

Aus der Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg / Saar  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. D. Kohn  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg / Saar

**Nichtviraler Gentransfer in  
humane mesenchymale Stammzellen**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*  
**der Medizinischen Fakultät**  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2010

vorgelegt von: Sebastian Elsler

geb. am: 12.10.1980 in Starnberg

Diese Arbeit wurde angefertigt am Institut für Experimentelle Orthopädie des Universitätsklinikums des Saarlandes unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Henning Madry.

*Für Ulrike und meine Familie*

---

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>5</b>
<b>Abstract</b>	<b>6</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>7</b>
2.1 Problematik und klinische Relevanz	7
2.2 Humane adulte mesenchymale Stammzellen als therapeutische Plattform	9
2.3 Gentransfer in humane adulte mesenchymale Stammzellen	11
2.4 Effekt von Hyaluronidase auf die Transfektion	15
2.5 Fragestellung	17
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>18</b>
3.1 Materialien und Geräte	18
3.2 Methoden	20
3.2.1 Isolierung von mesenchymalen Stammzellen und Kultur	20
3.2.1.1 Passage der mesenchymalen Stammzellen	21
3.2.1.2 Zellzählung	22
3.2.2 Transfektionsreagenzien	23
3.2.2.1 FuGENE <sup>®</sup> 6	23
3.2.2.2 Metafectene <sup>®</sup>	24
3.2.2.3 Lipofectamine <sup>™</sup> 2000	25
3.2.2.4 Lipofectamine <sup>™</sup> und PLUS <sup>®</sup>	26
3.2.2.5 DreamFect <sup>™</sup>	27
3.2.2.6 DreamFect <sup>™</sup> Gold	28
3.2.2.7 GeneJammer <sup>®</sup>	29
3.2.2.8 Effectene <sup>®</sup>	30
3.2.2.9 TurboFectin 8.0 <sup>™</sup>	31
3.2.2.10 <i>TransIT</i> <sup>®</sup> -LT1	32
3.2.2.11 GeneJuice <sup>®</sup>	33
3.2.2.12 TransPass <sup>™</sup> D2	34
3.2.2.13 jetPEI <sup>™</sup>	35
3.2.2.14 EcoTransfect <sup>™</sup>	36
3.2.2.15 <i>DMRIE-C</i>	37

3.2.3 Hyaluronidase	39
3.2.4 Plasmid-DNS	39
3.2.5 Markergene und Nachweismethoden	40
3.2.5.1 Luziferase	40
3.2.5.2 $\beta$ -Galaktosidase	42
3.2.6 Zytotoxizitätsbestimmung	42
3.2.7 Gesamtproteinbestimmung	44
3.2.8 Zusammenfassung der Arbeitsschritte	46
3.2.9 Statistische Auswertung	47
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>48</b>
4.1 Zytotoxizität	48
4.2 Luziferase-Messung	50
4.2.1 FuGENE <sup>®</sup> 6	50
4.2.2 Metafectene <sup>®</sup>	51
4.2.3 Lipofectamine <sup>™</sup> 2000	52
4.2.4 Lipofectamine <sup>™</sup> und PLUS <sup>®</sup>	53
4.2.5 DreamFect <sup>™</sup>	54
4.2.6 DreamFect <sup>™</sup> Gold	55
4.2.7 GeneJammer <sup>®</sup>	56
4.2.8 Effectene <sup>®</sup>	57
4.2.9 TurboFectin 8.0 <sup>™</sup>	58
4.2.10 <i>TransIT</i> <sup>®</sup> -LT1	59
4.2.11 GeneJuice <sup>®</sup>	60
4.2.12 TransPass <sup>™</sup> D2	61
4.2.13 jetPEI <sup>™</sup>	62
4.2.14 EcoTransfect <sup>™</sup>	63
4.2.15 <i>DMRIE-C</i>	64
4.2.16 Vergleich der Transgenexpressionen	64
4.3 Transgenexpression im Verhältnis zur Toxizität	66
4.4 Effizienzbestimmung	68

---

<b>5. Diskussion</b>	<b>71</b>
5.1 Ergebnisse unserer Untersuchungen	71
5.2 Bisherige Arbeiten zur Transfektion mesenchymaler Stammzellen	74
5.3 Therapeutische Kandidatengene	76
5.4 Ausblick	78
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>80</b>
<b>7. Publikationen</b>	<b>91</b>
<b>8. Dank</b>	<b>93</b>
<b>9. Lebenslauf</b>	<b>94</b>

**Tabellen und Abbildungen**

Tabelle 1	Übersicht über die Gentransfermethoden	12
Tabelle 2	Übersicht über die verwendeten Geräte	18
Tabelle 3	Übersicht über die verwendeten Materialien	19
Tabellen 4 – 18	Ergebnistabellen der Luziferaseaktivität	50 - 64
Tabelle 19	Transgenexpression in Relation zur Toxizität je Reagenz	66
Abbildung 1	Humane adulte mesenchymale Stammzellen nach Expansion <i>in vitro</i>	9
Abbildung 2	Differenzierungspotenzial adulter mesenchymaler Stammzellen	10
Abbildung 3	Schematische Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation	20
Abbildung 4	Neubauer-Zählkammer mit den auszuzählenden Quadraten	22
Abbildung 5	Verteilung der <i>wells</i> in der 96- <i>well</i> Platte	38
Abbildung 6	Die Luziferasereaktion	40
Abbildung 7	Die Reaktion der LDH	43
Abbildung 8	Standardkurve der BCA Messung zur Gesamtproteinbestimmung	45
Abbildung 9	Zytotoxizitätsbestimmung der Reagenzien nach Einsatz an humanen adulten mesenchymalen Stammzellen	48
Abbildung 10	Expression des Luziferasegens je Reagenz	65
Abbildung 11	Transgenexpression in Relation zur Toxizität	67
Abbildung 12	Vergleich von Luziferaseexpression und Effizienz nach X-Gal Färbung	69
Abbildung 13	X-Gal Färbung transfizierter humaner adulter mesenchymaler Stammzellen	70

### *1. Zusammenfassung*

Die Applikation genetisch modifizierter humaner adulter mesenchymaler Stammzellen (hMSZ) ist ein experimenteller Ansatz zur Behandlung von Gelenkknorpeldefekten. Diese multipotenten Vorläuferzellen können zu verschiedenen Zellen, unter anderem Chondrozyten, ausdifferenzieren. Diesen Differenzierungsprozess zu verbessern ist das Ziel einer genetischen Modifikation von hMSZ. Nichtvirale Gentransfermethoden waren bei diesen Zellen bisher wenig effektiv. In dieser Arbeit untersuchten und verglichen wir systematisch 15 verschiedene nichtvirale Transfektionssysteme in Bezug auf ihre Effizienz und Toxizität bei hMSZ unter Einsatz verschiedener Marker- und Kontrollgene. Zusätzlich wurde der Effekt einer Inkubation mit Hyaluronidase auf die Gentransfereffizienz bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass hMSZ nichtviral transfizierbar sind. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass das Polyamin GeneJammer<sup>®</sup> die maximale Gentransfereffizienz erzielt und dass diese durch Inkubation mit Hyaluronidase um das 1,4-fache auf  $25 \pm 15\%$  gesteigert werden konnte. Diese effiziente nichtvirale Modifikation von hMSZ könnte zukünftig in Protokollen zum therapeutischen Gentransfer zur Anwendung kommen.

## 1. Abstract

### *Nonviral gene transfer in human mesenchymal stem cells*

Application of genetically modified human adult mesenchymal stem cells (hMSCs) is an experimental approach to treat articular cartilage defects. These progenitor cells can differentiate into different types of tissues including cartilage. Genetic manipulation of hMSCs might enhance this process of chondrogenesis. Nonviral transfection reagents exhibited so far only reduced transfection efficiencies. In the present work, we systematically compared 15 nonviral transfection systems for their efficiency and cytotoxicity in hMSCs using different marker and control genes. The effect of incubating cells prior to and during transfection with hyaluronidase was also investigated. The present findings demonstrate that hMSCs can be transfected via nonviral gene transfer systems and that the efficiency of the optimal reagent (GeneJammer<sup>®</sup>) can further be improved 1.4-fold in the presence of hyaluronidase to  $25 \pm 15\%$ . This approach of nonviral genetic modification of hMSCs may find application in therapeutic gene transfer protocols in the future.

## 2. Einleitung

### 2.1 Problematik und klinische Relevanz

Gelenkknorpeldefekte regenerieren nicht, egal ob sie durch degenerative Prozesse hervorgerufen wurden oder als Folge eines Traumas entstanden sind (O'Driscoll 1998; Hunziker 2002). Je nach Lokalisation und Schweregrad der Knorpelverletzung existieren unterschiedliche Behandlungsansätze (Martinek et al. 2003; Madry und Kohn 2004; Simon und Jackson 2006; Khan et al. 2010). Eine frühzeitige Intervention und möglichst rasche Rehabilitation stehen vor allem bei traumatisch bedingten Knorpelläsionen im Vordergrund. Gelingt in diesen Fällen eine hinreichende Knorpelreparatur können Langzeitfolgen der Immobilisation für das Gelenk und den gesamten Organismus vermieden und das Risiko einer sekundären Arthrose verringert werden (Fritz et al. 2008; Schulze-Tanzil 2009).

Zur operativen Behandlung von Knorpeldefekten stehen eine Vielzahl von Maßnahmen zur Verfügung (Buckwalter und Mankin 1998; Bekkers et al. 2009; Ahmed und Hincke 2010). Sie haben das Ziel, eine möglichst komplette Wiederherstellung der Knorpelarchitektur zu erreichen. Je nach Tiefe und Ausdehnung der Knorpelschädigung haben sich dabei unter anderem markraumeröffnende Verfahren wie die Mikrofrakturierung (Steadman et al. 2003), die Abrasionsarthroplastik (Johnson 1986) oder die Pridie-Bohrung (Pridie 1959; Müller und Kohn 1999) für chondrale Defekte bis zu drei Quadratzentimeter Fläche etabliert (Knutsen et al. 2004; 2007; Madry und Pape 2008). Hauptzweck dieser Verfahren ist, dass durch das Eröffnen des Markraums Knochenmarkszellen in das geschädigte Knorpelareal eingeschwemmt werden, welche an der Bildung eines fibrocartilaginären Ersatzgewebes beteiligt sind. Das hierbei gebildete Gewebe ist jedoch durch seine eher faserknorpelige Zusammensetzung im Vergleich zum originären hyalinen Gelenkknorpel weniger elastisch und degeneriert relativ rasch (O'Driscoll 1998). Eine dauerhafte Heilung eines so behandelten Knorpeldefektes bleibt somit unsicher.

Die autologe Chondrozytentransplantation (Brittberg et al. 1994) wird hauptsächlich zur Behandlung von größeren Gelenkknorpeldefekten mit einem Ausmaß von drei bis etwa zehn Quadratzentimeter Fläche eingesetzt (Knutsen et al. 2004; 2007; Madry und Pape 2008; Basad et al. 2010). Hierbei werden spendereigene Knorpelfragmente aus einer wenig belasteten Zone des Kniegelenks entnommen, die Chondrozyten anschließend in Zellkulturlaboren enzymatisch isoliert und vermehrt und dem Patienten in einer weiteren Operation in den zuvor sorgfältig präparierten Knorpeldefekt implantiert (Brittberg et al. 1994; Knutsen et al. 2004; 2007; Vasiliadis et al. 2010). Mit dieser Behandlung konnten bereits bei korrekter Indikation relativ gute Ergebnisse erzielt werden (Knutsen et al. 2004; 2007; Saris et al. 2009). Dem gegenüber stehen jedoch die bei dieser Behandlung anfallenden hohen Kosten und der nicht vorhersagbare Behandlungserfolg. Bei Verwendung eines Periostlappens zur Deckung kann es zudem zu dessen Delamination (Driesang und Hunziker 2000) oder zur Hypertrophie kommen (Budri et al. 2006; Niemeyer et al. 2008). Ebenfalls nachteilig sind bei dieser Therapie die Notwendigkeit eines zweizeitigen Eingriffs und der zu setzende Knorpelschaden zur Entnahme des Gewebes.

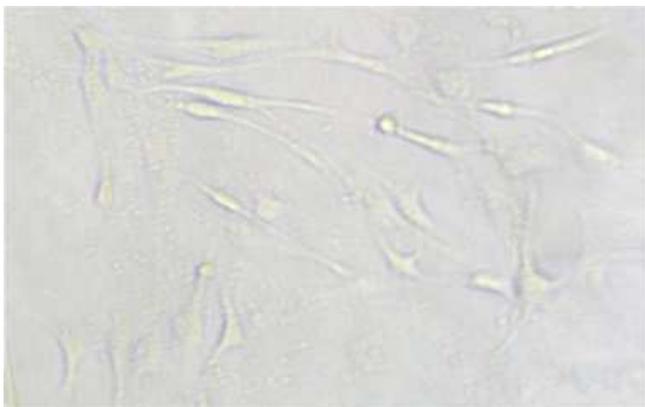
Bei sehr ausgedehnten Defekten des Knorpelgewebes oder generalisierter Arthrose eines Gelenkes bleibt oftmals nur der endoprothetische Oberflächenersatz in Form einer unikondylären oder Totalendoprothese, denn keine derzeit etablierte Behandlungsform erzielt eine Regeneration des körpereigenen Gelenkknorpels in seiner ursprünglichen Form (Messner und Gillquist 1996; Buckwalter und Mankin 1998). Das Verwenden körpereigener Zellen mit der Potenz sich in Knorpel umzuwandeln erscheint somit für die Reparatur oder Regeneration von Knorpeldefekten sehr reizvoll (Kafienah et al. 2007; Granero-Molto et al. 2008; Khan et al. 2010).

## 2.2 Humane adulte mesenchymale Stammzellen als therapeutische Plattform

Im Vergleich zu den gängigen operativen Maßnahmen zur Knorpelreparatur erscheint die minimalinvasive Entnahme, deren Kultur und anschließende Applikation von adulten mesenchymalen Stammzellen attraktiv (Khan et al. 2010; Sensebé et al. 2010). Diese potentiell knorpelbildenden Zellen können aus Knochenmarkspiraten isoliert und direkt in geschädigte Areale eingebracht werden ohne dabei wie bisher an anderer Stelle einen Defekt im Knorpelgewebe zur Entnahme von Knorpelzellen setzen zu müssen (Vinatier et al. 2009; Huang et al. 2010). Neben ihrer chondrogenen Potenz (Johnstone et al. 1998; Koga et al. 2009; Richter 2009) wären dabei auch die antiinflammatorische und immunsuppressive Wirkung der mesenchymalen Stammzellen auf das sie umgebende synoviale Gewebe von großem Nutzen (Chen und Tuan 2008; Sensebé et al. 2010).

Mesenchymale Stammzellen wurden erstmals 1970 beschrieben (Friedenstein et al. 1970). Es handelt sich dabei um mononukleäre Vorläuferzellen mit fibroblastenartigen Ausläufern (Abb. 1). Sie können aus Knochenmark über eine Dichtegradientenzentrifugation (Böyum 1968) und auf Grund ihres adhärenen Wachstums an Plastikoberflächen isoliert werden (Nadri et al. 2007). Mit Hilfe spezieller Nährmedien und Protokolle werden sie anschließend *in vitro* kultiviert.

**Abbildung 1: Humane adulte mesenchymale Stammzellen nach Expansion *in vitro***

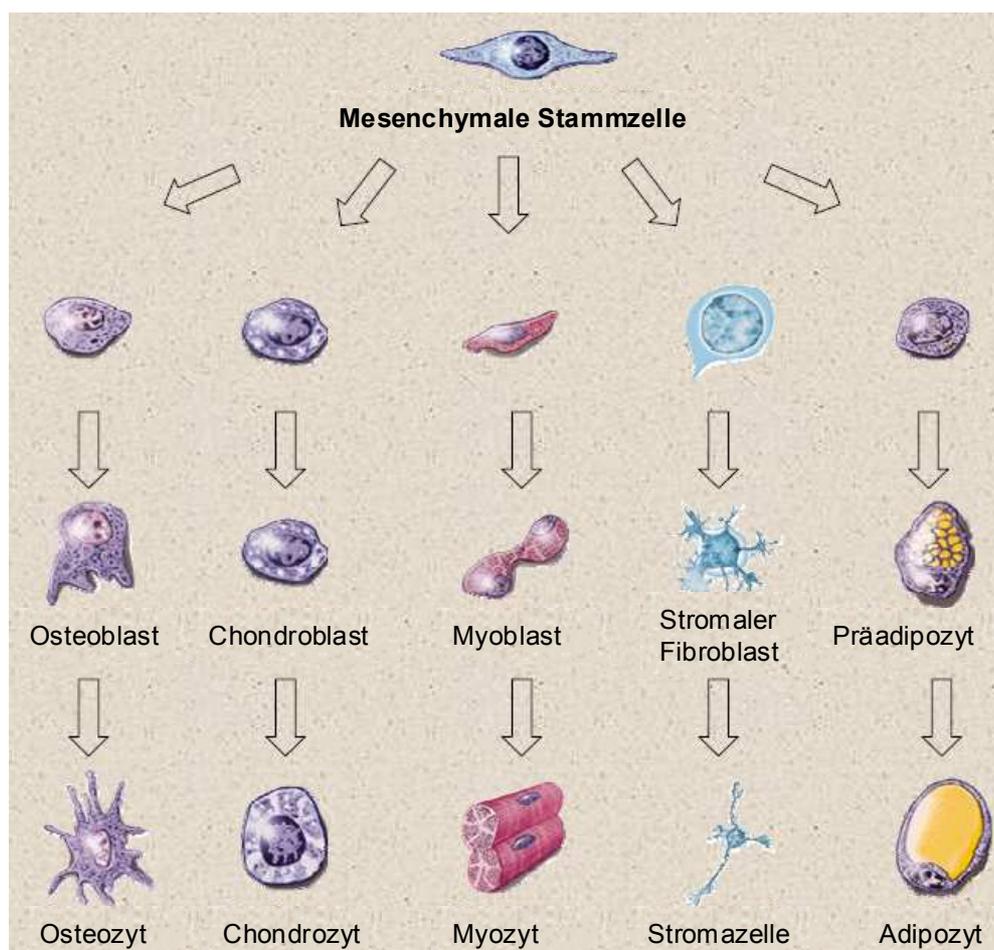


Lichtmikroskopie bei 100-facher Vergrößerung.

Adulte mesenchymale Stammzellen haben die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Gewebe (Pittenger et al. 1999). Ebenso ist es theoretisch möglich, Stammzellen durch ihre Potenz zur Selbstreplikation unbegrenzt *in vitro* zu kultivieren (Xiao et al. 2009). In Verbindung mit der Differenzierbarkeit zu spezialisierten Zellen wie Chondrozyten, sind mesenchymale Stammzellen für *tissue engineering*, der künstlichen Gewebezüchtung, sehr interessant (Caplan 2005; Dragoo et al. 2007; Gao et al. 2007; Granero-Molto et al. 2008).

Abbildung 2 zeigt eine Übersicht über die Differenzierungslinien, in welche mesenchymale Stammzellen bisher überführt werden konnten.

**Abbildung 2: Differenzierungspotenzial adulter mesenchymaler Stammzellen**



(adaptiert aus: *Mesenchymal stem cells of human adult bone marrow*. Pittenger Mark und Marshak Daniel in: *Stem cell biology*. Marshak Daniel, Gardner Richard und Gottlieb Daniel, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001).

Der vielversprechende Ansatz adulte mesenchymale Stammzellen zur Reparatur von Knorpeldefekten zu nutzen (Solchaga et al. 2004; Dragoo et al. 2007; Gao et al. 2007) könnte durch die Möglichkeit einer genetischen Modifizierung dieser Zellen und der damit verbundenen Steuerbarkeit der Differenzierung weiter optimiert werden (Evans et al. 2000; Grande et al. 2003). Betroffenen Patienten könnten so körpereigene mesenchymale Stammzellen entnommen, diese unter optimalen Bedingungen *in vitro* vermehrt und anschließend durch das Einschleusen spezieller Gene derartig modifiziert werden, dass die Chondrogenese dieser Zellen verstärkt wird (Martinek et al. 2003; Palmer et al. 2005; Weiss et al. 2010). Das so gewonnene autologe Knorpelgewebe stünde dann für therapeutische Zwecke zur Verfügung. Dabei scheint in der Differenzierungskaskade von mesenchymalen Stammzellen zum chondrogenen Gewebe neben den potentiell therapeutischen Genen (siehe 5.3) auch der die Zellen umgebende Sauerstoffgehalt eine wichtige Rolle zu spielen (Moussavi-Harami et al. 2004; Fehrer et al. 2007; Markway et al. 2009). Der Einfluss mechanischer Reize auf die Stammzellen im Hinblick auf eine verbesserte Differenzierung wird dagegen kontrovers diskutiert (Angele et al. 2004; Kelly und Prendergast 2005; Schumann et al. 2006).

