **25**(7): p. 1024-1034.
215. Curiel, D.T. and J.T. Douglas, *Cancer Gene Therapy*. 2007: Humana Press.
216. Chira, S., et al., *Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors*. Oncotarget, 2015. **6**(31): p. 30675-30703.
217. Nemerow, G.R., et al., *Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies*. Virology, 2009. **384**(2): p. 380-388.
218. Greber, U.F., et al., *Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells*. Cell, 1993. **75**(3): p. 477-86.
219. Volpers, C. and S. Kochanek, *Adenoviral vectors for gene transfer and therapy*. J Gene Med, 2004. **6 Suppl 1**: p. S164-71.
220. Wu, Q., T. Moyana, and J. Xiang, *Cancer gene therapy by adenovirus-mediated gene transfer*. Curr Gene Ther, 2001. **1**(1): p. 101-22.
221. Vecil, G.G. and F.F. Lang, *Clinical trials of adenoviruses in brain tumors: a review of Ad-p53 and oncolytic adenoviruses*. J Neurooncol, 2003. **65**(3): p. 237-46.
222. Wold, W.S. and K. Toth, *Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy*. Curr Gene Ther, 2013. **13**(6): p. 421-33.
223. Knipe, D.M. and P.M. Howley, *Fields Virology*. Vol. 1. 2007.
224. Surosky, R.T., et al., *Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome*. Journal of Virology, 1997. **71**(10): p. 7951-7959.
225. Kotin, R.M., et al., *Site-specific integration by adeno-associated virus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990. **87**(6): p. 2211-2215.
226. Henckaerts, E. and R.M. Linden, *Adeno-associated virus: a key to the human genome?* Future Virol, 2010. **5**(5): p. 555-574.
227. Bartlett, J.S., R. Wilcher, and R.J. Samulski, *Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors*. J Virol, 2000. **74**(6): p. 2777-85.
228. Henckaerts, E., et al., *Site-specific integration of adeno-associated virus involves partial duplication of the target locus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(18): p. 7571-6.

229. Daya, S. and K.I. Berns, *Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors*. Clinical Microbiology Reviews, 2008. **21**(4): p. 583-593.
230. Salganik, M., M.L. Hirsch, and R.J. Samulski, *Adeno-associated Virus as a Mammalian DNA Vector*. Microbiol Spectr, 2015. **3**(4).
231. Knipe, D.M. and A. Cliffe, *Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection*. Nat Rev Micro, 2008. **6**(3): p. 211-221.
232. Ho, I.A., et al., *HSV-1 amplicon viral vector-mediated gene transfer to human bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Cancer Gene Ther, 2008. **15**(9): p. 553-62.
233. Riethmacher, D., F. Lim, and T. Schimmang, *Efficient transfer of HSV-1 amplicon vectors into embryonic stem cells and their derivatives*. Methods Mol Biol, 2006. **329**: p. 265-72.
234. Vicario, I. and T. Schimmang, *Transfer of FGF-2 via HSV-1-based amplicon vectors promotes efficient formation of neurons from embryonic stem cells*. J Neurosci Methods, 2003. **123**(1): p. 55-60.
235. Epstein, A.L., *HSV-1-based amplicon vectors: design and applications*. Gene Therapy, 2005. **12**: p. S154.
236. Laliberte, J.P., A.S. Weisberg, and B. Moss, *The Membrane Fusion Step of Vaccinia Virus Entry Is Cooperatively Mediated by Multiple Viral Proteins and Host Cell Components*. PLoS Pathog, 2011. **7**(12): p. e1002446.
237. Maruri-Avidal, L., A.S. Weisberg, and B. Moss, *Direct Formation of Vaccinia Virus Membranes from the Endoplasmic Reticulum in the Absence of the Newly Characterized L2-Interacting Protein A30.5*. Journal of Virology, 2013. **87**(22): p. 12313-12326.
238. Tolonen, N., et al., *Vaccinia Virus DNA Replication Occurs in Endoplasmic Reticulum-enclosed Cytoplasmic Mini-Nuclei*. Molecular Biology of the Cell, 2001. **12**(7): p. 2031-2046.
239. Liu, L., et al., *From Crescent to Mature Virion: Vaccinia Virus Assembly and Maturation*. Viruses-Basel, 2014. **6**(10): p. 3787-3808.
240. Ady, J.W., et al., *Oncolytic gene therapy with recombinant vaccinia strain GLV-2b372 efficiently kills hepatocellular carcinoma*. Surgery, 2015. **158**(2): p. 331-338.
241. Lauer, U., et al., *Phase I/II clinical trial of a genetically modified and oncolytic vaccinia virus GL-ONC1 in patients with unresectable, chemotherapy-resistant peritoneal carcinomatosis*. Journal of Clinical Oncology, 2013. **31**(15).
242. Zeh, H.J., et al., *First-in-man Study of Western Reserve Strain Oncolytic Vaccinia Virus: Safety, Systemic Spread, and Antitumor Activity*. Molecular Therapy, 2015. **23**(1): p. 202-214.
243. Heo, J., et al., *Phase IIb randomized trial of Pexa-Vec (pexastimogene devacirepvec; JX-594), a targeted oncolytic vaccinia virus, plus best supportive care (BSC) versus BSC alone in patients with advanced hepatocellular carcinoma who have failed sorafenib treatment (TRAVVERSE)*. Journal of Clinical Oncology, 2013. **31**(15).
244. Haddad, D., et al., *A Vaccinia Virus Encoding the Human Sodium Iodide Symporter Facilitates Long-Term Image Monitoring of Virotherapy and Targeted Radiotherapy of Pancreatic Cancer*. Journal of Nuclear Medicine, 2012. **53**(12): p. 1933-1942.
245. Liu, Q., et al., *Bioluminescent imaging of vaccinia virus infection in immunocompetent and immunodeficient rats as a model for human smallpox*. Scientific Reports, 2015. **5**.
246. Belin, L.J., et al., *An oncolytic vaccinia virus expressing the human sodium iodine symporter prolongs survival and facilitates SPECT/CT imaging in an orthotopic model of malignant pleural mesothelioma*. Surgery, 2013. **154**(3): p. 486-495.
247. Coffin, J.M., *Structure and Classification of Retroviruses*, in *The Retroviridae*, J.A. Levy, Editor. 1992, Springer US: Boston, MA. p. 19-49.

248. Coffin JM, H.S., Varmus HE, *Retroviruses*. 1997: Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
249. Tai, C.K. and N. Kasahara, *Replication-competent retrovirus vectors for cancer gene therapy*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 3083-95.
250. Wu, X., et al., *Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration*. *Science*, 2003. **300**(5626): p. 1749-51.
251. Kawabe, Y., et al., *Targeted transgene insertion into the CHO cell genome using Cre recombinase-incorporating integrase-defective retroviral vectors*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016. **113**(7): p. 1600-1610.
252. Wang, G.P., et al., *HIV integration site selection: analysis by massively parallel pyrosequencing reveals association with epigenetic modifications*. *Genome Res*, 2007. **17**(8): p. 1186-94.
253. Schroder, A.R., et al., *HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots*. *Cell*, 2002. **110**(4): p. 521-9.
254. Olivo, C., et al., *In vivo bioluminescence imaging study to monitor ectopic bone formation by luciferase gene marked mesenchymal stem cells*. *Journal of Orthopaedic Research*, 2008. **26**(7): p. 901-909.
255. Im, H.-J., et al., *In Vivo Visualization and Monitoring of Viable Neural Stem Cells Using Noninvasive Bioluminescence Imaging in the 6-Hydroxydopamine-Induced Mouse Model of Parkinson Disease*. *Molecular Imaging*, 2013. **12**(4): p. 224-234.
256. Ke, C.C., et al., *In Vivo Fluorescence Imaging Reveals the Promotion of Mammary Tumorigenesis by Mesenchymal Stromal Cells*. *Plos One*, 2013. **8**(7).
257. Trono, D., *Lentiviral Vectors*. 2002: Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH
258. Pfeifer, A. and I.M. Verma, *Gene therapy: Promises and problems*. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2001. **2**: p. 177-211.
259. Reiser, J., et al., *Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996. **93**(26): p. 15266-15271.
260. De Rijck, J., et al., *Lentiviral nuclear import: a complex interplay between virus and host*. *Bioessays*, 2007. **29**(5): p. 441-51.
261. Hacein-Bey-Abina, S., et al., *Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(9): p. 3132-42.
262. Wang, G.P., et al., *DNA bar coding and pyrosequencing to analyze adverse events in therapeutic gene transfer*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(9): p. e49.
263. Naldini, L., et al., *Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996. **93**(21): p. 11382-11388.
264. Zufferey, R., et al., *Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo*. *Nature Biotechnology*, 1997. **15**(9): p. 871-875.
265. Zufferey, R., et al., *Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery*. *J Virol*, 1998. **72**(12): p. 9873-80.
266. Dull, T., et al., *A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system*. *Journal of Virology*, 1998. **72**(11): p. 8463-8471.
267. Friedmann, T., *The Development of Human Gene Therapy*. 1999: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
268. Kajaste-Rudnitski, A. and L. Naldini, *Cellular innate immunity and restriction of viral infection: implications for lentiviral gene therapy in human hematopoietic cells*. *Hum Gene Ther*, 2015. **26**(4): p. 201-9.
269. Madeira, C., et al., *Nonviral Gene Delivery to Mesenchymal Stem Cells Using Cationic Liposomes for Gene and Cell Therapy*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010.

270. Jacobsen, L., S. Calvin, and E. Lobenhofer, *Transcriptional effects of transfection: the potential for misinterpretation of gene expression data generated from transiently transfected cells*. Biotechniques, 2009. **47**(1): p. 617-24.
271. Gonzalez-Fernandez, T., et al., *Mesenchymal stem cell fate following non-viral gene transfection strongly depends on the choice of delivery vector*. Acta Biomater, 2017. **55**: p. 226-238.
272. Wang, W., et al., *Polyethylenimine-mediated gene delivery into human bone marrow mesenchymal stem cells from patients*. J Cell Mol Med, 2011. **15**(9): p. 1989-98.
273. Washbourne, P. and A.K. McAllister, *Techniques for gene transfer into neurons*. Current Opinion in Neurobiology, 2002. **12**(5): p. 566-573.
274. Romoren, K., et al., *Transfection efficiency and cytotoxicity of cationic liposomes in salmonid cell lines of hepatocyte and macrophage origin*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2004. **1663**(1-2): p. 127-134.
275. Jordan, M., A. Schallhorn, and F.M. Wurm, *Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation*. Nucleic Acids Research, 1996. **24**(4): p. 596-601.
276. McBain, S.C., et al., *Magnetic nanoparticles as gene delivery agents: enhanced transfection in the presence of oscillating magnet arrays*. Nanotechnology, 2008. **19**(40).
277. Dobson, J., *Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery*. Gene Ther, 2006. **13**(4): p. 283-7.
278. Plank, C., O. Zelphati, and O. Mykhaylyk, *Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-progress and prospects*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(14-15): p. 1300-31.
279. Plank, C., et al., *Enhancing and targeting nucleic acid delivery by magnetic force*. Expert Opin Biol Ther, 2003. **3**(5): p. 745-58.
280. Scherer, F., et al., *Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo*. Gene Ther, 2002. **9**(2): p. 102-9.
281. Mehier-Humbert, S. and R.H. Guy, *Physical methods for gene transfer: Improving the kinetics of gene delivery into cells*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005. **57**(5): p. 733-753.
282. Gao, X., K.-S. Kim, and D. Liu, *Nonviral gene delivery: What we know and what is next*. The AAPS Journal, 2007. **9**(1): p. E92-E104.
283. Sanford, J.C., et al., *DELIVERY OF SUBSTANCES INTO CELLS AND TISSUES USING A PARTICLE BOMBARDMENT PROCESS*. Particulate Science and Technology, 1987. **5**(1): p. 27-37.
284. Smith, K.R., *Gene Therapy: The Potential Applicability of Gene Transfer Technology to the Human Germline*. International Journal of Medical Sciences, 2004. **1**(2): p. 76-91.
285. Rhodes, K., et al., *Cellular laserfection*. Methods Cell Biol, 2007. **82**: p. 309-33.
286. Stevenson, D.J., et al., *Single cell optical transfection*. Journal of the Royal Society Interface, 2010. **7**(47): p. 863-871.
287. Weaver, J.C. and Y.A. Chizmadzhev, *Theory of electroporation: A review*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1996. **41**(2): p. 135-160.
288. Teissie, J., M. Golzio, and M.P. Rols, *Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: A minireview of our present (lack of ?) knowledge*. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, 2005. **1724**(3): p. 270-280.
289. Somiari, S., et al., *Theory and in vivo application of electroporative gene delivery*. Molecular Therapy, 2000. **2**(3): p. 178-187.
290. Kim, T.K. and J.H. Eberwine, *Mammalian cell transfection: the present and the future*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. **397**(8): p. 3173-3178.
291. Zaragosi, L.E., et al., *Nucleofection is a valuable transfection method for transient and stable transgene expression in adipose tissue-derived stem cells*. Stem Cells, 2007. **25**(3): p. 790-797.

292. Lopez, S.O., et al., *Preliminary study on non-viral transfection of F9 (factor IX) gene by nucleofection in human adipose-derived mesenchymal stem cells*. Peerj, 2016. **4**.
293. Bahrambeigi, V., et al., *Non-viral gene transfer into murine adipose derived mesenchymal stem cells: a comparative study of different non-viral methods*. Gene Therapy and Molecular Biology, 2013. **15**: p. 164-175.
294. Aluigi, M., et al., *Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2006. **24**(2): p. 454-461.
295. Dai, W.-J., et al., *CRISPR-Cas9 for in vivo Gene Therapy: Promise and Hurdles*. Molecular Therapy - Nucleic Acids. **5**.
296. Paix, A., et al., *High Efficiency, Homology-Directed Genome Editing in Caenorhabditis elegans Using CRISPR-Cas9 Ribonucleoprotein Complexes*. Genetics, 2015. **201**(1): p. 47-54.
297. Pattanayak, V., et al., *High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity*. Nature biotechnology, 2013. **31**(9): p. 839-843.
298. Nelles, David A., et al., *Programmable RNA Tracking in Live Cells with CRISPR/Cas9*. Cell, 2016. **165**(2): p. 488-496.
299. Hsu, P.D., et al., *DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(9): p. 827-32.
300. Fu, Y., et al., *High frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells*. Nature biotechnology, 2013. **31**(9): p. 822-826.
301. Felgner, J.H., et al., *ENHANCED GENE DELIVERY AND MECHANISM STUDIES WITH A NOVEL SERIES OF CATIONIC LIPID FORMULATIONS*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(4): p. 2550-2561.
302. Boussif, O., et al., *A VERSATILE VECTOR FOR GENE AND OLIGONUCLEOTIDE TRANSFER INTO CELLS IN CULTURE AND IN-VIVO - POLYETHYLENIMINE*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(16): p. 7297-7301.
303. Holmen, S.L., et al., *EFFICIENT LIPID-MEDIATED TRANSFECTION OF DNA INTO PRIMARY RAT HEPATOCYTES*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 1995. **31**(5): p. 347-351.
304. Bansal, R., et al., *Lipophilic and cationic triphenylphosphonium grafted linear polyethylenimine polymers for efficient gene delivery to mammalian cells*. Journal of Materials Chemistry, 2012. **22**(48): p. 25427-25436.
305. Tanasienko, I.V., et al., *DMAEM-based cationic polymers as novel carriers for DNA delivery into cells*. Cell Biology International, 2015. **39**(3): p. 243-245.
306. Zhang, Z., et al., *CRISPR/Cas9 Genome-Editing System in Human Stem Cells: Current Status and Future Prospects*. Molecular Therapy. Nucleic Acids, 2017. **9**: p. 230-241.
307. Zhang, X.J. and W.T. Godbey, *Viral vectors for gene delivery in tissue engineering*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2006. **58**(4): p. 515-534.
308. Tinevez, J.Y., et al., *TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking*. Methods, 2017. **115**: p. 80-90.
309. Mensing, N., et al., *Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from the gingiva and the periodontal ligament of the horse*. BMC veterinary research, 2011. **7**: p. 42-42.
310. Campisi, J., *Aging, cellular senescence, and cancer*. Annu Rev Physiol, 2013. **75**: p. 685-705.
311. Bae, Y., et al., *Characterization of glycol chitosan grafted with low molecular weight polyethylenimine as a gene carrier for human adipose-derived mesenchymal stem cells*. Carbohydrate Polymers, 2016. **153**: p. 379-390.

