

Aus dem Institut für Molekulare Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktorin: Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld)

Sektion Molekulare Onkologie  
(Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Wolfgang Ballhausen)

**IMMORTALISIERUNG PRIMÄRER HUMANER MESENCHYMALER STROMAZELLEN  
ALS ERSTER SCHRITT BEI DER AUFKLÄRUNG PATHOGENETISCHER MECHANISMEN  
DER ENTSTEHUNG VON DESMOIDEN**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von: Richard Nikolaus Bräuer

geboren am 22.9.1985 in Frankfurt am Main

Gutachter:     1. Prof. Dr. Dr. Ballhausen  
                  2. PD Dr. Bartel  
                  3. Prof. Dr. Brückl (Nürnberg)  
                  09.09.2014  
                  15.07.2015

## Referat

Stammzellen sind wesentlich an der Aufrechterhaltung und Regeneration verschiedener humaner Gewebe beteiligt. Multipotente, mesenchymale Stromazellen (MSC) bilden die Grundlage für Gewebe mesodermalen Ursprungs und sind in Wundheilungsreaktionen involviert. Partizipieren infolge von Keimbahnmutationen genetisch veränderte MSC an der Wundheilung, kann dies das Auftreten von bestimmten Weichteiltumoren insbesondere nach chirurgischen Eingriffen erklären. Desmoide sind seltene Formen der Weichteiltumore und werden als semimaligne eingestuft. Insbesondere bei Patienten, die an der Familiären Adenomatösen Polyposis Coli (FAP) leiden, wird über eine Häufung dieser extrakolonischen Manifestation nach operativen Eingriffen berichtet. Mediatoren einer überschießenden Wundheilungsreaktion könnten hierbei beteiligte prämaligene MSC in einen transformierten Zustand versetzen. Aus tumorbiologischer Sicht kommt neben dem bei FAP-Patienten konstitutiv aktivierten *Wnt*-Signalweg ein Synergismus mit dem durch TGF- $\beta$ -vermittelten, wundheilungsbedingten Proliferationsstimulus für mesenchymale Zellen als mögliche Ursache in Frage. Diese These lässt sich durch ein entsprechendes Zellmodell prüfen. *In vitro* lassen sich primäre, von Spendern gewonnene MSC nur vergleichsweise kurz kultivieren. Das aus dem Simian Virus 40 (SV40) stammende Large-T Antigen (LT-Antigen) kann durch Bindung v.a. an das Tumorsuppressorprotein p53 (TP53) zelluläre Apoptosevorgänge hemmen oder sogar unterbinden. Als Beitrag zur Aufklärung einer möglichen Pathogenese sollten in der vorliegenden Arbeit im Rahmen einer präklinischen Studie multipotente, mesenchymale Stromazellen durch Expression von LT-Antigen immortalisiert werden, um einer onkogen induzierten Seneszenz vorzubeugen und die Kultivierungsdauer *in vitro* zu verlängern. Nachdem erste Transfektionsversuche mit einem hierzu entwickelten episomal replizierenden Plasmid aufgrund niedriger Transfektionseffizienzen nicht erfolgversprechend schienen, wurden MSC mittels eines lentiviralen Expressionssystems stabil mit LT-Ag transduziert. Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Zelltypen darzustellen, führten wir zusätzlich Immortalisierungsversuche an primären Vorhautfibroblasten durch. Die aus diesen Versuchen resultierenden transgenen Zelllinien erreichten signifikant höhere kumulative Populationsverdopplungen als ihre zum Vergleich kultivierten Ursprungszellen. In weiteren Experimenten wurden die transgenen MSC auf die für MSC charakteristischen Oberflächenmarker und das Ansprechen auf übliche Differenzierungsprotokolle untersucht. Die LT-positiven MSC wiesen hierbei keine relevanten Unterschiede zu den verwendeten Ursprungszellen auf. Eine maligne Transformation der transgenen MSC durch die Aktivierung des onkogenen LT-Antigens wurde durch Softagarversuche ausgeschlossen. Diese Zelllinien eignen sich damit für die experimentelle Prüfung einer möglichen onkogenen Transformation durch Stimulation der TGF- $\beta$  und Wnt-Signalgebung.

