

Aus der
Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde Tübingen
Abteilung Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und
Gesichtschirurgie

**Etablierung einer Transfektionsmethode für humane
Kieferperiostzellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Karg, Anne-Kristin Marguérite

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. D. Alexander Friedrich

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Weiß

Tag der Disputation: 29.07.2022

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

cGMP	current Good Manufacturing Practice
CPP	Cell Penetrating Peptides
DMSO	Dexamethason
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ePL	Plättchenlysate vom Pferd
Esrb	Estrogen-related receptor beta
FACS	fluorescence activated cell sorting
FKS	fetales Kälberserum
GFP	grün fluoreszierendes Protein
hASC	human adipose Stemcell
HDHC	Histon-Deacetylase-Inhibitoren
HEK	Human Embryonic Kidney (Cells)
(h)ESC	(human) Embryonic Stemcell
hPL	humanes Plättchenlysate
(h)PSC	(human) Pluripotent Stemcell
hTERT	(human) Telomerase reverse Transkriptase
hiPS-Zellen, iPSC	(human) induzierte pluripotente Stammzellen
Klf4	Krüppel-like factor 4
miRNA	micro RNA
MKG	Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
mRNA	messenger RNA
MSC	mesenchymal stemcell
NP	Nanopartikel
Nr5a2	Leberrezeptor-Homolog-1
Oct3/4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 3/4
OSKM	Oct3/4, SOX2, cMYC und Klf4
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
piPS-Zellen	Protein induzierte pluripotente Stammzellen
RNA	Ribonukleinsäure
RPE-Zellen	retinale Pigmentepithelzellen
RT	Raumtemperatur
SAHA	Suberoylanalidhydroxamische Säure
SCNT	Somatischer Zellkern-Transfer
siRNA	small interfering RNA
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2
SSO	single stranded Oligonucleotid
srRNA	self replicating RNA
Stat3	signal transducer and activator of transcription 3

SV40LT

TSA

VPA

SV40 large T antigen (Simian Vacuolating Virus 40 Tag)

Trichostatin A

Valproinsäure

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung des Tissue Engineerings.....	14
Abbildung 2	Verbreitete Methoden zur iPS-Zell-Generierung.....	20
Abbildung 3	Gegenüberstellung der natürlichen und der artifiziell induzierten Transkription bzw. Translation.....	26
Abbildung 4	Datendarstellung von FACS Messungen mithilfe der Software „InCyte“.....	45
Abbildung 5	Darstellung einer ausgesäten 24-Well-Platte für die Auswertung der Transfektionseffizienzen der drei getesteten Transfektionsreagenzien nach 24 h.	47
Abbildung 6	Darstellung der ausgesäten 24-Well-Platte für die Auswertung der Transfektionseffizienzen von MesenCult-Zellen in Zellpassage 6 für die Messzeitpunkte nach 24, 43 und 48 Stunden.	48
Abbildung 7	Darstellung der ausgesäten 24-Well-Platte für die Auswertung der Transfektionseffizienzen nach Einfach- und Mehrfachtransfektion von MesenCult-Zellen in Zellpassage 5 nach 24 , 48, 96 und 144 Stunden.....	48
Abbildung 8	Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Mehrfachtransfektionen von MesenCult-Zellen nach Kryokonservierung in Zellpassage 5 mit Lipofectamine3000.	49
Abbildung 9	Das Diagramm zeigt die prozentuale und zeitabhängige Bestimmung der Anzahl an GFP-positiven MesenCult-Zellen mittels Durchflusszytometrie für die drei Transfekte Lipofectamine2000, Lipofectamine3000 und TransIT vor Kryokonservierung (Wertungsweise 1).....	54
Abbildung 10	Das Diagramm zeigt die prozentuale und zeitabhängige Bestimmung der Anzahl an GFP-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie für die drei Transfekte Lipofectamine2000, Lipofectamine3000 und TransIT vor Kryokonservierung (Wertungsweise 2).....	57
Abbildung 11	Das Diagramm zeigt die prozentuale und zeitabhängige Bestimmung der Anzahl an GFP-positiven MesenCult-Zellen der Zellpassage 5 mittels Durchflusszytometrie für die drei Transfekte Lipofectamine2000, Lipofectamine3000 und TransIT nach erfolgter Kryokonservierung.....	61
Abbildung 12	Prozentuale und zeitabhängige Darstellung der Transfektionseffizienzen vor und nach Kryokonservierung für die einzelnen Transfekte.....	62
Abbildung 13	zeigt am Beispiel des 2. Versuchsdurchlaufs repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Messungen für Lipofectamine2000, Lipofectamine3000 und TransIT für die Messzeitpunkte 24, 43, und 48 Stunden für MesenCult-Zellen nach Kryokonservierung.....	63

Abbildung 14	Mikroskopische (Fluoreszenz-) Aufnahmen von MesenCult-Zellen nach Kryokonservierung in Zellpassage 5, 24 Stunden nach erfolgter Transfektion für die Transfekte Lipofectamine2000, Lipofectamine3000 und TransIT.....	65
Abbildung 15	Fluoreszenzaufnahmen von MesenCult-Zellen nach erfolgreicher Transfektion in Zellpassage 5 nach Kryokonservierung. Für alle drei Transfekte; Messzeitpunkte 24, 43 und 48 Stunden.....	66
Abbildung 16	zeigt die prozentual und zeitabhängig bestimmten Transfektionseffizienzen für MesenCult-Zellen in Zellpassage 6 und Zellpassage 5, für beide nach Kryokonservierung unter Verwendung des Transfekts Lipofectamine3000.....	68
Abbildung 17	zeigt die prozentual- und zeitabhängig erreichten Transfektionseffizienzen bei MesenCult-Zellen unter Verwendung des Transfekts Lipofectamine3000 bei einmaliger Transfektion (T 1x) nach 24 und 48 Stunden, bei zweimaliger Transfektion (T 2x) nach 96 Stunden und dreimaliger Transfektion (T3x) nach 144 Stunden für n=3.	70
Abbildung 18	zeigt Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen von MesenCult-Zellen in Zellpassage 5 nach Kryokonservierung nach erfolgter Einfach- und Mehrfachtransfektion für die Messzeitpunkte 24, 48, 96 und 144 h.	71
Abbildung 19	Relative Transfektionseffizienz und relative Zytotoxizität nach der Anwendung verschiedener Transfektionsreagenzien.	83
Abbildung 20	Effizienzen bei der Transfektion von Leber-Zellen in einem 96-Well-Format mit den angegebenen Dosen eines (GFP)-exprimierenden Vektors.	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Entwicklungspotential von unterschiedlichen Stammzellen in Abhängigkeit von der Zellart.....	15
Tabelle 2	Übersicht über Vor- und Nachteile verschiedener Stammzellarten.	17
Tabelle 3	zeigt die prozentuale Anzahl an GFP-positiven Zellen bei der Verwendung des Transfekts Lipofectamine2000 24, 43 und 48 Stunden nach erfolgter Transfektion von MesenCult-Zellen für n=4.....	51
Tabelle 4	zeigt die prozentuale Anzahl an GFP-positiven Zellen bei der Verwendung des Transfekts Lipofectamine3000 24, 43 und 48 Stunden nach erfolgter Transfektion von MesenCult-Zellen ohne Kryokonservierung für n=6..	52
Tabelle 5	zeigt die prozentuale Anzahl an GFP-positiven Zellen bei der Verwendung des Transfekts TransIT 24, 43 und 48 Stunden nach erfolgter Transfektion von MesenCult-Zellen ohne Kryokonservierung für n=5.....	53
Tabelle 6	zeigt die prozentuale Anzahl an GFP-positiven Zellen bei der Verwendung des Transfekts Lipofectamine3000 24, 43 und 48 Stunden nach der erfolgten Transfektion für n=3 nach Entfernung der Ausreißer aus der Wertung (=Wertungsweise 2).....	55
Tabelle 7	zeigt die prozentuale Anzahl an GFP-positiven Zellen bei der Verwendung des Transfekts TransIT 24, 43 und 48 Stunden nach der erfolgten Transfektion für n=5. nach Entfernung der Ausreißer aus der Wertung (=Wertungsweise 2).....	56
Tabelle 8	zeigt die prozentuale Anzahl an GFP-positiven Zellen bei der Verwendung des Transfekts Lipofectamine2000 24, 43 und 48 Stunden nach der erfolgten Transfektion für n=3 nach zwischenzeitlicher Lagerung im flüssigen Stickstoff.....	59
Tabelle 9	zeigt die prozentuale Anzahl an GFP-positiven Zellen bei der Verwendung des Transfekts Lipofectamine3000 24, 43 und 48 Stunden nach der erfolgten Transfektion für n=3 nach zwischenzeitlicher Lagerung in Stickstoff.	59
Tabelle 10	zeigt die prozentuale Anzahl an GFP-positiven Zellen bei der Verwendung des Transfekts TransIT 24, 43 und 48 Stunden nach der erfolgten Transfektion für n=3 nach zwischenzeitlicher Lagerung in Stickstoff.	60
Tabelle 11	zeigt die prozentuale Anzahl an GFP-positiven Zellen bei der Verwendung des Transfekts Lipofectamine3000 24, 43 und 48 Stunden nach der erfolgten Transfektion für n=3 nach zwischenzeitlicher Lagerung in Stickstoff bei MesenCult-Zellen der Passage 6.....	67
Tabelle 12	zeigt die prozentuale Anzahl an GFP-positiven Zellen bei der Verwendung des Transfekts Lipofectamine3000 24 und 48 Stunden nach einmaliger Transfektion (T 1x), 96 Stunden nach zweimaliger Transfektion (T 2x) und 144 Stunden dreifacher Transfektion (T 3x) für n=3 bei MesenCult-Zellen der Passage 5.....	69

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	12
1.1	Häufigkeit und Therapie von Mundhöhlenkarzinomen in Deutschland	12
1.2	Tissue Engineering als Behandlungsoption in der kraniofazialen Chirurgie	13
1.3	Stammzellen im Überblick	14
1.3.1	Embryonale Stammzellen	15
1.3.2	Fetale Stammzellen	16
1.3.3	Adulte Stammzellen	16
1.3.4	Induzierte pluripotente Stammzellen	17
1.3.4.1	Entdeckung	18
1.3.4.2	Methoden zur Reprogrammierung	19
1.3.4.2.1	Somatischer Zellkern-Transfer	19
1.3.4.2.2	Inkubation mit Zellextrakten	19
1.3.4.2.3	Methoden zur Generierung von iPS-Zellen/Faktor vermittelte Reprogrammierung	20
1.3.4.2.3.1	Transfektion	21
1.3.4.2.3.2	Integrative Methoden	22
1.3.4.2.3.3	Nicht-Integrative Methoden	23
1.3.4.2.3.3.1	iPS-Zell-Generierung mit nicht-integrativen Vektoren	23
1.3.4.2.3.3.2	iPS-Zell Generierung mit rekombinanten Proteinen	24
1.3.4.2.3.3.3	iPS-Zell Generierung mit „small Molecules“	24
1.3.4.2.3.3.4	iPS-Zell-Generierung mittels synthetischer RNA	25
1.3.4.2.3.3.5	iPS-Zell-Generierung mit microRNA	26
1.3.4.3	Rolle der epigenetischen Einflüsse bei der Generierung von iPS-Zellen	27
1.4	Kieferperiostzellen	28
1.5	Fragestellung	29
2	Material und Methodik	31
2.1	Material	31
2.1.1	Verwendete Zellen	31
2.1.2	Verwendete mRNA	31
2.1.3	Geräte	32
2.1.4	Chemikalien	33

2.1.5	sonstiges Material	35
2.1.6	Verwendete statistische Tests	35
2.2	Methodik	36
2.2.1	Zellbiologische Methoden	36
2.2.1.1	Gewinnung der Kieferperiostzellen	36
2.2.1.2	Kultivierung von Kieferperiostzellen in DMEM-Medium	37
2.2.1.3	Reduktion des FKS- Anteils und Wechsel auf MesenCult-Medium	37
2.2.1.4	Einfrieren von MesenCult-Zellen	38
2.2.1.5	Beschichten der Zellkulturflaschen und Auftauen von MesenCult-Zellen	39
2.2.1.6	Ablösen und Aussäen der Zellen	40
2.2.1.7	Bestimmung der Konzentration der mRNA	40
2.2.2	Transiente Transfektion	41
2.2.2.1	Lipofectamine2000	41
2.2.2.2	Lipofectamine3000	41
2.2.2.3	TransIT	42
2.2.3	Vorbereitung auf die durchflusszytometrischen Messungen (FACS)	42
2.2.4	Durchführung der FACS-Messungen	43
2.2.5	Fixierung von transfizierten Zellen mittels Zinkformalin	45
2.2.6	Ablauf der Versuche	46
2.2.6.1	Vergleich der Transfektionseffizienzen vor und nach Kryokonservierung	46
2.2.6.2	Vergleich der Transfektionseffizienzen in Zellpassage 5 und 6	47
2.2.6.3	Vergleich der Transfektionseffizienzen von einfach und mehrfach transfizierten MesenCult-Zellen	48
3	Ergebnisse	50
3.1	Vergleich der Transfektionseffizienz vor Kryokonservierung	50
3.2	Vergleich der Transfektionseffizienz nach Kryokonservierung	58
3.3	Vergleich der Transfektionseffizienzen in Zellpassage 5 und 6	67
3.4	Vergleich der Transfektionseffizienzen von einfach und mehrfach transfizierten MesenCult-Zellen	69
4	Diskussion	73
4.1	Geschichte der iPS-Zell-Forschung	73
4.2	Vergleich der Transfektionseffizienzen vor Kryokonservierung	76
4.2.1	Einfluss der Zellart auf die Transfektionseffizienz	77

4.3	Vergleich der Transfektionseffizienzen nach Kryokonservierung	79
4.3.1	Einfluss von Kryokonservierung auf die Transfektionseffizienz	80
4.3.2	Einfluss von Transfektionsreagenz und Transfektionsmethode auf Effizienz und Zellviabilität	82
4.3.3	Einfluss von mRNA-Menge, mRNA-Modifikationen und Interferon-inhibitoren auf Effizienz und Zellviabilität	84
4.3.4	Kontroverse um fetales Kälberserum und synthetische, serumfreie Alternativen	87
4.3.5	Plättchenlysat als Alternative zu synthetischen serumfreien Medien	89
4.4	Vergleich der Transfektionseffizienzen in Zellpassage 5 und 6	91
4.4.1	Einfluss der Zellpassage auf Proliferationsverhalten	91
4.5	Vergleich der Transfektionseffizienzen von einfach und mehrfach transfizierten MesenCult-Zellen	92
4.5.1	Einfluss von wiederholter Transfektion auf Effizienz und Zelleletalität	93
4.6	Alternative Methoden zur iPS-Zellgenerierung	94
4.7	Ausblick	96
5	Zusammenfassung	97
6	Literaturverzeichnis	99
7	Erklärung zum Eigenanteil	110
8	Danksagung	111

1 Einleitung

1.1 Häufigkeit und Therapie von Mundhöhlenkarzinomen in Deutschland

Jährlich erkranken in Deutschland ca. 10.000 Personen an einem Karzinom der Mundhöhle oder des Pharynx. Ca. 75 % davon sind Männer. [1] Ursachen sind vor allem Rauchen (95 % der Betroffenen sind Raucher), Alkoholkonsum (vor allem in Kombination mit Tabakkonsum) und das Papillomavirus Typ 16 (HPV-16). [2] Je nach Tumorstadium gibt es unterschiedliche Therapiekonzepte. Neben den Möglichkeiten der Strahlen- und Chemotherapie die außer bei der Palliativmedizin meist ergänzend zum Einsatz kommen, steht bei den kurativen Therapieansätzen, die komplette Tumorsektion im Mittelpunkt. [3] Um Tumorfreiheit zu gewährleisten, arbeiten die Operateure mit einem Sicherheitsabstand von mindestens 0,5 cm zum Tumor. Dies hat zur Folge, dass schon bei kleinen Tumorausdehnungen große Bereiche an Geweben, häufig auch Knochen, entfernt werden müssen. [4] Die entstandenen Defekte müssen meist mit körpereigenem Gewebe ersetzt werden. Gängige Entnahmestellen für Ersatzgewebe sind beispielsweise der am Unterarm entnommene Radialis-Lappen zur Deckung von Weichgewebsdefekten. Zum Ersatz von Knochen dienen Transplantate aus Scapula, Tibia oder dem Beckenkamm. Häufig lassen sich so akzeptable funktionelle wie auch ästhetische Ergebnisse erzielen. [3] Jedoch sind diese autologen Transplantate mit einigen Nachteilen behaftet. So gestalten sich die Eingriffe hier schwieriger und langwieriger; die Patienten müssen teilweise sogar interoperativ umgelagert werden. Nicht immer bietet das gewählte Transplantat die gewünschte Qualität. Postoperativ sind die Patienten stärker eingeschränkt, sie müssen mit Schmerzen in zwei Operationsgebieten umgehen und der Heilungsprozess dauert länger. Auch die zusätzliche Narbenbildung der Entnahmestelle sei, wenn auch von untergeordneter Rolle, an dieser Stelle erwähnt. [5]

1.2 Tissue-Engineering als Behandlungsoption in der kraniofazialen Chirurgie

Das Tissue Engineering, ein Teilbereich der regenerativen Medizin, hat großes Potenzial für die Mund-, Kiefer-, und Gesichtschirurgie. Bei der Rekonstruktion großflächiger Defekte auf Grund von Tumorchirurgie oder auch angeborenen Defekten und schweren Gesichtstraumen besteht eine hohe Nachfrage nach Gewebeersatz. Tissue Engineering bietet die Möglichkeit, sowohl verletztes als auch pathologisch verändertes Gewebe zu ersetzen. [6]

Unter regenerativer Medizin versteht man die Behandlung verschiedener Erkrankungen durch die Wiederherstellung funktionsgestörter Zellen, Gewebe und Organe, sowohl durch die Anregung körpereigener Regenerations- und Reparaturprozesse als auch, wie beim Tissue Engineering, durch biologischen Ersatz, beispielsweise mit Hilfe gezüchteter Gewebe. [7] Es ist ein interdisziplinäres Feld, das die Prinzipien des Ingenieurwesens und der Biowissenschaften auf die Entwicklung biologischer Ersatzstoffe anwendet. [8] Dabei werden häufig spezielle Gerüste, sogenannte Scaffolds, verwendet. Sie bieten strukturelle Unterstützung, stellen Wachstumsfaktoren bereit und schließen Gewebelücken. Dieser Gewebeersatz kann anschließend sowohl als Transplantat in vivo (Abbildung 1), als auch zur Simulation von Krankheitsmodellen und Medikamentenentwicklung dienen. [9] Auch wenn bereits erste Erfolge bei klinischem Einsatz von künstlichen Geweben, vor allem bei Haut [10] und Knorpel [11] erzielt wurden, gibt es noch viele Hürden, die überwunden werden müssen, ehe eine universelle klinische Anwendung möglich ist. [12] Als Ausgangszellen für das Tissue-Engineering werden derzeit meist ausdifferenzierte, patienteneigene Zellen verwendet. Diese reduzieren die Gefahr von auftretenden Immunreaktionen bei einer späteren Reimplantation, vor allem im Vergleich zur allogenen (körperfremden) Transplantation. [12] Diese Zellen können jedoch nur noch sich selbst replizieren, erlauben nicht die Herstellung anderer Gewebearten und sind weniger proliferationsfreudig. [13] Daher hat die Forschung im Bereich des Tissue-Engineerings einen besonderen Focus auf die Verwendung von Stammzellen gelegt.

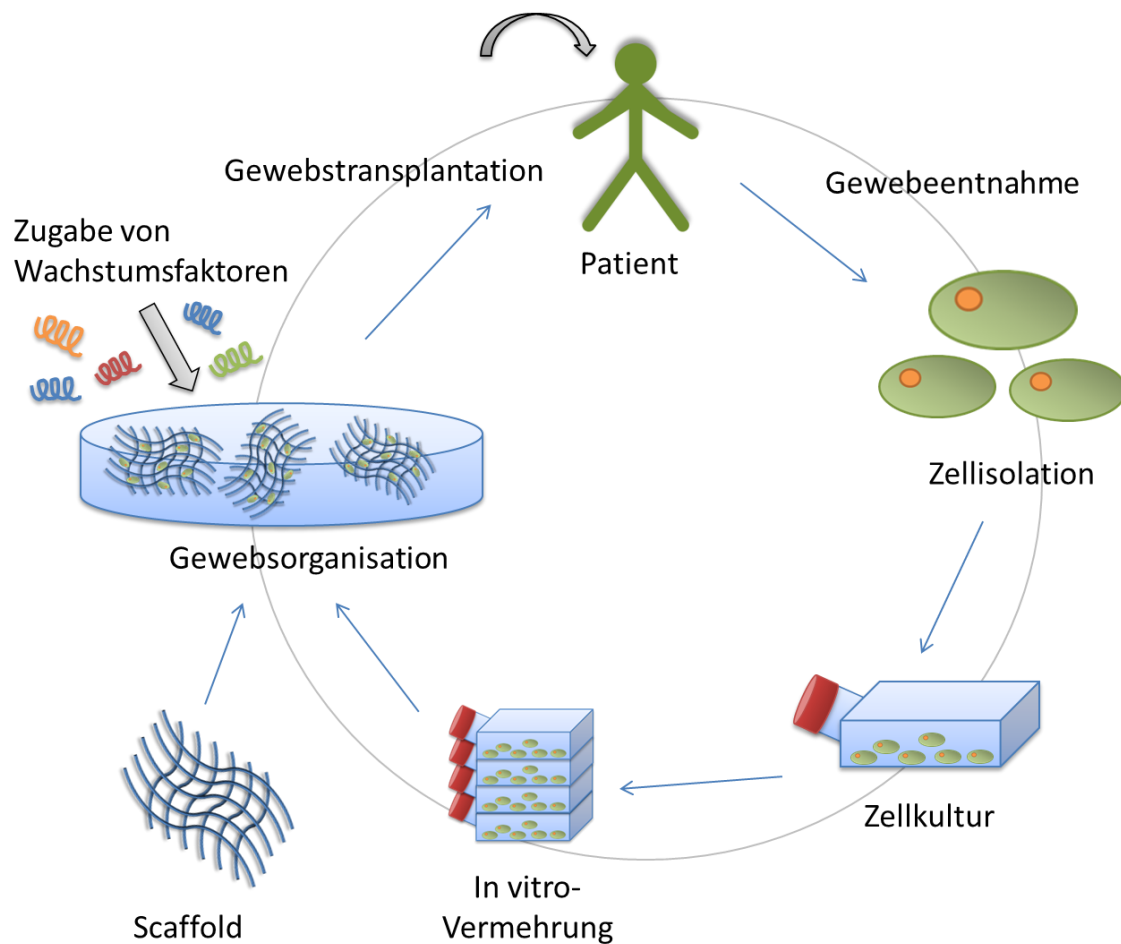



Abbildung 1 Schematische Darstellung des Tissue Engineerings. Durch eine Gewebeentnahme gewinnt man Zellen zur Isolation. Diese Zellen werden in vitro expandiert und zur Gewebsorganisation und Proliferation in dreidimensionale Scaffolds angesiedelt. Die in vitro gereiften Konstrukte können anschließend als Gewebeerersatz transplantiert werden.

1.3 Stammzellen im Überblick

Als Stammzellen bezeichnet man im Allgemeinen Zellen, die die Möglichkeit besitzen, sich in unterschiedliche Gewebe zu differenzieren. Sie sind nicht oder nur wenig differenziert. Man unterscheidet je nach Herkunft embryonale, fetale bzw. Nabelschnur-, adulte und künstlich reprogrammierte Stammzellen (induzierte pluripotente Stammzellen, kurz iPS-Zellen). Hinsichtlich ihres Differenzierungspotentials kann zwischen toti, pluri- oder multipotent, wie in Tabelle 1 dargestellt, unterschieden werden. [14] Totipotenz bedeutet, dass sich aus der entsprechenden Zelle noch ein kompletter Organismus entwickeln kann.

Als pluripotent werden Stammzellen bezeichnet, die sich zu Zellen der drei Keimblätter (Ektoderm, Endoderm und Mesoderm) und der Keimbahn eines Organismus entwickeln können. Sie vermögen sich also zu jedem Zelltyp eines Organismus zu differenzieren, da sie noch auf keinen bestimmten Gewebetyp festgelegt sind. [15] Von Multipotenz spricht man, wenn eine Zelle sich noch in verschiedene Zellen einer Zelllinie entwickeln kann. [16]



Stammzellenart	Differenzierungspotential
Totipotent	Embryonale Stammzellen bis zum Achtzellstadium (= Blastomer)
Pluripotent	Embryonale Stammzellen, fetale/-Nabelschnurblutzellen, induzierte pluripotente Stammzellen
Multipotent	Adulte Stammzellen

Tabelle 1 Entwicklungspotential von unterschiedlichen Stammzellen in Abhängigkeit von der Zellart

1.3.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (kurz ES-Zellen) werden aus einem sehr frühen Entwicklungsstadium des Embryos, der Blastozyste, entnommen. Oft differenzieren sie spontan in eine Zellart. Unter bestimmten Laborbedingungen hingegen verbleiben die Zellen anhaltend in einem undifferenzierten, proliferativen Zustand. [17] Bis zum Achtzellstadium besitzen sie die Fähigkeit zur Totipotenz (von lat. totus „ganz“ und lat. potentia „Vermögen, Kraft“), danach zur Pluripotenz. Zudem sind sie sehr proliferationsfreudig. Die Gewinnung von ES-Zellen geht unweigerlich mit der Zerstörung eines Embryos einher. Methoden, die zur Gewinnung von humanen embryonalen Stammzellen führen, sind daher ethisch sehr umstritten. [18] Ein weiterer Nachteil von embryonalen Stammzellen ist, dass es bei der allogenen Anwendung in vivo zu

immunologischen Abstoßungsreaktionen kommen kann, die eine Immunsuppression nötig machen. Eine weitere Problematik bei der Anwendung von embryonalen Stammzellen ist die Entstehung von Teratomen. Dies sind Tumore, die von Keimzellen ausgehen, und beispielsweise Haare oder Zähne ausbilden können. [19] Auf Grund der vielen negativen Aspekte kommen ES-Zellen im Bereich des Tissue Engineerings nur vereinzelt zum Einsatz.

1.3.2 Fetale Stammzellen

Fetale- oder Nabelschnurstammzellen stellen eine Zwischenform dar. Ihr Differenzierungs- und Proliferationspotential liegt unter dem embryonaler, aber über dem adulter Stammzellen. Gewonnen werden sie aus älteren Embryonen und Feten, bei denen sich die inneren Organe schon ausgebildet haben. Auch hier besteht eine ethische Kontroverse, da fetale Stammzellen häufig aus abgetriebenen Föten gewonnen werden. Nabelschnurstammzellen sind dagegen frei von ethischen Bedenken und gut verfügbar. [20] Ihre Relevanz für den Einsatz im Bereich des Tissue Engineerings wird derzeit weiter erforscht.

1.3.3 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen finden sich auch postnatal im erwachsenen Organismus in unterschiedlichsten Geweben, vor allem dem Knochenmark, aber auch im Gehirn, in der Nabelschnur, im Muskelgewebe und Periost. [13]

Das Periost ist eine dünne Bindegewebsschicht, die die Oberfläche der meisten Knochen bedeckt. [21] Die enthaltenen adulten Stammzellen dienen der Erneuerung und Reparatur verschiedener Gewebearten. Auf Grund der geringeren Differenzierungs- und Selbsterneuerungsmöglichkeiten im Vergleich zu embryonalen Stammzellen bezeichnet man sie als multipotent (Tabelle 1). In der Tissue-Engineering-Forschung werden adulte Stammzellen neben ausdifferenzierten Zellen mit am häufigsten verwendet. Sie sind die bis dato am intensivsten erforschte Stammzellart und kommen bereits aufgrund ihrer immunregulatorischen und protektiven Eigenschaften in zahlreichen klinischen

Studien, vor allem bei Knochenmark- oder anderen Organtransplantationen, zum Einsatz. [22] Sie sind ethisch unbedenklich, leicht verfügbar und immunologisch sehr gut verträglich. Allerdings besitzen sie ein geringeres Proliferationsverhalten und Differenzierungspotential im Vergleich zu embryonalen Stammzellen. [23] [24] Das Transplastizitätsverhalten von adulten Stammzellen - die Fähigkeit einer Stammzelle, andere Zellarten als die des Ursprungsgewebes zu generieren, sowohl innerhalb eines Keimblattes, als auch Keimblatt übergreifend - wird weiter erforscht. [25]

1.3.4 Induzierte pluripotente Stammzellen

Neben der Verwendung von embryonalen und adulten Stammzellen rücken die induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) immer mehr in den Mittelpunkt der Tissue Engineering-Forschung. Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen werden iPS-Zellen aus differenzierten Zellen generiert. [14] Daher sind sie, wie die adulten Stammzellen, ethisch unbedenklich. Bei autologer, also patienteneigener Anwendung, wird die Gefahr von immunologischen Reaktionen auf ein Minimum reduziert. [26] Gleichzeitig sind sie sehr proliferationsfreudig und besitzen Pluripotenz. [27] In der Theorie vereinen sie viele Vorteile und umgehen die Nachteile anderer Stammzellen (Tabelle 2).

	Adulte Stammzellen	Fetale Stammzellen	Embryonale Stammzellen	Induzierte pluripotente Stammzellen
Proliferationsverhalten	+	++	+++	+++
Differenzierungspotential	+	++	+++	+++
Ethische Kontroversen	-	+++	+++	-
Klinische Sicherheit	+++	Abhängig ob autologe oder allogene Verwendung	Abhängig ob autologe oder allogene Verwendung	Abhängig von Generierungsmethode
Verfügbarkeit	+++	-	-	Derzeit geringe Generierungseffizienzen

Tabelle 2 Übersicht über Vor- und Nachteile verschiedener Stammzellarten.

Durch fremdes Erbgut, das bei den derzeit effizientesten Generierungsmethoden in die Zelle eingebracht wird, besteht jedoch bei der klinischen Anwendung eine erhöhte Tumorstärke. Sichere Methoden erlauben momentan nur die Erzeugung einiger weniger iPS-Zellen. [28]

1.3.4.1 Entdeckung

Im Jahr 2006 gelang es den japanischen Forschern Shinya Yamanaka und Kazutoshi Takahashi erstmals embryonale (nach dem Achtzellstadium) und adulte Mausfibroblasten unter dem Einfluss der vier Transkriptionsfaktoren OCT3/4, SOX2, c-Myc, und Klf4 zu pluripotenten Stammzellen zu programmieren. Diese Zellen ähnelten in ihren Eigenschaften sehr ES-Zellen und wurden daher von Yamanaka als induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) bezeichnet.