312. Bae, Y., et al., *Characterization of basic amino acids-conjugated PAMAM dendrimers as gene carriers for human adipose-derived mesenchymal stem cells*. International Journal of Pharmaceutics, 2016. **501**(1-2): p. 75-86.
313. Boura, J.S., et al., *Direct Head-To-Head Comparison of Cationic Liposome-Mediated Gene Delivery to Mesenchymal Stem/Stromal Cells of Different Human Sources: A Comprehensive Study*. Human Gene Therapy Methods, 2013. **24**(1): p. 38-48.
314. Peister, A., et al., *Stable transfection of MSCs by electroporation*. Gene Therapy, 2004. **11**(2): p. 224-228.
315. Tabar, M.S., et al., *Evaluating Electroporation and Lipofectamine Approaches for Transient and Stable Transgene Expressions in Human Fibroblasts and Embryonic Stem Cells*. Cell Journal, 2015. **17**(3): p. 438-450.
316. Flanagan, M., et al., *Competitive DNA transfection formulation via electroporation for human adipose stem cells and mesenchymal stem cells*. Biological Procedures Online, 2012. **14**(1): p. 7.
317. Schlabach, M.R., et al., *Synthetic design of strong promoters*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(6): p. 2538-2543.
318. Kalimuthu, S., et al., *In Vivo Tracking of Chemokine Receptor CXCR4-Engineered Mesenchymal Stem Cell Migration by Optical Molecular Imaging*. Stem Cells Int, 2017. **2017**: p. 8085637.
319. Sprick, G., et al., *Baculovirus-induced recombinant protein expression in human mesenchymal stromal stem cells: A promoter study*. New Biotechnology, 2017. **39**: p. 161-166.
320. Hong, S., et al., *Functional Analysis of Various Promoters in Lentiviral Vectors at Different Stages of In Vitro Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells*. Mol Ther, 2007. **15**(9): p. 1630-9.
321. Wen, S., et al., *Characterization of Constitutive Promoters for piggyBac Transposon-Mediated Stable Transgene Expression in Mesenchymal Stem Cells (MSCs)*. PLoS One, 2014. **9**(4).
322. Meyerrose, T.E., et al., *Lentiviral-transduced human mesenchymal stem cells persistently express therapeutic levels of enzyme in a xenotransplantation model of human disease*. Stem Cells, 2008. **26**(7): p. 1713-22.
323. Lin, P., et al., *Efficient Lentiviral Transduction of Human Mesenchymal Stem Cells That Preserves Proliferation and Differentiation Capabilities*. Stem Cells Translational Medicine, 2012. **1**(12): p. 886-897.
324. Petersen, G.F., et al., *Efficient transduction of equine adipose-derived mesenchymal stem cells by VSV-G pseudotyped lentiviral vectors*. Research in Veterinary Science, 2014. **97**(3): p. 616-622.
325. Ribeiro, S., et al., *Plasmid DNA Size Does Affect Nonviral Gene Delivery Efficiency in Stem Cells*. Cellular Reprogramming, 2012. **14**(2): p. 130-137.
326. Aslan, H., et al., *Nucleofection-based ex vivo nonviral gene delivery to human stem cells as a platform for tissue regeneration*. Tissue Engineering, 2006. **12**(4): p. 877-889.
327. Ferreira, E., et al., *Optimization of a gene electrotransfer method for mesenchymal stem cell transfection*. Gene Therapy, 2008. **15**(7): p. 537-544.
328. van Vollenstee, F.A., et al., *Human adipose derived mesenchymal stromal cells transduced with GFP lentiviral vectors: assessment of immunophenotype and differentiation capacity in vitro*. Cytotechnology, 2016. **68**(5): p. 2049-2060.
329. Lagonegro, P., et al., *Osteoblasts preferentially adhere to peaks on micro-structured titanium*. Dental Materials Journal, 2018. **37**(2): p. 278-285.
330. Eggenhofer, E., et al., *Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 297.
331. Jasmin, et al., *Mesenchymal Bone Marrow Cell Therapy in a Mouse Model of Chagas Disease. Where Do the Cells Go?* PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(12).

332. Liu, X.B., et al., *Angiopoietin-1 preconditioning enhances survival and functional recovery of mesenchymal stem cell transplantation*. J Zhejiang Univ Sci B, 2012. **13**(8): p. 616-23.
333. Freeman, B.T., N.A. Kouris, and B.M. Ogle, *Tracking Fusion of Human Mesenchymal Stem Cells After Transplantation to the Heart*. Stem Cells Transl Med, 2015. **4**(6): p. 685-94.
334. Khurana, A., et al., *Iron administration before stem cell harvest enables MR imaging tracking after transplantation*. Radiology, 2013. **269**(1): p. 186-97.
335. Feng, G.X., et al., *Ultrabright organic dots with aggregation-induced emission characteristics for cell tracking*. Biomaterials, 2014. **35**(30): p. 8669-8677.
336. Berlier, J.E., et al., *Quantitative comparison of long-wavelength Alexa Fluor dyes to Cy dyes: fluorescence of the dyes and their bioconjugates*. J Histochem Cytochem, 2003. **51**(12): p. 1699-712.
337. Hu, Y.J., et al., *Nonviral Gene Targeting at rDNA Locus of Human Mesenchymal Stem Cells*. Biomed Research International, 2013.
338. NguyenThai, Q.A., et al., *Targeted inhibition of osteosarcoma tumor growth by bone marrow-derived mesenchymal stem cells expressing cytosine deaminase/5-fluorocytosine in tumor-bearing mice*. Journal of Gene Medicine, 2015. **17**(3-5): p. 87-99.
339. Zhu, H., et al., *The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix*. Stem Cells, 2006. **24**(4): p. 928-935.
340. Ode, A., et al., *CD73 AND CD29 CONCURRENTLY MEDIATE THE MECHANICALLY INDUCED DECREASE OF MIGRATORY CAPACITY OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS*. European Cells & Materials, 2011. **22**: p. 26-42.
341. Blume, C., et al., *Autoimmunity in CD73/Ecto-5'-Nucleotidase Deficient Mice Induces Renal Injury*. Plos One, 2012. **7**(5).
342. Airas, L., et al., *Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells*. Journal of Cell Biology, 1997. **136**(2): p. 421-431.
343. Koszalka, P., et al., *Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response*. Circulation Research, 2004. **95**(8): p. 814-821.
344. Zernecke, A., et al., *Cd73/ecto-5'-nucleotidase protects against vascular inflammation, monocyte recruitment and neointima formation*. Circulation, 2005. **112**(17): p. U370-U370.
345. Boxall, S.A. and E. Jones, *Markers for Characterization of Bone Marrow Multipotential Stromal Cells*. Stem Cells International, 2012.
346. Kundrotas, G., *Surface markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts*. Acta medica Lituanica, 2012. **19**(2): p. 75-79.
347. Maleki, M., et al., *Comparison of Mesenchymal Stem Cell Markers in Multiple Human Adult Stem Cells*. Int J Stem Cells, 2014. **7**(2): p. 118-26.
348. Lv, F.J., et al., *Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells*. Stem Cells, 2014. **32**(6): p. 1408-1419.
349. AddGene. *Addgene Vector Database*. 2019; Available from: <https://www.addgene.org>.
350. Chang, T.-C., M.-F. Hsu, and K.K. Wu, *High Glucose Induces Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Senescence by Upregulating Autophagy*. PLoS ONE, 2015. **10**(5): p. e0126537.
351. Huggett, J., et al., *Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations*. Genes Immun, 2005. **6**(4): p. 279-84.
352. Ferre, F., *Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth*. PCR Methods Appl, 1992. **2**(1): p. 1-9.
353. Gras, C., et al., *HLA-universal platelet transfusions prevent platelet refractoriness in a mouse model*. Hum Gene Ther, 2013. **24**(12): p. 1018-28.

354. Svedova, J., et al., *Therapeutic blockade of CD54 attenuates pulmonary barrier damage in T cell-induced acute lung injury*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017. **313**(1): p. L177-L191.
355. Rahman, M.M., et al., *CD13 promotes mesenchymal stem cell-mediated regeneration of ischemic muscle*. Front Physiol, 2014. **4**: p. 402.
356. Marsee, D.K., G.S. Pinkus, and H. Yu, *CD71 (transferrin receptor): an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens*. Am J Clin Pathol, 2010. **134**(3): p. 429-35.
357. Nodomi, S., et al., *CD146 is a novel marker for highly tumorigenic cells and a potential therapeutic target in malignant rhabdoid tumor*. Oncogene, 2016. **35**(40): p. 5317-27.
358. Restivo, G., et al., *low neurotrophin receptor CD271 regulates phenotype switching in melanoma*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 1988.
359. Hoppe, I., *HLA-Antigene*, in *Qualitätssicherung: im Medizinischen Laboratorium*, K.-G. von Boroviczény, R. Merten, and U.P. Merten, Editors. 1987, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 720-727.
360. Chambers, I., et al., *Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells*. Cell, 2003. **113**(5): p. 643-55.
361. Midwood, K.S. and D.M. Salter, *Expression of NG2/human melanoma proteoglycan in human adult articular chondrocytes*. Osteoarthritis Cartilage, 1998. **6**(5): p. 297-305.
362. Chambers, C.B., et al., *Spatiotemporal selectivity of response to Notch1 signals in mammalian forebrain precursors*. Development, 2001. **128**(5): p. 689-702.
363. Fakhimahmadi, A., et al., *Nucleostemin silencing induces differentiation and potentiates all-trans-retinoic acid effects in human acute promyelocytic leukemia NB4 cells via autophagy*. Leuk Res, 2017. **63**: p. 15-21.
364. Garikipati, V.N.S., et al., *Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human fetus heart*. PLoS One, 2018. **13**(2): p. e0192244.
365. Brimble, S.N., et al., *The cell surface glycosphingolipids SSEA-3 and SSEA-4 are not essential for human ESC pluripotency*. Stem Cells, 2007. **25**(1): p. 54-62.
366. Ning, H., et al., *Mesenchymal stem cell marker Stro-1 is a 75 kd endothelial antigen*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **413**(2): p. 353-7.
367. Lin, L., et al., *Analysis of expression and prognostic significance of vimentin and the response to temozolomide in glioma patients*. Tumour Biol, 2016. **37**(11): p. 15333-15339.
368. Martin, A.D., et al., *Adipose tissue density, estimated adipose lipid fraction and whole body adiposity in male cadavers*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1994. **18**(2): p. 79-83.
369. White, D.R., H.Q. Woodard, and S.M. Hammond, *Average soft-tissue and bone models for use in radiation dosimetry*. Br J Radiol, 1987. **60**(717): p. 907-13.
370. Laga, E.M., S.G. Driscoll, and H.N. Munro, *Quantitative studies of human placenta. I. Morphometry*. Biol Neonate, 1973. **23**(3): p. 231-59.
371. Tissiani, L.A.L., et al., *Effects of different liposuction techniques on the isolation of mesenchymal stem cells*. Revista Brasileira de Cirurgia Plástica, 2012. **27**: p. 509-513.
372. De Ugarte, D.A., et al., *Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow*. Cells Tissues Organs, 2003. **174**(3): p. 101-9.
373. Aust, L., et al., *Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates*. Cytotherapy, 2004. **6**(1): p. 7-14.
374. Policha, A., et al., *Endothelial differentiation of diabetic adipose-derived stem cells*. Journal of Surgical Research, 2014. **192**(2): p. 656-663.
375. Raposio, E., et al., *A Novel and Effective Strategy for the Isolation of Adipose-Derived Stem Cells: Minimally Manipulated Adipose-Derived Stem Cells for More*

- Rapid and Safe Stem Cell Therapy*. Plastic and Reconstructive Surgery, 2014. **133**(6): p. 1406-1409.
376. Hernigou, P., et al., *Benefits of small volume and small syringe for bone marrow aspirations of mesenchymal stem cells*. International Orthopaedics, 2013. **37**(11): p. 2279-2287.
377. Sakaguchi, Y., et al., *Suspended cells from trabecular bone by collagenase digestion become virtually identical to mesenchymal stem cells obtained from marrow aspirates*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2728-2735.
378. Bilic, G., et al., *Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial and mesenchymal stromal cells for application in cell therapy*. Cell Transplant, 2008. **17**(8): p. 955-68.
379. Soncini, M., et al., *Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes*. J Tissue Eng Regen Med, 2007. **1**(4): p. 296-305.
380. Kim, M.J., et al., *Human chorionic-plate-derived mesenchymal stem cells and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: a comparative analysis of their potential as placenta-derived stem cells*. Cell Tissue Res, 2011. **346**(1): p. 53-64.
381. Smith, J.R., et al., *Standardizing Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells for Translation to Clinical Use: Selection of GMP-Compliant Medium and a Simplified Isolation Method*. Stem Cells Int, 2016. **2016**.
382. Tsagias, N., et al., *Isolation of mesenchymal stem cells using the total length of umbilical cord for transplantation purposes*. Transfus Med, 2011. **21**(4): p. 253-61.
383. Buschmann, J., et al., *Yield and proliferation rate of adipose-derived stromal cells as a function of age, body mass index and harvest site-increasing the yield by use of adherent and supernatant fractions?* Cytotherapy, 2013. **15**(9): p. 1098-1105.
384. Rada, T., R.L. Reis, and M.E. Gomes, *Adipose Tissue-Derived Stem Cells and Their Application in Bone and Cartilage Tissue Engineering*. Tissue Engineering Part B-Reviews, 2009. **15**(2): p. 113-125.
385. Cuthbert, R., et al., *Single-platform quality control assay to quantify multipotential stromal cells in bone marrow aspirates prior to bulk manufacture or direct therapeutic use*. Cytotherapy, 2012. **14**(4): p. 431-440.
386. D'Ippolito, G., et al., *Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow*. Journal of Bone and Mineral Research, 1999. **14**(7): p. 1115-1122.
387. Dhamsi, L.D., *Liposuction*. Indian J Plast Surg, 2008. **41**(Suppl): p. S27-40.
388. Muschler, G.F., C. Boehm, and K. Easley, *Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume*. J Bone Joint Surg Am, 1997. **79**(11): p. 1699-709.
389. Rao, T.V. and V. Chandrasekharam, *Use of dry human and bovine amnion as a biological dressing*. Arch Surg, 1981. **116**(7): p. 891-6.
390. Miki, T. and S.C. Strom, *Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells*. Stem Cell Rev, 2006. **2**(2): p. 133-42.
391. Gasiorowska, A., et al., *Chorionic thickness and PlGF concentrations as early predictors of small-for-gestational age birth weight in a low risk population*. Ginekologia Polska, 2017. **88**(2): p. 87-95.
392. Lee, J.W., et al., *A randomized, open-label, multicenter trial for the safety and efficacy of adult mesenchymal stem cells after acute myocardial infarction*. J Korean Med Sci, 2014. **29**(1): p. 23-31.
393. *ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine Identifier NCT02291926, Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Articular Cartilage Defect 2018 Jan 27; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02291926>.*
394. Wilson, J.G., et al., *Mesenchymal stem (stromal) cells for treatment of ARDS: a phase 1 clinical trial*. Lancet Respir Med, 2015. **3**(1): p. 24-32.

