Zentrum für Innere Medizin
der Universität Ulm
Klinik für Innere Medizin II
Kardiologie, Angiologie, Pneumologie und Nephrologie

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. V. Hombach

Hocheffiziente genetische Markierung von humanen CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen durch mRNA-Gentransfer

Implikationen für eine therapeutische Myokardregeneration

Dissertation
zur Erlangung der Doktorgrades der Medizin
der
Medizinischen Fakultät der
Universität Ulm

Vorgelegt von

Desiree Kronawitter

aus Krumbach

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. K. M. Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Torzewski

2. Berichterstatter: PD. Dr. J. Greiner

Tag der Promotion: 20.11.08

`Quidquid agis, prudenter agas et respice finem.`

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS……I

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN. ……1

1 EINLEITUNG……3

1.1 STAMMZELLEN....6

1.2 KARDIOVASKULÄRE ZELLERSATZTHERAPIE....15

1.3 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT……18

2 MATERIAL UND METHODEN……20

2.1 MATERIAL UND GERÄTE……20

2.2 METHODEN……25

3 ERGEBNISSE……32

3.1 EFFIZIENZ DER TRANSFEKTION……32

3.2 VIABILITÄT DER ZELLEN NACH TRANSFEKTION……37

4 DISKUSSION……42

4.1 DIE STAMZELLEN: CD34 POSITIVE HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLEN UND MESENCHYMALE STAMMZELEN……42

4.2 MARKIERUNGEN DER STAMMZELLEN……44

4.3 DIE GENETISCHE MARKIERUNG……48

4.4 AUSBLICK……50

5 ZUSAMMENFASSUNG……54

6 LITERATURVERZEICHNIS……56

7 ANHÄNGE……79

7.1 POSTER……80

7.2 PUBLIKATIONEN……81

8 DANKSAGUNGEN……94

9 LEBENSLAUF ……96

Verzeichnis der verwendeten Abkürzunge:

α-MEM	*α- minimum essential medium*
ASC	*adult stem cells* (Adulte Stammzellen)
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	*Basic fibroblast growth factor*
bp	*base pair*
CD	*cluster of differentiation*
cDNA	*copyDNA*
CFP	*cyan fluorescent protein*
CMV	Cytomegalievirus
d	*day*
DCM	*dilated cardiomyophathy* (Dilatative Kardiomyopathie)
DNA	*desoxyribonucleic acid*
EDTA	*Ethylene diamine tetraacetic acid*
EGF	*epidermal growth factor*
EGFP	*enhanced green fluorescent protein*
ESC	*embryonic stem cell* (Embryonale Stammzellen)
FACS	*fluorescent activated cell sorting*
FBS	*fetal bovin serum*
FCS	*fetal calf serum*
FSC	*forward scatter*
GFP	*green fluorescent protein*
G-CSF	*granulocyte colony stimulating factor*
GM-CSF	*granulocyte/macrophage colony stimulating factor*
hESC	*humanESC*
HPC	*hematopoietic progenitor cells (*Hämatopoetische Progenitorzellen)
HSC	*hematopoietic stem cells* (Hämatopoetische Stammzellen)
IGF	*insulin-like growth factor*

Ig G	*immunglobulin G*
IL	*Interleukin*
kD	*kilodalton*
ΔLNGFR	*delta low affinity nerve growth factor receptor*
LNGFR	*low affinity nerve growth factor receptor*
MAPC	*multipotent adult progenitor cells*
MCH	*major histocompatibility complex*
mRNA	*messengerRNA*
MSC	*mesenchymal stem cells* (Mesenchymale Stammzellen)
NGF	*nerve growth factor*
PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	*polymerase chain reaction*
PDGF	*plaetelet derived growth factor*
PE	*phycoerythrin*
PGC	*primordial germ cells*
PSG	*penicilline, streptomycin, glutamine*
RNA	*ribonucleic acid*
rpm	*rounds per minute*
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
RT	*room temperature* (Raumtemperatur)
SCF	*stem cell factor*
SCID	*served combined immuno-deficiency*
SSC	*side scatter*
Thy-1	*thymidylate synthase-complementing protein*
YFP	*yellow fluorescent protein*

1 Einleitung

Stammzellen und ihre Nutzung bei der Regeneration von Gewebe sind ein gegenwärtiger Brennpunkt der Forschung und des öffentlichen Interesses.
Vor allem hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen sollen die Fähigkeit besitzen Gewebe oder Organe zu regenerieren (Jiang et al. 2002, Lagasse et al. 2000, Orlic et al. 2001a, Takahashi et al. 1999, Toma et al. 2002) und haben damit ein enormes Potential an Einsatzmöglichkeiten zur Bekämpfung von Krankheiten. Die Einsatzgebiete reichen von der Reduktion der akuten und chronischen Abstoßungsreaktion bei Transplantationen (Aggerwal et al. 2005), der Behandlung von Osteogenesis imperfecta (Horwitz et al. 2002, Le Blanc et al. 2005), der Therapie der amyotrophen Lateralsklerose (Mazzini et al. 2006) bis zur Behandlung von Volkskrankheiten wie Diabetes mellitus (Choi et al. 2005), um nur einen Bruchteil zu nennen.

Eine besondere Bedeutung kommt dem Einsatz von Stammzellen auf dem großen Feld der kardiovaskulären Erkrankungen zu. Laut Statistischem Bundesamt ist die chronisch ischämische Herzkrankheit mit 84163 Toten im Jahr 2004, das sind 10,3% aller Todesfälle, immer noch die Todesursache Nummer eins in Deutschland, dicht gefolgt vom akuten Myokardinfarkt mit 61736 Toten. Die durch Erkrankungen des Herzkreislaufsystems verursachten Kosten belaufen sich auf ca. 34,4 Milliarden im Jahr und verursachen, damit auf Erkrankungen bezogen, den größten Teil der Gesundheitskosten. In den USA stirbt laut *Heart Disease and Stroke Statistic –2006 Update* (Thom et al. 2006) jede Minute ein Mensch an einer Erkrankung des Herzens, statistisch einer von fünf Todesfällen. Dort sind ca. 13,2 Millionen Menschen an einer koronaren Herzerkrankung erkrankt und die verursachten Kosten belaufen sich auf 403,1 Milliarden US$ im Jahr. Dies unterstreicht die enorme Wichtigkeit der Entwicklung geeigneter Behandlungs-strategien zur Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen.

Der Einsatz von adulten Stammzellen zum Gewebeersatz stellt möglicherweise einen neuen Ansatz zur Behandlung dieser Gruppe von Erkrankungen, die alle mit einem Gewebeverlust und damit einem Funktionsverlust einhergehen, dar. Erste klinische Studien bei Patienten mit ischämischer Herzerkrankung zeigen nach Applikation von Stammzellen eine Verbesserung der Pumpfunktion (Assmus et al. 2002, Schachinger et al. 2004, Strauer et al. 2002, Strauer et al. 2005). Der Mechanismus, der zu dieser klinisch messbaren Funktionsverbesserung führt, ist jedoch noch unbekannt und sehr umstritten. Die meisten Evidenzen sprechen für eine Transdifferenzierung der Zellen, diese Hypothese ist jedoch sehr kontrovers diskutiert und beim Menschen nach autologer Stammzellapplikation noch nicht bewiesen. Der Nachweis der Transdifferenzierung der Stammzellen, insbesondere von hämatopoetischen und mesenchymalen, ist folglich ein Schlüssel zur Klärung dieser Frage und auf dem Weg zu einer erfolgreichen kardiovaskulären, aber auch sonstigen Zellersatztherapie.

Zwei große Gebiete, auf denen der Einsatz von Stammzellen erforscht wird, sind einerseits der Zustand nach Myokardinfarkt und andererseits die dilatative Kardiomyopathie.

Die Prognose bei Patienten mit Myokardinfarkt, der Todesursache Nummer eins in der westlichen Welt, ist unter anderem im Wesentlichen von dem Grad der linksventrikulären Funktionseinschränkung bestimmt. Ein Drittel aller Patienten entwickelt nach einem akuten Myokardinfarkt in Folge der entstehenden Nekrose eine Linksherzinsuffizienz; hierbei gilt eine Ejektionsfraktion von unter 30% als prognostisch ungünstig. Eine Therapie zur Wiederherstellung des ischämischen Gewebes und damit der Verbesserung der ventrikulären Funktion ist bis heute nicht möglich, hier könnte die kardiovaskuläre Zellersatztherapie ein großer Fortschritt sein.

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) stellt ebenfalls ein mögliches Einsatzgebiet der Stammzelltherapie dar. Sie ist durch eine eingeschränkte Funktion des linken oder beider Ventrikel charakterisiert (Richardson et al. 1996). Klinisches

Kardinalsymptom ist wiederum die Linksherzinsuffizienz, begleitet von Arrhythmien und Thromboembolien, bis hin zum plötzlichen Herztod, der in jedem Stadium auftreten kann. Prognostisch ungünstig ist, dass die DCM oft erst in fortgeschrittenem Stadium diagnostiziert wird und die 5-Jahres-Überlebensrate dann nur noch ca. 50% beträgt; das Patientenalter liegt meist zwischen dem zwanzigsten und fünfzigsten Lebensjahr. In der westlichen Welt beträgt die Prävalenz etwa 36 pro 100000 Einwohner, Inzidenz bei 6-8 pro 100000 im Jahr (Mestroni et al. 1999, Rakar et al. 1997). Pathologisch zeigen sich hier interstitielle Fibrosen und strukturelle Alterationen der extrazellulären Matrix, also ebenfalls ein Verlust funktionstüchtiger Zellen und damit eine Einschränkung der Herzfunktion. Die DCM imponiert als Linksherzinsuffizienz und wird auch so behandelt, was bis auf die medikamentöse Therapie keinen großen Spielraum offenlässt. Im fortgeschrittenen Stadium kommt nur die Herztransplantation als einzig etablierte kurative Therapie in Frage. Adulte Stammzellen könnten auch hier eine wichtige Therapieoption darstellen.

1.1 Stammzellen

Stammzellen charakterisieren sich als noch nicht vollständig differenzierte, teilungsfähige Zellen des Embryos, des Fötus oder des Erwachsenen. Im Unterschied zu anderen Körperzellen besitzen sie die Fähigkeit zur ständigen Proliferation und Selbsterneuerung, außerdem zeigen sie unterschiedlich starkes Differenzierungspotential und sind klonal. Hier soll aus der heterogenen Gruppe der Stammzellen im Detail nur auf die embryonalen und hämatopoetischen Stammzellen eingegangen werden.

1.1.1 Embryonale Stammzellen

Seit die erste humane embryonale Stammzelllinie (human embryonic stem cell hESC) im Jahr 1998 (Thomson et al. 1998) gewonnen werden konnte, ist die Nachfrage nach diesen Zellen zu Forschungszwecken enorm. Die Fähigkeit der hESC zur fast grenzenlosen Produktion und zur Differenzierung in fast alle Zelltypen ist auf sehr großes Interesse bei Forschern weltweit gestoßen. Diese einzigartigen Fähigkeiten haben hohe Erwartungen in einer Vielzahl von Forschungsfeldern geweckt, z.B. im besseren Verständnis für die Zellularbiologie des Menschen, und natürlich die Hoffnung, dadurch eine Vielzahl von Krankheiten bekämpfen zu können. Die Kehrseite ist allerdings die Gewinnung von diesen Zelllinien, da hierfür der frühe humane Embryo zerstört werden muss (De Wert et al. 2003). Daher hat eine Vielzahl an Regierungen die Arbeit mit hESC streng reguliert (Knowles 2004). Auf Grund der Vielzahl an Veröffentlichungen und Forschungsfeldern auf diesem Gebiet soll hier nur auf einige grundlegende Ergebnisse eingegangen werden.

Aus einer befruchteten Eizelle entwickelt sich nach drei Zellteilungen das so genannte Morula-Stadium. Die hierbei entstehenden Tochterzellen sind jede für sich in der Lage (eingenistet in den Uterus) einen eigenständigen und vollständigen Organismus zu bilden. Diese Fähigkeit, die im Übergang zu den folgenden Zellstadien verloren geht, wird Totipotenz genannt. Nach weiteren Teilungen entwickelt sich eine mit Flüssigkeit gefüllte Zellkugel die Blastocyste. Sie besteht aus einer inneren Zellmasse, die von Trophoblasten umhüllt ist.

Embryonale Stammzellen, die nach der Art ihrer Gewinnung definiert werden und keine eigenständige Zellart darstellen, werden aus dieser inneren Zellmasse gewonnen. Sie weisen pluripotente Eigenschaften auf, da sie sich in vitro in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren können.

Die Gewinnung embryonaler Stammzellen ist bisher nur bei Mäusen, Affen und Menschen etabliert worden. Wie bereits erwähnt konnte Thomson im Jahr 1998 (Thomson et al. 1998) aus 14 Blastocysten die ersten fünf humanen embryonalen Stammzelllinien gewinnen und kultivieren. Allerdings gelang schon im Jahre 1981 die erste Isolierung von murinen ESC (Evans et al. 1981) und 14 Jahre später konnten beim Rhesusaffen embryonale Stammzellen isoliert werden (Thomson et al.1995).

Die Pluripotenz der Zellen, also die Fähigkeit sich in fast alle Zellen des menschlichen Körpers zu entwickeln, wurde mehrfach bewiesen (Amit et al. 2000, Itskovitz-Eldor et al. 2000, Schuldiner et al. 2000) jedoch können sie bei der Einnistung in den Uterus keinen ganzen Organismus bilden.

Allerdings zeigten neue Ergebnisse von Scholer (Hubner et al. 2003) bereits 2003 eine mögliche Totipotenz. In seinen neuesten Ergebnissen (Kehler et al. 2006) konnte gezeigt werden, dass Maus-ESC in ursprünglichen Keimzellen (primordial germ cells PGC´s) die Differenzierung zu weiblichen und männlichen Gameten verursachen können. Das Potential dieser Zellen und ob sich menschliche embryonale Keimzellen ähnlich verhalten, bleibt abzuwarten.

1.1.1.1 IN VITRO DIFFERENZIERUNGSPOTENTIAL **ESC**; eine kurze Darstellung

Zahlreiche Arbeiten konnten das große Differenzierungspotential humaner ESC zeigen:

- Differenzierung zu Zellen aller drei Keimblätter (Reubinoff et al. 2001)
- Differenzierung zu neuronalen Vorläuferzellen (Reubinoff et al. 2001, Zhang et al. 2001)

- Differenzierung zu Neuronen (Schuldiner et al. 2001)
- Differenzierung zu Kardiomyozyten (Kehat et al. 2001)
- Differenzierung zu Endothelzellen (Levenberg et al. 2002)
- Differenzierung zu B-Zellen des Pankreas (Assady et al. 2001)
- Differenzierung in hämatopoetische Vorläuferzellen (Kaufman et al. 2001)
- Differenzierung zu T-Zellen des Immunsystems (Fleming et al. 2006, Galic et al. 2006)
- Differenzierung zu Zellen der Haut, Nebenniere, Muskeln, Knochen, Niere, Urogenitaltrakt (Schuldiner et al. 2000)

Murine ESC der Maus konnten bisher zu folgenden Zelltypen differenziert Werden:

- Dopamin und Serotonin produzierende Zellen (Lee et al. 2000)
- Kardiomyozyten (Klug 1996, Weissmann 2000, Wobus et al. 1995)
- Insulin produzierende Zellen, die einen medikamentös induzierten Diabetes korrigieren können (Lumelsky et al. 2001, Soria et al. 2000)
- Adipozyten (Dani et al. 1997)
- Astrozyten, Gliavorläuferzellen und Oligodendrozyten (Brustle et al. 1999)

1.1.1.2 THERAPEUTISCHER EINSATZ EMBRYONALER STAMMZELLEN BEI DER ZELLERSATZTHERAPIE

Die Hoffnungen, die in die Therapie mit hESC weltweit gesetzt werden, sind ernorm. Auf Grund der Entstehung von Teratomen und Teratokarzinomen (Reubinoff et al. 2000, Wakitani et al. 2003) ist die Applikation von unbehandelten undifferenzierten ESC keine Option in der Zellersatztherapie. Wie erwähnt, ist es in vitro schon mehrfach gelungen, hESC zu verschiedenen Vorläuferzellen zu differenzieren, daher zielen die derzeitigen Bemühungen auf die Applikation von gezielt differenzierten Vorläuferzellen am Ort der Schädigung ab. Da die Pluripotenz der Zellen die Differenzierung in beinahe alle Gewebetypen zulässt, scheinen alle Voraussetzungen für die Behandlung von nicht heilbaren

Erkrankungen gegeben zu sein, so z.B. Morbus Parkinson (Gerlacht et al. 2002, Takahaschi 2006), amyotrophe Lateralsklerose (Mazzini et al. 2003), Diabetes (Assady et al. 2001), Gelenkknorpeldefekte (Wakitani et al. 2004); weiter wird ihr Einsatz bei neuronalen Erkrankungen (Carpenter et al. 2001), neurodegenerativen Erkrankungen (Sonntag et al. 2006) und Erkrankungen der Lunge (Bishop et al. 2006) angedacht. Von großem Interesse ist auch der Einsatz von hESC zur Behandlung von Herzerkrankungen (Emanueli et al. 2005, Gepstein 2002, Smith et al. 2005).
Bevor hESC zum klinischen Einsatz gebracht werden, müssen allerdings noch eine Reihe von Problemen gelöst werden.

1.1.1.2 LIMITATIONEN DES EINSATZES VON **ESC** ZUM ZELLERSATZ BEIM MENSCHEN

- Sowohl die Forschung als auch der Einsatz von embryonalen Stammzellen ist ethisch stark umstritten, da bei der Gewinnung von hESC Embryonen zerstört werden müssen (De Wert G et al. 2003). In Deutschland ist die Erzeugung von embryonalen Stammzellen verboten (Embryonenschutzgesetz).

- Wie bereits erwähnt, kann der Einsatz von undifferenzierten embryonalen Stammzellen zur Tumorentwicklung, z.B. zur Entwicklung von Teratomen und Teratokarzinome (Reubinoff et al. 2000, Wakitani et al. 2003), führen. Die Identifikation der zur Differenzierung nötigen Umgebungsfaktoren ist ein momentan viel beforschtes Feld, und zu einigen Differenzierungen gibt es auch vielversprechende Ergebnisse, allerdings verbietet sich die Applikation von hESC am Menschen, solange es hier keine sicheren Ergebnisse zum Ausschluss einer Tumorinduktion gibt.

- Kardiomyozyten, die aus murinen ESC gezüchtet wurden zeigten im Versuch ein deutlich arrhythmogenes Potential (Zhang et al. 2002). Die Gefahr der Induktion von Arrhythmien beim Einsatz von hESC zur Myokardregeneration ist also zu beachten.

- Beim Einsatz von embryonalen Stammzellen kann es wie bei jeder Fremdzelltherapie oder Organtransplantation zu einer Abstoßung des eingebrachten Fremdmaterials kommen. Die ESC tragen das MCH I (major histocompatibility complex) als Oberflächenantigen. Da diese vom Immunsystem des Empfängers als fremd erkannt werden, muss begleitend zur Stammzelltherapie eine immunsuppressive Therapie stattfinden. Allerdings wird angenommen, dass embryonale Stammzellen aufgrund ihrer geringen Immunogenität und ihrer hohen Plastizität keine so starken Immunreaktionen hervorrufen (Zavazava 2003). Stammzellen, die immunologisch mit dem Empfängerorganismus identisch sind, können nur durch therapeutisches Klonen gewonnen werden. Dies ist in Europa, mit Ausnahme von Großbritannien, verboten. Eine weitere Möglichkeit stellt der Einsatz von Zellen, die sich sowohl in Blutzellen als auch in das gewünschte Gewebe entwickeln, dar, da die Abstoßung durch die eingebrachten Blutzellen verringert wird (chimäres Immunsystem).

- Viele Differenzierungsverfahren müssen noch für den klinischen Einsatz etabliert werden.

- Ob sich die aus den ESC entstandenen Zellen in das Gewebe des Zielorgans integrieren, ist noch nicht hinreichend geklärt. Dies ist z.B. bei der Applikation von Kardiomyozyten in Herzgewebe von entscheidender Wichtigkeit für eine funktionelle Integration.

- Letztlich wird aber vor allem die Frage zu klären sein, wie und ob sich durch die Applikation von hESC in menschliches Gewebe eine funktionelle Verbesserung zeigt.

1.1.2 Adulte Stammzellen

Undifferenzierte Zellen, die in differenziertem Gewebe vorkommen, werden adulte oder somatische Stammzellen (ASC) genannt. Sie teilen sich lebenslang (Selbsterneuerung) und können fortlaufend proliferieren, andererseits beteiligen sie sich auch an der Gewebeneubildung. Erste Beschreibungen adulter

Stammzellen stammen aus dem Jahr 1966 von Luriia und Friedenstein (Luriia et al. 1966). Die Gruppe der ASC ist recht heterogen, und es ist noch unklar, inwiefern die verschiedenen adulten Stammzellen übrig gebliebene embryonale Stammzellen, die einen Teil ihres Differenzierungspotentials verloren haben, sind oder auseinander hervorgehen. Unterschieden werden sie anhand ihres Differenzierungsverhaltens und einer Reihe von Oberflächenmarkern in vitro. Man schätzt die Frequenz von HSC im Körper auf 1:10000 bis 1:15000 (Weissman 2000), daher ist es oft schwierig, sie zu isolieren und aufzureinigen. Außerdem neigen adulte Stammzellen in Kultur oft zur raschen Ausdifferenzierung, verlieren also ihr Stammzellpotential. Daher können zu Forschungszwecken oft nur frühe Zellpassagen verwendet werden.
Im Vergleich zu embryonalen Stammzellen haben diese gewebespezifischen adulten Stammzellen eine geringere Selbsterneuerungskapazität und können in viele, jedoch nicht alle Zelldifferenzierungslinien ausdifferenzieren.

1.1.2.1 POPULATIONEN ADULTER STAMMZELLEN

Hämatopoetische Stammzellen (HSC):
Hämatopoetische Stammzellen sind sehr gut erforscht, da sie schon seit mehr als 40 Jahren im klinischen Gebrauch sind (Becker et al. 1963). Sie sind pluripotent und über verschiedene Differenzierungsstufen besitzen sie die Fähigkeit, Blutzellen aller drei Blutzellarten zu bilden, wie z.B. Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten, T- und B-Lymphozyten, Plasmazellen und natürliche Killerzellen; in vivo teilen sie sich kontinuierlich.