Bräuer, Richard: Immortalisierung primärer humaner mesenchymaler Stromazellen als erster Schritt bei der Aufklärung pathogenetischer Mechanismen der Entstehung von Desmoiden, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2014

# INHALT UND INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Mesenchymale Stammzellen .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Eigenschaften Mesenchymaler Stromazellen und ihre Bedeutung in der Medizin .....	2
1.1.2	Mesenchymale Stromazellen als mögliche Vorläuferzellen für Desmoide.....	4
<b>1.2</b>	<b>Seneszenz .....</b>	<b>9</b>
1.2.1	Onkogen induzierte Seneszenz .....	10
1.2.2	Simian Virus 40 Large-T Antigen.....	11
<b>1.3</b>	<b>Gentransfer in humane Zellen.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4</b>	<b>Immortalisierung humaner Primärzellen durch SV40 Large-T Antigen.....</b>	<b>13</b>
<b>1.5</b>	<b>Zielstellung .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODIK.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Zellen .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Bakterienstämme .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3</b>	<b>Chemikalien und Kits.....</b>	<b>17</b>
<b>2.4</b>	<b>Puffer, Lösungen und Medien .....</b>	<b>19</b>
<b>2.5</b>	<b>Verbrauchsmaterial.....</b>	<b>21</b>
<b>2.6</b>	<b>Kultivierung der Zellen .....</b>	<b>22</b>
<b>2.7</b>	<b>Erstellung einer Wachstumskinetik .....</b>	<b>22</b>
<b>2.8</b>	<b>Durchflusszytometrische Analyse .....</b>	<b>22</b>
<b>2.9</b>	<b>Nachweis des Differenzierungspotentials von MSC.....</b>	<b>23</b>
<b>2.10</b>	<b>Immunfluoreszenzmikroskopie .....</b>	<b>23</b>
<b>2.11</b>	<b>Proteinanalyse und Westernblot .....</b>	<b>24</b>
<b>2.12</b>	<b>Plasmidpräparation und Agarosegelelektrophorese .....</b>	<b>25</b>
<b>2.13</b>	<b>Herstellung der verwendeten Expressionsplasmide .....</b>	<b>26</b>

2.13.1	Plasmide.....	26
2.13.2	Klonierung von pFUW_LTA <sub>g</sub> .....	28
2.13.3	Klonierung von BMGNeo_LTA <sub>g</sub> .....	30
<b>2.14</b>	<b>Generierung transgener Zellen.....</b>	<b>33</b>
2.14.1	Transfektionen .....	33
2.14.2	Generierung infektiöser lentiviraler Partikel.....	34
2.14.3	Lentivirale Transduktion adhärenter Zellen.....	34
<b>2.15</b>	<b>Analyse des Wachstums in Softagar .....</b>	<b>35</b>
<b>2.16</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Klonierung der Expressionsvektoren.....</b>	<b>36</b>
3.1.1	Herstellung des lentiviralen Expressionsplasmids pFUW_LTA <sub>g</sub> .....	36
3.1.2	Herstellung des episomalen Expressionsvektors BMGNeo_LTA <sub>g</sub> .....	37
<b>3.2</b>	<b>Transfektionsexperimente mit BMGNeo_LTA<sub>g</sub>.....</b>	<b>40</b>
3.2.1	Transfektionen von NIH3T3 mit BMGNeo_LTA <sub>g</sub> .....	40
3.2.2	Transfektionen von hMSC mit BMGNeo_LTA <sub>g</sub> .....	40
3.2.3	Transfektionen von NHDF mit BMGNeo_LTA <sub>g</sub> .....	42
<b>3.3</b>	<b>Transfektionen und Transduktionen mit pFUW_LTA<sub>g</sub>.....</b>	<b>44</b>
3.3.1	Transfektionen von NIH3T3 mit pFUW_LTA <sub>g</sub> .....	44
3.3.2	Transduktionen von NHDF mit pFUW_LTA <sub>g</sub> .....	45
3.3.3	Transduktionen von hMSC mit pFUW_LTA <sub>g</sub> .....	46
<b>3.4</b>	<b>Immunpräzipitation von p53 und LT-Ag.....</b>	<b>47</b>
<b>3.5</b>	<b>Charakterisierung der MSC nach Gentransfer von LT-Ag .....</b>	<b>48</b>
<b>3.6</b>	<b>Statistische Analyse der Wachstumsverläufe .....</b>	<b>50</b>
<b>3.7</b>	<b>Charakterisierung der NHDF nach Gentransfer von LT-Ag .....</b>	<b>54</b>
<b>3.8</b>	<b>Ausblick - Stimulierung des Wnt-Signalweges an transgenen MSC.....</b>	<b>57</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Transfektion und Transduktion von MSC.....</b>	<b>59</b>
<b>4.2</b>	<b>Simian Virus 40 und Large T Antigen.....</b>	<b>61</b>