Ein Jahr später gelang der japanischen Forschergruppe auch die Generierung von iPS-Zellen aus humanen Fibroblasten. [29] iPS-Zellen zeigen alle Aspekte von Pluripotenz. Diese wurde zum einen durch die Bildung von Teratomen nach subkutaner Injektion bei Mäusen bewiesen. Zum anderen entwickelte sich aus einer Blastozyste, der man iPS-Zellen eingepflanzt hatte, ein vollständiger Mausembryo. [30]

Die Entdeckung von induzierten pluripotenten Stammzellen weckte große Hoffnungen in der Stammzellforschung und der regenerativen Medizin. Man versprach sich tiefgreifende Erkenntnisse über die Mechanismen der Differenzierung und Entdifferenzierung von Zellen und eine ethisch unbelastete Bezugsquelle für Zellen zur Simulation von Krankheitsmodellen und bei der Medikamentenentwicklung. Von größtem Interesse war und ist die Generierung von individuellen patienteneigenen Stammzellen für die klinische Anwendung im Bereich der regenerativen Medizin. [27]

1.3.4.2 Methoden zur Reprogrammierung

Unter Reprogrammierung versteht man eine beliebig differenzierte Zelle wieder in ein frühes embryonales Entwicklungsstadium zurückzuführen. Schon in den Sechzigerjahren wurden erste Versuche zur Rückführung von Zellen in ein undifferenziertes Stadium unternommen. Inzwischen sind diverse Methoden bekannt, die die Reprogrammierung von Zellen ermöglichen. [31]

1.3.4.2.1 Somatischer Zellkern-Transfer

Beim somatischen Zellkerntransfer (SCNT) wird einer somatischen differenzierten Körperzelle der Zellkern entnommen und in eine Eizelle, der man den Nucleus (Zellkern) zuvor entfernt hat, eingesetzt. Der Zellkörper der Oozyte mit den Botenstoffen veranlasst die Zelle, sich zu entdifferenzieren. [32] Der Erfolg dieser Methode ist abhängig vom Differenzierungsgrad der jeweiligen Spenderzelle. Je höher dieser ist, desto geringer ist die Chance, eine pluripotente oder gar totipotente Zelle zu erhalten. Vorteil dieser Methode ist die einfache Gewinnung der ES-Zellen durch heterologe Kombination. Jedoch ist diese Art der Reprogrammierung sehr aufwendig, mit einer hohen Sterberate der Zellen verbunden, und auf Grund der epigenetischen Einflüsse der Spenderzelle unkalkulierbar. [33] Für mediales Aufsehen sorgte das Schaf „Dolly“, das 1996 als erstes Säugetier mittels SCNT geklont wurde. [34]

1.3.4.2.2 Inkubation mit Zellextrakten

Ausdifferenzierte Zellen werden mit Extrakten aus beispielsweise embryonalen Stammzellen oder aus Teratokarzinomzellen inkubiert. Diese Methode ist besonders für die Grundlagenforschung von Interesse. Sie erlaubt die genaue Erforschung des Reprogrammierungsprozesses, dessen genauer Hergang noch nicht vollkommen verstanden ist. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die Schwierigkeit, definitiv nachzuweisen, ob die Zelle auf Grund einer erfolg-reichen Reprogrammierung zur Stammzelle oder infolge des durchgängigen Kontaktes mit den Zellextrakten die entsprechenden Proteine exprimiert. [35] Auch diese Form der Reprogrammierung ist schon seit Jahrzehnten bekannt.

1.3.4.2.3 Methoden zur Generierung von iPS-Zellen / Faktor vermittelte Reprogrammierung

Seit der Entdeckung der induzierten pluripotenten Stammzellen wurden diverse Methoden zu Generierung entwickelt (Abbildung 2). Wirkungsvolle Verfahren gehen häufig mit einer Integration von Fremdgenen ins Genom der Zelle einher. Nicht-integrative Verfahren sind derzeit häufig noch ineffizient. Bei vielen Reprogrammierungsmethoden verbleiben Zellen in einem Intermediärstadium und werden als „pre- oder partial-iPSCs bezeichnet. [36]

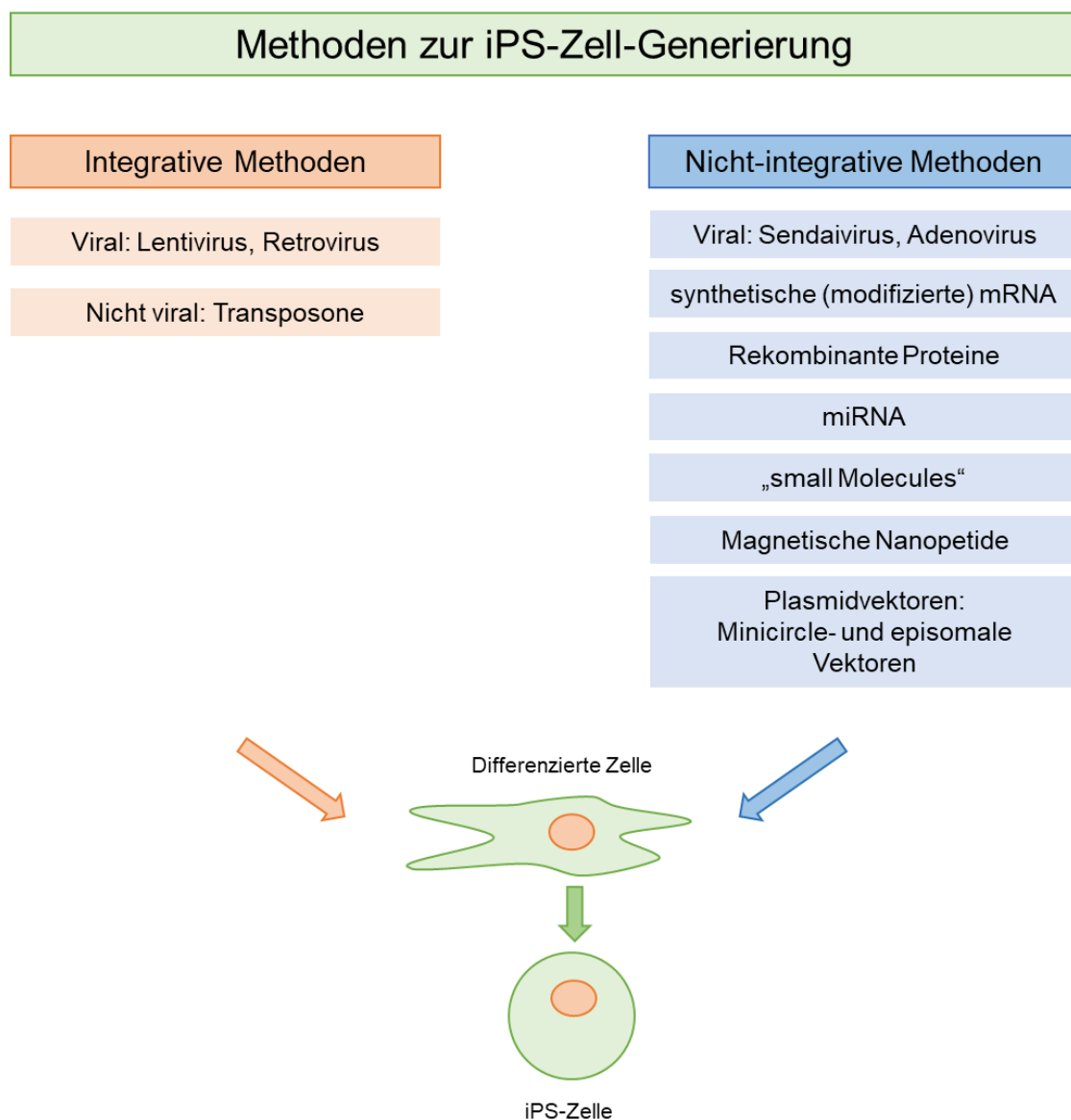


Abbildung 2 Verbreitete Methoden zur iPS-Zell-Generierung

Die meisten Methoden zur Generierung von iPS-Zellen basieren auf einer (Transkriptions-) Faktor-vermittelten Reprogrammierung. Transkriptionsfaktoren sind regulatorische Proteine. Durch Bindung an spezifische Regionen der DNA modulieren sie den Start der Transkription positiv oder negativ. Zu Beginn der Stammzellforschung ging man davon aus, dass es sich bei der Differenzierung von Stammzellen in die jeweiligen Gewebszelltypen um einen irreversiblen Prozess handle. Shinya Yamanaka und seine Kollegen bewiesen, dass Zellen, die man den Transkriptionsfaktoren OCT4, KLF4, SOX2 und c-MYC aussetzte, einen Reprogrammierungsprozess durchlaufen. Diese Faktoren bestimmen die Zellidentität und sind eng mit der Pluripotenz verknüpft. Um die Transkriptionsfaktoren in die Zelle einzubringen, wurde von Yamanaka ein retroviraler Vektor verwendet. [30] Neben den bekannten OSKM-Faktoren (OCT4, KLF4, SOX2 und c-MYC) kommen inzwischen eine ganze Reihe weiterer Faktoren wie Nanog, Stat3, Lin28, Esrrb, SV40LT, UTF-1, p53 siRNA, hTERT, Wnt3a und Nr5a2 in den unterschiedlichsten Kombinationen zum Einsatz. [36]

1.3.4.2.3.1 Transfektion

Die Transfektion bildet häufig die Grundlage für die Generierung von iPS-Zellen. Sie bezeichnet den Prozess des Einschleusens von fremder DNA oder auch RNA in eukaryotische Zellen. Man unterscheidet zwei Formen. Zum einen die transiente Transfektion, bei der genetisches Material nur vorübergehend in die Zelle eingebracht wird und zum anderen die stabile Transfektion, bei der es zu einem dauerhaften Einbau von bestimmten Gensequenzen ins Genom kommt. [37] Für die Transfektion gibt es unterschiedliche Wege:

- chemische Methoden, wie die Calcium-Phosphat-Präzipitation, DEAD-Dextran oder Lipofektion
- physikalische, wie Elektroporation und Mikroinjektion
- biologische Verfahren mittels Antikörper oder Transferininfektion
- oder die in der Vergangenheit sehr häufig angewendete retrovirale Methode [38]

1.3.4.2.3.2 Integrative Methoden

Ungeschützte Nukleinsäuren (RNA oder DNA) sind in biologischer Umgebung nur über einen sehr kurzen Zeitraum stabil. Darüber hinaus sind Nukleinsäuren nicht in der Lage von allein die Zellmembran zu passieren (wo die RNA ihre Funktion verwirklichen kann) oder gar in den Zellkern, wo die DNA transkribiert wird und auch das Zellgenom modifiziert werden kann, einzudringen. [39] Zur Überwindung dieser Barriere können spezielle Viren eingesetzt werden. Während der Evolution entwickelten Viren verschiedene Mechanismen, um in Zellen einzudringen, ihr Erbgut so lang wie möglich zu erhalten und intrazelluläre Schutzmechanismen des Wirtsorganismus zu umgehen und zu unterdrücken. So sind sie in der Lage ihr genetisches Material ins Genom des Wirtes zu integrieren und sich zu vermehren. Diese Fähigkeit macht sich die Gentherapieforschung zu Nutze. Das Fachgebiet „Reverse Genetics“ kehrt die klassischen Vorgehensweisen der Genetik um und entwickelt Methoden zur Genommodifikation und Erzeugung von rekombinanten Viren. Diese werden als Vektoren (= Transportmedium für Fremdgene) in der Gentherapie verwendet. [40] Für fast alle Viren können rekombinante Versionen erzeugt werden. Nur eine begrenzte Anzahl kommt jedoch tatsächlich zum Einsatz. [41]

Bei Retroviren liegt die Erbinformation als RNA-Einzelstrang vor. Dieser besitzt die Enzyme Integrase und reverse Transkriptase, mit denen es möglich ist, zu den RNA-Strängen komplementäre DNA-Stränge zu synthetisieren. Diese werden dann mithilfe des Integrase-Enzyms in das Wirtsgenom eingebaut. Bei der Reprogrammierung zu Stammzellen werden die entsprechenden Transkriptionsfaktoren mittels Retroviren oder Lentiviren in die Zelle einschleust und anschließend exprimiert. Die Zelle wird in ein pluripotentes Stadium zurückgeführt. So beispielsweise auch die bereits beschriebene Faktorvermittelte Reprogrammierung mittels Retroviren, wie sie Yamanaka und Takahashi bei ihrer Methode der Generierung von iPS-Zellen verwendeten. [42] Hierbei kann es zur Integration unerwünschten Erbguts ins Genom der Zielzelle kommen. Dies kann mit einer vermehrten Tumorentstehung einhergehen, vor allem, wenn der auch als Onkogen wirksame Transkriptionsfaktor c-Myc aktiviert

wird. Ein klinischer Einsatz der meisten retroviral generierten iPS-Zellen ist daher zu riskant für den Einsatz am Patienten. [43]

Zu den integrativen Methoden gehören auch Transposone, sogenannte „jumping genes“, Abschnitte der DNA, die nicht statisch an einen Ort am Gen gebunden sind, sondern innerhalb des Gens ihre Position ändern können. [44]

1.3.4.2.3.3 Nicht-Integrative Methoden

Um eine klinische Anwendung von iPS-Zellen überhaupt zu ermöglichen, ist es notwendig, eine Reprogrammierungsmethode zu verwenden, welche die Integration von Fremdgenen ins Genom der Zelle unterbindet. Die regenerative Medizin konzentriert sich daher auf die Entwicklung integrationsfreier Methoden zur iPS-Zellgenerierung. [40]

1.3.4.2.3.3.1 iPS-Zell-Generierung mit nicht-integrativen Vektoren

Bei dieser Methode kommen Adeno-virale oder Sendai-virale Vektoren zum Einsatz, die zumindest theoretisch nicht mehr die Fähigkeit besitzen, sich ins Genom zu integrieren. Dennoch zeigten in Studien gerade mal 8-33 % der transduzierten (= Gentransfer mittels Viren) Zellen keine Plasmidintegration auf. [33] Dies macht die Methode neben den sehr geringen Transfektions-effizienzen für die klinische Anwendung uninteressant.

Die Verwendung von episomalen Vektoren, die auf der Grundlage des Epstein-Bar-Virus-Nuclear-Antigen-1 entwickelt wurden, garantiert eine Vektor- und Transgen-freie Generierung von IPS-Zellen. Aber auch hier reichen die erreichten Effizienzen für eine klinische Anwendung nicht aus. [45]

Minicircle Expressionsvektoren bestehen aus superspiralisierter DNA ohne bakterielle Sequenzen. Sie zeigen weit höhere Transfektionseffizienzen und eine länger anhaltende Genexpression, da sie keinen bakteriellen Replikationsursprung besitzen und somit nicht so schnell aus dem Genom entfernt werden. Nach erfolgter Transfektion werden die Vektoren wieder aus den Zellen entfernt. Bei der Generierung von IPS-Zellen zeigten sich trotzdem nur sehr geringe Effizienzen von 0,05 %. [46]

1.3.4.2.3.3.2 iPS-Zell Generierung mit rekombinanten Proteinen

2009 stellte Zhou mit Kollegen erstmals eine Reprogrammierungsmethode vor, bei der iPS-Zellen durch das direkte Einschleusen von rekombinanten Proteinen erzeugt werden. Die generierten Zellen bezeichnet man als Protein-induzierte pluripotente-Zellen, kurz piPS-Zellen. [47] Rekombinante Proteine werden künstlich mit Hilfe von gentechnisch veränderten Mikroorganismen oder in Zellkulturen hergestellt. [48] Auf Grund ihrer Größe werden sie als Makromoleküle bezeichnet. Sie können die Zellmembran nicht eigenständig überwinden. Um ihnen dennoch die Passage zu ermöglichen, fusionierte man die Reprogrammierungsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4, und c-Myc mit Zellpenetrierenden Peptiden, kurz CPP. [49] Sie bestehen aus einer Poly-Arginin-Transduktionsdomäne und ermöglichen den Membranübergang ohne den Einsatz weiterer Chemikalien. [50] Diese Methode vereint viele Vorteile. Zum einen eliminiert sie das Problem der Genmanipulation der Zielzelle durch exogene Sequenzen, wie sie bei der herkömmlichen Generierung besteht. Zum anderen ist sie in der Durchführung sehr einfach, wirtschaftlich und die zeitaufwändige Suche nach Integrations-freien iPS-Zellen entfällt, was die Generierung mittels rekombinanter Proteine für die klinische Anwendung attraktiv macht. [47] Trotz aller Vorteile ist auch diese Methode der iPS-Zell-Generierung langsam und ineffizient und bedarf weiterer Entwicklungen. [50]

1.3.4.2.3.3.3 iPS-Zell-Generierung mit „small Molecules“

Im Jahr 2008 berichteten Huangfu und Kollegen als Erste über den Einsatz von sog. „small Molecules“, niedermolekularen Substanzen, darunter DNA-Methyltransferasen und Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDAC), die zu einer deutlichen Steigerung der Effizienz der iPS-Zell-Generierung führten. [51] HDAC sind Enzyme. Sie regeln Transkription, epigenetische Expression sowie Zellzyklus und -entwicklung, indem sie Histone verändern. Somit beeinflussen sie den Verdichtungsgrad der DNA, der während der Reprogrammierung eine große Rolle spielt, und führen zu einer Hochregulation von ES-spezifischen Genen. [36] Die Anwendung von Substanzen wie Dexamethason (DMSO),

Trichostatin A (TSA), Suberoylanalid-hydroxamische Säure (SAHA) und Valproinsäure (VPA) zeigte eine signifikante Effizienzsteigerung der Reprogrammierungsraten. Besonders VPA stach hervor. VPA steigerte nicht nur die Effizienz um ein hundertfaches, sondern ermöglichte zusätzlich auch den Verzicht auf das Protoonkogen c-Myc. [51] Auch weitere Transkriptionsfaktoren lassen sich so ersetzen. „small Molecules“ können jedoch nur ergänzend zu anderen Reprogrammierungsmethoden verwendet werden. Eine erfolgreiche Generierung von iPS-Zellen durch den alleinigen Einsatz von niedermolekularen Substanzen konnte noch nicht umgesetzt werden. [52]

1.3.4.2.3.3.4 iPS-Zell-Generierung mittels synthetischer RNA

Eine weitere Methode zur Generierung von iPS-Zellen stellte Warren in Zusammenarbeit mit seinen Kollegen 2010 vor. Durch den Einsatz von in-vitro hergestellter mRNA, die für die entsprechenden Transkriptionsfaktoren (OMSK) codiert, konnten unterschiedliche menschliche Zellen erfolgreich reprogrammiert werden. [53] Durch beispielsweise Lipofektion gelangt die mRNA ins Zytosol. Dort wird sie an den Ribosomen translatiert (= Synthese der Proteine, Abbildung 3). Die verwendete mRNA wurde vorher chemisch modifiziert, um Effizienz und Halbwertszeit zu steigern und sie vor zellulären immunologischen Abwehrmechanismen zu schützen. [54] Warren verglich die mRNA-basierte Generierung mit der retroviralen Methode. Die Zellen zeigen in ihrer Morphologie und in ihrem Verhalten gegenüber ES-Zellen noch größere Übereinstimmung als die retroviral generierten iPS-Zellen. Die Effizienz stieg um das 36-fache auf 1,4 %. iPS-Zell-Kolonien bildeten sich deutlich früher. Die Methode ist gut kontrollierbar und einfach umsetzbar. Mutationen des Genoms sind ausgeschlossen, was sie für die klinische Anwendung äußerst vielversprechend macht. [53] Allerdings zeigte die mRNA eine hohe Zytotoxizität bei der Reprogrammierung von differenzierten Zellen zu iPS-Zellen. [55]

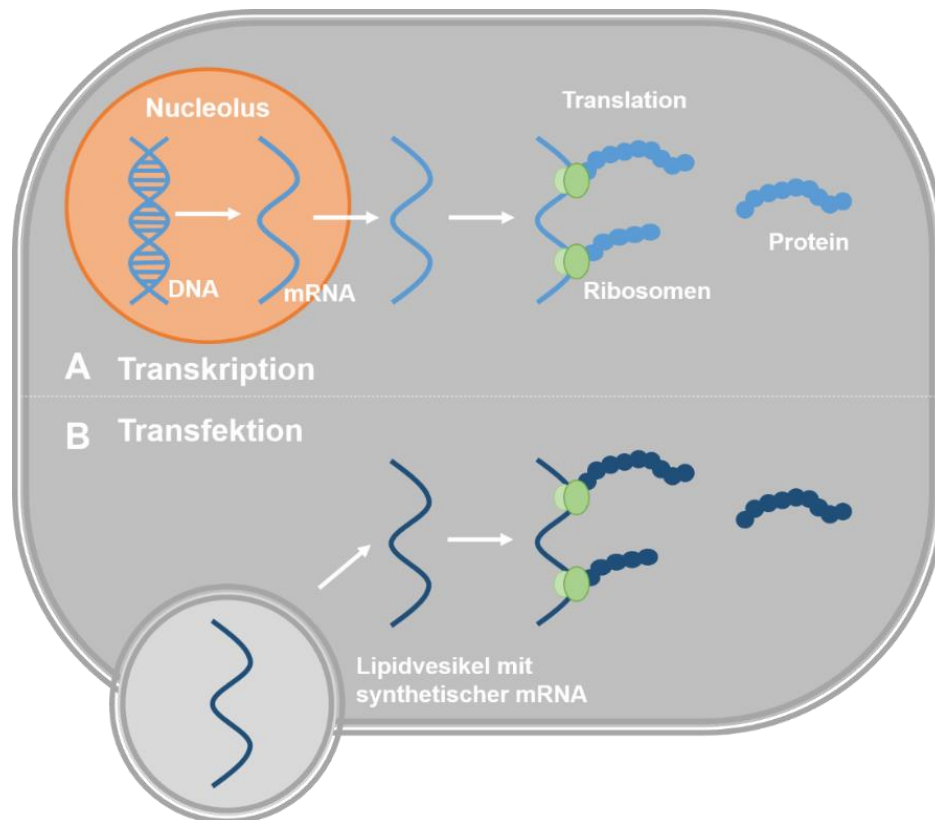


Abbildung 3 Gegenüberstellung der natürlichen (A) und der artifiziell induzierten (durch transfizierte synthetische mRNA) Transkription bzw. Translation (B)

1.3.4.2.3.3.5 iPS-Zell-Generierung mit microRNA

MicroRNAs, häufig als miRNA abgekürzt, sind kurze, nichtcodierende RNAs. Bei der Genregulation spielen sie eine wichtige Rolle. Sie erkennen spezifische Basenpaare auf der mRNA, binden an diese und regulieren so die Translation. Sie triggern das Andocken von Proteinen an bestimmte DNA-Abschnitte und verändern durch Modifikation von Histonen die Chromatinstruktur. Deshalb sind sie für die Zellproliferation und -differenzierung und somit auch für die iPS-Zellgenerierung von großer Bedeutung. [56] Im Jahr 2011 gelang Anokye eine hocheffiziente miRNA-vermittelte Reprogrammierung von somatischen Zellen von Mäusen und Menschen ohne den Einsatz von Reprogrammierungs-faktoren. Jedoch wurden integrierende virale Vektoren verwendet und die miRNA nicht direkt transfiziert. [57]

Im selben Jahr generierten auch Miyoshi und seinen Kollegen erfolgreich iPS-Zellen durch direkte Transfektion von miRNA und ohne den Einsatz viraler Methoden. Die Effizienz war allerdings sehr gering. [58]

Die besten Effizienzen bei der iPS-Zellgenerierung lassen sich derzeit erzielen, wenn miRNA unterstützend zur eigentlichen Methode, z. B. bei Generierung von iPS-Zellen mit modifizierter mRNA, verwendet wird. [59]

1.3.4.3 Rolle der epigenetischen Einflüsse bei der Generierung von iPS-Zellen

Neben der zuvor beschriebenen Regulation durch Transkriptionsfaktoren spielen auch epigenetische Einflüsse eine wichtige Rolle bei der Stammzell-differenzierung und -reprogrammierung. Eine einheitliche Definition des Begriffes gibt es derzeit noch nicht. Unter Epigenetik fasst man Veränderungen der DNA zusammen, die während der Zellteilung vererbt werden. Diese strukturellen Anpassungen chromosomaler Regionen dienen dazu, veränderte Aktivitätszustände zu registrieren, zu signalisieren oder konservieren. [60] Diese Veränderungen beruhen auf chemischen Modifikationen der Histone (Proteine, die für die Kondensierung der DNA zuständig sind) oder der DNA selbst. Häufig bewirken diese eine andauernde In- oder Aktivierung bestimmter Genareale. Die statischen unveränderlichen Informationen des Genoms werden durch epigenetische Einflüsse unterschiedlich umgesetzt. [61] Jüngste Studien haben gezeigt, dass die ursprüngliche somatische epigenetische Signatur ein begrenzender Faktor für die iPS-Zellgenerierung ist. Der Prozess der effektiven Reprogrammierung muss eine vollständige Umgestaltung des vorhandenen somatischen epigenetischen Gedächtnisses einschließen, gefolgt von der Etablierung einer komplett „neuen epigenetischen Signatur“, die dem neu zu differenzierenden Zelltyp entspricht. Weitere Untersuchungen epigenetischer Einflüsse in Zusammenhang mit der iPS-Reprogrammierung sind deshalb erforderlich. [62]

1.4 Kieferperiostzellen

Als Periost wird die Membran bezeichnet, die alle Oberflächen der Röhrenknochen außerhalb der Gelenke bedeckt. Es dient als Ansatzpunkt für Sehnen und Muskeln und setzt sich aus zwei Schichten zusammen. Das Stratum fibrosum bildet die äußere zellarme Schicht und besteht überwiegend aus straffem Bindegewebe. Dem Knochen zugewandt folgt das Stratum osteogenicum. Diese Schicht enthält mesenchymale Stammzellen (Osteoprogenitorzellen), aus denen sich Osteoblasten entwickeln. Sie bilden die Knochenmatrix (Osteoid) und sind zusammen mit den Osteoklasten, die aus hämatopoietischen Stammzellen des Knochenmarks hervorgehen, für den fortwährenden Knochenumbau sowie für Reparaturprozesse verantwortlich. Das Stratum osteogenicum ist stark vaskularisiert und innerviert und ist somit auch recht schmerzempfindlich. [63] Periostzellen lassen sich leicht kultivieren und inzwischen gilt das Periost sogar als bessere Quelle für mesenchymale Stammzellen (= adulte Stammzellen, die sich vom Mesenchym ableiten) als das Knochenmark. Gerade im Kieferbereich lassen sie sich besonders leicht gewinnen und ihr osteogenes Potential ist vom Alter des Spenders unabhängig. [21] Das macht sie auch für die iPS-Zell- und Tissue-Engineering-Forschung zu einer interessanten Zellquelle.

1.5 Fragestellung

Für die Stammzellforschung und insbesondere für die iPS-Zell-Forschung ist es von großem Interesse, den Sprung von in-vitro Experimenten, Krankheitsmodellen und Medikamentenentwicklung hin zur klinischen Anwendung zu schaffen. Um sich der klinischen Anwendung anzunähern, müssen zunächst die Methoden zur Generierung von iPS-Zellen weiterentwickelt bzw. verbessert werden. Neben der bereits erwähnten Problematik der Integration von genetischem Material und der damit verbundenen Gefahr der Tumorentstehung durch die Verwendung integrativer Methoden gibt es weitere Hürden, die überwunden werden müssen.

Die Anwendung von fetalem Kälberserum (FKS) ist in der Zellkultur immer noch weitverbreitet. FKS enthält viele Proteine, darunter Wachstumsfaktoren, die gerade für die Kultivierung von Stammzellen nur schwer zu ersetzen sind.

Aus dem Herzen des noch lebenden, nicht betäubten und noch ungeborenen Kälberfötus wird Blut entnommen, aus dem letztendlich das FKS gewonnen wird. Es handelt sich somit um ein natürliches Produkt, dessen exakte chemische Zusammensetzung schwankt und nicht vollständig bekannt ist. Fetales Kälberserum kann Verunreinigungen aufweisen und enthaltene Stoffe könnten beim Menschen zu immunologischen Reaktionen führen, was die routinemäßige klinische Anwendung untersagt. [64]

Momentan zeigen die verschiedenen Transfektionsmethoden für die iPS-Zell-Generierung nur sehr geringe Effizienzen, die sich zwischen 10^{-6} bis 10^{-2} bewegen. Die als am sichersten eingestuften Methoden erzeugen die geringsten Erfolgsraten. [28] Ziel ist es also, eine Methode zu entwickeln, die zum einen zu einer effizienten und integrationsfreien Generierung von iPS-Zellen führt und zum anderen auf die Anwendung von fetalem Kälberserum verzichtet (=xenofrei).

Avci-Adali und ihre Kollegen veröffentlichten im Jahr 2014 ein Protokoll zur optimierten Transfektion von Endothelzellen mittels in-vitro synthetisierter und modifizierter mRNA. [65] Basierend auf ihren Ergebnissen wurden humane Kieferperioestzellen transfiziert, die unter Verwendung vom FKS-freien MesenCult-Medium kultiviert wurden (MesenCult-Zellen, MC-Zellen).

Diese Arbeit soll einen Beitrag zur Etablierung einer effizienten Methode für die iPS-Zell-Generierung aus Kieferperiostzellen leisten. Diese Zellen sollen nach detaillierten Untersuchungen zukünftig im Bereich des Tissue-Engineerings in der kraniofazialen Chirurgie Anwendung finden.

2 Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Zellen

Zellart	Herkunft/Referenz
Humane Kieferperiostzellen	MKG-Chirurgie, Universitätsklinikum Tübingen

2.1.2 Verwendete mRNA

mRNA	Herkunft/Referenz
Modifizierte GFP-mRNA	Klinisches Forschungslabor Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (AG von Prof. Dr. Hans-Peter Wendel)

2.1.3 Geräte

Geräte	Hersteller/Firmensitz
Brutschrank, Hera Cell 150	Thermo Scientific, Deutschland
Zentrifuge 5804/5804 R	Eppendorf, Deutschland
Eppendorf Research® Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Zoe	BioRad
Guava easyCyte™ Flow Cytometer	Merck Millipore, Deutschland
Photometer Gene Quant	Amersham Biosciences, UK
TC20™ Automated Cell Counter	Bio Rad, USA
Vortex-Reagenzglas mixer	NeoLab, Deutschland
Wasserbad	Memmert

2.1.4 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller/ Bezugsquelle/ Firmensitz
Alpha MEM ohne Nucleoside Minimum essential Medium Eagle - alpha modification	STEMCELL Technologies, USA
Amphotericine B	Merck Millipore, Deutschland
Ampuwa® Spüllösung	Fresenius Kabi, Österreich
BD Cytotfix™	BD Plastipak, USA
Collagenase (1500 U/ml), Typ IX	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
Cryo-Medium	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
DMEM/F-12, GlutaMAX™ Supplement	Life Technologies, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Modified, without calcium chloride and magnesium chloride, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Einmalspritze 50/60 ml, Luer-Lok Ansatz, zentrisch	BD Plastipak, USA
Falcon 40µm cell Strainer, blue, sterile	Corning, USA
Falcon® Serologische Pipetten	Corning®, USA
Fetales Kälberserum, non USA- Origin, sterile-filtered, suitable for cell culture	Sigma-Aldrich, Deutschland

Guava Check Kit for Flow Cytometry	Merck Millipore, Deutschland
L-Glutamine	STEMCELL Technologies, USA
Lipofectamine2000 Reagent	Invitrogen, USA
Lipofectamine3000 Reagent	Invitrogen, USA
MesenCult™-ACF Enzymatic Dissociation Solution	STEMCELL Technologies, USA
MesenCult™-ACF Enzyme Inhibition	STEMCELL Technologies, USA
MesenCult™-SF Attachment Substrate	STEMCELL Technologies, USA
MesenCult™-XF Basalmedium	STEMCELL Technologies, USA
MesenCult™-XF Supplement (5X)	STEMCELL Technologies, USA
RNase-Free Water	Qiagen, Niederlande
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium, no phenol red	Life Technologies, USA
Penicillin-Streptomycin	Lonza, Schweiz
Solution of L-Glutamine	STEMCELL Technologies, USA
TransIT®-mRNA Transfection Kit	Mirus, USA
Trypan Blue Dye, 0.4 % solution	Bio Rad, USA

2.1.5 Sonstiges Material

Sonstiges Material	
CELLSTAR® Aspirationspipette	Greiner Bio-One, Deutschland
CELLSTAR® 50 ml und 15 ml Centrifuge Tube	Greiner Bio-One, Deutschland
Counting Slides, Zählobjektträger	Bio Rad, USA
Injekt® Solo 2-teilige Einmalspritzen, Luer Ansatz, exzentrisch	B/Braun, Deutschland
Minisart® NML Spritzenvorsatzfilter	Sartorius stedim biotech, Deutschland
Reaktionsgefäß, komisch, mit Schraubverschluss	Greiner Bio-One, Deutschland
TipOne® Pipettenspitzen, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	StarLab, Deutschland
Zellkulturflasche, 75 cm ² , U-shaped canted Neck with Phenolic-Style	Corning, USA
Zellkultur-Multiwellplatte, 24 Well, PS	Greiner Bio-One, Deutschland

2.1.6 Verwendete statistische Tests

T-Test zur Auswertung unabhängiger Stichproben	Microsoft Excel
--	-----------------

2.2 Methodik

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37°C und einem Kohlendioxidanteil von 5 %. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit dem TC20™ Automated Cell Counter unter Verwendung von Trypanblau (0,4 %) und eines Zählobjekt-trägers. Zentrifugiert wurde stets bei 4° C und 1400 U/min für sieben Minuten.