HSC können auf drei verschiedenen Wegen gewonnen werden:

Klassischerweise werden HSC aus dem Knochenmark am Beckenkamm mittels Knochmarkspunktion gewonnen.
Sie können aber auch durch leukapheretische Aufreinigung aus dem peripheren Blut gewonnen werden. Dazu werden sie vorher mit Hilfe von Zytokinen wie dem „granulocyte-colony-stimulating–factor“ (G-CSF) oder dem „granulocyte-

macrophage-colony-stimulating-factor“ (GM-CSF) aus dem Knochenmark ins Blut mobilisiert, hier liegen sie dann in hoher Konzentration vor.
Außerdem können aus Nabelschnurblut HSC gewonnen werden; da die Hämatopoese beim Fetus noch zu einem großen Teil in der Leber stattfindet, zirkuliert beim Neugeborenen noch ein großer Teil an HSC im Blut. Diese Zellen sollen im Gegensatz zu Knochenmarkszellen eine größere Proliferationsrate zeigen (Kim et al. 1999). Zur Identifizierung der HSC werden verschiedene Oberflächenmarker herangezogen. Vor allem die Isolierung mittels des CD34-Markers hat sich bewährt. Außerdem exprimieren undifferenzierte HSC CD133 und Thy-1 (Miraglia et al. 1997, Peault et al. 1993).
Hämatopoetische Stammzellen werden bei einer Vielzahl an Malignomen und hämatologischen Erkrankungen eingesetzt (Bensch et al. 2003, Holmberg et al. 2003) und sind oft die einzige potentiell kurative Therapieoption.

Mesenchymale Stammzellen (MSC):

Eine weitere Population adulter Stammzellen stellen die mesenchymalen Stammzellen dar. Ihre Isolierung, die kurz nach der Isolierung der hämatopoetischen Stammzellen (Friedenstein et al. 1966, Friedenstein et al. 1970) gelang, erfolgt aus dem Knochenmark. Sie bleiben beim Ausplattieren von Knochenmark an der Bodenfläche haften. Sie können sich in Knochen, Knorpel, Fett und Bindegewebe differenzieren (Bianco et al. 2001, Pittinger et al. 1999) und über viele Passagen hinweg teilen. Die stark mitogen (Bianco et al. 1999) wirkenden Wachstumsfaktoren sind PDFG, EGF, bFGF und IFG. MSC exprimieren kein CD34.

Progenitorzellen:

MAPC (multipotent adult progenitor cells) scheinen bislang die einzig bekannte Population ASC zu sein, die das Kriterium der Pluripotenz erfüllen. So konnte bei einem Experiment mit Mäusen gezeigt werden, dass sich aus einer einzigen markierten MAPC alle drei Keimblätter bildeten (Jiang et al. 2002). Außerdem gelang die Differenzierung in funktionstüchtige hepatozytenähnliche Zellen (Schwartz et al. 2002). MAPC können über 70 Passagen kultiviert werden ohne

auszudifferenzieren. Außerdem besitzen sie die Fähigkeit, unter ischämischen Bedingungen zu Gefäßendothelzellen zu differenzieren und dadurch an einer Angiogenese teilzunehmen (Reyes et al. 2002). Allerdings zeigen neue Ergebnisse beispielsweise, dass es keinerlei Hinweis gibt, dass sich MAPC in Kardiomyozyten differenzieren können und dadurch zur Verbesserung von Herzerkrankungen beitragen könnten (Agbulut et al. 2006).
Ein weiterer wichtiger Vertreter aus der Gruppe der Progenitorzellen sind die Hämangioblasten (Endotheliale Progenitorzellen). Die im Knochenmark auftretenden Zellen besitzen die Fähigkeit, Blutgefäße und Endothel zu bilden und sind somit an der Vaskularisierung von Gewebe beteiligt (Asahara et al. 1997). Außerdem verbessern sie die Herzfunktion und verringern den Gewebeumbau (remodeling) nach Myokardinfarkt (Schuster et al. 2004).

Stammzellen, die in anderen Geweben gefunden werden konnten:

Im Gehirn: Erstmals konnten 1965 im Bulbus olfactorius und im Hippocampus postnataler Rattengehirne (Altman et al.1965, Altman 1969) neuronale ASC nachgewiesen werden. Auch im Gehirn von anderen Säugetieren fand man adulte Stammzellen (Johansson et al. 1999), diese können sich in alle drei Zelltypen, also Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone, entwickeln (Gage et al. 1995, McKay 1997, Momma et al. 2000, Shihabbudin et al. 1999, Temple et al. 1999).

Im Pankreas: Genfer Wissenschaftler fanden im Pankreas Zellen, die über lange Zeit in Kultur gehalten werden konnten, den neuronalen Stammzellmarker Nestin exprimieren (Zulewski et al. 2001) und sich in Insulin produzierende Zellen differenzieren können (Choi et al. 2004).

In der Leber: SCID-Mäusen wurden fetale humane Leberzellen implantiert und es konnte danach eine humane Hämatopoeseaktivität in den Mäusen nachgewiesen werden (Namikawa et al. 1990)

In Epithelien (Haut und Darmepithel): Hier dienen die Stammzellen zur Regeneration von untergegangenen Zellen bzw. Gewebe (Bianco et al. 2000, Slack 2000).

Satellitenzellen und Myoblasten des Skelettmuskels: Satellitenzellen liegen vereinzelt in der Basallamina von Muskelfasern vor und sind erstmals an Fröschen entdeckt worden. Zur Proliferation werden sie durch Verletzungsreize, Ischämie oder anderen Stimuli angeregt. Skelettmyoblasten stellen muskelständige Stammzellen dar, die sich zur Skelettmuskulatur differenzieren können.

Zellen der „side population": Diese aus Knochenmark oder Skelettmuskulatur isolierbaren Zellen können sich in die Muskulatur integrieren und Dystrophin bilden (Gussoni et al. 1999)

1.1.2.2 HÄMATOPOETISCHE UND MESENCHYMALE STAMMZELLEN UND IHR KLINISCHER EINSATZ

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen anscheinend an der Regeneration von Geweben und Organen beteiligt sind (Jiang et al. 2002, Lagasse et al. 2000, Orlic et al. 2001, Takahashi et al. 1999, Toma et al. 2002). Diese Fähigkeit basiert auf ihrer funktionellen Plastizität und darauf, dass sie sich in einem anderen Gewebe zu Zellen differenzieren können, die spezifisch für das neue Organ sind.

<u>Hämatopoetische Stammzellen:</u>
Klinisch fest etabliert ist die Therapie mit HSC zur Regeneration der normalen Hämatopoese nach myeloablativer Chemotherapie. 2000 zeigten Forscher aus Kalifornien, dass sich HSC in vivo in Hepatozyten differenzieren können (Lagasse et al. 2000). Dass sich murinen hämatopoetischen Stammzellen möglicherweise zu Kardiomyozyten entwickeln können, zeigte Donald Orlic im Jahr 2001 (Orlic et al. 2001a). Damit startete die intensive Beforschung der klinischen Anwendung

von HSC zur stammzellbasierten Zellersatztherapie insbesondere der kardio-vaskulären Zellersatztherapie.

Mesenchymale Stammzellen:

Mesenchymale Stammzellen nehmen aufgrund ihrer Vielzahl an Applikationsmöglichkeiten einen großen Teil der Stammzelltherapie ein.
MSC sind für ihre immunmodulatorischen Fähigkeiten (Aggerwal et al. 2005), die Fähigkeit die Hämatopoese zu steigern (Koc et al. 2001) und sich in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten zu differenzieren (Pittenger et al. 1999) bekannt. Berichte über die erste klinische Anwendung von MSC beinhalten die Reduktion von akuten und chronischen immunologischen Abstoßungsreaktionen (Aggerwal et al. 2005), die Wiederherstellung von Gewebedefekten bei aplastischer Anämie (Scopes et al. 2001), die erfolgreiche Behandlung von Osteogenesis imperfecta (Horwitz et al. 2002, Le Blanc et al. 2005), die Verwendung bei der Therapie der amyotrophen Lateralsklerose (Mazzini et al. 2006), die Fähigkeit dentale Strukturen zu regenerieren (Shi et al. 2005) und die Verbesserung der Herzfunktion nach Myokardinfarkt (Chen et al. 2004).
Ergebnisse von Tiermodellen zeigen mögliche neue Einsatzmöglichkeiten von MSC auf: etwa die Behandlung von Diabetes mellitus (Choi et al. 2005) und akutem Nierenversagen (Morigi et al. 2006).

1.2 Kardiovaskuläre Zellersatztherapie

Mit hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen:

Durch die Ergebnisse von Orlic 2001 (Orlic et al. 2001a), die zeigen, dass eine Unterpopulation von HSC in der Lage ist, sich zu Kardiomyozyten zu differenzieren und untergegangenes Herzgewebe bei der Maus zu regenerieren, ist der Einsatz autologer HSC zum Zellersatz in greifbare Nähe gerückt. Weiter zeigte Orlic am murinen Infarktmodell die Ausbildung von funktionstüchtigem Myokardgewebe inklusive Endothelzellen und Zell- zu Zell-Kontakten wie z.B. Desmosomen durch Knochenmarksstammzellen (Orlic et al. 2001b). Funktionell

ließ sich ebenfalls eine Verbesserung nachweisen, so nahm die Kontaktilität zu und der enddiastolische Druck im linken Ventrikel ab. Auch andere Forschungsgruppen beschrieben die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Kardiomyozyten im Tiermodell (Toma et al. 2002). Andererseits zeigen Ergebnisse anderer Forschungsgruppen von 2004 (Balsam et al. 2004, Murry et al. 2004), dass es keinerlei Evidenz dafür gibt, dass hämatopoetische Stammzellen in Kardiomyozyten differenzieren.

Trotz dieser kontroversen Ergebnisse begannen bereits 2001 klinische Studien mit der Erforschung der Sicherheit und Effizienz der kardiovaskulären Zellersatz-therapie bei Myokardinfarkt (Assmus et al. 2002, Kang et al. 2004, Stamm et al. 2003, Strauer et al. 2001, Wollert et al. 2004). Die Veröffentlichung von Strauer im Jahre 2002 (Strauer et al. 2002) konnte erstmals die von Orlic am Tiermodell gezeigten Ergebnisse anhand einer klinischen Studie mit zehn Probanden auch am Menschen nachvollziehen. Den zehn Patienten mit Myokardinfarkt wurden relativ unselektionierte humane Knochenmarksstammzellen appliziert. Nach drei Monaten zeigte eine Reihe von kardiologischen Untersuchungen (Radionuklidventrikulographie, Stressechokariographie, Koronarangiographie) eine Verbesserung der Herzfunktion und eine Verkleinerung der Infarktregion im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Eine weitere Studie mit 18 Probanden (Strauer et al. 2005) erzielte im Jahr 2005 ähnliche Ergebnisse und zeigte auch eine metabolische Verbesserung der Infarktregion, da der maximale Sauerstoff und der Glukosebedarf gesteigert waren. Ähnlich positive Ergebnisse beim Menschen erzielte auch eine Forschergruppe der Universität Frankfurt (Assmus et al. 2002, Schachinger et al. 2004). Diese Studie von Schachinger 2004 mit 60 Probanden zeigte nach sechs Monaten signifikante Verbesserungen der linksventrikulären Ejektionsfraktion, einen Rückgang der Wandbewegungsstörungen im Infarktareal und ein signifikant vermindertes endsystolisches linksventrikuläres Ventrikelvolumen. Allerdings zeigte eine Studie von 2006 (Meyer et al. 2006) aus Hannover, bei der erstmals der Benefit der Stammzelltherapie über 18 Monate gemessen wurde, dass sich signifikante Verbesserungen der linksventrikulären Ejektionsfraktion nur nach 3 bzw. 6 Monaten zeigen, nach 18 Monaten lässt sich jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Verbesserung mehr

feststellen. Lediglich die Geschwindigkeit, mit der die Verbesserung eintritt, war bei der Stammzellgruppe größer.

Therapie mit Myoblasten:

Bei einem Patienten mit chronisch ischämischer Herzerkrankung führte Menasche aus Paris die erste klinische Studie mit transplantierten Myoblasten durch (Menasche et al. 2001). Es konnte keine funktionelle Integration der Myoblasten ins Myokard nachgewiesen werden, allerdings verbesserte sich die Ventrikelfunktion nach kombinierter Bypass-Operation und Myoblastentransplantation. Im Langzeitverlauf zeigte sich 2006 weiterhin eine klinische funktionelle Verbesserung mit einer Verbesserung der Ejektionsfraktion (Hagege et al. 2006). Eine andere Forschungsgruppe konnte bei Versuchen mit Kaninchen eine funktionelle Verbesserung bei infarziertem Herzen feststellen (Taylor et al. 1998). Allerdings gibt es auch Stimmen, die die Differenzierung von Myoblasten zu Kardiomyozyten bezweifeln (Reinecke et al. 2002).

1.2.1 Limitationen der ASC bei der kardiovaskulären Stammzelltherapie

- Adulte Stammzellen sind im Körpergewebe nur in sehr geringer Frequenz vorhanden.

- Die Vermehrung in vitro ist aufgrund des eingeschränkten Proliferationspotentials und aufgrund der stattfindenden Differenzierung schwierig.

- Zur therapeutischen Applikation von gezielten Populationen adulter Stammzellen müssen diese Populationen noch genauer differenziert werden.

- Die Entwicklung eines arrhythmogenen Potentials ist ähnlich wie bei den embryonalen Stammzellen nicht auszuschließen.

- Die Integration ins Gewebe und die Differenzierung bzw. Transdifferenzierung adulter autologer Stammzellen beim Menschen ist bislang auf molekularer Ebene in vivo noch nicht erwiesen (Wiehe et al. 2006).

1.3 Fragestellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Voraussetzungen einer stammzell-basierten myokardialen Regeneration.

Orlic zeigte 2001 eine Transdifferenzierung muriner HSC zu Kardiomyozyten. Darauf folgend berichtete Strauer, nach Applikation von mononuklearen Knochenstammzellen bei Herzinfarktpatienten, von einer klinisch messbaren funktionellen Verbesserung. Davon ausgehend soll die vorliegende Arbeit dazu beitragen die Frage zu klären, ob humane CD34-positive HSC und/oder MSC das Potential besitzen, zu Kardiomyozyten auszudifferenzieren und bei der Gewebe-regeneration mitzuwirken.

Da nicht mit letztlicher Sicherheit bewiesen werden kann, dass es sich bei einer Zellpopulation um reine HSC handelt, wird daher im Folgenden von hämatopoetischen Progenitorzellen HPC gesprochen.

Zum besseren Verständnis der molekularen Mechanismen dieser Trans-differenzierung ist eine effiziente nicht-toxische Markierung der Zellen wünschens-wert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Nukleofektion der Zellen mit LNGFR eine hocheffiziente Markierungsmethode darstellt (Wiehe et al. 2006). Jedoch ist die Verbesserung der Transfektionseffizienz und -viabilität, um möglichst viele Zellen zu markieren, die dann vielleicht im menschlichen Körper detektiert werden können, nach wie vor von Interesse.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Transfektionsbedingungen für humane CD34-positive HPC durch Verwendung von in vitro transkribierter mRNA anstelle von Plasmid-DNA bezüglich Effizienz und Viabilität zu optimieren und das Verfahren auf humane mesenchymale Stammzellen zu übertragen. Hierfür wurde ein Vergleich zwischen der Nukleofektion der Zellen mit einerseits mRNA und andererseits Plasmid-DNA durchgeführt.

Folgende Fragen waren zu klären:

Im Vergleich zwischen der Transfektion mit mRNA oder Plasmid

Welche Transfektion erzielt die höheren Effizienzen?

Welche Transfektion erzielt die höheren Vitalitäten?

Wie lange bleiben die Zellen markiert? Wie ist die Kinetik der Transfektion?

2 Material und Methoden

2.1 Material und Geräte

2.1.1 Zellen

CD34-positive periphere Blutstammzellen	Abteilung für Transfusionsmedizin der Universität Ulm
Mesenchymale Vorläuferzellen	Abteilung für Transfusionsmedizin der Universität Ulm
Escherichia coli	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.2 Zellkultur (Grundmedium und Zusätze)

α-MEM-Medium	Gibco, Karlsruhe, D
RPMI 1640	PAA Laboratories Gmbh, Pasching, A
Fetales Kälber Serum (FCS)	HyClone, South Logan, USA
humanes rekombinantes SCF (stem cell factor)	R&D Systems, Wiesbaden, D
humanes rekombinantes IL-6 (Interleucin 6)	R&D Systems, Wiesbaden, D
humanes rekombinantes IL-3 (Interleucin 3)	R&D Systems, Wiesbaden, D

2.1.3 Antibiotika und Transfektionsmedien

Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Human CD34 cell Nucleofector™ Solution	Amaxa GmbH, Köln, D

2.1.4 Oligonukleotide

Alle Primer wurden bei MWG Biotech, München, D synthetisiert und lagen als Arbeitslösung mit einer Konzentration von 10pmol/µl in ddH_2O gelöst vor.

2.1.5 Nukleinsäuren

pVAX1	Invitrogen, Carlsbad, USA
pGEM4Z/EGFP/A64 Plasmid	wurde von Peter Ponsaerts, Universität Antwerpen, Belgien, zur Verfügung gestellt
PVXA/ΔLNGFR Plasmid	wurde im Labor kloniert

2.1.6 Antikörper

non conjungated purified mouse	Santa Cruz, Santa Cruz California, USA
anti-human NGF antibody	Santa Cruz, Santa Cruz California,USA
IgG_1 anti-mouse, PE-conjugated	Becton Dickinson, Heidelberg, D

2.1.7 Enzyme

RNAse Out	Invitrogen, Carlsbad, USA
DNAse	Cure Vac GmbH, Tübingen, D
Spe I	New England Biolabs, Frankfurt, D
Xho I	New England Biolabs, Frankfurt, D

2.1.8 Chemikalien

PBS	PAA Laboratories Gmbh, Pasching, A
EDTA	PAA Laboratories Gmbh, Pasching, A
Trypsin	Gibco, Karlsruhe, D
LiCl	Cure Vac GmbH, Tübingen, D

2.1.9 Verbrauchsmaterialie

Kultur-Schalen (12 Well Platten)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Flaschen	Greiner Bio-One Gmbh, Frickhausen, D
Sterifilter	Nalgene Nunc Int., Rochester, USA
Falcon-Zentrifugenröhrchen (50ml, 15ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Alliquots	Eppendorf, Hamburg, D

2.1.10 Verwendete Kits

Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden, D
T7-Opti-mRNA Kit	Cure Vac GmbH, Tübingen, D
Poly(A) Tailing Kit	Ambion, Huntingdon, UK

CliniMACS ™	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, D
Endofree Plasmid Maxi Kit	Quiagen, Hilden, D

2.1.11 Geräte

Biofuge primo R	Heraeus, Hanau, D
FACS-Callibur flow cytometer	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Hera Safe (Bench)	Heraeus, Hanau, D
Nucleofector™ transfector system	Amaxa Biosystems, Köln, D
ABI PRISM 310 capillary genetic analyzer	Applied Biosystems, Weiterstadt, D

2.1.12 HPC-Medium

RPMI 1640	90 ml
FCS	10 ml
SCF	100 ng/ml
IL-6	20 ng/ml
IL-3	10 ng/ml

2.1.13 MSC-Medium

αMEM-Medium	80 ml
FCS	20 ml

PS	2 ml

2.1.14 Materialien für die MSC-Charakterisierung

Die Charakterisierung der MSC wurde freundlicherweise von Dr.med Markus T. Rojewski der Abteilung Transfusionsmedizin der Universität Ulm übernommen. Die von ihm verwendeten Materialien und Geräte werden hier kurz aufgelistet:

αMEM-Medium	Cambrex, Verviers, B
20% hitzeinaktiviertes FBS	Gibco, Karlsruhe, D
Trypsin	Gibco, Karlsruhe, D
CD14 (M5E2), CD29 (HUTS-21), CD34 (518), CD44 (G44-26), CD45 (HI30), CD166 (3A6)	BD Pharming, Heidelberg, D
CD105 (SN6)	Biozol-Serotec, Eching, D
Adipogenic differentiation medium	Cambrex BioScience, Walkersville, USA
Chonrogenic differentation medium	Miltenyi, Bergisch Gladbach, D
Osteogenic differentation medium	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, D
Sencescent cell staining kit	SIGMA, Taufkirchen, D
Oil RedO solution	SIGMA, Taufkirchen, D
Alcain Blue/Nuclear	Fast Red sDako, Hamburg, D

Positiv geladene Plastikoberfläche	NUNC, Wiesbaden, D
BD FACSAria	BD, Immunocytometry Systems , Heidelberg, D

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultivierung (HPC und MSC)

Sowohl die CD34-positiven hämatopoetischen Progenitorzellen (hematopoietic progenitor cells, HPC) als auch die mesenchymalen Vorläuferzellen sind von der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universität Ulm zur Verfügung gestellt worden. Sämtliche verwendeten Zelllinien stammen von Patienten, die mittels einer Einverständniserklärung der Verwendung der Zellen für Forschungszwecke zugestimmt haben.

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden, um eventuelle Kontaminationen mit Bakterien, Pilzen und Hefen zu verhindern, unter sterilen Bedingungen und mit steril filtrierten Lösungen in einer Laminar-Flow-Werkbank durchgeführt.

Humane CD34-positive HPC wurden durch den Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF) in das periphere Blut stimuliert und leukaphäretisch isoliert und dann in flüssigem Stickstoff bei -180℃ kryokonserviert. Die immunomagnetische Selektion der CD34-positiven Zellen wurde mit Hilfe des CliniMACS^{TM} -Systems vollzogen.
Bei der durchflusszytometrischen Reinheitsuntersuchung mittels Phycoerythrin (PE)- konjungierten anti-CD34-Antikörpern zeigte sich eine Reinheit von mehr als 98% CD34-positiver Zellen für die HPC.
Die Zellen wurden in RPMI-Medium, dem 10% FCS, die Wachstumsfaktoren IL-3 (10 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml) und SCF (100 ng/ml) zugesetzt wurde, bei 37℃ ,5% CO_2 und in gesättigter Wasserdampfatmosphäre über den zu beobachtenden Zeitraum kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt und frische

Wachstumsfaktoren wurden zugegeben. Die Viabilität der Zellen wurde mittels Trypanblau-Färbung bzw. mittels Zählung bei der Durchflusszytometrie bestimmt.

Mesenchymale Vorläuferzellen (mesenchymal stem cell, MSC) wurden aus der Spongiosa von Femur oder Tibia dreier gesunder Spender gewonnen (Isolation der MSC aus dem tabekulären Maschenwerk nach Adhäsion an eine positiv geladene Plastikoberfläche durch die Abteilung für Transfusionsmedizin der Universität Ulm) und für 24 Stunden in αMEM-Medium, dem 20% hitzeinaktiviertes FBS zugesetzt wurde, gebracht. Für die Versuche wurden frühe Zellpassagen (Passage 2 bis Passage 4) verwendet. Nach 10 bis 14 Tagen wurden die Zellen mittels Trypsin abgelöst und mit einer Dichte von 100-300 Zellen/cm² ausplattiert. Die Zellen wurden im MSC-Medium, das zweimal die Woche gewechselt wurde, bei 37℃, 5% CO_2 und in gesättigter Wasserdampfatmosphäre über den zu beobachtenden Zeitraum kultiviert. Die Viabilität der Zellen wurde ebenfalls mittels Trypanblau-Färbung und der Zählung bei der Durchflusszytometrie bestimmt.