### *2.3 Gentransfer in humane adulte mesenchymale Stammzellen*

Zur Umsetzung einer genetischen Modifizierung von mesenchymalen Stammzellen ist ein stabiler, sicherer und effizienter Gentransfer in diese Zellen wünschenswert, denn die Expression des erforderlichen Gens durch die Zellen selbst bietet gegenüber der alleinigen Kultivierung und Inkubation mit Wachstumsfaktoren einige Vorteile. Das Genprodukt kann so über einen längeren Zeitraum von den Zellen produziert werden, die Produktion kann auch nach einer möglichen Transplantation beispielsweise in einen Knorpeldefekt fortgesetzt werden und sie ist räumlich auf Areale mit zuvor eingebrachten, modifizierten Stammzellen begrenzt.

Prinzipiell gibt es verschiedene Möglichkeiten, Fremdgene in humane adulte mesenchymale Stammzellen einzuschleusen. Es stehen hierfür die gleichen Methoden zur Verfügung wie sie bereits bei anderen Zelllinien erfolgreich eingesetzt werden. Folgende Tabelle gibt eine kurze Übersicht über etablierte Methoden des Gentransfers (Tab. 1).

**Tabelle 1: Übersicht über die Gentransfermethoden**

Nichtvirale Systeme		Virale Systeme		
Physikalische Methoden	Lipide, Liposomen und lipidähnliche Substanzen	Retrovirale Vektoren	Adenovirale Vektoren	Adeno-assoziierte virale Vektoren
<b>Vorteile</b>	Niedrige Toxizität, Transfektion nicht Zellzyklusabhängig, Keine Immunogenität	Relativ hohe Effizienz	Sehr hohe Effizienz, Transduktion nicht zellzyklusabhängig	Sehr hohe Effizienz, Keine Induktion einer Immunantwort, Transduktion nicht zellzyklusabhängig
<b>Nachteile</b>	Effizienz ist zellspezifisch	Transduktion zyklusabhängig, Risiko der Tumorentstehung	Induktion einer Immunantwort, Replikationsrisiko	Helfer-Virus wird zur Herstellung benötigt
<b>Integration in das Genom</b>	Nein	Ja	Nein	Wirtsabhängig

Modifiziert nach Madry (Madry et al. 2006).

Eine weit verbreitete Methode ist die Transduktion mittels viraler Vektoren. Dazu werden verschieden virale Vektorsysteme, beispielsweise auf Basis der Adeno-assoziierten Viren (Cucchiaroni et al. 2003; Stender et al. 2007) benutzt, um Gene in den jeweiligen Zellen zu exprimieren. Die Vorteile hierbei liegen vor allem in der hohen Transduktionseffizienz (Pagnotto et al. 2007), während je nach Vektor unterschiedliche Nachteile existieren. So ist mittels retroviraler Vektoren, zu denen auch die häufig verwendeten lentiviralen Vektoren (eine Unterfamilie der retroviralen Vektoren, vom

humanen Immundefizienz-Virus (HIV) abgeleitet) zählen, zwar eine langandauernde Expression des eingeschleusten Gens möglich, jedoch tragen diese die Risiken einer Insertionsmutagenese und das Potential zur Generierung replikationskompetenter Viren (Anderson 1992). Während mit den sehr aufwendig zu konstruierenden lentiviralen Vektoren auch eine Transduktion ruhender Zellen möglich ist (Cockrell und Kafri 2007), können mit den übrigen retroviralen Vektoren nur in Zellteilung begriffene Zellen transduziert werden. Adenovirale Vektoren integrieren hingegen nicht in das Genom, wodurch die Transgenexpression allerdings auch nur transient stattfindet (Kochanek 1999). Ein wichtiger Vorteil ist hier die zellzyklusunabhängige Transduktion auch nichtreplizierender Zellen. Die Risiken ergeben sich vor allem aus der Immunantwort des Organismus nach viraler Erstinfektion (Benihoud et al. 1999; Evans et al. 2001). Dies zeigte besonders tragisch der Tod des 18-jährigen Jesse Gelsinger im Rahmen einer adenoviralen Gentransferstudie im Jahr 1999 (Marshall 1999). Adeno-assoziierte virale Vektoren besitzen demgegenüber sowohl die Möglichkeit einer zellzyklusunabhängigen Transduktion, als auch eine sehr hohe Transduktionseffizienz. Das Adeno-assoziierte Virus (AAV) integriert ebenfalls in das Genom, wobei es bisher jedoch mit keiner menschlichen Krankheit in Verbindung gebracht werden konnte (Samulski et al. 1989; Monahan und Samulski 2000). Die Hauptnachteile liegen, wie bei allen viralen Vektoren, in der äußerst aufwendigen Konstruktion dieser Trägersysteme und der nach der deutschen Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) erhöhten Sicherheitsstufe, wodurch Arbeiten mit diesen Vektoren nicht ohne weiteres in jedem Labor durchführbar sind.

Weitere Möglichkeiten des Gentransfers stellen physikalische Methoden wie die Elektroporation dar. Dabei wird über einen elektrischen Impuls kurzfristig das Membranpotential der Zelle zerstört und somit Poren in der Membran geschaffen. Durch diese Poren gelangt das genetische Material in das Zellinnere (Ferreira et al. 2008). Für diese Art genetischer Manipulation sind jedoch spezielle Geräte und teilweise komplexe Optimierungsprotokolle

erforderlich. Die gleichen Probleme ergeben sich bei anderen physikalischen Methoden wie der Transfektion mittels Laserpuls (Stevenson et al. 2010), der Ultraschalltransfektion (Otani et al. 2009), dem Beschuss mit an DNS gekoppelten Wolfram- oder Goldpartikeln (Uchida et al. 2009), der Mikroinjektion in den Zellkern (Hashimoto et al. 2006) oder der magnetgekoppelten Transfektion (Mair et al. 2009).

Aus diesem Kontext heraus erscheint eine Transfektion mittels nichtviraler Lipide oder lipidähnlicher Reagenzien als Alternative sinnvoll. Diese erstmals von Graham und Van der Eb beschriebene Art der Transfektion (Graham und van der Eb 1973) bietet eine Reihe von Vorteilen. Zum einen sind derartige Substanzen meist leicht zu handhaben und für unterschiedliche Arten von Genen zu verwenden, es müssen also im Gegensatz zur viralen Transduktion nicht für jedes Gen eigene Vektoren konstruiert werden. Zum anderen ist die Sicherheit im Umgang mit derartigen Systemen wesentlich besser zu gewährleisten und sie können in jedem Labor niedriger Sicherheitsstufe verwendet werden. Nachteilig kann hierbei das unterschiedliche Ansprechen verschiedener Zelllinien auf die diversen verfügbaren Reagenzien sein (Orth et al. 2008). Eine Vorhersage des optimalen Reagenz für bestimmte Zellen ist somit nur schwer möglich.

Der Wirkmechanismus nichtviraler Transfektionsreagenzien beruht auf einer Komplexbildung des jeweiligen Reagenz mit der in die Zelle einzuschleusenden DNS. Dazu wird zunächst das entsprechende Gen isoliert, in eine cDNS umgeschrieben und in einen Expressionsvektor (Plasmid) integriert. Anschließend komplexiert das jeweilige Reagenz die negativ geladene cDNS mit einem lipophilen, meist kationisch geladenen Teil und erleichtert durch seinen lipophilen Charakter die Bindung des Komplexes mit der Plasmamembran. Der Komplex wird anschließend mittels unspezifischer Adsorption und Endozytose in das Zellinnere aufgenommen (Luo und Saltzman 2000). Der darauf folgende Austritt aus den Endosomen wird vermutlich über Interaktionen von Helferlipiden des jeweiligen Reagenz mit der Endosomenmembran erleichtert (Farhood et al. 1992). Die

eingeschleuste cDNS wird somit im Zytosol oder direkt im Zellkern freigesetzt und das codierte Protein kann gebildet werden. Die genauen Transportprozesse in den Zellkern sind noch nicht geklärt (Neves et al. 1999; Escriou et al. 2001). Das erfolgreiche Einschleusen von Fremd-DNS in eine Zelle lässt sich anhand von Markergenen nachweisen. Liegt eine Expression des eingeschleusten Gens vor, ist die erfolgreiche Transfektion indirekt bewiesen (siehe 3.2.5).

Prinzipiell stehen für die oben genannten Vorgänge und zur Komplexierung der cDNS verschiedene Substanzen zur Verfügung. Genauer betrachtet kann man die in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien dabei in fünf Gruppen unterteilen:

- 1.) kationische Lipide: FuGENE<sup>®</sup> 6, Lipofectamine<sup>™</sup> 2000, Lipofectamine<sup>™</sup>, Effectene<sup>®</sup>, Turbofectin 8.0<sup>™</sup> mit Zusatz von Histonen
- 2.) sphärische kationische Liposomen: Metafectene<sup>®</sup>, *DMRIE-C*
- 3.) (Lipo-) Polyamine: DreamFect<sup>™</sup>, DreamFect<sup>™</sup> Gold, GeneJammer<sup>®</sup>, *TransIT<sup>®</sup>-LT1*, GeneJuice<sup>®</sup>, EcoTransfect<sup>™</sup>
- 4.) kationisches Polymer: TransPass<sup>™</sup> D2
- 5.) lineares Polyethylenimin: jetPEI<sup>™</sup>

#### *2.4 Effekt von Hyaluronidase auf die Transfektion*

Hyaluronidase ist ein in der Natur weit verbreitetes Enzym, das wichtige Aufgaben übernimmt. Es verdaut Hyaluronsäure, einen wichtigen Bestandteil des Zellgerüsts und der extrazellulären Matrix und trägt so zu deren stetigen Erneuerung bei. Es existieren drei Subtypen von Hyaluronidase. Während zu Typ 1 das testikuläre Enzym zählt, kommt Typ 2 beispielsweise bei Blutegeln und Typ 3 in manchen Bakterienstämmen vor (Kreil 1995). Bei Bakterien, wie etwa Streptokokken, scheint das Enzym durch seine

Möglichkeit in das Bindegewebe einzudringen unter anderem für die Ausbreitung der Bakterien im Gewebe verantwortlich zu sein (Hynes et al. 2000; Correa et al. 2009). Dieser Effekt der Bindegewebserweichung und Penetration wird seit mehreren Jahren auch medikamentös genutzt. Bereits 1950 wurde die verbesserte Aufnahme von Sulfonamiden durch den Einsatz von Hyaluronidase beschrieben (Witzgall und Boyens 1950) und auch heute noch wird Hyaluronidase beispielsweise als Hylase<sup>®</sup> (Riemser) zur schnelleren Resorption von Paravasaten angewandt.

In diesem Zusammenhang wurde in der Vergangenheit ebenfalls ein positiver Effekt von Hyaluronidase auf die Effizienz nichtviraler Transfektionsreagenzien gezeigt. So konnte die Transfektionseffizienz eines derartigen Reagenz bei Chondrozyten von 6,9% auf 41% gesteigert werden (Madry und Trippel 2000).

Die Wirkung der Hyaluronidase beruht vermutlich auf dem Verdau beziehungsweise dem teilweisen Abbau der die Zellen umgebenden Matrix und scheint so den Kontakt der Transfektionskomplexe mit der Zelle zu erleichtern (Erikson et al. 2008). Auch eine direkte Interaktion von Hyaluronidase und der Zelloberfläche scheint möglich zu sein. Für 293-Zellen konnte ein Transport von extrazellulär vorkommender Hyaluronidase vom Typ 1 in das Zellinnere beschrieben werden (Harada und Takahashi 2007), wobei hierbei die genauen Prozesse unbekannt sind.

### 2.5 Fragestellung

Es ist eine Vielzahl von nichtviralen Transfektionsreagenzien kommerziell verfügbar. Diese sind jedoch fast ausschließlich zum Gebrauch an ausdifferenzierten Zellen entwickelt worden. In welcher Art und Weise diese Reagenzien zur Transfektion humaner adulter mesenchymaler Stammzellen zu verwenden sind und ob die Transgenexpression durch Zusatz von Hyaluronidase optimiert werden kann, ist Inhalt dieser Arbeit. Ebenso wurde die Toxizität der Reagenzien auf die Stammzellen untersucht, da für eine mögliche klinische Anwendung, beispielsweise in der Behandlung von Knorpeldefekten mit autologen Stammzellen, eine möglichst hohe Anzahl an vitalen Zellen erforderlich ist und somit die Toxizität der angewandten Reagenzien ebenso eine wichtige Rolle spielt wie der Grad der Expression des eingeschleusten Fremdgens. Das optimale Reagenz muss also neben einer effizienten Transfektion auch eine geringe Toxizität aufweisen und somit einen hohen Prozentsatz von Ausgangszellen erfolgreich transfizieren.

Aus diesen Betrachtungen ergeben sich die folgenden Fragestellungen:

- 1.) Wie toxisch sind nichtvirale Reagenzien gegenüber humanen adulten mesenchymalen Stammzellen ?
- 2.) Sind humane adulte mesenchymale Stammzellen nichtviral transfizierbar ?
- 3.) Verbessert Hyaluronidase die nichtvirale Transfektion humaner adulter mesenchymaler Stammzellen ?
- 4.) Welche Effizienz kann mit der nichtviralen Transfektion humaner adulter mesenchymaler Stammzellen erreicht werden ?
- 5.) Korreliert die Höhe der Transgenexpression in humanen adulten mesenchymalen Stammzellen bei der Verwendung verschiedener Markergene untereinander ?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Materialien und Geräte

In folgender Tabelle sind alle verwendeten Geräte aufgeführt.

**Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung / Typ</b>	<b>Firma / Hersteller</b>
Kulturschrank	Hera Cell	Heraeus
Kulturflasche	75 cm <sup>2</sup> , 250 ml Polystyrene	Becton Dickinson
96-well Kulturplatte	Microtest™ 96	Becton Dickinson
Pipettierhilfe	Pipetus® akku	Hirschmann
Pipettierspitzen	5, 10, 25, 50 ml Polystyrene	Becton Dickinson
Pipetten	10, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen	crystal, yellow, blue	Ratiolab
Zentrifuge	Centrifuge 5804 R	Eppendorf
Laborwaage	BL 60S	Sartorius
Spatel	Waagenspatel	Roth
Sterilfilter	Rotilabo 0,22 µm	Roth
Einmalspritze 10 ml	Ecoject	Dispomed
Neubauer Zählkammer	0,0025 µm	Marienfeld
Deckgläser	24 x 24 mm	Roth
Mikroskop	CKX 31	Olympus
Digitalkamera	Camedia C5050	Olympus
Objektiv	C5060 ADUS	Olympus
Absaugkatheter	Ideal	Braun
Einmalspritze 50 ml	Injekt®	Braun
Proberöhrchen	50 ml	Becton Dickinson
Proberöhrchen	14 ml Polypropylene	Becton Dickinson
Proberöhrchen	1 ml Polypropylene	Eppendorf
Autoklav	Vertikalautoklav	Astell
Sterilbank	Hera Safe	Heraeus
Lumineszenz-, Absorptions-Messgerät	GENios	Tecan

In folgender Tabelle sind die verwendeten Materialien zusammengefasst.

**Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Materialien**

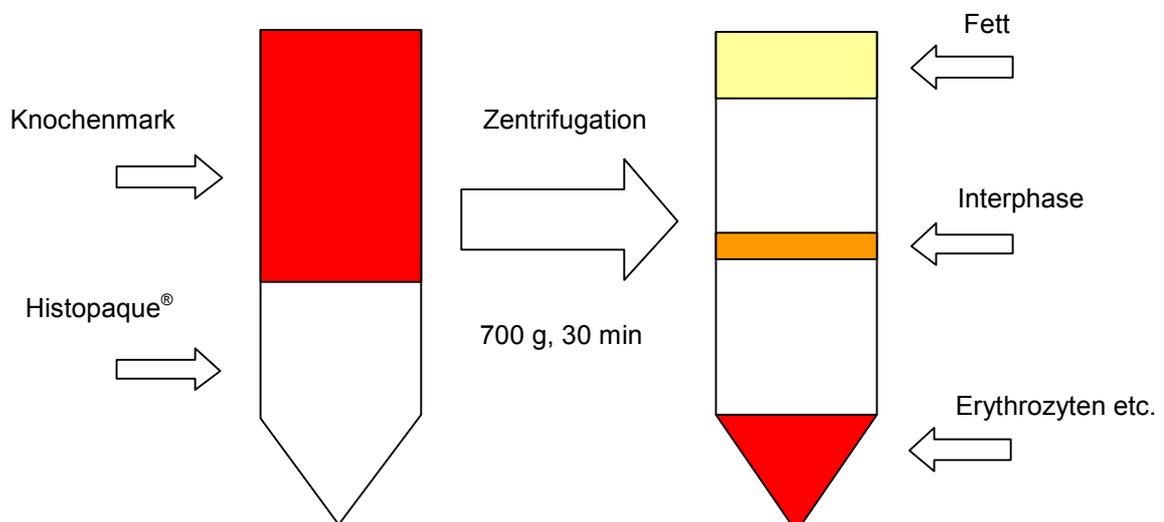
<b>Material</b>	<b>Bezeichnung / Typ</b>	<b>Firma / Hersteller</b>
DMEM	500 ml	Paisley
Opti-MEM®	500 ml	Paisley
PBS	1000 ml	PAA
MesenCult®	MesenCult® basal 500 ml	Stem cell technologies
Supplemente	MSC stimulatory suppl. 50 ml	Stem cell technologies
Antibiotika Penicillin - Streptomycin	Pen – Strep. 10.000 Einheiten/ml	Thermo scientific
Trypsin	Trypsin 2,5%	Paisley
Formalin	Formaldehyd 4%	Fischer
Hyaluronidase	<i>Hyal. from bovine testes</i>	Sigma
Heparin	Heparin-Na	Braun
Dichtegradient	Histopaque® 1077	Sigma
Zytotoxizitäts – Set	<i>LDH Kit</i>	Roche
X-Gal Nachweis – Set	<i>β-Gal staining set</i>	Roche
Luziferase – Set	<i>luc assay system</i>	Promega
Protein Quantifizierung	<i>BCA Kit</i>	Thermo Scientific
Transfektionsreagenz	FuGENE® 6	Roche
Transfektionsreagenz	Metafectene®	Biontex
Transfektionsreagenz	Lipofectamine™ 2000	Invitrogen
Transfektionsreagenz	Lipofectamine™	Invitrogen
Transfektions-Zusatz	PLUS®	Invitrogen
Transfektionsreagenz	DreamFect™	OZ Biosciences
Transfektionsreagenz	DreamFect™ Gold	OZ Biosciences
Transfektionsreagenz	GeneJammer®	Stratagene
Transfektionsreagenz	Effectene®	Qiagen
Transfektionsreagenz	Turbofectin 8.0™	Origene
Transfektionsreagenz	<i>TransIT®-LT1</i>	Mirus Bio Corporation
Transfektionsreagenz	GeneJuice®	Novagen
Transfektionsreagenz	TransPass™ D2	New England BioLabs
Transfektionsreagenz	jetPEI™	Polyplus transfection
Transfektionsreagenz	EcoTransfect™	OZ Biosciences
Transfektionsreagenz	<i>DMRIE-C</i>	Invitrogen
Plasmid lacZ	pCMVLacZ	Invitrogen
Plasmid IGF-I	pCMVhIGF-I	Invitrogen
Plasmid luc	pCMVLuc	Invitrogen
Plasmid Vermehrung	<i>E.coli, TOP 10 One Shot</i>	Invitrogen
Plasmid Aufreinigung	<i>EndoFree Plasmid Maxi Kit</i>	Qiagen

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Isolierung von mesenchymalen Stammzellen und Kultur

Während der operativen Implantation von Oberflächenersatzprothesen am Kniegelenk wurde das aus dem eröffneten distalen femoralen Markraum austretende Knochenmark (etwa 10 – 15 ml) in einer 50 ml Einmalspritze gesammelt. Das Knochenmark wurde in ein konisches 50 ml Zentrifugenröhrchen, in das zuvor 3 ml Heparin gegeben wurden, umgefüllt. Die Probe wurde dann im Labor mit DMEM auf 20 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. In ein weiteres 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 15 ml Histopaque<sup>®</sup> Lösung gegeben. Anschließend wurde das Knochenmark langsam über das Histopaque<sup>®</sup> geschichtet, wobei ein Vermischen der beiden Phasen vermieden wurde. Nun wurde das Röhrchen 30 Minuten bei Raumtemperatur und 700 g ohne Bremsfunktion zentrifugiert. Bei dieser Dichtegradientenzentrifugation sammeln sich die mesenchymalen Stammzellen gemeinsam mit anderen mononukleären Zellen in der Interphase, während schwerere Bestandteile und auch Erythrozyten oder Granulozyten auf Grund ihrer höheren Dichte am Boden des Röhrchens zu liegen kommen (English und Andersen 1974). Die Fettanteile des Knochenmarks finden sich dabei an der Oberfläche der Lösung (Abb. 3).