2.2.1.1 Gewinnung der Kieferperiostzellen

Die verwendeten Kieferperiostzellen wurden im Rahmen von Routinebiopsien und kraniofazialen Operationen der Universitätsklinik Tübingen gewonnen. Die Patienten stimmten der Verwendung für Forschungszwecke zu (Ethikvotum Pr. Nr.-194_2008BOZ).

Eingelegt in Natrium-Chlorid-Lösung gelangten die Gewebeproben ins Labor der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Dort wurde das Periost isoliert und mit dem Skalpell in der Petrischale zerkleinert. Nach Überführung in ein 50 ml Falcon und Zugabe von PBS zentrifugierte man das Gewebe-PBS-Gemisch. Der gebildete Überstand wurde vorsichtig mit der Aspirationspipette abgesaugt. Nach Zugabe von Kollagenase (1500U/ml) wurden die Zellen für 90 Minuten im Wasserbad bei 37°C enzymatisch verdaut. Erneut erfolgte die Zugabe von PBS mit anschließendem Zentrifugieren. Ein weiteres Mal wurde der Überstand abgenommen. Abschließend konnten die Zellen nun auf DMEM-Komplett-medium (Zusammensetzung: DMEM/F-12, GlutaMAX™ mit 10 % FKS und jeweils 1 % Pen-Strep und Amphotericine B) ausgesät werden. Zum Zeitpunkt der Überführung in eine Zellkulturflasche befanden sich die Zellen in Passage null. Im Folgenden wurden die Kieferperiostzellen kultiviert und passagiert bis Passage zwei erreicht wurde. Die Zellen wurden in dieser Passage eingefroren (Einfriermedium – 80 % DMEM-Komplett, 10 % FCS und 10 % steriles DMSO) und im flüssigem Stickstoff bei 196°C gelagert.

2.2.1.2 Kultivierung von Kieferperiostzellen in DMEM-Medium

Nach der Entnahme aus dem Flüssigstickstoff wurden die Kieferperiostzellen zunächst im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und mit Medium verdünnt. Nach einem Zentrifugations-Schritt wurde der Überstand abgesaugt und das verbleibende Zellpellet in DMEM-Komplettmedium (je nach Pellet-Größe 2-3 ml) aufgenommen. Um die Zellzahl zu bestimmen, entnahm man der Zellsuspension 20 µl und vermischte diese mit ebenfalls 20 µl Trypanblau, welches man in einer 96-Well Platte vorgelegt hatte. Nach einer Inkubationszeit von 4-5 Minuten gab man das Zellsuspensions-Trypanblau-Gemisch auf die Zählkammer und bestimmte anschließend die Zellzahl mit Hilfe des TC20™ Automated Cell Counter. Schließlich wurden die Zellen gemäß der ermittelten Zellzahl mit DMEM-Komplettmedium vermennt und zu je 250.000 – 350.000 Zellen in 10 ml DMEM-Komplettmedium pro 75 cm²-Flasche ausgesät. Die Kieferperiostzellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt in Passage 3. Eine weitere Kultivierung der Zellen erfolgte je nach Proliferationsverhalten für ca. ein- bis eineinhalb Wochen in DMEM-Komplettmedium. Der Mediumwechsel wurde alle zwei Tage vorgenommen.

2.2.1.3 Reduktion des FKS- Anteils und Wechsel auf MesenCult-Medium

Um aus einer bereits serumhaltigen Zellkultur FKS-freie MesenCult-Zellen zu erhalten, bedurfte es einer schrittweisen Herabsetzung des verwendeten Serums. Ab einer Konfluenz von ca. 60 % wurde mit der Reduktion des FKS-Anteils im Komplettmedium begonnen. Da sich die Kieferperiostzellen besonders während dieser Phase, aber auch nach beendeter Umstellung auf MesenCult-Medium als sehr anfällig für Infektionen zeigten, war es empfehlenswert, das Medium immer direkt vor dem Überführen in die Zellkulturflasche mit Hilfe eines Spitzenvorsatzfilters mit einer Porengröße von 0,22 µm und entsprechender Einmalspitze steril zu filtrieren.

Bei der ersten Reduktion wurde der Anteil des FKS von 10 % auf 7,5 % im Komplettmedium vermindert und die Zellen für 2 Tage in diesem Medium belassen. Es folgte im selben Rhythmus die Reduktion von 7,5 % auf 5,0 % und

von 5,0 % auf 2,5 %. Schließlich erfolgte nach 2-3 Tagen die Umstellung der Kieferperiostzellen von 2,5 % FCS-haltigem Komplettmedium auf das serumfreie MesenCult-Medium.

Zusammensetzung des MesenCult-Mediums:

- *MesenCult™-XF Basalmedium* und *MesenCult™-XF Supplement (5X)* im Verhältnis 1:5
- *L-Glutamine, Pen-Strep* und *Amphotericine B* je zu 1 %

Vorsorglich wurde auch der Grundansatz des MesenCult-Mediums sterilfiltriert. Dieser war im Kühlschrank bei 2°- 8°C 5 Tage haltbar. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3-4 Tage.

2.2.1.4 Einfrieren von MesenCult-Zellen

Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Kieferperiostzellen, die nicht direkt in Versuchen zum Einsatz kamen, im Einfriermedium in den Flüssigstickstoff überführt. Dafür wurde das alte Medium aus der Zellkulturflasche entfernt und einmal mit vorgewärmten PBS gewaschen. Anschließend wurden bei einer Flaschengröße von 75 cm² 3,5 ml MesenCult™-ACF Enzymatic Dissociation Solution auf die Zellen gegeben und für fünf bis acht Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5,0 % CO₂ inkubiert. Danach wurde durch Sichtkontrolle und vorsichtiges Klopfen sichergestellt, dass sich die Zellen gut gelöst hatten. Um die enzymatische Reaktion zu stoppen, wurden ebenfalls 3,5 ml MesenCult™-ACF Enzyme Inhibition hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde mit der Pipette aufgenommen, mehrmals resuspendiert, um die Zellen möglichst zu vereinzeln und anschließend in ein 50ml-Falcon überführt. Um möglichst alle Zellen aus der Flasche zu lösen, erfolgte zusätzlich eine Spülung der Kulturflasche mit 5-10 ml Alpha MEM. Die Zellen wurden gezählt, gleichzeitig wurde die Zellsuspension zentrifugiert. Entsprechend seiner Größe wurde das entstandene Pellet in einem definierten Volumen Cryo-SFM aufgenommen und in Cryo-Röhrchen á 2 ml

Aliquots aufgeteilt (ca. 1-2 Millionen Zellen pro Aliquot). Die Cryo-Röhrchen wurden für eine Stunde bei -20°C und anschließend über Nacht bei -80°C im Gefrierschrank gelagert. Am nächsten Tag erfolgte die Überführung in den Stickstofftank.

2.2.1.5 Beschichten der Zellkulturflaschen und Auftauen von MesenCult-Zellen

Um den MesenCult-Zellen nach Kryokonservierung das Wachstum in den Zellkulturflaschen zu ermöglichen, mussten diese zunächst mit MesenCult™-SF Attachment Substrate beschichtet werden. Das lyophilisierte Attachment wurde in 5 ml sterilem Ampuwa aufgelöst und bei 37°C im Brutschrank für 30 - 60 min inkubiert. Die so entstandene Attachment-Lösung konnte nun zum Beschichten der Flaschen und Platten verwendet werden. Für das Coating einer 75cm^2 -Flasche verwendete man 5ml steriles PBS vermischt mit 185 μl der zuvor angesetzten Attachment-Lösung. Dies entspricht einer 1:28 Verdünnung. Für die Beschichtung von zwölf Wells in einer 24-Well-Platte vermengte man 207,5 μl mit 6042,5 μl sterilem PBS, das einer 1:30 - Verdünnung entspricht. Pro Well wurden 500 μl pipettiert. Nachdem das Attachment in die Flaschen bzw. Platten eingebracht wurde, verschloss man sie mit einem Parafilm, um Kontaminationen entgegenzuwirken. So versiegelt wurden die Flaschen/Platten mindestens eine Nacht (max. 20 Tage) im Kühlschrank gelagert. Zum benötigten Zeitpunkt wurden die Flaschen zunächst auf Raumtemperatur gebracht, was etwa 20 Minuten in Anspruch nahm. Die restliche Lösung wurde abgenommen, ohne die nun beschichtete Oberfläche zu berühren. Anschließend wusch man die Flaschen/Platten einmal vorsichtig mit sterilem, vorgewärmtem Ampuwa und trocknete sie für ca. 15 min bei $15\text{-}25^{\circ}\text{C}$ unter der Sterilbank. Danach waren die Flaschen/Platten für die Aufnahme der MesenCult-Zellen bereit.

Die Cryo-Röhrchen mit der sich darin befindlichen Zellsuspension wurden dem Stickstofftank entnommen und im Wasserband erwärmt. Analog zum im Punkt 2.2.1.2. beschriebenen Vorgehen, wurden die Zellen in die beschichteten 75 cm^2 - Zellkulturflaschen ausgesät und ca. 7-10 Tage kultiviert.

2.2.1.6 Ablösen und Aussäen der Zellen

Am Tag vor der ersten Transfektion wurden, analog zu Punkt 2.2.1.4, die Zellen gelöst und gezählt. Pro Well in einer 24-Well-Platte wurden 125.000 Zellen auf den beschichteten Platten ausgesät. Die Konfluenz betrug ca. 70-80 %.

2.2.1.7 Bestimmung der Konzentration der mRNA

Um die Konzentration der RNA mit Hilfe des Photometers Gene Quant zu bestimmen, wurden zunächst 70 μl RNase-freies Wasser in eine Küvette pipettiert und als Blindprobe zur Kalibrierung des Gerätes verwendet. In eine zweite Küvette gab man 68,6 μl RNase-freies Wasser und 1,4 μl der modifizierten mRNA (entspricht einer 1:50 Verdünnung). Aus drei Messproben ermittelte man den Mittelwert; multipliziert mit 50 ergab diese die Konzentration der RNA in $\mu\text{g/ml}$.

2.2.2 Transiente Transfektion

2.2.2.1 Lipofectamine2000

Zunächst wurde vorgewärmtes Opti-MEM Reduced Serum Medium in ein Eppendorf-Röhrchen vorgelegt und nachfolgend die auf Eis gekühlte mRNA und das auf Raumtemperatur erwärmte Lipofectamine2000 hinzugegeben. Die Transfektionslösung hatte ein Gesamtvolumen von 312,5 µl pro Well der 24-Well Platte, das sich wie folgt zusammensetzte: 1,25 µl Lipofectamine2000, ein Volumen, das 1,44 µg modifizierter GFP-markierter mRNA entspricht (abhängig von der Konzentration der verwendeten mRNA) und das restliche Volumen, aufgefüllt mit Opti-MEM Reduced Serum Medium, um das Gesamtvolumen zu erreichen. Die Transfektionslösung wurde für 20 Minuten unter der Sterilbank bei RT inkubiert. Anschließend nahm man das auf den tags zuvor ausgesäten Zellen befindliche Medium ab und ersetzte es durch 312,5 µl Transfektionslösung pro Well. Ab diesem Zeitpunkt verblieb die Lösung für vier Stunden auf den Zellen. Danach wurde das Transfektionsmedium abgenommen und durch 1250 µl MesenCult-Medium ersetzt. Stets wurde auch bei allen anderen Transfekten drauf geachtet, dass beim Mediumwechsel in den Wells die beschichtete Oberfläche nicht berührt wurde.

2.2.2.2 Lipofectamine3000

Es wurden zunächst 31,25 µl Opti-MEM und 1,875 µl Lipofectamine3000 in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben. In ein weiteres Eppendorf-Röhrchen pipettierte man wiederum ein definiertes Volumen an GFP-markierter mRNA, ebenfalls kongruent zu einer RNA-Menge von 1,44 µg und die entsprechende Menge an Opti-MEM, um auf ein Gesamtvolumen von 64,04 µl zu kommen. Je Eppendorf-Röhrchen entnahm man nun jeweils 31,25 µl und fügte sie in einem weiteren zusammen. Anschließend inkubierte man die Transfektionslösung für 5 Minuten unter der Sterilbank. Danach nahm man den 24-Well-Platten das Medium vom Vortag ab, gab pro Well vorsichtig 250 µl MesenCult-Medium auf die Zellen und fügte 62,5 µl der Transfektionslösung hinzu. Auch hier verblieb das

Transfektionsmedium für vier Stunden auf den Zellen. Um die Transfektion abzustoppen, gab man anschließend 937,5 µl MesenCult-Medium hinzu. Das Gesamtvolumen pro Well betrug nun 1250 µl.

2.2.2.3 TransIT

Für die Transfektion mit dem Transfektionsreagenz TransIT wurde ein Volumen verwendet, das 0,61 µg RNA pro Well entsprach, des Weiteren je 1,125 µl des Transfektionsreagenz selbst und der dazugehörigen Boost-Lösung. Das restliche Volumen, welches benötigt wurde, um auf ein Gesamtvolumen von 59,125 µl pro Well zu kommen, bestand aus vorgewärmtem Opti-MEM. Zunächst wurde dieses in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben. Es folgte die auf Eis gelagerte mRNA, anschließend wurden Boost und TransIT hinzupipettiert. Das Transfektionsmedium wurde für 2-5 Minuten unter der Sterilbank bei RT inkubiert. Danach wurde das MesenCult-Medium vom Vortag entfernt. Je Well legte man 575 µl frisches MesenCult-Medium vor und pipettierte 59,125 µl Transfektionsmedium hinzu. Nach einer Transfektionszeit von vier Stunden stoppte man den Vorgang durch die Zugabe von 616 µl MesenCult-Medium ab.

2.2.3 Vorbereitung auf die durchflusszytometrischen Messungen (FACS)

Da die Zellen nach erfolgreicher Transfektion zu den einzelnen Messzeit-punkten GFP exprimierten, empfahl es sich, die Vorbereitung für und auch die Durchflusszytometrie selbst in einem möglichst abgedunkeltem Raum, ohne das Licht der Sterilbank, durchzuführen. Zunächst wurde das Transfektions-MesenCult-Mediumgemisch abgenommen und die Zellen wurden mit ca. 500 – 1000 µl PBS gewaschen. Anschließend pipettierte man 200 µl MesenCult™-ACF Enzymatic Dissociation Solution pro Well und inkubierte für fünf bis acht Minuten im Brutschrank. Um die enzymatische Reaktion zu unterbrechen, gab man ebenfalls 200 µl MesenCult™-ACF Enzyme Inhibition hinzu. Das Well wurde mehrfach gespült; durch mehrmaliges Resuspendieren und das Durchlaufen der Zellsuspension durch ein Zellsieb (Falcon 40µm cell Strainer) wurden die Zellen

vereinzelt. Je Well wurde zusätzlich mit 1000 µl Alpha MEM nachgespült und diese ebenfalls durch das Zellsieb in das Falcon pipettiert. Um möglichst alle Zellen aus dem Zellsieb zu lösen, wurde abschließend auch dieses mit 5 ml Alpha MEM gespült. Die Wells von zwei Positiv- bzw. zwei Negativproben wurden gepoolt. Das Falcon wurde nun zentrifugiert, anschließend der Überstand abgenommen und in 250 - 300 µl Cytofix aufgenommen (die Menge an Cytofix wurde so gewählt, dass sich eine Konzentration von 100 – 400 Zellen pro µl ergab) und in Eppendorf-Röhrchen überführt.

2.2.4 Durchführung der FACS-Messungen

Das fluorescence activated cell sorting, kurz FACS, ist eine besondere Form der Durchflusszytometrie. Der Begriff, der eigentlich ein Markenname der Firma Becton Dickinson (BD) ist, hat sich als Synonym für diese Form der Durchflusszytometrie durchgesetzt. Mit Hilfe dieser können Zellen und andere Teilchen in Suspensionen bezüglich ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften untersucht werden. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, Zellen in Suspension zu vereinzeln und einen Laserstrahl passieren zu lassen, um eine Analyse des refraktierten Lichts durchzuführen.

Zur Anregung der Zellen wird ein Argon-Ionen-Laser verwendet, dessen Hauptspektrum im blauen Wellenbereich bei 488 nm liegt. Trifft der Laserstrahl die Zelle, kommt es zur Streuung des Laserlichts. In unseren Versuchen exprimieren die erfolgreich transfizierten Zellen durch die eingeschleuste mRNA zusätzlich noch GFP (engl. green fluorescent protein). Diese beiden physikalischen Parameter erfasste nun das optische System des Gerätes mit Hilfe von Photodetektoren. Sie werden in elektrische Signale transformiert und gegebenenfalls verstärkt. Nachdem die Zellen den Laserstrahl und die Detektoren durchlaufen haben, bewirkt ein Vibrationsmechanismus (hydrodynamische Fokussierung), dass sich der Strom in einzelne Tröpfchen mit je einer Zelle formiert. Die Zellen reihen sich wie an einer Perlenkette auf. Je nach Zellcharakteristika (z. B. GFP positiv oder nicht) der in dem Tropfen enthaltenen Zelle wird dieser mit einer negativen oder positiven Ladung versehen

und kann so anschließend über ein Spannungsfeld entsprechend abgelenkt, separiert und in das jeweilige Auffangröhrchen geleitet werden. Dies ermöglicht Aussagen über Größe, innere Zellstruktur (Granularität) sowie Fluoreszenzintensität der Einzelzelle, wobei die Fluoreszenz auch auf Eigenfluoreszenz der Zelle beruhen kann.

Zunächst wurde das Guava easyCyte™ Flow Zytometer durch ein Kalibrierungs- und Reinigungsprogramm vorbereitet. Die durchflusszyto-metrischen Messungen erfolgten mit der Software „InCyte“. Um eine ideale Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen, wurden folgende Grund-einstellungen bei der Darstellung der Diagramme genommen (Abbildung 4).

Erstes Diagramm:	vertikal:	SSC-H-log
	horizontal:	FSC-H-log
Zweites Diagramm:	vertikal:	GRN-H-log
	horizontal:	FSC-H-log
Drittes Diagramm:	vertikal:	500 Counts
	Horizontal:	GRN-H-Log

SSC-H-log steht für „side scatter high“ (seitliche Streuung) und bezieht sich meist auf die Zellgranularität im Inneren. FSC-H-log (forward scatter high, vorwärts gerichtete Streuung) liefert Rückschlüsse auf die Zellgröße. GRN-H-log steht für die Fluoreszenz. Counts bezeichnet die Anzahl der Zellen. „log“ steht für die logarithmische Darstellung. Die Zellproben wurden alle unmittelbar vor der Messung stark gevortext. Das FACS-Röhrchen mit der Negativ-Probe wurde um die Kapillare des Zytometers positioniert. Mittels Unterdruck wurde die Suspension über die Kapillare in die Messküvette des Geräts gedrückt. Unter „Adjust Settings“ wurden anschließend grundlegende Einstellungen vorgenommen (Eigenfluoreszenz, Zellgröße). Für Proben desselben Transfekts wurden die Einstellungen beibehalten, bei Proben für andere Transfektionsreagenzien neu adjustiert. Nach der Durchführung eines kurzen Reinigungsprogrammes konnte mit der Positiv-Probe fortgefahren werden.

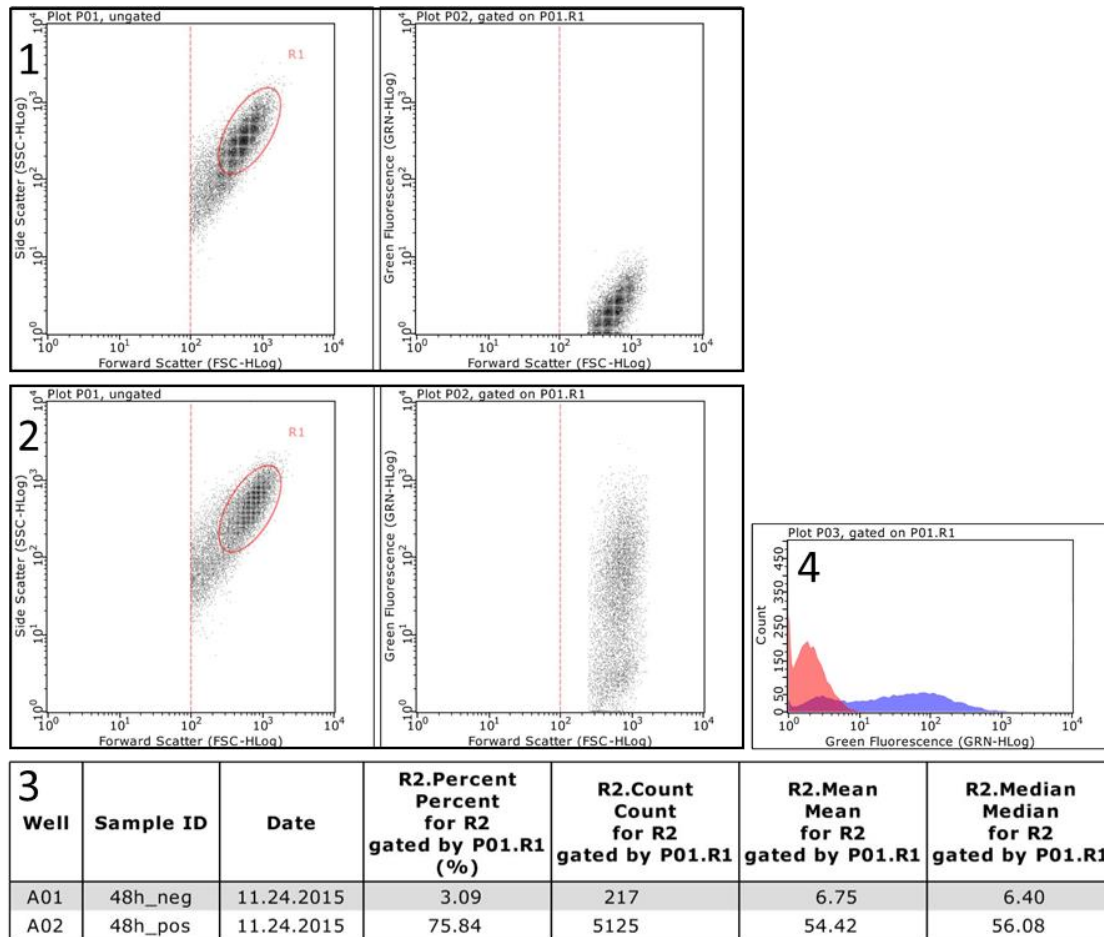


Abbildung 4 Datendarstellung von FACS Messungen mit der Software „InCyte“. 1 stellt die Negativprobe (Transfektion ohne Zugabe von mRNA), 2 die Positivprobe (Transfektion mit mRNA) dar. Plot 1 bezieht sich auf die Größe der gemessenen Teilchen, nur Teilchen innerhalb der roten Ellipse (Gate) werden als intakte Zellen angesehen und ausgewertet. Plot 2 stellt die Intensität der Fluoreszenz dar. Bei der Positivprobe zeigen sich Fluoreszenzen die über die Eigenfluoreszenz hinausgehen. In 3 werden die erhobenen Daten numerisch für die Positiv- und Negativprobe gegenübergestellt. Im Histogramm 4 wird die Anzahl der GFP-negativen und der GFP-positiven Zellen in Abhängigkeit von der Fluoreszenzintensität dargestellt.

2.2.5 Fixierung von transfizierten Zellen mittels Zinkformalin

Parallel zu den Zellen, die für die Durchflusszytometrie bestimmt waren, wurden unter gleichen Bedingungen ebenfalls Zellen ausgesät, transfiziert und simultan zu den FACS-Zeitpunkten mittels Zinkformalin für spätere mikroskopische Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahmen fixiert. Hierfür wurden die Wells mit den transfizierten Zellen unter nicht sterilen Bedingungen zunächst durch Zugabe von PBS gewaschen. Anschließend wurde Zinkformalin auf die Zellen pipettiert,

welches nach einer Einwirkdauer von ca. 20 Minuten wieder abgenommen wurde. Die Zellen wurden weitere zwei bis drei Mal mit PBS gewaschen. Abschließend beließ man das PBS auf den fixierten Zellen, verpackte sie lichtdicht und lagerte sie bis zur zeitnah stattfindenden Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskopie bei 7-8°C Grad im Kühlschrank.

2.2.6 Ablauf der Versuche

2.2.6.1 Vergleich der Transfektionseffizienzen vor und nach Kryokonservierung

Um die Transfektionseffizienzen erheben und untereinander vergleichen zu können, wurden für jeden Messzeitpunkt (nach 24, 43 und 48 Stunden) je zwölf Wells á 125.000 Zellen in einer 24-Wellplatte angelegt. Davon je vier Wells für jedes der drei Transfektionsreagenzien, die sich nochmals in je zwei Negativ- und zwei Positivproben unterteilten (Abbildung 5). Bei der Positivprobe wurde bei der Transfektion GFP-markierte, modifizierte mRNA verwendet. Bei der Negativprobe ersetzte man die mRNA durch RNase freies Wasser. Die Zellen der Negativprobe wurden somit auch den Transfektionsreagenzien ausgesetzt. Für die Fluoreszenzaufnahmen wurden MesenCult-Zellen auf identische Weise ausgesät und transfiziert. Insgesamt wurden also sechs 24-Well-Platten mit je zwölf ausgesäten Wells für den Versuch benötigt, je Transfekt eine Platte für die Durchflussszytometrie und je eine für die Fluoreszenzmikroskopie. Die verwendeten MesenCult-Zellen befanden sich zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung in Zellpassage 5. Wie unter den Abschnitten 2.3.1./2.3.2./2.3.3. beschrieben, wurden die Transfektionen für die drei Transfektionsreagenzien Lipofectamin2000, Lipofectamine3000 und TransIT durchgeführt. Nach der erfolgten Transfektion (gerechnet nach 4-stündiger Einwirkzeit und Zugabe von MesenCult-Medium) wurden die Zellen durchflussszytometrisch analysiert. Die beiden Positiv- bzw. Negativproben wurden gepolt.

Zeitgleich erfolgte die Fixierung der Zellen mit Zinkformalin für die Fluoreszenzmikroskopie. Der Versuchsablauf und die damit verbundene Durchflussszytometrie wurden für transfizierten MesenCult-Zellen sowohl vor als auch nach erfolgter Kryokonservierung durchgeführt und die Transfektions-

effizienzen verglichen. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte nur für MesenCult-Zellen nach Kryokonservierung. Mit den erhobenen Daten sollte zusätzlich auch das geeignetste Transfektionsreagenz für die folgenden Versuchsreihen ermittelt werden.

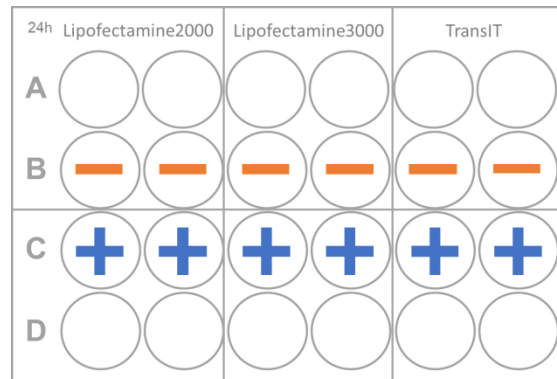


Abbildung 5 Darstellung einer ausgesäten 24-Well-Platte für die Auswertung der Transfektionseffizienzen der drei getesteten Transfektionsreagenzien nach 24 h, — steht für die Negativprobe (die Zellen werden mit den Transfektionsreagenzien behandelt, aber es wird RNase freies Wasser statt mRNA verwendet), + steht für die Positivprobe (die Zellen werden mit GFP-markierte mRNA transfiziert).

2.2.6.2 Vergleich der Transfektionseffizienzen in Zellpassage 5 und 6

Das Transfektionsreagenz Lipofectamine3000 erwies sich am effizientesten und die Zellen, die eine zwischenzeitliche Lagerung in Stickstoff erfahren hatten, konnten mit größerem Erfolg transfiziert werden. Der folgende Versuch sollte klären, ob sich Kieferperioistzellen nach erfolgter Kryokonservierung auch in der nachfolgenden Zellpassage erfolgreich transfizieren lassen. Es erfolgte ein identischer Versuchsablauf, wie unter 2.7.1. beschrieben, alleinig mit dem Transfekt Lipofectamine3000 als Transfektionsreagenz und MesenCult-Zellen der Passage 6. Hierzu wurden auf einer 24-Well-Platte erneut zwölf Wells á 125.0000 MesenCult-Zellen der Passage 6 ausgesät. Jeweils vier dieser Wells entsprachen den drei Messzeitpunkten, wovon wieder je zwei als Negativ- und je zwei als Positivproben fungierten (Abbildung 6). Die Transfektionseffizienzen nach 24, 43 und 48 Stunden wurden mittels Durchflusszytometrie ausgewertet. Auf Grund der sehr geringen Anzahl an GFP-positiven Zellen entschied man sich gegen zusätzliche Fluoreszenzaufnahmen.