2.2.2 Plasmid Konstruktion

Der ΔLNGFR-Vektor wurde durch das Klonieren der extrazellulären bzw. transmembranösen Domäne der cDNA des trunkierten humanen LNGFR-Gens (ΔLNGFR) in den eukaryontischen pVAX1 Expressionsvektor generiert. Das ΔLNGFR 834 bp-Fragment wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Verwendet wurden der vordere Primer 5´gcgatgggggcaggtgccac-3´ und der reverse Primer 5´ctgtcagcagctgtccacctc-3´, der ein fehlerhaft induziertes Stop-Codon hinter der transmembranen Domäne von ΔLNGFR enthielt. Die korrekte Sequenz für die Einfügung wurde mittels einer Sequenzanalyse durch den ABI PRISM310 kapillarer genetischer Analysator ermittelt. Danach wurde das Vektor-Konstrukt in TOP-10 Zellen (Escherichia coli) transformiert und das Plasmid mit Hilfe des Endofree Plasmid Maxi Kit isoliert (Greiner et al. 2004).
Die Herstellung des Vektors wurde von Frau Dr. biol. hum. Juliane Wiehe, Abteilung Innere Medizin II, Universität Ulm, übernommen und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.2.3 In-vitro-Transkription

Zur Herstellung von mRNA wurde die Methode der In-vitro-Transkription gewählt. Zunächst werden die Vektorplasmide, die sowohl einen CMV-Promotor als auch eine Poly(A)-Sequenz enthalten, mittels eines Enzyms, das hinter der Poly(A)-Sequenzen schneidet, linearisiert. Dies geschah im Folgenden mit pGEM4Z/EGFP/A64-Plasmid mit Hilfe von Spe I und mit dem pVXA/ΔLNGFR-Plamid mit Hilfe von Xho I.
Mittels des Nucleotid Removal Kit (1 U/µl RNAse Out) folgte anschließend die Aufreinigung der linearisierten Vektoren, die als DNA-Schablonen für die eigentliche In-vitro-Transkription verwendet wurden.
Die Transkription selbst wurde mit Hilfe des T7-Opti-mRNA Kit, nach Herstellervorschrift, durchgeführt. Der 20 µl Ansatz für die 2 bis 3 stündige Inkubation bei 37℃ bestand aus 4 µl Nukleotid-Mix, 7 µl H_20, 4 µl linearisiertes Vektor-Produkt, 4µl Puffer (PBS) und T7 RNA-Polymerase. Die nun entstandene 5´mRNA wurde mittels der Zugabe von 1 µl DNAse 30 min bei 37℃ g ereinigt. Um einen Poly(A)-Schwanz an die mRNA von ΔLNGFR anzufügen, wurde das Poly(A) Tailing Kit verwendet. Der 100 µl Ansatz für diese Reaktion enthielt 20 µl DNAse, 36 µl H_2O, 20 µl EPAP Puffer, 10 µl $MnCl_2$, 10 µl ATP und 4 µl E-PAP und wurde eine Stunde bei 37℃ inkubiert.
Für die anschließende Fällung der mRNA für EGFP und ΔLNGFR wurde 50 µl LiCl zugegeben und 1 bis 2 Stunden bei -20℃ inkubiert. Danach wurde die Suspension bei 4℃ 15 min bei 14000 rpm pelletiert und nach Entfernen des Überstandes in 20 µl H_2O resuspendiert. Schließlich wurde nach Zugabe von 1 µl RNAse Inhibitor die mRNA-Konzentration mit Hilfe einer spektrophotometrischen Analyse OD_{260} bestimmt. Die mRNA wurde dann in 5 µl Aliquots bei -80℃ gelagert.

2.2.4 Transfektion

Als Transfektionsmethode wurde die Nukleofektion verwendet. Die Nukleofektion ist eine etablierte physikalische Gentransfermethode, bei der die Aufnahme von Fremd-DNA bzw. -mRNA in die Zielzellen mittels Applikation spezifischer elektrischer Impulse in einem spezifischen Puffersystem veranlasst wird. Die DNA

kann hierdurch nicht nur in die Zelle, sondern auch in den Zellkern gebracht werden.

Die Nukleofektion erfolgte nach dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll. Sowohl die CD34-positiven HPC als auch die MSC wurden in ein 50 ml Zentrifugations-Falcon gebracht und 5min bei 1250 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Zellen in humaner CD34 Cell Nuleofektor^{TM} Solution resuspendiert, ca. 2-3x10^6 der CD34 positiven HPC und 5x10^6 der MSC mit 100 µl Solution pro Versuch. Eine Transfektionsprobe setzte sich aus 100 µl Zellsuspension und 5 µg mRNA (ΔLNGFR oder EGFP) bzw. 2 µg Plasmid-DNA (ΔLNGFR oder EGFP) zusammen, außerdem wurde jeweils eine Leerprobe (mock) verwendet. Die Zellsuspensionen wurden in spezielle vom Hersteller mitgelieferte Nukleofektionsküvetten überführt und mit für die jeweiligen Zellen optimierten Transfektionsprogrammen, U-08 für CD34-positive HPC und C-17 für MSC, des Nukleofektions-Gerätes transfiziert. Nach der Nukleofektion wurden die Zellen möglichst schnell mit je 500 µl vorgewärmtem Kulturmedium gemischt und auf fünf Löcher (mRNA EGFP, Plasmid EGFP, mRNA LNGFR, Plasmid LNGFR, mock) einer 12-Loch-Kulturplatte verteilt, in die jeweils 1,5 ml Kulturmedium vorgelegt waren. Anschließend wurden die Zellen in gesättigter Wasserdampfatmosphäre inkubiert.

Zur Transfektion von ΔLNGFR-Plasmid wurde, wie beschrieben, der pVAX1-Vektor, der die trunkierte Form des LNGFR-Gens trug, verwendet. Die damit transfizierten Zellen exprimieren also die transmembrane und extrazelluläre Domäne des Rezeptors und waren dadurch mit Antikörpern nachweisbar. Signaltransduktion konnte aufgrund des Fehlens der intrazellulären Domäne nicht stattfinden.
Es wurden drei unabhängige Experimente mit je drei unabhängigen Spendern für jede Zellart durchgeführt.

2.2.5 Durchflusszytometrische Auswertung (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie (FACS) ist eine häufig verwendete Methode, um innerhalb eines Zellgemisches individuelle Zellen zu charakterisieren. Hierbei werden Zellen in einem Flüssigkeitshüllstrom (sheath fluid) einzeln nacheinander an einem Laserstrahl vorbeigeführt und die entstehende Lichtstreuung nach vorn (FSC, forward scatter) und zur Seite (SSC, side scatter) wird von Detektoren erfasst. Der „Forward Scatter“ ist in den gezeigten Diagrammen auf der x-Achse aufgetragen, welche die Ablenkung des Laserstrahls in seiner Einfallsrichtung angibt. Die individuelle Streuung gibt Aufschluss über die Oberflächenbeschaffenheit und Größe der untersuchten Zellen. Werden Zellen mit fluoreszierenden Oberflächenproteinen bzw. Zellen, die mit fluorochromgekoppelten Antikörpern markiert sind, eingesetzt, so können diese Zellen aufgrund der emittierten Fluoreszenz, die von den Detektoren aufgenommen und verrechnet wird, über die Expression von Oberflächenproteinen charakterisiert werden. Die sich so ergebende Fluoreszenzstärke ist auf der logarithmisch kalibrierten y-Achse aufgetragen.

In dieser Arbeit wurde sowohl die posttransfektionelle Expression von ΔLNGFR und EGFP in Plasmid-DNA nukleofizierten, mRNA nukleofizierten und mock transfizierten CD34-positiven HPC und MSC mittels Durchflusszytometrie nach Tag 1,3,6,8 und 10 bestimmt.
Zunächst mussten die adhärenten MSC mit Hilfe von Trypsin abgelöst werden, bei den nicht adhärenten CD34-positiven HPC ist dies nicht nötig.
Da die mit dem enhanced green fluorescent protein, EGFP, nukleofizierten Zellen bereits fluoreszierende Oberflächenproteine enthielten, mussten sie nicht weiter mit Antikörpern behandelt werden.
EGFP-transfizierte Zellen wurden lediglich bei RT für 5 min mit 1250 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde entfernt und das Pellet anschließend mit PBS gewaschen. Dann wurde die Zellsuspension nochmals 5 min bei 1250 rpm pelletiert und anschließend in 500 µl PBS aufgenommen.
Zur Detektion von ΔLNGFR müssten die Zellen mit Hilfe von Antikörpern fluorochrom markiert werden. Auch diese Zellen wurden zunächst bei RT 5 min

mit 1250 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und mit PBS gewaschen. Die wiederum gleichermaßen abzentrifugierten Zellen wurden dann mit 10 µl des erst Antikörpers, nicht konjugierter auf gereinigter monoklonaler anti-humaner mouse NGF-Rezeptor Antikörper, versetzt und 20 min bei RT inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschritte mit PBS und anschließende Zugabe von 3 µl zweit Antikörper, PE- konjugierter IgG_1-anti-mouse Antikörper. Nach einer weitern Inkubation von 20 min bei Dunkelheit wurden die Zellen noch zweimal mit PBS gewaschen und letztlich in 500 µl PBS resuspendiert.
Die FACS-Auswertung erfolgte mittels dem FACS-Calibur Flow Cytometer (Becton & Dickinson), das einen Argon-Ionen-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm eingebaut hat. Die Datenanalyse wurde mit der Cellquest Software Version 3.1 durchgeführt. Für die Messung der EGFP-markierten Zellen wurde Kanal FL1, der die grüne Farbe detektiert, und für die LNGFR-Markierung mittels PE-Antikörper der Kanal FL2 verwendet.

2.2.6 Charakterisierung von MSC

Die Charakterisierung der MSC wurde freundlicherweise von Dr. med. Markus T. Rojewski, Abteilung für Transfusionsmedizin Universität Ulm, übernommen.
Zur Differenzierung der Zellen wurden initial 25.000 bis 100.000 Zellen in verschiebbaren Flaschen ausgesät und die Differenzierung wurde mit Hilfe eines Mediums von Cambrex (osteogene und adipogene Differenzierung) oder von Miltenyi (chondrogene und osteogene Differenzierung), wie vom Herstellerprotokoll vorgeschrieben, induziert. Um die differenzierten Zellen zu erfassen, wurden die Zellen in 7% Paraformaldehyd fixiert. Weiter wurden Osteoblasten durch die alkalische Phosphatase-Aktivität markiert, die Differenzierung der Adipozyten wurde über die Färbung mit gesättigten Öl RedO Solution überprüft und die der Chondrozyten mittels Färbung durch Alcaline Blue; alles laut Herstellerprotokoll.
Der Alterungsprozess der Zellen wurde mittels der Messung der lysosomalen ß-Galactosidase-Aktivität detektiert, hierfür wurde das Senescent cell staining Kit verwendet.

Marker panel:

Alle Antikörper, die verwendet wurden, um die MSC zu charakterisieren beinhalten: CD3 (HIT3a), CD14 (M5E2), CD16 (3G8), CD29 (HUTS-21), CD34 (581), CD44 (G44-26), CD45 (HI30), CD37 (AD2), CD90 (5E10), CD146 (P1H12), CD166 (3A6) und CD253 (GA-R2).

Für die FACS-Analyse wurden 1.000.000 Zellen mit PBS gewaschen und für 20 min mit 20 µl Antikörper, als Gesamtvolumen 120 µL, inkubiert; mit Ausnahme von CD105, dort wurden nur 10 µl Antikörper verwendet. Anschließend wurden die Zellen ein weiteres Mal mit PBS gewaschen und wurde mittels FACS-Durchflusszytometrie (FACSDiva Software 4.1.2 des BD FACSAria) die relative Fluoreszenzintensität von 25.000 Zellen bestimmt.

Um zu bewerten, ob sich das Differenzierungspotential der Zellen nach Transfektion ändert, wurden MSC mit ΔLNGFR mRNA und mock transfiziert, wie bereits beschrieben, und anschließend mit anti-LNGFR-Antikörper markiert. Die FACS-Analyse zeigte eine Fluoreszenzanreicherung von bis zu 99,4% der LNGFR-transfizierten Zellen, mock-transfizierte Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Nicht transfizierte, transfizierte und markierte Zellen wurden untersucht. Da alle Versuchsreihen sich in Chondrozyten, Osteoblasten und Adipozyten differenzierten, zeigte sich, dass weder die Zellsplittung noch die Nukleofektion auf das Differenzierungspotential Einfluss nimmt.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl die Transfektionseffizienz als auch die Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen nach Transfektion bei CD34-positiven HPC und MSC untersucht. Dabei war der Vergleich zwischen mRNA-transfizierten und Plasmid-transfizierten Zellen von besonderem Interesse.

Die Arbeitsschritte seien hier im Überblick noch einmal kurz zusammengefasst.

Nach Isolierung der jeweiligen Zellen, CD34-positive HPC und MSC, wurden die Zellen pro Versuchsreihe mit ΔLNGFR Plasmid, ΔLNGFR mRNA, EGFP Plasmid, EGFP mRNA transfiziert. Zum Vergleich wurde jeweils ein Teil der Zellen als Leerprobe mock-transfiziert. Nach 1,3,6,8 und 10 Tagen wurde die Expression von ΔLNGFR und EGFP sowie die Vitalität der Zellen mittel FACS-Analyse bestimmt. Es wurden sowohl für CD34-positive HPC als auch für MSC drei unabhängige Versuchsreihen mit Proben von drei unabhängigen Spendern durchgeführt.

3.1 Effizienz der Transfektion

Optimierung der Nukleofektion:
Die Gen-Expression einer Zelle hängt vor allem von der Menge an produzierter mRNA in der Zelle ab. In früher durchgeführten Experimenten wurde das EGFP Expressions-Gen verwendet, um die Transfektionseffizienz in CD34-positiven HPC und MSC mittel Nukleofektion zu optimieren. Hierfür wurde die Transfektionseffizienz nach einem Tag mittels FACS-Analyse ermittelt. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da bereits bekannt war, dass die Genexpression nach 12 bis 24 Stunden ihr Maximum erreicht. Die Transfektionseffizienz war bei Gebrauch von 5 µg mRNA am höchsten und konnte auch mit größeren Mengen an mRNA nicht erhöht werden.

3.1.1 Transfektionseffizienz für die EGFP-Genexpression

Die Auswertung der Mittelung der Messreihen der transfizierten und mock-transfizierten CD34-positiven HPC und MSC (je n=3) ergab die in Abbildung 1 graphisch dargestellten Werte.

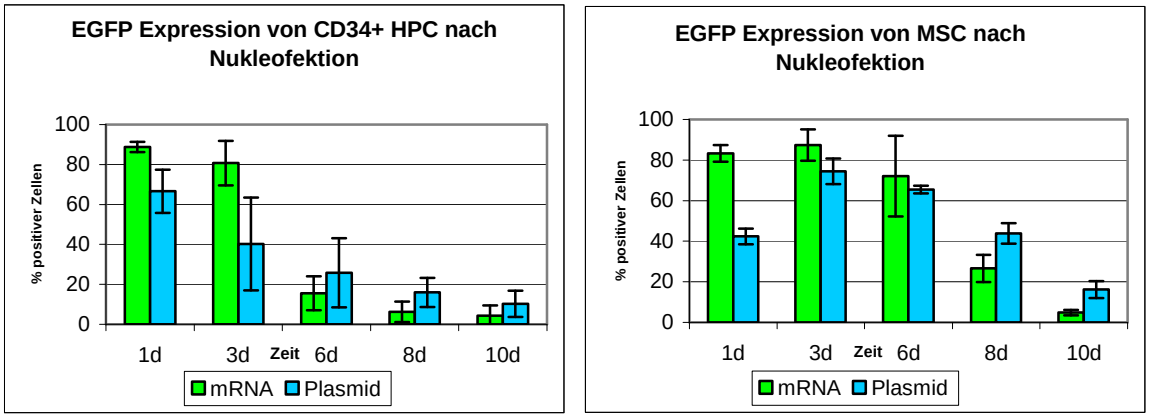


Abb. 1: Expressionseffizienz (n=3) mit Standardabweichung bei EGFP mRNA- und Plasmid-transfizierten hämatopoetischen Progenitorzellen (HPC) aus dem Blut und mesenchymalen Stammzellen (MSC) aus dem Knochenmark über einen Zeitraum von 10 Tagen (d).

EGFP: enhanced green fluorescent protein
mRNA: messenger ribonucleic acid

Am ersten Tag nach Nukleofektion exprimieren 89% der viablen CD34-positiven HPC- und 83% der viablen MSC-Zellfraktionen EGFP.
Die Expression nahm am dritten Tag auf 81% bzw. 87%, 16% oder 72% an Tag sechs, 6% oder 27% an Tag 8 und 4% bzw. 5% an Tag 10 ab.

Im Vergleich zwischen mRNA- und Plasmid-transfizierten Zellen zeigen sich vor allem initial Unterschiede. So war die EGFP-Expression mit mRNA am ersten Tag bei CD34-positiven HPC 89%, bei MSC 83%, im Vergleich zu 67% bzw. 42% bei Plasmid-transfizierten Zellen. Auch am dritten Tag zeigen sich ähnliche Werte. Am sechsten Tag sind die Transfektionseffizienzen sowohl bei mRNA-transfizierten als auch bei Plasmid-transfizierten Zellen ungefähr gleich, CD34-positive HPC mRNA 16% zu Plasmid 26%, MSC mRNA 72% zu Plasmid 65%. Nach zehn

Tagen nimmt die Genexpression auf vernachlässigbare Werte ab und es zeigt sich kein Unterschied mehr zwischen mRNA- und Plasmid-nukleofizierten Zellen.

Im Vergleich zwischen CD34-positiven HPC und MSC lässt sich feststellen, dass MSC ihr Expressionsmaximum erst am dritten Tag zeigen (mRNA EGFP 1 d 81%, 3 d 87%).
Auch der Abfall der Transfektionseffizienz am sechsten Tag lässt sich bei MSC erst am achten Tag feststellen, so ist die Expression von mRNA EGFP am sechsten Tag immer noch bei 72%, im Vergleich zu 16% bei HPC.

3.1.2 Transfektionseffizienz für die ΔLNGFR-Expression

Neben der EGFP-Expression wurde auch die Expression von ΔLNGFR bei CD34-positiven HPC und MSC (n=3) untersucht. Abbildung 2 zeigt die graphisch dargestellten Werte. Um auszuschließen, dass die Zellen auch ohne Transfektion ΔLNGFR exprimieren, wurden die mock-transfizierte Zellen ebenfalls gefärbt und es zeigten sich keine ΔLNGFR-positiven Zellpopulationen.

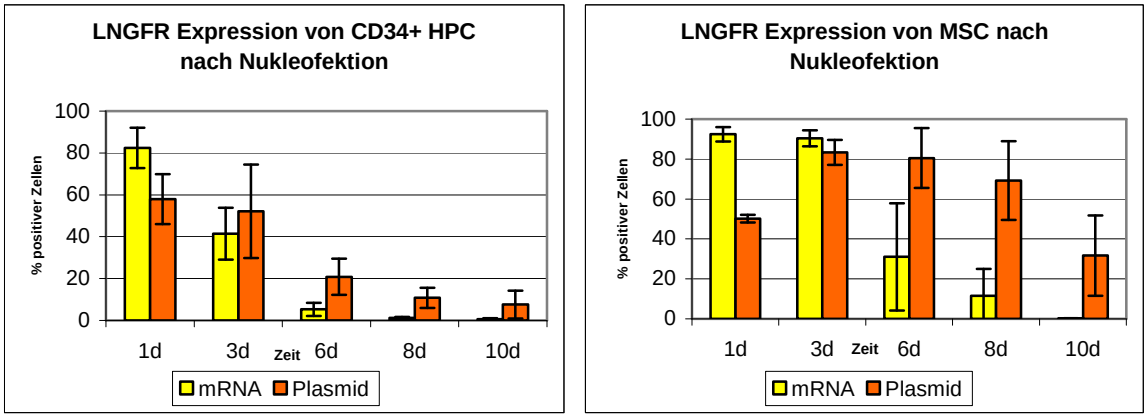


Abb. 2: Expressionseffizienz (n=3) mit Standardabweichung bei ΔLNGFR mRNA- und Plasmid-transfizierten hämatopoetischen Progenitorzellen (HPC) aus dem Blut und mesenchymalen Stammzellen (MSC) aus dem Knochenmark über einen Zeitraum von 10 Tagen (d).

ΔLNGFR: delta low affinity nerve growth factor receptor
mRNA: messenger ribonucleic acid

Am ersten Tag nach Nukleofektion exprimieren 83% der viablen CD34-positiven HPC und 92% der viablen MSC-Zellfraktion ΔLNGFR.
Im Vergleich zwischen mRNA- und Plasmid-transfizierten Zellen zeigen sich ebenfalls intial Unterschiede. Die ΔLNGFR-Expression bei mRNA-transfizierten CD34-positiven HPC lag bei 83% und bei MSC bei 92% im Vergleich zu 58% bzw. 50% bei Plasmid-transfizierten Zellen. Auch hier kommt es zu einem starken Abfall der Effizienz am sechsten Tag (HPC ΔLNGFR 6 d mRNA 5%, Plasmid 21%). Dieser Abfall der Transfektionseffizienz am sechsten Tag ist bei MSC wiederum nicht nachweisbar (Plasmid ΔLNGFR 6 d HPC 21%, MSC 82%). Auch bei ΔLNGFR-transfizierten Zellen zeigte die MSC ihr Expressionsmaximum erst am dritten Tag (MSC ΔLNGFR Plasmid 1 d 50% 3 d 83%).

Im Vergleich zur EGFP-Genexpression war die Expression von ΔLNGFR aber nur bis zum sechsten Tag gut messbar (mRNA ΔLNGFR 8 d 1,3%, 10 d 0,6%).