395. Le Blanc, K., et al., *Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells*. Lancet, 2004. **363**(9419): p. 1439-1441.
396. Jiang, R., et al., *Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells in type 2 diabetes: a pilot study*. Front Med, 2011. **5**(1): p. 94-100.
397. Liu, X., et al., *A preliminary evaluation of efficacy and safety of Wharton's jelly mesenchymal stem cell transplantation in patients with type 2 diabetes mellitus*. Stem Cell Res Ther, 2014. **5**(2): p. 57.
398. Koh, K.S., et al., *Clinical application of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in progressive hemifacial atrophy (Parry-Romberg disease) with microfat grafting techniques using 3-dimensional computed tomography and 3-dimensional camera*. Ann Plast Surg, 2012. **69**(3): p. 331-7.
399. Acosta, L., et al., *Adipose Mesenchymal Stromal Cells Isolated From Type 2 Diabetic Patients Display Reduced Fibrinolytic Activity*. Diabetes, 2013. **62**(12): p. 4266-9.
400. Lv, Y.T., et al., *Transplantation of human cord blood mononuclear cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in autism*. J Transl Med, 2013. **11**: p. 196.
401. Campan, M., et al., *Ferritin as a reporter gene for in vivo tracking of stem cells by 1.5-T cardiac MRI in a rat model of myocardial infarction*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2011. **300**(6): p. H2238-H2250.
402. Liu, J., et al., *Noninvasive Monitoring of Embryonic Stem Cells In Vivo with MRI Transgene Reporter*. Tissue Engineering Part C-Methods, 2009. **15**(4): p. 739-747.
403. Cho, I.K., et al., *Longitudinal Monitoring of Stem Cell Grafts In Vivo Using Magnetic Resonance Imaging with Inducible Maga as a Genetic Reporter*. Theranostics, 2014. **4**(10): p. 972-989.
404. Arbab, A.S., et al., *Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI*. Blood, 2004. **104**(4): p. 1217-1223.
405. Tian, F., et al., *Fates of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> nanoparticles in human mesenchymal stem cells assessed by synchrotron radiation-based techniques*. Biomaterials, 2014. **35**(24): p. 6412-6421.
406. Yamada, M., et al., *Manganese-Guided Cellular MRI of Human Embryonic Stem Cell and Human Bone Marrow Stromal Cell Viability*. Magnetic Resonance in Medicine, 2009. **62**(4): p. 1047-1054.
407. Kasten, A., et al., *Tracking of adipose tissue-derived progenitor cells using two magnetic nanoparticle types*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2015. **380**: p. 34-38.
408. Schonitzer, V., et al., *In Vivo Mesenchymal Stem Cell Tracking with PET Using the Dopamine Type 2 Receptor and F-18-Fallypride*. Journal of Nuclear Medicine, 2014. **55**(8): p. 1342-1347.
409. Hung, S.C., et al., *Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging*. Clinical Cancer Research, 2005. **11**(21): p. 7749-7756.
410. Lapa, C., et al., *(18)FDG-PET/CT for prognostic stratification of patients with multiple myeloma relapse after stem cell transplantation*. Oncotarget, 2014. **5**(17): p. 7381-7391.
411. Tarantal, A.F., et al., *Radiolabeling and In Vivo Imaging of Transplanted Renal Lineages Differentiated from Human Embryonic Stem Cells in Fetal Rhesus Monkeys*. Molecular Imaging and Biology, 2012. **14**(2): p. 197-204.
412. Bindslev, L., et al., *Labelling of human mesenchymal stem cells with indium-111 for SPECT imaging: effect on cell proliferation and differentiation*. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2006. **33**(10): p. 1171-1177.
413. Defresne, F., et al., *Biodistribution of adult derived human liver stem cells following intraportal infusion in a 17-year-old patient with glycogenosis type 1A*. Nuclear Medicine and Biology, 2014. **41**(4): p. 371-375.

414. Detante, O., et al., *Intravenous administration of <sup>99m</sup>Tc-HMPAO-labeled human mesenchymal stem cells after stroke: in vivo imaging and biodistribution*. Cell Transplant, 2009. **18**(12): p. 1369-79.
415. van Hensbergen, Y., et al., *Ex vivo culture of human CD34(+) cord blood cells with thrombopoietin (TPO) accelerates platelet engraftment in a NOD/SCID mouse model*. Experimental Hematology, 2006. **34**(7): p. 943-950.
416. Gildehaus, F.J., et al., *Impact of Indium-111 Oxine Labelling on Viability of Human Mesenchymal Stem Cells In Vitro, and 3D Cell-Tracking Using SPECT/CT In Vivo*. Molecular Imaging and Biology, 2011. **13**(6): p. 1204-1214.
417. Ha, S., et al., *In vivo imaging of human adipose-derived stem cells in Alzheimer's disease animal model*. Journal of Biomedical Optics, 2014. **19**(5).
418. Chen, G.C., et al., *Tracking of Transplanted Human Mesenchymal Stem Cells in Living Mice using Near-Infrared Ag-2 S Quantum Dots*. Advanced Functional Materials, 2014. **24**(17): p. 2481-2488.
419. Swart, J.F., et al., *Mesenchymal stem cell therapy in proteoglycan induced arthritis*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2015. **74**(4): p. 769-777.
420. Lee, S., et al., *In Vivo Bioluminescence Imaging of Transplanted Mesenchymal Stem Cells as a Potential Source for Pancreatic Regeneration*. Molecular Imaging, 2014. **13**.
421. Bai, X., et al., *Tracking Long-Term Survival of Intramyocardially Delivered Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells Using Bioluminescence Imaging*. Molecular Imaging and Biology, 2011. **13**(4): p. 633-645.
422. Li, H.Y., Y.S. Wang, and F. Cao, *In vivo Bioluminescence Imaging Monitoring of Stem Cells' Participation in Choroidal Neovascularization*. Ophthalmic Research, 2013. **50**(1): p. 19-26.
423. Li, Z., et al., *Optimization of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Delivery Dose and Route in Mice with Acute Liver Injury by Bioluminescence Imaging*. Molecular Imaging and Biology, 2015. **17**(2): p. 185-194.
424. Liang, Y., P. Walczak, and J.W.M. Bulte, *Comparison of red-shifted firefly luciferase Ppy RE9 and conventional Luc2 as bioluminescence imaging reporter genes for in vivo imaging of stem cells*. Journal of Biomedical Optics, 2012. **17**(1).
425. Min, J.J., et al., *In vivo bioluminescence imaging of cord blood derived mesenchymal stem cell transplantation into rat myocardium*. Annals of Nuclear Medicine, 2006. **20**(3): p. 165-170.
426. Nakabayashi, A., et al., *In vivo bioluminescence imaging of magnetically targeted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in skeletal muscle injury model*. Journal of Orthopaedic Research, 2013. **31**(5): p. 754-759.
427. Su, W., et al., *Bioluminescence Reporter Gene Imaging Characterize Human Embryonic Stem Cell-Derived Teratoma Formation*. Journal of Cellular Biochemistry, 2011. **112**(3): p. 840-848.
428. Kokhuis, T.J.A., et al., *Intravital Microscopy of Localized Stem Cell Delivery Using Microbubbles and Acoustic Radiation Force*. Biotechnology and Bioengineering, 2015. **112**(1): p. 220-227.
429. Lewis, C.M., et al., *Mn-52 Production for PET/MRI Tracking Of Human Stem Cells Expressing Divalent Metal Transporter 1 (DMT1)*. Theranostics, 2015. **5**(3): p. 227-239.
430. Li, Z.J., et al., *Comparison of reporter gene and iron particle labeling for tracking fate of human embryonic stem cells and differentiated endothelial cells in living subjects*. Stem Cells, 2008. **26**(4): p. 864-873.
431. Ge, Y.Q., et al., *Fluorescence Modified Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles for High-Efficient Cellular Imaging*. Nanoscale Research Letters, 2009. **4**(4): p. 287-295.

- 
432. Sung, C.K., et al., *Dual-Modal Nanoprobes for Imaging of Mesenchymal Stem Cell Transplant by MRI and Fluorescence Imaging*. Korean Journal of Radiology, 2009. **10**(6): p. 613-622.

## B ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<sup>18</sup> FFHBG	9-(4-fluoro-3-hydroxymethylbutyl)-Guanin
β-Gal	β-Galaktosidase
AD-hMSC	hMSC aus Fettgewebe (engl.: <i>adipose tissue derived</i> hMSC)
AD-MSC	MSCs aus dem Fettgewebe (engl. <i>adipose tissue derived</i> MSC)
AIED	Aggregation Induced Emission Dot
BLB	Biolumineszenzbasierte Bildgebung
BM-hMSC	humane BM-MSC
BM-MSC	MSC aus dem Knochenmarkgewebe (engl. <i>Bone Marrow Derived</i> SC)
BNF	Bionized Nanoferrite
Cas	CRISPR-associated gene
CCL	CC chemokine ligands
CD	Clusters of Differentiation Gene
cDNA	Komplementäre DNA (engl.: <i>complementary</i> DNA)
CDSe	Kalziumselenid
CLB	Cerenkov Lumineszenz Bildgebung
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CaSC	Cardiac SC
CSC	Krebsstammzelle (engl. <i>cancer stem cell</i> )
CT	Threshold Cycle
Cy3	Cyanine dye 3
Cy5	Cyanine dye 5
cytDNA	Cytosolische DNA
D2R	Dopamin Typ 2 Rezeptor
DKK	Dickkopf-Related Protein
DMT1	Divalenten Metall Transporter 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure (engl. <i>diethylenetriaminepentaacetic acid</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	für Säugetierzellen Codon-optimierte Version des GFP (engl. <i>enhanced</i> GFP)
ESC	Embryonale SC
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FePro	Ferumoxid
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FITC	Fluorescein isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FLB	Fluoreszenzbasierte Bildgebung
FSC	forward scatter
gDNA	Genomische DNA
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GSC	Glioblastom SC
GvHR	Graft vs. Host Reaktion
hBMP-2	human bone morphogenetic protein
HDR	Homology Directed Repair

---

hFTH	Schwere Kette des humanen ferritins (engl. <i>Human ferritin heavy chain</i> )
HLA-I	Humanes Leukozyten Antigen
HMPAO	Hexamethylpropylenaminnoxim
hMSC	Humane MSC
HS	Humanserum
HSC	Hämatopoetische SC
HSV1-TK	Tyrosinkinase des Herpes Simplex Virus Typ 1
IgG	Immunglobulin
IL	Interleukin
iPSC	induzierte pluripotente SC
ISCT	Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie (engl. <i>International Society for Cellular Therapy</i> )
Kat	Kationisch
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KM	Kontrastmittel
LSC	Leber SC
MagA	Mucoviscosität-assoziiertes Gen A
MNP	Magnetischer Nanopartikel
MPB	Magnetpartikelbildung
MPC	Muskelvorläuferzelle (engl. <i>Muscle Progenitor Cell</i> )
MRFP	Monomerisches Rot Fluoreszierendes Protein
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	Mesenchymale SC
NOTA-AC133	1,4,7-Triazacyclononan-N,N,N`-Triessigsäure`-AC133 Antikörper
NPC	neurale Vorläuferzelle (engl. <i>Neural Progenitor Cell</i> )
NSC	Neurale SC
PAMAM	Polyamidoamin
PBS	phosphate-buffered Saline
PBSC	SC aus dem periphären Blut
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
PEG-b-PAsp-PEI	PEG-block-poly(L-Aspartamsäure)-PEI
PEI	Polyethylenimin
PEI	Polyethylenimin
PET	Positronenemissionstomographie
QD	Quantum Dot
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
RGD	Arginylglycylaspartamsäure
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i> )
RT	Raumtemperatur
SC	Stammzelle (engl. <i>stem cell</i> )
SDF	Stromal cell-derived factor
SPECT	Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie (engl.: <i>single photon emission computed tomography</i> )
SPIO	Super-paramagnetisches Eisenoxid (engl. <i>Super Paramagnetic Iron Oxide</i> )

---

SPION	SPIO Nanopartikel
SSEA-4	Stage-specific embryonic Antigen
SSX	Synovial Sarcoma, X Breakpoint
SYT	Synovial Sarcoma Translocation
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UB	Ultraschallbildgebung
UC-MSC	SC aus dem Nabelschnurblut (engl. <i>Umbilical Cord Blood SC</i> )
VEGF	vascular endothelial growth factor
VNTRs	variable number tandem repeats
ZnS	Zinksulfid

## C MATERIALIEN

### C.1 MATERIALIEN

Material	Hersteller
Einmalhandschuhe Nitril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Elektroporationsküvette 4 mm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Kryoröhrchen 1.6 ml CryoPure	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Multikanal-Pipettenspitzen RAININ 200 µL	Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Nadeln	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
PCR Reaktionsgefäße, 0.2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (20, 200, und 1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (1.5 und 2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Serologische Einmalpipetten (5, 10, 25 und 50 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Spritzen (8, 20 und 50 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Spritzen Sterilfilter, Minisart NY25, 0.25 µL	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 96-Wells)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten (10 cm Durchmesser), Fibronectin	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Sigma Aldrich, Burlington, USA

### C.2 GERÄTE

Gerät	Hersteller
Analysewaage ED224S	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland
Autoklav Systec V-150	Systec, Wetzlar, Deutschland
Durchflusszytometer BD Accuri C6	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Durchflusszytometer EPICS XL-MCL	Beckmann Coulter, Brea, USA
Eismaschine AF 103	Scotsman Ice Systems, Fairfax, USA
Feinwaage MC1	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX50 mit Olympus CMOS SC30 Kamera	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland

Gel iX Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Elektrophoresekammer Classic	Thermo Scientific GmbH, Langenselbold, Deutschland
Elektroporator X-cell pulser	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Inkubator Heracell 240i	Thermo Scientific GmbH, Langenselbold, Deutschland
Inkubatormikroskop LumaScope 600	Etaluma Inc., Carlsbad, USA
Lichtmikroskop Olympus BH-2	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer MSH Basic	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Minizentrifuge MiniSpin	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multikanalpipette Pipet-Lite 12-channel	Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
pH-Meter HI 221	HANNA Instruments, Kehl am Rhein, Deutschland
Pipetten Transferpette	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettierhilfe accu-jet pro	Brand, Wertheim, Deutschland
Plattenlesegerät	Epoch, BioTek Instruments Inc., USA
Real-time PCR detection system IQ™5	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Reinstwasseranlage Arium 611	Sartorius Ag, Göttingen, Deutschland
Spektralphotometer, NanoDrop 1000	Thermo Scientific GmbH, Langenselbold, Deutschland
Sterilwerkbank Technoflow 2F150-II	Integra Biosciences AG, Zürich, Schweiz
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
UV/Vis-Spektralphotometer Nanodrop ND-1000	PeqLab-Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Vortex-Schüttler	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad WNB 45	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge 5702	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge für 1,5 und 2 ml Gefäße, Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Zentrifuge Micro Star 17R	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

### C.3 CHEMIKALIEN

Chemikalie	Hersteller
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Alizarin Rot	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Deutschland

$\alpha$ -Minimum Essential Medium ( $\alpha$ -MEM)	GIBCO Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Alcianblau 8GX	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
BODIPY 493/503	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Calcein	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Cetylpyridiniumchlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Collagenase	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
DAPI	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
DMEM	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
DMSO	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
DNA-Polymerase GoTaq	Promega, Mannheim, Deutschland
DNA-Polymerase EpiMark®	New England Biolabs, Ipswich, USA
dNTPs	Promega, Mannheim, Deutschland
EDTA	Applichem GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Formamide	Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
G418 Bisulfat Geneticin	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
GeneRuler 100 bp DNA-Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
GeneRuler 1 kp DNA-Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Gentamicin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Deutschland
Humanserum	c.c.pro GmbH, Oberdorla, Deutschland
Isopropanol	Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
IQ <sup>TM</sup> SYBR®Green Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Kristallviolett	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ladepuffer	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

NH <sub>4</sub> Cl	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Oil Red O	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Paraformaldehyde	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Reverse Transkriptase M-MLV	Promega, Mannheim, Deutschland
Reaktionspuffer Reverse Transkriptase M-MLV	Promega, Mannheim, Deutschland
Roti-Safe®	Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Silbernitrat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Stickstoff	Linde Gas, Pullach, Deutschland
SYBR Green II	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tris-HCl	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Trypanblau	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

#### C.4 ZELLKULTURMEDIEN

Bezeichnung in dieser Arbeit	Zusammensetzung
Vollmedium	α-MEM mit 5% HS und 0.5% Gentamicin
Kryomedium	α-MEM + 10 % Humanserum + 10 % DMSO
Selektionsmedium	Vollmedium mit 200 µg/ml G418 Bisulfat

#### C.5 LÖSUNGEN UND PUFFER

Bezeichnung in dieser Arbeit	Zusammensetzung
Agarosegel	TAE running buffer with 1.5 % (w/v) Agarose + 5 % (v/v) RotiSafe®
Alcianblau-Färbelösung	1% Alcianblau 8GX in 3% Essigsäure
Alizarin Rot Stammlösung	10% (w/v) in PBS
Alizarin Rot Arbeitslösung	2% (w/v) in PBS
Blocking-Puffer	2 % FKS in PBS
BODIPY-Stammlösung	10 mM in DMSO (10 mg BODIPY in 3.815 mL DMSO)
BODIPY-Arbeitslösung	5 µM BODIPY in 1 µL DMSO and 2 mL PBS 1 µL BODIPY Stammlösung in 2 mL PBS