4.2.1	Wachstumsverhalten der kultivierten MSC .....	61
4.2.2	Zellbiologische Auswirkungen der Expression des Large T Antigens auf MSC .....	62
4.2.3	Wachstumsverhalten der kultivierten NHDF .....	66
4.2.4	Zellbiologische Auswirkungen der Expression des Large T Antigens auf NHDF .....	66
<b>4.3</b>	<b>BMGNeo_LTA<sub>g</sub> und pFUW_LTA<sub>g</sub> als labortechnische Werkzeuge .....</b>	<b>68</b>
4.3.1	MSC als Vorläuferzelle für die Entstehung von Desmoiden .....	69
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>THESEN.....</b>	<b>80</b>

**TABELLARISCHER LEBENSLAUF**

**SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG UND**

**ERKLÄRUNG ÜBER BISHERIGE PROMOTIONSVERSUCHE**

**DANKSAGUNG**

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Standardmaßeinheiten, Länderabkürzungen und Enzymbezeichnungen sind nicht aufgeführt. Es wurden jeweils die in der englischen Literatur gebräuchlichen Abkürzungen für Fachtermini verwendet. *Kursiv* hervorgehoben sind englische Begriffe im Abkürzungsverzeichnis sowie in der weiteren Arbeit. Ebenfalls werden lateinische Begriffe und Namen sowie Genbezeichnungen *kursiv* hervorgehoben.

AG	Arbeitsgruppe
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin Resistenz
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BPV	Bovines Papillomavirus
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Differenzierungscluster
cDNA	Komplementäre DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM-HG	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium – High Glucose</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSH	<i>Dishevelled</i> protein
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsorter (Durchflusszytometrie)
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis Coli
FC	Fluoreszenzzytometrie
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FKS	Fetales Kälber Serum
g	Erdanziehungskraft
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3

HBS	HEPES gepufferte Kochsalzlösung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFSZ	MSC aus subkutanem Fettgewebe
HGF	Hepatozytärer Wachstumsfaktor
HIV	Humanes Immunschwäche Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HRP	Meerrettichperoxidase
hTERT	Humane Telomerase
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
ITS	Mischung aus Insulin, Transferrin und Selensäure
kDa	Kilo Dalton
KI	Konfidenzintervall
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
MAD	<i>Mothers against decapentaplegic*</i>
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MSC	Multipotente, mesenchymale Stromazellen
MSC-KM	Mesenchymale Stromazellen aus Knochenmark
MSC-SC	Mesenchymale Stromazellen aus Subkutanfett
MT <sub>p</sub>	Metallothioneinpromotor
NEAA	Nichtessentielle Aminosäuren
Neo <sup>R</sup>	Neomycin Resistenz
NHDF	Normale humane Hautfibroblasten
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NP 40	Nonidet P-40
OIS	Onkogen induzierte Seneszenz
ORF	Offener Leserahmen
ORI	Replikationsursprung

PAS	Perjodsäure / Schiffs Reagenz
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	Populationsverdopplung
PDT	Populationsverdopplungszeit
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RE	Restriktionsendonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMAD3	SMA- AND MAD-RELATED PROTEIN 3*
SMAD4	SMA- AND MAD-RELATED PROTEIN 4*
T <sub>A</sub>	Temperatur der Primerbindung bei PCR
TE	Tris-EDTA Puffer
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
TP53 / <i>TP53</i>	Tumorsuppressorprotein 53 / Tumorsuppressorgen 53
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
UV	Ultraviolett
WB	Western Blot
WRE	<i>woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element</i>
WT	Wildtyp