3.1.3 Überblick Transfektionseffizienzen

Zur besseren Übersicht sind die Transfektionseffizienzen der vier Versuche hier noch einmal zusammen aufgeführt:

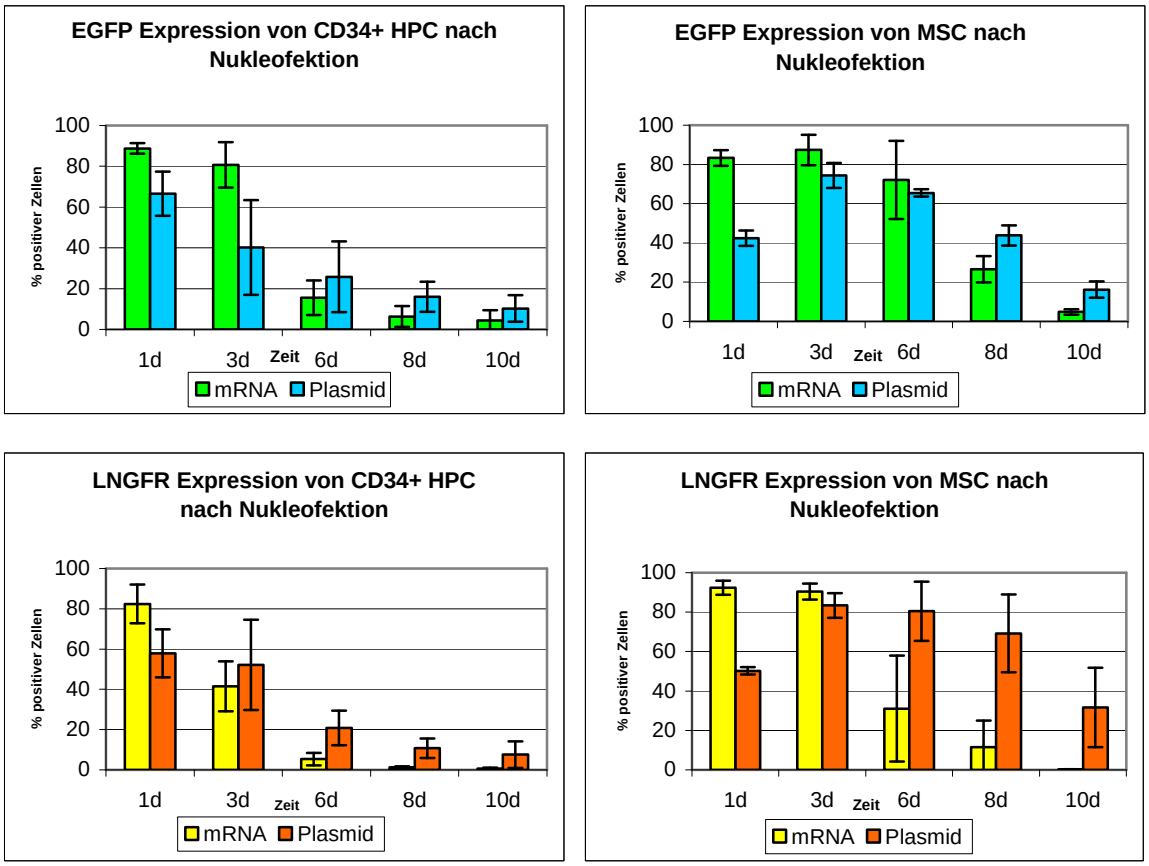


Abb. 3: Gegenüberstellung der Expressionseffizienzen (n=3) mit Standardabweichungen bei EGFP mRNA- und Plasmid-transfizierten und ΔLNGFR mRNA- und Plasmid-transfizierten hämatopoetischen Progenitorzellen (HPC) aus dem Blut und mesenchymalen Stammzellen (MSC) aus dem Knochenmark über einen Zeitraum von 10 Tagen (d).

EGFP: enhanced green fluorescent protein
ΔLNGFR: delta low affinity nerve growth receptor
mRNA: messenger ribonucleic acid

3.2 Viabilität der Zellen nach Transfektion

Wie bereits erwähnt wurde die Viabilität der Zellen ebenfalls am 1,3,6,8 und 10 Tag mittels FACS-Analyse bestimmt, hierbei wurden immer 10000 Zellen gezählt und der prozentuale Anteil der Zellen mit Genexpression von EGFP bzw. ΔLNGFR bestimmt.
Die Gegenüberstellung von mRNA- und Plasmid-transfizierten und mock-transfizierten Zellen kann dazu genutzt werden, etwaige negative Auswirkung der mRNA oder des Plamid-Vektors abzuschätzen.

3.2.1 Viabilität der Zellen nach Transfektion mit EGFP

Die Auswertung der Mittelung der Messreihen EGFP-transfizierten bzw. mock-transfizierten CD34-positiven HPC und MSC (je n=3) ergab folgende in der Abbildung 4 graphisch dargestellten Werte.

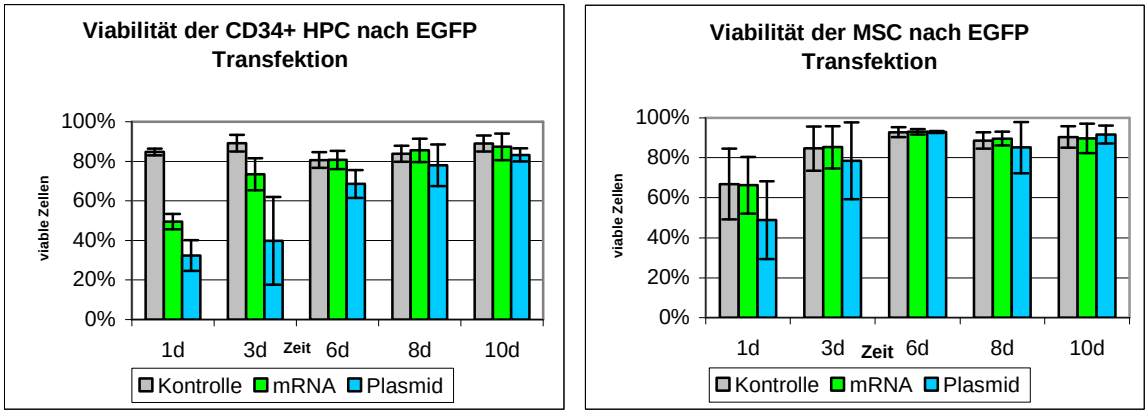


Abb. 4: Gegenüberstellung der Vitalitätsdurchschnittswerte (n=3) mit Standardabweichung von mock-transfizierten, EGFP mRNA- und EGFP Plasmid-transfizierten hämatopoetischen Progenitorzellen (HPC) und mesenchymalen Stammzellen (MSC) über einen Zeitraum von 10 Tagen (d).

EGFP: enhanced green fluorescent protein
mRNA: messenger ribonucleic acid

Bei mock-transfizierten CD34-positiven HPC kommt es am ersten Tag nach Nukleofektion zu einem Abfall der Vitalität um 15,3%. Im Vergleich dazu zeigen mRNA-transfizierte HPC einen Zellverlust von 50,5% und Plasmid-transfizierte HPC einen Vitalitätsabfall von 67,6%.

Bei MSC zeigt sich ein ähnliches Bild, 66,8% der mock-transfizierten, 66,3% der mRNA-transfizierten und 48,8% der Plasmid-transfizierten Zellen sind am ersten Tag nach Transfektion noch viabel.

Im zeitlichen Verlauf erholen sich die Zellpopulationen jedoch, so dass ab dem sechsten Tag keine nennenswerten Unterschiede hinsichtlich der Vitalität von mock-transfizierten, mRNA- oder Plasmid-transfizierten Zellen mehr zu erkennen sind.

Im Vergleich zwischen mRNA- und Plasmid-Transfektion zeigen sich wiederum vor allem initial Unterschiede. Während der Zellverlust bei mRNA-transfizierten Zellen bei 50% für HPC bzw. 34% für MSC liegt, zeigt sich bei Plasmid-transfizierten Zellen ein Vitalitätsabfall von 68% für HPC und 51% für MSC.

Es lässt sich ebenfalls feststellen, dass die Viabilitäten bei MSC durchwegs höher sind als die bei vergleichbar transfizierten CD34-positiven HPC.

3.2.2 Viabilität der Zellen nach Transfektion mit ΔLNGFR

Abbildung 5 zeigt die graphische Auswertung der mit ΔLNGFR mRNA und Plasmid transfizierten bzw. mock-transfizierten Messreihen (n=3).

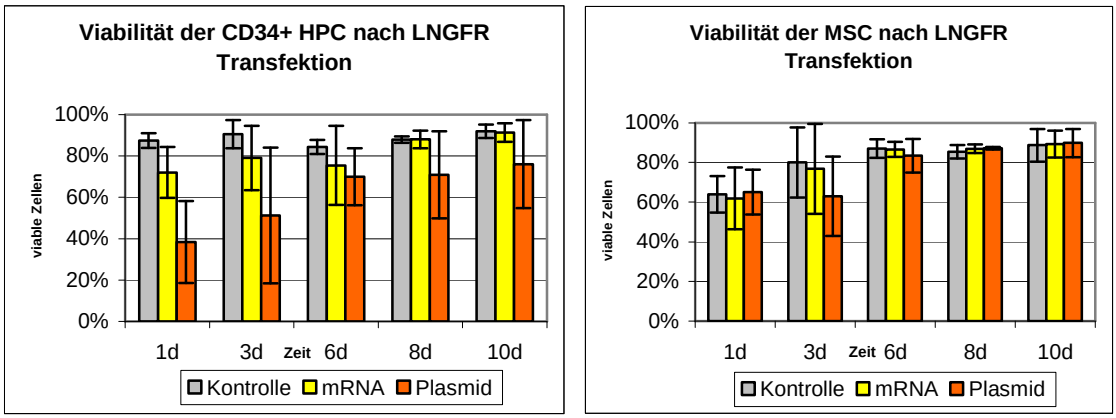


Abb. 5: Gegenüberstellung der Vitalitätsdurchschnittswerte (n=3) mit Standardabweichung von mock-transfizierten, ΔLNGFR mRNA- und ΔLNGFR Plasmid-transfizierten hämatopoetischen Progenitorzellen (HPC) und mesenchymalen Stammzellen (MSC) über einen Zeitraum von 10 Tagen (d).

ΔLNGFR: delta low affinity nerve growth receptor
mRNA: messenger ribonucleic acid

Auch hier zeigt sich zunächst ein Viabilitätsverlust, so sind am ersten Tag nach Nukleofektion 87,5% der mock-transfizierten, 72% der mRNA-transfizierten und 38,4% der Plasmid-transfizierten CD34-positiven HPC viabel.

Bei den MSC zeigen sich am ersten Tag nach Nukleofektion 63,9% der mock-transfizierten, 61,9% der mRNA-transfizierten und 65,1% der Plasmid-transfizierten Zellen viabel.

Nach sechs Tagen sind jedoch auch bei Transfektion mit ΔLNGFR kaum mehr unterschiede zwischen mock-, mRNA- und Plasmid-transfizierten Zellen erkennbar.

Im Vergleich zwischen mRNA und Plasmid sind bei CD34-positiven HPC die Unterschiede wiederum vor allem am ersten und dritten Tag nach Nukleofektion nachweisbar (Zellverluste von 12,5% bei mock-transfizierten, von 28% bei mRNA-transfizierten und von 61,6% bei Plasmid-transfizierten Zellen ΔLNGFR 1 d).

Bei den MSC sind hingegen auch am ersten Tag nach Nukleofektion kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchen zu erkennen.

Im Vergleich zwischen den Vitalitäten der EGFP-transfizierten und ΔLNGFR-transfizierten Messreihen zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede.

3.2.3 Übersicht Vitalitäten

Zur besseren Übersicht sind hier noch einmal alle Vitalitäten nach Transfektion zusammen dargestellt:

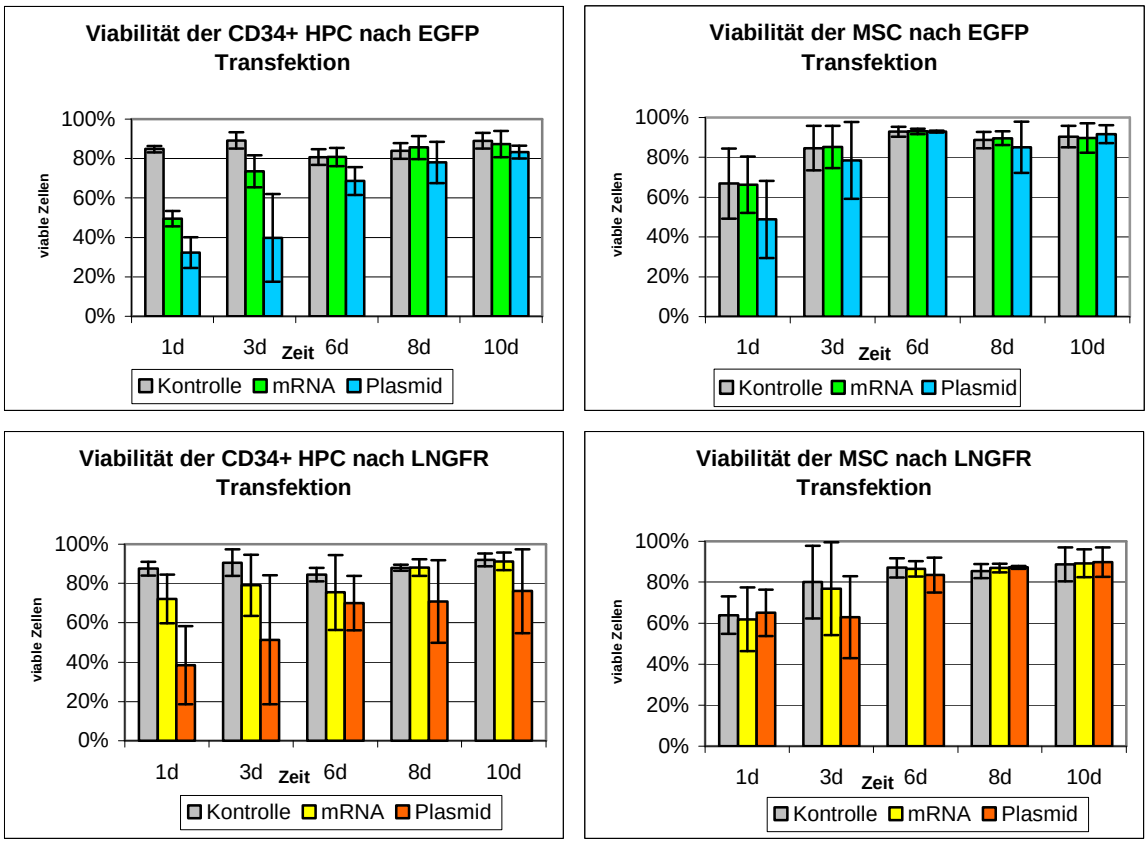


Abb. 6: Gegenüberstellung der Vitalitätsdurchschnittswerte (n=3) von mock-transfizierten, EGFP mRNA- und EGFP Plasmid-transfizierten sowie ΔLNGFR mRNA- und ΔLNGFR Plasmid–transfizierten hämatopoetischen Progenitorzellen (HPC) und mesenchymalen Stammzellen (MSC) über einen Zeitraum von 10 Tagen (d).

EGFP: enhanced green fluorescent protein
ΔLNGFR: delta low affinity nerve growth receptor
mRNA: messenger ribonucleic acid

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Transfektionseffizienz für die Nukleofektion in vitro mit mRNA und Plasmid in CD34-positive HPC und MSC untersucht. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Markierung mittels mRNA- bzw. Plasmid-Transfektion Einfluss auf die Vitalität der Zellen nimmt und wie lange die EGFP- und ΔLNGFR-Rezeptoren in transfizierten Zellen exprimiert werden, d.h. wie lange die Zellen markiert bleiben und nachgewiesen werden können. Von besonderem Interesse war bei den genannten Punkten der Vergleich zwischen mRNA-transfizierten und Plasmid-transfizierten Zellen.
Die Markierung bzw. ihre Optimierung soll in klinischen in vivo Studien dazu beitragen, das *Homing*potential der Zellen, also das Potential sich gezielt in einem Gewebe anzusiedeln, und das Potential zur Ausdifferenzierung in Kardiomyozten zu untersuchen. Mittelfristig soll dies zur Erforschung und Etablierung einer Zellersatztherapie bei kardiovaskulären Erkrankungen, im Speziellen der Regeneration des Gewebes nach Myokardinfarkt bzw. der Therapie der dilatativen Kardiomyopathie dienen.

4.1 Die Stammzellen: CD34-positive hämatopoetische Progenitorzellen und mesenchymale Stammzellen

4.1.1 CD34-positive hämatopoetische Progenitorzellen

CD34-positive Zellen werden in der Hämatologie und der Onkologie schon seit Jahren klinisch eingesetzt und sind gut etabliert, so z.B. bei der Therapie von Lymphomen und Leukämien (Döhner et al. 2000, Harousseau et al. 1995). Der Oberflächenmarker CD34 für HSC ist bereits 1989 durch Sutherland beschrieben worden (Sutherland et al. 1989) und wird bis heute als Markerprotein zur Selektion hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark und aus dem peripheren Blut verwendet. Auf diese vorhandenen Separationssysteme kann auch beim Einsatz der Zellen bei kardiologischen Patienten zurückgegriffen werden. Eine

Ausbildung von Teratomen oder Tumoren beim Einsatz von CD34-positiven HPC ist nie beschrieben worden und daher auch nicht zu erwarten. Die Erkenntnis, dass CD34-positive hämatopoetische Stammzellen nicht nur Zellen des Blutsystems sind, sondern wahrscheinlich auch in Kardiomyozyten ausdifferenzieren können (Orlic et al. 2001a), die im murinen Modell infarziertes Myokardgewebe teilweise zu regenerieren vermochten, lässt darauf schließen, dass dies vielleicht auch am Menschen möglich ist. Daher wurden die CD34-positive HPC für diese Versuche ausgewählt. Allerdings konnten auch Zellen beschrieben werden, die dieselben Stammzelleigenschaften besitzen, jedoch nicht das CD34-Antigen (Dao et al. 2000, Osawa et al.1996); Potential und Nutzung dieser Zellen sind jedoch noch unbekannt. Es zeigt aber, dass noch nicht alle Subpopulationen an hämatopoetischen Stammzellen mit ihren Eigenschaften bekannt sind, auch ihre Oberflächenmarker sind nicht einheitlich genau beschrieben. Daher bieten sich die bereits erforschten und klinisch etablierten CD34-positive HPC am besten für die bereits beschriebenen Versuche an.

4.1.2 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen wurden bereits 1966 isoliert (Friedenstein et al.1966) und sind heute aus der Stammzelltherapie bzw. der Erforschung dieser nicht mehr wegzudenken. MSC sind multipotent und zeigen daher eine enorme Bandbreite an Einsatzmöglichkeiten. Wie bereits erwähnt sind sie für ihre immunmodulatorischen Eigenschaften (Aggerwal et al. 2005) ihre Fähigkeit die Hämatopoese zu steigern (Koc et al. 2001) und in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten zu differenzieren (Pittenger et al. 1999) bekannt, um nur ein paar der vielen Einsatz-möglichkeiten zu nennen. MSC können von einer Vielzahl an Geweben, wie Knochenmark, Nabelschnurblut, Fettgewebe und Zahnfleisch, durch die Adhäsion an eine Plastikoberfläche einfach und schnell gewonnen werden. Eine ex vivo Expansion in großer Zahl, die für manche therapeutischen Verfahren nötig ist, ist hier jederzeit möglich. Auch bei diesen seit mindestens zehn Jahren etablierten Zellen ist niemals über die Entstehung von Teratomen oder Tumoren berichtet worden.

Aufgrund ihrer Multipotenz, also auch der Fähigkeit in Kardiomyozyten auszudifferenzieren, ihrer langen Etablierung in der Stammzellforschung und der neusten Forschung an der Regeneration von Myokardgewebe (Chen et al. 2004) sind diese Zellen ebenfalls für diese Versuchsreihen geeignet.

4.2 Markierungen der Stammzellen

Es wurde bereits eine Vielzahl von Anstrengungen unternommen um das Schicksal der markierten Stammzellen in vivo zu erforschen. MSC wurden z.B. mittels retroviraler Gentransduktion mit dem EGFP-Gen markiert und in Paviane transplantiert. Sie konnten auf eine Vielzahl von Geweben verteilt gefunden werden (Devine et al. 2003). Nicht invasive Bildgebung mittels Radionukliden zeigt sich auch in der Lage, die dynamische Verteilung der MSC im Körper darzustellen (Kraitchman et al. 2003), aber leider nicht ihr weiteres Schicksal, d.h., inwiefern die Zellen ausdifferenzieren.
Mit der zunehmenden Bedeutung von HPC und MSC in der Gen- bzw. Zellersatztherapie gibt es für den klinischen Gebrauch einen starken Bedarf an sicheren, effektiven und nicht viralen Gentransfer-Methoden. Jedoch gibt es hier eine Reihe von Problemen, so birgt die virale Vektortransduktion die Gefahr der Induktion von Tumoren (Li et al. 2002) und/oder der nichtspezifischen Integration in das Genom (Baum et al. 2003,Hacein-Bey-Abina et al. 2003), wohingegen andere nicht virale Transfektionsmethoden oft sehr niedrige Effizienzen zeigen (Li et al. 2001). Elektroporation von CD34-positiven HPC z.B. erzielt nur eine Transfektionseffizienz von 20-25% (Weissinger et al. 2003, Wu et al. 2001, Wu et al. 2001) und Lipofektion gilt als ineffizient (Lundqvist et al. 2002, Van Tendeloo et al. 1998). Die Nukleofektion wurde bereits als eine schnelle, hocheffiziente und vor allem sichere Methode zur Markierung von HPC beschrieben (Greiner et al. 2004).
Die essentiellen Vorteile der Nukleofektion sind: Im Gegensatz zu viralen Transduktion ist diese Methode transient, d.h., eine Integration in das Genom der Zellen ist nicht nötig und damit ist das Risiko der Induktion von Tumoren gering. Außerdem ist die Nukleofektion im Gegensatz zu anderen Transfektionsmethoden

hocheffizient (Greiner et al. 2004, Wiehe et al. 2006). Weiter konnte gezeigt werden, dass die Markierung mittels Nukleofektion das Ausdifferenzierungspotential der Zellen und ihre Vitalität nicht nennenswert beeinflusst (Wiehe et al. 2006), die Zellen behalten ihre physiologischen Eigenschaften.
Dennoch besteht nach wie vor der Bedarf diese Methode zu optimieren um möglichst viele Zellen zu markieren.

4.2.1 Effizienz der Markierung

Im Vergleich zwischen mRNA- und DNA-Transfektion ist die mRNA überlegen. Dies stimmt mit vorausgehenden Berichten überein, die gezeigt haben, dass die Genexpression bei mRNA-Transfer mittels Elektroporation oder Nukleofektion im Vergleich zur DNA-Transfektion deutlich besser ist (Martinet et al. 2003, Van de Parre et al. 2005, Van Tendeloo et al. 2001).
mRNA ist ein normaler Bestandteil der Zelle und dringt nicht in den Zellkern ein, sondern kann im Zytoplasma direkt zur Translation der Proteinbiosynthese verwendet werden. Daher ist ihre Halbwertszeit auch geringer als bei DNA, die zunächst im Kern in mRNA transkribiert werden muss und dort nicht verbraucht wird, sondern theoretisch unendlich oft die Induktion zur Proteinbiosynthese geben kann. Die Notwendigkeit des Eindringens in den Kern und die Transkriptions-regulation, die etwa mit der Plasmid-DNA verbunden ist, wird also vermieden und daher ist die mRNA-Transfektion auch eine valide Alternative zur nicht viralen Genübertragung (Kariko et al.1998, Lu et al. 1994, Sawai et al. 1998).
Im Unterschied zur EGFP-Transfektion ist der ΔLNGFR-Marker nur bis zum sechsten Tag effizient nachweisbar, dies ist auf die unterschiedliche Stabilität der exprimierten Markergene zurückzuführen. Es zeigt wie wichtig die Auswahl der Markerproteine, die für die mRNA-Transfektion verwendet werden, ist. Neuste Studien haben aber gezeigt, dass die Genexpression nach mRNA-Transfektion auch einige Tage andauert (Van Tedeloo et al. 2001).
Bei genauerer Betrachtung zeigt vor allem am ersten Tag nach der Nukleofektion die stärksten Unterschiede; so exprimieren mRNA- transfizierte CD34-positive HPC EGFP zu 89% im Gegensatz zu 67% der Plasmid- transfizierten Zellen, bei

der LNGFR-Expression zeigen sich ähnliche Werte. Da es sich um eine transiente Transfektion handelt, nehmen die Werte im zeitlichen Verlauf kontinuierlich ab, jedoch bleibt zumindest bis zum sechsten Tag der Unterschied zwischen der mRNA-Transfektion und der Transfektion mit Plasmid nachweisbar, z.B. EGFP 3 d mRNA 81% Plasmid hingegen 40%. Ab dem sechsten Tag ist die Expression bei beiden Verfahren jedoch nicht mehr relevant nachweisbar und daher auch der Unterschied zwischen mRNA- und Plasmid-Transfektion nicht (mRNA LNGFR 8 d 1,3%, Plasmid LNGFR 8 d 10,8%). Die Werte für die mRNA-transfizierten Zellen fallen im zeitlichen Verlauf etwas stärker ab, was jedoch auf die geringere Halbwertszeit der mRNA zurückzuführen ist.