Calcein-Stammlösung	200 µg/mL Calcein in ddH <sub>2</sub> O
Calcein-Arbeitslösung	5 µg/mL Calcein in ddH <sub>2</sub> O 2.5 mL Calcein Stammlösung + 97.5 mL ddH <sub>2</sub> O
Cetylpyridiniumchlorid	10% (w/v) Cetylpyridiniumchlorid in PBS
Fixierlösung	4 % Paraformaldehyd in PBS
HANKS I Puffer	0.1396 g/l Calciumchlorid, 0.09767 g/l Magnesiumsulfat, 0.4 g/l Kaliumchlorid, 0.06 g/l monobasisches Kaliumphosphat, 8 g/l Natriumchlorid, 0.04788 g/l dibasisches Natriumphosphat, 1 g/l D-Glukose; Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
HANKS II Puffer	HANKS I Puffer (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) mit 10% HS (c.c.pro GmbH, Oberdorla, Deutschland)
Oil Red O Arbeitslösung	2 g/l in 60%igem Isopropanol
PBS	137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 8.1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O; 1.8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7.4
Primer Lösungen	1 pmol/µL Vorwärtsprimer + 1pmol/µL Rückwärtsprimer in ddH <sub>2</sub> O
Propidiumiodid Lösung	50 µg/mL in 0.9 % NaCl
TAE Laufpuffer	40 mM Tris Base; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA; in ddH <sub>2</sub> O; pH 8
von-Kossa-AgNO <sub>3</sub> -Lösung	5 % AgNO <sub>3</sub> in ddH <sub>2</sub> O
von-Kossa-Formaldehydlösung	5 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 0.2 % Formaldehyd in ddH <sub>2</sub> O
Zellysispuffer zur DNA Extraktion	10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 M EDTA; 0,5 % SDS (w/v)
Zellysispuffer zur RNA Extraktion	990µL RLT-Puffer (aus dem Qiagen RNeasy Mini Kit) + 10µL β-Mercaptoethanol

## C.6 KITS

Kit	Hersteller
β-Galactosidase-Färbe-Kit	Cell Signaling Technology, Inc., USA
DNA Isolation QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Qiagen QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Fugene HD	Promega, Mannheim, Deutschland
PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PromoFectin	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
PromoFectin-HUVEC	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
RNA Isolation RNeasy Mini Kit Plus	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

## C.7 DIFFERENZIERUNGSMEDIEN

Differenzierung	Medium	Hersteller
Osteogen	StemMACS OsteoDiff Media	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Chondrogen	StemMACS ChondroDiff Media	
Adipogen	StemMACS AdipoDiff Media	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Kontrolle	DMEM + 5 % HS	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

## C.8 ANTIKÖRPER

Antikörper	Markierung	Hersteller
anti CD73	PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti CD44	PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti CD45	PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus IgG1, $\kappa$	PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti CD90	FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti CD31	FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti HLA I	FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti CD34	FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus IgG1, $\kappa$	FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti CD105	R-PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus IgG1	R-PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti HLA I	FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus IgG2a	FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

## C.9 PRIMER

## C.9.1 CDNA-SYNTHESE PRIMER

Primer	Hersteller
Oligo-dT Primer	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland

## C.9.2 QRT-PCR PRIMER

Ziel-DNA	NCBI accession number	Vorwärtsprimer-Sequenz	Rückwärtsprimer-Sequenz	Hersteller	Annealing-Temperatur [°C]	Produktlänge [bp]
<i>egfp</i>	U55762	5'-CGA CCA CTA CCA GCA GAA C-3'	5'-GGC CGC CCG TTC GTA TAT TTC TTC G-3'	Eurofins Scientific SE, Luxemburg	60	127
Nonsens-DNA	-	5'-CCG CTT CAT GCT AAG GAT CTG GCT GC-3'	5'-GGC CGC CCG TTC GTA TAT TTC TTC G-3'	Eurofins Scientific SE, Luxemburg	64	80
<i>gap-dh</i>	NM_002046.6	5'-AGG GCT GCT TTT AAC TCT GGT-3'	5'-CCC CAC TTG ATT TTG GAG GGA- 3'	Eurofins Scientific SE, Luxemburg	62	206

## C.10 NONSENS-DNA

**Vorwärts:** 5'-C\*C\*G\* C\*T\*T CAT GCT AAG GAT CTG GCT GCA TGC TAT GTT GAT ACG CCT AC /iCy3/ ACT GCT CGA AGA AAA TAT ACG AAG CGG G\*C\*G\* G\*C\*C-3';

**Rückwärts:** 5'-G\*G\*C\* C\*G\*C CCG CTT CGT ATA TTT TCT TCG AGC AGT GTA GGC GTA TCA AC /iCy3/ ATA GCA TGC AGC CAG ATC CTT AGC ATG A\*A\*G\* C\*G\*G-3';

\*=Phosphorothioatbindung: S anstelle von O.

C.11 VEKTOREN

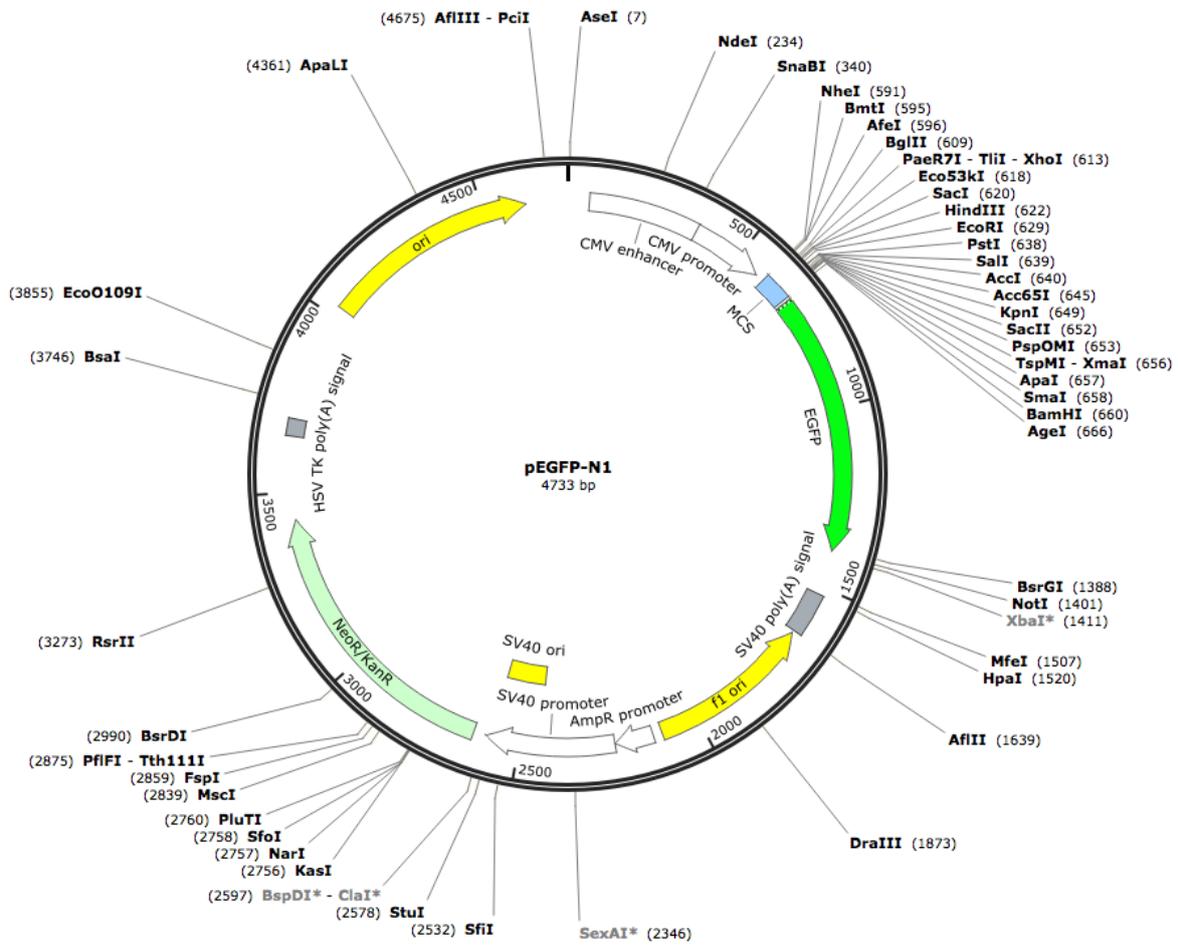
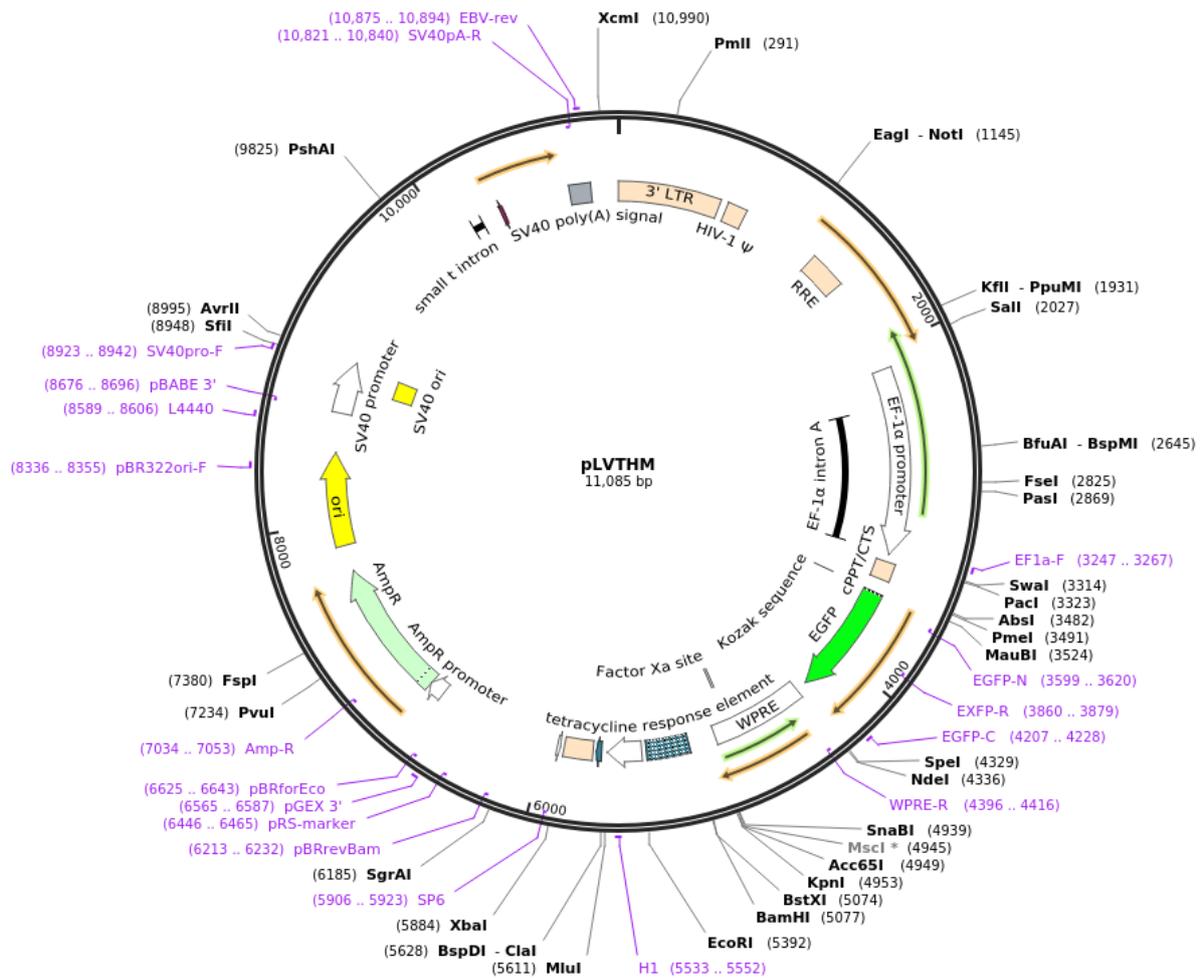


Abbildung C.1: Vektorkarte von pEGFP-N1. EGFP-Produktion unter der Kontrolle des CMV Promotors; ClonTech Laboratories, Inc. USA; Cat. #6085-1 [349].



**Abbildung C.2: Vektorkarte von pLVTHM.** Selbstinaktivierender Vektor; EGFP Produktion unter der Kontrolle des EF1 $\alpha$  Promotors. Erhalten von der Figueiredo-Gruppe der Medizinischen Hochschule Hannover [349].

## D METHODEN

### D.1 ZELLISOLATION

hMSCs wurden aus Fettgewebe nach Liposuktion isoliert. Hierzu wurde das Fettgewebe mithilfe einer Schere in etwa 0.5 cm<sup>3</sup> große Stücke geschnitten, wobei darauf geachtet wurde keine Blutgefäße zu durchschneiden. Jeweils etwa 20 ml (ca. 17-20 g) Fettgewebe wurden in ein 50 ml Röhrchen überführt und mittels steriler Schere in einen nahezu homogenen Brei zerschnitten und 10 ml Collagenase-Lösung (2 mg/ml Collagenase in HANKS I Puffer, beides Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) wurden pro Röhrchen zugegeben und gevortext. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung bis zu einer vollständigen Homogenität gevortext. Die Hälfte des Volumens (ca. 15 ml) wurde in ein neues 50 ml Röhrchen überführt. Beide Röhrchen wurden bis zu einem Gesamtvolumen von 40 ml mit HANKS I Puffer aufgefüllt und für 5 Minuten bei 200 × g zentrifugiert. Der Fett-Überstand wurde mittels sterilem Löffel in ein neues 50 ml Röhrchen überführt, die mittlere Schicht wurde mittels Vakuumpumpe verworfen. Das verbleibende Pellet wurde mittels Schnipsen resuspendiert und zu dem Fett-Überstand gegeben. Diese Lösung wurde mit mit HANKS II Puffer auf 50 ml aufgefüllt und für 10 Minuten bei 400 × g zentrifugiert. Fett und Überstand wurden verworfen und das Pellet in 40 ml HANKS II Puffer resuspendiert und die Lösung erneut für 10 Minuten bei 400 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mittels Schnipsen resuspendiert und mit Vollmedium auf 30 ml aufgefüllt. Jeweils 15 ml der Zellsuspension wurden in T75-Zellkulturflaschen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) gefüllt und für 24-28 Stunden inkubiert, bis adhärenzte Zellen im Mikroskop zu erkennen waren. Anschließend wurden verbliebene Gewebestücke entfernt, mehrfach mit PBS gewaschen und das Medium gewechselt. Anschließend wurden die isolierten Zellen bis zur Konfluenz inkubiert und kryokonserviert.

### D.2 ZELLKULTUR

Nach Isolation und vor Beginn der weiteren Experimente dieser Arbeit wurden die isolierten AD-hMSCs in Vollmedium expandiert und kryokonserviert in Kryomedium. AD-hMSCs wurden hierzu in Kryokonservierungsröhrchen in Kryo-Behältern in flüssigem Stickstoff gelagert. Wenn nicht anders erwähnt, wurden die AD-hMSCs unter folgenden Standardbedingungen kultiviert: im Inkubator in humider Atmosphäre bei 37°C, 21% O<sub>2</sub>- und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt.

### D.3 ZELLREVITALISIERUNG

Nach Entnahme aus dem Kryo-Behälter wurden die Kryokonservierungsröhrchen unmittelbar im 37° C warmen Wasserbad unter Rühren aufgetaut (etwa 2 Minuten). Anschließend wurde die Zellsuspension unter der Sterilwerkbank in eine 175 cm<sup>2</sup> Kulturflasche mit 20 ml 37°C-warmem

Vollmedium gegeben und im Inkubator bei 37°C kultiviert. Nach Adhärenzen der Zellen über Nacht wurde das Medium gewechselt.