**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation**



Nach der Zentrifugation wurde die Interphase entnommen und in ein 50 ml Proberöhrchen gegeben. Dieses wurde bis auf 30 ml mit DMEM aufgefüllt. Anschließend wurde es drei Minuten bei Raumtemperatur und 200 g zentrifugiert, um restliche Histopaque<sup>®</sup>-Bestandteile von den Zellen zu entfernen. Das anfallende Zellpellet am Boden des Proberöhrchens wurde in MesenCult<sup>®</sup> resuspendiert, in Kulturflaschen gegeben und unter täglicher optischer Kontrolle bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert (Bruder et al. 1997). Das verwendete Medium MesenCult<sup>®</sup> (Basal Medium + Nährstoffe (Supplemente) + 1% Penicillin - Streptomycin) ist speziell zur Kultur mesenchymaler Stammzellen entwickelt worden und induziert keine Differenzierung. Durch dieses selektive Expansionsmedium und durch die für mesenchymale Stammzellen typische Plastikadhärenz wurden die Zellen weiter isoliert. Um alle nicht plastikadhärenten Zellen zu entfernen, wurde 24 bis 48 Stunden nach Kulturbeginn der erste Mediumwechsel durchgeführt. Bei einer Probenmenge von etwa 10 bis 15 ml Knochenmark konnten so je Probe etwa 500.000 Stammzellen in Kultur gebracht werden. Im weiteren Verlauf wurde das Wachstumsmedium zweimal wöchentlich gewechselt. Bei einer Zellkonfluenz von 80-90% wurde eine Passagierung der Zellen vorgenommen. Dies erfolgte nach unten aufgeführtem Protokoll (3.2.1.1).

#### *3.2.1.1 Passage der mesenchymalen Stammzellen*

Zunächst wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 3 ml 0,125% Trypsin auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 10 Minuten (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) wurde die Kulturflasche kräftig geschüttelt und mikroskopisch festgestellt, ob sich alle Zellen vom Boden der Flasche gelöst haben. Jetzt wurde die Flasche zweimal mit jeweils 10 ml DMEM gespült und das Stammzell-DMEM-Gemisch in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Es folgte eine Zentrifugation von 4 Minuten bei Raumtemperatur und 200 g. Der nach der Zentrifugation anfallende Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml MesenCult<sup>®</sup> mit Supplementen resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend gezählt (siehe 3.2.1.2) und

entweder zu 500.000 Zellen je Kulturflasche neu ausgesät und mit 15 ml MesenCult® mit Supplementen weiter kultiviert oder für Versuchsreihen in eine 96-well Kulturplatte zu 5.000 Zellen je well ausgebracht.

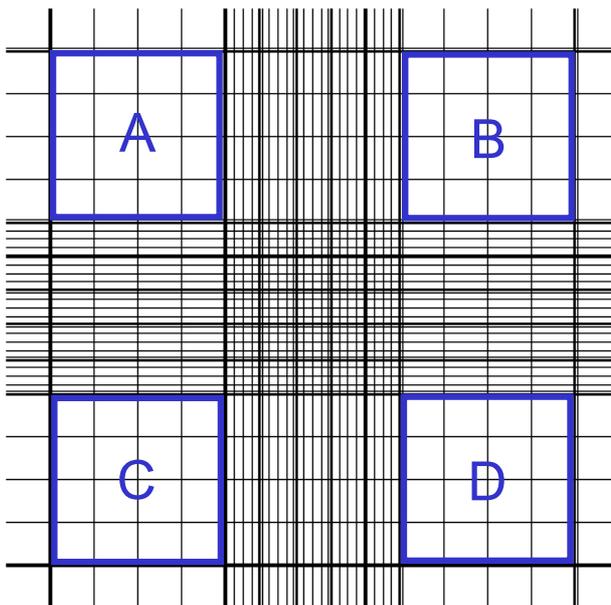
Alle Passagierungen und Versuchsreihen erfolgten mit Zellen, die maximal der 3. Passage entstammten, also das oben genannte Protokoll nicht öfter als dreimal durchlaufen hatten.

### 3.2.1.2 Zellzählung

Die Zellzählung wurde in einer Neubauer-Zählkammer vorgenommen. Dabei wurden alle Zellen in den einzelnen Quadraten A, B, C und D ausgezählt (Abb. 4). Anschließend wurde der Mittelwert aus der Zellzahl der vier Quadrate ermittelt (Mittelwert =  $\frac{\text{Zellzahl}(A+B+C+D)}{4}$ ).

Da ein Quadrat ein Volumen von 0,1 µl aufweist, muss dieser Mittelwert anschließend mit dem Faktor 10.000 multipliziert werden und man erhält die Anzahl der Zellen in einem Milliliter resuspendierter Lösung.

**Abbildung 4: Neubauer-Zählkammer mit den auszählenden Quadraten**



### 3.2.2 Transfektionsreagenzien

Im Folgenden sind alle verwendeten Transfektionsreagenzien mit den jeweiligen Protokollen aufgeführt. Diese sind dabei zur besseren Übersichtlichkeit in Punkte gegliedert. Im Anschluss an jedes der aufgeführten Potokolle wurden die Zellen für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Darauf folgte der Markergennachweis (siehe 3.2.5.1/2).

#### 3.2.2.1 FuGENE<sup>®</sup> 6

FuGENE<sup>®</sup> 6 ist ein nicht-liposomales Gemisch aus Lipiden und weiteren unbekanntem Bestandteilen in 80% Ethanol. Die genaue Zusammensetzung wird vom Hersteller nicht bekannt gegeben. Es ist filter-sterilisiert als zweiphasiges Reagenz zu erhalten. Laut Hersteller sollen hiermit sowohl große Plasmide bis 10 kB als auch Oligonukleotide und Nukleotide in Zellen eingebracht werden können.

Protokoll je *well* in der 96-*well* Platte

1. 22,5 µl Opti-MEM<sup>®</sup> in ein Polypropylen-Röhrchen geben.
2. 0,5 µl FuGENE<sup>®</sup> 6 dazupipettieren, vorsichtig mischen.
3. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
4. 0,25 µg DNS in ein weiteres Polypropylen-Röhrchen geben.
5. FuGENE<sup>®</sup> 6 Lösung auf DNS geben, vorsichtig mischen.
6. Gemisch 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Mediumwechsel bei den Zellen. 125 µl MesenCult<sup>®</sup> ohne Supplemente auf die Zellen geben.
8. FuGENE<sup>®</sup>-DNS-Gemisch tropfenweise auf die Zellen geben, Platte schwenken.

### 3.2.2.2 Metafectene<sup>®</sup>

Metafectene<sup>®</sup> ist ein Gemisch von kationischen Liposomen, die laut Hersteller einen Komplex mit der einzuschleusenden DNS bilden. Diese Komplexe werden mittels Endozytose durch die äußere Zellhülle transportiert. Durch eine spezielle Zusammensetzung aktiviert das saure Milieu der Endosomen das Reagenz, welches dadurch die Endosomenmembran lysiert und somit die DNS in das Zytosol freisetzt.

Protokoll je *well* in der 96-*well* Platte

1. 0,125 µg DNS in 7,5 µl Opti-MEM<sup>®</sup> geben.
2. 0,625 µl Metafectene<sup>®</sup> in 7,5 µl Opti-MEM<sup>®</sup> geben.
3. DNS Lösung zur Metafectene<sup>®</sup> Lösung geben, vorsichtig mischen.
4. Gemisch 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Mediumwechsel bei den Zellen. 125 µl MesenCult<sup>®</sup> mit Supplementen auf die Zellen geben.
6. Metafectene<sup>®</sup>-DNS-Gemisch tropfenweise auf die Zellen geben, Platte schwenken.

### 3.2.2.3 Lipofectamine™ 2000

Lipofectamine™ 2000 ist ein Gemisch aus kationischen Lipiden, die die DNS komplexieren und so einen Transport durch die Zellmembran in das Zellinnere gewährleisten sollen.

Protokoll je *well* in der 96-*well* Platte

1. 0,2 µg DNS in 12,5 µl Opti-MEM® geben.
2. 0,5 µl Lipofectamine™ 2000 in 12,5 µl Opti-MEM® geben.
3. DNS Lösung zur Lipofectamine™ 2000 Lösung geben, vorsichtig mischen.
4. Gemisch 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Mediumwechsel bei den Zellen. 125 µl MesenCult® mit Supplementen auf die Zellen geben.
6. Lipofectamine™ 2000-DNS-Gemisch tropfenweise auf die Zellen geben, Platte schwenken.

#### 3.2.2.4 Lipofectamine<sup>TM</sup> und PLUS<sup>®</sup>

Lipofectamine<sup>TM</sup> ist ein Gemisch aus kationischen Lipiden der ersten Generation. Das von der Herstellerfirma speziell in Verbindung mit Lipofectamine<sup>TM</sup> empfohlene PLUS<sup>®</sup> Reagenz soll die DNS präkomplexieren und so die durch die kationischen Lipide vermittelte Transfektion verbessern.

Protokoll je *well* in der 96-*well* Platte

1. 0,1 µg DNS in 6 µl Opti-MEM<sup>®</sup> geben.
2. 0,1 µl PLUS<sup>®</sup> dazugeben.
3. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
4. 0,3 µl Lipofectamine<sup>TM</sup> in 6 µl Opti-MEM<sup>®</sup> geben.
5. DNS-PLUS<sup>®</sup> Lösung zur Lipofectamine<sup>TM</sup> Lösung geben, vorsichtig mischen.
6. Gemisch 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Mediumwechsel bei den Zellen. 50 µl MesenCult<sup>®</sup> ohne Supplemente auf die Zellen geben.
8. Transfektionskomplex tropfenweise auf die Zellen geben, Platte schwenken.
9. 3 Stunden inkubieren (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).
10. 150 µl MesenCult<sup>®</sup> mit Supplementen zu den Zellen geben.

### 3.2.2.5 DreamFect™

DreamFect™ besteht aus einem Gemisch von Lipopolyaminen. Es besitzt einen lipophilen, lipidähnlichen Teil und einen geladenen Polyamin-Anteil, ähnlich kationischen Polymeren. Elektrostatische Interaktionen sollen für eine feste Bindung der DNS an das Transfektionsreagenz sorgen. Diese positiv geladenen Komplexe sollen sich an der Zelloberfläche anlagern und durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden. Die hydrophoben Eigenschaften der Lipide und die polykationischen Anteile des Komplexes sollen dann wiederum zu einer Lyse der Endosomenmembran, dem Austritt von DNS in das Zytosol und zum Transport der DNS in den Zellkern führen.

Protokoll je *well* in der 96-*well* Platte

1. 0,125 µg DNS in 12,5 µl Opti-MEM® geben.
2. 0,5 µl DreamFect™ in 12,5 µl Opti-MEM® geben.
3. DreamFect™ Lösung zur DNS Lösung geben, vorsichtig mischen.
4. Gemisch 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Mediumwechsel bei den Zellen. 125 µl MesenCult® mit Supplementen auf die Zellen geben.
6. Dreamfect™-DNS-Gemisch tropfenweise auf die Zellen geben, Platte schwenken.

### 3.2.2.6 DreamFect™ Gold

DreamFect™ Gold besteht aus den gleichen Anteilen wie sein oben genannter Vorgänger DreamFect™ und wirkt damit über den selben Mechanismus. Im Vergleich zu DreamFect™ soll es jedoch einen effizienteren Austritt der DNS aus den Endosomen in das Zytosol gewährleisten und selbst besser biodegradabel sein. Dadurch sollen zelluläre Mechanismen weniger bis gar nicht gestört werden, was laut Hersteller zu einer sehr geringen Toxizität führt.

Protokoll je *well* in der 96-*well* Platte

1. 0,25 µg DNS in 25 µl PBS geben.
2. 1 µl DreamFect™ Gold in 25 µl PBS geben.
3. DNS Lösung zur Dreamfect™ Gold Lösung geben, vorsichtig mischen.
4. Gemisch 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Mediumwechsel bei den Zellen. 125 µl MesenCult® mit Supplementen auf die Zellen geben.
6. Dreamfect™ Gold-DNS-Gemisch tropfenweise auf die Zellen geben, Platte schwenken.

### 3.2.2.7 GeneJammer®

GeneJammer® ist ein Gemisch aus Polyaminen in 80% Ethanol. Eine Komplexierung der DNS soll deren Transport in das Zellinnere gewährleisten. Wegen der vom Hersteller nicht bekannt gegebenen Zusammensetzung sind die genauen Mechanismen leider nicht vollends geklärt.

Protokoll je *well* in der 96-*well* Platte

1. 25 µl Opti-MEM® in steriles Polypropylen-Röhrchen geben.
2. 0,75 µl GeneJammer® direkt in das Medium geben.
3. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
4. 0,25 µg DNS zur GeneJammer® Lösung geben, vorsichtig mischen.
5. Gemisch 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Mediumwechsel bei den Zellen. 37,5 µl MesenCult® mit Supplementen zu den Zellen geben.
7. GeneJammer®-DNS-Gemisch tropfenweise auf die Zellen geben, Platte schwenken.
8. 3 Stunden inkubieren (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).
9. 62,5 µl MesenCult® mit Supplementen zu den Zellen geben, Platte schwenken.

### 3.2.2.8 Effectene<sup>®</sup>

Effectene<sup>®</sup> ist ein nicht-liposomales Gemisch aus Lipiden. Das Transfektionssystem besteht aus dem Reagenz, einem speziellen Puffer und einem *enhancer*. Zunächst wird hierbei die DNS durch den *enhancer* in der Pufferlösung kondensiert. Nach Zugabe des Reagenz bildet sich der Komplex aus kondensierter DNS und Effectene<sup>®</sup>. Diese Moleküle aus hochkondensierter DNS und Lipiden sollen das Einschleusen der DNS in die Zelle gewährleisten.

Protokoll je *well* in der 96-*well* Platte

1. 0,05 µg DNS in 14,95 µl Puffer geben.
2. 0,4 µl *enhancer* zur DNS-Puffer Lösung geben, vorsichtig mischen.
3. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
4. 1,25 µl Effectene<sup>®</sup> dazugeben, vorsichtig mischen.
5. Gemisch 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Mediumwechsel bei den Zellen. Zellen einmal mit 100 µl PBS spülen, 87,5 µl MesenCult<sup>®</sup> mit Supplementen zu den Zellen geben.
7. 87,5 µl MesenCult<sup>®</sup> mit Supplementen zum Transfektionskomplex geben, vorsichtig mischen.
8. Transfektionskomplex tropfenweise auf die Zellen geben, Platte schwenken.

### 3.2.2.9 TurboFectin 8.0<sup>TM</sup>

Turbofectin 8.0<sup>TM</sup> ist eine Mischung aus Lipiden und Histonen in 80 % Alkohol. Eine Komplexbildung mit der einzuschleusenden DNS soll deren Transport in das Zellinnere ermöglichen.

Protokoll je *well* in der 96-*well* Platte

1. 0,15 µl Turbofectin 8.0<sup>TM</sup> in 5 µl Opti-MEM<sup>®</sup> geben.
2. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
3. 0,05 µg DNS zur Turbofectin 8.0<sup>TM</sup> Lösung geben.
4. Gemisch 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Mediumwechsel bei den Zellen. 125 µl MesenCult<sup>®</sup> mit Supplementen zu den Zellen geben.
6. Turbofectin 8.0<sup>TM</sup>-DNS-Gemisch tropfenweise auf die Zellen geben, Platte schwenken.

### 3.2.2.10 TransIT<sup>®</sup>-LT1

TransIT<sup>®</sup>-LT1 ist ein Reagenz auf Basis von Proteinen und Polyaminen. Es enthält weiterhin Histone und ein vom Hersteller nicht näher bezeichnetes Lipid. Durch Komplexierung mit der DNS soll deren Transport in das Zellinnere ermöglicht werden.

Protokoll je *well* in der 96-*well* Platte

1. 0,28 µl TransIT<sup>®</sup>-LT1 in 9 µl Opti-MEM<sup>®</sup> geben.
2. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
3. 0,1 µg DNS zur TransIT<sup>®</sup>-LT1 Lösung geben.
4. Gemisch 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Mediumwechsel bei den Zellen. 100 µl MesenCult<sup>®</sup> mit Supplementen zu den Zellen geben.
6. TransIT<sup>®</sup>-LT1-DNS-Gemisch tropfenweise auf die Zellen geben, Platte schwenken.

### 3.2.2.11 GeneJuice<sup>®</sup>

GeneJuice<sup>®</sup> besteht aus einem untoxischen zellulären Protein und einem geringen Anteil neuartiger Polyamine in 80-90% Ethanol. Es soll laut Hersteller den Transport von DNS in das Zellinnere ebenfalls über eine Komplexierung erreichen.

Protokoll je *well* in der 96-*well* Platte

1. 0,2 µl GeneJuice<sup>®</sup> in 5 µl Opti-MEM<sup>®</sup> geben.
2. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
3. 0.06 µg DNS zur GeneJuice<sup>®</sup> Lösung geben.
4. Gemisch 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Mediumwechsel bei den Zellen. 125 µl MesenCult<sup>®</sup> mit Supplementen zu den Zellen geben.
6. GeneJuice<sup>®</sup>-DNS-Gemisch tropfenweise auf die Zellen geben, Platte schwenken.

### 3.2.2.12 TransPass™ D2

TransPass™ D2 ist ein nicht-lipoides kationisches Polymer. Laut Hersteller ist es für Kotransfektionen mehrerer Plasmide geeignet. Der Transport durch die Zellmembran geschieht ebenfalls über Komplexbildung des Reagenz mit der DNS.

Protokoll je *well* in der 96-*well* Platte

1. 0,1 µg DNS in 75 µl Opti-MEM® geben.
2. 0.2 µl TransPass™ D2 zur DNS Lösung geben.
3. Gemisch 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Mediumwechsel bei den Zellen. Zellen einmal mit 100 µl Opti-MEM® waschen.
5. TransPass™-DNS-Gemisch tropfenweise auf die Zellen geben, Platte schwenken.
6. 3 Stunden inkubieren (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).
7. Transfektionskomplex durch 125 µl MesenCult® mit Supplementen ersetzen.

### 3.2.2.13 jetPEI<sup>TM</sup>

jetPEI<sup>TM</sup> besteht hauptsächlich aus einem linearen Polyethylenimin. Es verpackt die einzuschleusende DNS in positiv geladene Partikel, die mit den anionischen Proteoglykanen der Zelloberfläche interagieren sollen. Nach deren Bindung sollen die Komplexe über Endozytose in das Zellinnere aufgenommen werden. Innerhalb der Endosomen soll jetPEI<sup>TM</sup> die DNS vor deren Abbau schützen, indem es den sauren pH abpuffert. Dieser Prozess führt laut Hersteller zum Aufbrechen der Endosomen, zur Freisetzung der DNS in das Zytosol und zum Transport der DNS in den Zellkern.

Protokoll je *well* in der 96-*well* Platte

1. 0,25 µg DNS in 12,5 µl 150 mM NaCl geben.
2. 0,5 µl jetPEI<sup>TM</sup> in 12,5 µl 150 mM NaCl geben.
3. jetPEI<sup>TM</sup> Lösung zur DNS Lösung geben, vorsichtig mischen.
4. Gemisch 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Mediumwechsel bei den Zellen. 125 µl MesenCult<sup>®</sup> mit Supplementen auf die Zellen geben.
6. jetPEI<sup>TM</sup>-DNS-Gemisch tropfenweise auf die Zellen geben, Platte schwenken.

### 3.2.2.14 EcoTransfect™

EcoTransfect™ besteht aus Lipopolyaminen und neutralen Lipiden. Die Komplexe aus Reagenz und DNS sollen an der Zelloberfläche binden und über Endozytose in die Zelle aufgenommen werden. Der hydrophobe Anteil der Lipide und die Pufferkapazität der Polyaminanteile sollen dann für einen Austritt der Komplexe aus den Endosomen sorgen.

Protokoll je *well* in der 96-*well* Platte

1. 0,2 µg DNS in 50 µl Opti-MEM® geben.
2. 0,4 µl EcoTransfect™ in 50 µl Opti-MEM® geben.
3. DNS Lösung zur EcoTransfect™ Lösung geben, vorsichtig mischen.
4. Gemisch 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Mediumwechsel bei den Zellen. 125 µl MesenCult® mit Supplementen auf die Zellen geben.
6. EcoTransfect™-DNS-Gemisch tropfenweise auf die Zellen geben, Platte schwenken.

### 3.2.2.15 *DMRIE-C*

*DMRIE-C* ist ein liposomales Reagenz bestehend aus einer äquivalenten Mischung aus dem kationischen Lipid *DMRIE* (1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxy ethyl ammonium bromide) und Cholesterol in Membran-gefiltertem Wasser. Es komplexiert die DNS und soll so für einen Transport in das Zellinnere sorgen.