Interessanterweise zeigen die transfizierten MSC eine davon abweichende Kinetik. Hier ergibt sich das Expressionsmaximum erst am dritten Tag, so z.B. EGFP-Plasmid 1 d 49%, 3 d 79%. Ansonsten entspricht die Kinetik jedoch der der CD34-positive HPC und auch hier zeigt die mRNA-Transfektion höhere Werte. Ein möglicher Grund für diese unterschiedliche Kinetik ist, dass es durch die Mobilisierung der MSC aus dem Knochenmark ins Blut zu einer Vorselektion kommt, die dazu führt, dass dort der Anteil der Zellen, die gut auf Wachstums-faktoren reagieren, sehr hoch ist. Diese Zellen haben möglicherweise, dadurch dass sie sich in einem anderen Reifestadium befinden, ein höheres Proliferations-potential als die knochmarkständigen Stammzellen.

Außerdem zeigen die MSC im zeitlichen Verlauf eine starke Expression der Plasmid-transfizierten Zellen, so z.B. LNGFR 6 d 81%, 8 d 69%, 10 d 32% zu mRNA-transfizierten Zellen LNGFR 6 d 31%, 8 d 11%, 10 d 0,1%. Trotz der Überlegenheit der mRNA am ersten und dritten Tag zeigt sich hier im zeitlichen Verlauf eine stärkere Expression durch die Plasmid-markierten Zellen, dies könnte bei Markierungsmethoden, bei denen mehr der Zeitraum als die hohe Effizienz der Markierung von Bedeutung ist, von Vorteil sein. Welchen Hintergrund diese Abweichung der Expressionskinetik bei MSC, im Vergleich zu CD 34+ HPC hat, ist noch unbekannt.

Allerdings lässt sich aufgrund der geringen Anzahl der Messreihen (n=3), die auf der eingeschränkten Verfügbarkeit der Stammzellen zu Forschungszwecken begründet ist, keine effektive und endgültige Aussage zur effektivsten

Transfektionsmethode und ihrer genauen Kinetik machen. Auch signifikante Unterschiede in der Effizienz zwischen den Nukleofektionsmethoden ließen sich nur bei 8 Versuchen verifizieren, jedoch immer für Tag 1. Die alternative Möglichkeit die Zellen mittels viraler Transduktion zu markieren bringt, wie schon mehrfach beschrieben, die Gefahr mit sich Tumore zu induzieren.
Letztlich lässt sich wohl festhalten, dass die Nukleofektion mit mRNA zumindest initial der Nukleofektion mit Plasmid überlegen ist.

4.2.2 Einfluss der Transfektion auf die Vitalität

Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass die Transfektion mit der Methode der Nukleofektion die Vitalität der Zellen vor allem in den ersten 84 h beeinflusst, danach erholen sich die Zellen jedoch wieder und es ist kein signifikanter Zelltod mehr vorhanden (Greiner et al. 2004). Der genaue Mechanismus der Zellschädigung ist unbekannt, es wird jedoch angenommen, dass eine Induktion der Apoptose und das osmotisch bedingte Anschwellen der Zellen zum Zelluntergang führen (Greiner et al. 2004). Daher konnte auch in den Versuchen der vorliegenden Arbeit von einem anfänglichem Vitalitätsverlust der Zellen nach Nukleofektion ausgegangen werden, was sich daran zeigt, dass auch die mock-transfizierten Zellen einen Vitalitätsverlust hatten. In der Frage, ob die mRNA oder der Plasmid-Vektor eventuelle toxische Effekte auf die Vitalität der Zellen haben, zeigte sich, dass sowohl die Transfektion mit mRNA als auch mit Plasmid im zeitlichen Vergleich zu mock-transfizierten Zellen keinen nennenswerten Zelltod induzieren. Im Vergleich zu Plasmid-transfizierten Zellen zeigen mRNA-transfizierte Zellen höhere Vitalitäten. Da mRNA im Gegensatz zu Plasmid-DNA einen normalen Zellbestandteil darstellt, ist sie auch weniger toxisch.
Anfänglich zeigen sich leichte Unterschiede, hier z.B. für CD34-positive HPC LNGFR am ersten Tag ein Vitalitätsverlust von 15% der mock-transfizierten Zellen im Gegensatz zu 50% der mRNA-transfizierten und 68% der Plasmid-transfizierten Zellen. Am sechsten Tag haben sich die Zellen jedoch erholt und es waren keine Unterschiede zwischen den drei Versuchsreihen mehr festzustellen. Als wichtiger Vorteil in der klinischen Anwendung gilt außerdem die Tatsache, dass die mRNA nicht die Fähigkeit besitzen sich in das Empfängergenom zu

integrieren; hierbei werden Sicherheitsvorrichtungen umgangen und Tumor-suppressorgene ausgeschaltet oder Tumorenhancergene aktiviert (Lu et al. 1994, Ying et al.1999)
Es ließen sich jedoch Unterschiede bei den anfänglichen Vitalitäten zwischen HPC und MSC erkennen. So zeigen CD34-positive HPC stärkere Unterschiede zwischen mock-, mRNA- und Plasmid-transfizierten Zellen, bei MSC lassen sich jedoch schon am ersten Tag kaum Unterschiede in den Vitalitätsverlusten feststellen. So zeigten MSC am ersten Tag für LNGFR z.B. Vitalitäten von 64% für mock-, 62% für ΔLNGFR mRNA- und 65% für ΔLNGFR Plasmid-transfizierte MSC am ersten Tag. Auch hier ist der Grund noch unklar.

4.3 Die genetische Markierung

Die Anforderungen, die an einen genetischen Marker gestellt werden, sind vielfältig.
Die Markierung sollte

- einfach durchführbar sein
- effizient sein, also die Zielzelle effizient markieren
- nach der Markierung leicht zu detektieren sein
- keine toxische Wirkung auf die Zielzelle haben
- sich in klinischen Studien bewährt haben.

Ob eine transiente oder stabile Markierung der Zellen durchgeführt wird, ist von der gewünschten Dauer, in denen die Zellen detektiert werden können, und der Studienzahl abhängig. Bei klinischen Studien an Patienten ist die transiente

Transfektion der stabilen vorzuziehen, da das Risiko der Tumorinduktion deutlich geringer ist.
Die Gründe für die Tumorentstehung sind die Aktivierung von Protoonkogenen bzw. die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Diese Gefahr besteht vor allem bei der Integration des Markergens in das Genom der Zielzelle, also bei der stabilen Transfektion. Das EGFP- und das ΔLNGFR-Markergen erfüllen die oben genannten Kriterien weitestgehend. Wie bereits mehrfach beschrieben, ist die Markierung mit EGFP und ΔLNGFR einfach durchführbar, transient, nicht toxisch und führt zu einer effektiven Markierung (Greiner et al. 2004, Wiehe et al. 2006).

4.3.1 Sicherheit des ΔLNGFR-Vektors

Wie bereits beschrieben können etwaige toxische Effekte durch die Gegenüberstellung der Vitalitäten von mock-transfizierten und ΔLNGFR-transfizierten Zellen überprüft werden. Da sich hier im Verlauf aber nur sehr geringe Unterschiede zeigen, ist anzunehmen, dass der ΔLNGFR-Vektor keine schädlichen Effekte auf die Zellen hat. Außerdem haben bereits mehrere Studien gezeigt, dass zwar die Nukleofektion an sich, jedoch nicht die Markierung mit ΔLNGFR die Vitalität der Zellen beeinflusst (Greiner et al. 2004, Wiehe et al. 2006). Es konnte auch gezeigt werden, dass die Markierung mit ΔLNGFR das Differenzierungspotential der Zellen nicht beeinflusst (Wiehe et al. 2006).
Allerdings muss erwähnt werden, dass im murinen Modell ein Fall beschrieben wurde, bei dem eine Krankheit, die mit der akuten myeloischen Leukämie vergleichbar ist, beschrieben wurde (Li et al. 2002). Wahrscheinlich ist dies aber darauf zurückzuführen, dass im Gegensatz zum hier verwendeten Verfahren eine retrovirale Transduktionsmethode verwendet wurde, bei der die Fremd-DNA, in diesem Fall wahrscheinlich das *Evi1 Onkogen*, stabil in das Genom der Empfängerzellen integriert wurde (Bonini et al. 2003).
Aufgrund dieser Ergebnisse wurden von 17 unabhängigen Arbeitsgruppen die Resultate zur Toxizität des ΔLNGFR-Vektors zusammengestellt und ausgewertet (Bonini et al. 2003). Über 300 Mäuse wurden mit den ΔLNGFR-Vektor mittels retroviraler Transduktion markiert und zeigten über eine Zeit von über 20 bzw. 28 Wochen normale Differenzierung und keinerlei Tumorinduktion. Auch bei über 100

Versuchen mit der Transfektion von Lymphozyten mit dem ΔLNGFR-Vektor zeigten sich keine pathologischen Veränderungen des Proliferations- oder Adhäsionsverhaltens sowie der Oberflächenmarker. Das Proliferationsverhalten veränderte sich auch nicht bei Zugabe von großen Mengen ΔLNGFR. Aus dieser groß angelegten Studie, die nicht einen Hinweis auf die Tumorinduktion durch Transfektion mit ΔLNGFR beschreiben konnte, lässt sich schließen, dass die Transfektion mit ΔLNGFR nicht mit der Induktion von Leukämien bzw. anderen Tumoren korreliert und somit als sicherer Marker gewertet werden kann.

4.4 Ausblick

4.4.1 Zelldifferenzierung, Zellfusion und Plastizität der adulten Stammzellen

Wie bereits beschrieben ist die kardiovaskuläre Zellersatztherapie ein kontrovers diskutiertes Forschungsgebiet. So ist die Bewertung der in der Literatur veröffentlichten Effekte (Verkleinerung von infarzierten Arealen, Verbesserung der Pumpfunktion bei Herzinfarktpatienten) bei der Applikation von adulten Stammzellen in geschädigtes Gewebe (Assmus et al. 2002, Kang et al. 2004, Orlic et al. 2001a, Orlic et al. 2001b, Schachinger et al. 2004, Stamm et al. 2003, Strauer et al. 2002, Strauer et al. 2005) recht unterschiedlich. Dabei geht die Mehrheit der Veröffentlichungen von einer Transdifferenzierung der Stammzellen aus (Alison et al. 2003, Badorff et al. 2003, Gojo et al. 2003, Newsome et al. 2003). Einige Arbeitsgruppen zweifeln die Fähigkeit zur Plastizität adulter Stammzellen und damit auch von HPC und MSC an (Balsam et al. 2004, Murry et al. 2004, Terada et al. 2002, Wagners et al. 2002, Ying et al. 2002). Auf die beiden meistzitierten Ergebnisse aus dem Jahr 2004 von Forschungsgruppen aus Seattle und Standford, die eine Transdifferenzierung bezweifeln, wird hier kurz eingegangen.

Die Arbeitsgruppe aus Stanford (Balsam et al. 2004) arbeitete mit HSC von *green fluorescent-protein* (GFP) exprimierenden transgenen Mäusen, die in das ischämische Myokard von Wildtyp-Mäusen injiziert wurden. 10 Tage lang konnten

GFP-positive Zellen nachgewiesen werden, nach 30 Tagen jedoch nur noch vereinzelte. Außerdem wurden keine spezifischen kardialen Marker auf den GFP-positiven Zellen exprimiert, sondern z.B. für die Hämatopoese spezifische Marker wie CD45.
Auch Pathologen aus Seattle (Murry et al. 2004) konnten keine Trans-differenzierung nach Injektion von HSC in das gesunde oder geschädigte Myokard von 145 Mäusen beobachten.

Andere Arbeitsgruppen vermuten, dass die Geweberegenerierung nicht auf der Transdifferenzierung der Zellen, sondern auf einer Zellfusion basiert (Ischikawa et al. 2006, Nygren et al. 2004, Terada et al. 2002, Ying et al. 2002).
Im beschriebenen Fall von 2002 (Ying et al. 2002) wurden murine Gehirnzellen mit ESC kokultiviert und es konnten Zellen, die sowohl embryonale als auch gehirnspezifische Marker zugleich trugen, selektioniert werden. Daher wurde von der Entstehung von Hybridzellen ausgegangen. Spätere Arbeitsgruppen (Ichikawa et al. 2006, Nygren et al. 2004, Terada et al. 2002) konnten ähnliche Ergebnisse bei Versuchen mit Kardiomyozyten zeigen.
Die Frage, ob und in welchem Umfang adulte Stammzellen also ein Transdifferenzierungspotential haben oder nicht, bleibt also bis dato strittig.
Für ein besseres Verständnis der möglichen Beteiligung von Stammzellen an der Gewebeerneuerung ist es daher sehr wichtig passende Technologien zu entwickeln, mit deren Hilfe man die myokardiale Regeneration über einen längeren Zeitraum beobachten kann, um die noch nicht bekannten zellulären und genetischen Mechanismen der Geweberegeneration am Herzen zu untersuchen. Nur dann wird es möglich sein, endgültig zu klären, ob und in welchem Ausmaß Stammzellen an der myokardialen Geweberegeneration beteiligt sind.

4.4.2 Untersuchung des In-vivo-Differenzierungspotentials beim Menschen

Bevor mit EGFP- und ΔLNGFR-transfizierten HPC und/oder MSC am Menschen appliziert werden können, müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein. Es muss die Zustimmung der „Kommission für somatische Gentherapie“ der Bundesärztekammer (BAeK), des Regierungspräsidiums Tübingen und des Paul-

Ehrlich-Instituts vorliegen. Außerdem muss das Protokoll zur Gewinnung, Aufreinigung und Transfektion der HPC und MSC gemäß den GMP-Richtlinien (*„good manufacturing practice*“) angepasst sein. Die Transfektionmethode mit EGFP und ΔLNGFR für HPC und MSC entspricht diesen Richtlinien bereits. Es sollen autologe HPC von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie entnommen werden, mit ΔLNGFR transfiziert und den Patienten wieder mittels intrakoronaren Ballonkatheters appliziert werden. Zum Nachweis einer Transdifferenzierung der Kardiomyozyten soll dann eine Biopsie entnommen werden. Bei Infarktpatienten ist dies aus ethischen Gründen nicht möglich, bei dilatativer Kardiomyopathie ist es jedoch eine etablierte diagnostische Methode.

Es bleibt jedoch noch eine Reihe an Fragen ungeklärt: Es gibt keine Richtlinien und Erfahrungen dazu, wie viel Stammzellen bzw. in welcher Konzentration die Stammzellen am besten appliziert werden, oder auch in welchem Zeitraum bzw. -rahmen sie verabreicht werden müssen um die besten Ergebnisse zu erzielen.

4.4.3 Transfektion der Stammzellen mit Transkriptionsfaktoren

Ein weiteres vielversprechendes Forschungsfeld ist in diesem Zusammenhang die Transfektion von Stammzellen mit Transkriptionsfaktoren, die die Differenzierung der Zellen in Kardiomyozyten forcieren sollen. Seit der Entdeckung von herzspezifischen Transkriptionsfaktoren Nkx-2.5 in den frühen 1990er Jahren haben ausgedehnte Studien zur Herzentwicklung an einer Vielzahl von Spezies, von Fliegen bis zum Menschen, begonnen (Shiojima et al. 2005). Die molekulare Aufspaltung von Signalwegen der Kardiogenese ist nicht nur ein Vorteil zum besseren Verständnis der Herzentwicklung und kongenitalen Herzerkrankungen, sondern auch ein wichtiger Schritt für neue Therapiestrategien wie etwa die kardiovaskuläre Zellersatztherapie.

So haben japanische Forscher (Toko et al. 2002) Versuche mit transgenen Mäusen durchgeführt, die die dominant negative Mutante der Transkriptions-faktoren Nkx2-5 überexprimieren. Mittels Doxorubicin wurde bei diesen Mäusen und der Wildtyp-Kontrollgruppe, diese exprimieren die normalen Nkx 2-5-Transkriptionsfaktoren, eine Apoptose der Kardiomyozyten induziert. Es konnte

gezeigt werden, dass Nkx2-5 eine wichtige Rolle in der Verhinderung von Apoptosen bzw. Stress durch Doxorubicin spielt.
Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren Nkx 2-5 und GATA 4 bei der Differenzierung von Stammzellen in Kardiomyozyten eine Rolle spielen (Monzen et al. 1999).
Diese Ergebnisse eröffnen ein neues Feld der Forschung, nämlich die Manipulation von Stammzellen mittels Transfektion von Transkriptionsfaktoren, zum Zweck die Transdifferenzierung der Zellen in eine gewünschte Richtung zu drängen.
Eine weitere Möglichkeit zur Nutzung der mRNA-Transfektion stellt die mögliche Transfektion von Oberflächenmarkern wie Chemokine oder Integrine dar; hiermit könnte das Homingpotential der Zellen erhöht werden.
Ob sich die gewünschten Ergebnisse jedoch erzielen lassen und wie die Applikation am Menschen aussehen könnt, ist jedoch noch unklar.

5 Zusammenfassung

Der Einsatz von Stammzellen zur Geweberegeneration ist ein Brennpunkt der gegenwärtigen Forschung und stellt möglicherweise eine Therapieoption zur Bekämpfung einer Vielzahl an Krankheiten dar. Insbesondere die kardiovaskuläre Zellersatztherapie zeigt vielversprechende Erfolge, die etwa zur Verbesserung der Ventrikelfunktion nach Herzinfarkt oder zur Therapie der dilatativen Kardiomyopathie dienen könnten.

Neuste Evidenzen sprechen für eine Plastizität von Stammzellen, insbesondere hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen, die eine Differenzierung in verschiedene Gewebe, auch Myokard, zeigen. Die Applikation von autologen Knochenmarksstammzellen in ischämische Myokardinfarktnarben führte zu einer funktionellen Verbesserung. Allerdings ist das *in vivo* Differenzierungspotential von autologen hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen beim Menschen auf zellulärer Ebene noch nicht nachgewiesen. Dies stellt möglicherweise den entscheidenden Schritt bei der Etablierung einer Zellersatztherapie zum Einsatz am Menschen dar.
Um diese Vorgänge genauer erforschen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit die Markierung von *cluster of differentiation 34* (CD34) positiven *hematopoietic progenitor cells* (HPC) und *mesenchymal stem cells* (MSC) mittels transienter Transfektion mit dem *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) und dem *delta low affinity nerve growth receptor* (ΔLNGFR) vorgenommen. Diese genetische Markierung soll es in späteren klinischen *in vivo* Studien ermöglichen, die autologen Stammzellen aufgrund ihrer Markierung nach der Injektion ins Myokard wiederzufinden und ihre weiteres „Schicksal“, also eine mögliche Differenzierung in Kardiomyozyten, zu verfolgen. Die Transfektion mit EGFP oder ΔLNGFR wirkt nicht toxisch auf die Zellen.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit die Transfektionsmethodik optimiert, indem ein Vergleich zwischen der Transfektion mit *messenger*

ribonucleic acid mRNA und der mit Plasmid durchgeführt wurde. Es zeigte sich, dass die Transfektion mit mRNA im Bezug auf die Transfektionseffizienzen als auch die Viabilität der Zellen nach Transfektion der Transfektion mit Plasmid überlegen ist.

Zusammenfassend wird in der vorliegenden Arbeit eine einfach durchzuführende, schnelle, effiziente und nicht toxische Methode zur Markierung von humanen CD34-positiven HPC und MSC, die den *goog manufacturing practice* (*GMP)*-Richtlinien entspricht beschrieben. Diese Methode eignet sich eventuell dazu, die Differenzierung von CD34-positiven HPC und MSC in Kardiomyozyten und deren *Homingpotential* im Myokard beim Menschen nachweisen zu können. Außerdem könnte sich das Verfahren zur Modifikation von Stammzelleigenschaften im Rahmen der regenerativen Zelltherapie eignen.