#### D.4 ZELLZAHLEN

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen nach der jeweiligen Kultivierung mit PBS gewaschen und mit Accutase abgelöst. Die Zellen wurden mittels 5-minütiger Zentrifugation bei 300xg aus der Suspension sedimentiert und lebende Zellen unter Trypanblau-Ausschluss mittels Neubaur-Kammer am Mikroskop Olympus BH-2 (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland) gezählt (N=4).

#### D.5 POPULATION DOUBLING LEVEL

Für die Bestimmung des sog. Population Doubling Level erfolgten drei unabhängige Langzeitkultivierungen der isolierten Zellen über 20 Passagen. Alle 3-4 Tage bei einer Konfluenz von etwa 60-80% wurde passagiert. Nach jeder Passage wurden die Zellen gezählt und die Anzahl der Populationsverdopplungen pro Passage mithilfe der folgenden Gleichung (D-1) berechnet.

$$N_D = \frac{\ln\left(\frac{x}{x_0}\right)}{\ln 2} \quad \text{(D-1)}$$

$N_D$  = Anzahl der Populationsverdopplungen pro jeweiliger Passage

$x_0$  = Anzahl der inokulierten lebenden Zellen

$x$  = Anzahl der geernteten lebenden Zellen nach der jeweiligen Passage

Die kumulative Verdopplung  $CND_i$  der Zellpopulation wurde mithilfe der folgenden Gleichung (D-2) berechnet.

$$CND_i = \sum_{i=1}^n \frac{\ln\left(\frac{x_i}{x_{0,i}}\right)}{\ln 2} \quad \text{(D-2)}$$

$N_D$  = Anzahl der Populationsverdopplungen pro jeweiliger Passage

$x_{0,i}$  = Anzahl inokulierter lebender Zellen nach Passage  $i - 1$

$x_i$  = Anzahl der geernteten lebenden Zellen nach Passage  $i$

Die Verdopplungszeit innerhalb des exponentiellen Wachstums kann anhand der durchschnittlichen Wachstumskurve bestimmt werden:

$$T_D = \frac{\log 2}{m/3.5} \quad (\text{D-3})$$

$T_D$  = Verdopplungszeit

$m$  = Steigung der durchschnittlichen Wachstumskurve  $\log(\text{Zellzahl}) = mx + b$

## D.6 FIXIERUNG VON ZELLEN

Zur Fixierung von Zellen wurden die zu untersuchenden Zellen nach zweimal mit PBS gewaschen und für 40 Minuten bei 4°C in Fixierlösung inkubiert.

## D.7 IMMUNOPHÄNOTYP-ANALYSE

Zellen wurden mittels 8-minütiger Accutase Behandlung geerntet, zweimal mit kaltem Blocking-Puffer gewaschen und mit einer Konzentration von  $10^6$  Zellen/mL in kaltem Blocking-Puffer resuspendiert. Zellfärbung erfolgte durch Zugabe jeweils einer 20  $\mu\text{L}$  Fluoreszenz-Antikörper-Lösung (alle BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) zu 100  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension in der Menge, die vom Hersteller empfohlen wurde. Negativkontrollen erfolgten durch Zugabe passender Fluoreszenz-Isotypkontrollen. Die genauen Zusammensetzungen sind in der nachfolgenden

**Tabelle D.1** dargestellt.

**Tabelle D.1: Verwendete Antikörper zur Immunophänotypanalyse der isolierten und transfizierten Zellen**

	Antikörper	Marker	V Blocking-Puffer [ $\mu\text{L}$ ]	V Antikörper [ $\mu\text{L}$ ]	Antikörper/Test [ $\mu\text{g}$ ]
Test-Antikörper	Anti-CD73	PE	15.2	4.8	0.03
	Anti-CD44	PE	17.6	2.4	0.03
	Anti-CD45	PE	15.2	4.8	0.03
Isotypkontrolle	Maus IgG1, $\kappa$	PE	19.4	0.6	0.03
Test-Antikörper	Anti-CD90	FITC	19.8	0.2	0.1
	Anti-CD31	FITC	18.7	1.3	0.1
	Anti-HLA I	FITC	19	1	0.8
	Anti-CD34	FITC	4	16	0.1
Isotypkontrolle	Maus IgG1, $\kappa$	FITC	19.8	0.2	0.1
Test Antikörper	Anti-CD105	R-PE	19.5	0.5	0.05
Isotypkontrolle	Maus IgG1	R-PE	19.5	0.5	0.05
Test Antikörper	Anti-HLA I	FITC	19	1	0.8
Isotypkontrolle	Maus IgG2a	FITC	19	1	0.1

Nach 20-minütiger Inkubation bei RT im Dunkeln, wurden 400  $\mu\text{L}$  kalter Blocking-Puffer und 1  $\mu\text{L}$  Propidiumiodid (PI) zugefügt. Diese Zellsuspension wurde am EPICS XL-MCL Durchflusszytometer analysiert. Lebende Zellen wurde mittels FS vs SS Dotplots und unter

Ausschluss eines PI-Signals gegatet und mindestens 10.000 gegatete einzelne Signale wurden zur Analyse verwendet.

## D.8 ZELLDIFFERENZIERUNG

Zur Bewertung der Differenzierungskapazität wurden die isolierten bzw. transfizierte Zellen in 6-Well-Platten mit einer anfänglichen Zelldichte von 3000 Zellen/cm<sup>2</sup> in Vollmedium ausplattiert. Nach Kultivierung bis zur vollständigen Konfluenz nach etwa 3-4 Tagen unter Standardbedingungen, wurde das Medium zu adipogenem, osteogenem oder chondrogenem Differenzierungsmedium gewechselt. Gleichzeitig wurde als Negativkontrolle in einer Probe weiterhin in Vollmedium kultiviert. In allen Proben wurde insgesamt 21 Tage alle 3-4 Tage das Medium gewechselt. Anschließend wurden die Zellen in Fixierlösung für 40 Minuten bei 4°C inkubiert und eine erfolgreiche Differenzierung mithilfe zellspezifischer Färbelösungen visualisiert. Die Zellkerne wurden in allen Proben mittels DAPI-Färbung visualisiert.

### D.8.1 FÄRBEVERFAHREN

#### D.8.1.1 Adipogene Differenzierung: Oil Red O Färbung

Intrazelluläre Lipidtröpfchen wurden mittels Oil Red O (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) angefärbt. Die fixierten Zellen wurden zweimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml 60%igem Isopropanol für 5 min bei RT inkubiert. Nachdem das Isopropanol aspiriert wurde, wurden die Zellen in 2 ml der Oil Red O Arbeitslösung für 5 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden viermal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und am Mikroskop untersucht.

#### D.8.1.2 Adipogene Differenzierung: BODIPY Färbung

Die intrazelluläre Akkumulation von Lipidtröpfchen wurde auch mit BODIPY 493/503 (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland) visualisiert. Die fixierten Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und 600 µl der BODIPY-Arbeitslösung wurden pro Well auf die Zellen gegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei RT im Dunklen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Untersuchung am Fluoreszenz-Mikroskop Olympus IX50 mit Olympus CMOS SC30 Kamera (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland) mit einer Exzitationswellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm.

#### D.8.1.3 Osteogene Differenzierung: Alizarin Rot Färbung

Zur Bewertung der osteogenen Differenzierung wurde eine Alizarin Rot Färbung durchgeführt. Fixierte Zellen wurden zweimal mit kaltem ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden 500 µl der Alizarin Rot Arbeitslösung (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) pro Well auf die

Zellen gegeben. Nach 10 Minuten Inkubation bei RT im Dunklen wurde dreimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und einmal für 15 Minuten in PBS gewaschen und erneut PBS zugegeben. Anschließend erfolgte die Untersuchung am Mikroskop Olympus IX50 mit Olympus CMOS SC30 Kamera (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland).

#### **D.8.1.4 Osteogene Differenzierung: Calcein Färbung**

Ebenfalls zur Bewertung der osteogenen Differenzierung wurden extrazelluläre Kalziumakkumulationen mittels fluoreszierendem Calcein (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) angefärbt. Hierzu wurden die fixierten Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit 1 ml Calcein-Arbeitslösung bedeckt. Nach Übernacht-Inkubation bei 4°C wurden die Zellen fünfmal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend erfolgte die Untersuchung am Fluoreszenz-Mikroskop Olympus IX50 mit Olympus CMOS SC30 Kamera (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland) mit einer Exzitationswellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm.

#### **D.8.1.5 Chondrogene Differenzierung: Alcianblau Färbung**

Eine erfolgreiche chondrogene Differenzierung und damit eine Akkumulation von Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix wurde mittels Alcianblau (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) visualisiert. Die fixierten Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und 3 Minuten bei RT in 3%iger Essigsäure inkubiert. Anschließend wurde die Essigsäurelösung entfernt und die Zellen wurden 30 Minuten bei RT in Alcianblau-Färbelösung inkubiert. Danach wurden die Zellen fünfmal mit 3%iger Essigsäure gewaschen und es erfolgte eine Bewertung der Differenzierungskapazität am Mikroskop Olympus IX50 mit Olympus CMOS SC30 Kamera (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland).

#### *D.8.2 QUANTIFIZIERUNG*

Der Grad der osteogenen Differenzierung wurde mittels Extraktion von Alizarin Rot quantifiziert. Hierzu wurde auf die zuvor gefärbten Zellen im 6-Well 1 ml Cetylpyridiniumchlorid (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Germany; 10% (w/v) in PBS) zugegeben. Nach 20 minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Menge des extrahierten Farbstoffes mittels Absorption bei 550 nm im Plattenlesegerät bestimmt (Epoch, BioTek Instruments Inc., USA). Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine Kalibrationskurve von Alizarin Rot im passenden Messbereich (0.13-4.28 mol/l) verwendet (siehe E.6).

#### **D.9 COLONY FORMING UNITS**

Die zu untersuchenden Zellen wurden in 100 mm Zellkulturschalen mit einer Konzentration von 50 Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert und für 8 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit 5 ml der Kristallviolett-Arbeitslösung (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) für 10 min bei RT inkubiert. Die entstandenen und gefärbten Kolonien wurden am Mikroskop Olympus IX50 mit Olympus CMOS SC30 Kamera (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland) gezählt.

#### D.10 SENESZENZ

Zur Analyse der zellulären Seneszenz wurde die Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galactosidase Färbung durchgeführt mithilfe eines Kits (Cell Signaling Technology, Inc., USA) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurden zuvor die zu untersuchenden Zellen in 6-Well-Plates mit einer Zelldichte von 3000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert und für 2 Tage in Vollmedium unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und fixiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS wurde die  $\beta$ -Galactosidase-Färbelösung zugefügt und bei 37°C über Nacht in einem trockenen Inkubator inkubiert. Die Analyse der Seneszenz erfolgte am Mikroskop Olympus IX50 mit Olympus CMOS SC30 Kamera (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland). Als Negativkontrolle wurden unbehandelte AD-hMSCs der zweiten Passage verwendet, als Positivkontrolle wurde Seneszenz in AD-hMSCs der zweiten Passage durch 21-tägige Kultivierung in hoch-konzentriertem Glukosemedium (4.5 g/l) induziert [350].

#### D.11 RNA ISOLATION UND CDNA SYNTHESE

Zur Zellyse wurden die Zellen im 6-Well mit PBS gewaschen und 250  $\mu$ l RNA-Lysispuffer pro Well zugegeben und mittels Zellschaber gelöst und in 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Gesamt-RNA der zu untersuchenden Zellen wurde mittels RNeasy Mini Plus Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Anweisungen des Herstellers aus 10<sup>5</sup> Zellen isoliert. Die RNA-Konzentrationen wurden mittels Nanodrop 1000 (PeqLab-Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) bestimmt. Zur cDNA-Synthese wurden 2  $\mu$ g der isolierten RNA und 3  $\mu$ l oligo-dT Primer (0.1 mM, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) mit ddH<sub>2</sub>O auf 27  $\mu$ l aufgefüllt. Nach Denaturierung bei 65°C für 5 Minuten, erfolgte die Transkription über 1 Stunde bei 37°C mithilfe von 400 U M-MLV Reverse Transkriptase (2  $\mu$ l), dem zugehörigen 5X Reaktionspuffer (8  $\mu$ l), 4  $\mu$ l dNTPs (2 mM, alles von Promega, Mannheim, Deutschland).

#### D.12 DNA ISOLATION

Zur Zellyse wurden die Zellen im 6-Well mit PBS gewaschen und 250  $\mu$ l DNA-Lysispuffer pro Well zugegeben und mittels Zellschaber gelöst und in 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Gesamt-DNA

wurde mittels Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit, die cytosolische DNA (cytDNA) mittels Qiagen QIAprep Spin Miniprep Kit nach Anweisungen des Herstellers (Qiagen, Hilden, Deutschland) aus  $10^5$  Zellen isoliert.

### D.13 qRT-PCR

Die quantitative RT-PCR wurde mit dem IQ<sup>TM</sup>5 real-time PCR Detektionssystem durchgeführt. Die qRT-PCR-Primer wurden mithilfe von Clone Manager designt. Je Ansatz wurden 12.5  $\mu$ l IQ<sup>TM</sup>SYBR<sup>®</sup>Green Supermix (beides Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland), 1  $\mu$ l Primermix (0.25 mM) und 10 ng DNA mit ddH<sub>2</sub>O auf insgesamt 25  $\mu$ l aufgefüllt.

Zur Bestimmung der relativen *egfp* Expressionslevel wurde die delta-delta- $C_T$ -Methode und *gap-dh* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) als Housekeeping-Gen [351].

$$\Delta C_T = C_{T(\text{Zielgen})} - C_{T(\text{Housekeeping-Gen})}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{Experiment})} - \Delta C_{T(\text{Kontrolle})} \quad \text{(D-4)}$$

$$\text{Expressionsrate} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$C_T$  = Threshold Cycle einer einzelner PCR – Reaktion

Die absoluten Ziel-DNA Konzentrationen in der Gesamt-DNA und im Zytoplasma der Zielzellen wurden mithilfe des Threshold Cycles ( $C_T$ ) und einer Kalibrationskurve im Bereich von 0.001 bis 100 pg (*egfp*) bzw. 0.001 bis 1 pg (Nonsens-DNA) bestimmt (siehe **Kapitel E.5**) [352].

## D.14 TRANSFEKTION DER AD-HMSCS

### D.14.1 LIPOFEKTION

#### D.14.1.1 Lipofektion mittels FuGene HD

Kryokonservierte AD-hMSCs der Passage 2 wurden revitalisiert und mit einer Zellzahl von  $2.5 \times 10^4$  Zellen je Well auf 24-Well-Platten in 500  $\mu$ l Vollmedium kultiviert bis eine Konfluenz von 70-90% erreicht wurde. Anschließend wurde das Medium gewechselt zu 1 ml  $\alpha$ -MEM und verschiedene Arbeitslösungen wurden in verschiedenen Mengen nach dem folgenden Schema zu den Wells zugegeben. Der Wertebereich ergab sich aus Empfehlungen des Herstellers für Stammzellen.

**Tabelle D.2: Well-Aufteilung der Lipofektion mittels FuGene HD (Promega, Mannheim, Deutschland)**

Gesamt DNA-Menge \ Arbeitslösung (FuGene:DNA)	4:1	3.5:1	2.5:1	1.5:1
100 ng	A1	A2	A3	A4
150 ng	B1	B2	B3	B4
200 ng	C1	C2	C3	C4
250 ng	D1	D2	D3	D4
300 ng	E1	E2	E3	E4
400 ng	F1	F2	F3	F4

Nach 72 Stunden Inkubation wurde die Transfektionseffizienz überprüft.

#### D.14.1.2 Lipofektion mittels PromoFectin

Kryokonservierte AD-hMSCs der Passage 2 wurden revitalisiert und mit einer Zellzahl von  $2.5 \times 10^4$  Zellen je Well auf 24-Well-Platten in 500  $\mu$ l Vollmedium kultiviert bis eine Konfluenz von 50-60% erreicht wurde. Anschließend wurde das Medium gewechselt zu 1 ml  $\alpha$ -MEM und verschiedene Arbeitslösungen wurden in verschiedenen Mengen nach dem folgenden Schema zu den Wells zugegeben. Der Wertebereich ergab sich aus Empfehlungen des Herstellers für Stammzellen.