\* Eigenname aus *Drosophila*

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Mesenchymale Stammzellen

Für die Aufrechterhaltung und Regeneration humaner Gewebe sind differenzierungskompetente Zellen mit hoher Proliferationsfähigkeit notwendig. Diese sogenannten Stammzellen besitzen sowohl das Vermögen zur unbegrenzten, undifferenzierten Selbsterneuerung, können sich aber auch in funktionell ausgereifte Tochterzellen differenzieren und so Wachstums- und Reparaturvorgänge beeinflussen. Es werden *per definitionem* anhand des jeweiligen Differenzierungspotentials verschiedene Formen von Stammzellen unterschieden. Totipotente Stammzellen wie die Zygote oder die Blastomeren der Morula besitzen bis zum 8-Zell-Stadium die Fähigkeit, ausgehend von einer einzelnen Zelle, einen vollständigen Organismus zu bilden. Embryonale Stammzellen können in Zellen und Gewebe aller drei Keimblätter differenzieren, bilden selbst aber kein extraembryonales Gewebe und können somit keinen vollständigen Organismus generieren. Diese Fähigkeit bezeichnet man als Pluripotenz. Die meisten adulten Stammzellen sind multipotent, d.h.: ihre Differenzierungsfähigkeit ist auf bestimmte Zelltypen begrenzt (Schiebler, 2005). Die für diese Aufgabe wesentlichen mesenchymalen Stammzellen bilden die Grundlage für die verschiedenen Formen von Weichteil- und Bindegewebe. Als Transdifferenzierung wird die Differenzierung von Zellen eines Keimblattes in Zellen eines anderen Keimblattes bezeichnet, eine Fähigkeit die bisher nur bei wenigen adulten Stammzellen gezeigt werden konnte (Anderson et al., 2001). Als Beispiel dafür sei die Transdifferenzierung von MSC in hepatozytäre Zellen zu nennen (Sgodda et al., 2007). Vor dem Hintergrund fehlender Spenderorgane in der Transplantationsmedizin werden große Erwartungen in die Zelltherapie insbesondere durch die künstliche Herstellung biologischer Gewebe (*tissue engineering*) gesetzt (Heyde et al., 2007). Möglicherweise lassen sich durch Transdifferenzierungsverfahren neue therapeutische Ansätze etablieren und so gezielt geschädigtes Gewebe ersetzen oder reparieren. Ein großer Vorteil der Verwendung adulter Stammzellen gegenüber embryonalen Stammzellen besteht in der Umgehung ethischer Konflikte, die mit der Forschung an embryonalen Stammzellen einhergehen.

In der Arbeit von Friedenstein aus dem Jahr 1970 werden erstmals fibroblastenähnliche, aus dem Knochenmark isolierte, in Plastikadhärenz wachsende Zellen beschrieben. Diese Zellen wachsen *in-vitro* in fibroblastenähnlichen Kolonien und wurden zunächst als *colony-forming unit-fibroblast* (CFU-F) bezeichnet (Friedenstein et al., 1970). Spätere Untersuchungen können zeigen, dass jeder dieser Kolonien eine zu diesem Zeitpunkt als mesenchymale Stammzelle bezeichnete Zelle zugrunde liegt (Caplan, 1991; Pittenger, 1999). Mesenchymale Stammzellen lassen sich aus einer Vielzahl humaner Gewebe wie Knochenmark, Fettgewebe, Knorpel oder

Amnionflüssigkeit extrahieren. *In-vivo* bilden diese Zellen die Grundlage zu den Reparatur- und Differenzierungsvorgängen des Binde- und Weichteilgewebes.



**Abb. 1:** Mikroskopisches Bild humaner mesenchymaler Stromazellen mit freundlicher Genehmigung der AG Müller (KIM IV). Bei den abgebildeten MSC handelt es sich um aus dem Knochenmark stammende Zellen der Passage 2 (Originalvergrößerung 100-fach, der Größenmarker entspricht 100  $\mu\text{m}$ ).

Da die bisher in der Literatur charakterisierten Zellen eine heterogene Zellpopulation darstellen und sich aktuell kein spezifischer Stammzellmarker nachweisen lässt, wurde für diese Zellen der Begriff der multipotenten, mesenchymalen Stromazelle (MSC) eingeführt. Es wird daher durch die internationale Gesellschaft für Zelltherapie (ISCT) vorgeschlagen, dass der Begriff der mesenchymalen Stammzelle für diejenige Zellpopulation reserviert bleiben soll, die diese Stammzellkriterien vollständig erfüllt. MSC weisen unbestritten multipotentes Differenzierungspotential auf. Die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Regeneration, welche eine charakteristische Stammzeleigenschaft darstellt, scheinen von diesen Zellpopulationen jedoch nur unzureichend erfüllt zu werden. Obwohl die Abkürzung MSC in der Literatur bisher häufig mesenchymale Stammzellen bezeichnet, wird durch die ISCT empfohlen die Abkürzung auch für multipotente, mesenchymale Stromazellen beizubehalten um Kontinuität im wissenschaftlichen Diskurs zu gewährleisten und Verwirrung zu vermeiden (Horwitz et al., 2005). Aus den oben genannten Gründen werde ich im Rahmen meiner Dissertation durchgehend den Begriff der multipotenten, mesenchymalen Stromazelle (MSC) verwenden da dieser Ausdruck derzeit wissenschaftlich präziser ist ohne bislang unbewiesenes biologisches oder therapeutisches Potential zu implizieren.