6 Literaturverzeichnis

[1] **Agbulut O, Mazo M, Bressolle C, Gutierrez M, Azarnoush K, Sabbah L, Niederlander N, Abizanda G, Andreu EJ, Pelacho B, Gavira JJ, Perez Ilzarbe M,Peyrard S, Bruneval P, Samuel JL, Soriano- Navarro M, Garcia- Verdugo JM, Hagege AA. Prosper F, Menasche P.** Can bone marrow- derived multipotent adult progenitor cells regenerate infarcted myocardium?
*Cardivasc Res 72:*175-183 (2006)

[2] **Aggarwal S, Pittenger MF.** Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses.
Blood 105:1815-1822 (2005)

[3] **Alison MR, Poulsom R, Otto WR, Vig P, Brittan M, Direkze NC, Preston SL, Wright NA.** Plastic adult stem cells: will they graduate from the school of hard knocks?
J Cell Sci 116:599-603 (2003)

[4] **Altman J, Das GD.** Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats.
J Comp Neurol 124:319-335 (1965)

[5] **Altman J.** Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special references to persisting neurogenesis in the olfactory bulb.
J Comp Neurol 137:433-457 (1969)

[6] **Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz- Eldor J, Thomson JA.**Clonally derived human embryonic stem cells lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture.
Dev Bio 227:271-278 (2000)

[7] **Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM.** Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis.
Science 275:964-967 (1997)

[8] **Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz- Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M.**
Insulin production by human embryonic stem cells.
Diabetes 50:1691-1697 (2001)

[9] **Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmler S, Zeiher AM.**
Transplatation of Progenitor Cells and Regeneration Enhanchement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI).
Circulation 106:3009-3017 (2002)

[10] **Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, Fleming I, Busse R, Zeiher AM, Dimmeler S.** Transdifferentation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes.
Circulation 107:1024-1032 (2003)

[11] **Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC.** Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium.
Nature 428:668-673 (2004)

[12] **Baum C, Dullmann J, Li Z, Fehse B, Meyer J, Williams DA, von Kalle C.** Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells.
Blood 101:2099-2114 (2003)

[13] **Becker AJ, McCulloch EA, Till JE.** Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells.
Nature 197:452-454 (1963)

[14] **Benesch M, Deeg HJ.** Hematopoietic cell transplantation for adult patients with myelodysplastic syndroms and myeloproliferative disorders.
Mayo Clin Proc 78:981-990 (2003)

[15] **Bianco P, Riminucci M, Kuznetsov S, Robey PG.** Multipotential cells in the bone marrow stroma: regulation in the context of organ physiology.
Crit Rev Eukaryot Gene Expr 9:159-173 (1999)

[16] **Bianco P, Gehron Robey P.**Marrow stromal stem cells.
J Clin Invest 105:1663-1668 (2000)

[17] **Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG.** Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications.
Stem Cells 19:180-192 (2001)

[18] **Bishop AE, Rippon HJ.** Stem cells.-potential for repairing damaged lungs and growing human lungs for transplantation.
Expert Opin Biol Ther 6:751-758 (2006)

[19] **Bonini C, Grez M, Traversari C, Ciceri F, Maktel S, Ferrari G, Dinauer M, Sadat M, Aiuti A, Deola S, Radrizzani M, Hagenbeek A, Apperley J, Ebeling S, Martens A, Kolb HJ, Weber M, Lotti F, Grande A, Weissinger E, Bueren JA, Lamana M, Falkenburg JH, Heemskerk MH, Austin T, Kornblau S, Marini F, Benati C, Magnani Z, Cazzaniga S, Toma S, Gallo-Stampino C, Itrona M, Slavin S, Greenberg PD, Bregni M, Mavilio F, Bordignon C.** Safety of retroviral gene marking with a truncated NGF receptor.
Nat Med 9:367-369 (2003)

[20] **Brustle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, McKay RD.** Embryonic stem cell-derived glial precursor: a source of myelinating transplants.
Science 285:754-756 (1999)

[21] **Carpenter MK, Inokuma MS, Denham J, Mujataba T, Chiu CP, Rao MS.** Enrichment of neurons and neural precursor from human embryonic stem cells.
Exp Neurol 172:383-397 (2001)

[22] **Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC.** Green fluorescent protein as a marker for gene expression.
Science 263:802-805 (1994)

[23] **Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S, Sun JP.** Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction.
Am J Cardiol 94:92-95 (2004)

[24] **Choi KS, Shin JS, Lee JJ, Kim YS, Kim SB, Kim CW.** In vitro trans-differentiation of rat mesenchymal cells into insulin- producing cells by rat pancreatic extract.
Biochem Biophys Res Commun 330:1299-1305 (2005)

[25] **Choi Y, Ta M, Atouf F, Lumelsky N.** Adult pankreas generates multipotent stem cells ans pancreatic and nonpancreatic progeny.
Stem Cells 22:1070-84 (2004)

[26] **Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois P, Darimont C, Ailhaud G.** Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro.
J Cell Sci 110:1279-1285 (1997)

[27] **Dao MA, Nolta JA.** CD34: to select or not to select? That is the question.
Leukemia 14:773-776 (2000)

[28] **De Wert G, Mummery C.** Human embryonic stem cells: research, ethics and policy.
Hum Reprod 18:672-682 (2003)

[29] **Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R.** Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following infusion into nonhuman primates.
Blood 101:2999-3001 (2003)

[30] **Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P.** Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia.
N Engl J Med 343:1910-1916 (2000)

[31] **Emanueli C, Lako M, Stojkovic M, Madeddu P.** In search of the best candidate for regeneration of ischemic tissues: are embryonic/fetal stem cells more advantageous than adult counterparts?
Thromb Haemost 94:738-749 (2005)

[32] **Evans MJ, Kaufman MH.** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.
Nature 292:154-156 (1981)

[33] **Fleming HE, Scadden DT.** Embryonic stem cells make human T cells.
Proc Natl Acad Sci USA 103:12213-12214 (2006)

[34] **Friedensteiner AJ, Piatetzky- Shapiro II, Petrakova KV.** Osteogenesis in transplants of bone marrow cells.
J Embryol Exp Morphol 16:381-390 (1966)

[35] **Friedensteiner AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS.** The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea- pig bone marrow and spleen cells.
Cell Tissue Kinet 3:393-403 (1970)

[36] **Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, Peterson DA, Suhr ST, Ray J.** Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplantated to the adult brain.
Proc Natl Acad Sci USA 92:11879-11883 (1995)

[37] **Galic Z, Kitchen SG, Kacena A, Subramanian A, Burke B, Cortando R, Zack JA.** T lineage differentiation from human embryonic stem cells.
Proc Natl Acad Sci USA 103:11742-11747 (2006)

[38] **Gepstein L.** Derivation and potential applications of human embryonic stem cells.
Cir Res 91:866-876 (2002)

[39] **Gerlach M, Braak H, Hartmann A, Jost WH, Odin P, Priller J, Schwarz J.** Current state of stem cell research for the treatment of Parkinson´s disease.
J Neurol 249:Suppl 3:III/33-5 (2002)

[40] **Gojo S, Umezawa A.** Plasiticity of mesenchymal stem cells – regenerative medichin for disease hearts.
Hum Cell 16:23-30 (2003)

[41] **Greiner J, Wiehe J, Wiesneth M, Zwaka TP, Prill T, Schwarz K, Bienek-Ziolkowski M, Schmitt M, Döhner H, Hombach V, Torzewski J.** Transient genetic labeling of human CD34-positive hematopoietic stem cells unsing nucleofection.
Transfus Med Hemother 31:136-141 (2004)

[42] **Gussoni Em Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC.** Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation.
Nature 401:390-394 (1999)

[43] **Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval JL, Fraser CC, Cyazzana-Calvo M, Fischer A.** A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency.
N Engl J Med 348:255-256 (2003)

[44] **Hagege AA, Marolleau JP, Vilquin JT, Alheritiere A, Peyrard S, Duboc D, Abergel E, Messas E, Mousseaux E, Schwartz K, Desnos M, Menasche P.** Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long- term follow-up of the first phase I cohort of patients.
Circulation 114:108-113 (2006)

[45] **Harousseau JL, Attal M, Divine M, Milpied N, Marit G, Leblond V, Stoppa AM, Bourhis JH, Caillot D, Boasson M et al.** Comparison of autologous bona marrow transplantation and peripheral blood stem cell transplantation after first remission induction treatment in multiple myeloma.
Bone Marrow Transplant 15:963-969 (1995)

[46] **Holmberg LA, Stewart FM.** Hematopoietic stem cell transplantation for non- Hodgkin´s lymphoma.
Oncology (Williston Park) 17:627-632 (2003)

[47] **Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T.** Isolated allogeneic bone marrow- derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone.
Proc Natl Acad Sci USA 99:8932-8937 (2002)

[48] **Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF 3rd , Bioani M , Scholer HR.** Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells.
Science 300:1251-1256 (2003)

[49] **Ischikawa F, Shimazu H, Schultz LD, Fukata M, Nakamura R, Lyons B, Shimoda K, Shimoda S, Kanemaru T, Nakamura K, Ito H, Kaji Y, Perry AC, Harada M.** Purified human hematopoietic stem cells contribute to the generation of cardiomyocytes through cell fusion.
Faseb J 20:950-952 (2006)

[50] **Itskovitz- Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H, Benbenisty N.** Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising germ layers.
Mol Med 6:88-95 (2000)

[51] **Jiang Y, Jhagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzales XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM.** Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.
Nature 418:41-49 (2002)

[52] **Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J.** Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system.
Cell 96:25-34 (1999)

[53] **Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, Kim YJ, Soo Lee D, Sohn DW, Han KS, Oh BH, Lee MM, Park YB.** Effects of intracoronary infunsion of peripheral mobilised with granulocyte- colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial.
Lancet 363:751-756 (2004)

[54] **Kariko K, Kuo A, Barnathan ES, Langer DJ.** Phosphate-enhanced transfection of cationic lipid-complexed mRNA and plasmid DANN
Biochim Biophys Acta 1369:320-334 (1998)

[55] **Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA.** Hematopoietic colony- forming cells derived from human embryonic stem cells.
Proc Natl Acad Sci USA 98:10716-10721 (2001)

[56] **Kehat I, Kenyagin- Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livine E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L.** Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes.
J Cin Invest 108:407-414 (2001)

[57] **Kehler J, Hubner K, Scholer HR.** Derivation of germ cells from embryonic stem cells.
Ernst Schering Res Found Workshop 60:125-142 (2006)

[58] **Kim DK, Fujiki Y, Fukushima T, Ema H, Shibuya A, Nakauchi H.** Comparison of hematopoietic activities of human bone marrow and umbilical cord blood CD34 positive and negative cells.
Stem Cells 17:286-294 (1999)

[59] **Klug MG.** Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells from stavle intracardiac grafts.
J Clin Invest 98:216-224 (1996)

[60] **Knowles LP.** A regulatory patchwork- uman ES cell research oversight.
Biotechnologie 22:157-163 (2004)

[61] **Koc ON, Lazarus HM.** Mesenchymal stem cells: heading into the clinic.
Bone Marrow Transplant 27:235-239 (2001)

[62] **Kraitchman DL, Tatsumi M, Gilson WD, Ishimori T, Kedziorek D, Walczak P, Segars WP, Chen HH, Friztges D, Izbudak I, Young RG, Marcelino M, Pittenger MF, Solaiyappan M, Boston RC, Tsui BM, Wahl RL, Bulte JW.** Dynamic imaging of allogeniec mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction.
Circulation 112:1451-1461 (2005)

[63] **Lagasse E, Connors H, Al- Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M.** Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo.
Nat Med 6:1229-1234 (2000)

[64] **Le Blanc K, Gotherstrom C, Ringden O, Hassan M, McMahon R, Horwitz E, Anneren G, Axelsson O, Nunn J, Ewald U, Norden-Lindberg S, Jansson M, Dalton A, Astrom E, Westgren M.** Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta.
Transplantation 79:1607-1614 (2005)

[65] **Lee SH, Lumenlsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD.** Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells.
Nat Biotechnol 18:675-679 (2000)

[66] **Levenberg S, Golub JS, Amit M, Itskovitz- Eldor J, Langer R.** Endothelial cells derived from human embryonic stem cells.
Proc Natl Acad Sci USA 99:4391-4396 (2002)

[67] **Li LH, McCarthy P, Hui SW.** High–efficieny electotransfection of human primary hematopoietic stem cells.
FASEB J 15:586-588 (2001)

[68] **Li Z, Dullmann J, Schiedlmeier B, Schmidt M, von Kalle C, Meyer J, Froster M, Stocking S, Wahlers A, Frank O, Ostertag W, Kuhlcke K, Eckert HG, Fehse B, Baum C.**Murine leukemia induced by retroviral gene marking.
Science 296:497 (2002)

[69] **Lu D, Benjamin R, Kim M, Conry RM, Curiel DT.** Optimization of methods to achieve mRNA-mediated transfection of tumor cells in vitro and in vivo employing cationic liposome vectors.
Cancer Gene Ther 1:245-252 (1994)

[70] **Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R.** Differentiation of embryonic stem cells to insulin –secreting structures similar to pancreatic istlets.
Science 292:1389-1394 (2001)

[71] **Lundqvist A, Noffz G, Pavlenko M, Saeboe-Larssen S, Fong T, Maitland N, Pisa P.** Nonviral and viral gene transfer into different subsets of human dendritic cells yield comparable efficiency of transfection.
J Immunother 56:445-454 (2002)

[72] **Luriia EA, Chakhava OV, Fridenshtein A.** The origin of fribroblast – like cells in bone marrow culture.
Tsitologiia 8:115-119 (1966)

[73] **Maraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW.** A novel five- transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molekular cloning.
Blood 90:5013-5021 (1997)

[74] **Martinet W, Schrijvers DM, Kockx MM.** Nucleofecon as an efficient nonviral transfection method for human monocytic cells.
Biotechnol Lett 25:1025-1029 (2003)

[75] **Mazzini L, Fagioli F, Boccaletti R, Mareschi K, Oliveri G, Oliveri C, Pastore I, Marasso R, Madon E.** Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a methodological approach in humans.
Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 4:158-161 (2003)

[76] **Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Vassalo E, Oliveri G, Boccaletti R, Testa L, Livigni S, Fiagioli F.** Autologous mesenchymal stem cells: clinical applications im amyotrophic lateral sclerosis.
Neurol Res 28:523-526 (2006)

[77] **McKay.** Stem cells in the central nervous system.
Science 276:66-71 (1997)

[78] **Menasche P, HagegeAA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP**. Myoblast transplantation for heart failure.
Lancet 357:279-280 (2001)

[79] **Mestroni L, Rocco C, Gregori D, Sinagra G, Di Lenarda A, Miocic S, Vatta M , Pinamonti B, Muntoni F, Caforio AL, McKenna WJ, Falaschi A, Giacca M, Camerini F.** Familial dilated cardiomyopathy: evidence for genetic and phenotypic heterogeneity. Heart Muscle Disease Study Group.
J Am Coll Cardiol 34:181-190 (1999)

[80] **Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H.** Intrakoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months` follow- up data from the randomized, controll BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST- elevation infarct regeneration) trail.
Circulation 14:1287-1294 (2006)

[81] **Momma S, Johannson CB, Frisen J.** Get to know your stem cells.
Curr Opin Neurobiol 10:45-49 (2000)

[82] **Monzen K, Shiojima I, Hiroi Y, Kudoh S, Oka T, Takimoto E, Hayashi D, Hosoda T, Habara-Ohkubo A, Nakaoka T, Fujita T, Yazaki Y, Kumoro I.** Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen –activated protein kinase kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4.
Mol Cell Biol 19:7096-7105 (1999)

[83] **Morigi M, Benigni A, Remuzzi G, Imberti B.** The regenerative potential of stem cells in acute renal failure.
Cell Transplant 1:111-117 (2006)

[84] **Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ.** Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts.
Nature 428:664-668 (2004)

[85] **Namikawa R, Weilbaecher KN, Kaneshima H, Yee EJ, McCune JM.** Long- term human hematopoiesis in the SCID- hu mouse.
J Exp Med 172:1055-1063 (1990)

[86] **Newsome PN, Johnnessen I, Boyle S, Dalakas E, McAulay KA, Samuel K, Rea F, Forrester L, Turner ML, Hayes PC, Harrison DJ, Blickmore WA, Plevris JN.** Human cord blood- derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion.
Gastroentertology 124:1891-1900 (2003)

[87] **Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Heschler J, Taneera J, Fleischmann BK, Jacobsen SE.** Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation.
Nat Med 10:494-501 (2004)

[88] **Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal- Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P.** Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium.
Nature 410:701-705 (2001a)

[89] **Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal- Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P.** Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival.
Proc Natl Acad Sci USA 98:10344-10349 (2001b)

[90] **Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H.** Long- term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell.
Science 273:242-245 (1996)

[91] **Peault B, Weisman IL, Buckle AM, Tsukamoto A, Baum C.** Thy-1-expressing CD34+ human cells express multiple hematopoietic potentialities in vitro and in SCID- hu mice.
Nouv Rev Fr Hematol 35:91-93 (1993)

[92] **Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.
Science 284:143-147 (1999)

[93] **Rakar S, Sinagra G, Di Lenarda A, Poletti A, Bussani R, Silvestri F, Camerini F.** Epidemiology of dilated cardiomyopathy. A prospective post-mortem study f 5252 necropsies. The Heart Muscle Disease Study Group.
Eur Heart J 18:117-123 (1997)

[94] **Reinecke H, Poppa V, Murry CE**. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting.
J Mol Cell Cardiol 34:241- 249 (2002)

[95] **Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A.** Embryonic stem cells lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro.
Nat Biotechnol 18:399-404 (2000)

[96] **Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A, Ben-Hur T.** Neural progenitors from human embryonic stem cells.
Nat Biotechnol 19:1134-1140 (2001)

[97] **Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM.** Origin of endothelial progenitors in human embryonic stem cells.
J Clin Invest 109:337-346 (2002)

[98] **Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O´Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfas I, Martin I, Nordet P.** Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classifikation of cardiomyopathies.
Circulation 93:1-842 (1996)

[99] **Sawai K, Ohno K, Iijima Y, Levin B, Meruelo D.** A novel method of cell-specific mRNA transfection.
Mol Genet Metab 64:44-51 (1998)

[100] **Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM.**
Transplantation of progenitor cells and regeneration enhanchement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial.
J Am Coll Cardiol 44:1690-1699 (2004)

[101] **Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N.**
Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derivesd from human embryonic stem cells.
Proc Natl Acad Sci USA 97:11307-11312 (2000)

[102] **Schuldiner M, Eiges R, Eden A, Yanuka O, Itskovitz- Eldor J, Goldstein RS, Benvenisty N.** Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells.
Brain Res 913:201-205 (2001)

[103] **Schuster MD, Kocher AA, Seki T, Martens TP, Xiang G, Homma S, Itecus S.** Myocardial neovascularization by bone marrow angioblasts results in cardiomyocyte regeneration.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 287:525-532 (2004)

[104] **Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM.** Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte- like cells.
J Clin Invest 109:1219-1302 (2002)

[105] **Scopes J, Ismail M, Marks KJ, Rutherford TR, Draycott GS, Pocock C, Gordon-Smith EC, Gibson FM.** Correction of stromal cell defect after bone marrow transplantation in aplastic anaemia.
Br J Haematol 115:642-652 (2001)

[106] **Shi S, Barthold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S.** The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures.
Orthod Craniofac Res 8:191-199 (2005)

[107] **Shiojima I, Komuro I.** Cardiac development biology: from flies to humans.
Jpn J Physiol 55:245-254 (2005)

[108] **Slack JM.** Stem cells in epithelial tissues.
Science 287:1431-1433 (2000)

[109] **Smith AM, van Vliet P, Hassink RJ, Goumans MJ, Doevendans PA.**The role of stem cells in cardiac regeneration.
J Cell Mol Med 9:25-36 (2005)

[110] **Sonntag KC, Sanchez-Prnaute R.** Tailoring human embryonic stem cells gor neurodegenerative disease therapy.
Curr Opin Investing Drugs 7:614-618 (2006)

[111] **Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quinto T, Reig JA, Martin F.** Insulin secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin- induced diabetic mice.
Diabetes 49:157-162 (2000)

[112] **Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G.** Autologous bone- marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration.
Lancet 361:45-46 (2003)

[113] **Statistisches Bundesamt Deutschland (www.destatist.de)**
Todesursachenstatistik 2004; Pressemitteilung vom 17.10.2005

[114] **Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P.** Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction.
Dtsch Med Wochenschr 126:932-938 (2001)

[115] **Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P.** Repair of infarcted myocardium by atologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans.
Circulation 106:1913-1918 (2002)

[116] **Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Bartsch T, Schannwell C, Antke C, Sorg RV, Kogler G, Wernet P, Muller HW, Kostering M.** Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologuos bone marrow cell transplantation in chronic coronary arterry disease: the IACT Study.
J Am Coll Cardiol 46:1651-1658 (2005)

[117] **Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM.** Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long- term hematopoiesis in vitro.
Blood 74:1563-1570 (1989)

[118] **Takahaschi J.** Stem cell therapy for Parkinson´s disease.
Ernst Schering Res Found Workshop 60:229-244 (2006)

[119] **Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T.** Ischemia- and cytokine- induced mobilization of bone marrow- derived endothelial progenitor cells for neovascularization.
Nat Med 5:434-438 (1999)

[120] **Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheston KA, Glower DD, Kraus WE.** Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal yoblast transplantation.
Nat Med 4:929-933 (1998)

[121] **Temple S, Alvarez- Buylla A.** Stem cells in the adult mammalian central nervous system.
Curr Opin Neurobiol 9:135-141(1999)

[122] **Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW.** Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion.
Nature 416:542- 545 (2002)

[123] **Thom T, Haase N, Rosamond W, Howard VJ, Rumsfeld J, Manolio T, Zheng ZJ, Flegal K, O´Donnell C, Kittner S, Lloyd- Jones D, Goff DC Jr, Hong Y, Adams R, Friday G, Furie K, Gorelick P, Kissela B, Marler J, Meigs J, Roger V, Sidney S, Sorlie p, Steinberger J, Wasserthiel-Smoller S, Wilson M, Wolf P, Ammerican Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee.**
Heart Disease and Stroke Statistic – 2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee ans Stroke Statistics Subcomittee.
Circulation 113:85-151 (2006)

[124] **Thomson JA, Kalischman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP.** Isolation of a primate embryonic stem cell line.
Proc Natl Acad Sci USA 92:7844-7848 (1995)

[125] **Thomson JA, Itskovitz- Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM.** Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.
Science 282:1145-1147 (1998)

[126] **Toko H, Zhu W, Takimoto E, Shiojima I, Hiroi Y, Zou Y, Oka T, Akazawa H, Mizukami M, Sakamoto M, Terasaki F, Kitaura Y, Takano H, Nagai T, Nagai R, Komuro I.** Csx/Nkx2-5 is required for homeostasis and survival of cardiac myocytes in the adult heart.
J Biol Chem 277:24735-24743 (2002)

[127] **Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD.** Human mesenchymal stem cells differentiatie to a cardiomyocyte phenotype in adult murine heart.
Circulation 105:93-98 (2002)

[128] **Van de Parre TJ, Martinet W, Schrijvers DM, Herman AG, De Meyer GR.** mRNA but not plasmid DNA is efficienttly transfected in murine J774A.1 macrophages.
Biochem Biophys Res Commun 327:356-360 (2005)

[129] **Van Tendeloo VF, Snoeck HW. Lardon F, Vanham Gl, Nijs G. Lenjou M, Hendriks L, van Broeckhoven C, Moulijn A, Rodrigus I, Verdonk P, Van Bockstaele DR, Berneman ZN.** Nonviral transfection of distinct types of human dendritic cells: high-efficeincy gene transfer by electroporation into hematopoietic progenitor- but not monocyte-derived dendritic cells.
Gene Ther 5:700-707 (1998)

[130] **Van Tendeloo VFl, Ponsaerts P, Lardon F, Nijs G, Lenjou M, Van Broeckhoven C, Van Bockstaele DR, Berneman ZN.** Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells :superiority to lipofection and passiv pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells.
Blood 98:49-56 (2001)

[131] **Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL.** Littel evidence for developmentl plasticity of adult hematopoietic stem cells.
Science 297:2256-2259 (2002)

[132] **Wakitani S, Aoki H, Harada Y, Sonobe M, Morita Y, Mu Y, Tomita N, Nakamura Y, Takeda S, Watanabe TK, Tanigami A.** Embryonic stem cells from articular cartilage, not teratomas, in osteochondral defects of rat joints.
Cell Transplant 13:331-336 (2004)

[133] **Wakitani S, Takaoka K, Hattori T, Miyazawa N, Iwanaga T, Takeda S, Watanabe TK, Tanigami A.** Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint from teratomas and subsequently destroy the joint.
Rheumatology (Oxford) 42:162-165 (2003)

[134] **Weismann IL.** Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities.
Science 287:1442-1446 (2000)

[135] **Weissinger F, Reimer P, Waessa T, Buchhofer S, Schertlin T, Kunzmann V, Wilhelm M.** Gene transfer in purified human hematopoietic peripheral- blood stem cells by means of electroporation without prestimulation.
J Lab Clin Med 141:138-149 (2003)

[136] **Wiehe J, Niesler C, Torzewski J, Zimmermann O, Wiesneth M, Schmitt M, Schwarz K, Döhner J, Hombach V, Greiner J.** Efficient transient genetic labeling of human CD34+ progenitor cells for in vivo application.
Regenerative Med 1:223-234 (2006)

[137] **Wobus AM, Rohwedel J, Maltsev V, Heschler J.** Development of cardiomyocytes expressing cardiac-specific genes, action potentials, and ionic channels during embryonic stem cell- derived cardiogenesis.
Ann N Y Acad Sci 752:460-469 (1995)

[138] **Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes- Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertensteiner B, Ganser A, Drexler H.** Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlles clinical trial.
Lancet 364:141-148 (2004)