**Tabelle D.3: Well-Aufteilung der Lipofektion mittels PromoFectin (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland)**

Gesamt DNA-Menge \ Arbeitslösung (PromoFectin:DNA)	4:1	3.5:1	2.5:1	1.5:1
0.5 $\mu$ g	A1	A2	A3	A4
0.75 $\mu$ g	B1	B2	B3	B4
1 $\mu$ g	C1	C2	C3	C4
1.25 $\mu$ g	D1	D2	D3	D4
1.5 $\mu$ g	E1	E2	E3	E4

Nach 72 Stunden Inkubation wurde die Transfektionseffizienz überprüft.

#### D.14.1.3 Lipofektion mittels PromoFectin-HUVEC

Kryokonservierte AD-hMSCs der Passage 2 wurden revitalisiert und mit einer Zellzahl von  $2.5 \times 10^4$  Zellen je Well auf 24-Well-Platten in 500  $\mu$ l Vollmedium kultiviert bis eine Konfluenz von 50-60% erreicht wurde. Anschließend wurde das Medium gewechselt zu 1 ml  $\alpha$ -MEM und verschiedene Arbeitslösungen wurden in verschiedenen Mengen nach dem folgenden Schema zu den Wells zugegeben. Der Wertebereich ergab sich aus Empfehlungen des Herstellers für Stammzellen.

**Tabelle D.4: Well-Aufteilung der Lipofektion mittels PromoFectin-HUVEC (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland)**

Gesamt DNA-Menge	Arbeitslösung (PromoFectin-HUVEC:DNA)			
	4:1	3.5:1	2.5:1	1.5:1
1.5 µg	A1	A2	A3	A4
1.75 µg	B1	B2	B3	B4
2 µg	C1	C2	C3	C4
2.25 µg	D1	D2	D3	D4
2.5 µg	E1	E2	E3	E4

Nach 72 Stunden Inkubation wurde die Transfektionseffizienz überprüft.

#### *D.14.2 ELEKTROPORATION DER AD-HMSCs*

Die Elektroporation der AD-hMSCs erfolgte nach Ablösung mittels Accutase (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Deutschland) und der Bestimmung der Zellzahl mittels Neubaur-Kammer.  $10^6$  Zellen wurden nach erneuter Pelletierung mittels Zentrifugation für 5 Minuten bei 300 g in 400 µl hypoosmolaren Elektroporationspuffer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gelöst. Nach der Bestimmung der optimalen Elektroporationsparameter wurden immer etwa 6.8 nmol DNA verwendet. Die DNA und die Zelllösung wurden in eine 4 mm Elektroporationsküvette und mittels X-cell pulser (beides Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) und einem Rechteckimpuls elektroporiert. Außer zu Parameteroptimierung wurde mit einem von 600 V über 100 µs gearbeitet.

Nach erfolgtem Elektroporationspuls wurden die Zellen bei nacheinander für je 5 Minuten bei RT und bei 4°C inkubiert und anschließend in 100 mm Kulturschalen (Cell+, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) in 10 ml Vollmedium transferiert. Nach 24 Stunden Expansion in Vollmedium wurde das Medium gewechselt, um Zellreste aus dem Medium zu entfernen. Nach weiteren 2 Tagen unter Standardkultivierungsbedingungen, sowie nach weiteren 14 Tagen in Selektionsmedium (nur für Elektroporation mit pEGFP-N1) und/oder weiteren 14 Tagen unter Standardkultivierungsbedingungen wurden die Zellen analysiert.

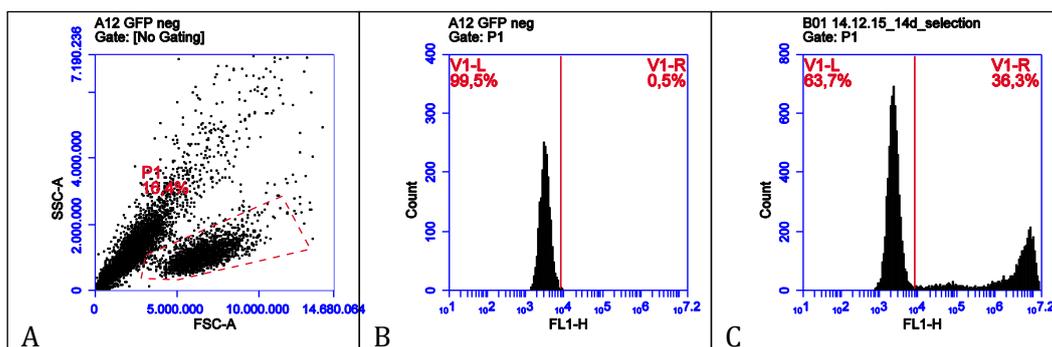
#### *D.14.3 LENTIVIRALE TRANSDUKTION DER AD-HMSCs*

Für die lentivirale Transduktion wurde ein lentivirales Vektorsystem zweiter Generation verwendet (pLVTHm, 11 kb; *egfp* Expression unter Kontrolle des EF1α Promotors und wurde verwendet wie von Gras et al. (2013) beschrieben [353]. Hierzu wurden  $5 \times 10^6$  humane embryonale Nierenzellen (engl. *human embryonic kidney cells*, HEK) 293T mit 10 µg des Plasmids transfiziert. Nach 24 und 48 Stunden wurde der virale Zellüberstand gesammelt, gefiltert und mittels Ultrazentrifugation bei  $30.000 \times g$  und 4°C über 4 Stunden aufkonzentriert (Optima L-100

XP; Beckman Coulter, Krefeld, Germany). Anschließend erfolgten eine Titration mittels seriell verdünnter Transduktion und die Analyse mittels EGFP-Durchflusszytometrie. Dabei wurden  $7.8 \times 10^7$  aktive Viruspartikel pro ml detektiert. Die anschließende Transduktion der AD-hMSCs erfolgte in Vollmedium mit 50  $\mu\text{g/ml}$  Protaminsulfat in einer T175-Zellkulturflasche (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) mit einer Multiplizität der Infektion von 5. Nach 3 Tagen unter Standardkultivierungsbedingungen, sowie nach weiteren 14 Tagen unter Standardkultivierungsbedingungen wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Da die weiteren Analysen unter S1-Bedingungen durchgeführt wurden, mussten die transduzierten Zellen zunächst 14 Tage unter Quarantäne kultiviert werden, um die Überführung in ein S1-Labor zu erlauben. Daher erfolgte keine weitere Analyse 3 Tage nach erfolgter Transduktion.

#### D.15 DURCHFLUSSZYTOMETERANALYSE

Im Folgenden ist beispielhaft eine durchflusszytometrische Analyse dargestellt. Die vom Durchflusszytometer aufgenommenen Ereignisse wurden in *Dot Plots* und Histogrammen dargestellt, wie beispielhaft in der nachfolgenden **Abbildung D.1** gezeigt.



**Abbildung D.1** Beispielhafte Analyse der generierten Durchflusszytometerdaten. (A) Dotplot der Negativkontrolle, der rote Kasten zeigt viable Zellen; (B) Gegatetes FL-1-Histogramme der Negativkontrolle; und (C) Gegatetes FL-1-Histogramme einer beispielhaften Probe. Die roten vertikalen Linien zeigen das 0.5% Konfidenzintervall des gegateten FL-1-Histogramms aus der Negativkontrolle. Alle Zellen rechts dieser Linie in untersuchten Proben werden aufgrund der Signalintensität als licht-emittierend und somit als Marker-positive Zellen angenommen.

Anhand des *Dot Plots Side Scatter (SSC) vs. Forward Scatter (FSC)* wurde ein sogenanntes *Gate* angelegt, das die Signale von einzelnen intakten AD-hMSCs von Agglomeraten und Bruchstücken selektierte (roter gestrichelter Kasten in **Abbildung D.1A**). Die Signale dieser Ereignisse wurden dann in den Intensitäts-Histogrammen der jeweiligen Fluoreszenzdetektoren des Durchflusszytometers dargestellt und analysiert. Hierzu wurden immer die Signale des Versuchs mit dem der zugehörigen Negativkontrolle verglichen. Als Grenze für Marker-positive AD-hMSCs wurde ein  $\alpha$ -Fehler von 0.5% angenommen und diente zur Bestimmung der Untergrenze für die Fluoreszenz-Intensität Marker-positiver AD-hMSCs (rote senkrechte Linie in **Abbildung D.1B**

**und C).** Daraus ergab sich der prozentuale Anteil Marker-positiver AD-hMSCs. Die hier beschriebenen Schritte wurden für alle Durchflusszytometeranalysen dieser Arbeit durchgeführt.

## D.16 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Untersuchungen in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Alle Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Für die qRT-PCR Analyse wurden die Isolate dreier unabhängiger Kultivierungen vereinigt, um eine erfolgreiche Nukleotidisolierung zu garantieren; diese kombinierten Proben wurden dreifach vermessen. F-Tests wurden durchgeführt, um das Level der Signifikanz zu bestimmen, mit dem anschließend zweiseitige T-Tests durchgeführt wurden.

## E ERGÄNZENDES MATERIAL

### E.1 FUNKTIONEN DER OBERFLÄCHENMARKER

CD3:	beteiligt an T-Zell-Aktivierung, spezifisch für T-Zellen und T-Vorläuferzellen;
CD9:	Tetraspanin-29, beteiligt an der Aktivierung von Thrombozyten, Zelladhäsion und Metastasierung;
CD10:	Nepriylsin, membrangebundene Peptidase, Fibroblasten-spezifischer Oberflächenmarker;
CD13:	Alanin-Aminopeptidase, charakteristisch für myeloische Zellen, Perizyten und aktivierten Endothelzellen;
CD14:	hämatopoetischer Zellmarker;
CD29:	Integrin $\beta$ -1, beteiligt an der Zelladhäsion, Fibroblasten-spezifischer Oberflächenmarker;
CD31:	PECAM-1, Endothelzellmarker;
CD34:	beteiligt an Zell-Zell-Adhäsion, hämatopoetischer Zellmarker;
CD44:	Hyaluronsäurerezeptor, beteiligt an Zellkontakten und Kontakten zur extrazellulären Matrix, Fibroblasten-spezifischer Oberflächenmarker;
CD45:	Tyrosin-Proteinphosphatase, beteiligt an T-Zell-Aktivierung, hämatopoetischer Zellmarke
CD54:	Integrin, beteiligt an Zelladhäsion, charakteristisch für Leukozyten und Endothelzellen
CD71:	Transferrin Rezeptor, charakteristisch für erythroide Vorläuferzellen
CD73:	5'-Nukleotidase, Fibroblasten-spezifischer Oberflächenmarker
CD79:	beteiligt an T-Zell-Aktivierung

---

CD90:	Thymuszell-Antigen, beteiligt an Zelladhäsion, Zellmigration und Apoptose, Fibroblasten-spezifischer Oberflächenmarker
CD105:	Endoglin, regulatorische Komponente des TGF- $\beta$ -Rezeptors, Fibroblasten-spezifischer Oberflächenmarker
CD133:	Prominin-1, hämatopoetischer Stammzellmarker sowie von Stammzellen des Zentralen Nervensystems
CD146:	beteiligt an Zelladhäsion, charakteristisch für Neuralleistenzellen, Marker für tumorerzeugende Zellen
CD166:	Zelladhäsionsmolekül, Fbroblasten-spezifischer Oberflächenmarker
CD271:	Wachstumsfaktorrezeptor, beteiligt Proliferation und Zelladhäsion
HLA-I:	Humanes Leukozyten Antigen Klasse I, Expression in nahezu allen kernhaltigen Zellen sowie Thrombozyten
HLA-ABC:	Humanes Leukozyten Antigene der Klasse I, Expression in nahezu allen kernhaltigen Zellen sowie Thrombozyten
HLA-DR:	Humanes Leukozyten Antigen der Klasse II, spezifisch für Immunzellen
NANOG:	Homöoboxprotein, Transkriptionsfaktor, wichtig für die Pluripotenz von Stammzellen, Embryonalzellmarker
NG-2:	humanes Melanom-Proteoglykan, hauptsächlich in Nerven- und Gliazellen sowie in Zellen des Mesenchyms
Notch-1:	Transmembranrezeptor, beteiligt an Zell-Zell-Interaktionen
Nucleostemin:	Beteiligt am Zellzyklus, hemmt Differenzierungskapazität
Oct-4:	Transkriptionsfaktor, Marker für undifferenzierte Zellen
SSEA-4:	Stage-specific embryonic Antigen 4, embryonaler Stammzellmarker, beteiligt an Differenzierung
STRO-1:	MSC Marker, Expression in Endothelzellen; Vimentin: Filamentprotein, Hauptbestandteil des Zytoskelett-Gerüsts von Zellen des Mesenchyms.

**Quellen: [346, 354-367].**

## E.2 hMSC-ZELLAUSBEUTE AUS VERSCHIEDENEN GEWEBEARTEN VS. BENÖTIGTE ZELLENZAHLEN ZUR TRANSPLANTATION IN BISHERIGEN STUDIEN

In der folgenden **Tabelle E.1** sind die Zellausbeuten von hMSC-Isolationen aus verschiedenen Gewebetypen zu erkennen.

**Tabelle E.1: Zellausbeute an hMSCs nach Isolation aus verschiedenen Gewebetypen in bisherigen Studien.** Wenn möglich wurden Mittelwert und Standardabweichung aus der Originalliteratur angegeben. Werte wurden, wenn nicht bereits angegeben, in pro mL umgerechnet. Hierzu wurden folgende Dichten angenommen: Fettgewebe: 0.91 g/mL [368]; Knochenmarkgewebe: 1.06 g/mL [369]; Plazenta: 1.05 g/mL [370]; Bei fehlender Angabe zur Gesamtzellzahl aus einer Probenahme wurden durchschnittliche Werte für die Berechnung verwendet.

Gewebe	Stelle der Probenahme	Besonderheiten	Zellzahlen der isolierten MSCs	Quelle	
Fett	Abdomen	Verschiedene Isolationstechniken	1.35×10 <sup>6</sup> Zellen/mL bis 1.77×10 <sup>6</sup> Zellen/mL	[371]	
	Hüfte		1.82±1.04 ×10 <sup>5</sup> Zellen/mL	[372]	
	Hüfte und Oberschenkel		4.04±0.21×10 <sup>5</sup> Zellen/mL	[373]	
	Subkutanes Fettgewebe		3.33×10 <sup>5</sup> Zellen/mL	[111]	
	Nicht angegeben	Diabetisches Fettgewebe		2.04±0.18 ×10 <sup>5</sup> Zellen/mL	[374]
		Nicht-diabetisches Fettgewebe		2.36±0.14 ×10 <sup>5</sup> Zellen/mL	
Nicht angegeben			5.68 ×10 <sup>3</sup> Zellen/mL	[375]	
Knochenmark	Rechter Beckenkamm		393±150 Zellen/mL	[376]	
	Linker Beckenkamm		413±152 Zellen/mL		
	Linker und rechter Beckenkamm	Verschiedene Aspiratgrößen (1 mL bis 50 mL)	2062±1552 Zellen/mL bis 95±8 Zellen/mL		
	Tibia		5.8±5.6×10 <sup>7</sup> Zellen/mL	[377]	
	Tibia		2.4±1.4×10 <sup>7</sup> Zellen/mL		
	Hüfte		3.18±1.85×10 <sup>5</sup> Zellen/mL	[372]	
Plazenta	Ganze Plazenta		1.47×10 <sup>6</sup> Zellen/mL	[82]	
	Amnion		1.7±0.3x 10 <sup>6</sup> Zellen/g	[378]	
	Chorion		21×10 <sup>6</sup> Zellen/ganzer Chorion Membran	[379]	
	Chorion		4.5±2.7×10 <sup>4</sup> Zellen/g	[380]	
Nabelschnur	Wharton-Sulze		6.4±3.2×10 <sup>4</sup> Zellen/g	[380]	
	Wharton-Sulze		2.8×10 <sup>5</sup> Zellen/cm	[381]	
	Wharton-Sulze		1.5×10 <sup>6</sup> Zellen/cm	[12]	
	Wharton-Sulze		5×10 <sup>6</sup> Zellen/cm	[112]	
	Wharton-Sulze		6.5×10 <sup>5</sup> Zellen/cm	[382]	

Anhand von **Tabelle E.1** kann man sehen, dass es starke Unterschiede in der Zellausbeute von hMSCs aus unterschiedlichen Gewebearten gibt. Des Weiteren ist auffällig, dass die Isolation von hMSCs aus dem Fettgewebe (AD-hMSCs) zu den geringsten Unterschieden innerhalb eines Gewebetyps führt (3.1-facher Unterschied von minimaler zu maximaler Ausbeute). Bei der Isolation von MSCs aus der Nabelschnur besteht ein 78.1-facher und bei der Isolation aus der Plazenta ein 466.7-facher Unterschied zwischen minimaler und maximaler Ausbeute. Bei der Isolation aus Knochenmark sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Studien höher (6×10<sup>5</sup>-facher Unterschied von minimaler zu maximaler Ausbeute). Da auch die Standardabweichungen innerhalb einzelner Studien sehr hohe Werte aufweisen, ist dies nicht nur mit dem Zellursprung aus verschiedenen Knochen zu erklären. Unterschiedliche Ausbeuten bei der Zellisolation von MSCs aus derselben Gewebeart sind hauptsächlich auf zwei verschiedene Ursachen zurückzuführen: Die Wahl der Isolationsmethode und demographische Unterschiede zwischen Spendern. Bei der Isolation von MSCs aus Fettgewebe konnte gezeigt werden, dass

Altersunterschiede zwischen Patienten keinen großen Einfluss auf die Isolationsausbeute haben, während Änderungen in Pufferzusammensetzungen, enzymatischem Verdau und Zentrifugation zu deutlich unterschiedlichen Ausbeuten führen [383, 384]. Isolationsausbeuten von hMSCs aus dem Knochenmark (BM-hMSCs) hängen sehr von der Wahl der Isolationsstelle ab. So konnte gezeigt werden, dass eine Isolation aus dem Beckenkamm zu starken Variationen der Ausbeute aufgrund von Ausspülungsprozessen durch periphere Blutströme führt [385]. Außerdem wurde das Alter insbesondere bei weiblichen Patienten als Einflussfaktor identifiziert [39, 386]. Um die Zellausbeute der MSC Isolation aus den verschiedenen Gewebetypen miteinander vergleichen zu können, muss auch die Gesamtzellausbeute betrachtet werden. Je nach Gewebe stehen stark unterschiedliche Volumina zur Isolation zur Verfügung. Die sich daraus ergebenden potenziellen Gesamtausbeuten variieren also stark von Gewebe zu Gewebe und erschweren einen Vergleich (siehe **Tabelle E.2**).