### **1.1.1 Eigenschaften Mesenchymaler Stromazellen und ihre Bedeutung in der Medizin**

Wie bereits zuvor erläutert, lassen sich MSC aus unterschiedlichen Geweben isolieren. Die Rolle der MSC in den jeweiligen Geweben ist bisher nicht abschließend geklärt, es liegt aber nahe, eine physiologische Funktion zu vermuten. Die aus dem Knochenmark isolierten MSC scheinen an der Regulation von Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer

Stammzellen (HSC) beteiligt zu sein und damit auch eine Rolle in der Hämatopoese zu spielen (Valtieri and Sorrentino, 2008). Die für die hämatopoetische Entwicklung notwendige Umgebung wird wesentlich durch MSC und durch die daraus differenzierenden Stromazellen beeinflusst (Huang and Terstappen, 1992). Die aus Fettgewebe gewonnenen Fettstammzellen besitzen ähnliche Eigenschaften wie die aus Knochenmark stammenden MSC Populationen. Neben einem multipotenten Differenzierungspotential in mesodermale Zelltypen wie Osteozyten, Chondrozyten und Adipozyten wird auch über Möglichkeiten der Transdifferenzierung in Zellen mit neuronalem und hepatozytärem Phänotyp berichtet (Zuk et al., 2002; Sgodda et al., 2007). Die von der Forschungsgruppe um Patricia Zuk untersuchten Zellen erfüllen die untersuchten Konsensuskriterien in gleicher Weise wie die als Vergleich verwendeten aus Knochenmark stammenden MSC. Das Muster der mittels FACS-Analyse bestimmten Oberflächenmerkmale (CD29+, CD44+, CD71+, CD90+, CD105/SH2+, SH3+, STRO-1+, CD13+, CD14-, CD16-, CD56-, CD61-, CD62E-, CD104-, CD106-, CD31-, CD34-, CD45-) ist deutlich weiter gefasst als dies entsprechend der später publizierten Konsensusdefinition gefordert wurde (Dominici et al., 2006). Weiterhin fehlt im Vergleich zu den Konsensusmerkmalen die Bestimmung von CD73+, CD14- oder CD11b-, CD79a- oder CD19- und HLA-DR- weshalb zu vermuten ist, dass es sich möglicherweise um differente Subpopulationen multipotenter, mesenchymaler Stromazellen handelt. Auch in anderen Organen und Geweben lassen sich MSC unter anderem als Gefäß-assoziierte Perizyten nachweisen, die vermutlich an der Gewebsregeneration beteiligt sind (Crisan et al., 2008). Insgesamt besteht leider eine hohe Varianz hinsichtlich der untersuchten Zellen und der jeweiligen Charakterisierung innerhalb der zu dieser Thematik publizierten Literatur, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse deutlich einschränkt. Das vielfältige Differenzierungspotential der MSC hat Hoffnungen auf eine therapeutische Verwendung beispielsweise als Zellersatz nach Myokardinfarkten, Muskeltraumata oder auch im Rahmen genetischer Erkrankungen wie der Osteogenesis imperfecta geweckt. Einige klinische, randomisierte Studien zeigen die prinzipielle Wirksamkeit einer regenerativen Therapie durch Stammzellen. Bis zur Anwendung in der klinischen Routine bleibt aber weiterhin ein hoher Forschungsbedarf (Tögel et al., 2007).

In der Vergangenheit waren die Ergebnisse unterschiedlicher Forschungsgruppen, die sich mit mesenchymalen Stromazellen beschäftigten, nur bedingt vergleichbar. Die verschiedenen Forschungsgruppen verwendeten unterschiedliche Methoden zur Isolation der Zellpopulationen aus dem Ursprungsmaterial (Plastikadhärenz, Dichtegradientenzentrifugation und immunologische Separation). Aber auch die Kultivierungsbedingungen im Hinblick auf den Zusatz von Wachstumsfaktoren oder fetalem Kälberserum variierten deutlich. In Ermangelung eines allgemein akzeptierten Kriteriums zur Definition multipotenter, mesenchymaler

Stromazellen werden im Rahmen eines Konsensus die folgenden Eigenschaften als definierende Charakteristika benannt (Dominici et al., 2006).