[139] **Wu MH, Liebowitz DN, Smith SL, Williams SF, Dolan ME.** Efficient expression of foreign genes in human CD34(+) hematopoietic precursor cells using electroporation.
Gene Ther 8:384-390 (2001)

[140] **Wu MH, Smith SL, Danet GH, Lin AM, Williams SF, Liebowitz DN, Dolan ME.** Optimization of culture conditions to enhance transfection of human CD34+ cells by electroporation.
Bone Marrow Transplant 27:1200-1209 (2001)

[141] **Ying H, Zaks TZ, Wang RF, Irvine KR, Kammula US, Marincola FM, Leitner WW, Restifo NP.** Cancer therapy using a self- replicating RNA vaccine.
Nat Med 5:823-827 (1999)

[142] **Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG.** Changing potency by spontaneous fusion.
Nature 416:545-548 (2002)

[143] **Zavazava N.** Embryonic stem cells and potency to induce transplantation tolerance.
Expert Opin Biol Ther 3:5-13 (2003)

[144] **Zhang SC, Wernig M, Ducan ID, Brustle O, Thomson JA.** In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells.
Nat Biotechnol 19:1129-1133 (2001)

[145] **Zhang YM, Hartzell C, Narlow M , Dudley SC Jr.** Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential.
Circulation 106:1294-1299 (2002)

[146] **Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF.** Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic istlets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine and hepatic phenotypes.
Diabetes 50:521-533 (2001)

7 Anhänge

7.1 Poster

7.2 Publikation

Hocheffiziente genetische Markierung von humanen CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen durch mRNA-Gentransfer

Juliane M. Wiehe[1], Peter Ponsaerts[2], Markus T. Rojewski[3], Jörg M. Homann[1], Jochen Greiner[4], Desiree Kronawitter[1], Hubert Schrezenmeier[3], Vinzenz Hombach[1], Markus Wiesneth[3], Jan Torzewski[1]

[1] Abteilung Innere Medizin II, Universität Ulm, Deutschland; [2] Laboratory of Experimental Hematology, Faculty of Medicine, University of Antwerp, Belgium; [3] Abteilung Transfusionsmedizin, Universität Ulm, Deutschland; [4] Abteilung Innere Medizin III, Universität Ulm, Deutschland

Hintergrund

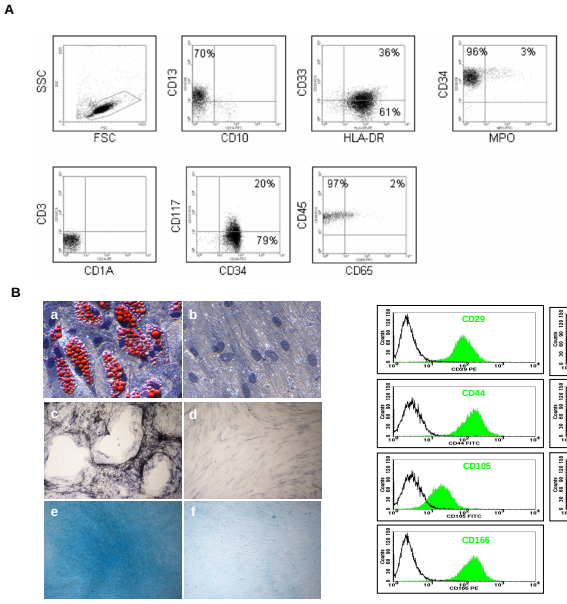
Die genetische Markierung von humanen hämatopoetischen Progenitorzellen (HPC) und deren *in vivo*-Monitoring ist ein Ansatz zur Beantwortung grundlegender Fragen in der Stammzellbiologie. Kürzlich haben wir ein effizientes, transientes, genetisches Markierungsverfahren für humane CD34$^+$ HPC mit der trunkierten Form des *low affinity nerve growth factor receptors* (ΔLNGFR) beschrieben. Für dieses Verfahren besteht eine *in vivo*-Zulassung am Menschen. (siehe Poster 425).

Ziel

Ziel dieser Arbeit ist es, die Transfektionsbedingungen für humane CD34$^+$ HPC durch Verwendung von *in vitro*-transkribierter mRNA anstelle von Plasmid DNA bezüglich Effizienz und Viabilität zu optimieren und das Verfahren auf humane mesenchymale Stammzellen zu übertragen.

Ergebnisse

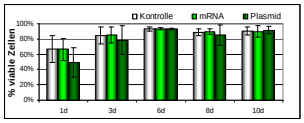
Charakterisierung der Stammzellen



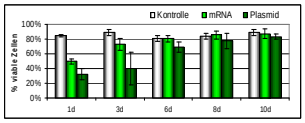
A: Humane CD34+ hämatopoetische Stammzellen exprimieren die Oberflächenmarker CD34, CD45, CD13 und HLA-DR. CD33 und CD117 wird schwach exprimiert. **B**: MSC differenzieren zu Adipozyten (a), Osteoblasten (c) und Chondrozyten (e); Kontrollen jeweils daneben (b, d, f). MSC exprimieren das Markermuster CD29$^+$, CD44$^+$, CD105$^+$ CD166$^+$, CD14$^-$, CD34$^-$, CD45$^-$.

Viabilität nach Nukleofektion

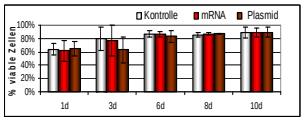
EGFP in MSC



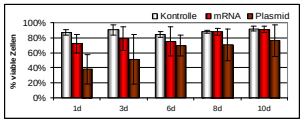
EGFP in HPC



LNGFR in MSC



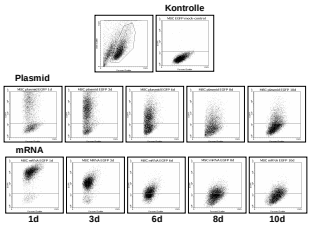
LNGFR in HPC



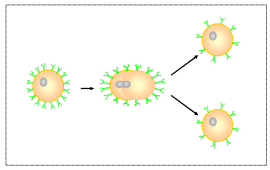
Vergleich der Viabilitäten von Plasmid- und mRNA-Transfektion 1-10 Tage nach Nukleofektion mit EGFP, bzw. LNGFR (n=3).

Expressionseffizienz

Markerexpression nach Plasmid- und mRNA Nukleofektion im Vergleich

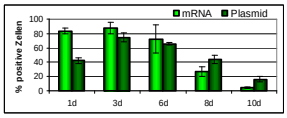


Exemplarische FACS-Dotblots von Plasmid- und mRNA-transfizierten Zellen 1-10 Tage nach Nukleofektion.

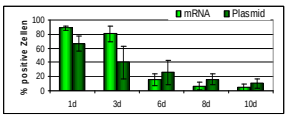


Die translatierten Proteine werden bei der Proliferation auf die Tochterzellen aufgeteilt.

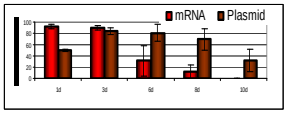
EGFP in MSC



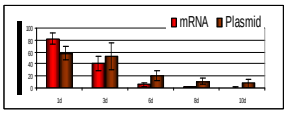
EGFP in HPC



LNGFR in MSC



LNGFR in HPC



Vergleich von Plasmid- und mRNA-Transfektion. Expressionseffizienzen 1-10 Tage nach Nukleofektion mit EGFP, bzw. LNGFR (n=3).

Methoden

Charakterisierung der Stammzellen

Humane CD34$^+$ HPC wurden mittels Immunphänotypisierung mit Antikörpern gegen CD34, CD45, CD1A, CD3, CD10, CD13, HLA-DR, MPO, CD33, CD65 und CD117 charakterisiert.
Zur Charakterisierung der mesenchymalen Stammzellen wurden diese zu Chondro-, Osteo- und Adipozyten differenziert (Differenzierungsmedien von Cambrex). Dazu wurden initial 25.000-100.000 Zellen ausplattiert und nach Hersteller Protokoll zur Differenzierung stimuliert. Zusätzlich wurden die MSC mittels FACS auf das Expressionsmuster CD29$^+$, CD44$^+$, CD105$^+$, CD166$^+$, CD14$^-$, CD34$^-$ und CD45$^-$ untersucht.

In vitro Transkription (IVT)

Linearisierte Plasmide mit dem ΔLNGFR-, bzw. EGFP-Gen wurden als Template für die IVT (T7 Opti-mRNA transcription kit; Cure Vac GmbH) eingesetzt. Die Polyadenylierung der mRNA wurde mit dem Poly(A) Tailing Kit (Ambion) durchgeführt.

Nukleofektion

1-5x10^6 CD34$^+$ HPC, bzw. 5x10^5 MSC wurden in 100µl *Human CD34 Cell Nucleofector™ Solution* (Amaxa Biosystems) und mit 2µg Plasmid DNA bzw. 5µg mRNA resuspendiert. Die Transfektion wurde mittels der Nuceofector™ Technologie mit dem Programm U-08, bzw C-17 durchgeführt.

Durchfluss-Zytometrie

Zur Untersuchung der Oberflächenexpression wurden die mit ΔLNGFR-transfizierten Zellen mit dem *anti-human NGF-Receptor antibody* (Santa Cruz) markiert und mittels FACS-Analyse quantifiziert, die EGFP-markierten Zellen wurden direkt in die Analyse eingesetzt. Die Viabilität der Zellen nach Transfektion wurde mittels der Trypan-Blau-Ausschluss Methode, oder mittels Scatter-Ausschluss bestimmt.

Zusammenfassung

- Die Nukleofektion mit mRNA ist eine schnelle, hoch effiziente Transfektions-methode für schwer zu transfizierende humane CD34+ HPC und MSC.
- Der Anteil exprimierender Zellen ist nach Transfektion mit *in vitro* transkribierter mRNA initial signifikant höher als mit Plasmid DNA.
- Die Toxizität der mRNA-Transfektion ist im Vergleich zur Plasmidtransfektion reduziert.
- Das Verfahren könnte sich zur Modifikation von Stammzelleigenschaften im Rahmen der regenerativen Zelltherapie eignen.

Torzewski et al. (2006) mRNA-Transfektion von adulten Progenitorzellen zur spezifischen Gewebsregeneration. Deutsche Patentanmeldung.
Wiehe et al. (2006) Efficient transient genetic labeling of human CD34+ progenitor cells for in vivo application. Future Medicine (Regenerative Medicine). 1: 223-234.
Greiner et al. (2004) Transient Genetic Labeling of Human CD34 Positive Hematopoietic Stem Cells Using Nucleofection. Transfusion Medicine and Hemotherapy. 31: 136-141.

Highly efficient mRNA-based gene delivery into human progenitor cells

Juliane M. Wiehe[1], Peter Ponsaerts[2], Markus T. Rojewski[3], Joerg M. Homann[1], Jochen Greiner[4], Desiree Kronawitter[1], Hubert Schrezenmeier[3], Vinzenz Hombach[1], Markus Wiesneth[3], Oliver Zimmermann[1], Jan Torzewski[1]

[1]Department of Internal Medicine II, University of Ulm, Ulm, Germany.
[2]Laboratory of Experimental Hematology, Faculty of Medicine, University of Antwerp, Antwerp, Belgium.
[3]Department of Transfusion Medicine, University of Ulm, and Institute for Clinical Transfusion Medicine and Immunogenetics, University of Ulm, Ulm, Germany.
[4]Department of Internal Medicine III, University of Ulm, Ulm, Germany.

Contact information:
Professor Jan Torzewski, MD, M.phil.
University of Ulm
Department of Internal Medicine II-Cardiology, Robert Koch Str. 8, 89081 Ulm, Germany
Phone:+ 49 731 500-24347
Fax: + 49 731 500-24442
Email: jan.torzewski@uniklinik-ulm.de

Abstract

Good manufacture practice (GMP)-compatible short time modification of adult progenitor cells is a key step towards the improvement of cellular therapies. mRNA-transfection of human hematopoietic and mesenchymal stem cells (HSC/MSC) with in vitro-transcribed mRNA for cell surface receptors revealed a 24h transfection efficiency of ~85% without significantly affecting cell viability or differentiation capacity. mRNA-based nucleofection is a powerful, non-toxic approach for transient gene transfer and manipulation of stem cell function.

Adult progenitor cell therapy for organ repair is a promising area of biomedical research. Gene therapy is also considered as an important avenue towards the development of novel therapies for human disease. Using gene therapy approaches in order to improve the regenerative capacity of adult progenitor cells is conceivable and, possibly, absolutely necessary to make cellular therapy successful.

Mesenchymal stem cells (MSC) obviously have a multi-lineage potential and might gain an increasing impact in cellular therapy[1]. For hematopoietic progenitor cells (HPC), the proposed plasticity remains a controversial issue[2,3]. Gene delivery into human progenitor cells may aim at labelling to track cells *in vivo* or at transient manipulation of stem cell characteristics to improve their regenerative capacity. Conventional gene delivery into human progenitor cells, however, is associated with high risks and a number of ethical concerns. Namely, virus based gene delivery bears the risks of oncogenesis and mutagenesis as well as elicitation of immune responses, whereas non-viral gene delivery is considered to be inefficient[4]. With the emerging role of HPC and MSC as potential gene and cell therapy vehicles in clinical approaches, there is an increasing need for safe, effective, non-viral gene delivery.

In this paper, we continue a series of small reports on the development of a highly efficient, non toxic methodology of gene transfer into human progenitor cells. Very recently, we have described a rapid, specific and efficient transient genetic labelling of HPC with a plasmid coding for ΔLNGFR using nucleofection[5]. Importantly, this method is ready for *in vivo*-application in humans now and is currently being tested in a clinical trial. This trial might establish nucleofection as being feasible and safe. If so, the herein described mRNA-transfection is based on a method already applicable in humans and may thus be useful in a wide range of applications.

Human CD34-positive HPC were isolated from peripheral blood from patients stimulated with granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)[5]. Human MSC were characterized by immunophenotyping. They lack hematopoietic stem cell marker CD34 as well as markers for peripheral blood cells CD14, CD45 and CD271 but do express CD29, CD44, CD105, and CD166[6]. MSC were not senescent. Osteogenic, adipogenic, and chondrogenic differentiation could be induced (see **supplementary Fig.1 and Methods**, online).

Both, MSC and CD34+ HPC were transfected with ΔLNGFR and EGFP using mRNA- and plasmid nucleofection (see **supplementary Methods**, online). After 24h, mRNA-transfection with EGFP resulted in extremely high transfection efficiencies with 89±3% (HPC) or 83±4% (MSC) positive cells, whereas plasmid transfection was markedly less effective (67±11% (HPC), or 42±4 (MSC)). After 3d, mRNA transfected cells still showed extremely high (81±11% (HPC) or 87±8% (MSC)) marker expression. From day 6 on, marker expression revealed a reverse pattern with significantly higher expression after plasmid transfection. Antigen expression attenuated intensively with time resulting in less than 30% positive cells after 10d (**Fig. 1A**). The high transfection efficiency of mRNA-transfection was - in contrast to plasmid transfection - associated with only marginal viability loss (**Fig. 1B**). **Fig. 1C** shows a representative example of Median Fluorescence Intensity (MFI) of mRNA and plasmid transfected cells to determine transgene expression differences in positive cells 24h after transfection.

To assess whether nucleofection of MSC altered their capacity to differentiate into chondrocytes, osteoblasts and adipocytes, mock- and ΔLNGFR-transfected MSC were stained for ΔLNGFR. ΔLNGFR-negative and -positive population were enriched by fluorescence activated cell sorting (see **supplementary Methods** online). Non-transfected, non-stained, and stained MSC were investigated. Results depicted in **Fig. 2** show that the differentiation potential is neither influenced by cell sorting nor by nucleofection because all assays differentiate into chondrocytes, osteoblasts and adipocytes.

We demonstrate here that mRNA transfection with ΔLNGFR and EGFP is highly efficient for human HPC and MSC showing >80-90% positive cells after 24h. Marker expression attenuates quickly after 3d and almost disappears after 10d. The kinetics of mRNA vs. plasmid transfection is easily explainable by the fact that mRNA has a short cellular half-life and thus, expression of the gene of interest does not last for a prolonged period of time. In addition to transfecting marker genes, mRNA transfection may also be useful to either transfect cell surface receptors like integrins or chemokine receptors in order to improve stem cell homing or transcription factors in order to improve stem cell transdifferentiation. The fact that very high expression levels last for three days only and then quickly disappear may be advantageous for any kind of application that requires transient and intense but no continuous change of stem cell properties. Thus, although short term gene expression may

be seen as a limitation of non-viral gene delivery, it may also be considered as being superior with regards to *in vivo*-application, because it provides a safety advantage in the clinical setting by avoiding uncontrolled gene expression. mRNA has no potential to integrate into the host genome thereby obviating safety concerns, as for example insertional mutagenesis. The latter is an important advantage of this methodology for potential use in clinical trials[7,8].

A critical parameter in determining quality and efficiency of non viral gene delivery is the viability of cells after the transfection process. Our results demonstrate that cell viability following mRNA transfection is significantly better compared to that following plasmid transfection. This finding is in accordance with previous reports showing that viability after mRNA transfer by electroporation was markedly improved compared to DNA transfection[9,10,11]. mRNA is a normal constituent of the cell and thus less toxic than plasmid DNA. Also, only one membrane (i.e. the cell membrane, and not additionally the nuclear membrane), needs to be overcome to create a biologically active cell constituent. Since entry into the nucleus as well as transcriptional regulation associated with plasmids is avoided, mRNA transfection is a valid alternative for non viral gene delivery[7,12,13].

In summary, mRNA based nucleofection is a powerful, highly efficient and non-toxic approach for transient labelling of human progenitor cells or, via transfection of selective proteins, for transient manipulation of stem cell function. It is easy to adopt to GMP protocols with the aim to combine principles of gene therapy and tissue engineering.

1. Miyahara, Y., et al. *Nat Med.* **12** 459-65 (2006).
2. Orlic, D., et al. *Nature.* **410**, 701-705 (2001).
3. Murry, C.E., et al. *Nature.* **428**, 664-668 (2004).
4. Wu, M.H., Liebowitz, D.N., Smith, S.L., Williams, S.F., Dolan, M.E. *Gene Ther.* **8**, 384-390 (2001).
5. Wiehe, J.M., et al., *Regen. Med*. **1**, 223–234 (2006).
6. Jones, E.A., et al. *Arthitis & Rheumatism* **46**, 3349-3360 (2002).
7. Lu, D., Benjamin, R., Kim, M., Conry, R.M., Curiel, D.T. *Cancer Gene Ther.* **4***,* 245-252 (1994).
8. Ying, H., et al. *Nat. Med.* **5**, 823-827 (1999).
9. Van Tendeloo, V.F., et al. *Blood.* **98**, 49-56 (2001).
10. Van De Parre, T.J., Martinet, W., Schrijvers, D.M., Herman, A.G., De Meyer, G.R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **327**, 356-360 (2005).
11. Martinet, W., Schrijvers, D.M., Kockx, M.M. *Biotechnol. Lett.* **25**,1025-1029 (2003).
12. Kariko, K., Kuo, A., Barnathan, E.S., Langer, D.J. *Biochim. Biophys. Acta.* **1369**, 320-334 (1998).

13. Sawai, K., Ohno, K., Iijima, Y., Levin, B., Meruelo, D. *Mol. Genet. Metab.* **64**, 44-51 (1998).

Figure legends

1A

Efficiency of mRNA- transfection into human CD34-positive HPC and MSC.

$2x10^6$ cells were transfected with 5µg mRNA or 2µg plasmid DNA using nucleofection. FACS analysis was performed after 1-10d. Three independent experiments were performed with cells of three different donors. (A) CD34-positve HPC transfected with EGFP. (B) CD34-positve HPC transfected with LNGFR. (C) MSC transfected with EGFP. (D) MSC transfected with LNGFR. 24h transfection efficiency was extremely high using mRNA.

1B

Viability of human CD34-positive HPC and MSC after mRNA transfection.

Viability was determined by trypan-blue and flow cytometry (scatter exclusion) 1 to 10d after nucleofection. Transfection with mRNA is significantly less toxic than with plasmid DNA. Mock transfected cells were used as negative control.

1C

Representative example of Median Fluorescence Intensity (MFI) of mRNA and plasmid transfected cells to determine transgene expression differences in positive cells 24h after transfection. Upper panel: EGFP; Lower panel: LNGFR.

2

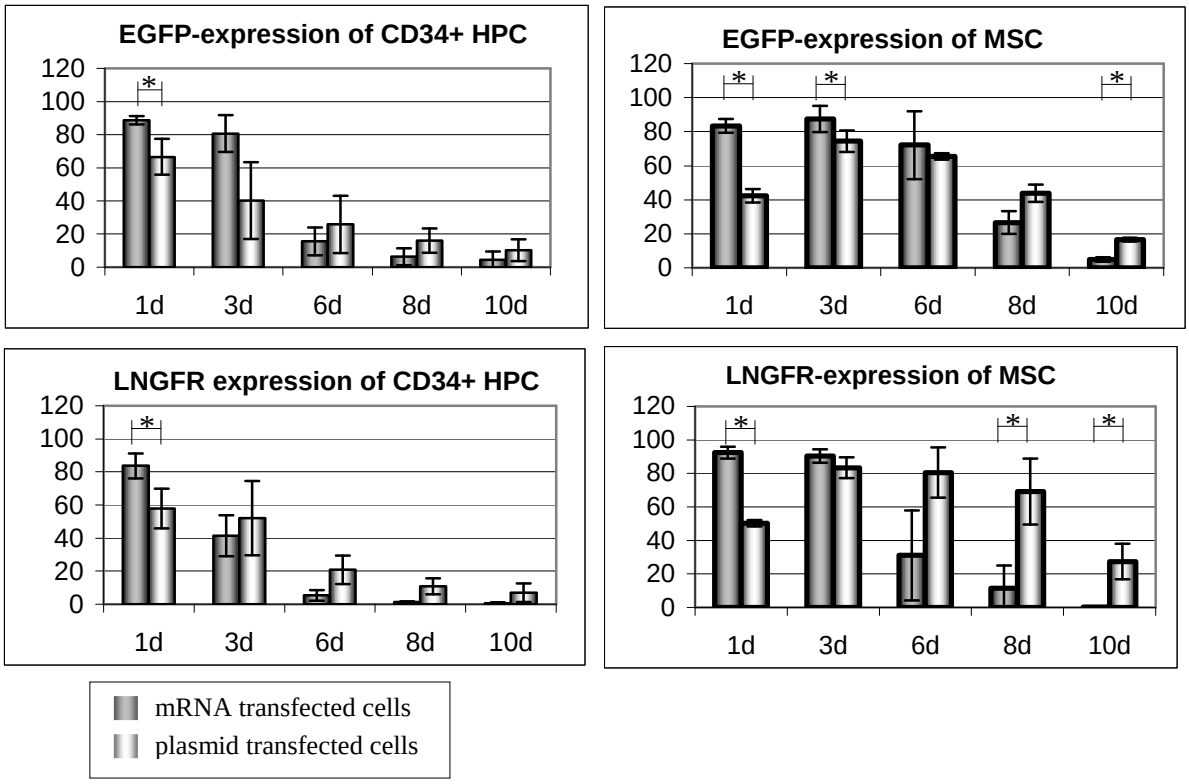
Differentiation potency is not altered by nucleofection.