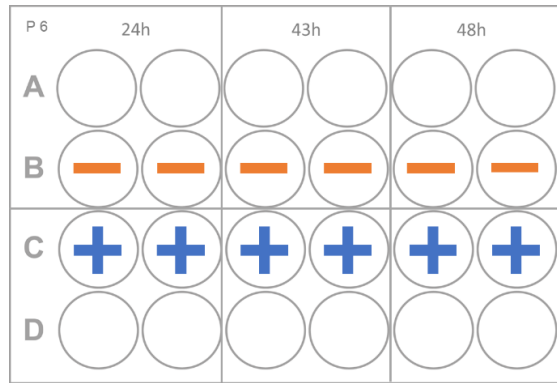


Abbildung 6 Darstellung der ausgesäten 24-Well-Platte für die Auswertung der Transfektionseffizienzen von MesenCult-Zellen in Zellpassage 6 für die Messzeitpunkte nach 24, 43 und 48 Stunden, - steht für die Negativprobe, das Transfektionsmedium enthält keine mRNA, + steht für die Positivprobe (es wird mittels GFP-markierte mRNA transfiziert)

2.2.6.3 Vergleich der Transfektionseffizienzen von einfach und mehrfach transfizierten MesenCult-Zellen

Mit der letzten Versuchsreihe wollte man eruieren, ob eine mehrmalige Transfektion der MesenCult-Zellen zu höheren Transfektionseffizienzen führen kann. Dazu wurden, analog zu den Versuchen davor, je 16 Wells zweier 24-Well-Platten á 125.000 Zellen ausgesät (Abbildung 7). Davon entsprachen je vier Wells den Messzeitpunkten nach 24, 48, 96 und 48 Stunden. Die Zellen befanden sich nach erfolgter Stickstofflagerung in Zellpassage 5.

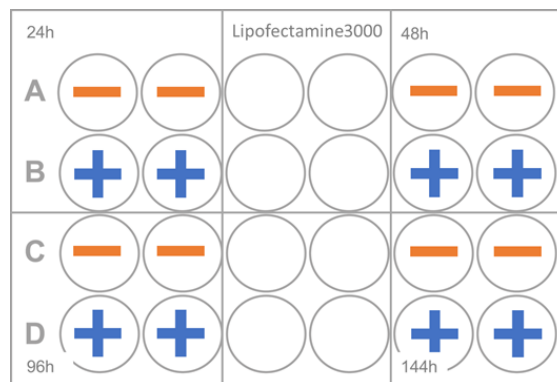


Abbildung 7 Darstellung der ausgesäten 24-Well-Platte für die Auswertung der Transfektionseffizienzen nach Einfach- und Mehrfachtransfektion von MesenCult-Zellen in Zellpassage 5 nach 24 , 48, 96 und 144 Stunden, die 96 Stunden Wells werden zwei Mal, die 144 Stunden Wells drei Mal transfiziert, - steht für die Negativprobe (das Transfektionsmedium enthält keine mRNA) , + steht für die Positivprobe (es wird mittels GFP-markierte mRNA transfiziert)

Am folgenden Tag wurden die Zellen, wie bereits unter 2.3.2 beschrieben, mit Lipofectamine3000 transfiziert. Nach 24 und 48 Stunden wurden erstmals durchflusszytometrische Analysen nach einmaliger Transfektion durchgeführt und simultan die MesenCult-Zellen für die Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie fixiert. Die verbleibenden acht Wells auf jeder Platte wurden nach 48 Stunden ein zweites Mal transfiziert. 96 Stunden nach der ersten und 48 Stunden nach der zweiten Transfektion erfolgte eine weitere FACS-Analyse und zeitgleich die Fixierung der Zellen. Die je vier restlichen Wells auf den Platten wurden ein drittes Mal, 96 Stunden nach der ersten und 48 Stunden nach der zweiten Transfektion, transfiziert und schließlich nach 144 Stunden durchflusszytometrisch ausgewertet und für die Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie fixiert. (Abbildung 8)

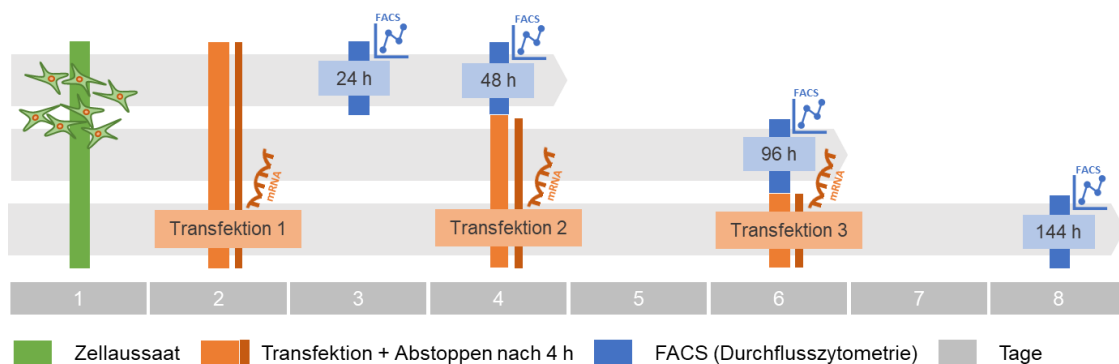


Abbildung 8 Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Mehrfachtransfektionen von MesenCult-Zellen nach Kryokonservierung in Zellpassage 5 mit Lipofectamine3000

3 Ergebnisse




3.1 Vergleich der Transfektionseffizienz vor Kryokonservierung

Zunächst transfizierte man MesenCult-Zellen der Zellpassage 5; direkt nach der Umstellung auf MesenCult-Medium und ohne, dass die Zellen zwischenzeitlich eine Lagerung in flüssigem Stickstoff erfahren hätten. Mittels je drei unterschiedlicher Transfektionsreagenzien (Lipofectamine2000, Lipofectamine3000 und TransIT) wurde GFP-markierte mRNA ins Zellinnere eingebracht. War der Vorgang erfolgreich, produzierte die Zelle ein fluoreszierendes Protein, das aus der eingeschleusten mRNA intrazellulär translatiert wurde. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte dieses fluoreszierende Protein und somit die prozentuale Anzahl an erfolgreich transfizierte Zellen detektiert werden. Parallel erfolgten Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen.

Insgesamt erfolgten für das Transfektionsreagenz Lipofectamine2000 vier Versuchsdurchläufe, von denen einer ein zeitgleich ablaufender Parallelansatz war (Tabelle 3). Für Lipofectamine3000 und TransIT erfolgten sechs Versuchsdurchläufe. Hiervon wurden jeweils zwei als Parallelansätze durchgeführt (Tabelle 4 und 5).





Wie aus Abbildung 9 ersichtlich, zeigte Lipofectamine2000 im Mittelwert von allen drei Transfekten die niedrigsten Effizienzen über alle drei Messzeitpunkte (24, 43, 48 Stunden) hinweg. Nach 24 Stunden lag die Anzahl der GFP-positiven MesenCult-Zellen mit durchschnittlich 4,65 % ($\pm 2,61$) noch am höchsten und fiel dann im Mittel über den 43-Stunden Wert mit 3,50 % ($\pm 1,98$) nach 48 Stunden auf ein Minimum von 3,45 % ($\pm 1,72$) ab. Ein einmalig-erreichter Höchstwert lag bei 8,20 %, 24 Stunden nach der Transfektion im Rahmen des dritten Versuchsdurchlaufs. Der niedrigste Wert wurde nach 43 Stunden bei einem der Parallelansätze verzeichnet. Nur 1% der transfizierten MesenCult-Zellen erwies sich hier als GFP-positiv. Die Standardabweichung bewegte sich auf Grund der geringen Streuung der Werte bei maximal $\pm 2,61$ % (Tabelle 3).

Lipofectamine2000	24h	43h	48h
Zellpassage 5			
Ø KK	2,8	1,0	2,2
	1,6	2,9	2,8
	6,0	3,6	2,4
	8,2	6,5	6,4
MW	4,65	3,5	3,45
STABWN	2,61	1,98	1,72

Tabelle 3 zeigt die prozentuale Anzahl an GFP-positiven Zellen bei der Verwendung des Transfekts Lipofectamine2000 24, 43 und 48 Stunden nach erfolgter Transfektion von MesenCult-Zellen für n=4.  steht für einen Parallelansatz,  und  stehen für unabhängige Einzelansätze. Ø KK steht für ohne Kryokonservierung, MW für den Mittelwert und STABWN für die Standardabweichung





Lipofectamine3000 zeigte im Durchschnitt deutlich höhere Effizienzwerte als Lipofectamine2000 (Abbildung 9). Ein einmaliger Spitzenwert lag bei 30 % GFP-positiven Zellen. Die Erfolgsquote bewegte sich im Mittelwert zwischen minimal 12,43 % ($\pm 12,43$) nach 48 Stunden und maximal 13,95 % ($\pm 12,69$) nach 43 Stunden. Nach 24 Stunden emittierten 13,47 % ($\pm 12,14$) der Zellen GFP. Die Werte der beiden Parallelansätze divergierten stark. Während sich im ersten die Werte zwischen 24,5 % und 30,0 % Prozent (höchster gemessener Einzelwert) bewegten, lagen die Werte des zweiten Parallelansatzes bei maximal 1,1 % und somit auch deutlich unter den Transfektionseffizienzen von Lipofectamine2000. Auch die Werte der beiden Einzelansätze waren weit gestreut. Beim ersten Einzelansatz ergaben sich Transfektionseffizienzen zwischen 14,0 % nach 48 Stunden und 22,4 % nach 43 Stunden. Im zweiten Einzelansatz lag die Maximalanzahl an GFP-positiven Zellen bei 3,4 % nach 43 Stunden. Erwartungsgemäß zeigte sich eine hohe Standardabweichung (Abbildung 9 und Tabelle 4).

Lipofectamine3000		24h	43h	48h
Zellpassage 5				
Ø KK		30,0	27,7	28,7
		24,5	29,2	28,8
		1,1	0,6	0,3
		0,5	0,4	0,8
		20,4	22,4	14,0
		2,5	3,4	2,0
	MW	13,17	13,95	12,43
Wertungsweise 1	STABWN	12,14	12,69	12,43

Tabelle 4 zeigt die prozentuale Anzahl an GFP-positiven Zellen bei der Verwendung des Transfekts Lipofectamine3000 24, 43 und 48 Stunden nach erfolgter Transfektion von MesenCult-Zellen ohne Kryokonservierung für n=6.  und  stehen für Parallelansätze,  und  stehen für Einzelansätze. Ø KK steht für ohne Kryokonservierung, MW für den Mittelwert und STABWN für die Standard-abweichung.

Das Transfekt TransIT erzielte im Rahmen der ersten Versuchsreihen ohne vorherige Stickstofflagerung von allen Transfekten die höchsten Effizienzen für alle 3 Messzeitpunkte (Abbildung 9). Im Durchschnitt steigerte sich die Anzahl an GFP-positiven Zellen von 25,25 % ($\pm 5,99$) nach 24 Stunden auf 26,50 % ($\pm 8,82$) nach 43 Stunden. Das Durchschnittsmaximum wurde nach 48 Stunden mit 29,42 % ($\pm 9,26$) leuchtenden Zellen erreicht (Tabelle 5). Sieht man sich die einzelnen Versuchsdurchläufe an, ergaben sich zu allen Messzeitpunkten Minimal- und Maximaleffizienzen. Die Effizienz bei Verwendung von TransIT erwies sich als etwa doppelt so hoch wie bei Lipofectamine3000 und um ein Vielfaches höher als bei Lipofectamine2000. Bei einem der durchgeführten Parallelansätze wurden sogar einmalig 43,4 % GFP-positive Zellen detektiert. Ein Einzelansatz zeigte mit Effizienzen zwischen 14,5 % nach 24 Stunden und 17,2 % nach 48 Stunden deutlich geringe Werte im Vergleich zu den restlichen Versuchsdurchläufen, die weniger weit gestreut waren. Die Standard-abweichung lag mit 5,96 % nach 24 Stunden, 8,82 % nach 43 Stunden und 9,26 % nach 48 Stunden über der von Lipofectamine2000 und unter der von Lipofectamine3000.

TransIT		24h	43h	48h
Zellpassage 5				
Ø KK		28,0	38,2	39,9
		27,3	29,2	43,4
		20,4	18,7	26,2
		29,3	21,0	22,8
		14,5	15,2	17,2
		32,0	36,7	27,0
	MW	25,25	26,5	29,42
Wertungsweise 1	STABWN	5,96	8,82	9,26

Tabelle 5 zeigt die prozentuale Anzahl an GFP-positiven Zellen bei der Verwendung des Transfekts TransIT 24, 43 und 48 Stunden nach erfolgter Transfektion von MesenCult-Zellen ohne Kryokonservierung für n=5.  und  stehen für Parallelansätze,  und  stehen für Einzelansätze. Ø KK steht für ohne Kryokonservierung, MW für den Mittelwert und STABWN für die Standardabweichung.

Statistische Signifikanz ergab sich für den Vergleich von Lipofectamine2000 mit TransIT. Hier war p zu jedem Messzeitpunkt < 0,05 (24h: p = 0,0002, 43h: p = 0,0015, und 48h: p = 0,0012). Bei der Gegenüberstellung von Lipofectamine2000 und Lipofectamine3000 ließ sich keine statistische Signifikanz nachweisen (24h: p = 0,1835, 43h: p = 0,1265, und 48h: p = 0,1689). TransIT zeigte nur für den 48 Stunden-Wert eine statistisch signifikant höhere Effizienz als Lipofectamine3000 (p= 0,0361), für die übrigen beiden Messzeitpunkte konnte keine signifikant höhere Anzahl an GFP-positiven Zellen gegenüber Lipofectamine3000 bestätigt werden (24h: p = 0,0843, 43h: p = 0,1031, Abbildung 9).

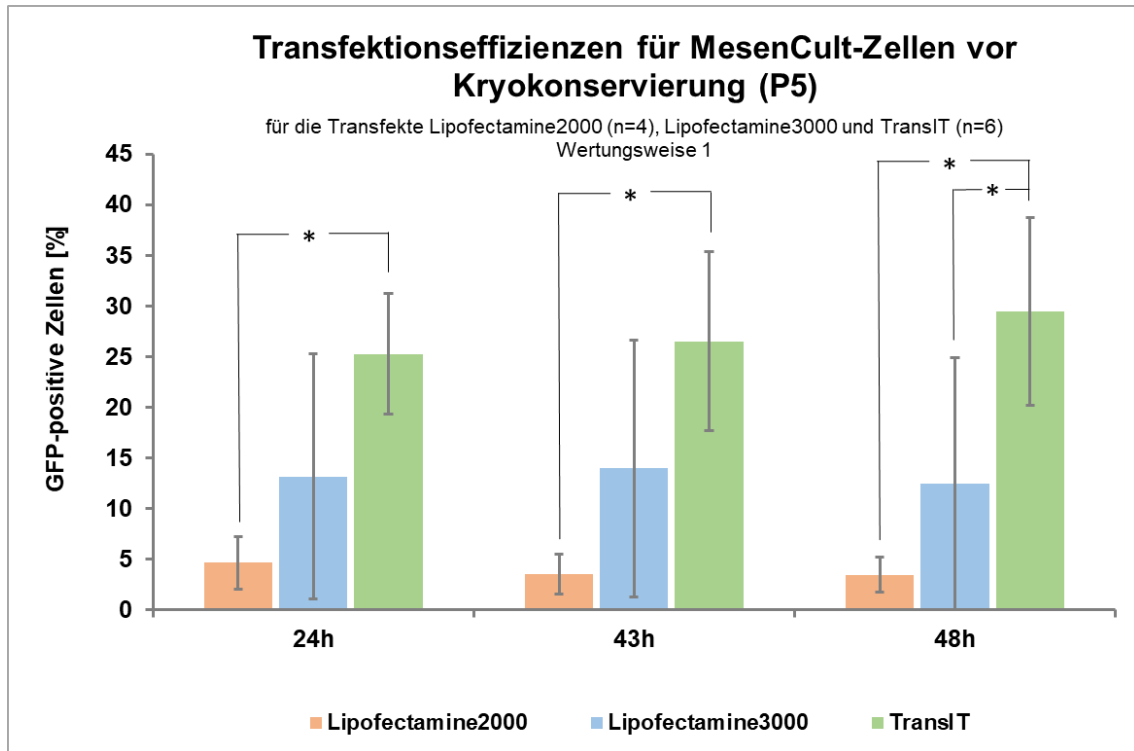


Abbildung 9 Das Diagramm zeigt die prozentuale und zeitabhängige Bestimmung der Anzahl an GFP-positiven MesenCult-Zellen mittels Durchflusszytometrie für die drei Transfekte Lipofectamine2000, Lipofectamine3000 und TransIT vor Kryokonservierung (Wertungsweise1). * markiert statistische Signifikanz zwischen zwei Messwerten. Für den Vergleich zu Lipofectamine3000 sowohl zu Lipofectamine2000 als auch zu TransIT ergab sich für keinen Messzeitpunkt statistische Signifikanz. Deutlich sind die überlegenen Transfektionseffizienzen von TransIT zu erkennen. Die Standardabweichung zeigt sich für alle Werte sehr hoch.

Auf Grund der hohen Streuung der einzelnen Effizienzwerte entschied man sich, die am stärksten abweichenden Ergebnisse der Durchflusszytometrie (die Ausreißer) nicht in eine zweite Wertungsweise mit einfließen zu lassen (Wertungsweise 2). Für Lipofectamine2000 wurden die Werte wie ursprünglich belassen (Tabelle 3), weil die Streuung der Werte gering war.

Für das Transfekt Lipofectamine3000 wurden die Werte des zweiten Parallel- und des zweiten Einzelansatzes nicht gewertet (Tabelle 6). Es verblieben somit drei Versuchsdurchläufe, von denen zwei parallel durchgeführt wurden. Wie zu erwarten, zeigten sich im Vergleich zur ersten Wertungsweise höhere Effizienzen mit deutlich geringeren Standardabweichungen. Bei Wertungsweise 1/n=6 betragen die Mittelwerte und die entsprechenden Standardabweichungen für 24 Stunden 13,17 % ($\pm 12,20$), für 43 Stunden 13,95 % ($\pm 12,69$) und für 48 Stunden

12,43 % ($\pm 12,44$). Bei Wertungsweise 2/n=3 beliefen sich die Mittelwerte/Standardabweichungen nach 24 Stunden auf 24,97 % ($\pm 3,93$), nach 43 Stunden auf 26,43 % ($\pm 2,92$) und nach 48 Stunden auf 23,83 % ($\pm 6,95$) (Tabelle 6). Die Verteilung der Maximal-/Minimaleffizienzen blieb gleich. Das Maximum wurde nach 43 Stunden detektiert, das Minimum nach 48 Stunden.

Lipofectamine3000		24h	43h	48h
Zellpassage 5				
Ø KK		30,0	27,7	28,7
		24,5	29,2	28,8
		20,4	22,4	14,0
	MW	24,97	26,43	23,83
Wertungsweise 2	STABWN	3,93	2,92	6,95

Tabelle 6 zeigt die prozentuale Anzahl an GFP-positiven Zellen bei der Verwendung des Transfekts Lipofectamine3000 24, 43 und 48 Stunden nach der erfolgten Transfektion für n=3 nach Entfernung der Ausreißer aus der Wertung (=Wertungsweise 2) steht für einen Parallelansatz, für einen Einzelansatz. Ø KK steht für ohne Kryokonservierung, MW für den Mittelwert und STABWN für die Standardabweichung.

Bei TransIT wurde ein Einzelansatz nicht gewertet. Auch hier führte der Ausschluss des Ausreißers zur Errechnung etwas höherer Effizienzmittelwerte verbunden mit einer geringeren Standardabweichung (Tabelle 7). Die Verteilung der Transfektionseffizienzen in Bezug auf die Messzeitpunkte änderte sich ebenfalls nicht. Die geringste Anzahl an Zellen, 27,4 % ($\pm 3,85$), leuchteten nach 24 Stunden. Nach 43 Stunden waren 28,76 % ($\pm 7,92$) der Zellen GFP-positiv. Das Maximum an GFP-positiven Zellen erzielte TransIT in der Wertungsweise 2 nach 48 Stunden mit 31,86 % ($\pm 8,19$).

Im direkten Vergleich der Wertungsweisen zeigte TransIT ein Plus von 3 % mehr GFP-positiven Zellen für den 48-Stundenwert bei Wertungsweise 2. Der 43-Stundenwert legte um 2,26 % zu. Beim der Gegenüberstellung der 24-Stundenwerte belief sich die Steigerung zur Wertungsweise 1 noch auf 1,9 %. Die Standardabweichung verringerte sich im Vergleich zur Wertungsweise 1 für alle Messzeitpunkte, am deutlichsten für den 24 Stundenwert von $\pm 5,69$ auf $\pm 3,85$.

TransIT		24h	43h	48h
Zellpassage 5				
Ø KK		28,0	38,2	39,9
		27,3	29,2	43,4
		20,4	18,7	26,3
		29,3	21,0	22,8
		32,0	36,7	27,0
	MW	27,4	28,76	31,86
Wertungsweise 2	STABWN	3,85	7,92	8,19

Tabelle 7 zeigt die prozentuale Anzahl an GFP-positiven Zellen bei der Verwendung des Transfekts TransIT 24, 43 und 48 Stunden nach der erfolgten Transfektion für $n=5$. nach Entfernung der Ausreißer aus der Wertung (=Wertungsweise 2). und stehen für Parallelansätze, steht für einen Einzelansatz. Ø KK steht für ohne Kryo-konservierung, MW für den Mittelwert und STABWN für die Standardabweichung.

Durch die veränderte Anzahl der Werte, die zur Berechnung des arithmetischen Mittels herangezogen wurden, änderte sich auch die Signifikanz der Ergebnisse. In der ersten Wertungsweise lieferte hauptsächlich TransIT im Vergleich zu Lipofectamine2000 statistisch signifikant höhere Effizienzen. Zwischen Lipofectamine2000 und Lipofectamine3000 ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen bzw. berechnen. Beim Vergleich von Lipofectamine3000 und TransIT zeigte sich lediglich im 48-Stundenwert ein statistische signifikanter Unterschied. In der zweiten Wertungsweise blieben die signifikant besseren Effizienzen von TransIT gegenüber Lipofectamine2000 erhalten. Für den 24-Stunden-Wert steigerte sich die Signifikanz um gut eine Dezimalstelle, für die 43- und 48-Stundenwerte verringerte sie sich leicht (24h: $p = 3,6376$, 43h: $p = 0,0022$, und 48h: $p = 0,0017$). Neu ist, dass für Lipofectamine3000 in der Gegenüberstellung zu Lipofectamine2000 sich nun ein zu allen Messzeiten signifikant höherer Transfektionserfolg aufzeigen ließ. (24h: $p = 0,0065$, 43h: $p = 0,0017$, und 48h: $p = 0,0486$). Beim Vergleich von TransIT und Lipofectamine3000 konnte allerdings in der zweiten Wertungsweise zu keiner der drei Messzeiten ein signifikanter Unterschied in der Transfektionseffizienz nachgewiesen werden. (Abbildung 10).

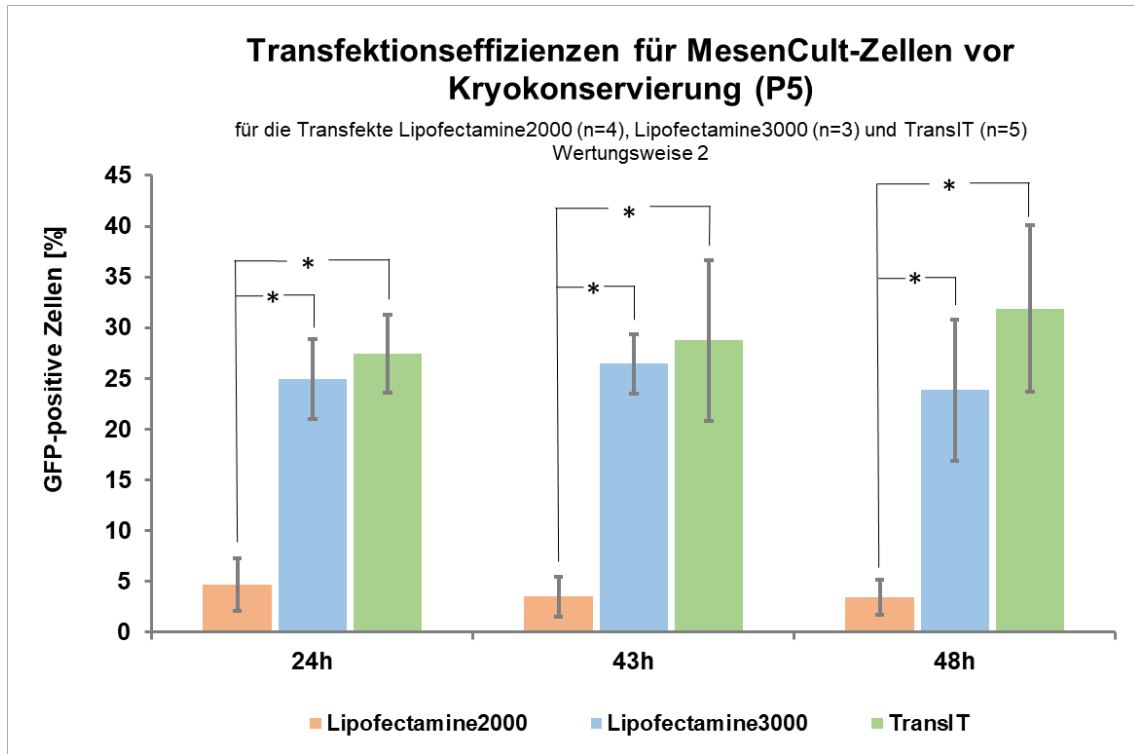


Abbildung 10 Das Diagramm zeigt die prozentuale und zeitabhängige Bestimmung der Anzahl an GFP-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie für die drei Transfekte Lipofectamine2000, Lipofectamine3000 und TransIT vor Kryokonservierung (Wertungsweise 2). * markiert die statistische Signifikanz zwischen zwei Messwerten. Nach dem Ausschließen der Ausreißer, zeigt sich lediglich beim Vergleich von Lipofectamine3000 zu TransIT keine statistische Signifikanz für alle untersuchten Messzeitpunkte.




3.2 Vergleich der Transfektionseffizienz nach Kryokonservierung

Frühere Testdurchläufe für mRNA-Transfektionen wiesen auf eine deutlich höhere Erfolgsquote von Transfektionen nach Kryokonservierung hin. Nun wurde systematisch geprüft, ob MesenCult-Zellen, die nach der FKS-Reduktion eine Lagerung in flüssigen Stickstoff erfahren hatten, tatsächlich im Vergleich zu Zellen ohne vorherige Kryokonservierung höhere und reproduzierbare Transfektionseffizienzen erreichten. Zudem wurde mit demselben Versuchsablauf auch das effizienteste Transfektionsreagenz für die transiente Transfektion von MesenCult-Zellen aus den drei getesteten Substanzen ermittelt. Alle Versuchsabläufe wurden in Zellpassage 5 durchgeführt.

Die MesenCult-Zellen, die zuvor einer Kryokonservierung unterzogen wurden, zeigten für alle Transfekte zu allen gemessenen Zeitpunkten deutlich höhere Transfektionseffizienzen.




Den größten positiven Einfluss auf die Transfektionseffizienz zeigte eine vorherige Stickstofflagerung auf das Transfekt Lipofectamine2000. Vor Kryokonservierung lag die durchschnittliche Effizienz für den 24 Stundenwert bei 4,65 % ($\pm 2,61$) und steigerte sich nach erfolgter Stickstofflagerung um mehr als das Sechsfache, auf 32,0 % ($\pm 4,82$) (Tabelle 3 und 8). Nach 43 Stunden sank der detektierte Wert für Lipofectamine2000 leicht auf 29,9 % ($\pm 5,74$). Im Vergleich dazu erzielte Lipofectamine2000 ohne vorherige Stickstofflagerung zu diesem Messzeitpunkt nur eine Effizienz von 3,5 % ($\pm 1,98$). Das Maximum für Lipofectamine2000 nach Kryokonservierung belief sich nach 48 Stunden auf 34,0 % ($\pm 3,43$) GFP-positive Zellen (Tabelle 8, Abbildung 11 und 12). Ohne vorherige Kryokonservierung ergab sich für Lipofectamine2000 zum gleichen Messzeitpunkt die niedrigste Effizienz mit 3,45 % ($\pm 1,72$). Insgesamt betrachtet, verbesserte sich die Anzahl der erfolgreich transfizierten Zellen für Lipofectamine2000 nach erfolgter Kryokonservierung um etwa das Achtfache (Abbildung 12). Auch die Verteilung der Maximal- und Minimalwerte auf die Messzeitpunkte änderte sich. Während man ohne vorherige Stickstofflagerung das Maximum nach 24 Stunden detektierte, wurde es mit Kryokonservierung nach 48 Stunden erzielt.

Lipofectamine2000	24h	43h	48h
Zellpassage 5			
+ KK	38,6	37,3	38,8
	27,2	29,1	32,4
	30,2	23,3	30,9
MW	32,0	29,9	34,03
STABWN	4,82	5,74	3,43

Tabelle 8 zeigt die prozentuale Anzahl an GFP-positiven Zellen bei der Verwendung des Transfekts Lipofectamine2000 24, 43 und 48 Stunden nach der erfolgten Transfektion für n=3 nach zwischenzeitlicher Lagerung im flüssigen Stickstoff. ,  und  steht für Einzelansätze. +KK steht für nach Kryokonservierung, MW für den Mittelwert und STABWN für die Standardabweichung.




Nach erfolgter Lagerung in Stickstoff lieferte Lipofectamine3000 die höchsten Transfektionsraten von allen Transfekten für jeden Messzeitpunkt. Stellte man die erreichten Effizienzen für Lipofectamine3000 bei Transfektion vor (Wertungsweise 2) und nach Kryokonservierung gegenüber, zeigte sich im Durchschnitt eine Steigerung der Effizienz um das 2,8-fache (Abbildung 12). Die höchste Anzahl an GFP-positiven-Zellen wurde mit durchschnittlich 75,6 % (\pm 9,58) nach 24 Stunden erreicht. Ein einmalig erreichter Maximalwert belief sich auf 86,8 % nach 24 Stunden. Ohne Kryokonservierung lag die erreichte Effizienz für den 24 Stundenwert ca. zwei Drittel niedriger, bei durchschnittlich 24,97 % (\pm 3,93). Danach sanken die Transfektionseffizienzen nach 43 Stunden auf einen Wert von 70,23 % (\pm 12,95) und nach 48 Stunden auf 66,83 % (\pm 12,19) ab (Tabelle 9, Abbildung 11 und 13). Ohne Stickstofflagerung lagen das Effizienzmaximum mit 26,43 % (\pm 2,92) nach 43 Stunden und das Minimum mit 23,83 % (\pm 6,95) nach 48 Stunden (Abbildung 12).

Lipofectamine3000	24h	43h	48h
Zellpassage 5			
+KK	76,6	76,0	73,7
	86,8	82,4	77,1
	63,4	52,3	49,7
MW	75,6	70,23	66,83
STABWN	9,58	12,95	12,19

Tabelle 9 zeigt die prozentuale Anzahl an GFP-positiven Zellen bei der Verwendung des Transfekts Lipofectamine3000 24, 43 und 48 Stunden nach der erfolgten Transfektion für n=3 nach zwischenzeitlicher Lagerung in Stickstoff. ,  und  steht für die Durchführung als Einzelansätze. +KK steht für nach Kryokonservierung, MW steht für den Mittelwert und STABWN steht für die Standardabweichung.