**Tabelle E.2: Vergleich der möglichen Ausbeuten der MSC Isolation aus verschiedenen Gewebetypen.** Zur Abschätzung wurden die durchschnittlichen Probenmengen und die Literaturangaben der minimalen und maximalen Zellausbeuten aus Tabelle E.1 verwendet.

Gewebetyp	Probenmengen		Minimum Zellausbeute	Maximum Zellausbeute
Fett	5 bis 25 L	[387]	$2.8 \times 10^9$	$4.4 \times 10^{11}$
Knochenmark	2 bis 20 mL	[109, 388]	$1.9 \times 10^2$	$1.2 \times 10^9$
Plazenta	500 bis 750 g Amnion: 3.3 cm <sup>3</sup> Chorion: 133.6 cm <sup>3</sup>	[82, 389-391]	$2.1 \times 10^7$	$1.5 \times 10^{10}$
Nabelschnur	20 bis 120 cm	[382]	$1.3 \times 10^6$	$6.0 \times 10^8$

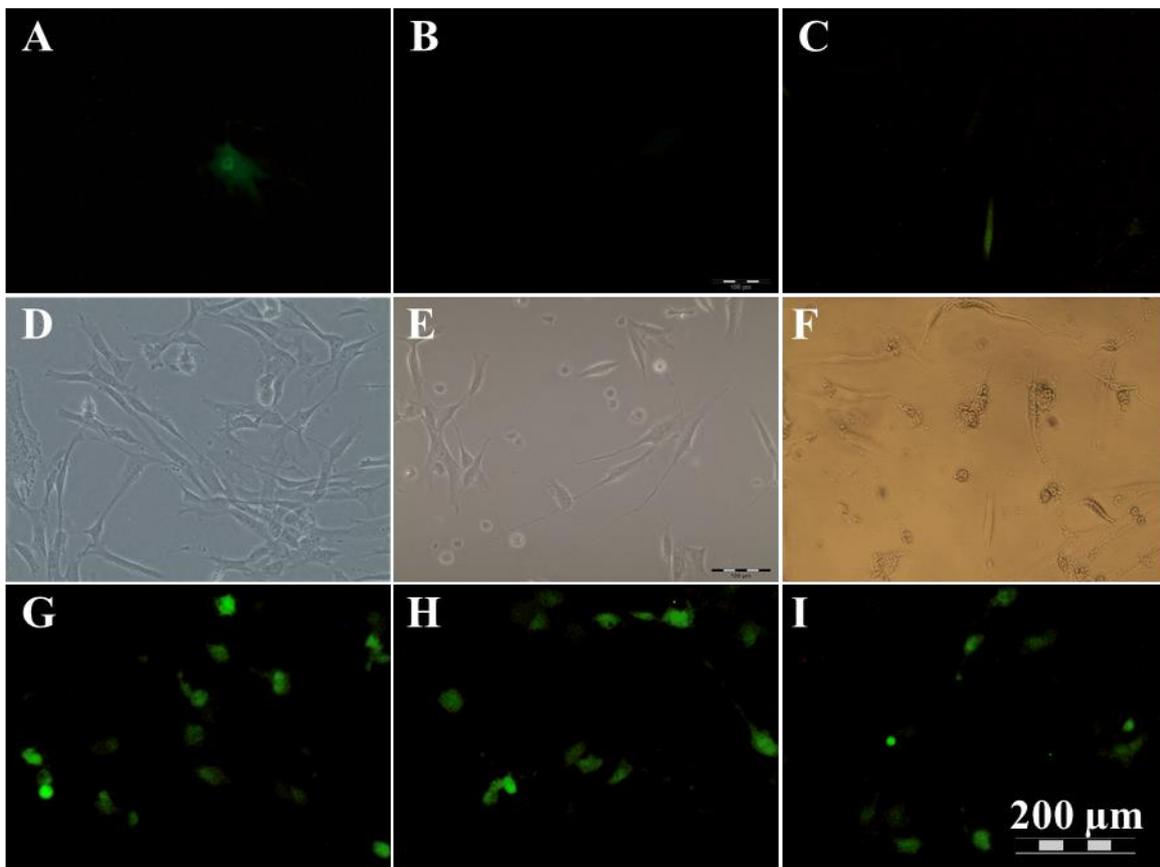
Nach **Tabelle E.2** kann also aus Fettgewebe die größte Gesamtmenge an MSCs isoliert werden. Zum Vergleich sind in der nachfolgenden **Tabelle E.3** benötigte Zellzahlen aus aktuellen Studien der Stammzelltherapie dargestellt.

**Tabelle E.3: Verwendete Zellzahlen in der Stammzelltherapie in beispielhaften aktuellen Studien.**

Behandelte Erkrankung	Gewebeursprung der verwendeten hMSCs	Verwendete Zellzahl pro Patient	Injektionsmethode	Quelle
Myokardial-Infarkt	Knochenmark	$7.2 \pm 0.90 \times 10^7$	Intrakoronar	[392]
Arthritis	Nabelschnur	$2 \times 10^7$	Intraartikulär	[393]
Arthritis	Knochenmark	$1 \times 10^8$	Intraartikulär	[44]
Lungenverletzungen	Knochenmark	$1 \times 10^6$ , $5 \times 10^6$ oder $10 \times 10^6$ pro kg Körpergewicht	Intravenös	[394]
GVHR	Knochenmark	$2 \times 10^6$ (Tag 73) + $1 \times 10^6$ (Tag 170) pro kg Körpergewicht	Intravenös	[395]
Diabetes Mellitus	Plazenta	$1.35 \times 10^6$ pro kg Körpergewicht	Intravenös	[396]
Diabetes Mellitus	Nabelschnur: Wharton Sulze	Je $1 \times 10^6$ pro kg Körpergewicht	Intravenös (Tag 5) und intrapankreatisch (Tag 10)	[397]
Parry Romberg Syndrom	Fettgewebe	$1 \times 10^7$	Subkutane Mikro-Fett-Graft- Injektion	[398]
Chronische Ischämie	Fettgewebe	$0.5 \times 10^6$ oder $1 \times 10^6$ pro kg Körpergewicht	Intraarteriell	[399]
Autismus	Nabelschnurblut	Viermal je $1 \times 10^6$ pro kg Körpergewicht	Intravenös bzw. intrathekal	[400]

### E.3 ERGEBNISSE DER LIPOFEKTION

In der folgenden Abbildungen sind die Bildausschnitte der Proben eines jeden Kits mit dem höchsten Anteil EGFP-positiver Zellen dargestellt. Diese wurden unter folgenden Bedingungen erzielt: FuGeneHD:DNA=2.5:1, insgesamt 400 ng DNA; PromoFectin-HUVEC:DNA=3.5:1, insgesamt 2.25 µg DNA. Für das Kit PromoFectin konnten keine EGFP-positive AD-hMSCs identifiziert werden. Als Positivkontrolle wurde für alle Kits eine Transfektion von NIH-3T3 Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt und zeigen, dass mithilfe aller verwendeten Lipofektions-Kits maximal vereinzelt EGFP-produzierende AD-hMSCs erzielt werden konnten.



**Abbildung E.1: Ergebnisse der Lipofektion mittels verschiedener Kits.** Lipofektion von AD-hMSCs mittels FuGene HD (A,D), mittels PromoFectin (B,E) und mittels PromoFectin-HUVEC (C,F); sowie Lipofektion von NIH-3T3s mittels FuGene HD (H), mittels PromoFectin (I) und mittels PromoFectin-HUVEC (J). Dargestellt sind Fluoreszenzbilder (A-C und H-J) und Phasenkontrastbilder (D-F). Der Messbalken entspricht 200 µm.

## E.4 AKTUELLE STUDIEN ZU VERSCHIEDENEN TRACKING METHODEN

In der folgenden **Tabelle E.4** sind aktuelle Studien mit hMSCs zu *in vivo* und *in vitro* Trackings dargestellt.

**Tabelle E.4: *In vitro* und *in vivo* Zell Tracking in bisherigen Untersuchungen**

Bildgebungsverfahren	Detektion	Markierung	Zelltyp	Donor Spezies	Empfänger Spezies	Kontrastmittel	Ref.
MRI	<i>In vivo</i>	Indirekt	CaSC	Schwein	Rat	hFTH	[401]
	<i>In vivo</i>	Indirekt	ESC	Maus	Maus	hFTH	[402]
	<i>In vivo</i>	Indirekt	ESC	Maus	Maus	MagA	[403]
	<i>In vitro</i>	Direkt	MSC/HSC	Mensch	-	FePro Komplexe	[404]
	<i>In vivo</i>	Direkt	MSC	Mensch	Maus	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> and Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> Nanopartikel	[405]
	<i>In vivo</i>	Direkt	ESC	Mensch	Maus	Mn <sup>2+</sup>	[406]
	<i>In vivo</i>	Direkt	AD-MSC	Mensch	Maus	BNF starch and nano-mags-D-SPIONs	[407]
	<i>In vivo</i>	Direkt	NSC/MSC	Mensch	Ratte	Magnetodendrimere mit SPIO	[180]
MPI	<i>In vitro</i>	Direkt	Adulte SC	Mensch/Ratte	-	Dextran-umhüllte SPIONs	[176]
PET	<i>In vivo</i>	Indirekt	MSC-Zelllinie SCP-1	Mensch	Rat	<sup>18</sup> FDG-D2R	[408]
	<i>In vivo</i>	Indirekt	BM-MSC	Mensch	Maus	<sup>18</sup> FFHBG-HSV1-TK	[409]
	<i>In vivo</i>	Direkt	nicht definiert	Mensch	Mensch	<sup>18</sup> FDG	[410]
	<i>In vivo</i>	Direkt	ESC	Mensch	Rhesus Affe	<sup>64</sup> Cu / <sup>89</sup> Zr	[411]
SPECT	<i>In vitro</i>	Direkt	BM-MSC	Mensch	-	<sup>111</sup> In-oxine	[412]
	<i>In vivo</i>	Direkt	LSC	Mensch	Mensch	<sup>111</sup> In-DTPA	[413]
	<i>In vivo</i>	Direkt	BM-MSC	Mensch	Rat	<sup>99m</sup> Tc-HMPAO	[414]
	<i>In vivo</i>	Direkt	UC-MSC	Mensch	Maus	<sup>99m</sup> Tc	[415]
	<i>In vivo</i>	Direkt	MSC Zelllinie SCP-1	Mensch	Ratte	<sup>111</sup> In-oxine	[416]
FLI	<i>In vitro</i>	Indirekt/ Direkt	BM-MSC	Mensch	-	AIEDs/ GFP	[335]
	<i>In vivo</i>	Direkt	AD-MSC	Mensch	Maus	NEO-LIVE™-Magnoxide 675 or 797 Nanopartikel	[417]
	<i>In vivo</i>	Direkt	BM-MSC	Mensch	Ratte	CdSe/ZnS and CdTe/ZnS QDs	[203]
	<i>In vivo</i>	Direkt	MSC	Mensch	Maus	Ag <sub>2</sub> S QDs	[418]
	<i>In vitro</i>	Direkt	MSC	Mensch	-	RGD-peptid konjugierte QDs	[201]
BLI	<i>In vivo</i>	Indirekt	BM-MSC	Mensch	Maus	Luziferase	[419]
	<i>In vivo</i>	Indirekt	BM-MSC	Mensch	Maus	Luziferase	[420]
	<i>In vivo</i>	Indirekt	AD-MSC	Mensch	Maus	Luziferase	[421]
	<i>In vivo</i>	Indirekt	NSC	Mensch	Maus	Luziferase	[255]
	<i>In vivo</i>	Indirekt	BM-MSC	Mensch	Maus	Luziferase	[422]
	<i>In vivo</i>	Indirekt	BM-MSC	Mensch	Maus	Luziferase	[423]
	<i>In vivo</i>	Indirekt	NSC	Mensch	Maus	Luziferase	[424]
	<i>In vivo</i>	Indirekt	UC-MSC	Mensch	Ratte	Luziferase	[425]
	<i>In vivo</i>	Indirekt	BM-MSC	Mensch	Ratte	Luziferase	[426]
	<i>In vivo</i>	Indirekt	BM-MSC	Mensch	Maus	Luziferase	[254]
	<i>In vivo</i>	Indirekt	ESC	Mensch	Maus	Luziferase	[427]

Bildgebungsverfahren	Detektion	Markierung	Zelltyp	Donor Spezies	Empfänger Spezies	Kontrastmittel	Ref.
UB	<i>In vivo</i>	Direkt	AD-MSK	Mensch	Hühner-Embryo	Biotinylierte Mikrobläschen mit Perfluorbutan (C <sub>4</sub> F <sub>10</sub> )	[428]
Multimodal: PET/MRI	<i>In vivo</i>	Indirekt	hNPC	Mensch	Ratte	<sup>52</sup> Mn; DMT1	[429]
Multimodal: FLI/BLI/MRI	<i>In vivo</i>	Indirekt/Direkt	ESC	Mensch	Maus	eGFP-Luziferase-Fusionsprotein/SPIOs	[430]
Multimodal: MRI/FLI	<i>In vitro</i>	Direkt	UC-MSK	Mensch	-	FITC-CS@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Nanopartikel	[431]
Multimodal: MRI/FLI	<i>In vitro/In vivo</i>	Direkt	MSK	Mensch	Ratte	MNP@SiO <sub>2</sub> (RITC)-PEG Nanopartikels	[432]

SC – Stammzelle (engl. *stem cell*); MSC – Mesenchymale SC (hier verwendet, wenn der Zelltyp nicht näher definiert war); AD-MSK – MSCs aus dem Fettgewebe (engl. *Adipose tissue derived MSC*); BM-MSK – MSC aus dem Knochenmarkgewebe (engl. *Bone Marrow Derived SC*); CaSC – Cardiac SC; ESC – Embryonale SC; GSC – Glioblastom SC; HSC – Hämatopoetische SC; iPSC – induzierte pluripotente SC; LSC – Leber SC; PBSC – SC aus dem peripheren Blut; MPC – Muskelvorläuferzelle (engl. *Muscle Progenitor Cell*); NPC – neurale Vorläuferzelle (engl. *Neural Progenitor Cell*); NSC – Neurale SC; UC-MSK – SC aus dem Nabelschnurblut (engl. *Umbilical Cord Blood SC*). <sup>18</sup>FFHBG – 9-(4-fluoro-3-hydroxymethylbutyl)-guanin; AIED – *Aggregation Induced Emission Dot*; BNF – *Bionized Nanoferrite*; D2R – Dopamin Typ 2 Rezeptor; DMT1 – Divalenter Metall Transporter 1; DTPA – Diethylentriaminpentaessigsäure (engl. *diethylenetriaminepentaacetic acid*); eGFP – für Säugetierzellen Codon-optimierte Version des GFP (engl. *enhanced GFP*); FePro – Ferumoxid-Protaminsulfat; FITC – Fluorescein isothiocyanat; GFP – grün fluoreszierendes Protein; hFTH – Schwere Kette des humanen ferritins (engl. *Human ferritin heavy chain*); HMPAO – Hexamethylpropylenaminnoxim; HSV1-TK – Tyrosinkinase des Herpes Simplex Virus Typ 1; MagA – Mucoviscosität-assoziiertes Gen A; MNP – Magnetischer Nanopartikel; NOTA-AC133 – 1,4,7-Triazacyclononan-N,N,N`-Triessigsäure`-AC133 Antikörper; PEG – Polyethylenglycol; PEG-b-PAsp-PEI – PEG-block-poly(L-Aspartamsäure)-PEI; PEI – Polyethylenimin; QD – *Quantum Dot*; RFP – rot fluoreszierendes Protein; RGD – Arginylglycylaspartamsäure; SPIO – Super-paramagnetisches Eisenoxid (engl. *Super Paramagnetic Iron Oxide*); SPIO – SPIO Nanopartikel; MRT=Magnetresonanztomographie; MPB=Magnetpartikelbildung; PET=Positronenemissionstomographie; SPECT=Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie (engl.: *single photon emission computed tomography*); CLB=Cerenkov Lumineszenz Bildgebung; FLB=Fluoreszenzbasierte Bildgebung; BLB=Biolumineszenzbasierte Bildgebung; UB=Ultraschallbildung.