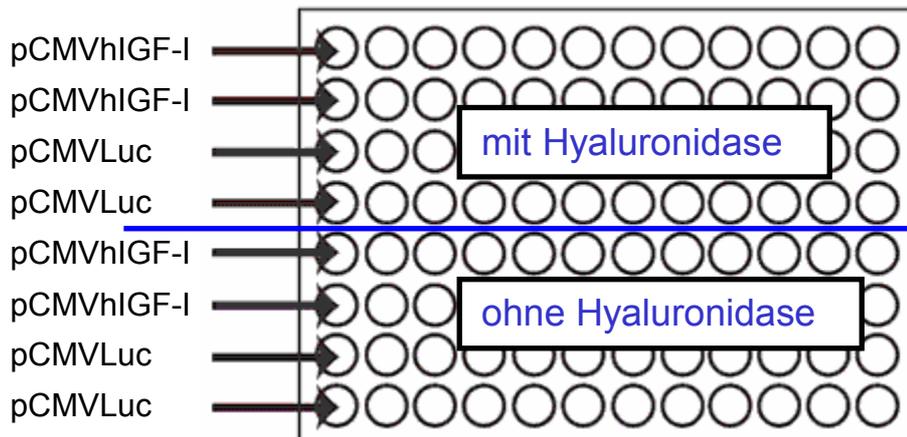
Protokoll je *well* in der 96-*well* Platte

1. 0.06 µg DNS in 30 µl Opti-MEM<sup>®</sup> geben.
2. 0,18 µl *DMRIE-C* in 30 µl Opti-MEM<sup>®</sup> geben.
3. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
4. DNS Lösung zur *DMRIE-C* Lösung geben, vorsichtig mischen.
5. Gemisch 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Mediumwechsel bei den Zellen. Altes Medium verwerfen.
7. *DMRIE-C*-DNS-Gemisch tropfenweise auf die Zellen geben, Platte schwenken.
8. 4 Stunden inkubieren (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).
9. 140 µl MesenCult<sup>®</sup> mit Supplementen zugeben.

Alle Versuchsreihen wurden mit Zellen durchgeführt, die maximal dreimal passagiert worden waren (siehe 3.1.1). In eine 96-well Platte wurden 5.000 Zellen je well ausgesät und mit 200 µl MesenCult® mit Supplementen kultiviert. Nach 24 Stunden wurde in die dafür vorgesehenen wells Hyaluronidase gegeben (siehe 3.2.3). Weitere 12 Stunden später, also 36 Stunden nach der Aussaat, wurden die Transfektionsreihen durchgeführt und wiederum in die hierfür vorgesehenen wells Hyaluronidase zugegeben.

Jedes Reagenz wurde mit einem Markergen und einem Kontrollgen in jeweils doppelter Ausfertigung angewandt. Jede dieser Reihen wurde jeweils mit und ohne Zugabe von Hyaluronidase angefertigt (Abb. 5).

**Abbildung 5: Verteilung der wells in der 96-well Platte**



pCMVLuc steht dabei für das Luziferaseplasmid, pCMVhIGF-I für das IGF-I Plasmid (siehe 3.2.2). Ohne Hyaluronidase bedeutet Standardprotokoll wie unter 3.2.3.1-15 beschrieben, mit Hyaluronidase bedeutet Zugabe von Hyaluronidase 12 Stunden vor und während der Transfektion (siehe 3.2.4).

Zur Bestimmung der Effizienz mittels X-Gal Färbung wurde jedes der hierauf getesteten fünf Reagenzien (Lipofectamine™ 2000, GeneJammer®, TransIT®-LT1, TransPass™ D2 und EcoTransfect™) in drei unabhängigen Testreihen mit jeweils zwei wells für das lacZ Gen und zwei wells für das Kontrollgen eingesetzt.

### 3.2.3 Hyaluronidase

In dieser Arbeit wurde Hyaluronidase vom Typ 1, also das testikuläre Enzym, angewandt. Die in Pulverform verfügbare Hyaluronidase wurde mit PBS gelöst und anschließend steril filtriert. Da das Protokoll eine Zugabe von 4 Einheiten je Milliliter 12 Stunden vor und während der Transfektion vorsah (Madry und Trippel 2000), wurde die Lösung zu den geforderten Zeitpunkten in die dafür vorgesehenen *wells* gegeben. Zu jedem Zugabezeitpunkt wurde eine frische Hyaluronidaselösung angesetzt, um einen Verlust der enzymatischen Aktivität durch zu lange Lagerung zu vermeiden.

### 3.2.4 Plasmid-DNS

Die eingesetzten Plasmidvektoren trugen unter einem *Cytomegalovirus immediate-early* Promoter/Enhancer (MacGregor und Caskey 1989) entweder das *Photinus pyralis* Luziferasegen (pCMVLuc) (Madry et al. 2003), das *Escherichia coli*  $\beta$ -Galaktosidase Gen (pCMVlacZ) (Madry und Trippel 2000) oder das *human insulin-like growth factor I* (IGF-I) Gen (pCMVhIGF-I) (Madry et al. 2001). Die Vektoren wurden in *Escherichia coli* vermehrt. Hochreine, endotoxinfreie Plasmid DNS wurde mit dem *EndoFree Plasmid Maxi Kit* den Herstellerangaben gemäß hergestellt. Anschließend wurde die Plasmid DNS mit sterilem Wasser bis auf eine Konzentration von 1  $\mu$ g DNS je 1  $\mu$ l Wasser verdünnt.

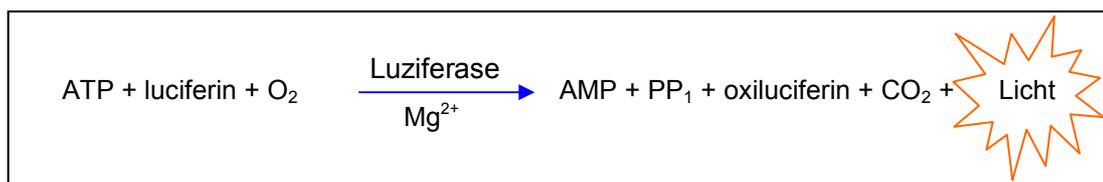
### 3.2.5 Markergene und Nachweismethoden

Zur Quantifizierung des Gentransfers in die Zellen wurden Markergene eingeschleust und deren Produkte über spezielle Nachweismethoden bestimmt. Im Folgenden sind die verwendeten Gene und ihre Nachweismethoden dargestellt.

#### 3.2.5.1 Luziferase

Luziferase ist ein Enzym des Leuchtkäfers *Photinus pyralis*. Es katalysiert eine Reaktion, die für dessen Biolumineszenz verantwortlich ist (Abb. 6).

**Abbildung 6: Die Luziferasereaktion**



Durch das Einschleusen des Luziferasegens und deren Expression in der Zelle kann nach Zugabe der für die Reaktion benötigten Komponenten mittels *Luciferase Assay System* eine Lichtemission gemessen werden. Die Menge des gemessenen Lichts lässt einen Rückschluss auf die Menge des exprimierten Enzyms und damit auf die Menge der eingeschleusten Enzym-DNS zu. Dabei ist zu beachten, dass das Signal nur etwa 15 Sekunden anhält und dann sehr schnell gegen null abfällt. Alle erzielten Werte werden in relativer Lichteinheit (*relative light unit*; RLU) angegeben. Die Vorbereitung der Zellen und die Durchführung der Messung erfolgte nach einem festen Protokoll.

### Protokoll zur Luziferase-Messung in der 96-well Platte

Zunächst wurden die Medien mit den Transfektionskomplexen aller *wells* abpipettiert und für die Toxizitätsbestimmung bei 4°C aufbewahrt (siehe 3.2.6). Anschließend wurden die Zellen mit 150 µl PBS gespült, 30 µl Lysat in jedes der *wells* gegeben und bei Raumtemperatur für 2 Minuten inkubiert. 10 µl dieses Lysats wurden für die Gesamtproteinbestimmung bei -80°C konserviert (siehe 3.2.7). In die zu messenden *wells* wurden dann 100 µl Substrat gegeben, alles wurde kurz auf- und abpipettiert und die Messung wurde innerhalb von 5 Sekunden durchgeführt.

Die Substratzugabe erfolgte bei maximal 4 *wells* gleichzeitig, um einen Signalverlust durch die Dauer der Messung zu verhindern. Alle Messungen wurden im Tecan GENios Lesegerät durchgeführt. Die Einstellungen für alle Messungen waren 3 Messungen je *well*, 1000 ms Integrationszeit und eine Verstärkung von 150.

Der Vorteil der Luziferase-Messung liegt in der direkten Vergleichbarkeit aller ermittelten Werte anhand von RLU-Werten in konkreten Zahlen. Durch die Bestimmung von Kontrollwerten, beispielsweise von mit IGF-I transfizierten Zellen sind sofort Aussagen über eine Genexpression des Markergens möglich. Nachteilig ist die Tatsache, dass die Zellen zur Auswertung lysiert werden müssen und somit keine Aussagen über Morphologie oder Vitalität der Zellen mehr möglich sind. Die Luziferase-Messung wurde standardisiert zum Vergleich aller Reagenzien eingesetzt.

### 3.2.5.2 $\beta$ -Galaktosidase

Die hier verwendete  $\beta$ -Galaktosidase stammt aus *E.coli* und wurde erstmals 1957 kristallisiert (Wallenfels und Marie Luise 1957). Es kann über sein Gen (*lacZ*) in Zellen eingeschleust und anschließend nachgewiesen werden. Sein Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal) wird von der  $\beta$ -Galaktosidase zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl hydrolysiert. Dieses wird anschließend durch Luftsauerstoff oxidiert und bildet den blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo. In der Lichtmikroskopie können also mit X-Gal angefärbte Zellen, die das Markergen *lacZ* und sein Produkt  $\beta$ -Galaktosidase enthalten, als blau erkannt werden (Abb. 12).

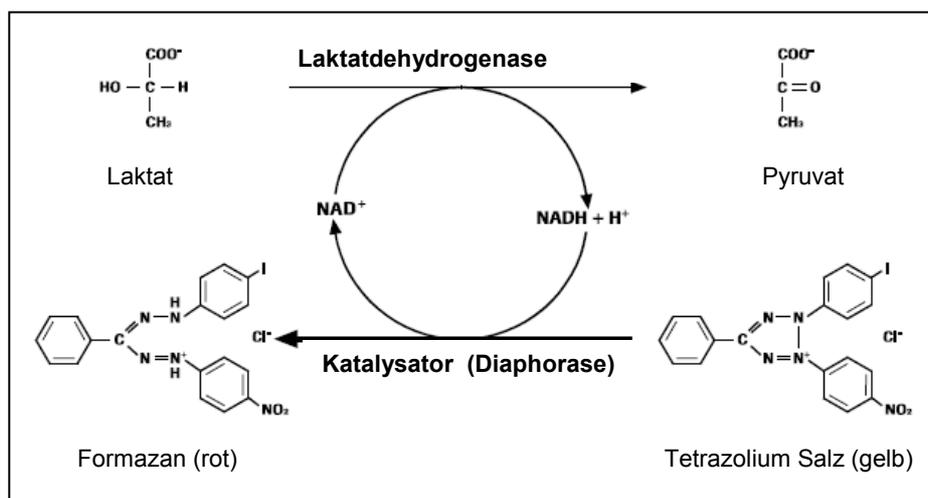
Die Vorteile der X-Gal Färbung zum Nachweis des *lacZ* Reportergens liegen in der Möglichkeit der lichtmikroskopischen Auswertung der Ergebnisse und der damit verbundenen morphologischen Beurteilbarkeit der Zellen. Anhand der Relation von blauen zu weißen Zellen kann eine Effizienz in Prozent bestimmt werden. Dies wurde in der vorgelegten Arbeit für die fünf Reagenzien mit der höchsten Luziferaseaktivität durchgeführt. Das Prozedere der Färbung wurde dabei nach Herstellerangaben vollzogen.

### 3.2.6 Zytotoxizitätsbestimmung

Die Zytotoxizitätsbestimmung erfolgte über eine Messung der Laktatdehydrogenase (LDH)-Konzentration im Überstand nach der 48-stündigen Inkubation der Zellen mit den Transfektionsreagenzien. Da die LDH ein intrazelluläres Enzym darstellt, steigt deren Konzentration im Überstand an, wenn Zellen sterben oder eine defekte Plasmamembran aufweisen, was nach einiger Zeit ebenfalls zum Zelltod führt. Der Nachweis erfolgt indirekt über die von der LDH gebildeten Produkte. Zunächst reduziert sie  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}+\text{H}^+$ , dies erfolgt über eine gleichzeitige Oxidation von Laktat zu Pyruvat. Die zwei dadurch frei gewordenen Wasserstoffatome werden daraufhin durch den Katalysator Diaphorase auf das gelbe

Tetrazolium Salz INT (2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium-Chlorid) übertragen. Dieses wird hiermit zu dem roten Indikator Formazan reduziert, welcher ein breites Absorptionsspektrum bei 500 nm aufweist (Abb. 7). Das gelbe INT hat in dieser Wellenlänge keine signifikante Absorption. Je mehr LDH also durch zu Grunde gegangene Zellen bereitgestellt wird, desto mehr Formazan wird gebildet und kann über seine Absorption gemessen werden. Die Höhe der Absorption gibt also indirekt den Grad des Zelluntergangs wieder.

**Abbildung 7: Die Reaktion der LDH**



Die LDH Bestimmung erfolgte nach einem festen Protokoll. Zur Durchführung des Tests gilt zu beachten, dass bereits zum Zeitpunkt der Transfektion einige *wells* mit Zellen bereitgestellt werden müssen, in die nur Wachstumsmedium (MesenCult<sup>®</sup> + Supplemente) zugegeben wird. Das Medium verbleibt dann wie die Transfektionskomplexe für 48 Stunden auf den Zellen. Dies ist nötig, um die spontane Sterberate der Zellen ohne Reagenz als Niedrigkontrolle zu erfassen. Ebenso werden einige zusätzliche *wells* mit Zellen benötigt, welche lysiert werden können und somit als Maximalkontrolle dienen. Die Transfektionskomplexe und Überstände wurden nach der 48-stündigen Inkubation in eine neue 96-*well* Platte in gleicher Verteilung pipettiert und der Test nach folgendem Protokoll durchgeführt.

### Protokoll zur Zytotoxizitätsbestimmung in der 96-well Platte

Zunächst wurde zu den *wells* der Maximalkontrolle 5 µl Lysat gegeben, die Platte geschwenkt und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Das Lysat wurde anschließend zur Platte der restlichen Überstände pipettiert und als Maximalkontrolle gekennzeichnet. Jetzt wurden 100 µl nach Herstellerangaben frisch angesetzte Reaktionslösung in alle *wells* gegeben. Nach einer Inkubation von 10 Minuten, während der die Platte vor Licht geschützt werden muss, wurden 50 µl Stop-Lösung in alle *wells* pipettiert. Anschließend wurden alle zu messenden *wells* im Absorptions-Lesegerät (Tecan GENios) bei 450 nm Wellenlänge, einer Referenzwellenlänge von 495 nm und drei Messungen je *well* ausgewertet. Über untenstehende Formel lässt sich der Prozentsatz der gestorbenen Zellen und damit die Zytotoxizität der Reagenzien berechnen.

$$\text{Toxizität(\%)} = \frac{\text{gemessenerWert} - \text{Niedrigkontrolle}}{\text{Maximalkontrolle} - \text{Niedrigkontrolle}} \cdot 100$$

Als Niedrigkontrolle dient dabei der spontane Zelluntergang der Zellen ohne Transfektionsreagenz über 48 Stunden gemessen im Wachstumsmedium, während die lysierten Zellen die Maximalkontrolle darstellen.

#### 3.2.7 Gesamtproteinbestimmung

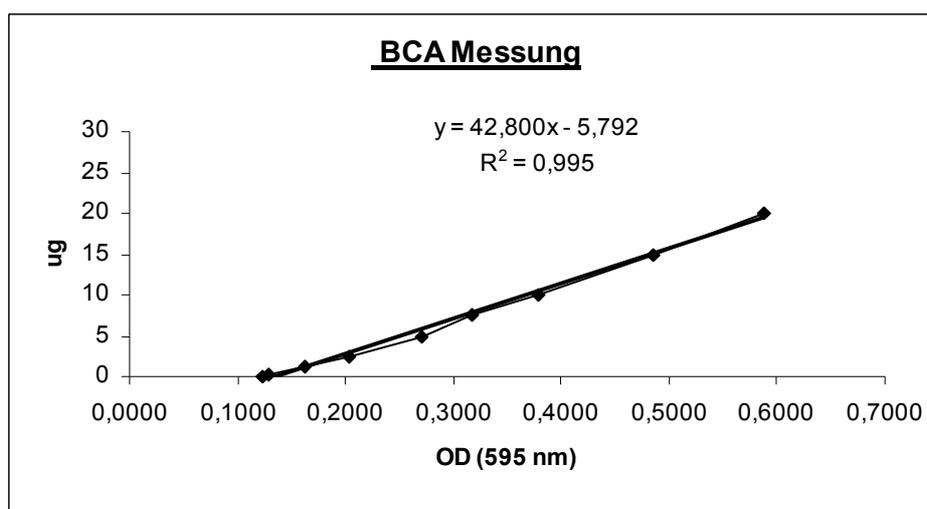
Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes je *well* ist nötig, um Verfälschungen der Ergebnisse durch unterschiedliche Zellzahlen in den *wells* zu verhindern. Die Ergebnisse der Luziferase-Messung wurden anhand der ermittelten Proteinmenge standardisiert und sind somit untereinander direkt vergleichbar. Diese Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte mit Hilfe von Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*, BCA). Alle für den Test benötigten Komponenten sind in dem angewendeten *BCA-Protein-Assay-Kit* enthalten. BCA formt einen lilafarbenen Chelatkomplex mit  $\text{Cu}^{1+}$ . Dieses entsteht wenn

$\text{Cu}^{2+}$  von Proteinen in alkalischer Umgebung reduziert wird. Ohne Protein und damit ohne  $\text{Cu}^{1+}$  behält das Reagenz seine grüne Farbe. Der lilafarbene Komplex hat eine starke Absorption bei 562 nm. Die Absorptionsrate steigt dabei linear mit dem Proteingehalt an.

Zur Durchführung des Tests in der 96-well Platte wurden die Standardreihen nach Herstellerangaben hergestellt. Im Test wurden 10  $\mu\text{l}$  Proben von transfizierten, lysierten Zellen (siehe Protokoll unter 3.2.5.1 Punkt 4) und 10  $\mu\text{l}$  Standardlösungen eingesetzt. Die Messung erfolgte im GENios Absorptions-Lesegerät bei 595 nm Wellenlänge und drei Messungen je well. Die Standardreihen wurden gemeinsam mit den Proben in einem Durchlauf gemessen. Anhand der gemessenen Absorptionsraten der Standardreihen und deren vordefinierter Proteinmenge kann eine Standardkurve bestimmt werden (Abb. 8). Über diese Standardkurve können die gemessenen Absorptionswerte in Proteinmengen umgerechnet werden. In dem unten aufgeführten Beispiel wäre dies:

$$\mu\text{g Protein im well} = 42,800 \times \text{gemessener Wert} - 5,792$$

**Abbildung 8: Standardkurve der BCA Messung zur Gesamtproteinbestimmung**



Die X-Achse zeigt die Absorption bei 595 nm. Die Y-Achse zeigt die vordefinierte Proteinmenge in  $\mu\text{g}$ .

### 3.2.8 Zusammenfassung der Arbeitsschritte

Da mehrere Verfahren parallel angewandt wurden und sich die Protokolle zum Teil überlappten, ist im Folgenden der gesamte Ablauf der Versuchsreihen und Nachweise nochmals in Punkte gegliedert dargestellt.

1. Zellen isolieren und in Kultur bringen (siehe 3.2.1).
2. Zellen in eine 96-well Platte ausbringen (5.000 Zellen/well) und kultivieren. Zu den Zellen für die Transfektionen müssen mindestens 4 wells zusätzlich für die Zytotoxizitätsbestimmung ausgesät werden (siehe 3.2.6).
3. 24 Stunden nach Aussaat 4 Einheiten je Milliliter Hyaluronidase in die dafür vorgesehenen wells zugeben (siehe 3.2.3).
4. 36 Stunden nach Aussaat Transfektion nach den jeweiligen Protokollen (siehe 3.2.2.1-15) und gleichzeitige Zugabe von 4 Einheiten je Milliliter Hyaluronidase zu den jeweiligen wells (siehe 3.2.3).
5. Zum gleichen Zeitpunkt in den wells für die Zytotoxizitätsbestimmung Mediumwechsel durchführen. 125 µl MesenCult<sup>®</sup> mit Supplementen und 4 Einheiten je Milliliter Hyaluronidase zu den jeweiligen Zellen geben.
6. 48-stündige Inkubation der Zellen mit den Reagenzien bzw. dem Medium.
7. Nach Ablauf der Inkubation 5 µl Lysat des Zytotoxizitätskit zu den Zellen der Maximalkontrolle geben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (siehe 3.2.6).

8. Alle Überstände in eine neue 96-well Platte in gleicher Verteilung pipettieren und bei 4°C aufbewahren.
9. Zellen mit 150 µl PBS spülen.
10. 30 µl Lysat in jedes well geben und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
11. 10 µl Lysat entnehmen und für Proteinbestimmung bei -80°C konservieren (siehe 3.2.7).
12. Luziferase-Messung mit den verbliebenen 20 µl Lysat (siehe 3.2.5.1).
13. Bestimmung der Zytotoxizität in den aufbewahrten Überständen (siehe 3.2.6).
14. Gesamtproteinbestimmung mit den konservierten 10 µl Lysat (siehe 3.2.7).