Auf die Erfolgsraten des Transfekts TransIT zeigte eine vorangegangene Kryokonservierung den geringsten positiven Effekt. Trotzdem konnten die Effizienzen im Vergleich zur ersten Versuchsreihe ohne Stickstofflagerung noch fast verdoppelt werden (Tabelle 10). Über die Messzeitpunkte hinweg stieg die Anzahl der GFP-positiven-Zellen leicht an (Abbildung 11). Für den 24 Stundenwert wurde eine Effizienz von 53,33 % ($\pm 10,34$) erzielt. Ohne vorherige Kryopreservation lag bei Wertungsweise 2 die Anzahl an GFP-positiven Zellen nach 24 Stunden bei 27,4 % ($\pm 3,85$). Zum 43-Stunden-Messzeitpunkt belief sich die Transfektionsquote mit Stickstofflagerung auf 55,7 % ($\pm 4,92$), ohne auf 28,76 % ($\pm 7,92$). Der Höchstwert für die kryokonservierten Zellen wurde nach 48 Stunden mit 57,9 % ($\pm 4,50$) erreicht. Zum selben Messzeitpunkt konnten ohne Stickstofflagerung nur 31,86 % ($\pm 8,19$) GFP-positive Zellen detektiert werden (Abbildung 12 und 13). Die Verteilung der Maximal- und Minimaleffizienzen auf die Messzeitpunkte blieb sowohl vor als auch nach Stickstofflagerung gleich.

TransIT	24h	43h	48h
Zellpassage 5			
+KK	39,0	49,2	51,8
	63,1	56,8	62,5
	57,9	61,1	59,4
MW	53,3	55,7	57,9
STABWN	10,36	4,92	4,50

Tabelle 10 zeigt die prozentuale Anzahl an GFP-positiven Zellen bei der Verwendung des Transfekts TransIT 24, 43 und 48 Stunden nach der erfolgten Transfektion für n=3 nach zwischenzeitlicher Lagerung in Stickstoff.  ,  und  steht für die Durchführung als Einzelansätze. +KK steht für nach Kryokonservierung, MW für den Mittelwert und STABWN für die Standardabweichung.

Nach erfolgter Stickstofflagerung zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Transfekten Lipofectamine2000 und Lipofectamine3000 für den 24-Stunden-Wert ($p = 0,011$) und für den 43-Stunden-Wert ($p = 0,0322$). Für den 48-Stunden-Wert ergab sich ganz knapp keine Signifikanz ($p = 0,0529$). Bei der Gegenüberstellung von Lipofectamine2000 und TransIT ergaben sich signifikante Unterschiede für den Vergleich der 43- ($p = 0,009$) und 48-Stunden-Werte ($p = 0,0049$). Keine statistische Signifikanz ließ sich für den 24-Stunden-Wert nachweisen ($p = 0,0825$). Die Gegenüberstellung von TransIT und

Lipofectamine3000 wies für keinen der drei Messzeitpunkte signifikant unterschiedliche Effizienzen auf (24h: $p = 0,0898$; 43h: $p = 0,2491$; 48h: $p = 0,4240$) (Abbildung 11).

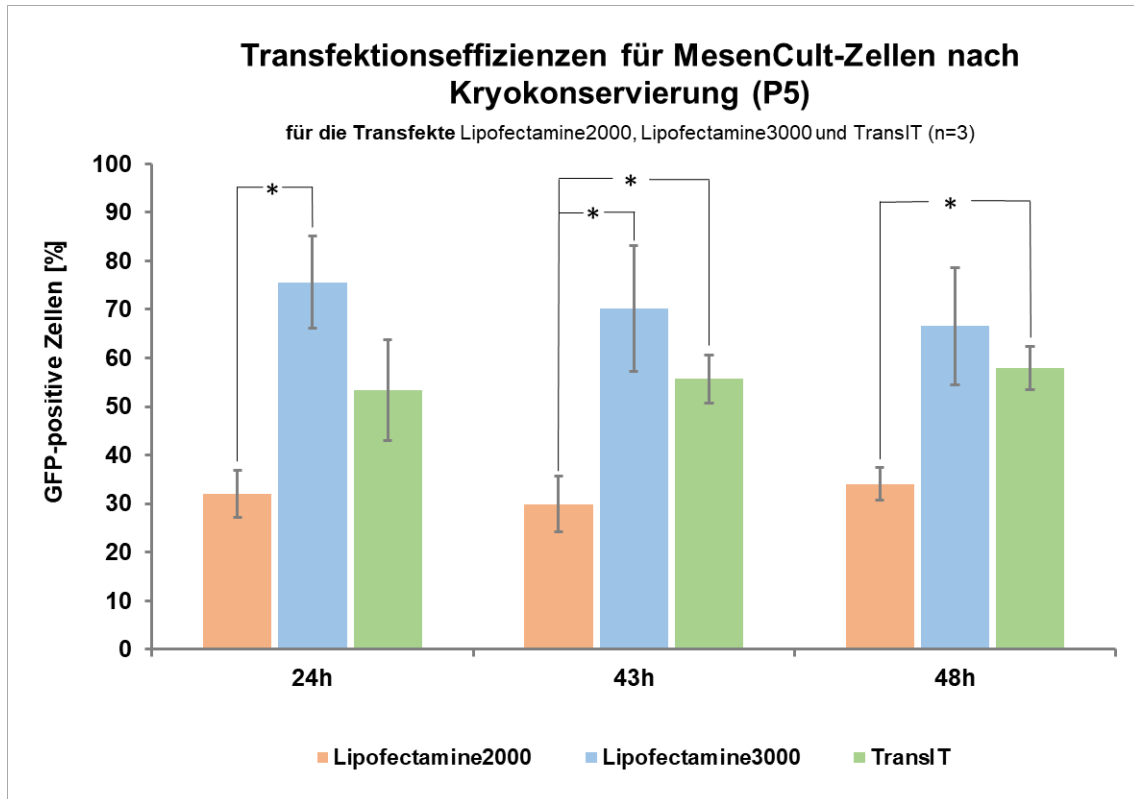


Abbildung 11 Das Diagramm zeigt die prozentuale und zeitabhängige Bestimmung der Anzahl an GFP-positiven MesenCult-Zellen der Zellpassage 5 mittels Durchfluss-zytometrie für die drei Transfekte Lipofectamine2000, Lipofectamine3000 und TransIT nach erfolgter Kryokonservierung.* markiert die statistische Signifikanz zwischen zwei Messwerten. Die Verwendung von Lipofectamine3000 liefert für alle 3 Messzeitpunkte die höchsten Transfektionseffizienzen.

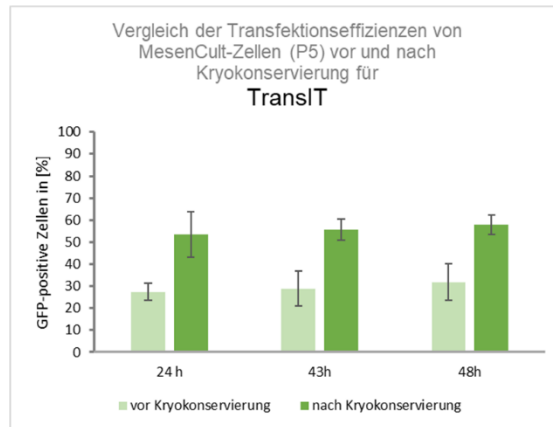
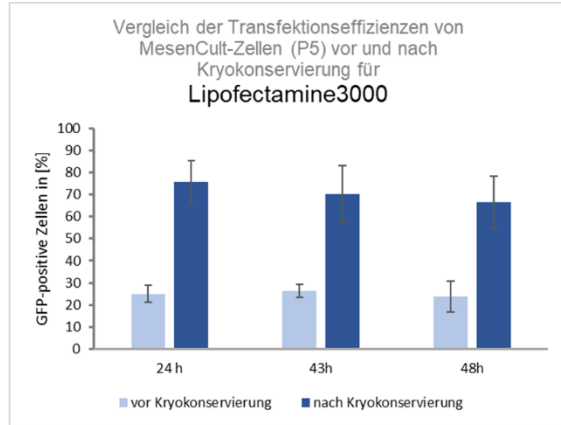
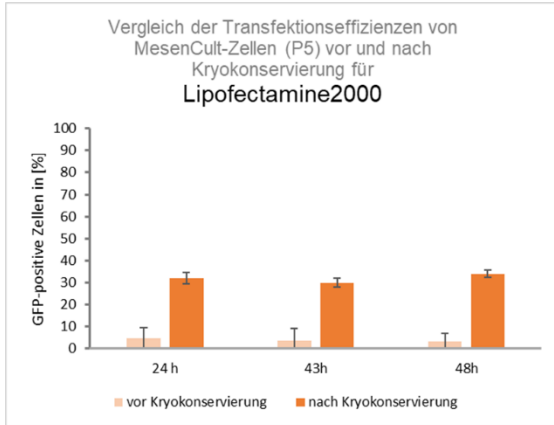
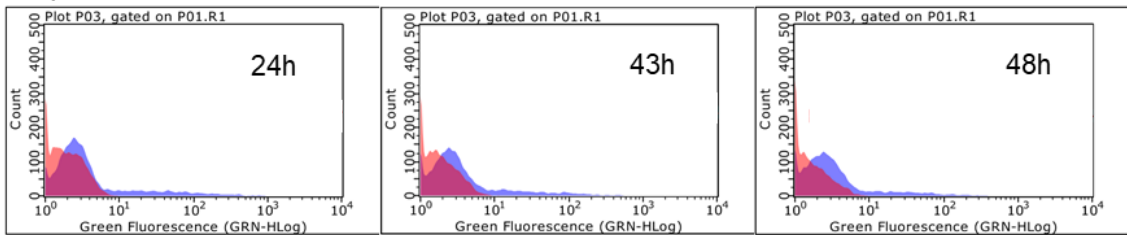
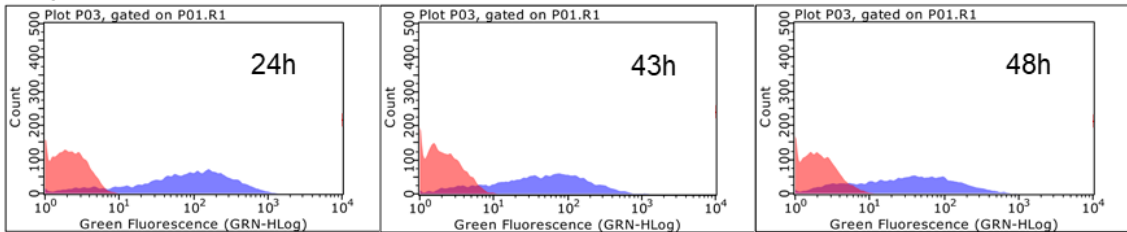


Abbildung 12 Prozentuale und zeitabhängige Darstellung der Transfektionseffizienzen vor und nach Kryokonservierung für die einzelnen Transfekte. Nach erfolgter Kryokonservierung zeigen sich für alle drei Transfekte zu allen drei Messzeitpunkten deutliche höhere Transfektionseffizienzen. Die Verwendung von Lipofectamine3000 liefert im Gesamtvergleich nach Kryokonservierung die höchste Anzahl an GFP-positiven Zellen.

Lipofectamine2000



Lipofectamine3000



TransIT

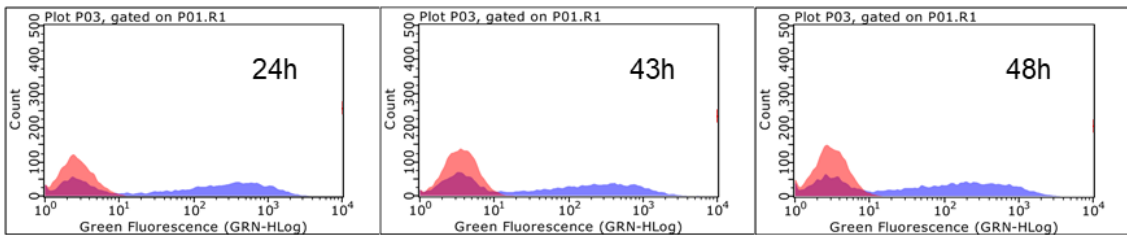


Abbildung 13 zeigt am Beispiel des 2. Versuchsdurchlaufs repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Messungen für Lipofectamine2000, Lipofectamine3000 und TransIT für die Messzeitpunkte 24, 43, und 48 Stunden für MesenCult-Zellen nach Kryokonservierung. ■ steht für GFP-positive Zellen, ■ steht für nicht transfizierte Zellen. Auf der x-Achse ist die Intensität der Fluoreszenz aufgetragen, auf der y-Achse die Anzahl der gezählten fluoreszierenden Zellen. Deutlich zeigt sich die sehr geringe Fluoreszenzintensität bei Lipofectamine2000. Bei Lipofectamine3000 und TransIT ist der Anteil der positiven Zellen deutlich höher.

Gleichzeitig wurden parallel zu den durchflusszytometrischen Analysen die Zellen des gleichen Versuchsansatzes mit Zinkformalin fixiert und Aufnahmen sowohl mit dem Durchlicht- als auch mit dem Fluoreszenzmikroskop gemacht. Durch die Kombination der Durchlicht- mit den Fluoreszenzaufnahmen konnte der prozentuale Anteil an GFP-positiven Zellen in Abhängigkeit von den einzelnen Transfektionsreagenzien bzgl. ihrer Effizienz visualisiert und verglichen werden (Abbildung 14). Die Aufnahmen untermauerten die Ergebnisse der Durchflusszytometrie. Lipofectamine3000 zeigte optisch, dicht gefolgt von TransIT, den höchsten Anteil an fluoreszierenden Zellen. Eine Gegenüberstellung der Fluoreszenzaufnahmen verdeutlicht die höheren Transfektionseffizienzen von Lipofectamine3000 gegenüber Lipofectamine2000.

und TransIT (Abbildung 15). Zudem erlaubten die Durchlicht-mikroskopischen Aufnahmen Rückschlüsse auf den Einfluss der Transfektionsreagenzien auf das Proliferationsverhalten der Zellen und somit auch auf ihre Toxizität. Lipofectamine2000 erzielte zwar die geringste Effektivität von allen Transfekten, zeigte aber den dichtesten Zellrasen und ließ somit auf die beste Zellverträglichkeit der drei Transfekte schließen. Im Gegensatz dazu wies TransIT bei mittleren Effizienzraten eine etwas niedrigere Zelldichte und viele apoptotische Zellen auf, was für eine höhere Zelltoxizität sprach. Lipofectamine3000 zeigte rein optisch, demnach semi-quantitativ bewertet, die höchste Anzahl an leuchtenden Zellen und einen ähnlich dichten Zellrasen wie Lipofectamine2000. Lipofectamine3000 schien somit hohe Transfektions-effizienzen und eine niedrige Zelltoxizität für MesenCult-Zellen zu vereinen (Abbildung 14).

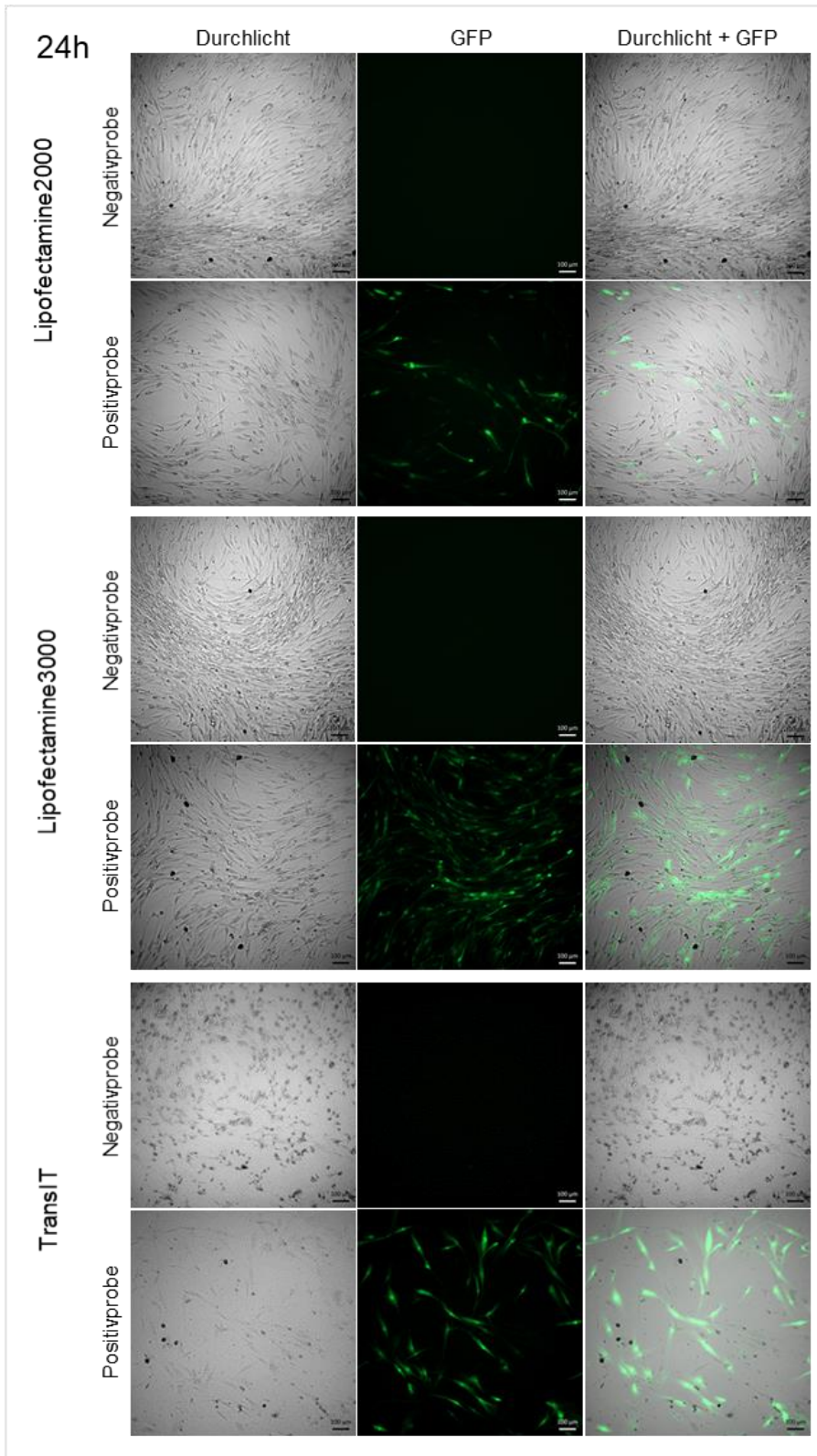


Abbildung 14 Mikroskopische (Fluoreszenz-) Aufnahmen von MesenCult-Zellen nach Kryokonservierung in Zellpassage 5, 24 Stunden nach erfolgter Transfektion für die Transfekte Lipofectamine2000, Lipofectamine3000 und TransIT. Bei Lipofectamine2000 zeigt sich deutlich die geringste Anzahl an leuchtenden Zellen und ein relativ dichter Zellrasen. Bei TransIT ist deutlich die verminderte Zellzahl erkennbar.

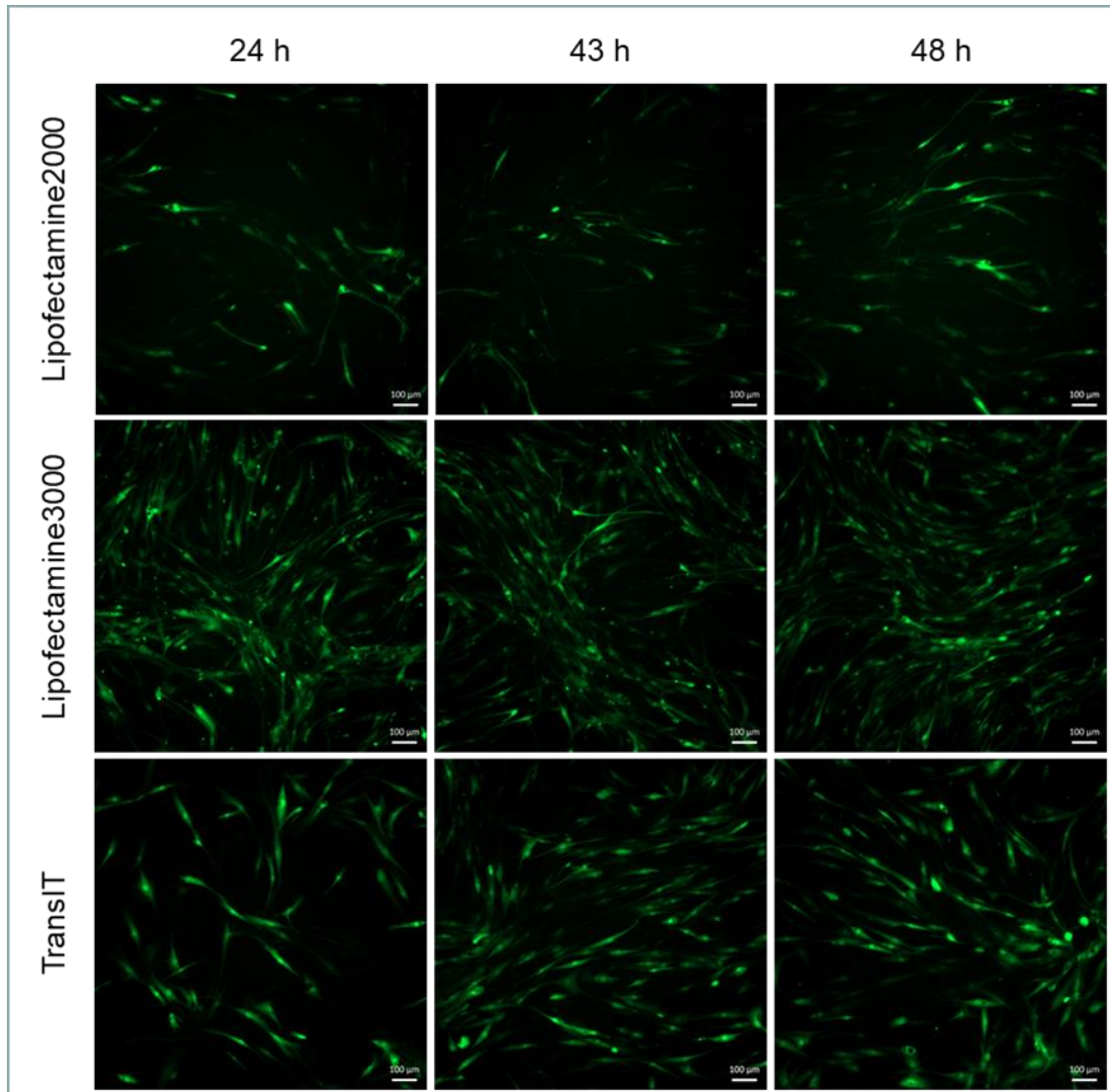


Abbildung 15 Fluoreszenzaufnahmen von MesenCult-Zellen nach erfolgreicher Transfektion in Zellpassage 5 nach Kryokonservierung. Für alle drei Transfekte; nach 24, 43 und 48 Stunden. Die grüne Fluoreszenz zeigt GFP-positive, erfolgreich mit mRNA transfizierte Zellen. Die Fotos bestätigen die Ergebnisse der Durchflusszytometrie und zeigen die höchsten Erfolgsquoten bei der Transfektion mit Lipofektamine3000 bei gleichzeitiger guter Zellverträglichkeit. Die Transfektion mit TransIT zeigt ebenfalls gute Transfektionsraten, aber eine schlechtere Zellverträglichkeit.




Während bei Zellen ohne vorherige Kryopreservation das Transfekt TransIT bei der Transfektion von MesenCult-Zellen mit GFP-markierter mRNA die besten Effizienzen lieferte, erbrachte nach der Kryokonservierung Lipofectamine3000 die höchsten Transfektionsquoten. Auch wenn sich der Unterschied zwischen TransIT und Lipofectamine3000 als nicht statistisch signifikant herausstellte, wurde für die folgenden Versuche Lipofectamine3000, auch auf Grund seiner besseren Zellverträglichkeit als Transfektionsreagenz verwendet.

3.3 Vergleich der Transfektionseffizienzen in Zellpassage 5 und 6

In einer weiteren Versuchsreihe sollte ermittelt werden, ob sich die Transfektionseffizienzen für Lipofectamine3000 auch für MesenCult-Zellen in einer höheren Passage (Zellpassage 6) nach Kryokonservierung reproduzieren lassen. Der Versuchsablauf erfolgte analog zu den Versuchen zuvor, allerdings ausschließlich mit Lipofectamine3000. Man verglich die Anzahl der GFP-positiven Zellen der Zellpassagen 5 (Wertungsweise 2) mit denen der Zellpassage 6 ebenfalls 24, 43 und 48 Stunden nach erfolgter Transfektion.

Die hohen Transfektionseffizienzen der Zellpassage 5 konnten in Zellpassage 6 nicht annähernd erreicht werden (Abbildung 16). Die Transfektionsquoten lagen für alle Messzeitpunkte um ein Vielfaches unter denen der Zellpassage 5. Die höchsten Effizienzen bei Transfektion von MesenCult-Zellen in Zellpassage 6 nach Kryokonservierung wurden nach 24 Stunden mit einem durchschnittlichen Wert von 11,3 % ($\pm 11,56$) erreicht. Dieser Wert lag um mehr als ein Sechsfaches niedriger als die Effizienz in der Zellpassage 5 zum selben Messzeitpunkt (75,6 % ($\pm 9,58$)). Nach 43 Stunden nahm der prozentuale Anteil transfizierter Zellen in Zellpassage 6 um mehr als die Hälfte auf 4,6 % ($\pm 3,38$) ab und nach weiteren 5 Stunden erwiesen sich nur noch 2,9 % ($\pm 1,90$) als GFP-positiv (Tabelle 11). Im Vergleich dazu ließen sich in Zellpassage 5 zum 43 Stunden-Messzeitpunkt 70,23 % ($\pm 12,95$) und nach 48 Stunden 66,83 % ($\pm 12,19$) der MesenCult-Zellen als GFP-positiv detektieren.

Lipofectamine3000	24h	43h	48h
Zellpassage 6			
+KK	27,6	1,6	1,5
	2,5	9,3	1,6
	3,7	2,9	5,6
MW	11,3	4,6	2,9
STABWN	11,56	3,38	1,90

Tabelle 11 zeigt die prozentuale Anzahl an GFP-positiven Zellen bei der Verwendung des Transfekts Lipofectamine3000 24, 43 und 48 Stunden nach der erfolgten Transfektion für n=3 nach zwischenzeitlicher Lagerung in Stickstoff bei MesenCult-Zellen der Passage 6.  ,  und  steht für die Durchführung als Einzelansatz. +KK steht für nach Kryokonservierung, MW für den Mittelwert und STABWN für die Standardabweichung.

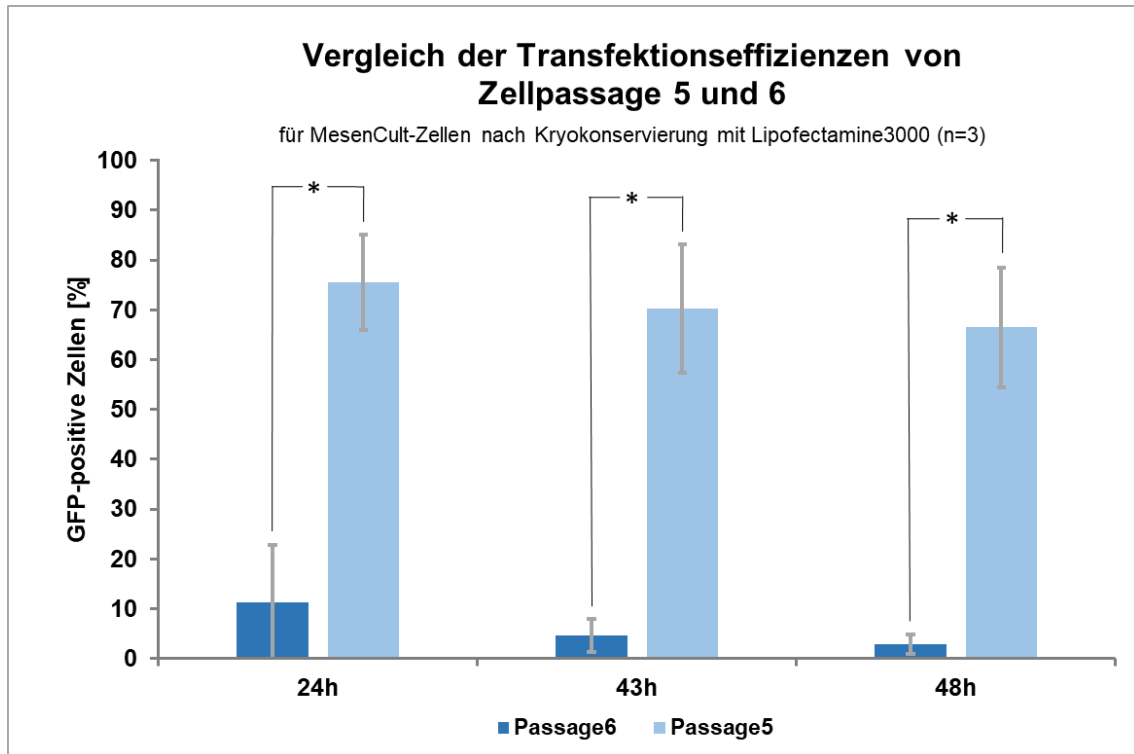


Abbildung 16 zeigt die prozentual und zeitabhängig bestimmten Transfektionseffizienzen für MesenCult-Zellen in Zellpassage 6 und Zellpassage 5, für beide nach Kryokonservierung unter Verwendung des Transfekts Lipofectamine3000. Deutlich erkennbar sind die um ein vielfaches höheren Erfolgsquoten in der Passage 5. Für alle drei Messzeitpunkte ergibt sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen beiden Zellpassagen [*].

Der Unterschied zu den Ergebnissen der Passage 5 erwies sich für alle Messzeitpunkte als hoch signifikant. Für die 24-Stunden-Werte belief sich der P-Wert auf 0,0042, für die 43-Stunden-Werte auf 0,0143 und für die 48-Stunden-Wert auf 0,0155 (Abbildung 16).

3.4 Vergleich der Transfektionseffizienzen von einfach und mehrfach transfizierten MesenCult-Zellen

In den vorangegangenen Versuchen wurden die MesenCult-Zellen einmal transfiziert und danach im Abstand von 24, 43 und 48 Stunden die resultierenden GFP-positiven Zellen ermittelt. In einem abschließenden Versuch wurden die Zellen zusätzlich nach 48 und nach 96 Stunden erneut transfiziert und der Einfluss auf die Transfektionseffizienz untersucht. Es erfolgte eine durchflusszytometrische Auswertung, sowie Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen.

Die Transfektionseffizienzen ließen sich durch mehrfaches Transfizieren von MesenCult-Zellen der Passage 5 mit Lipofectamine3000 als Transfekt nicht steigern. Nach 24 Stunden und einmaliger Transfektion betrug die Effizienz durchschnittlich 71,77 % ($\pm 1,87$). Das Maximum der Transfektionseffizienzen wurde nach 48 Stunden und einmalig erfolgter Transfektion mit 73,6 % ($\pm 4,01$) erzielt. Zum dritten Messzeitpunkt, 96 Stunden nach erster Transfektion und 48 Stunden nach der zweiten Transfektion, sank die Anzahl der GFP-positiven Zellen auf 62,53 % ($\pm 5,35$). Das Transfektionsminimum wurde nach 144 Stunden erreicht. Von den dreifach-transfizierten Zellen leuchteten nach 144 Stunden nur noch 56,83 % ($\pm 4,44$) (Tabelle 13, Abbildung 17).