## E.5 KALIBRATIONSURVE QRT-PCR

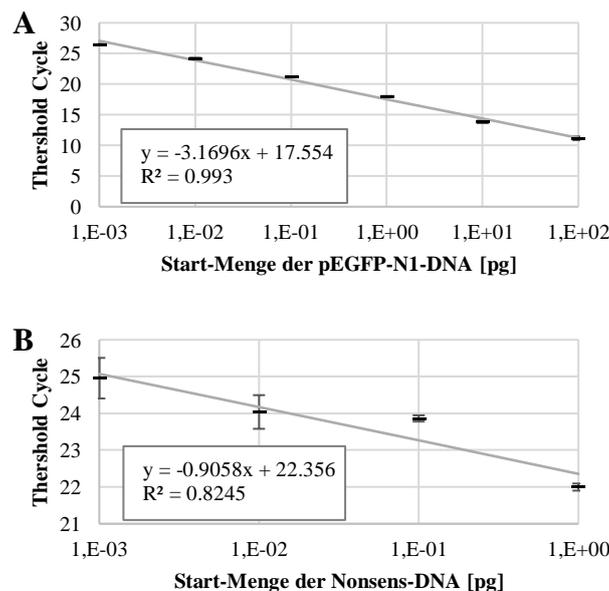
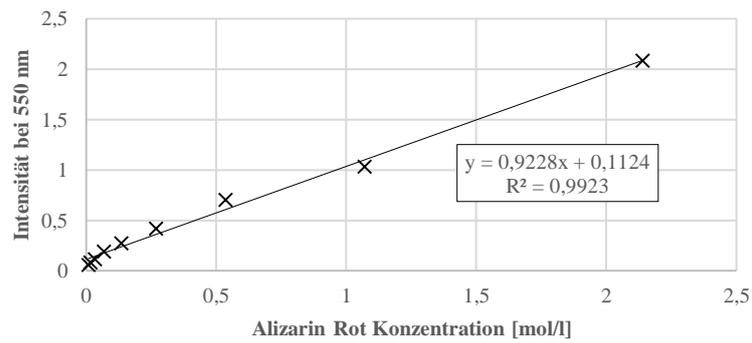


Abbildung E.2: Kalibrationskurven der qRT-PCRs zur absoluten Bestimmung der Ziel-DNA-Konzentrationen für pEGFP-N1 (A) und Nonsense-DNA (B).

## E.6 KALIBRATIONS-KURVE ZUR QUANTIFIZIERUNG DER OSTEOGENEN DIFFERENZIERUNG



**Abbildung E.3: Kalibrationskurven der qRT-PCRs zur absoluten Bestimmung der Ziel-DNA-Konzentrationen für pEGFP-N1 (A) und Nonsens-DNA (B).**

---

**F TABELLENVERZEICHNIS**

<b>Tabelle 3.1: Differenzierungskapazitäten und spezifische Oberflächenmarker von MSCs aus verschiedenen humanen Gewebearten.</b> .....	13
<b>Tabelle 3.2: Vorteile (“+”) und Nachteile (“-“) der verschiedenen DNA-Transfermethoden.</b> .....	30
<b>Tabelle 4.1: Oberflächen-Immunophänotyp-Charakterisierung der isolierten Zellen in Passage 2</b> .....	35
<b>Tabelle 4.2: Vergleich der Oberflächenantigenexpression</b> .....	57
<b>Tabelle 4.3: Transfektionseffizienzen und Anteil Marker-positiver Zellen</b> .....	71
<b>Tabelle 4.4: <i>In vivo</i> Tracking Methoden und deren Vor- (“+”) und Nachteile (“-“) in bisherigen Studien</b> .....	75
<b>Tabelle D.1: Verwendete Antikörper zur Immunophänotypanalyse der isolierten und transfizierten Zellen</b> .....	120
<b>Tabelle D.2: Well-Aufteilung der Lipofektion mittels FuGene HD (Promega, Mannheim, Deutschland)</b> .....	125
<b>Tabelle D.3: Well-Aufteilung der Lipofektion mittels PromoFectin (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland)</b> .....	125
<b>Tabelle D.4: Well-Aufteilung der Lipofektion mittels PromoFectin-HUVEC (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland)</b> .....	126
<b>Tabelle E.1: Zellausbeute an hMSCs nach Isolation aus verschiedenen Gewebetypen in bisherigen Studien.</b> .....	130
<b>Tabelle E.2: Vergleich der möglichen Ausbeuten der MSC Isolation aus verschiedenen Gewebetypen</b> .....	131
<b>Tabelle E.3: Verwendete Zellzahlen in der Stammzelltherapie in beispielhaften aktuellen Studien</b> .....	131
<b>Tabelle E.4: <i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Zell Tracking in bisherigen Untersuchungen</b> .....	133

**G ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

<b>Abbildung 3.1: Entstehung von CSCs.)</b> .....	6
<b>Abbildung 3.2: Übersicht aktueller klinischer Studien mit Anwendung von hMSCs</b> .....	11
<b>Abbildung 3.3: Verschiedene bestehende Zellidentifikationsmethoden</b> .....	17

<b>Abbildung 3.4: Prinzip der lentiviralen Transduktion nach Kajaste-Rudnitski 2015 [268].</b>	26
<b>Abbildung 3.5: Schematischer Ablauf der Transfektion mittels Lipofektion bzw. kationischer Polymere.</b>	27
<b>Abbildung 3.6: Schematischer Ablauf der Transfektion mittels Elektroporation.</b>	28
<b>Abbildung 4.1: Zellwachstum der isolierten Zellen in Passage 2.</b>	32
<b>Abbildung 4.2: Adipogene Differenzierungskapazität der isolierten Zellen in Passage 2.</b>	33
<b>Abbildung 4.3: Osteogene Differenzierungskapazität der isolierten Zellen in Passage 2.</b>	33
<b>Abbildung 4.4: Chondrogene Differenzierungskapazität der isolierten Zellen in Passage 2.</b>	34
<b>Abbildung 4.5: Durchflusszytometer-Analyse der Oberflächenantigenexpression der isolierten Zellen in Passage 2.</b>	35
<b>Abbildung 4.6: Durchflusszytometer-Analyse der Oberflächenantigenexpression der isolierten Zellen in Passage 2.</b>	35
<b>Abbildung 4.7: Zellwachstum der AD-hMSCs (A) und deren Population Doubling Levels (B).</b>	36
<b>Abbildung 4.8: Optimierung der Parameter der Elektroporation von AD-hMSCs mit dem Reporterplasmid pEGFP-N1.</b>	38
<b>Abbildung 4.9: Optimierung der eingesetzten DNA-Menge für die Elektroporation von AD-hMSCs mit dem Reporterplasmid pEGFP-N1.</b>	39
<b>Abbildung 4.10: Schematische Darstellung der Versuche</b>	41
<b>Abbildung 4.11: Anteil erfolgreich markierter AD-hMSCs [in %] zu verschiedenen Zeitpunkten nach erfolgter Elektroporation</b>	42
<b>Abbildung 4.12: Anzahl der gDNA- (genomische DNA) und cytDNA- (cytosolische DNA) Kopien pro Marker-positiver Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten.</b>	44
<b>Abbildung 4.13: EGFP-Produktion nach Elektroporation mit pEGFP-N1 (A-C) oder lentiviraler Transduktion mit pLVTHM (D).</b>	45
<b>Abbildung 4.14: Anzahl der <i>egfp</i>-mRNA-Kopien pro Marker-positiver Zelle nach Elektroporation mit pEGFP-N1 oder nach lentiviraler Transduktion mit pLVTHM.</b>	46
<b>Abbildung 4.15: Langzeit-Nachweisbarkeit mittels Elektroporation markierter AD-hMSCs.</b>	48

---

Abbildung 4.16: Ausschnitte aus einer online <i>in vitro</i> Überwachung der mittels Elektroporation EGFP-markierten AD-hMSCs.....	50
Abbildung 4.17: Veränderung der CFU-Anzahl relativ zur Kontrolle.....	51
Abbildung 4.18: Repräsentative Darstellung von Seneszenz-assoziiierter $\beta$ -Galaktosidase-Färbung.....	53
Abbildung 4.19: Durchflusszytometeranalyse der Oberflächenantigene der mit pEGFP-N1 elektroporierten AD-hMSCs zu verschiedenen Zeitpunkten nach erfolgtem DNA-Transfer unbehandelter AD-hMSCs in Passage 2 (vgl. Kapitel 4.1.3).....	54
Abbildung 4.20: Durchflusszytometeranalyse der Oberflächenantigene der mit Nonsens-DNA elektroporierten AD-hMSCs zu verschiedenen Zeitpunkten nach erfolgtem DNA-Transfer unbehandelter AD-hMSCs in Passage 2 (vgl. Kapitel 4.1.3). ....	55
Abbildung 4.21: Durchflusszytometeranalyse der Oberflächenantigene der mit pLVTHM lentiviral transduzierten AD-hMSCs zu verschiedenen Zeitpunkten nach erfolgtem DNA-Transfer unbehandelter AD-hMSCs in Passage 2 (vgl. Kapitel 4.1.3). ....	56
Abbildung 4.22: Adipogene Differenzierungskapazität von AD-hMSCs nach erfolgtem DNA-Transfer.....	58
Abbildung 4.23 Semi-quantitative Analyse der adipogenen Differenzierung aus Abbildung 4.22.....	60
Abbildung 4.24: Osteogene Differenzierungskapazität von AD-hMSCs nach erfolgtem DNA-Transfer.....	61
Abbildung 4.25 Quantitative Analyse der osteogenen Differenzierung aus Abbildung 4.24. ....	63
Abbildung 4.26 Vergleich der Marker-DNA-Menge in den transfizierten AD-hMSCs pro isolierter Zelle.....	65
Abbildung 4.27: Osteogene Differenzierung der mittels Elektroporation EGFP-markierten AD-hMSCs. ....	66
Abbildung C.1: Vektorkarte von pEGFP-N1. . ....	116
Abbildung C.2: Vektorkarte von pLVTHM.....	117
Abbildung D.1 Beispielhafte Analyse der generierten Durchflusszytometerdaten.....	127
Abbildung E.1: Ergebnisse der Lipofektion mittels verschiedener Kits.....	132

---

<b>Abbildung E.2: Kalibrationskurven der qRT-PCRs zur absoluten Bestimmung der Ziel-DNA-Konzentrationen für pEGFP-N1 (A) und Nonsens-DNA (B).....</b>	<b>134</b>
<b>Abbildung E.3: Kalibrationskurven der qRT-PCRs zur absoluten Bestimmung der Ziel-DNA-Konzentrationen für pEGFP-N1 (A) und Nonsens-DNA (B).....</b>	<b>135</b>

## MITARBEIT AN EXPERIMENTEN

Kapitel 4.2.2      Gemeinsame experimentelle Durchführung      B. Sc. Eva Grün

### **Betreute Abschlussarbeiten im Rahmen der Promotion**

Bachelorarbeit von Eva Grün mit dem Titel „*Etablierung eines Systems zur Markierung von Stammzellen durch transiente Transfektion*“. (Mitarbeit oben angegeben)

---

**LEBENS LAUF****Persönliche Daten**

Name, Vorname	von der Haar, Kathrin
Geburtsdatum	30.09.1989
Geburtsort	Münster
Staatsangehörigkeit	Deutsch

**Ausbildung**

Seit 10/2013	Promotion Chemie im Bereich Stammzellforschung an der Leibniz Universität Hannover am Institut für Technische Chemie
10/2011 - 10/2013	Studium mit Abschluss M. Sc. Life Science. Note: 1,1 Thesis: Deconvolution of mixture signals of biosensor arrays into the individual analyte concentrations (Kooperation <i>OptiEnz Sensors</i> und <i>Colorado State University, USA</i> )
10/2008 - 09/2011	Studium mit Abschluss B. Sc. Life Science. Note: 1,1 Thesis: Charakterisierung eines modularen Hohlfaserreaktors
08/2001 - 07/2008	<i>Liebfrauenschule Oldenburg</i> mit Abschluss Allgemeine Hochschulreife (Note 1,8; Schwerpunktfächer: Mathematik, Chemie, Biologie)

---

## PUBLIKATIONSLISTE

### Publikationen

1. **von der Haar K (75%)**, Jonczyk R, Lavrentieva A, Weyand B, Vogt P, Jochums A, Stahl F, Scheper T, Blume C. Electroporation: A sustainable and cell biology preserving Cell Labeling Method for adipogenous Mesenchymal Stem Cells. Bioresearch OpenAccess. (am 27.01.2019 zur Veröffentlichung akzeptiert).
2. **von der Haar K (90%)**, Lavrentieva A, Stahl F, Scheper T, Immenschuh S, Reimers K, Weyand B, Blume C. Lost Signature: Progress and Failures in in vivo Tracking of Implanted Stem Cells. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 9907–9922 (2015).
3. von der Haar M, Heuer C, Pähler M, **von der Haar K (5%)**, Lindner P, Scheper T, Stahl F. Optimization of Cyanine Dye Stability and Analysis of FRET Interaction on DNA Microarrays. MDPI biology Vol. 5. (2016).
4. von der Haar M, Preuß J, **von der Haar K (5%)**, Lindner P, Scheper T, Stahl F. The Impact of Photobleaching on Microarray Analysis. MDPI biology Vol. 4. (2015).

### Vorträge auf internationalen Konferenzen

1. World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig, Germany 2015: von der Haar K. Tracking of Autologous Transplanted Stem Cells.
2. Dechema ATMP 2015 – Issues and Challenges from Bench to Bedside, Tutzing, Germany 2015: von der Haar K. Cell Signature for Tracking of Autologous Transplanted Stem Cells.

### Posterpräsentationen auf internationalen Konferenzen

1. BIOFABRICATION Retreat, Hannover, Germany 2014: von der Haar K, Lavrentieva A, Stahl F, Scheper T, Immenschuh S, Reimers K, Weyans B, Blume C; Cell Signature for the Tracking of Transplanted Autologous Cells.
2. Fraunhofer Life Science Symposium, Leipzig, Germany 2014: von der Haar K, Lavrentieva A, Stahl F, Scheper T, Immenschuh S, Reimers K, Weyans B, Blume C; Methylation Patterns as a Marker for Tracking of Autologous Transplanted Stem Cells.