Alle Messungen wurden in drei Versuchsreihen und jeweils zwei Konditionen je Reagenz durchgeführt und anschließend die Mittelwerte und die Standardabweichungen bestimmt. Während innerhalb einer Versuchsreihe nur Zellen des gleichen Spenders verwendet wurden, unterschieden sich die Spender der einzelnen Versuchsreihen.

### *3.2.9 Statistische Auswertung*

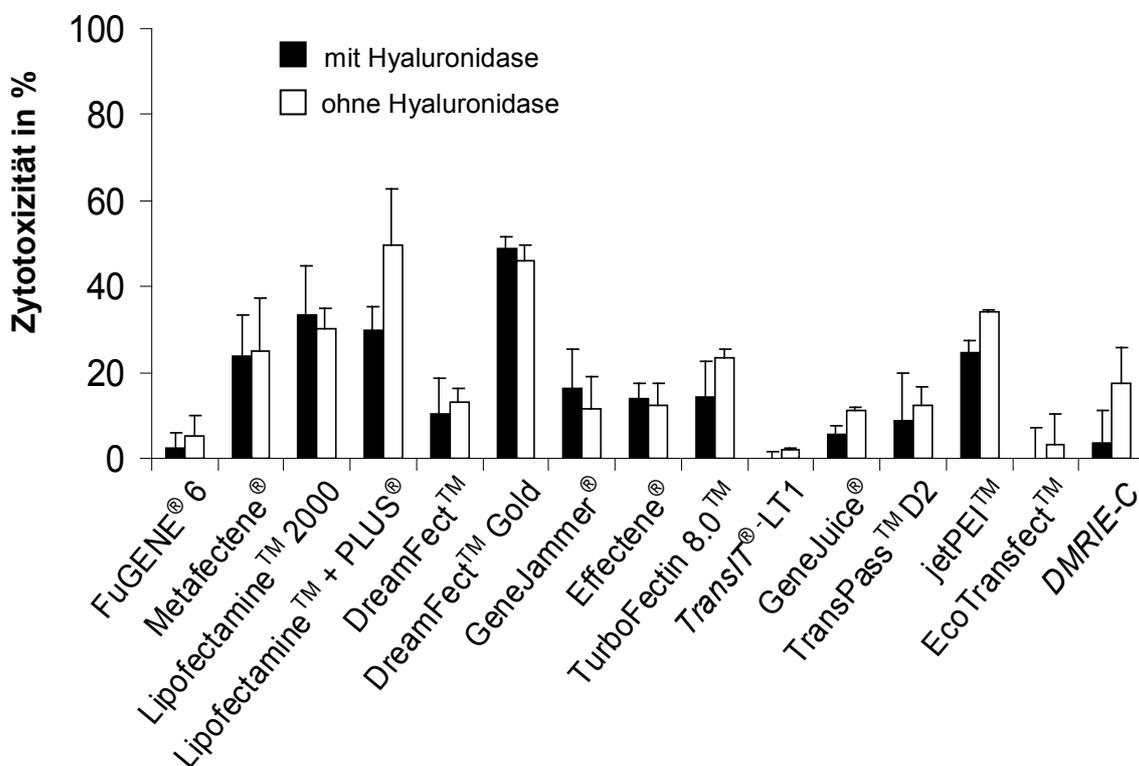
Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Sigma Stat. 3.0 von Cisco Systems. Dabei wurden der t-Test und der Mann-Whitney Rank Sum Test angewandt. Statistische Signifikanz wurde angenommen bei Werten innerhalb des 95% Konfidenzintervalls, also einem p-Wert < 0,05.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Zytotoxizität

Folgende Abbildung zeigt die Mittelwerte und deren Standardabweichung in Prozent toter Zellen je *well* für jedes Reagenz.

**Abbildung 9: Zytotoxizitätsbestimmung der Reagenzien nach Einsatz an humanen adulten mesenchymalen Stammzellen**



Werte sind dargestellt als Prozent toter Zellen in Bezug auf die Ausgangszellzahl. Mit Hyaluronidase: Transfektion nach Protokoll des jeweiligen Reagenz mit Hyaluronidasezusatz. Ohne Hyaluronidase: Transfektion nach Protokoll des jeweiligen Reagenz ohne Hyaluronidasezusatz.

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, weisen die Reagenzien in Bezug auf ihre Zytotoxizität sehr große Unterschiede auf (Abb. 9). Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Toxizität der jeweiligen Reagenzien durch den Einsatz von Hyaluronidase beobachtet werden. Auch bei den augenscheinlich größten Differenzen der Toxizitäten zwischen der Behandlung mit Hyaluronidase und der Transfektion mit Standardprotokoll waren die Unterschiede nicht statistisch signifikant. So ergaben sich für das Reagenz Lipofectamine™ + PLUS® Toxizitäten von  $29,67\% \pm 5,82\%$  mit Hyaluronidase und  $49,53\% \pm 13,35\%$  ohne Hyaluronidase ( $p=0,333$ ) und für *DMRIE-C*  $3,72\% \pm 7,53\%$  mit Hyaluronidase und  $17,31\% \pm 8,59\%$  ohne Hyaluronidase ( $p=0,333$ ). Aus diesem Grund wurde für die weiteren Berechnungen nur noch der Mittelwert der Toxizitäten aus den Werten mit und ohne Zugabe von Hyaluronidase des jeweiligen Reagenz verwendet.

Insgesamt konnten Schwankungen der Toxizität der Reagenzien zwischen nahezu keiner Toxizität (*TransIT*®-LT1:  $0,00\% \pm 1,69\%$  mit Hyaluronidase und  $2,15\% \pm 0,32\%$  ohne Hyaluronidase) und sehr hohen Toxizitäten, bei denen nahezu jede zweite Ausgangszelle zu Grunde ging (*DreamFect*™ Gold:  $48,96\% \pm 2,53\%$  mit Hyaluronidase und  $45,86\% \pm 3,62\%$  ohne Hyaluronidase), gezeigt werden.

#### 4.2 Luziferase-Messung

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Messung der Transgenexpression des Luziferasegens für jedes Reagenz einzeln wiedergegeben. Dabei sind die ermittelten Werte auf die Proteinmenge des jeweiligen *wells* standardisiert, um Schwankungen in der Zellzahl auszugleichen (siehe 3.2.7). Die Werte sind somit als RLU je mg Protein dargestellt. Es sind sowohl die Mittelwerte der Kontrolltransfektionen, als auch die im Mittel erreichten Werte der mit dem Luziferasegen transfizierten Zellen und die dazugehörigen Standardabweichungen angegeben.

##### 4.2.1 FuGENE® 6

**Tabelle 4: Luziferaseaktivität (RLU/mg Protein) nach Transfektion mit FuGENE® 6**

	ohne Hyaluronidase	mit Hyaluronidase	p-Wert
<b>Kontrolle</b>	261 ± 341	356 ± 484	n.e.
<b>luc Plasmid</b>	1704 ± 1907	1081 ± 626	0,699
<b>p-Wert</b>	0,041	0,049	

Kontrolle: Zellen transfiziert mit dem IGF-I Plasmid. luc Plasmid: Zellen transfiziert mit dem Luziferaseplasmid. p-Wert: Vergleich der Werte der jeweiligen Spalte bzw. Zeile. n.e.: nicht erhoben.

Sowohl ohne Hyaluronidase, als auch mit deren Zugabe konnten signifikant höhere RLU Werte für die mit dem Luziferasegen transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden.

Eine Verbesserung der Transgenexpression durch Hyaluronidase konnte nicht beobachtet werden.

4.2.2 Metafectene<sup>®</sup>**Tabelle 5: Luziferaseaktivität (RLU/mg Protein) nach Transfektion mit Metafectene<sup>®</sup>**

	ohne Hyaluronidase	mit Hyaluronidase	p-Wert
<b>Kontrolle</b>	894 ± 559	1244 ± 721	n.e.
<b>luc Plasmid</b>	2798 ± 2694	2494 ± 860	0,798
<b>p-Wert</b>	0,093	0,021	

Kontrolle: Zellen transfiziert mit dem IGF-I Plasmid. luc Plasmid: Zellen transfiziert mit dem Luziferaseplasmid. p-Wert: Vergleich der Werte der jeweiligen Spalte bzw. Zeile. n.e.: nicht erhoben.

Ohne Hyaluronidase konnte keine Signifikanz in der Erhöhung der RLU Werte für die mit dem Luziferasegen transfizierten Zellen festgestellt werden. Durch den Einsatz von Hyaluronidase wurde hierbei jedoch Signifikanz erreicht.

Eine signifikante Erhöhung der Transgenexpression durch den Einsatz von Hyaluronidase konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

4.2.3 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000**Tabelle 6: Luziferaseaktivität (RLU/mg Protein) nach Transfektion mit Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000**

	ohne Hyaluronidase	mit Hyaluronidase	p-Wert
<b>Kontrolle</b>	786 ± 462	761 ± 509	n.e.
<b>luc Plasmid</b>	4001 ± 3849	4255 ± 2349	0,893
<b>p-Wert</b>	0,041	0,002	

Kontrolle: Zellen transfiziert mit dem IGF-I Plasmid. luc Plasmid: Zellen transfiziert mit dem Luziferaseplasmid. p-Wert: Vergleich der Werte der jeweiligen Spalte bzw. Zeile. n.e.: nicht erhoben.

In den mit dem Luziferasegen transfizierten Zellen konnten sowohl ohne Hyaluronidase, als auch mit deren Zugabe signifikant höhere RLU Werte gemessen werden.

Die Expression des Transgen konnte um den Faktor 1,06 durch den Einsatz von Hyaluronidase verbessert werden. Signifikant war diese Verbesserung jedoch nicht.

#### 4.2.4 Lipofectamine<sup>TM</sup> + PLUS<sup>®</sup>

**Tabelle 7: Luziferaseaktivität (RLU/mg Protein) nach Transfektion mit Lipofectamine<sup>TM</sup> + PLUS<sup>®</sup>**

	ohne Hyaluronidase	mit Hyaluronidase	p-Wert
<b>Kontrolle</b>	1321 ± 486	1746 ± 1385	n.e.
<b>luc Plasmid</b>	2000 ± 808	3207 ± 1615	0,133
<b>p-Wert</b>	0,109	0,124	

Kontrolle: Zellen transfiziert mit dem IGF-I Plasmid. luc Plasmid: Zellen transfiziert mit dem Luziferaseplasmid. p-Wert: Vergleich der Werte der jeweiligen Spalte bzw. Zeile. n.e.: nicht erhoben.

Weder unter Verwendung von Hyaluronidase noch ohne diese konnte eine signifikante Erhöhung der Luziferaseaktivität festgestellt werden.

Der Mittelwert der Einzelergebnisse der mit dem Luziferasegen transfizierten Zellen konnte jedoch unter Einsatz von Hyaluronidase um den Faktor 1,60 gesteigert werden. Statistische Signifikanz für diesen Effekt lag allerdings nicht vor.

## 4.2.5 DreamFect™

Tabelle 8: Luziferaseaktivität (RLU/mg Protein) nach Transfektion mit DreamFect™

	ohne Hyaluronidase	mit Hyaluronidase	p-Wert
<b>Kontrolle</b>	895 ± 539	503 ± 417	n.e.
<b>luc Plasmid</b>	1620 ± 1513	1163 ± 758	0,524
<b>p-Wert</b>	0,295	0,091	

Kontrolle: Zellen transfiziert mit dem IGF-I Plasmid. luc Plasmid: Zellen transfiziert mit dem Luziferaseplasmid. p-Wert: Vergleich der Werte der jeweiligen Spalte bzw. Zeile. n.e.: nicht erhoben.

Weder mit noch ohne Hyaluronidase konnten signifikant höhere RLU/mg Protein Werte für die mit Luziferase transfizierten Zellen gemessen werden.

Eine Verbesserung der Transgenexpressin durch Hyaluronidase wurde nicht beobachtet.

## 4.2.6 DreamFect™ Gold

Tabelle 9: Luziferaseaktivität (RLU/mg Protein) nach Transfektion mit DreamFect™ Gold

	ohne Hyaluronidase	mit Hyaluronidase	p-Wert
<b>Kontrolle</b>	1635 ± 1299	1400 ± 786	n.e.
<b>luc Plasmid</b>	2215 ± 1110	2721 ± 1457	0,513
<b>p-Wert</b>	0,425	0,079	

Kontrolle: Zellen transfiziert mit dem IGF-I Plasmid. luc Plasmid: Zellen transfiziert mit dem Luziferaseplasmid. p-Wert: Vergleich der Werte der jeweiligen Spalte bzw. Zeile. n.e.: nicht erhoben.

Auch hier konnte weder unter Einsatz von Hyaluronidase noch ohne diese eine statistisch signifikante Luziferaseaktivität gemessen werden.

Der Mittelwert der erzielten Ergebnisse für die mit dem Luziferasegen transfizierten Zellen konnte zwar unter Einsatz von Hyaluronidase um den Faktor 1,23 gesteigert werden, signifikant war diese Verbesserung jedoch nicht.

4.2.7 GeneJammer<sup>®</sup>Tabelle 10: Luziferaseaktivität (RLU/mg Protein) nach Transfektion mit GeneJammer<sup>®</sup>

	ohne Hyaluronidase	mit Hyaluronidase	p-Wert
<b>Kontrolle</b>	1207 ± 710	1373 ± 1022	n.e.
<b>luc Plasmid</b>	11053 ± 7872	15357 ± 11001	0,454
<b>p-Wert</b>	0,009	0,026	

Kontrolle: Zellen transfiziert mit dem IGF-I Plasmid. luc Plasmid: Zellen transfiziert mit dem Luziferaseplasmid. p-Wert: Vergleich der Werte der jeweiligen Spalte bzw. Zeile. n.e.: nicht erhoben.

Der Unterschied zwischen den mit dem Luziferasegen transfizierten Zellen und jenen, die ein Kontrollgen erhielten zeigte sich sowohl bei Einsatz von Hyaluronidase als auch ohne deren Zugabe als statistisch signifikant.

Die Transgenexpression konnte für GeneJammer<sup>®</sup> durch die Zugabe von Hyaluronidase um das 1,39-fache gesteigert werden. Dieser positive Effekt der Hyaluronidase erreichte jedoch keine Signifikanz.

4.2.8 Effectene<sup>®</sup>Tabelle 11: Luziferaseaktivität (RLU/mg Protein) nach Transfektion mit Effectene<sup>®</sup>

	ohne Hyaluronidase	mit Hyaluronidase	p-Wert
<b>Kontrolle</b>	817 ± 416	465 ± 340	n.e.
<b>luc Plasmid</b>	1732 ± 886	2872 ± 1561	0,151
<b>p-Wert</b>	0,093	0,004	

Kontrolle: Zellen transfiziert mit dem IGF-I Plasmid. luc Plasmid: Zellen transfiziert mit dem Luziferaseplasmid. p-Wert: Vergleich der Werte der jeweiligen Spalte bzw. Zeile. n.e.: nicht erhoben.

Während ohne Hyaluronidase kein signifikanter Unterschied der RLU/mg Protein Werte zwischen den mit dem Luziferasegen transfizierten Zellen und den Kontrollzellen vorlag, konnte bei Einsatz von Hyaluronidase eine signifikante Erhöhung der Werte gezeigt werden.

Die Expression des Transgen konnte durch den Einsatz von Hyaluronidase um den Faktor 1,66 gesteigert werden. Statistisch signifikant war dieser Effekt jedoch nicht.

4.2.9 Turbofectin 8.0<sup>TM</sup>**Tabelle 12: Luziferaseaktivität (RLU/mg Protein) nach Transfektion mit Turbofectin 8.0<sup>TM</sup>**

	ohne Hyaluronidase	mit Hyaluronidase	p-Wert
<b>Kontrolle</b>	3114 ± 3665	1354 ± 602	n.e.
<b>luc Plasmid</b>	4016 ± 3003	2462 ± 1613	0,290
<b>p-Wert</b>	0,651	0,146	

Kontrolle: Zellen transfiziert mit dem IGF-I Plasmid. luc Plasmid: Zellen transfiziert mit dem Luziferaseplasmid. p-Wert: Vergleich der Werte der jeweiligen Spalte bzw. Zeile. n.e.: nicht erhoben.

Weder für den Einsatz von Hyaluronidase noch ohne deren Zugabe konnten signifikant höhere RLU/mg Protein Werte im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt werden.

Der Einsatz von Hyaluronidase verbesserte die Transgenexpression des Transfektionsreagenz nicht.

4.2.10 *TransIT*<sup>®</sup>-LT1**Tabelle 13: Luziferaseaktivität (RLU/mg Protein) nach Transfektion mit *TransIT*<sup>®</sup>-LT1**

	ohne Hyaluronidase	mit Hyaluronidase	p-Wert
<b>Kontrolle</b>	2828 ± 2356	3132 ± 1749	n.e.
<b>luc Plasmid</b>	4957 ± 2906	7437 ± 3307	0,198
<b>p-Wert</b>	0,132	0,018	

Kontrolle: Zellen transfiziert mit dem IGF-I Plasmid. luc Plasmid: Zellen transfiziert mit dem Luziferaseplasmid. p-Wert: Vergleich der Werte der jeweiligen Spalte bzw. Zeile. n.e.: nicht erhoben.

Ohne Hyaluronidase wurde keine Signifikanz im Unterschied zwischen den Zellen, die das Luziferasegen erhielten, und den Kontrollzellen erzielt. Mit Hyaluronidase konnte jedoch eine signifikante Erhöhung der Luziferaseaktivität in den Zellen festgestellt werden.

Der durchschnittliche Wert für die mit dem Luziferasegen transfizierten Zellen konnte unter Einsatz von Hyaluronidase um den Faktor 1,50 gesteigert werden. Signifikanz lag für diese Verbesserung nicht vor.

## 4.2.11 GeneJuice®

Tabelle 14: Luziferaseaktivität (RLU/mg Protein) nach Transfektion mit GeneJuice®

	ohne Hyaluronidase	mit Hyaluronidase	p-Wert
<b>Kontrolle</b>	2999 ± 2791	939 ± 323	n.e.
<b>luc Plasmid</b>	3679 ± 2861	3066 ± 1423	0,648
<b>p-Wert</b>	0,685	0,009	

Kontrolle: Zellen transfiziert mit dem IGF-I Plasmid. luc Plasmid: Zellen transfiziert mit dem Luziferaseplasmid. p-Wert: Vergleich der Werte der jeweiligen Spalte bzw. Zeile. n.e.: nicht erhoben.

Die Transfektion ohne Hyaluronidase zeigte keine signifikante Luziferaseaktivität in den Zellen im Vergleich zu ihrer Kontrolle. Unter Einsatz von Hyaluronidase konnte jedoch eine signifikante Erhöhung der Transgenexpression nachgewiesen werden.

Verbesserte Transgenexpression mit Hyaluronidase konnte nicht gezeigt werden.

4.2.12 TransPass<sup>TM</sup> D2**Tabelle 15: Luziferaseaktivität (RLU/mg Protein) nach Transfektion mit TransPass<sup>TM</sup> D2**

	ohne Hyaluronidase	mit Hyaluronidase	p-Wert
<b>Kontrolle</b>	5768 ± 4533	1961 ± 2111	n.e.
<b>luc Plasmid</b>	4322 ± 3478	3341 ± 3082	0,616
<b>p-Wert</b>	0,549	0,387	

Kontrolle: Zellen transfiziert mit dem IGF-I Plasmid. luc Plasmid: Zellen transfiziert mit dem Luziferaseplasmid. p-Wert: Vergleich der Werte der jeweiligen Spalte bzw. Zeile. n.e.: nicht erhoben.

Es konnte weder mit noch ohne Hyaluronidase eine signifikante Erhöhung der Luziferaseaktivität in den mit dem Luziferasegen transfizierten Zellen festgestellt werden.

Eine verbesserte Expression des Transgen nach Einsatz von Hyaluronidase lag nicht vor.

## 4.2.13 JetPEI™

**Tabelle 15: Luziferaseaktivität (RLU/mg Protein) nach Transfektion mit JetPEI™**

	ohne Hyaluronidase	mit Hyaluronidase	p-Wert
<b>Kontrolle</b>	1543 ± 1048	1420 ± 1327	n.e.
<b>luc Plasmid</b>	3064 ± 1213	3890 ± 3645	0,610
<b>p-Wert</b>	0,043	0,150	

Kontrolle: Zellen transfiziert mit dem IGF-I Plasmid. luc Plasmid: Zellen transfiziert mit dem Luziferaseplasmid. p-Wert: Vergleich der Werte der jeweiligen Spalte bzw. Zeile. n.e.: nicht erhoben.

Hier konnte eine statistisch signifikante Erhöhung der Luziferaseaktivität für die Transfektion ohne Hyaluronidase festgestellt werden, während bei der Transfektion mit Hyaluronidase keine Signifikanz erreicht wurde.