Mehrfachtransfektion	24h	48h	96h	144h
mit Lipofectamine3000				
Zellpassage 5	T 1x	T 1x	T 2x	T 3x
+KK	70,2	69,2	55,1	53,3
	70,7	72,7	65	54,1
	74,4	78,9	67,5	63,1
MW	71,76	73,6	62,53	56,83
STABWN	1,87	4,01	5,35	4,44

Tabelle 12 zeigt die prozentuale Anzahl an GFP-positiven Zellen bei der Verwendung des Transfekts Lipofectamine3000 24 und 48 Stunden nach einmaliger Transfektion (T 1x), 96 Stunden nach zweimaliger Transfektion (T 2x) und 144 Stunden nach dreifacher Transfektion (T 3x) für n=3 bei MesenCult-Zellen der Passage 5. +KK steht für nach Kryokonservierung, MW für den Mittelwert und STABWN für die Standardabweichung.

Als statistisch signifikant erwiesen sich nur der 48-Stundenwert im Vergleich zum 96-Stunden-Wert ($p = 0,027$) und zum 144-Stunden-Wert ($p = 0,003$). (Abbildung 17).

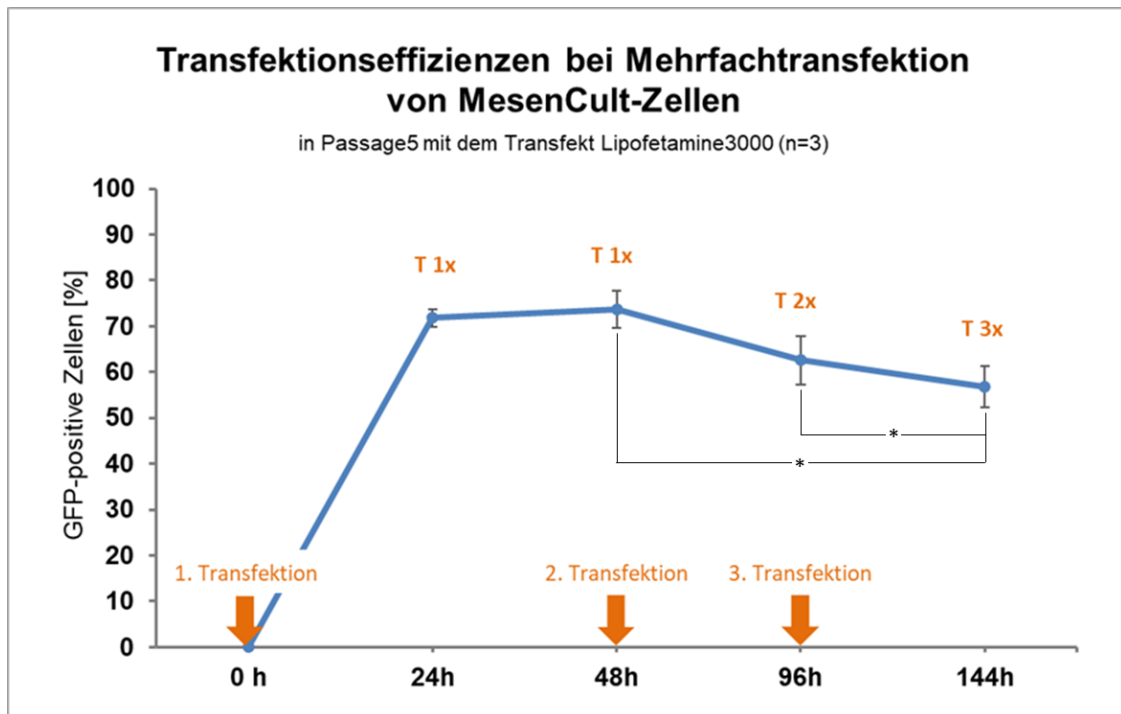


Abbildung 17 zeigt die prozentual- und zeitabhängig erreichten Transfektionseffizienzen bei MesenCult-Zellen unter Verwendung des Transfekts Lipofectamine3000 bei einmaliger Transfektion (T 1x) nach 24 und 48 Stunden, bei zweimaliger Transfektion (T 2x) nach 96 Stunden und dreimaliger Transfektion (T3x) nach 144 Stunden für $n=3$. * markiert die statistische Signifikanz zwischen zwei Messwerten

Die Ergebnisse von Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie stützen die Ergebnisse der FACS-Analysen. Die Aufnahme des einfach transfizierten 48-Stundenwerts leuchtete am stärksten. Im Durchlicht zeichnete sich zu diesem Messzeitpunkt auch der dichteste Zellrasen ab. Verglichen mit der Fluoreszenzaufnahme des ebenfalls einfach transfizierten 24-Stundenwertes schienen die Zellen sogar proliferiert zu haben. Für den 96-Stundenwert, bei dem die Zellen zwei Transfektionen durchlaufen haben, nahm die Fluoreszenz sichtbar ab. Im Durchlicht wurde eine verringerte Konfluenz sichtbar, kugelig geformte Zellen ließen auf apoptotische Vorgänge schließen. Die Fluoreszenzaufnahme des 144-Stundenwertes leuchtete am wenigstens, der Zellrasen war lückenhaft, es zeigten sich vermehrt apoptotische Zellen (Abbildung 18).

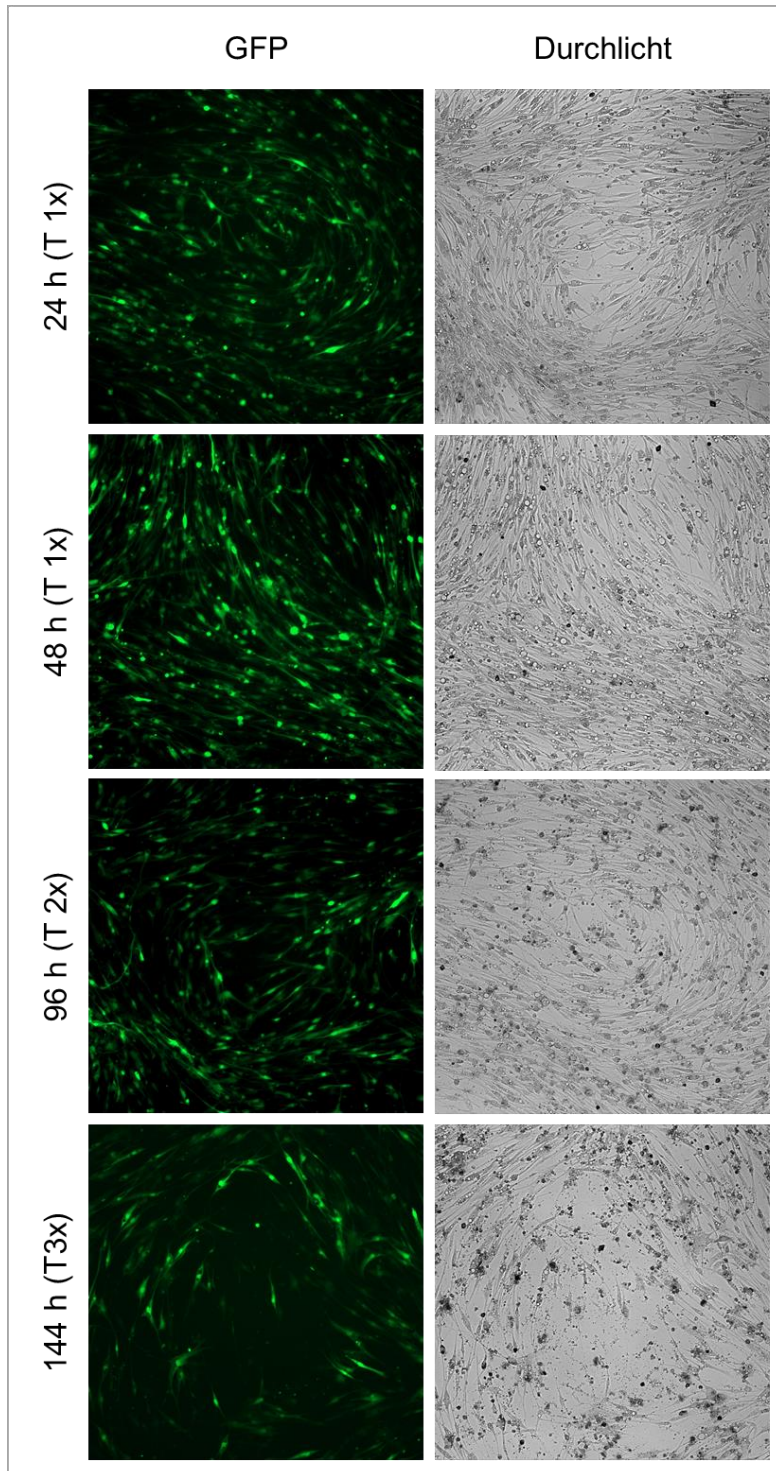


Abbildung 18 zeigt Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen von MesenCult-Zellen in Zellpassage 5 nach Kryokonservierung nach erfolgter Einfach- und Mehrfachtransfektion für die Messzeitpunkte 24, 48, 96 und 144 h. Für die 24 und 48 Stundenwerte, die einmal transfiziert wurden (T 1x), zeigt sich eine hohe Fluoreszenzintensität bei gleichzeitig dichtem Zellrasen. Erste apoptotische Zellen werden sichtbar. Beim zweifach transfiziertem (T 2x) 96 Stundenwert nimmt sowohl die Fluoreszenz auch die Dichte des Zellrasens ab. Der 144-Stunden-Wert weist nach drei erfolgten Transfektionen (T 3x) die geringste Anzahl an leuchtenden Zellen auf. Der Zellrasen ist weniger konfluent und viele Zellen wirken apoptotisch.

Zusammenfassend ließen sich im ersten Versuch MesenCult-Zellen mit deutlich höheren Erfolgsraten nach erfolgter Kryokonservierung transfizieren. Das Transfektionsreagenz Lipofectamine3000 erbrachte von allen drei getesteten Transfekten die höchsten Transfektionseffizienzen bei gleichzeitig guter Zellverträglichkeit. Die hohe Anzahl an GFP-positiven Zellen, die mit Lipofectamine3000 in Zellpassage 5 erzielt wurden, konnten bei sonst gleichen Bedingungen in Zellpassage 6 bei weitem nicht reproduziert werden. Mehrmaliges Transfizieren steigerte die Effizienzen nicht. Mit jeder weiteren Transfektion zeigte sich die zunehmende zytotoxische Wirkung in Form von apoptotischen Zellen und verminderter Zellzahl.

4 Diskussion

4.1 Geschichte der iPS-Zell-Forschung

Im Jahr 2006 gelang es erstmals aus Mausfibroblasten pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) zu generieren. [30] Ein Jahr später gelang auch die Generierung von menschlichen iPS-Zellen. [29] Diese pluripotenten Zellen eröffneten der regenerativen Medizin ungeahnte Möglichkeiten. Theoretisch bestand nun die Möglichkeit, einem Individuum beliebige Zellen zu entnehmen, sie zu iPS-Zellen umzuprogrammieren und in jede gewünschte Zellart differenzieren zu lassen. Für ihre Entdeckung, differenzierte Zellen in einen pluripotenten Status zu reprogrammieren, bekamen John Gurdon and Shinya Yamanaka 2012 den Nobelpreis verliehen.

Durch die retrovirale Reprogrammierungsmethode und die damit verbundene Gefahr der Integration von fremdem Erbgut war eine klinische Anwendung dieser iPS-Zellen jedoch ausgeschlossen. [66] Daher fokussierte man sich in den folgenden Jahren vor allem auf die Entwicklung integrationsfreier Methoden. Es gelang mittels nicht-integrativer Vektoren, iPS-Zellen zu generieren, doch ließ sich auch hier nicht immer eine Modifikation des Wirtsgenoms ausschließen. [67] Zhou und Kollegen entwickelten eine Methode, bei der somatische Zellen durch die Verwendung von rekombinanten Proteinen reprogrammiert werden können. Diese iPS-Zellen sind zwar frei von fremdem Erbgut, jedoch waren die Erfolgsquoten nicht überzeugend. [43]

Der Einsatz von microRNA bei der Generierung von iPS-Zellen wirkte effizienzsteigernd. Allerdings war der Versuch, iPS-Zellen durch den alleinigen Einsatz von microRNA zu generieren, nicht erfolgreich. [57] Zudem waren die Effizienzen bei nicht-viraler Transfektion sehr gering. [58]

Ein von Warren et al. entwickeltes integrationsfreies Vorgehen, das durch den Einsatz von synthetisch hergestellter mRNA iPS-Zellen erzeugt, scheint auf Grund der hohen Effizienzen sehr vielversprechend. Diese Methode erfordert allerdings tägliche Transfektionen über einen Zeitraum von mehreren Wochen und kann mit einer hohen Zytotoxizität verbunden sein. [53]

Seit der ersten gelungenen Generierung kamen bis dato iPS-Zellen vor allem bei der Simulation von Krankheitsmodellen, Entwicklung neuer Medikamente und Medikamentenstudien zum Einsatz; vor allem dort, wo Tierversuche an ihre Grenzen stoßen. [68] Großes Ziel der regenerativen Medizin war und ist der Einsatz von iPS-Zellen bei der Therapie diverser Erkrankungen in vivo und bei der Entwicklung von autologen Transplantaten. Diese personalisierte Therapie umgeht das Risiko einer Immunreaktion und die ethischen Kontroversen bei der Verwendung von Zellen aus Embryonen. [69]

Im Jahr 2014 erfolgte die erste klinische Anwendung von iPS-Zellen beim Menschen. Das Forscherteam um Mandai veröffentlichte 2017 eine Studie zur Therapie von Maculadegeneration mit iPS-Zellen. Nur acht Jahre nach der ersten erfolgreichen iPS-Zell Generierung untersuchten sie die Transplantation von retinalen Pigmentepithelzellen (RPE), die sie aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenziert hatten. Die an der Studie teilnehmenden Patienten litten an neovaskulärer altersbedingter Makuladegeneration. Die iPS-Zellen wurden aus Hautfibroblasten, die von zwei Patienten mit fortgeschrittener neovaskulärer Makuladegeneration stammten, reprogrammiert und zu RPE-Zellen differenziert. Die RPE-Zellen und die iPSCs, aus denen sie sich entwickelten, wurden zunächst umfangreichen Tests unterzogen.

Bei einem Patienten wurde die neovaskuläre Membran operativ entfernt. Es erfolgte die Transplantation des autologen, von iPS-Zellen abgeleiteten RPE-Zellblattes unter der Netzhaut. Ein Jahr nach der Operation war das transplantierte Blatt intakt, die bestmöglich korrigierte Sehschärfe hatte sich weder verbessert oder verschlechtert. Es bestand ein zystoides Makulaödem. [70] 2015 musste die Studie jedoch abgebrochen werden, da in den zu transplantierenden Zellen kanzerogene Veränderungen festgestellt worden waren. [71]

Trotz der verzeichneten Erfolge und auch erster klinischer Anwendungen von iPS-Zellen fehlt noch immer eine Methode, die eine sichere, integrationsfreie, xenofreie, leicht reproduzierbare und zellschonende Transfektion mit hohen Erfolgsquoten ermöglicht.

Im Jahr 2019 postulierten Doss und Sachinidis zehn Minimalkriterien, die iPS-Zellen und deren Produkte vor der klinischen Anwendung erfüllen müssen:

- (1) Sterilität, Freiheit von Mykoplasmen und anderen Endotoxinen
- (2) Expression von Pluripotenz-assoziierten Markern wie Nanog, Oct4, SOX2
- (3) Die exprimierten Differenzierungsmaker müssen für das therapeutische Zellprodukt eindeutig sein;
- (4) normaler Karyotyp, keine Chromosomenaberrationen
- (5) Keine undifferenzierten iPS-Zellen im endgültigen zellulären Arzneimittelprodukt und die Freiheit von Tumorigenität, bestätigt durch in-vivo-Teratom-Assays, Sequenzierung des gesamten Genoms und Exoms sowie Durchflusszytometrie
- (6) 100 % Reinheit des therapeutischen Zellprodukts ohne kontaminierende Zelltypen fremder Abstammungslinien
- (7) In-vivo-Daten zur Zelltransplantation, die die Haltbarkeit und funktionelle Verbesserung in präklinischen Modellen zeigen
- (8) nach Sequenzierung des gesamten Genoms oder des Exoms dürfen keine Restreprogrammierungstransgene und -vektoren nachgewiesen werden;
- (9) Genotypisierung bei autologen iPSCs und
- (10) Die Lebensfähigkeit muss sichergestellt sein. [72]

Die Versuche der vorliegenden Arbeit sollen eine Basis für weitere Versuche schaffen, die zur erfolgreichen Generierung von iPS-Zellen aus serumfrei kultivierten Kieferperiostzellen führen, die die von Doss und Sachinidis aufgestellten Bedingungen erfüllen. Hauptaugenmerk der durchgeführten Versuche war die Auswahl des geeignetsten Transfekts, mit dem ein besonders effizientes und schonendes Einbringen von mRNA in die MesenCult-Zellen gelingt. Die hier verwendete mRNA codiert für ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) und ermöglichte die erfolgreich transfizierten Zellen quantitativ zu erfassen.

4.2 Vergleich der Transfektionseffizienzen vor Kryokonservierung

Bei der Transfektion von in serumfreiem MesenCult-Medium kultivierten Kieferperiostzellen der Zellpassage 5 zeigten sich ohne vorherige Kryokonservierung für alle drei verwendeten Transfekte nur sehr enttäuschende Transfektionseffizienzen. Auf Grund der hohen Effizienzen, die von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans-Peter Wendel bei der Transfektion von menschlichen Endothelzellen erreicht wurden, hatte man sich deutlich höhere Zahlen an GFP-positiven Zellen erhofft. [65] Die Transfektionseffizienzen lagen im Durchschnitt für alle verwendeten Transfekte unter 30 %. Bei Lipofectamine3000 und TransIT ließ man Ausreißerwerte, bei denen man von einem Fehlversuch ausgehen kann, nicht in die zweite Kalkulation (Wertungsweise 2) einfließen. Die sehr niedrigen Werte eines Doppel- und eines Einzelansatzes von Lipofectamine3000, welche sich unter 3,5 % GFP-positiver Zellen bewegten, wurden aus der Wertung genommen. Bei TransIT wurde ein Einzelansatz, dessen Effizienzen ca. ein Drittel niedriger ausfielen als der Gesamtdurchschnitt, nicht berücksichtigt. Für Lipofectamine2000 wurden die Werte der ersten Wertungsweise belassen.

Lipofectamine2000 lag in Bezug auf die Anzahl an GFP-positiven Zellen mit einem einmaligen Maximaltransfektionswert von 8,2 % nach 24 Stunden und mit einem allgemeinen Durchschnittswert für alle drei Messzeiten von 3,87 % weit hinter den anderen beiden Transfekten. Lipofectamine3000 erreichte nach Elimination der Ausreißer im Mittel für alle drei Messzeitpunkte 25,08 %. Die höchste Transfektionseffizienz wurde nach 43 Stunden sowohl im Durchschnitt mit 26,43 % als auch mit dem einmaligen Maximalwert von 29,20 % erreicht. Beim direkten Vergleich der Transfekte konnten die höchsten Erfolgsquoten nach 48 Stunden mit TransIT erzielt werden. Hier zeigten sich im Durchschnitt 31,86 % der Zellen GFP-positiv. Ein einmaliger Höchstwert der Versuchsreihe von 43,4 %, wurde ebenfalls nach 48 Stunden mit TransIT erreicht. Bei der Gegenüberstellung von Lipofectamine2000 zu den anderen Transfekten ließ sich statistische Signifikanz aufzeigen, zwischen Lipofectamine3000 und TransIT nicht. Trotz der geänderten Wertungsweise lagen die ermittelten

Transfektionseffizienzen weiterhin unter den Erwartungen. Da sich der Versuchsablauf stark am Protokoll der Arbeitsgruppe von Prof. Avci-Adali orientierte, mit Lipofectamine2000 das gleiche Transfekt und die gleiche mRNA verwendet wurden, könnten die geringeren Effizienzen auf die Verwendung einer anderen Zellart zurückzuführen sein.

4.2.1 Einfluss der Zellart auf die Transfektionseffizienz

Bei chemischen Transfektionsmethoden, wie in dieser Arbeit, ist die Endozytose- und Proliferationsfähigkeit einer Zellart entscheidend für die Transfektionseffizienz. Diese wird von vielen Faktoren auf dem Weg des Lipidkomplexes von der Aufnahme in die Zelle bis zur Transkription beeinflusst. Über Endozytose gelangen die Lipidkomplexe (Transfektionsreagenz + mRNA) in das Zytosol der Zelle. Zellen mit hoher Endozytoseaktivität können demnach auch liposomale Transfektionsreagenzien besser aufnehmen. Danach müssen die Lipidkomplexe wieder aus den Endosomen ins Zytosol freigesetzt werden (endosomal escape). Um weiter in den Zellkern zu gelangen, muss sich während der Zellteilung die Zellkernmembran kurzzeitig auflösen. Wenig oder gar nicht proliferierende Zellen, wie z.B. Primär- oder Nervenzellen, oder auch solche mit geringer Endozytoseaktivität, wie z.B. T-Zellen, gelten daher als sehr schwer zu transfizieren. [73]

In einem 2017 veröffentlichtem Paper untersucht Figueroa anhand von CT26 Zellen (Colon-Karzinomzellen), die als schwer zu transfizieren gelten, und den leicht zu transfizierenden SK-BR3 Zellen (Mamma-Karzinomzellen) die Gründe für ihre unterschiedliche Transfizierbarkeit. Sie transfizierten mit den nicht-viralen Vektoren Gold-Polyamidoamine (AuPAMAM) und Polyethyleneimine (PEI). Es konnte gezeigt werden, dass CT26 Zellen Vektor/DNA-Komplexe in einer geringeren Rate aufnehmen konnten als SK-BR3 Zellen. Mögliche Gründe für die verminderte Internalisierung könnten die vermehrte Produktion von Muzinen auf der Oberfläche der CT26 Zellen sein. Diese Muzine fungieren als physikalische Barriere für die Aufnahme von Genen und Vektorkomplexen, da sie dazu neigen,

diese zu binden und zur Bildung von Aggregaten (Verbindung von Molekülen) führen. [74]

Aber nicht nur Hindernisse bei der Komplexaufnahme scheinen die Transfektionseffizienz zu beeinflussen. Auch die Freisetzung des Komplexes aus den Endosomen kann ein entscheidender Faktor sein. Der genaue Vorgang der Freisetzung aus Endosomen ist noch nicht geklärt. Gemäß der verbreiteten Protonenschwamm-Hypothese können bestimmte polykationische Reagenzien, besonders jene mit einer hohen Dichte an Aminogruppen auf ihrer Oberfläche (AUPAMAM und PEI), dazu führen, dass Protonen ins Endosom gepumpt werden. Diese führen zur osmotischen Schwellung und schließlich zur Lysis des Endosoms, verbunden mit der Freisetzung des Komplexes.

Chloroquine, ein Aminochinolin-Derivat und Malariamedikament, hat eine ähnliche Wirkungsweise. Wurden SK-BR3 Zellen zusätzlich mit Chloroquine transfiziert, steigerte sich die Transfektionseffizienz vor allem in Kombination mit PEI. Bei CT26 Zellen konnte keine Steigerung der Transfektionseffizienz durch Verwendung von Chloroquine erreicht werden, was darauf schließen lässt, dass der „endosomale escape“ einen geringeren Einfluss auf die Transfizierbarkeit von CT26 Zellen hat.

Abschließend wurde der Transport des Komplexes im Cytoplasma zum Nucleus untersucht. Es zeigte sich, dass im Vergleich zu SK-BR3 Zellen die Transportfähigkeit für Komplexe bei CT26 Zellen deutlich geringer ausfällt.

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Transfizierbarkeit von Zellen liegt in der Ausprägung der angeborenen immunologischen Abwehr. Abhängig davon können Zellen mehr oder weniger sensibel Fremdgene detektieren und Abwehrmechanismen einleiten. So konnte ausschließlich im Cytoplasma der CT26 Zellen eine große Akkumulation an Autophagosomen nachgewiesen werden. Autophagosomen dienen der Verwertung und dem Abbau von altem oder fremdem Zellmaterial. [75] Dies lässt auf eine höhere Sensibilität gegenüber exogenem Material der CT26 Zellen schließen und könnte eine weitere Erklärung für die verminderte Transfizierbarkeit sein. [76].

Das Periost, dem die in dieser Arbeit verwendeten Zellen entstammen, besteht neben Bindegewebe vor allem aus Knochenvorläuferzellen (Osteoprogenitorzellen). Sie gehören zur Entwicklungslinie der mesenchymalen Stammzellen und sind sehr proliferationsfreudig. [77] [78] Somit gehören sie theoretisch zur Gruppe der leicht zu transfizierenden Zellen. Daher lassen sich die niedrigen Transfektionseffizienzen nicht auf die verwendete Zellart zurückführen, was auch in den folgenden Versuchen belegt werden konnte. Im Rahmen der Literaturrecherche zeigte sich, dass keine weiteren Studien außerhalb unseres Labors zur Generierung von iPS-Zellen auf Basis von Kieferperiostzellen veröffentlicht wurden. Auch zur Transfektion von Kieferperiostzellen gibt es keine Publikationen, welche einen Vergleich der Effizienzen erlaubt hätten.

4.3 Vergleich der Transfektionseffizienzen nach Kryokonservierung

Einen zum Teil großen Einfluss auf die Transfizierbarkeit der in dieser Arbeit verwendeten Kieferperiostzellen hatte eine zwischenzeitliche Lagerung in Stickstoff. Die MesenCult-Zellen, die nicht direkt für Transfektionen verwendet werden konnten, wurden eingefroren, zu einem späteren Zeitpunkt wieder aufgetaut und der Versuchsablauf erneut vollzogen. Alle drei Transfektionsreagenzien zeigten nun überraschenderweise deutlich höhere Effizienzen.

Beim Einsatz von Lipofectamine2000 steigerte sich die Anzahl an GFP-positiven Zellen am m, von durchschnittlichen unter 4 % vor auf über 30 % nach Kryokonservierung. Im arithmetische Mittel zeigte sich die Effizienz nach 48 Stunden mit 34,03 % am höchsten.

Lipofectamine3000 zeigte von allen Transfekten die höchsten Transfektionseffizienzen nach Stickstofflagerung. Das Maximum wurde nach 24 Stunden detektiert, 75,6 % der Zellen emittierten GFP. Nach 48 Stunden erreichte der Wert für Lipofectamine3000 sein Minimum mit 66,83 %.

Das Transfekt TransIT verzeichnete die geringste Steigerung der Effizienzen im Vergleich zu den erreichten Werten ohne vorherige Kryokonservierung. Zum 24-Stundenmesswert erwiesen sich mit 53,3 % die geringste Anzahl an Zellen als GFP-positiv. Das größte Quantum an erfolgreich transfizierten Zellen wurde mit

57,9 % nach 48 Stunden erreicht. Die Unterschiede zwischen den Transfekten Lipofectamine3000 und TransIT erwiesen sich zu keinem Messzeitpunkt als statistisch signifikant.

Die Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie untermauerte die durchflusszytometrischen Analysen. Lipofectamine2000 zeigte von allen Transfekten die geringste Anzahl an GFP-positiven-Zellen, allerdings den dichtesten Zellrasen. Dies ließ auf eine geringe Zytotoxizität des Transfekts schließen. TransIT zeigte optisch bewertet stark leuchtende MesenCult-Zellen, allerdings verbunden mit der höchsten Zellsterblichkeit im Vergleich zu den anderen Transfekten. Es war kaum noch ein intakter Zellverband zu erkennen, die Zellzahl zeigte sich optisch allgemein niedrig und viele Zelle wiesen eine kugelige Form auf, was auf apoptotische Vorgänge hindeutet. Die Fluoreszenzaufnahmen des Transfekts Lipofectamine3000 leuchteten am stärksten bei gleichzeitig dichtem Zellrasen. Da Lipofectamine3000 sowohl bezüglich der Transfektionseffizienzen als auch der Zellverträglichkeit überzeugte, wurde es in folgenden Versuchen als alleiniges Transfektionsreagenz verwendet.

Den einzigen Unterschied, den die Kieferperiostzellen zu denen der ersten Versuchsreihe mit den deutlich geringeren Transfektionseffizienzen erfahren hatten, bestand in der vorherigen Stickstofflagerung. Es stellte sich die Frage, ob und wie die Kryokonservierung einen positiven Effekt auf die Transfizierbarkeit der in MesenCult-Medium gezüchteten Kieferperiostzellen hatte.

4.3.1 Einfluss von Kryokonservierung auf die Transfektionseffizienz

Seit Jahrzehnten ist das Einfrieren und die Langzeitlagerung von Zellen eine gängige Methode in der Zellkultur.

Unter „Gefrieren“ versteht man den Übergang eines Stoffes vom flüssigen in den festen Aggregatzustand. Dieser Vorgang beginnt bei lebendem Gewebe bei -2 bis -15 °C. Bei Temperaturen von -130°C kommen die meisten zellulären Prozesse zum Erliegen, da unter diesen Bedingungen nicht mehr ausreichend Energie für Stoffwechselprozesse vorhanden ist. Ab Temperaturen von -196°C finden keine metabolischen Vorgänge mehr statt, die Lebensfähigkeit bleibt

jedoch erhalten. Die Lagerung in Stickstoff, der unter normalen Bedingungen bei Temperaturen von -196°C von einem gasförmigen in den flüssigen Zustand übergeht, ist eine gute Möglichkeit Zellen zu konservieren und für spätere Zeitpunkte verfügbar zu machen [79].

Zellen einzufrieren ist allerdings auch ein kritischer Vorgang, denn dabei entstehen sowohl intra- als auch extrazellulär Eiskristalle, die die Membran der Zelle schädigen können. Osmotische Vorgänge können zum „Austrocknen“ der Zelle führen. Auch der Prozess des Auftauens kann Zellschäden bewirken. Hier schmelzen zuerst die extrazellulären Kristalle und erzeugen ein osmotisches Gefälle, dass zur Zellschwellung bis hin zum Platzen der Zelle führen kann. [80]. Durch die Zugabe von Gefrierschutzmitteln, beispielsweise Glycerin oder Dimethylsulfoxid (DMSO) können diese negativen Auswirkungen auf die Zelle weitestgehend eliminiert werden. Allerdings haben auch diese Gefrierschutzmittel zytotoxische Effekte und können nur in definierten Dosen verwendet werden. [81]

Die Kieferperiostzellen, die nach erfolgter Stickstofflagerung für weitere Versuche zum Einsatz kamen, wurden mit Hilfe von DMSO eingefroren. Obwohl die Kryokonservierung sowohl in der Grundlagen- als auch in der klinischen Forschung seit mehreren Jahrzehnten sehr verbreitet ist, hat auch sie ihre Grenzen. Auch wenn Zellen bei niedrigen Temperaturen von -196°C keinen Metabolismus mehr aufweisen, kommt es trotzdem zu Veränderungen auf genetischer Ebene, die zu einer Schädigung von Zellaktivität und -struktur führen können. Des Weiteren entstehen beim Gefrier-, als auch beim Auftauvorgang freie Radikale, die eine nicht zu vernachlässigende Rolle bei auftretenden Zellschäden spielen [82].