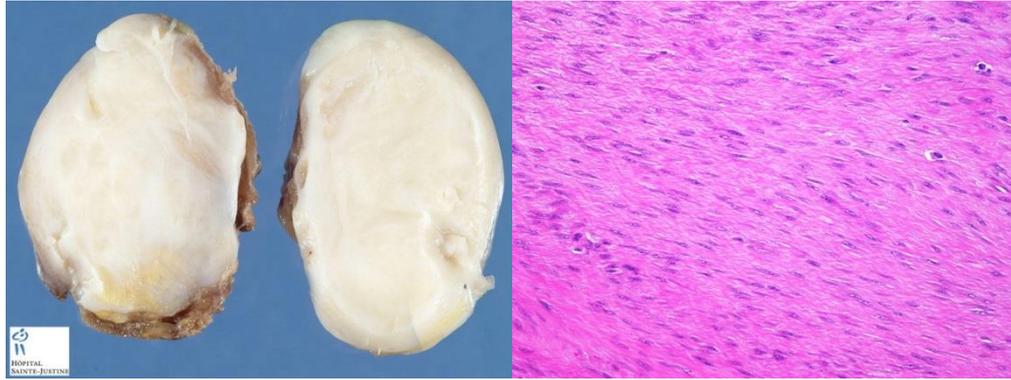
- Plastikadhärenz unter Standardkulturbedingungen
- Expression eines spezifischen Oberflächenantigenmusters
- Multipotentes Differenzierungspotential

Das für MSC spezifische Oberflächenantigenmuster besteht in der Expression von CD105, CD73 und CD90 durch mindestens 95 % der Zellpopulation. Zusätzlich dürfen höchstens 2 % der Zellpopulation CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79a oder CD19 und HLA-DR exprimieren. Das multipotente Differenzierungspotential wird durch die Fähigkeit zur *in-vitro*-Differenzierung in Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten mittels histochemischer Färbungen nachgewiesen.

Die Erfahrungen aus der klinischen Praxis haben bestimmte Eigenschaften von MSC aufgezeigt, die weiterer Ausführung bedürfen. MSC verfügen über ausgeprägte Reparaturmechanismen zur Korrektur von DNA-Strangbrüchen sowie eine im Vergleich zu anderen Zelltypen effektivere Antwort auf oxidativen Stress. Dies führt zu einer vergleichsweise hohen Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung (Chen et al., 2006). Verschiedene publizierte Daten deuten auf eine hohe Widerstandsfähigkeit von MSC gegenüber potentiell genotoxischen Einflüssen sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. An Patienten mit maligner Grunderkrankung lassen sich auch nach Chemotherapie MSC aus Knochenmark gewinnen (Lützkendorf, 2010). In Empfängern nach allogener Knochenmarkstransplantation, die zuvor einer myeloablativen Behandlung unterzogen wurden, stammt sogar der überwiegende Teil der untersuchten MSC weiter vom Empfänger (Koc et al., 2002). Diese Ergebnisse deuten auf eine außerordentliche Resistenz der MSC gegenüber genotoxischen Einflüssen von Radio- und Chemotherapie hin. Auch *in-vitro* Untersuchungen zur Chemotherapieresistenz von MSC bestätigen eine ausgeprägte Apoptoseresistenz gegenüber typischen in der klinischen Praxis verwendeten Chemotherapeutika (Müller et al., 2006).

### **1.1.2 Mesenchymale Stromazellen als mögliche Vorläuferzellen für Desmoide**

Desmoide, die im klinischen Kontext auch synonym als aggressive Fibromatose bezeichnet werden, sind eine seltene Form von Weichteiltumoren. Erstmals von McFarlane im Jahr 1832 beschrieben, leitet sich der Begriff Desmoid von dem griechischen Wort *desmós* für Band oder Sehne ab (MacFarlane and Robertson, 1832).