Durch die Verwendung von Hyaluronidase konnte eine mittlere Verbesserung der Transgenexpression um den Faktor 1,27 beobachtet werden, jedoch wurde hierbei keine Signifikanz erreicht.

4.2.14 *EcoTransfect*<sup>®</sup>**Tabelle 17: Luziferaseaktivität (RLU/mg Protein) nach Transfektion mit *EcoTransfect*<sup>®</sup>**

	ohne Hyaluronidase	mit Hyaluronidase	p-Wert
<b>Kontrolle</b>	4579 ± 2697	4158 ± 4025	n.e.
<b>luc Plasmid</b>	6798 ± 2316	6328 ± 3095	0,772
<b>p-Wert</b>	0,157	0,240	

Kontrolle: Zellen transfiziert mit dem IGF-I Plasmid. luc Plasmid: Zellen transfiziert mit dem Luziferaseplasmid. p-Wert: Vergleich der Werte der jeweiligen Spalte bzw. Zeile. n.e.: nicht erhoben.

Auch hier konnte keine signifikante Erhöhung der Luziferaseaktivität durch die Transfektion weder mit noch ohne Hyaluronidase nachgewiesen werden.

Eine verbesserte Transgenexpression durch den Einsatz von Hyaluronidase lag ebenfalls nicht vor.

4.2.15 *DMRIE-C***Tabelle 18: Luziferaseaktivität (RLU/mg Protein) nach Transfektion mit *DMRIE-C***

	ohne Hyaluronidase	mit Hyaluronidase	p-Wert
<b>Kontrolle</b>	836 ± 712	1154 ± 652	n.e.
<b>luc Plasmid</b>	1382 ± 719	1360 ± 478	0,699
<b>p-Wert</b>	0,216	0,546	

Kontrolle: Zellen transfiziert mit dem IGF-I Plasmid. luc Plasmid: Zellen transfiziert mit dem Luziferaseplasmid. p-Wert: Vergleich der Werte der jeweiligen Spalte bzw. Zeile. n.e.: nicht erhoben.

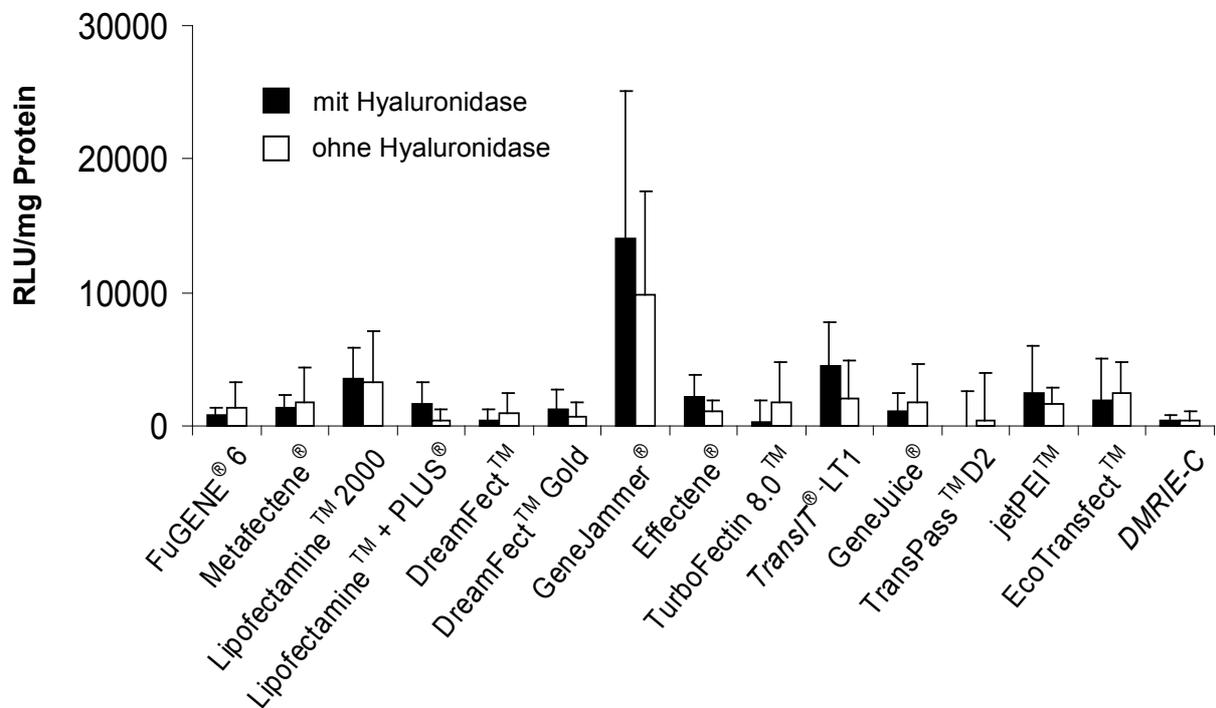
Es konnte weder für die Transfektion ohne Hyaluronidase noch bei dem Einsatz von Hyaluronidase ein statistisch signifikanter Unterschied in der Luziferaseaktivität zwischen den mit dem Luziferasegen transfizierten Zellen und der Kontrolltransfektion festgestellt werden.

Eine Verbesserung der Expression des Transgen durch Hyaluronidase konnte nicht beobachtet werden.

4.2.16 *Vergleich der Transgenexpressionen*

Zusammenfassend zeigten sich deutliche Unterschiede im Grad der Expression des eingeschleusten Luziferasegens je nach verwendetem Reagenz. Zur Veranschaulichung sind in folgender Grafik alle Transgenexpressionen der einzelnen Reagenzien als RLU/mg Protein abzüglich der jeweiligen Kontrollwerte dargestellt (Abb 10).

Abbildung 10: Expression des Luziferasegens je Reagenz



mit Hyaluronidase: Transfektion nach Protokoll des jeweiligen Reagenz mit Hyaluronidasezusatz.  
 ohne Hyaluronidase: Transfektion nach Protokoll des jeweiligen Reagenz ohne Hyaluronidasezusatz.

Der Vergleich zeigt die große Bandbreite der Höhe der Transgenexpressionen je nach Reagenz. Während das Polyamin GeneJammer® mit  $15357 \pm 11001$  RLU/mg Protein mit Hyaluronidase bzw.  $11053 \pm 7872$  RLU/mg Protein ohne Hyaluronidase die höchste Transgenexpression aufwies, wurde von anderen Reagenzien nur eine sehr geringe Expression des Transgen erreicht (TransPass™ D2  $3341 \pm 3082$  RLU/mg Protein mit Hyaluronidase und  $4322 \pm 3478$  RLU/mg Protein ohne Hyaluronidase).

Zusammenfassend führte die Inkubation mit Hyaluronidase bei einigen Reagenzien zu einer geringgradigen Verbesserung der Transgenexpression, ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

### 4.3 Transgenexpression im Verhältnis zur Toxizität

Da die Transgenexpression des Luziferasegens auf den Gesamtproteingehalt nach stattgehabter Transfektion standardisiert wurde, könnten theoretisch falsch hohe Werte für ein Reagenz ermittelt worden sein, wenn dieses Reagenz eine hohe Anzahl an nicht transfizierten Zellen abgetötet hat. Somit muss die Transgenexpression eines Reagenz in Relation zu dessen Toxizität gesehen werden, um die effektive Wirkung auf die Ausgangszellzahl zu bestimmen.

Unten stehende Tabelle zeigt eine Übersicht dieser Relation für jedes Reagenz. Dabei wurde der jeweils beste RLU/mg Protein-Mittelwert aus obigen Ergebnistabellen jedes Reagenz mit der Überlebensrate multipliziert. Die Überlebensrate errechnet sich dabei aus untenstehender Formel.

$$\text{Überlebensrate in \%} = 100\% - \text{mittlere Toxizität in \%}$$

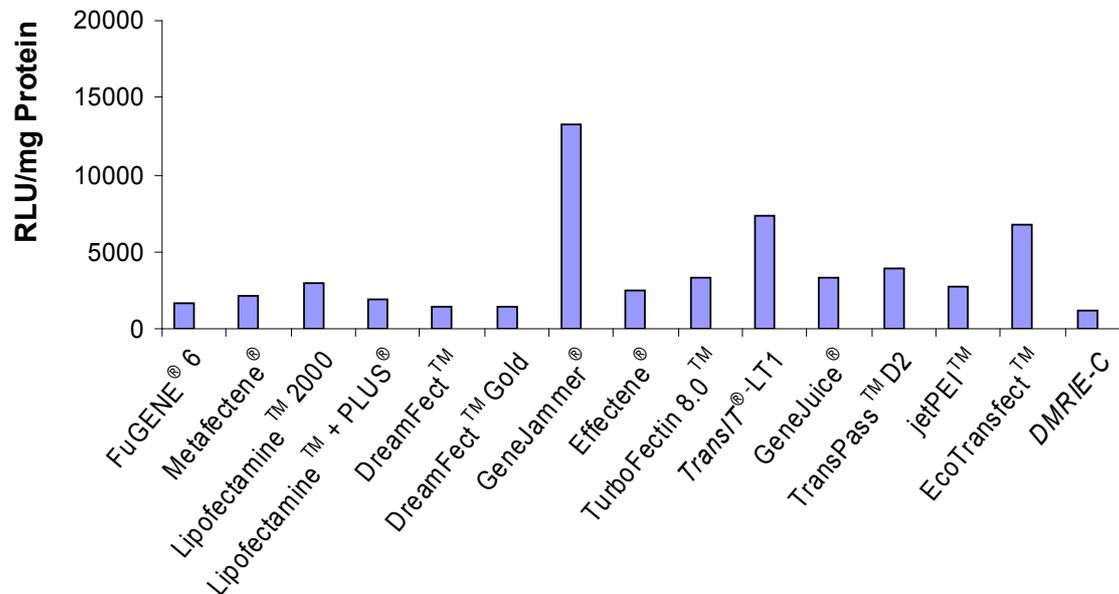
**Tabelle 19: Transgenexpression in Relation zur Toxizität je Reagenz**

Reagenz	ermittelte Transgenexpression in RLU/mg Protein	Überlebensrate in %	Transgenexpression in Relation zur Toxizität in RLU/mg Protein
FuGENE® 6	1704	96,2	1639
Metafectene®	2798	75,6	2116
Lipofectamine™ 2000	4255	68,2	2900
Lipofectamine™ + PLUS	3207	60,4	1937
DreamFect™	1620	88,4	1432
DreamFect™ Gold	2721	52,6	1431
GeneJammer®	15357	86,3	13244
Effectene®	2872	86,9	2497
Turbofectin 8.0™	4016	81,3	3265
TransIT®-LT1	7437	98,9	7357
GeneJuice®	3679	91,6	3371
TransPass™ D2	4322	89,6	3870
jetPEI™	3890	70,7	2750
EcoTransfect™	6798	98,5	6693
DMRIE-C	1382	89,5	1237

Ermittelte Transgenexpression: bester Mittelwert der Luziferasebestimmung, Werte in RLU/mg Protein.  
 Überlebensrate: mittlere Überlebensrate der Zellen nach Transfektion, Werte in %.  
 Transgenexpression in Relation zur Toxizität: Transgenexpression \* Überlebensrate, Werte in RLU/mg.

Zur Veranschaulichung sind in folgender Grafik die mit der Toxizität korrelierten Transgenexpressionen nochmals dargestellt (Abb. 11).

**Abbildung 11: Transgenexpression in Relation zur Toxizität**



Die angegebenen Werte der Transgenexpression sind hierbei korreliert mit der Überlebensrate. Ein hoher Wert spricht also für eine hohe Transgenexpression bei gleichzeitig niedriger Toxizität.

Abbildung 11 zeigt, dass auch unter Beachtung der Toxizität das Reagenz GeneJammer® mit einer mittleren Überlebensrate von 86,2% der Zellen nach dessen Einsatz und einer errechneten Transgenexpression von 13244 RLU/mg Protein die mit Abstand höchste Rate von Ausgangszellen der getesteten 15 Systeme transfiziert. Seine Transgenexpression in Bezug auf die Ausgangszellzahl ist damit fast doppelt so hoch wie die der beiden folgenden Reagenzien *TransIT*®-LT1 (7357 RLU/mg Protein) und EcoTransfect™ (6693 RLU/mg Protein). Gerade im Hinblick auf empfindliche und schwer zu kultivierende Zellen wie humane adulte mesenchymale Stammzellen ist dies ein wichtiger Punkt, der für die weitere Anwendung von GeneJammer® an diesem speziellen Zelltyp spricht.

#### 4.4 Effizienzbestimmung

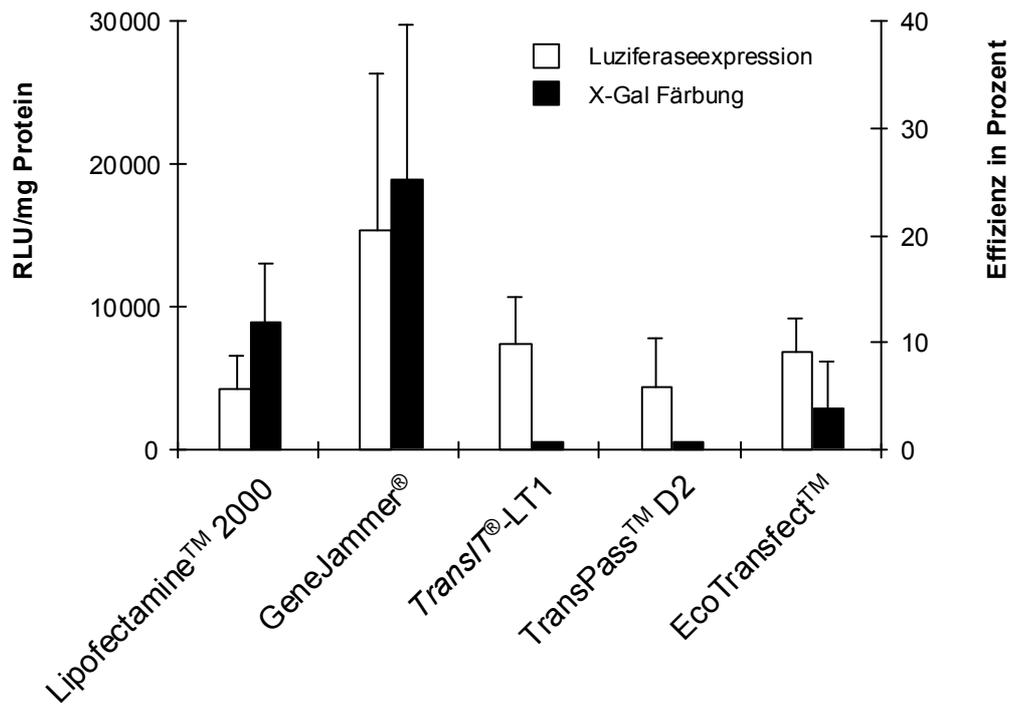
Nach dem systematischen Vergleich aller Reagenzien mittels Luziferasenachweis wurde für die besten fünf Reagenzien dieses Nachweisverfahrens (Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000, GeneJammer<sup>®</sup>, *TransIT*<sup>®</sup>-LT1, TransPass<sup>TM</sup> D2 und EcoTransfect<sup>TM</sup>) zusätzlich nach Gentransfer des *lacZ* Vektors die Effizienz durch X-Gal-Färbung bestimmt.

Für das Polyamin GeneJammer<sup>®</sup> ergab sich so nach einer Luziferaseexpression von  $15357 \pm 11001$  RLU/mg Protein eine Effizienz von  $25,27\% \pm 14,62\%$  (Abb. 13). Interessanterweise lagen für *TransIT*<sup>®</sup>-LT1 und TransPass<sup>TM</sup> D2 die Effizienzen nach X-Gal Färbung trotz hoher Luziferasewerte von  $7437 \pm 3307$  beziehungsweise  $4322 \pm 3478$  RLU/mg Protein bei unter 1%. Die Werte der beiden Markergene korrelierten also nicht. EcoTransfect<sup>TM</sup> ( $6798 \pm 2316$  RLU/mg Protein) erzielte nach Auszählung der gefärbten Zellen eine Effizienz von  $3,82\% \pm 4,48\%$ , während für Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 ( $4255 \pm 2349$  RLU/mg Protein) eine Effizienz von  $11,76\% \pm 5,99\%$  vorlag (Abb. 12).

Die ermittelte Transfektionseffizienz des Reagenz GeneJammer<sup>®</sup> (25,27%) ist damit mehr als doppelt so hoch wie die Effizienz des für dieses Markergen nächst besten Reagenz Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (11,76%) und mehr als sechsmal so hoch wie die Effizienz des drittbesten Reagenz EcoTransfect<sup>TM</sup> (3,82%). Somit konnte auch mittels X-Gal Färbung ein erfolgreicher Gentransfer in humane adulte mesenchymale Stammzellen bewiesen und die sehr gute Transgenexpression von GeneJammer<sup>®</sup> für ein weiteres Markergen gezeigt werden.

In unten dargestellter Abbildung sind die Ergebnisse nach Luziferasebestimmung und die ermittelten Effizienzen nach X-Gal Färbung der besten fünf Reagenzien direkt gegenüber gestellt.

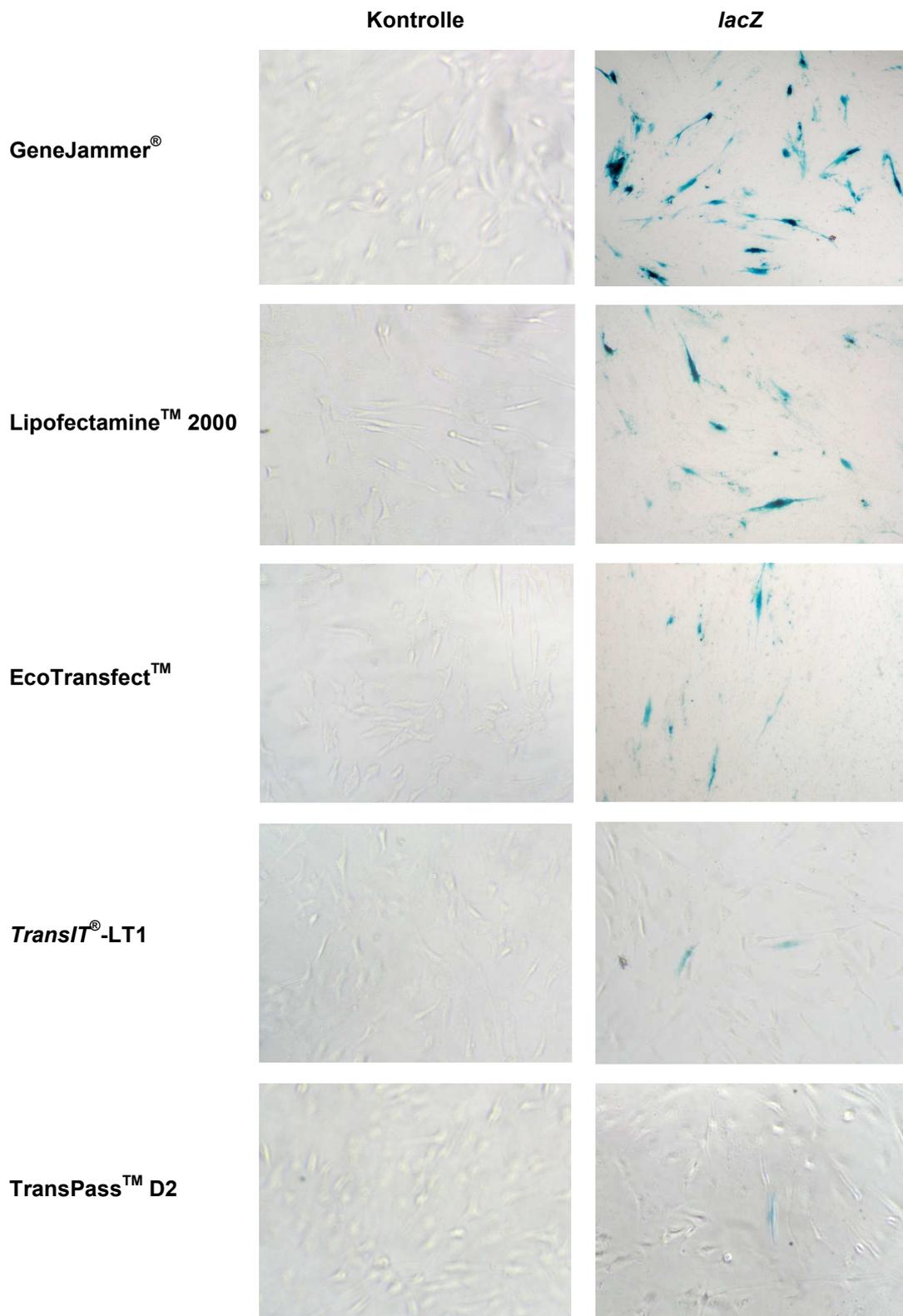
**Abbildung 12: Vergleich von Luziferaseexpression und Effizienz nach X-Gal Färbung**



Die weißen Balken zeigen die Luziferaseexpression und beziehen sich auf die linke Skala mit RLU/mg Protein. Die schwarzen Balken zeigen die *lacZ* Genexpression und beziehen sich auf die rechte Skala mit Effizienz in Prozent.