Adipogenic, chondrogenic and osteoblastic differentiation was induced after fluorescence-activated cell sorting of untransfected, mock-transfected and LNGFR-transfected MSC. Control assays were performed in αMEM supplemented with 20% FBS. For details see **supplementary Methods** online. Magnification factor is 400 for adipogenic differentiation and 40 for chondrogenic and osteogenic differentiation.

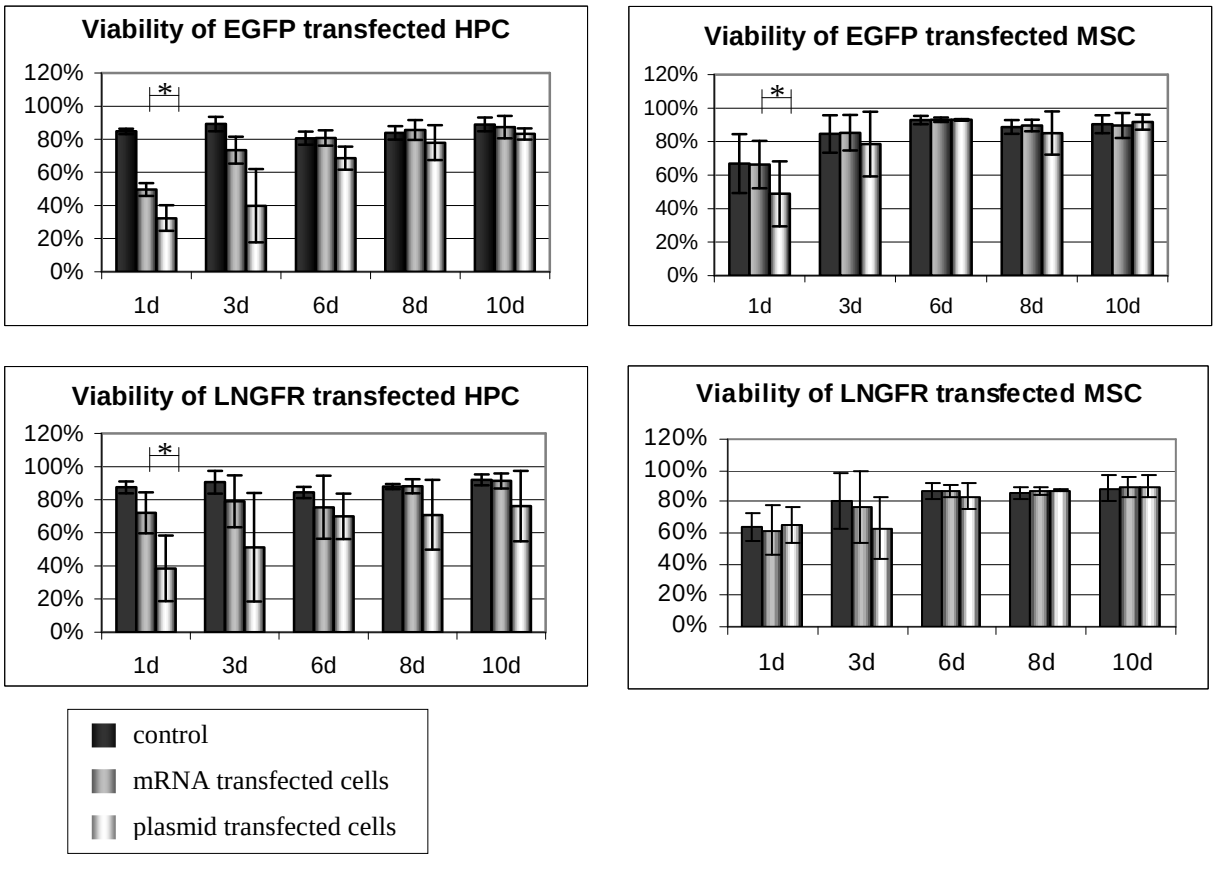
Figures

Figure 1

A)



B)



C)

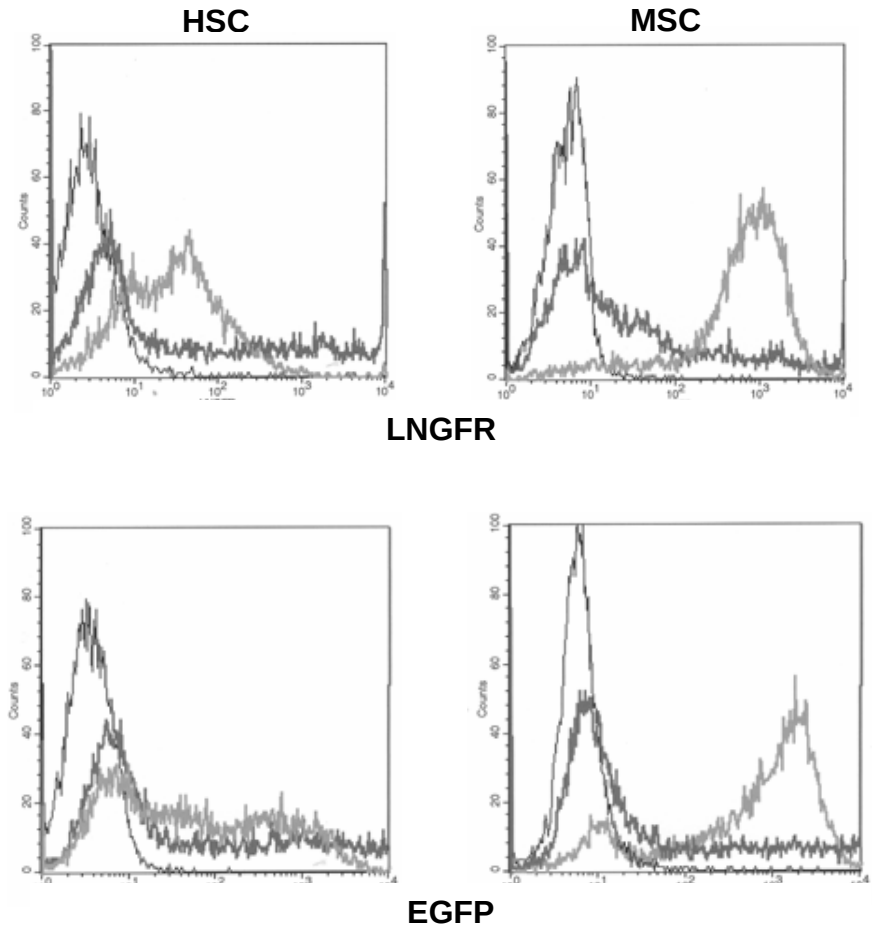
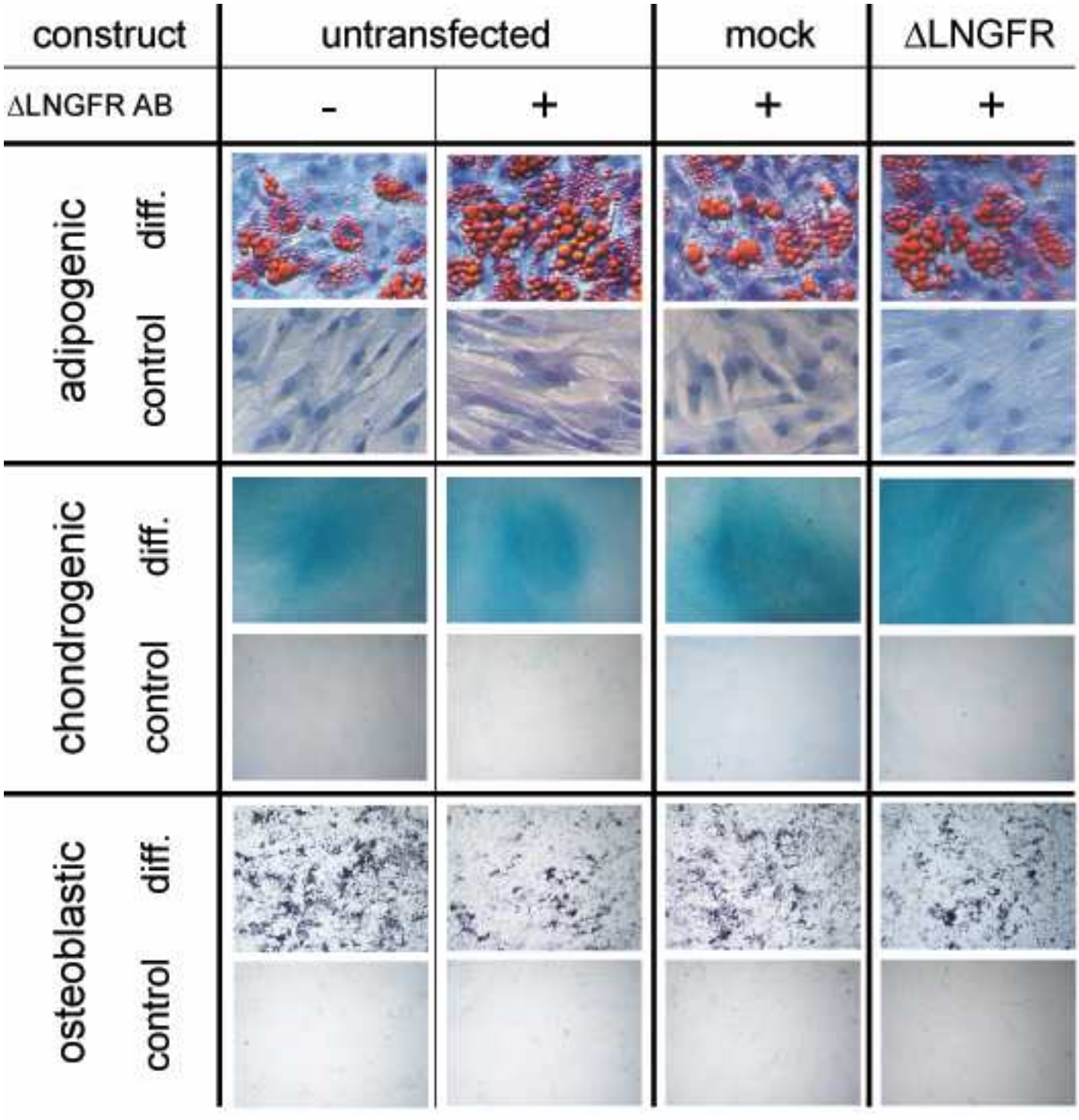


Figure 2


construct
untransfected
mock
ΔLNGFR
ΔLNGFR AB
-
+
+
+
adipogenic
diff.
control
chondrogenic
diff.
control
osteoblastic
diff.
control

Supplementary

Methods

MSC/Differentiation Assays

Spongiosa from femur or tibia was obtained from three healthy donors after formal consent. MSC were isolated from trabecular meshwork after adhesion to positively charged plastic surface (NUNC, Wiesbaden, Germany) for 24h in complete αMEM (Cambrex, Verviers, Belgium), supplemented with 20% heat inactivated FBS (Gibco, Karlsruhe, Germany). Early passages (passage 2 - passage 4) were used for experiments. Cells were collected after 10-14d using trypsin (Gibco) and plated at densities of 100-300 cells/cm^2. Medium was changed twice a week. To determine viability, the supernatant of cell culture, containing the dead cells, was withdrawn and together with trypsinised MSC centrifugated at 300g for 5min. Viability was determined by trypan-blue exclusion and in flow cytometry by scatter exclusion.

Antibodies used for characterization of MSC included: CD14 (M5E2), CD29 (HUTS-21), CD34 (581), CD44 (G44-26), CD45 (HI30), CD166 (3A6) (BD Pharmingen, Heidelberg, Germany) CD105 (SN6) (Biozol-Serotec, Eching, Germany). 10^6 cells were incubated with primary antibodies and relative fluorescence intensity of cells was acquired using a BD FACSDiva Software 4.1.2 on a BD FACSAria (BD Immunocytometry Systems, Heidelberg, Germany) **(Figure 1 suppl.)**.

For differentiation assays, $2.75x10^3$-10^4 cells/cm^2 were seeded and differentiation was induced. Adipogenic differentiation medium was purchased from Cambrex BioScience, Walkersville, MD, USA, chondrogednic and osteogenic differentiation media were purchased from Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Germany. Assays were fixed in 4% paraformaldehyde and (i) osteoblasts were stained for alkaline phosphatase activity, (ii) adipogenic differentiation was monitored by staining with a saturated Oil RedO solution and (iii) chondrogenic differentiation was performed by Alcian Blue staining. Senescent cells were detected using senescent cell staining kit (all materials from SIGMA, Taufkirchen, Germany, except Alcian Blue/Nuclear Fast Red staining kit (Dako, Hamburg, Germany) **(Figure 2 suppl.)**.

In vitro transcription

Linearized plasmids were purified using the *nucleotid removal kit* (Qiagen, Hilden, Germany) and were used as DNA templates for the *in vitro* transcription reaction. Transcription was conducted using the T7 Opti-mRNA transcription kit (Cure Vac GmbH, Tuebingen, Germany). Purification of mRNA was performed by *DNas*e I digestion. To add a poly-A tail to the mRNA, the Poly(A) Tailing Kit (Ambion) was used. The mRNAs were finally precipitated by LiCl. The mRNA concentration was assayed by spectrophotometric analysis at OD_{260}.

Nucleofection

CD34-positive HPC and MSC were pelleted and resuspended in human CD34 Cell Nucleofector™ Solution (Amaxa GmbH, Köln, Germany) at 2-3x10^6 or 5x10^5 cells per 100 µl, respectively. Cells were nucleofected with 5 µg mRNA or 2 µg plasmid DNA using program U-08 (for HPC) or C-17 (for MSC) of the nucleofector device. After nucleofection, cells were immediately mixed with 500 µl prewarmed culture medium and transferred into well plates containing prewarmed medium. Cells were incubated at 37℃ over a time period of 10 days. Three independent experiments using samples of three different donors were performed.

Fluorescence activated cell sorting

Non-transfected and mock-transfected cells as well as cells transfected with ΔLNGFR mRNA were stained with anti-LNGFR-antibody. Transfected living cells (passage 4) were enriched to a purity of 99.4% by fluorescence activated cell sorting using a BD FACSAria (100 µm nozzle, sheet pressure 20 psi). Untransfected and unstained cells were used as controls (sort gate was set as live gate in the forward scatter versus sideward scatter dot blot). Differentiation assays were performed for all populations as described above, except initial cell count was 7.2x10^4–1.6x10^5 for adipogenic differentiation assays and the corresponding controls.

Figure legends

Figure 1:

Characterisation of undifferentiated MSC by flow cytometry.

MSC express CD29, CD44, CD105 (endoglin) and CD166 but are negative for CD14, CD34 and CD45.

Figure 2: MSC differentiation.

Adipogenic (A), osteogenic (C) and chondrogenic (E) differentiation was induced as described above. Negative controls were set up in αMEM, supplemented with 20% FBS. Successful differentiation was monitored by histological staining. Initial cell count was 200.000 for adipogenic differentiation assays and 45.000 for osteogenic and adipogenic differentiation assays. Differentiation of one representative MSC-preparation is shown. Magnification factor is 400 for adipogenic differentiation and 40 for chondrogenic and osteogenic differentiation.

Figures

Figure 1

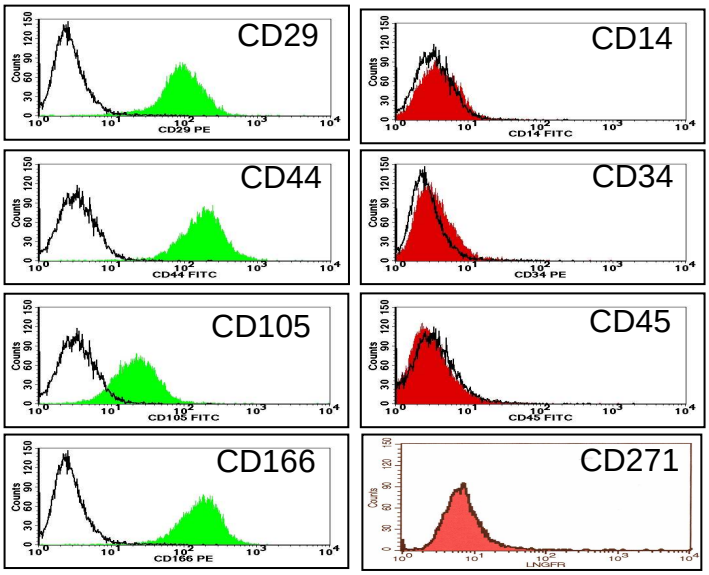
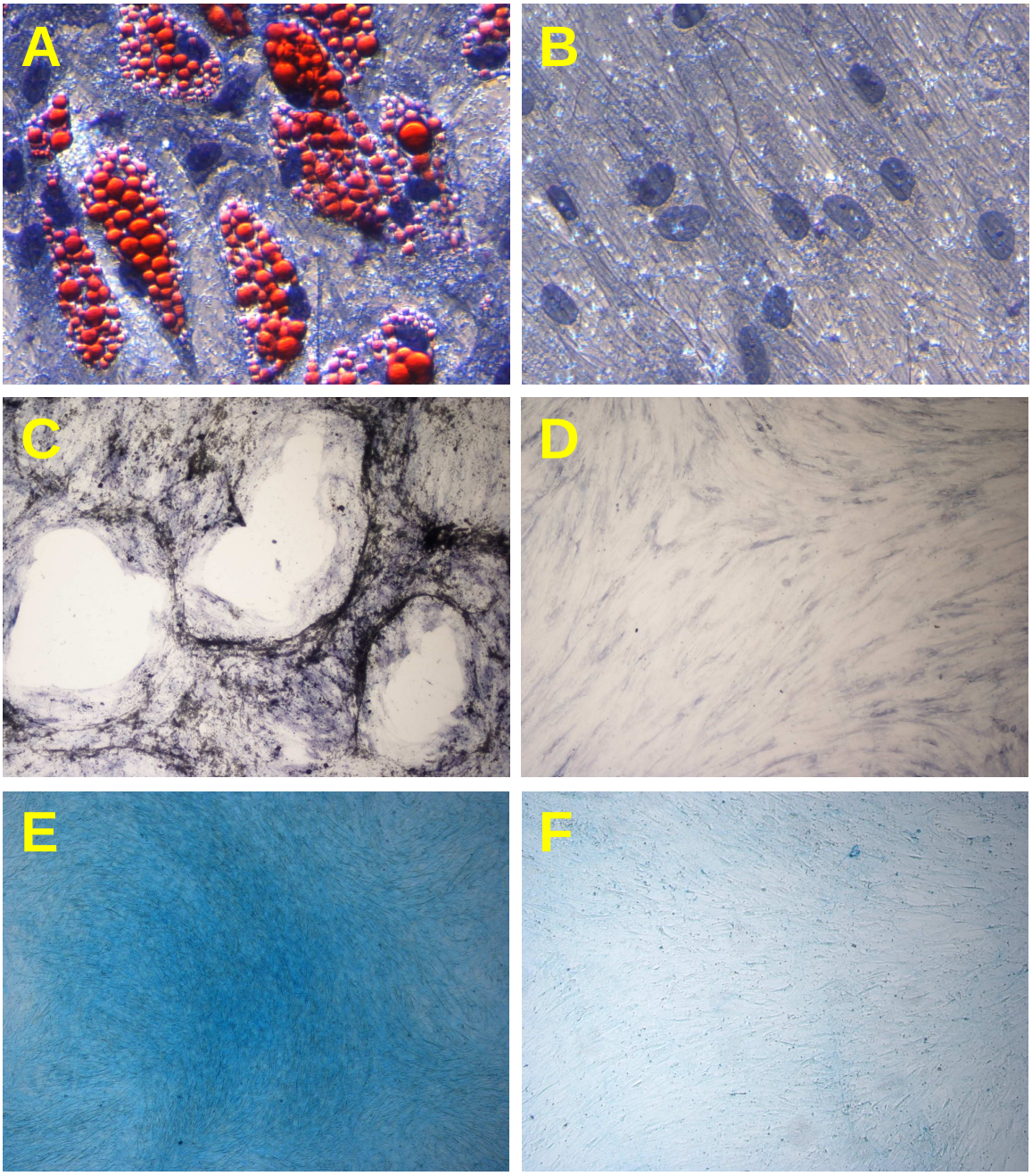


Figure 2



8 Danksagungen

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlichst bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dem ärztlichen Direktor der Abteilung Innere Medizin II des Universitätsklinikums Ulm, Herrn **Prof. Dr. Vinzenz Hombach**, danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu können.

Herzlichst bedanke ich mich bei Herrn **Prof. Dr. M. phil. Jan Torzewski**, für die Bereitstellung des Themas, des Laborplatzes, die ausgezeichnete Betreuung und die Anteilnahme am Fortschreiten meiner Arbeit aber auch für seine entspannte und offene Art die Arbeitsgruppe zu führen. Er war mir ein Doktorvater wie man ihn sich wünscht. Vielen, vielen Dank hierfür!

Bei Frau **Dr. hum. biol. Juliane Wiehe** bedanke ich mich aufs herzlichste für die hervorragende Betreuung, für die Geduld beim Einarbeiten in die Methodik, die Korrektur des Manuskripts und die vielen kleinen Arbeitsschritte die sie mir abgenommen hat. Aber vor allem bedanke ich mich für die Möglichkeit immer und immer wieder Fragen stellen zu können und auf kompetente Antworten zu stoßen. Ohne sie hätten die Experimente niemals so schnell und komplikationslos funktioniert. Ich hätte es nicht besser treffen können!

Außerdem bedanke ich mich bei den medizinisch- technischen Assistentinnen des Labors **Magdalena Bienek- Ziolkowski** und **Andrea Bucher** für die Möglichkeit Fragen zu stellen und die nette Atmosphäre.
Herrn **Dr. Dimitar Manolov** danke ich für seine nette Gesellschaft im Labor, seine entspannte Art und die aufmunternden Worte.

Herrn **Dr. Markus Rojewski** von der Abteilung Transfusionsmedizin der Universität Ulm danke ich für die Bereitstellung und Aufreinigung der Stammzellen.

Meinen Eltern bin ich dankbarer als man es je in ein paar Zeilen fassen könnte. Sie haben mich das ganze Studium und die Doktorarbeit hindurch immer ohne Bedingungen unterstützt, bestärkt und ermutigt. Aber weit über das hinaus für die Gewissheit, dass sie immer für mich da sind und sein werden. Ihr seid schwer in Ordnung!

9 Lebenslauf

Name:	Desiree Kronawitter
Nationalität:	Deutsch
Geburtsdatum:	29.04.1983
Geburtsort:	Krumbach (Schwaben)
Eltern:	Peter und Andrea Kronawitter
Familienstand:	ledig

Schule:

1989-1993 Grundschule Deisenhausen

1993-2002 Gymnasium Krumbach

Studium:

Oktober 2002- jetzt Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm

September 2004 Ärztliche Vorprüfung

Promotion:

September 2005- Dezember 2006

Arbeitsgruppe Prof. Dr. J. Torzewski

Thema:

Hocheffiziente genetische Markierung von Humanen CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen durch mRNA-Gentransfer