Gäbe es keine Begrenzung für die Zugabe von Gefrierschutzmitteln, könnte man Zellen ohne Abstriche erhalten. Gängige Mittel wie DMSO sind allerdings mit steigender Konzentration zunehmend zytotoxisch. [83]. So wurde beobachtet, dass DMSO eine Methylierung der DNA und Veränderungen an Histonen bewirkt, die zu einem Rückgang der Überlebensrate und einer verminderten Fähigkeit zur Differenzierung der Zellen führen. Dies erschwert zusätzlich die klinische Anwendung solcher Zellen. Darüber hinaus schädigt DMSO die

Zellmembran. [83] Dies könnte ein Erklärungsversuch für die erhöhten Transfektionsraten sein. Eine geschädigte Membran erleichtert den Transport von Transfektionsreagenzien durch die Zellmembran. Vorstellbar wäre auch, dass sich nach der Stickstofflagerung Teile der zelleigenen Abwehrmechanismen dahingehend veränderten, dass diese beispielsweise das Eindringen und das Umsetzen fremder mRNA zu Proteinen eher gestatten. Dabei handelt es sich aber um reine Spekulation. Literatur, die von positiven Effekten der Kryokonservierung auf die Zelltransfektion berichtet, konnte im Zuge der Recherche nicht ausfindig gemacht werden. Die Frage, warum sich MesenCult-Zellen nach erfolgter Stickstofflagerung erfolgreicher transfizieren lassen, erlaubt lediglich, wie oben erwähnt, ein paar Hypothesen.

4.3.2 Einfluss von Transfektionsreagenz und Transfektionsmethode auf Effizienz und Zellviabilität

Da es sich bei Lipofectamine3000 um den Nachfolger von Lipofectamine2000 handelt, wäre vielleicht die Testung eines anderen Transfekts anstelle von Lipofectamine2000 ebenfalls interessant gewesen.

In einem im Jahr 2018 veröffentlichten Paper wurden fünf gebräuchliche Transfektionsreagenzien (Lipofectamine3000, Lipofectamine2000, Fugene, RNAiMAX und Lipofectin) zum einen hinsichtlich ihrer Transfektionseffizienzen und zum anderen in Bezug auf ihre Zelltoxizität untersucht (Abbildung 19). Es wurden zehn unterschiedliche Zelltypen, hauptsächlich Krebszellen, mit sog. single-stranded Oligonukleotiden (SOOs) transfiziert. Die Autoren konnten belegen, dass eine hohe Transfektionseffizienz meist auch mit einer erhöhten Zytotoxizität einhergeht. So zeigte Lipofectamine3000 in ihrer Studie, wie auch in dieser Arbeit die größten Erfolgsquoten bei den meisten transfizierten Zelltypen. Gleichzeitig wies das Transfekt zusammen mit Lipofectamine2000 im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, die höchste Zellsterblichkeit auf. Gute Ergebnisse konnten sie für das Transfektionsreagenz RNAiMAX nachweisen, dass bei hohen Transfektionsraten eine im Verhältnis geringe Toxizität von ca. 20 % zeigte. [84]

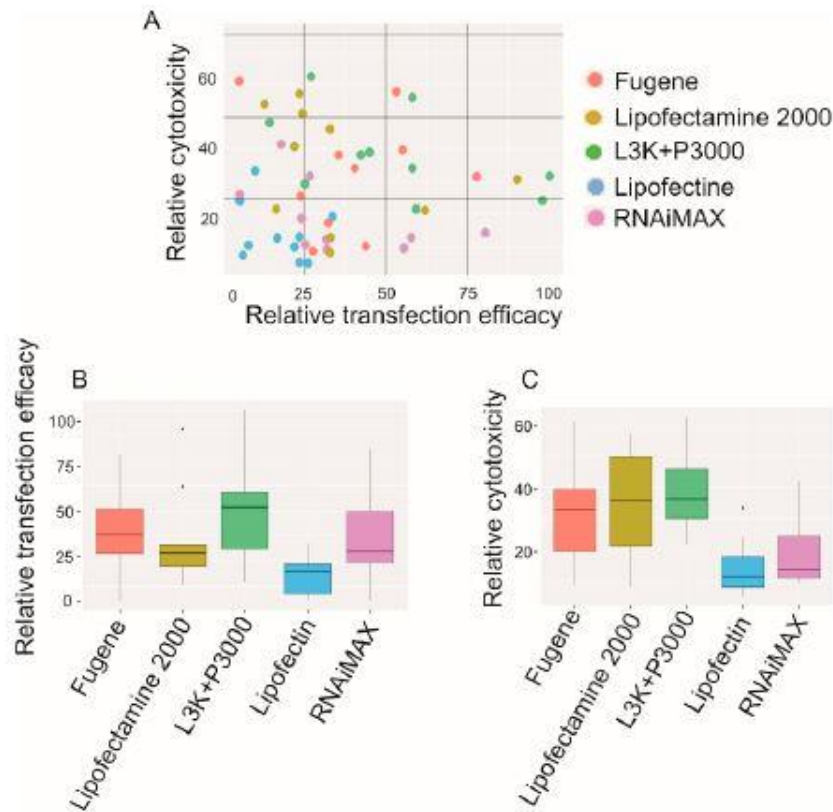


Abbildung 19 Relative Transfektionseffizienz und relative Zytotoxizität nach der Anwendung verschiedener Transfektionsreagenzien. (A) die Transfektionseffizienz in Relation zur Zelltoxizität; (B) Relative Transfektionseffizienz in Abhängigkeit von dem verwendeten Transfektionsreagenz, gezeigt als Median; (C) Relative Zytotoxizität in Abhängigkeit von dem verwendeten Transfektionsreagenz, als Median gezeigt. L3K: Lipofectamine3000 Transfektionsreagenz, P3000: Enhancer Reagenz. [84]

Auch ein Vergleich mit anderen Transfektionsmethoden wäre aufschlussreich gewesen. In einer Studie zur Generierung von iPS-Zellen verglichen Manzini und Co-autoren das Transfekt Lipofectamine3000 mit drei weiteren integrationsfreien Methoden zur Reprogrammierung (Senai-virus-, elektroporations- und chemiebasiert). Es zeigte sich, dass die Sendai-Virus-Methode die höchste Reprogrammierungsrate erzielte. Es folgten elektroporationsbasierte Methoden. Bei diesen und der Senai-Virus-Methode lag die Transfektionseffizienz knapp unter 0,002 %. Mit Lipofectamin3000 gelang der der Forschergruppe die Generierung von iPS-Zellen in nur 0,001 % der Fälle. Zudem funktionierte die Generierung nur aus den von einem der drei Patienten stammenden

Ausgangszellen. [66] Die hohen Transfektionseffizienzen von 1,4 %, die Warren erzielt hatte, konnte Manzini nicht reproduzieren. [53]

Die Anzahl an verfügbaren Transfekten und Transfektionsmethoden ist sehr groß. Ein Vergleich mehrerer Transfekte in Kombination mit unterschiedlichen Transfektionsmethoden hätte den Rahmen dieser Arbeit bei weitem überschritten.

4.3.3 Einfluss von mRNA-Menge, mRNA-Modifikationen und Interferon-inhibitoren auf Effizienz und Zellviabilität

Die in unseren Versuchen verwendete mRNA wurde freundlicherweise vom Forschungslabor für Thorax-, Herz-, und Gefäßchirurgie unter der Leitung von Prof. Dr. Hans-Peter Wendel zur Verfügung gestellt. Diese besticht durch hohe Stabilität und Immuntoleranz. Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Avci-Adali transfizierte mit der gleichen mRNA menschliche Endothelzellen und erreichte Transfektionseffizienzen von bis zu 87 %. In Studien aus diesem Labor wurden die Erfolgsraten der Transfektionen in Abhängigkeit vom Transfektionsreagenz, der Zellpassage und der Häufigkeit der Transfektionen anhand der Anzahl der GFP-positiven Zellen gemessen. [65] Die zur Verfügung gestellte mRNA wurde mit Phosphatase behandelt. Dies stabilisiert die mRNA, reduziert die Immunantwort der Zellen auf das exogene Genmaterial und markiert den Start der Translation. Der Austausch von Basen durch modifizierte Ribonukleoside erfolgte nicht. Während der Transfektion wurde auch kein Inhibitor verwendet, der eine Interferon-vermittelte Immunantwort unterdrückt. Avci-Adali und ihr Team konnten bei der Transfektion von unterschiedlichen Zelltypen zeigen, dass bereits geringe mRNA Mengen von 0,5 µg ausreichten, um sehr gute Transfektionseffizienzen von bis zu 86 % zu erreichen. Sie konnten zudem demonstrieren, dass eine Erhöhung der mRNA-Menge die Protein-Expression nicht oder nur geringfügig verbessert. [65]

Auch auf der Website des Herstellers der verwendeten Transfektreihe Lipofectamine (ThermoFischer) wird gezeigt, dass für Lipofectamine3000 unabhängig von der eingesetzten mRNA-Menge, hohe Transfektionseffizienzen

erzielt werden können (Abbildung 20). [85] Basierend auf diesen Ergebnissen sah man davon ab, unterschiedliche Mengen bei der Transfektion auszutesten. Alle Versuche erfolgten stets mit der gleichen Menge von 144 µg GFP-markierter mRNA.

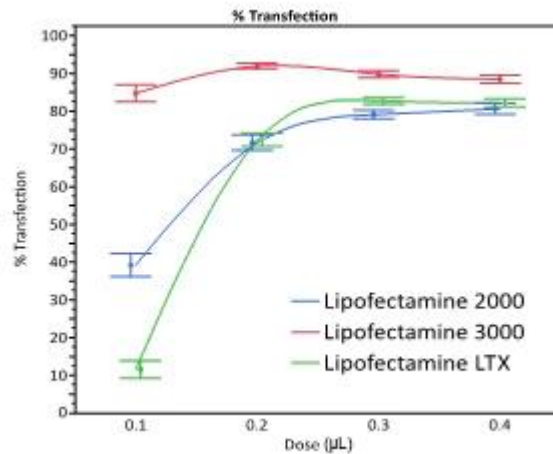


Abbildung 20 Effizienzen bei der Transfektion von Leber-Zellen in einem 96-Well-Format mit den angegebenen Dosen eines (GFP)-exprimierenden Vektors. Die Analyse wurde 48 Stunden nach der Transfektion unter Verwendung von Durchflusszytometrie durchgeführt, um die prozentuale Transfektionseffizienz und die Intensität der GFP-Expression zu bestimmen. Lipofectamine3000- lieferte dosisunabhängig eine höhere Effizienz und Proteinexpression als das Lipofectamine2000 und Lipofectamine LTX-Reagenz von Invitrogen.[82]

Ebenfalls von Belang, vor allem in Bezug auf die Zytotoxizität, ist der Grad der Modifizierung der verwendeten mRNA.

Schon 2012 zeigten Studien, dass unmodifizierte mRNA eine starke Immunantwort, verbunden mit hoher Zellsterblichkeit, auslöst. Bei Verwendung einer modifizierten mRNA lag die Letalität deutlich geringer. [55] Die verwendete mRNA musste dahingehend verändert werden, den Abwehr-mechanismus der zu transfizierenden Zelle auf ein Minimum zu reduzieren. Gleichzeitig sollte ihre Stabilität erhöht werden.

Das Team um Warren synthetisierte mit Hilfe der in-vitro Transkription (einer Methode zur DNA-abhängigen Herstellung von RNA) eine mRNA, bei der durch die Verwendung von Phosphatasen Triphosphate am 5'-Ende der mRNA entfernt und am 5'-Guanin-Ende angehängt wurden, um das Anhängen der 5'-Capp-Struktur zu ermöglichen. Das Capping ist für die Stabilität und für das

Ausschleusen der mRNA aus dem Zellkern wichtig. Dem 3'-Ende wurde ein Poly-A-Schwanz (mehrere Adeninnukleotide) angefügt, was stabilisierend wirkt und den Translationsprozess in der Zielzelle erleichtert. So konnte nicht nur die Transfektionseffizienz gesteigert, sondern auch die Halbwertszeit der mRNA erhöht werden. Um mögliche Abwehrmechanismen auf eingeschleustes Genmaterial noch weiter zu reduzieren, synthetisierten sie mRNAs, die zusätzlich modifizierte Ribonukleosidbasen enthielten.

Wurde Cytidin durch 5-Methylcytidin oder Pseudouridin durch Uridin vollständig substituiert, erhöhten sich Überlebensrate und die ektopische Proteinexpression deutlich. [53] Auch konnte gezeigt werden, dass Acetylierung von Cytidin in der mRNA die Translationseffizienz fördert. [86]

Trotz aller Modifizierungen besitzt exogen eingebrachte mRNA immer noch immunologisches Potenzial. Erkennt die Zelle die eingebrachte mRNA als fremd, kommt es zur Produktion von Typ I Interferonen und weiteren pro-inflammatorischen Zytokinen, die letztendlich die Immunantwort einleiten und eine weitere Translation der mRNA verhindern. [87] Größte Erfolge in Bezug auf Zellüberlebensrate und Proteinexpression konnten somit durch die Kombination der Basenaustausch-Methoden bei gleichzeitiger Verwendung des Interferon-Inhibitors B18R erzielt werden [53]. Er fungiert als Immunsuppressor und unterbricht den Interferon-Signalweg, indem er Typ 1 Interferone bindet und neutralisiert. [88]

Die Arbeitsgruppe um Michel ging in einem 2019 veröffentlichten Paper noch einen Schritt weiter und synthetisierte mRNA mit direkt für B18R codierenden Abschnitten. Sie konnten aufzeigen, dass die Interferon-vermittelte Immunantwort unterdrückt werden konnte und dass Zellen, die mit der B18R- mRNA transfiziert wurden, eine deutliche höhere Überlebensrate aufzeigten als nach Transfektion mit mRNA ohne die B18R-Sequenz. [89]

Von Interesse wäre gewesen, inwieweit sich die Transfektionseffizienzen in der vorliegenden Arbeit unter dem Einsatz von Interferon-Inhibitoren oder B18R-mRNA in Kombination mit weiteren mRNA-Modifizierungen hätten steigern, und sich die Zellletalität hätte verringern lassen können.

4.3.4 Kontroverse um fetales Kälberserum und synthetische, serumfreie Alternativen

In allen Versuchen dieser Arbeit wurden ausschließlich in MesenCult-Medium gezüchtete Kieferperiostzellen verwendet. Dabei handelt es sich um ein Kulturmedium, das ohne die Zugabe von fetalem Kälberserum (FKS) auskommt.

Der Zusatz von FKS zum Kulturmedium ist immer noch weitverbreitete Praxis in der Zellkultur. Auch wenn die genaue Zusammensetzung des FKS nicht bekannt ist, so weiß man heutzutage, dass sich im Serum circa 1.800 Proteine und Peptide sowie bis zu 4.000 Metabolite befinden. Neben den gängigen Komponenten wie Aminosäuren, Salzen, Spurenelementen, Vitaminen, Transportproteinen, Kollagenen, Keratinen und Hormonen fand man auch Wachstumsfaktoren, die für die Proliferation der Zellen essenziell sind. [90] Allerdings bringt FKS auch eine ganze Reihe von negativen Aspekten mit sich. Durch den nicht standardisierten Gewinnungsprozess kann eine gleich-bleibende Qualität nicht gewährleistet werden. Es handelt sich um ein natürliches Produkt, das in seiner Zusammensetzung auch innerhalb einer Charge starken Schwankungen unterliegen kann. Beides reduziert die exakte Reproduzierbarkeit von Versuchen. [91] Außerdem bestehen ethische Debatte. Die Gewinnung des fetalen Kälberserums erfolgt bei der Schlachtung der trächtigen Kuh. Der Rinderfötus wird entnommen und es erfolgt eine Punktion des noch schlagenden Herzens ohne weitere Betäubung. Hierdurch und durch den zunehmenden Sauerstoffmangel erleidet das Tier Schmerzen, bis der Tod eintritt. [92] Dieses Vorgehen wird nicht nur von Tierschützern scharf kritisiert. Auch wird es zukünftig vermehrt wirtschaftliche und logistische Probleme bei der Verwendung von fetalem Kälberserum geben. Für die Gewinnung eines Liters FKS werden ca. 3 Föten benötigt. Durch geringere Verfügbarkeit und gestiegene Produktionskosten sind auch die Preise für das Endprodukt stark gestiegen. Trotzdem nimmt die Nachfrage stetig zu und wird zukünftig die weltweite Verfügbarkeit weit übersteigen. [64] Hinzu kommt, dass fetales Kälberserum eine mögliche Quelle für mikrobiologische Verunreinigungen (Prioen, Viren,

Zoonosen) ist und die enthaltenen xenogenen Proteine Immunreaktionen nach Zelltherapien auslösen können. Mittlerweile gilt allgemein der Konsens, dass für humane klinische Anwendungen von Zellen, die mit fetalem Kälberserum *in vitro* kultiviert wurden, eine sehr restriktive Handhabung gilt. [93]

In unseren Versuchen zeigte sich, dass die Kieferperiostzellen, die auf MesenCult-Medium kultiviert wurden, häufiger Infektionen erlitten, als Kieferperiostzellen desselben Patienten, die auf regulären FKS-haltigem Medium gezüchtet wurden.

Die Suche und Entwicklung serumfreier Kulturmedien ist für die Stammzellforschung von grundlegender Bedeutung. Derzeit sind mehr als 20 serumfreie Medien auf dem Markt, darunter CellGro™ (CellGenix), Stemline MSC™ (Sigma Alderich) und TeraPeak™ (Lonza). [91] Doch auch hier stehen die Hersteller vor diversen Problemen. Im Vergleich zu serumhaltigen Medien bieten die serumfreien häufig schlichtweg nicht die gleich guten Zellwachstumsbedingungen; die Zellverdopplungsraten sind häufig vermindert, die Morphologie und Zellgrößen sind verändert. Die Hersteller veröffentlichen nicht die genaue Zusammensetzung. Zwischen unterschiedlichen Chargen kommt es zu Abweichungen, was ebenfalls das reproduzierbare wissenschaftliche Arbeiten erschwert. [94]

Rajala testete 2007 neun verschiedene xenofreie Kulturmedien. Keines davon schaffte es dauerhaft ein undifferenziertes Wachstum von hESC-Zellen zu gewährleisten. [95]

Inzwischen konnten jedoch einige Forschergruppen positive Erfolge bei der Entwicklung und Anwendung von xenofreien Medien im Bereich der Stammzellforschung verbuchen. Baghbaderani und sein Team entwickelten ein robustes, definiertes und xenofreies Medium, das die zuverlässige Proliferation von hPSCs (human pluripotent stem cells) und die Generierung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSCs) aus mehreren somatischen Zelltypen unterstützte. Die in diesem Medium für über 40 Passagen kultivierten hPSCs waren genetisch stabil und zeigten ein hohes Expressionsniveau der Pluripotenzmarker TRA-1-60, TRA-1-81, Oct-3/4 und SSEA-4. Zudem differenzierten sie sich leicht in Ektoderm, Mesoderm und Endoderm.

Das Medium spielt auch eine wesentliche Rolle bei der Etablierung eines GMP-konformen Verfahrens (Methode zur Prüfung von Qualitätsstandards bei Herstellungsprozessen in den USA) zur Herstellung von humanen iPSC. Diese dienen dann zur Erzeugung klinisch relevanter Zelltypen, die bei Zellersatztherapien verwendet werden können. [96].

Auch Winston und seinen Kollegen gelang die erfolgreiche serumfreie Herstellung von mesenchymalen Stammzell-Gewebe-Ringen, ausgehend von induzierten Pluripotenten Stammzellen. [97]

4.3.5 Plättchenlysate als Alternative zu synthetischen serumfreien Medien

Eine weitere serumfreie Alternative zu synthetischen Medien könnten menschliches Serum und andere Blutderivate sein. Die Problematiken mit mikrobiellen Verunreinigungen und immunologischen Wirkungen, wie beim Einsatz von FKS, wird minimiert. [93]

Sehr vielversprechend scheint die Verwendung von menschlichem Plättchenlysate (hPL) zu sein. Gewonnen wird es aus thrombozytenreichem Blutplasma. Der einfach umzusetzende Herstellungsprozess reiht mehrere Gefrier- und Auftauschritte aneinander. Abschließend erfolgen Zentrifugation und Filtration. Um die Gerinnung zu verhindern, muss bei manchen hPL Heparin zugesetzt werden, bevor es dem Kulturmedium zugeführt wird. Defibrinogenierte Plättchenlysate können ohne die Zugabe von Heparin eingesetzt werden. [98] Zahlreiche Studien belegen die Erfolge, die mit der Verwendung von Plättchenlysate im Bereich der Stammzellkultur verzeichnet werden konnten.

Naskou lieferte in einer Studie Hinweise darauf, dass Plättchenlysate von Pferden (ePL) anstelle von FKS für die Kultur von MSCs aus dem Knochenmark von Pferden verwendet werden können, ohne deren Eigenschaften/Phänotyp und Funktionalität zu beeinflussen. Es zeigte sich, dass die Zugabe von ePL zum Medium die Proliferation unterstützt und die Lebensfähigkeit der MSCs erhöhte. ePL hat nicht nur keinen Einfluss auf das Differenzierungspotential von MSCs, sondern verbessert es sogar. Mit ePL kultivierte MSCs zeigten einen vergleichbaren Immunphänotyp und vergleichbare immunmodulatorische

Eigenschaften im Vergleich zu denen im Standardzellkulturmedium gezüchteten Zellen. [99]

In einem 2016 veröffentlichten Paper wurde humanes Plättchenlysat und FKS bei der Kultivierung von mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe (hASC) verglichen. Die Zellen wurden entweder in Zellkulturmedium unter Zugabe von 5 % hPL oder 10 % FKS kultiviert. Die Autoren untersuchten die zellulären Replikationsraten, den immunologischen Phänotyp und das Differenzierungspotential. Zusätzlich wurde die Lebensfähigkeit der Zellen vor und nach der Kryokonservierung in einer Lösung auf hPL-Basis im Vergleich zu einem Einfriermedium auf FKS-Basis bewertet. Auch der Einfluss auf die Kultivierbarkeit frischer Gewebeproben wurde untersucht. Die Explantate, die mit hPL supplementierten Medien kultiviert wurden, zeigten eine frühere und schnellere hASC-Proliferation als die mit FKS ergänzten. Ebenso zeigten Zellen, die mit hPL supplementierten Medien gezüchtet wurden, eine höhere Proliferationsrate, ohne den Immunphänotyp zu verlieren. Die osteogene Differenzierung der xenofreien hASCs war höher, als das der unter FKS-Bedingungen produzierten hASCs, was besonders für das Tissue Engineering von Knochen interessant ist. Die adipogene Differenzierung war jedoch bei xenofreiem hASC verringert. Schließlich zeigten die in einer hPL-basierten Lösung kryokonservierten Zellen eine höhere Lebensfähigkeit als die in einer FKS-basierten kryokonservierten Zellen. [100]

Wanner und Kollegen konnten in einem 2017 veröffentlichtem Paper die positiven Auswirkungen von Plättchen Lysate auf die Mineralisierung von Kieferperiostzellen nachweisen. Zunächst zeigte sich bei Impedanz-messungen eine signifikant höhere Zellverdopplungszeit im Vergleich zu auf FCS-Medium kultivierten Zellen. Dies war jedoch nicht auf eine geringere Proliferationsrate zurückzuführen, sondern auf eine verringerte Zellgröße. Bei einer Messung der Stoffwechselaktivität konnte ein deutlich ausgeprägteres Proliferationsverhalten dokumentiert werden. Auch das Mineralisierungspotenzial war signifikant höher und bei vier der fünf untersuchten Patienten-zellen war die Zugabe von Dexamethason nicht mehr erforderlich. [101]

Ein großes Problem bei der Verwendung von Plättchenlysate ist die sehr limitierte Verfügbarkeit. Ob abgelaufene Blutkonserven eine mögliche Quelle für Plättchenlysate darstellen, muss erst noch untersucht werden. [102]

4.4 Vergleich der Transfektionseffizienzen in Zellpassage 5 und 6

In einem weiteren Versuch der vorliegenden Arbeit wurden die Effizienzen der Transfektion von MesenCult-Kieferperiostzellen nach erfolgter Kryokonservierung mit Hilfe von Lipofectamine3000 der Zellpassage 5 und Zellpassage 6 verglichen. Der Versuch lieferte ein sehr eindeutiges Ergebnis. In Zellpassage 5 lag die Anzahl der GFP-positiven Zellen im Durchschnitt bei über 66 %. Der durchschnittliche Maximalwert von 75,6 % wurde nach 24 Stunden erreicht. Ein einmaliger Spitzenwert von 86,2 % wurde ebenfalls nach 24 Stunden detektiert. Im Vergleich lieferte Zellpassage 6 nur sehr geringe Transfektionsraten. Durchschnittlich zeigten sich gerade mal 6,27 % der Zellen positiv. Das Transfektionsmaximum wird, wie auch bei Zellpassage 5, nach 24 Stunden (11,3 %) erreicht. Ein unikal nach 24 Stunden erreichter Messwert von 27,6 % weicht deutlich von den restlichen Messwerten ab, die sich für alle Messzeitpunkte unterhalb von 10% bewegen. In Bezug auf die Transfektionseffizienzen war die Überlegenheit der Zellen in Passage 5 gegenüber denen in Passage 6 für alle Messzeitpunkte hochsignifikant.

4.4.1 Einfluss der Zellpassage auf Proliferationsverhalten

Eine im Jahr 2015 veröffentlichte Studie konnte zeigen, dass DNA-Modifikationen in Zellkulturen schon in niedrigen Passagen stattfinden. Laut den erhobenen Daten konnte die Stabilität des Genoms über Passage 5 hinaus nicht gewährleistet werden. Menschliche Stromazellen aus dem Fettgewebe zeigten sich am anfälligsten für genomische Veränderungen. Fibroblasten erwiesen sich dagegen als am stabilsten. Die Stabilität variierte auch innerhalb verschiedener Fibroblastenkulturen. [103]

Im selben Jahr untersuchten Choi und Kollegen den Einfluss von Spenderalter, Langzeitkultivierung und Kryokonservierung auf mesenchymale Stammzellen aus Tonsillengewebe. Sie verglichen Zellen in Passage 2 bzw. 3. mit Passage 15. Bis auf eine niedrigere Proliferationsfähigkeit ab Passage 15 konnten sie keine nennenswerten Veränderungen aufzeigen. [104]

Vor allem bei diesem Versuch wäre auch der Vergleich mit den Transfektionseffizienzen von Zellen, die auf einem anderen serumfreien Medium oder auf Plättchenlysate kultiviert worden sind, interessant. Denkbar ist, dass mit zunehmender Verbesserung der xenofreien Kulturmedien auch eine Verwendung der Zellen in höheren Passagen möglich ist, da sie mehr und spezifischere Substrate enthalten.

4.5 Vergleich der Transfektionseffizienzen von einfach und mehrfach transfizierten MesenCult-Zellen

Der letzte Versuch widmete sich der Mehrfachtransfektion von MesenCult-Zellen mit Lipofectamine3000 in Zellpassage 5 nach erfolgter Stickstofflagerung. Hier wurden die Anzahl der GFP-positiven Zellen nach einmaliger Transfektion nach 24 Stunden und 48 Stunden, nach zweimaliger Transfektion nach 92 Stunden und dreimaliger Transfektion nach 144 Stunden verglichen (Abbildung 8). Nach 24 Stunden und einmaliger Transfektion leuchteten 71,77 % der Zellen. Das Maximum der Transfektionseffizienzen wurde nach 48 Stunden und ebenfalls einmaliger Transfektion mit 73,6 % erreicht. Danach sank die Anzahl an GFP-positiven Zellen trotz zweifach erfolgter Transfektion nach 96 Stunden auf 62,53 % und nach 144 Stunden mit dreifacher Transfektion auf den Minimalwert von 56,83 % ab. Eine statistische Signifikanz ergab sich nur beim Vergleich des 48 Stundenwerts zu den 96- und 144-Stundenwerten.

Die Versuche der ersten und letzten Versuchsreihe haben für den 24 und 48 Stundenwert den exakt selben Aufbau und Ablauf. Ein Unterschied besteht lediglich in der Häufigkeit, in der die Kulturplatten aus dem Inkubator entnommen wurden und vorübergehend außerhalb unter der sterilen Werkbank verweilten. Während, wie oben bereits beschrieben, im Versuch zur Mehrfachtransfektion

das Maximum nach 48 Stunden erreicht wurde, zeigte sich beim Versuch zur Wahl des Transfektionsreagenz die höchste Erfolgsquote nach 24 Stunden mit 75,6 % und die geringste nach 48 Stunden mit 66,83 %. Die Ergebnisse bewegen sich aber innerhalb der Standardabweichung. Die Aufnahmen der Durchlicht- und Fluoreszenz-mikroskopie verdeutlichten zusätzlich die zytotoxische Wirkung jeder Transfektion. Der Zellrasen der 96- und 144-Stundenwerte wies eine deutlich niedrigere Konfluenz als die der 24- und 48-Stundenwerte auf. Viele Zellen zeigten sich apoptotisch.

Eine weitere Limitierung der vorliegenden Arbeit lag in der rein optischen und fehlenden quantitativen Bestimmung der Anzahl an lebenden und toten Zellen (Bestimmung der Zellvitalität) vor und nach durchgeführten Transfektion. Ohne diese Limitierung hätte zusätzlich zur semi-quantitativen Auswertung der mikroskopischen Bilder eine genaue Quantifizierung der Mortalitätsraten erfolgen können.

4.5.1 Einfluss von wiederholter Transfektion auf Effizienz und Zellletalität

Trotz widersprüchlicher Ergebnisse in unseren Versuchen, scheinen Mehrfachtransfektionen der Schlüssel zur erfolgreicher Generierung von iPS-Zellen zu sein. In einem bereits mehrfach zitiertem Paper von Warren zur iPS-Zellgenerierung mittels modifizierter mRNA werden die Ausgangszellen 17-mal transfiziert. [53]

Unter achtmaliger Transfektion reprogrammierten Watanabe und seine Kollegen im Jahr 2019 iPS-Zellen aus Leberzellen von Krallenaffen. Sie verwendeten die von Poleganov et al. entwickelte RNA-Transfektionsmethode, bei der humane Reprogrammierungsfaktor-mRNAs (OCT4 / SOX2 / KLF4 / C-MYC / LIN28A / NANOG), humane ES-Zell-spezifische miRNAs und vom Vaccinia-Virus abgeleitete Interferon-Response-Suppressor-mRNAs (E3, K3 und B18R) verwendet werden. Die Aminosäuresequenzen der Reprogrammierungsfaktor-mRNAs von Krallenaffen und Menschen sind sich sehr ähnlich und alle miRNA-Sequenzen sind bei beiden Spezies sogar identisch. Die RNAs wurden acht Tage

nacheinander von Tag eins bis acht transfiziert. Am 18. Tag nach Ersttransfektion konnten zwei iPS-ähnliche Kolonien nach-gewiesen werden. [105]

Lee und Co-Autoren veröffentlichen in einem Paper von 2016 die erfolgreiche iPS-Zellgenerierung aus menschlichen Fibroblasten auf der Basis eines xenofreien Mediums unter mehrmaliger Transfektion. Dafür transfizierten sie die Zellen an elf aufeinanderfolgenden Tagen unter der Verwendung des Transfekts Stemfects (Stemgent. Inc.). Dieses Transfektionssystem enthielt neben den bekannten Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc und Lin28 einen microRNA-Cocktail, der den Erfolg der Transfektion erhöhen sollte. Zusätzlich verwendeten sie den Interfonsuppressor B18R. Die Anzahl der ESC-ähnlichen Kolonien betrug ungefähr 0,2–0,3 %. Auffallend hoch war der Prozentsatz der ESC-ähnlichen Kolonien unter allen Kolonien (~ 87,5 %). [106]

Wie diverse Studien zeigten, besitzen mehrmalige Transfektionen das Potential, die Effizienzen bei der Reprogrammierung zu erhöhen, doch scheint dabei die Verwendung von zusätzlichen microRNAs und vor allem die Verwendung von Immunsuppressoren unerlässlich zu sein.