Abbildung 13 zeigt repräsentative Ausschnitte von X-Gal gefärbten humanen adulten mesenchymalen Stammzellen nach Transfektion mit dem Luziferaseplasmid für jedes der genannten fünf Reagenzien (Abb.13).

**Abbildung 13: X-Gal Färbung transfizierter humaner adulter mesenchymaler Stammzellen**



Transfektion mit dem jeweiligen Reagenz, dem IGF-I Plasmid als Kontrolle oder dem *lacZ* Markergen. Vergrößerung jeweils x 10.

## 5. Diskussion

### 5.1 Ergebnisse unserer Untersuchungen

Humane adulte mesenchymale Stammzellen sind schwer transfizierbar. In der vorliegenden Arbeit konnten wir dennoch zeigen, dass

1. einige der getesteten Reagenzien (FuGENE<sup>®</sup> 6, *TransIT*<sup>®</sup>-LT1, EcoTransfect<sup>™</sup>) eine auch für die empfindlichen humanen adulten mesenchymalen Stammzellen niedrige Toxizität aufweisen.
2. das Polyamin GeneJammer<sup>®</sup> die höchste Transgenexpression von allen getesteten Reagenzien erreichte.
3. die Inkubation mit Hyaluronidase die Transgenexpression des Reagenz GeneJammer<sup>®</sup> um den Faktor 1,4 steigern konnte, jedoch ohne statistische Signifikanz.
4. Effizienzen von etwa 25% durch Transfektion humaner adulter mesenchymaler Stammzellen mit GeneJammer<sup>®</sup> möglich sind.
5. die Höhe der Transgenexpression des Luziferasegens nicht immer mit der durch X-Gal Färbung ermittelten Transfektionseffizienz korreliert.

Der systematische Vergleich der untersuchten 15 Reagenzien zeigt erhebliche Unterschiede in Bezug auf die Effizienz des Gentransfer und der Toxizität auf die Stammzellen. Dies ist vermutlich vor allem auf die unterschiedliche und nicht genau bekannte Zusammensetzung der einzelnen Reagenzien zurückzuführen, wodurch die exakten Wirkmechanismen noch nicht vollständig geklärt sind. Ebenso zeigten sich im Rahmen unserer Untersuchung unterschiedliche Transfektionsergebnisse bei den Zellen einzelner Spender, was die Vermutung nahe legt, dass nicht alle

mesenchymalen Stammzellen von unterschiedlichen Spendern in gleichem Maße transfizierbar sind. Dies drückt sich unter anderem in der teilweise erhöhten Standardabweichung der ermittelten Werte aus, die sich aus Ergebnissen von Testreihen mit Zellen jeweils unterschiedlicher Spender zusammensetzen. Während die Proportionalität der Reagenzien untereinander erhalten blieb, schwankten die Transgenexpressionen teilweise von Spender zu Spender, also von Testreihe zu Testreihe. Der Vergleich der angewandten Reagenzien untereinander bleibt hiervon jedoch unberührt.

In Zusammenschau zeigte der Luziferasenachweis bei einigen Reagenzien eine gute Expression des Transgens. Für das *lacZ* Gen konnte die erfolgreiche Transfektion jedoch nicht in allen der hierauf getesteten fünf Reagenzien bestätigt werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse des Transgennachweises zwischen der Transfektion mit dem Luziferasegen und der Transfektion mit dem *lacZ* Gen sind möglicher Weise auf die unterschiedliche Größe der beiden Gene zurückzuführen. Während das *lacZ* Gen aus 1023 Aminosäuren besteht (Schmidt et al. 1989), also von mindestens 3,07 Kilobasen kodiert wird, ist das Luziferasegen mit etwa 1,8 Kilobasen (de Wet et al. 1987) erheblich kleiner und damit eventuell einer Komplexierung und dem Einschleusen in das Zellinnere eher zugänglich. Möglicherweise spielt also die Größe eines einzuschleusenden Gens auch in der nichtviralen Transfektion eine nicht unerhebliche Rolle.

Die Verwendung von Hyaluronidase führte nur eine geringgradige Verbesserung der Transfektionseffizienz herbei. Eine signifikante Erhöhung der Transgenexpression wie sie in der Vergangenheit für Chondrozyten gezeigt werden konnte (Madry und Trippel 2000) lag bei den von uns untersuchten humanen adulten mesenchymalen Stammzellen nicht vor. Eventuell kann dies durch das Fehlen von extrazellulärer Hyaluronsäure, wie es bei Chondrozyten der Fall ist, erklärt werden. Eine wichtige Komponente in der Wirkung der Hyaluronidase auf die Transfektion scheint somit der Verdau der extrazellulären Hyaluronsäure zu sein, wodurch möglicherweise

eine bessere Interaktion von Transfektionskomplexen und Zellmembran gewährleistet werden kann. Um die Effizienz zukünftig eingesetzter Transfektionsreagenzien zu maximieren, muss die Anwendung von Hyaluronidase jedoch auch bei anderen Zelllinien immer mit in Betracht gezogen werden, da auch eine nur geringgradige Erhöhung der Transgenexpression bereits von Nutzen sein könnte und selbst bei empfindlichen Zellen wie den mesenchymalen Stammzellen keine erhöhte Toxizität durch Hyaluronidase nachzuweisen war. Der Einsatz der Hyaluronidase scheint also nur wenige Risiken für die zu behandelnden Zellen zu besitzen. Eine Evaluation, inwieweit Hyaluronidase einen Effekt auf die Differenzierbarkeit oder den Differenzierungsprozess von mesenchymalen Stammzellen besitzt, wäre in diesem Zusammenhang eventuell noch wünschenswert.

Trotz der unterschiedlichen Ergebnisse in den beiden in dieser Arbeit durchgeführten Nachweisverfahren von Markergenen konnte sicher gezeigt werden, dass mit dem Reagenz GeneJammer<sup>®</sup>, dem nach dem Luziferasenachweis effektivsten Reagenz, auch das *lacZ* Gen mit einer Effizienz von über 25% in die Stammzellen eingeschleust werden konnte. Somit ist das hier ermittelte Reagenz ein guter Kandidat zur weiteren Anwendung in der nichtviralen Transfektion von humanen adulten mesenchymalen Stammzellen. Zwar bleiben die Effizienzen deutlich hinter dem Grad der Transgenexpression von viralen Vektoren zurück, wo beispielsweise für die Transduktion mit AAV eine Effizienz von über 90% gezeigt werden konnte (Pagnotto et al. 2007), jedoch können durch die relativ unkomplizierte Handhabung verschiedene Gene und deren Wirkung auf die Kultur, Differenzierung und die therapeutischen Möglichkeiten der mesenchymalen Stammzellen schnell und effektiv verglichen werden.

Ebenso gilt zu beachten, dass mögliche Effekte von in mesenchymale Stammzellen eingeschleusten Genen nicht nur über den Grad der Expression ihre Wirkung entfalten, sondern auch Zell-Zell Interaktionen und parakrine Effekte eine wichtige Rolle in Wachstum und Differenzierung der

Stammzellen und der sie umgebenden Zellen spielen (Potapova et al. 2007; Gnecci und Melo 2009). Eine geringere Transgenexpression muss also nicht zwangsläufig mit einer verminderten Wirkung von derart transfizierten Stammzell-Kulturen einhergehen.

### *5.2 Bisherige Arbeiten zur Transfektion mesenchymaler Stammzellen*

In der Vergangenheit wurde in mehreren Arbeiten immer wieder auf Versuche der nichtviralen Transfektion von mesenchymalen Stammzellen mit Lipid- oder lipidähnlichen Substanzen hingewiesen. Jedoch gelang es oft nicht, diese Zellen erfolgreich mit derartigen Reagenzien zu transfizieren (Hamm et al. 2002) oder es wurden maximale Effizienzen von unter 1% erreicht, woraufhin in diesem Fall die genetische Manipulation von mesenchymalen Stammzellen mit der bereits erwähnten Elektroporation durchgeführt wurde (Haleem-Smith et al. 2005). Ebenso konzentrierten auch Stiehler et al. ihre Studien nach erfolgloser Transfektion von mesenchymalen Stammzellen vom Schwein mit unterschiedlichen nichtviralen Transfektionssystemen und dabei erzielten Effizienzen von weniger als 2% auf die Transduktion dieser Zellen mittels rAAV (Stiehler et al. 2006). Eine gezielte Suche nach geeigneten Reagenzien zur nichtviralen Transfektion blieb in diesen Arbeiten leider aus.

Erste Hinweise auf die gute Wirksamkeit des von uns evaluierten Polyamin GeneJammer<sup>®</sup> lieferte die Arbeit von Bosch et al., welche die Kombination eines adenoviralen Vektors unter gleichzeitiger Zugabe von GeneJammer<sup>®</sup> untersuchte (Bosch et al. 2006). In dieser Arbeit konnte so eine fünffach erhöhte Transgenexpression des untersuchten Markergens *green fluorescent protein* (GFP) in mesenchymalen Stammzellen vom Schwein im Vergleich zur Transduktion ohne GeneJammer<sup>®</sup> gezeigt werden. Eine Evaluation der Transfektionseffizienz des nichtviralen Reagenz ohne Zusatz viraler Vektoren fand jedoch nicht statt.

Ein erfolgreicher Gentransfer unter alleiniger Verwendung des Polyamin GeneJammer® konnte in der Arbeit von Braam et al. bei der Verwendung an humanen embryonalen Stammzellen und dem Markergen GFP nachgewiesen werden (Braam et al. 2008). Durch Optimierung verschiedener Parameter wie DNS/Reagenz Ratio, Inkubationsdauer und Menge an zugesetzten Transfektionskomplexen konnten so in einer kleinen Versuchsreihe (n=3) Effizienzen von fast 80% ermittelt werden. Die genauen Maßnahmen zur Optimierung sind in der Arbeit jedoch nicht wiedergegeben. Ein direkter Vergleich mit anderen nichtviralen Reagenzien am gleichen Zelltyp wurde ebenfalls nicht durchgeführt.

Zwar konnte in einer weiteren Arbeit die erfolgreiche Transfektionen humaner mesenchymaler Stammzellen mit mehreren nichtviralen Reagenzien gezeigt werden, jedoch wurden dabei weitaus weniger dieser Systeme angewandt und miteinander verglichen als in der von uns durchgeführten Studie. So berichten Hoelters et al. von der erfolgreichen Transfektion kommerziell erworbener humaner mesenchymaler Stammzellen (Cambrex, USA) mit dem Reagenz Lipofectamine™ 2000 und einer damit erzielten Effizienz von 50%, gefolgt von Metafectene® mit 22% und Lipofectamine™ in Kombination mit PLUS® mit 13% Effizienz (Hoelters et al. 2005). Alle drei Reagenzien waren auch Teil unserer Untersuchungen und obwohl deren Rangfolge in unserer Arbeit bestätigt werden konnte, wurden in unserer Studie insgesamt niedrigere Transfektionsraten ermittelt. Auch die von Hoelters beschriebene allgemein hohe Überlebensrate von 86 – 97% steht im Gegensatz zu den Ergebnissen unserer Untersuchung, in der die Toxizitäten zwischen 40% (Lipofectamine™ mit PLUS®) und 24% (Metafectene®) abgestorbener Zellen schwanken, also eine Überlebensrate von 60 – 76% gezeigt wurde.

Mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse unserer Arbeit und der Ergebnisse von Hoelters et al. könnte unter anderem die von Hoelters verwendete kommerziell erworbene Zelllinie von humanen mesenchymalen Stammzellen sein, die eventuell unempfindlicher gegenüber äußeren Noxen und leichter transfizierbar ist. Ebenso kann auch das von Hoelters

angewandte Markergen *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) möglicherweise besser in die Zellen eingeschleust oder sensitiver durch Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Der direkte Vergleich der drei von Hoelters verwendeten Reagenzien mit 12 weiteren Transfektionssystemen, wie er in unserer Arbeit durchgeführt wurde und die gleichzeitige Verwendung von humanen adulten mesenchymalen Stammzellen verschiedener Spender und das Einschleusen unterschiedlicher Markergene stellt die Gegenüberstellung verschiedener Transfektionsreagenzien für humane mesenchymale Stammzellen in jedem Fall auf eine wesentlich breitere Basis. Letztendlich muss nämlich gerade für eine spätere klinische Anwendung oder für die Untersuchung unterschiedlicher Kandidatengene an Patientenzellen eine sichere und verlässliche Transgenexpression unterschiedlicher Gene in Zellen verschiedener Spender vorausgesetzt werden.

### 5.3 *Therapeutische Kandidatengene*

Wenn die nichtvirale Transfektion humaner adulter mesenchymaler Stammzellen zur Knorpelregeneration eingesetzt werden soll, müssen auch die möglichen Gene für dieses Ziel evaluiert werden. In der Literatur werden eine Vielzahl von möglichen therapeutischen Genen zur Herstellung von Knorpelgewebe aus mesenchymalen Stammzellen mit zum Teil unterschiedlichen Ergebnissen diskutiert. Folgende Aufstellung soll einen kurzen Überblick über häufig diskutierte Genprodukte und deren Auswirkung auf die Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen liefern.

- *Transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$  1 (transforming growth factor  $\beta$  1; TGF- $\beta$ 1):*

Für *TGF- $\beta$ 1* wurde gezeigt, dass es die Chondrogenese in Zellaggregaten aus mesenchymalen Stammzellen und deren Synthese von Typ-II-Kollagen begünstigt (Johnstone et al. 1998; Palmer et al. 2005).

- *Transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$  3 (transforming growth factor  $\beta$  3; TGF- $\beta$ 3):*

*TGF- $\beta$ 3* moduliert die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Pelletkultur. Typ-II-Kollagen und Proteoglykane werden unter seinem Einfluss vermehrt gebildet (Mackay et al. 1998; Kafienah et al. 2007).

- *Knochenmorphogenetisches Protein 2 (bone morphogenetic protein 2; BMP-2):*

*BMP-2* ist bekannt dafür, die Chondrogenese und die Produktion von Typ-II-Kollagen in Stammzellaggregaten zu beeinflussen (Carlberg et al. 2001; Palmer et al. 2005). Es konnte eine vermehrte Expression von *Sox-9* nachgewiesen werden (Majumdar et al. 2001; Sekiya et al. 2005).

- *Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (fibroblast growth factor 2; FGF-2):*

*FGF-2* erhöht die Proliferation von mesenchymalen Stammzellen und deren Chondrogenese in Zellaggregaten (Chiou et al. 2006). Eine gesteigerte Proteoglykansynthese konnte ebenfalls festgestellt werden (Solchaga et al. 2005).

- *Transkriptionsfaktor Sox9 (SRY-related High Mobility Group box 9; Sox9):*

*Sox9* ist unter anderem in der embryonalen Entwicklung (Hargus et al. 2008) ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Typ-II-Kollagen Synthese (Bell et al. 1997). Er spielt eine wichtige Rolle bei Initiation der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Chondrozyten (Lefebvre und de Crombrughe 1998; Sekiya et al. 2002; Cucchiari et al. 2007).

- *Insulinartiger Wachstumsfaktor I (insulin-like growth factor I; IGF-I):*

*IGF-I* scheint alleine keine oder nur sehr geringe Einflüsse auf die Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen zu besitzen (Kawamura et al. 2005; Palmer et al. 2005). Allerdings besitzt *IGF-I* in Verbindung mit anderen Wachstumsfaktoren, beispielsweise *TGF- $\beta$ 1*, positive Effekte auf die Chondrogenese im Hinblick auf Proteoglykansynthese und Typ-II-Kollagen Produktion (Worster et al. 2001; Sakimura et al. 2006).

Neben den genannten Genen und Genprodukten gibt es natürlich noch weitere, die im Zusammenhang mit mesenchymalen Stammzellen und deren chondrogener Potenz diskutiert werden. Zu nennen wären beispielsweise der transformierende Wachstumsfaktor  $\beta$  2 (*TGF- $\beta$ 2*) oder das knochenmorphogenetische Protein 5 (*BMP-5*) (Kim und Im 2009). Eine Evaluation der Auswirkung all dieser Kandidatengene auf die Stammzellen und deren Einsatz für die Gewebereparatur setzt jedoch in jedem Fall einen zuverlässigen und effizienten Gentransfer in humane mesenchymale Stammzellen voraus, wie er mit dem von uns ermittelten Reagenz GeneJammer<sup>®</sup> möglich zu sein scheint.

#### 5.4 Ausblick

Der Einsatz humaner adulter mesenchymaler Stammzellen bietet eine große Bandbreite an experimentellen und potentiell therapeutischen Möglichkeiten. Nicht nur auf Grund ihrer Differenzierungsmöglichkeiten, die sie zu potentiell interessanten Zellen im *tissue engineering* machen, sondern auch auf Grund spezieller Fähigkeiten, wie beispielsweise der Migration zu Tumorgewebe (Jiang et al. 2009; Picinich et al. 2010), oder der bereits erwähnten entzündungshemmenden und immunsuppressiven Eigenschaften (Chen und Tuan 2008; Sensebé et al. 2010). Obwohl mesenchymale Stammzellen bei jedem Patienten aus Knochenmark isoliert werden können und somit rein theoretisch autologe Stammzellen für jeden Patienten zur Verfügung stehen, sind mesenchymale Stammzellen auch aussichtsreiche Kandidaten für allogene Stammzelltransplantationen, da sie keine *major-histocompatibility-complex*-(MHC)-II und nur sehr wenige MHC-I Oberflächenmoleküle besitzen und damit, wenn überhaupt, nur minimale Abstoßungsreaktionen im Empfänger hervorrufen (Le Blanc und Ringden 2006; Koppula et al. 2009).

Gelingt es also, adulte mesenchymale Stammzellen in der gewünschten Art und Weise gezielt in Differenzierungsgrade und -Linien zu bringen und diesen Prozess stabil und reproduzierbar zu gestalten, so können neue Wege im Bereich der Geweberekonstruktion und der regenerativen Medizin beschritten werden.

In unserer Arbeit haben wir ein breites Spektrum nichtviraler Transfektionsreagenzien für den Einsatz an humanen adulten mesenchymalen Stammzellen mit unterschiedlichen Markergenen verglichen und konnten das Polyamin GeneJammer® als optimales Reagenz für deren Transfektion identifizieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit können in Zukunft zur genaueren Untersuchung der Effekte von potenziell therapeutischen Genen in mesenchymalen Stammzellen genutzt werden.

*6. Literaturverzeichnis*

- 1 Ahmed TA, Hincke MT (2010) Strategies for Articular Cartilage Lesion Repair and Functional Restoration. *Tissue Eng Part B Rev* DOI 10.1089/ten.TEB.2009.0590
- 2 Anderson WF (1992) Human gene therapy. *Science* 256:808-813
- 3 Angele P, Schumann D, Angele M, Kinner B, Englert C, Hente R, Fuchtmeier B, Nerlich M, Neumann C, Kujat R (2004) Cyclic, mechanical compression enhances chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds. *Biorheology* 41:335-346
- 4 Basad E, Ishaque B, Bachmann G, Sturz H, Steinmeyer J (2010) Matrix-induced autologous chondrocyte implantation versus microfracture in the treatment of cartilage defects of the knee: a 2-year randomised study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 10.1007/s00167-00009-01028-00161
- 5 Bekkers JE, Inklaar M, Saris DB (2009) Treatment selection in articular cartilage lesions of the knee: a systematic review. *Am J Sports Med* 37 Suppl 1:148-155
- 6 Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, Sham MH, Koopman P, Tam PP, Cheah KS (1997) SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet* 16:174-178
- 7 Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M (1999) Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 10:440-447
- 8 Bosch P, Fouletier-Dilling C, Olmsted-Davis EA, Davis AR, Stice SL (2006) Efficient adenoviral-mediated gene delivery into porcine mesenchymal stem cells. *Mol Reprod Dev* 73:1393-1403
- 9 Böyum A (1968) Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97:7-7
- 10 Braam SR, Denning C, van den Brink S, Kats P, Hochstenbach R, Passier R, Mummery CL (2008) Improved genetic manipulation of human embryonic stem cells. *Nat Methods* 5:389-392
- 11 Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331:889-895

- 12 Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE (1997) Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64:278-294
- 13 Buckwalter JA, Mankin HJ (1998) Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum* 41:1331-1342
- 14 Budri EM, Audett J, Levine D, Fraser P (2006) Autologous cultured chondrocytes: adverse events reports. *J Bone Joint Surg Am* 88:2538; author reply 2539
- 15 Caplan AI (2005) Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 11:1198-1211
- 16 Carlberg AL, Pucci B, Rallapalli R, Tuan RS, Hall DJ (2001) Efficient chondrogenic differentiation of mesenchymal cells in micromass culture by retroviral gene transfer of BMP-2. *Differentiation* 67:128-138
- 17 Chen FH, Tuan RS (2008) Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Res Ther* 10:223
- 18 Chiou M, Xu Y, Longaker MT (2006) Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 343:644-652
- 19 Cockrell AS, Kafri T (2007) Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol Biotechnol* 36:184-204
- 20 Correa AB, Americo MA, Oliveira IC, Silva LG, de Mattos MC, Ferreira AM, Couceiro JN, Fracalanza SE, Benchetrit LC (2009) Virulence characteristics of genetically related isolates of group B streptococci from bovines and humans. *Vet Microbiol* DOI 10.1016/j.vetmic.2009.1012.1003
- 21 Cucchiaroni M, Ren XL, Perides G, Terwilliger EF (2003) Selective gene expression in brain microglia mediated via adeno-associated virus type 2 and type 5 vectors. *Gene Ther* 10:657-667
- 22 Cucchiaroni M, Thurn T, Weimer A, Kohn D, Terwilliger EF, Madry H (2007) Restoration of the extracellular matrix in human osteoarthritic articular cartilage by overexpression of the transcription factor SOX9. *Arthritis Rheum* 56:158-167
- 23 de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 7:725-737

- 24 Dragoo JL, Carlson G, McCormick F, Khan-Farooqi H, Zhu M, Zuk PA, Benhaim P (2007) Healing full-thickness cartilage defects using adipose-derived stem cells. *Tissue Eng* 13:1615-1621
- 25 Driesang IM, Hunziker EB (2000) Delamination rates of tissue flaps used in articular cartilage repair. *J Orthop Res* 18:909-911
- 26 English D, Andersen BR (1974) Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *J Immunol Methods* 5:249-252
- 27 Erikson A, Tufto I, Bjonnum AB, Bruland OS, Davies Cde L (2008) The impact of enzymatic degradation on the uptake of differently sized therapeutic molecules. *Anticancer Res* 28:3557-3566
- 28 Escriou V, Carrière M, Bussone F, Wils P, Scherman D (2001) Critical assessment of the nuclear import of plasmid during cationic lipid-mediated gene transfer. *J Gene Med* 3:179-187
- 29 Evans CH, Ghivizzani SC, Smith P, Shuler FD, Mi Z, Robbins PD (2000) Using gene therapy to protect and restore cartilage. *Clin Orthop Relat Res* 214-219
- 30 Evans CH, Ghivizzani SC, Oligino TA, Robbins PD (2001) Future of adenoviruses in the gene therapy of arthritis. *Arthritis Res* 3:142-146
- 31 Farhood H, Bottega R, Epand RM, Huang L (1992) Effect of cationic cholesterol derivatives on gene transfer and protein kinase C activity. *Biochim Biophys Acta* 1111:239-246
- 32 Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitinger S, Kloss F, Gully C, Gassner R, Lepperdinger G (2007) Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell* 6:745-757
- 33 Ferreira E, Potier E, Logeart-Avramoglou D, Salomskaite-Davalgiene S, Mir LM, Petite H (2008) Optimization of a gene electrotransfer method for mesenchymal stem cell transfection. *Gene Ther* 15:537-544
- 34 Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3:393-403
- 35 Fritz J, Janssen P, Gaissmaier C, Schewe B, Weise K (2008) Articular cartilage defects in the knee--basics, therapies and results. *Injury* 39 Suppl 1:50-57

- 36 Gao J, Yao JQ, Caplan AI (2007) Stem cells for tissue engineering of articular cartilage. *Proc Inst Mech Eng H* 221:441-450
- 37 Gneccchi M, Melo LG (2009) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. *Methods Mol Biol* 482:281-294
- 38 Graham FL, van der Eb AJ (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456-467
- 39 Grande DA, Mason J, Light E, Dines D (2003) Stem cells as platforms for delivery of genes to enhance cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 2:111-116
- 40 Granero-Molto F, Weis JA, Longobardi L, Spagnoli A (2008) Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: application to bone and cartilage repair. *Expert Opin Biol Ther* 8:255-268
- 41 Haleem-Smith H, Derfoul A, Okafor C, Tuli R, Olsen D, Hall DJ, Tuan RS (2005) Optimization of high-efficiency transfection of adult human mesenchymal stem cells in vitro. *Mol Biotechnol* 30:9-20
- 42 Hamm A, Krott N, Breibach I, Blindt R, Bosserhoff AK (2002) Efficient transfection method for primary cells. *Tissue Eng* 8:235-245
- 43 Harada H, Takahashi M (2007) CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2. *J Biol Chem* 282:5597-5607
- 44 Hargus G, Kist R, Kramer J, Gerstel D, Neitz A, Scherer G, Rohwedel J (2008) Loss of Sox9 function results in defective chondrocyte differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Int J Dev Biol* 52:323-332
- 45 Hashimoto T, Mahara A, Kobori A, Murakami A, Yamaoka T (2006) Various properties of polymeric carriers improved the transfection efficiency. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 333-334
- 46 Hoelters J, Ciccarella M, Drechsel M, Geissler C, Gulkan H, Bocker W, Schieker M, Jochum M, Neth P (2005) Nonviral genetic modification mediates effective transgene expression and functional RNA interference in human mesenchymal stem cells. *J Gene Med* 7:718-728
- 47 Huang AH, Farrell MJ, Mauck RL (2010) Mechanics and mechanobiology of mesenchymal stem cell-based engineered cartilage. *J Biomech* 43:128-136

- 48 Hunziker EB (2002) Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10:432-463
- 49 Hynes WL, Dixon AR, Walton SL, Aridgides LJ (2000) The extracellular hyaluronidase gene (hylA) of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Microbiology Letters* 184:109-112
- 50 Jiang J, Chen W, Zhuang R, Song T, Li P (2009) The effect of endostatin mediated by human mesenchymal stem cells on ovarian cancer cells in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* DOI 10.1007/s00432-00009-00728-00438
- 51 Johnson LL (1986) Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy* 2:54-69
- 52 Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU (1998) In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238:265-272
- 53 Kafienah W, Mistry S, Dickinson SC, Sims TJ, Learmonth I, Hollander AP (2007) Three-dimensional cartilage tissue engineering using adult stem cells from osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum* 56:177-187
- 54 Kawamura K, Chu CR, Sobajima S, Robbins PD, Fu FH, Izzo NJ, Niyibizi C (2005) Adenoviral-mediated transfer of TGF-beta1 but not IGF-1 induces chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet cultures. *Exp Hematol* 33:865-872
- 55 Kelly DJ, Prendergast PJ (2005) Mechano-regulation of stem cell differentiation and tissue regeneration in osteochondral defects. *J Biomech* 38:1413-1422
- 56 Khan WS, Johnson DS, Hardingham TE (2010) The potential of stem cells in the treatment of knee cartilage defects. *Knee* DOI 10.1016/j.knee.2009.1012.1003
- 57 Kim HJ, Im GI (2009) Combination of Transforming Growth Factor-Beta(2) and Bone Morphogenetic Protein 7 Enhances Chondrogenesis from Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Part A* 1543-1551
- 58 Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, Drogset JO, Grontvedt T, Solheim E, Strand T, Roberts S, Isaksen V, Johansen O (2004) Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am* 86-A:455-464

- 59 Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, Grontvedt T, Isaksen V, Ludvigsen TC, Roberts S, Solheim E, Strand T, Johansen O (2007) A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. *J Bone Joint Surg Am* 89:2105-2112
- 60 Kochanek S (1999) High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy. *Hum Gene Ther* 10:2451-2459
- 61 Koga H, Engebretsen L, Brinchmann JE, Muneta T, Sekiya I (2009) Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 17:1289-1297
- 62 Koppula PR, Chelluri LK, Poliseti N, Vemuganti GK (2009) Histocompatibility testing of cultivated human bone marrow stromal cells - a promising step towards pre-clinical screening for allogeneic stem cell therapy. *Cell Immunol* 259:61-65
- 63 Kreil G (1995) Hyaluronidases - a group of neglected enzymes. *Protein Sci* 4:1666-1669
- 64 Le Blanc K, Ringden O (2006) Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol* 18:586-591
- 65 Lefebvre V, de Crombrughe B (1998) Toward understanding SOX9 function in chondrocyte differentiation. *Matrix Biol* 16:529-540
- 66 Luo D, Saltzman WM (2000) Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol* 18:33-37
- 67 MacGregor GR, Caskey CT (1989) Construction of plasmids that express *E. coli* beta-galactosidase in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 17:2365-2365
- 68 Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF (1998) Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 4:415-428
- 69 Madry H, Trippel SB (2000) Efficient lipid-mediated gene transfer to articular chondrocytes. *Gene Ther* 7:286-291
- 70 Madry H, Zurakowski D, Trippel SB (2001) Overexpression of human insulin-like growth factor-I promotes new tissue formation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation. *Gene Ther* 8:1443-1449

- 71 Madry H, Cucchiarini M, Stein U, Remberger K, Menger MD, Kohn D, Trippel SB (2003) Sustained transgene expression in cartilage defects *in vivo* after transplantation of articular chondrocytes modified by lipid-mediated gene transfer in a gel suspension delivery system. *J Gene Med* 5:502-509
- 72 Madry H, Kohn D (2004) Konservative Therapie der Kniegelenkarthrose. *Der Unfallchirurg* 107:689-700
- 73 Madry H, Kohn D, Cucchiarini M (2006) Gentherapie in der Orthopädie. *Der Orthopäde* 35:1193-1202
- 74 Madry H, Pape D (2008) Autologe Chondrozytentransplantation. *Der Orthopäde* 37:756-763
- 75 Mair L, Ford K, Alam MR, Kole R, Fisher M, Superfine R (2009) Size-uniform 200 nm particles: fabrication and application to magnetofection. *J Biomed Nanotechnol* 5:182-191
- 76 Majumdar MK, Wang E, Morris EA (2001) BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J Cell Physiol* 189:275-284
- 77 Markway BD, Tan GK, Brooke G, Hudson JE, Cooper-White JJ, Doran MR (2009) Enhanced Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Low Oxygen Environment Micropellet Cultures. *Cell Transplant* DOI 10.3727/096368909X096478560
- 78 Marshall E (1999) Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 286:2244-2245
- 79 Martinek V, Ueblacker P, Imhoff AB (2003) Current concepts of gene therapy and cartilage repair. *J Bone Joint Surg Br* 85:782-788
- 80 Messner K, Gillquist J (1996) Cartilage repair. A critical review. *Acta Orthop Scand* 67:523-529
- 81 Monahan PE, Samulski RJ (2000) AAV vectors: is clinical success on the horizon? *Gene Ther* 7:24-30
- 82 Moussavi-Harami F, Duwayri Y, Martin JA, Buckwalter JA (2004) Oxygen effects on senescence in chondrocytes and mesenchymal stem cells: consequences for tissue engineering. *Iowa Orthop J* 24:15-20
- 83 Müller B, Kohn D (1999) Indikation und Durchführung der Knorpel-Knochen-Anbohrung nach Pridie. *Der Orthopäde* 28:4-10

- 84 Nadri S, Soleimani M, Hosseni RH, Massumi M, Atashi A, Izadpanah R (2007) An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol* 51:723-729
- 85 Neves C, Escriou V, Byk G, Scherman D, Wils P (1999) Intracellular fate and nuclear targeting of plasmid DNA. *Cell Biol Toxicol* 15:193-202
- 86 Niemeyer P, Pestka JM, Kreuz PC, Erggelet C, Schmal H, Suedkamp NP, Steinwachs M (2008) Characteristic complications after autologous chondrocyte implantation for cartilage defects of the knee joint. *Am J Sports Med* 36:2091-2099
- 87 O'Driscoll SW (1998) The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 80:1795-1812
- 88 Orth P, Weimer A, Kaul G, Kohn D, Cucchiaroni M, Madry H (2008) Analysis of novel nonviral gene transfer systems for gene delivery to cells of the musculoskeletal system. *Mol Biotechnol* 38:137-144
- 89 Otani K, Yamahara K, Ohnishi S, Obata H, Kitamura S, Nagaya N (2009) Nonviral delivery of siRNA into mesenchymal stem cells by a combination of ultrasound and microbubbles. *J Control Release* 133:146-153
- 90 Pagnotto MR, Wang Z, Karpie JC, Ferretti M, Xiao X, Chu CR (2007) Adeno-associated viral gene transfer of transforming growth factor-beta1 to human mesenchymal stem cells improves cartilage repair. *Gene Ther* 14:804-813
- 91 Palmer GD, Steinert A, Pascher A, Gouze E, Gouze J-N, Betz O, Johnstone B, Evans CH, Ghivizzani SC (2005) Gene-induced chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells in vitro. *Mol Ther* 12:219-228
- 92 Picinich SC, Glod JW, Banerjee D (2010) Protein kinase C zeta regulates interleukin-8-mediated stromal-derived factor-1 expression and migration of human mesenchymal stromal cells. *Exp Cell Res* 316:593-602
- 93 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147
- 94 Potapova IA, Gaudette GR, Brink PR, Robinson RB, Rosen MR, Cohen IS, Doronin SV (2007) Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 25:1761-1768

- 95 Pridie KH (1959) A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg Br* 41:618
- 96 Richter W (2009) Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration. *J Intern Med* 266:390-405
- 97 Sakimura K, Matsumoto T, Miyamoto C, Osaki M, Shindo H (2006) Effects of insulin-like growth factor I on transforming growth factor beta1 induced chondrogenesis of synovium-derived mesenchymal stem cells cultured in a polyglycolic acid scaffold. *Cells, Tissues, Organs* 183:55-61
- 98 Samulski RJ, Chang LS, Shenk T (1989) Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 63:3822-3828
- 99 Saris DB, Vanlauwe J, Victor J, Almqvist KF, Verdonk R, Bellemans J, Luyten FP (2009) Treatment of symptomatic cartilage defects of the knee: characterized chondrocyte implantation results in better clinical outcome at 36 months in a randomized trial compared to microfracture. *Am J Sports Med* 37 Suppl 1:10-19
- 100 Schmidt BF, Adams RM, Requadt C, Power S, Mainzer SE (1989) Expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus bulgaricus* beta-galactosidase gene cloned in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 171:625-635
- 101 Schulze-Tanzil G (2009) Activation and dedifferentiation of chondrocytes: implications in cartilage injury and repair. *Ann Anat* 191:325-338
- 102 Schumann D, Kujat R, Nerlich M, Angele P (2006) Mechanobiological conditioning of stem cells for cartilage tissue engineering. *Biomed Mater Eng* 16:S37-52
- 103 Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ (2002) In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4397-4402
- 104 Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Reger RL, Prockop DJ (2005) Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res* 320:269-276
- 105 Sensebé L, Krampera M, Schrezenmeier H, Bourin P, Giordano R (2010) Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang* 93-107

- 106 Simon TM, Jackson DW (2006) Articular cartilage: injury pathways and treatment options. *Sports Med Arthrosc* 14:146-154
- 107 Solchaga LA, Welter JF, Lennon DP, Caplan AI (2004) Generation of pluripotent stem cells and their differentiation to the chondrocytic phenotype. *Methods Mol Med* 100:53-68
- 108 Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF (2005) FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 203:398-409
- 109 Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG (2003) Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy* 19:477-484
- 110 Stender S, Murphy M, O'Brien T, Stengaard C, Ulrich-Vinther M, Søballe K, Barry F (2007) Adeno-associated viral vector transduction of human mesenchymal stem cells. *European Cells & Materials* 13:93-99
- 111 Stevenson DJ, Gunn-Moore FJ, Campbell P, Dholakia K (2010) Single cell optical transfection. *J R Soc Interface* DOI 10.1098/rsif.2009.0463
- 112 Stiehler M, Duch M, Mygind T, Li H, Ulrich-Vinther M, Modin C, Baatrup A, Lind M, Pedersen FS, Bunger CE (2006) Optimizing viral and non-viral gene transfer methods for genetic modification of porcine mesenchymal stem cells. *Adv Exp Med Biol* 585:31-48
- 113 Uchida M, Li XW, Mertens P, Alpar HO (2009) Transfection by particle bombardment: delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun. *Biochim Biophys Acta* 1790:754-764
- 114 Vasiliadis HS, Wasiak J, Salanti G (2010) Autologous chondrocyte implantation for the treatment of cartilage lesions of the knee: a systematic review of randomized studies. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* DOI 10.1007/s00167-00010-01050-00163
- 115 Vinatier C, Bouffi C, Merceron C, Gordeladze J, Brondello JM, Jorgensen C, Weiss P, Guicheux J, Noel D (2009) Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 4:318-329
- 116 Wallenfels K, Marie Luise Z (1957) Kristallisation der beta-Galaktosidase aus *Escherichia coli*. *Angewandte Chemie* 69:482

- 117 Weiss S, Hennig T, Bock R, Steck E, Richter W (2010) Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 223:84-93
- 118 Witzgall J, Boyens H (1950) Die resorptionssteigernde Wirkung der Hyaluronidase bei rektaler Sulfonamid-Verabreichung. 2. (Das Hyaluronsäure-Hyaluronidase-System). *Ther Ggw* 89:411-414
- 119 Worster AA, Brower-Toland BD, Fortier LA, Bent SJ, Williams J, Nixon AJ (2001) Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor-beta1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix. *J Orthop Res* 19:738-749
- 120 Xiao Y, Mareddy S, Crawford R, Dhaliwal N (2009) Stem cell related gene expression in clonal populations of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Tissue Eng Part A* DOI 10.1089/ten.TEA.2009.0307

### 7. Publikationen

Auszüge und Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen und Kongressbeiträgen veröffentlicht:

**Abstract:** „Comparative gene transfer analysis in human mesenchymal stem cells using 15 novel optimized non-viral transfection systems“.

**Elsler S;** Schetting S; Kohn D; Madry H; Cucchiari M

*European Cells and Materials Journal*, Vol. 16 suppl. 4, 2008. p. 68

06/2008      **Vortrag**, 23. Jahreskongress der Gesellschaft für Orthopädisch-Traumatologische Sportmedizin (GOTS) im Rahmen des *GOTS Young Investigator Award* in München:

**Elsler S;** Schetting S; Kohn D; Madry H; Cucchiari M

“Vergleich und Optimierung nicht-viraler Vektoren zum Gentransfer in humane mesenchymale Stammzellen“.

10/2008      **Postervorstellung**, *2nd International Symposium on Biotechnology in Musculoskeletal Repair* der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen (AO Foundation) in Lausanne, Schweiz:

**Elsler S;** Schetting S; Kohn D; Cucchiari M; Madry H

“Comparative gene transfer analysis in human mesenchymal stem cells using fifteen novel optimized non-viral transfection systems“.

02/2009      **Postervorstellung**, 55. Kongress der *Orthopaedic Research Society (ORS)* in Las Vegas, NV, USA:

**Elsler S;** Schetting S; Kohn D; Cucchiari M; Madry H

“Comparison and optimization of novel nonviral vectors for gene transfer in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells“.

- 09/2009     **Vortrag**, 26. Kongress der Arbeitsgemeinschaft für Arthroskopie (AGA) in Leipzig:  
              **Elsler S**; Kohn D; Madry H; Cucchiarini M  
              “Vergleich und Optimierung nichtviraler Gentransfersysteme für humane mesenchymale Stammzellen“.
- 10/2009     **Poster und Kurzvortrag**, Deutscher Jahreskongress für Orthopädie und Unfallchirurgie in Berlin:  
              Madry H; **Elsler S**; Kohn D; Cucchiarini M  
              “Optimierter nichtviraler Gentransfer in humane mesenchymale Stammzellen“.
- 11/2009     **Poster**, 17. Jahreskongress der *European Society for Gene & Cell Therapy* (ESGCT) in Hannover:  
              **Elsler S**; Schetting S; Kohn D; Madry H; Cucchiarini M  
              “Optimization of novel nonviral vectors for gene transfer in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells“.

*8. Dank*

Für die Betreuung und Hilfe während meiner gesamten Promotionsarbeit danke ich meinen Betreuern Frau Priv. Doz. Dr. rer. nat. Magali Madry (geb. Cuchiarini) und Univ.-Prof. Dr. Henning Madry, sowie dem gesamten Team des Instituts für Experimentelle Orthopädie in Homburg / Saar. Namentlich sind das Frau Dr. rer. nat. Susanne Heiligenstein, Frau TA Sarah Schetting und Frau. Dipl. Biol. Anja Weimer.

Außerdem danke ich für die Unterstützung dem Direktor der Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie der Universitätsklinik Homburg / Saar, Univ.-Prof. Dr. med. D. Kohn, sowie allen Operateuren der Klinik für die Beschaffung von Knochenmarkspiraten.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 12.10.1980  
Geburtsort: Starnberg

### Schulbildung

1987 – 1991 Grundschole Weßling (Landkreis Starnberg)  
1991 – 1992 Rhabanus-Maurus-Gymnasium St. Ottilien  
1992 – 2001 Reuchlin-Gymnasium Ingolstadt  
06/2001 Abitur, Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulstudium

2003 – 2005 externes Studium der Humanmedizin an der  
Universität des Saarlandes  
2005 – 2006 Studium der Humanmedizin an der Albert-  
Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau  
03/2006 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der Albert-  
Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau  
04/2006 – 05/2010 Studium der Humanmedizin an der Universität des  
Saarlandes