4.6 Alternative Methoden zur iPS-Zellgenerierung

Die Verwendung von sich selbst replizierender RNA (self replicating RNA, srRNA) ist eine relativ neue, sehr vielversprechende Methode. Im Vergleich zur regulären Reprogrammierung mit synthetischer mRNA (mit Basenaustausch, veränderter Endstruktur und enthaltener B18R-Codierung) führte die srRNA-basierte Methode zu einer effizienteren Reprogrammierung somatischer Zellen und einer größeren Anzahl an iPS-Zellen. Ein entscheidender Vorteil liegt in der einmaligen Anwendung der srRNA. Aufwendige Mehrfachtransfektionen entfallen und erlauben so ein zellschonenderes, kosten- und zeitsparendes Arbeiten. [107]

Auch die erst seit kurzem im Bereich der iPS-Zellforschung verwendeten magnetischen Nanopartikel (NPs) scheinen chancenreich. Die NPs sind positiv geladen, mit einem Zeta-Potential von + 30 mV in Wasser. Die Größe der NPs bewegt sich von 140 bis 200 nm, wobei die Mehrheit bei ca. 160 nm liegt. Diese

Nanopartikeln dienen, wie das Transfekt Lipofectamine3000 auch, als Transportmedium. Ihnen kann beispielsweise ein gewünschtes Plasmid hinzugefügt werden. Bringt man den Plasmid/Nanopartikel-Komplex und die Zielzelle unter der Einwirkung eines Magnetfeldes zusammen, findet die Transfektion (Magnetofektion) statt. [108]

Yamoah generierte hiPSC-Zellen mit Hilfe von magnetischen Nanopartikeln und verglich die Erfolgsraten mit hiPSC-Zellen, die mit Lipofektamine2000 und Lipofectamine3000 transfiziert wurden. Die Anzahl der mit NPs positiv transfizierten Zellen lag bei 43 %. Für die Transfekte Lipofectamine2000 und Lipofectamine3000 mit unter 10 % signifikant darunter. [109]

4.7 Ausblick

Die bahnbrechende Entdeckung von induzierten pluripotenten Stammzellen durch Takahashi und Yamanaka hat die Tür in der regenerativen Medizin und im Tissue Engineering zu einer Vielzahl von Möglichkeiten geöffnet, insbesondere individueller und patientenspezifischer Behandlungen. Sind sichere, effiziente und reproduzierbare Methoden zur Generierung von iPS-Zellen etabliert, stellt sich die Frage, in welcher Form die iPS-Zellen in vivo angewendet werden sollen. Das 3D-Bioprinting von iPS-Zellen mit sogenannten Bioinks (Biotinten) verspricht die Entwicklung von 3D-Konstrukten mit identischer Biofunktion und Architektur wie das Ausgangsgewebe. Mit ihnen könnte man den ungedeckten Bedarf an Gewebe- und Organtransplantaten decken. Angesichts der großen Empfindlichkeit von iPS-Zellen gegenüber Bioprinting-Parametern und -Bedingungen, insbesondere mechanischen Kräften während des Druckprozesses, müssen auch hier noch viele Hürden überwunden werden, ehe 3D-gedrucktes Gewebe klinisch Anwendung finden kann. Es besteht weiterhin Bedarf an der Entwicklung neuer biokompatibler Bioinks, die die Lebensfähigkeit der Zellen während und nach dem Druck erhalten und die mechanischen Funktionen über einen langen Zeitraum garantieren. [110]

Ein weiterer Trend geht auch zur Entwicklung von injizierbaren Biomaterialien und Verfahren zur Erzeugung von Nanofasergerüsten, um invasive Operationen in Zukunft ganz zu vermeiden. [111] Beide Verfahren besitzen großes Potential, die regenerative Medizin zu revolutionieren.

5 Zusammenfassung

Stammzellen eröffnen der regenerativen Medizin durch ihr großes Differenzierungspotential ungeahnte Möglichkeiten. Die Anwendung von embryonalen Stammzellen wird jedoch kontrovers diskutiert. Patienteneigene, adulte Stammzellen sind ethisch unbedenklich, erzeugen keine immunologischen Reaktionen und sind leicht verfügbar. Aber sie haben ein geringes Differenzierungspotential, können sich also nicht in jede Zellart entwickeln und zeigen ein deutlich niedrigeres Proliferationspotential als beispielsweise embryonale Stammzellen.

Die erstmals von Yamanaka und Kollegen im Jahr 2006 generierten induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) vereinen viele positive Aspekte von embryonalen und adulten Stammzellen. Die ersten Methoden zur Gewinnung von iPS-Zellen bargen die Gefahr der Integration von fremdem Erbgut in das Genom der menschlichen Zellen, was eine klinische Anwendung untersagte. Derzeitige integrations- und xenofreie Methoden zur Generierung von iPS-Zellen sind häufig ineffizient und teilweise mit einer hohen Zellsterblichkeit verbunden. Ziel ist es, eine effektive, zellschonende und leicht reproduzierbare Methode zu entwickeln, die frei ist von immunreaktiven Substanzen und xenogenem Material. Auch wenn inzwischen iPS-Zellen schon vereinzelt in klinischen Studien zum Einsatz kamen, müssen noch etliche Hürden in Bezug auf die Generierung, Kultivierung und Langzeitkonservierung überwunden werden.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Methode zur Transfektion von humanen Kieferperiostzellen, die in serumfreien MesenCult-Medium gezüchtet wurden. Die Zellen wurden mit Hilfe einer modifizierten, GFP-markierten mRNA transfiziert, was eine quantitative Beurteilung der Transfektionsraten ermöglichte. Die Integration von fremdem Erbgut ins Genom der Zielzelle ist hier ausgeschlossen. Vor der Lagerung in Stickstoff zeigten serumfrei kultivierte Kieferperiostzellen, auch nach Ausschluss von Ausreißern, für alle drei Transfekte nur sehr geringe Transfektionseffizienzen von unter 30 %. Nach

Kryokonservierung wurden zum Teil signifikant höhere Transfektionseffizienzen von bis zu 86,6 % mit dem Transfekt Lipofectamine3000 erzielt. Da sich neben der hohen Erfolgsquote, eine vertretbaren Zytotoxizität in der Fluoreszenzmikroskopie abzeichnete, wurde Lipofectamine3000 für die folgenden Versuche als alleiniges Transfekt verwendet.

Die für die MesenCult-Zellen der Zellpassage 5 erreichten Transfektionseffizienzen nach vorheriger Stickstofflagerung konnten bei der Transfektion von Zellen der Zellpassagen 6 nicht reproduziert werden, wie ein weiterer Versuch zeigte.

In einem abschließenden Versuch wurde der Einfluss von mehrmaliger Transfektion auf die Transfektionseffizienz untersucht. Das Erfolgsmaximum lag nach 48 Stunden und einmaliger Transfektion bei durchschnittlich 73,6 % GFP-positiver Zellen. Nach zweimaliger Transfektion zeigten sich nach 96 Stunden noch 62,5 % der Zellen positiv. Die geringste Menge an GFP-positiven Zellen (56,8 %) bei gleichzeitig hoher Zellsterblichkeit wurde nach dreimaliger Transfektion detektiert.

Die Verwendung von weiter modifizierter mRNA, zusätzlicher microRNA oder gar selbst-replizierender RNA stellt weitere vielversprechende Methoden für eine sichere und effiziente Generierung von iPS-Zellen dar. Die Unterdrückung proinflammatorischer Signalwege mit Hilfe eines Interferon-Inhibitors scheint bei vielen Methoden unumgänglich. Eine sichere und effiziente Methode zur Generierung von iPS-Zellen ermöglicht, neben der Schaffung von individuellen patientenspezifischen Gewebetransplantaten, auch die Verwendung in der Entwicklung von Medikamenten und der Simulation von Krankheitsmodellen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Bikowski K, Budach W, Danker H, Gauler T, Mantey W, Wolff K-D (2012) Patientenleitlinie Mundhöhlenkrebs. Leitlinienprogramm Onkologie:1–69
- [2] Rivera C (2015) Opportunities for biomarkers with potential clinical use in oral cancer. *Medwave* 15:11884-11894 .
<https://doi.org/10.5867/medwave.2015.06.6186>
- [3] Wolff K-D (2012) Langversion, S3 Leitlinie, Mundhöhlenkarzinom. Leitlinienprogramm Onkologie:1–119
- [4] Wong T, Wiesenfeld D (2018) Oral Cancer. *Aust Dent J* 63 Suppl 1:S91-S99. <https://doi.org/10.1111/adj.12594>
- [5] Montero PH, Patel SG (2015) Cancer of the oral cavity. *Surg Oncol Clin N Am* 24:491–508. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2015.03.006>
- [6] Roi A, Ardelean LC, Roi CI, Boia E-R, Boia S, Rusu L-C (2019) Oral Bone Tissue Engineering: Advanced Biomaterials for Cell Adhesion, Proliferation and Differentiation. *Materials (Basel)* 12 .
<https://doi.org/10.3390/ma12142296>
- [7] Langer R, Vacanti JP (1993) Tissue engineering. *Science* 260:920–926.
<https://doi.org/10.1126/science.8493529>
- [8] Mao AS, Mooney DJ (2015) Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:14452–14459.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1508520112>
- [9] Do A-V, Khorsand B, Geary SM, Salem AK (2015) 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Adv Healthc Mater* 4:1742–1762.
<https://doi.org/10.1002/adhm.201500168>
- [10] Chua AWC, Khoo YC, Tan BK, Tan KC, Foo CL, Chong SJ (2016) Skin tissue engineering advances in severe burns: review and therapeutic applications. *Burns Trauma* 4:3. <https://doi.org/10.1186/s41038-016-0027-y>
- [11] Ma N, Wang H, Xu X et al. (2017) Autologous-cell-derived, tissue-engineered cartilage for repairing articular cartilage lesions in the knee: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 18:519.
<https://doi.org/10.1186/s13063-017-2251-6>

- [12] Howard D, Buttery LD, Shakesheff KM, Roberts SJ (2008) Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *J Anat* 213:66–72. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00878.x>
- [13] Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W, Józkwicz A (2015) Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim Pol* 62:329–337. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1023
- [14] Gao L, Thilakavathy K, Nordin N (2013) A plethora of human pluripotent stem cells. *Cell Biol Int* 37:875–887. <https://doi.org/10.1002/cbin.10120>
- [15] Mitalipov S, Wolf D (2009) Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 114:185–199. https://doi.org/10.1007/10_2008_45
- [16] Lin H-T, Otsu M, Nakauchi H (2013) Stem cell therapy: an exercise in patience and prudence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368:1–14. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0334>
- [17] Dakhore S, Nayer B, Hasegawa K (2018) Human Pluripotent Stem Cell Culture. Current Status, Challenges, and Advancement. *Stem Cells Int* 2018:1–17. <https://doi.org/10.1155/2018/7396905>
- [18] Ilic D, Ogilvie C (2017) Concise Review: Human Embryonic Stem Cells-What Have We Done? What Are We Doing? Where Are We Going? *Stem Cells* 35:17–25. <https://doi.org/10.1002/stem.2450>
- [19] Albrecht S, Dierken J, Freese H, Corinna H (2003) Stammzellforschung. Debatte zwischen Ethik, Politik und Geschäft
- [20] Spinelli V, Guillot PV, Coppi P de (2013) Induced pluripotent stem (iPS) cells from human fetal stem cells (hFSCs). *Organogenesis* 9:101–110. <https://doi.org/10.4161/org.25197>
- [21] Ferretti C, Mattioli-Belmonte M (2014) Periosteum derived stem cells for regenerative medicine proposals: Boosting current knowledge. *World J Stem Cells* 6:266–277. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i3.266>
- [22] Borges FT, Convento MB, Schor N (2018) Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell: what next? *Stem Cells Cloning* 11:77–83. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S147804>
- [23] Liu S, Zhou J, Zhang X et al. (2016) Strategies to Optimize Adult Stem Cell Therapy for Tissue Regeneration. *Int J Mol Sci* 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17060982>

- [24] Sobhani A, Khanlarkhani N, Baazm M, Mohammadzadeh F, Najafi A, Mehdinejadiani, Shayesteh and Sargolzaei Aval, Fereydoon (2016) Multipotent Stem Cell and Current Application 2018 Jul 25;10(7):7028-7037. doi: 10.19082/7028
- [25] Koestenbauer S, Zech N, Dohr G (2006) Trans-Differenzierung von adulten Stammzellen. Ist eine Veränderung in Richtung naiverer Zellen möglich? J. Reproduktionsmed. Endokrinol(3):324–330
- [26] Reimann V, Creutzig U, Kögler G (2009) Stem cells derived from cord blood in transplantation and regenerative medicine. Dtsch Arztebl Int 106:831–836. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2009.0831>
- [27] Huang GT-J (2010) Induced Pluripotent Stem Cells—A New Foundation in Medicine. Journal of Experimental & Clinical Medicine 2:202–217. [https://doi.org/10.1016/S1878-3317\(10\)60033-2](https://doi.org/10.1016/S1878-3317(10)60033-2)
- [28] Aoi T (2016) 10th anniversary of iPS cells: the challenges that lie ahead. J Biochem 160:121–129. <https://doi.org/10.1093/jb/mvw044>
- [29] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M et al. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 131:861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- [30] Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126:663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- [31] GURDON JB (1962) The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. J Embryol Exp Morphol 10:622–640
- [32] Mah N, Wang Y, Mrowka, Ralf, Frank Rosenbauer, James Adjaye und Miguel A. Andrade-Navarro (2010) Die Entwicklungsuhr zurückdrehen. Den Geheimnissen der Stammzellen auf der Spur. systembiologie.de, S.1–96
- [33] Telpalo-Carpio, Aguilar-Yañez, Gonzalez-Garza, Cruz-Vega, Moreno-Cuevas (2013) iPS cells generation: an overview of techniques and methods. Journal of Stem Cells & Regenerative Medicine 2013 Apr 30;9(1):2-8. doi: 10.46582/jsrm.0901002

- [34] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810–813. <https://doi.org/10.1038/385810a0>
- [35] Alberio R, Campbell KH, Johnson AD (2006) Reprogramming cells into stem cells(132) 2006 Nov;132(5):709-20. doi: 10.1530/rep.1.01077
- [36] Feng B, Ng J-H, Heng J-CD, Ng H-H (2009) Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 4:301–312. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.03.005>
- [37] Buddecke E (2002) *Molekulare Medizin. Eine systematische Einführung.* ecomed, Landsberg/Lech S.97
- [38] Kim TK, Eberwine JH (2010) Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* 397:3173–3178. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>
- [39] Janning W, E (2008) *Genetik: Allgemeine Genetik - Molekulare Genetik - Entwicklungsgenetik.* DeL. Thieme
- [40] Bayart E, Cohen-Haguenaer O (2013) Technological overview of iPS induction from human adult somatic cells. *Curr Gene Ther* 13:73–92. <https://doi.org/10.2174/1566523211313020002>
- [41] Lukashev AN, Zamyatnin AA (2016) Viral Vectors for Gene Therapy: Current State and Clinical Perspectives. *Biochemistry Mosc* 81:700–708. <https://doi.org/10.1134/S0006297916070063>
- [42] Rony IK, Baten A, Bloomfield JA, Islam ME, Billah MM, Islam KD (2015) Inducing pluripotency in vitro: recent advances and highlights in induced pluripotent stem cells generation and pluripotency reprogramming. *Cell Prolif* 48:140–156. <https://doi.org/10.1111/cpr.12162>
- [43] Zhou Y-y, Zeng F (2013) Integration-free methods for generating induced pluripotent stem cells. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 11:284–287. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2013.09.008>
- [44] Milton H. Saier, Chika Kukita, Zhongge Zhang (2017) Transposon-mediated directed mutation in bacteria and eukaryotes. *Front Biosc* 2017 Mar 1;22:1458-1468. doi: 10.2741/4553i

- [45] Yu J, Hu K, Smuga-Otto K et al. (2009) Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324:797–801. <https://doi.org/10.1126/science.1172482>
- [46] Jia F, Wilson KD, Sun N et al. (2010) A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods* 7:197–199. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1426>
- [47] Zhou H, Wu S, Joo JY et al. (2009) Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4:381–384. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.04.005>
- [48] Clark DP, Pazdernik NJ, Held A, Jarosch B (2009) *Molekulare Biotechnologie. Grundlagen und Anwendungen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg S.219
- [49] Augustyniak J, Zychowicz M, Podobinska M, Barta T, Buzanska L (2014) Reprogramming of somatic cells possible methods to derive safe, clinical-grade human induced pluripotent stem cells. *Acta Neurobiol Exp(74)*:373–382
- [50] Kim D, Kim C-H, Moon J-I et al. (2009) Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4:472–476. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.005>
- [51] Huangfu D, Maehr R, Guo W et al. (2008) Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* 26:795–797. <https://doi.org/10.1038/nbt1418>
- [52] Lin T, Wu S (2015) Reprogramming with Small Molecules instead of Exogenous Transcription Factors. *Stem Cells Int* 2015:794632. <https://doi.org/10.1155/2015/794632>
- [53] Warren L, Manos PD, Ahfeldt T et al. (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7:618–630. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.012>
- [54] Mandal PK, Rossi DJ (2013) Reprogramming human fibroblasts to pluripotency using modified mRNA. *Nat Protoc* 8:568–582. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.019>

- [55] Drews K, Tavernier G, Demeester J et al. (2012) The cytotoxic and immunogenic hurdles associated with non-viral mRNA-mediated reprogramming of human fibroblasts. *Biomaterials* 33:4059–4068. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.02.025>
- [56] Mohr AM, Mott JL (2015) Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis* 35:3–11. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1397344>
- [57] Anokye-Danso F, Trivedi CM, Juhr D et al. (2011) Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 8:376–388 <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.03.001>
- [58] Miyoshi N, Ishii H, Nagano H et al. (2011) Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* 8:633–638. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.05.001>
- [59] Schlaeger TM, Daheron L, Brickler TR et al. (2015) A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nat Biotechnol* 33:58–63. <https://doi.org/10.1038/nbt.3070>
- [60] Bird A (2007) Perceptions of epigenetics. <https://www.nature.com/articles/nature05913>. 2007.May 24;447(7143):396-8. doi: 10.1038/nature05913
- [61] Allis CD, C. David Allis TJDR, Jenuwein T, Reinberg D, Caparros ML (2007) *Epigenetics. Pediatric research.* Cold Spring Harbor, New York 2015 Oct 26. doi: 10.3389/fgene.2015.00315
- [62] Gomes KMS, Costa IC, Santos JFD, Dourado PMM, Forni MF, Ferreira JCB (2017) Induced pluripotent stem cells reprogramming: Epigenetics and applications in the regenerative medicine. *Rev Assoc Med Bras* (1992) 63:180–189. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.63.02.180>
- [63] Lüllmann-Rausch R, Paulsen F (2009) *Taschenlehrbuch Histologie*, 3. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart S.117
- [64] van der Valk J, Bieback K, Buta C et al. (2018) Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *ALTEX* 35:99–118. <https://doi.org/10.14573/altex.1705101>

- [65] Avci-Adali M et. al. (2014) Optimized conditions for successful transfection of human endothelial cells with in vitro synthesized and modified mRNA for induction of protein expression 2014 Mar 3;8(1):8. doi: 10.1186/1754-1611-8-8
- [66] Manzini S, Viiri LE, Marttila S, Aalto-Setälä K (2015) A Comparative View on Easy to Deploy non-Integrating Methods for Patient-Specific iPSC Production. *Stem Cell Rev Rep* 11:900–908 .
<https://doi.org/10.1007/s12015-015-9619-3>
- [67] Telpalo-Carpio SA, Aguilar-Yañez JM, Gonzalez-Garza MT, Cruz-Vega DE, Moreno-Cuevas JE (2013) iPS cells generation: an overview of techniques and methods. *Journal of Stem Cells & Regenerativ Medicine* 2013 Apr 30;9(1):2-8. doi: 10.46582/jsrm.0901002
- [68] Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S (2017) Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov* 16:115–130.
<https://doi.org/10.1038/nrd.2016.245>
- [69] Scudellari M (2016) A Decade of iPS Cells. Induced pluripotent stem cells were supposed to herald a medical revolution. But ten years after their discovery, they are transforming biological research instead. *Nature*(534):310–312 2016 Dec 16. doi: 10.1038/nrd.2016.245
- [70] Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y et al. (2017) Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med* 376:1038–1046. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1608368>
- [71] Garber K (2015) RIKEN suspends first clinical trial involving induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 33:890–891.
<https://doi.org/10.1038/nbt0915-890>
- [72] Doss MX, Sachinidis A (2019) Current Challenges of iPSC-Based Disease Modeling and Therapeutic Implications. *Cells* 8.
<https://doi.org/10.3390/cells8050403>
- [73] Wiethoff CM, Middaugh CR (2003) Barriers to nonviral gene delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 92:203–217.
<https://doi.org/10.1002/jps.10286>
- [74] Florea BI, Meaney C, Junginger HE, Borchard G (2002) Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures. *AAPS PharmSci* 4:E12.
<https://doi.org/10.1208/ps040312>

- [75] Roberts R, Al-Jamal W'T, Whelband M et al. (2013) Autophagy and formation of tubulovesicular autophagosomes provide a barrier against nonviral gene delivery. *Autophagy* 9(5):667–682 2013 Feb 19. doi: 10.4161/auto.23877
- [76] Figueroa E, Bugga P, Asthana V et al. (2017) A mechanistic investigation exploring the differential transfection efficiencies between the easy-to-transfect SK-BR3 and difficult-to-transfect CT26 cell lines. *J Nanobiotechnology* 15:36. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0271-8>
- [77] Lüllmann-Rauch R, Asan E (2019) Taschenlehrbuch Histologie, 6., vollständig überarbeitete Auflage. Thieme, Stuttgart S117
- [78] Alexander D, Rieger M, Klein C, Ardjomandi N, Reinert S (2013) Selection of osteoprogenitors from the jaw periosteum by a specific animal-free culture medium. *PLoS ONE* 8:e81674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081674>
- [79] Schmitz S (2011) Kryokonservierung und Langzeitlagerung von Zellen. In: Schmitz S (Hrsg) *Der Experimentator: Zellkultur*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S 191–204
- [80] Joseph Prohaska, Talel Badri (2020) Cryotherapy. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan PMID: 29493944 Bookshelf ID: NBK482319
- [81] Bank H, Mazur P (1973) Visualization of Freezing Damage. *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY* 57:729–742
- [82] Smits L, Hofmann N, Glasmacher B (2013) Antioxidantien als Strategie zur Optimierung der Kryokonservierung von Stammzellen für das Tissue Engineering. *Biomed Tech (Berl)* 58 Suppl 1. <https://doi.org/10.1515/bmt2013-4200>
- [83] Jang TH, Park SC, Yang JH et al. (2017) Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res* 6:12–18. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2016.12.001>
- [84] Wang T, Larcher LM, Ma L, Veedu RN (2018) Systematic Screening of Commonly Used Commercial Transfection Reagents towards Efficient Transfection of Single-Stranded Oligonucleotides. *Molecules* 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23102564>

- [85] (2020) Lipofectamine 3000 Reagent | Thermo Fisher Scientific - DE. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/product-brand/lipofectamine/lipofectamine-3000.html>.
- [86] Arango D, Sturgill D, Alhusaini N et al. (2018) Acetylation of Cytidine in mRNA Promotes Translation Efficiency. *Cell* 175(7):1872-1886.e24 DOI: 10.1016/j.cell.2018.10.030
- [87] Ivashkiv LB, Donlin LT (2014) Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 14:36–49. <https://doi.org/10.1038/nri3581>
- [88] Alcami A, Symons JA, Smith GL (2000) The Vaccinia Virus Soluble Alpha_Beta Interferon (IFN) Receptor Bind to Cell Surface and Protects Cells from the Antoviral Effects of IFN. *Journal of Virology* 74(23):11230–11239 DOI: 10.1128/jvi.74.23.11230-11239.2000
- [89] Michel T, Golombek S, Steinle H et al. (2019) Efficient reduction of synthetic mRNA induced immune activation by simultaneous delivery of B18R encoding mRNA. *Journal of Biological Engineering* 13:40. <https://doi.org/10.1186/s13036-019-0172-5>
- [90] Brunner D, Frank J, Appl H, Schöffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G (2010) Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX* 27:53–62. <https://doi.org/10.14573/altex.2010.1.53>
- [91] Gottipamula S, Muttigi MS, Kolkundkar U, Seetharam RN (2013) Serum-free media for the production of human mesenchymal stromal cells: a review. *Cell Prolif* 46:608–627. <https://doi.org/10.1111/cpr.12063>
- [92] van der Valk J, Mellor D, Brands R et al. (2004) The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol In Vitro* 18:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2003.08.009>
- [93] Mannello F, Tonti GA (2007) Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem Cells* 25:1603–1609. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0127>
- [94] Cimino M, Gonçalves RM, Barrias CC, Martins MCL (2017) Xeno-Free Strategies for Safe Human Mesenchymal Stem/Stromal Cell Expansion: Supplements and Coatings. *Stem Cells Int* 2017:6597815. <https://doi.org/10.1155/2017/6597815>

- [95] Rajala K, Hakala H, Panula S et al. (2007) Testing of nine different xeno-free culture media for human embryonic stem cell cultures. *Hum Reprod* 22:1231–1238. <https://doi.org/10.1093/humrep/del523>
- [96] Baghbaderani A, Behnam, Tian X et al. (2016) A Newly Defined and Xeno-Free Culture Medium Supports Every-Other-Day Medium Replacement in the Generation and Long-Term Cultivation of Human Pluripotent Stem Cells. *PLoS ONE* 11:e0161229. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161229>
- [97] Winston TS, Suddhapas K, Wang C, Ramos R, Soman P, Ma Z (2019) Serum-Free Manufacturing of Mesenchymal Stem Cell Tissue Rings Using Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Int* 2019:5654324. <https://doi.org/10.1155/2019/5654324>
- [98] Laner-Plamberger S, Lener T, Schmid D et al. (2015) Mechanical fibrinogen-depletion supports heparin-free mesenchymal stem cell propagation in human platelet lysate. *J Transl Med* 13:354. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0717-4>
- [99] Naskou MC, Sumner SM, Chocallo A et al. (2018) Platelet lysate as a novel serum-free media supplement for the culture of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 9:75. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0823-3>
- [100] Escobar CH, Chaparro O (2016) Xeno-Free Extraction, Culture, and Cryopreservation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Transl Med* 5:358–365. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0094>
- [101] Wanner Y, Umrath F, Waidmann M, Reinert S, Alexander D (2017) Platelet Lysate: The Better Choice for Jaw Periosteal Cell Mineralization. *Stem Cells Int* 2017:8303959 doi: 10.1155/2017/8303959
- [102] Astori G, Amati E, Bambi F et al. (2016) Platelet lysate as a substitute for animal serum for the ex-vivo expansion of mesenchymal stem/stromal cells: present and future. *Stem Cell Res Ther* 7:93. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0352-x>
- [103] Pavlova GV, Vergun AA, Rybalkina EY, Butovskaya PR, Ryskov AP (2015) Identification of structural DNA variations in human cell cultures after long-term passage. *Cell Cycle* 14:200–205. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.974427>

- [104] Choi J-S, Lee B-J, Park H-Y et al. (2015) Effects of donor age, long-term passage culture, and cryopreservation on tonsil-derived mesenchymal stem cells. *Cell Physiol Biochem* 36:85–99. <https://doi.org/10.1159/000374055>
- [105] Watanabe T, Yamazaki S, Yoneda N et al. (2019) Highly efficient induction of primate iPS cells by combining RNA transfection and chemical compounds. *Genes Cells* 24:473–484. <https://doi.org/10.1111/gtc.12702>
- [106] Lee K-I, Lee S-Y, Hwang D-Y (2016) Extracellular Matrix-Dependent Generation of Integration- and Xeno-Free iPS Cells Using a Modified mRNA Transfection Method. *Stem Cells Int* 2016:1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/6853081>
- [107] Steinle H, Weber M, Behring A et al. (2019) Generation of iPSCs by Nonintegrative RNA-Based Reprogramming Techniques: Benefits of Self-Replicating RNA versus Synthetic mRNA. *Stem Cells Int* 2019:1–16. <https://doi.org/10.1155/2019/7641767>
- [108] Plank C, Zelphati O, Mykhaylyk O (2011) Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-progress and prospects. *Adv Drug Deliv Rev* 63:1300–1331. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.08.002>
- [109] Yamoah MA, Moshref M, Sharma J et al. (2018) Highly efficient transfection of human induced pluripotent stem cells using magnetic nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 13:6073–6078. <https://doi.org/10.2147/IJN.S172254>
- [110] Romanazzo S, Nemec S, Roohani I (2019) iPSC Bioprinting: Where are We at? *Materials (Basel)* 12. <https://doi.org/10.3390/ma12152453>
- [111] Chocholata P, Kulda V, Babuska V (2019) Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. *Materials (Basel)* 12. <https://doi.org/10.3390/ma12040568>

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im molekularbiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Dorothea Alexander-Friedrich durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Dorothea Alexander-Friedrich.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Dr. Annika Henrich) von mir eigenständig oder in Zusammenarbeit mit Dr. Annika Henrich durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig und nach Anleitung durch Dr. Annika Henrich durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

München, den

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Doktormutter Prof. Dr. Dorothea Alexander-Friedrich für die hervorragende Betreuung und die Unterstützung bei der Durchführung und Umsetzung der gesamten Arbeit. Die zahlreichen Gespräche auf fachlicher und persönlicher Ebene werden mir immer als positiver und konstruktiver Austausch in Erinnerung bleiben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Martin Weiß für die hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung als Zweitgutachter.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Annika Henrich bedanken, die mich mit einer Engelsgeduld an die Grundlagen des molekularbiologischen Arbeitens herangeführt hat und mir stets Rat, Tat und Enthusiasmus zur Seite stand.

Auch möchte ich Dr. Felix Umrath meinen Dank aussprechen, der mich mehrfach mit den neuesten Papern versorgt hat.

Meinem Partner, Stefan Strecker, bin ich tief verbunden für seine Motivation, seinen Zuspruch und die Lösung all meiner technischen Probleme während der Arbeit an dieser Dissertation.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Ulrike und Georg Karg, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht haben und denen ich diese Arbeit widme.