**Abb. 2:** Makroskopisches Bild eines extraabdominellen Desmoids (links) mit freundlicher Genehmigung von Dr. JC. Fournet (Universität Descartes, Paris) und mikroskopisches Bild eines Desmoids (rechts) mit freundlicher Genehmigung von Dr. D. Ramnani (<http://www.webpathology.com/>)

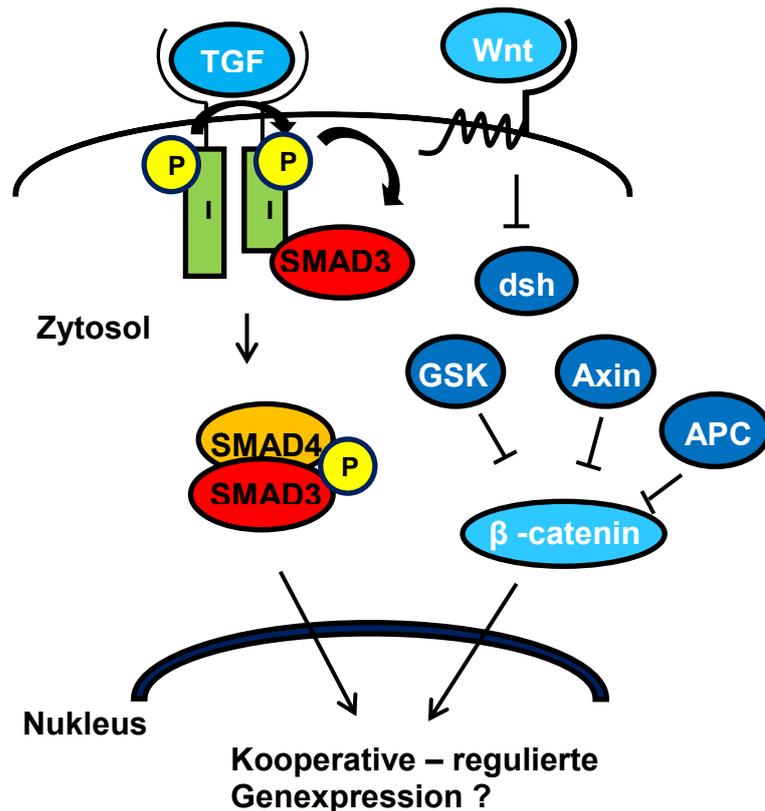
Desmoide bilden sich vor allem im Bereich der Muskelfaszien und wachsen von dort aus lokal infiltrativ und destruierend. Da Desmoide in der Regel keine Metastasen bilden, werden sie als niedrigmaligne Form der Sarkome eingestuft. Die Inzidenz ist mit 2,4-4,3 Neuerkrankungen pro 1.000.000 Einwohner niedrig. Jedoch tritt bei Patienten mit Familiärer Adenomatosis Coli die Erkrankung bei 15 % der Patienten mit Darmkrebs und damit deutlich häufiger auf. Während im Rahmen eines Gardner Syndroms bei FAP-Patienten mit Auftreten von Osteomen und Desmoid-Tumoren eine genetische Ursache der Erkrankung beschrieben wird, tritt der überwiegende Anteil der Desmoide sporadisch auf (Riede et al., 2004).

Die Therapie der aggressiven Fibromatose bestand bis zum Jahr 2000 vor allem aus einer chirurgischen Entfernung des Tumors (Heiskanen and Järvinen, 1996). Die operationsassoziierten Komplikationen haben aufgrund des niedrigmalignen Charakters der Tumorform zu einem Umdenken geführt. Bei hohen Rezidivraten nach lokaler Sanierung und trotz R0-Resektion wird heute allgemein eine restriktive Indikationsstellung zur Operation empfohlen. Die Autoren empfehlen in der Publikation von Bonvalot et al. aus dem Jahr 2012 eine „wait and see“-Strategie für die Initialbehandlung der meisten Desmoiderkrankungen. Das Auftreten von Spontanremissionen oder ein Wachstumsarrest bei einem Teil der Erkrankten scheint diese Zurückhaltung zu rechtfertigen. Eine chirurgische Intervention ist ausgehend von der aktuellen Literatur nur bei Versagen anderer Therapieoptionen, ausgeprägten Befunden oder Komplikationen, wie ein drohender Darmverschluss, Gefäß- oder Darmperforationen indiziert. (Bonvalot et al., 2012). Neben der chirurgischen Intervention sind hormonelle Behandlungen, Radio- und Chemotherapie als weitere zusätzliche Therapieoptionen in die klinische Praxis eingeführt worden. Während ältere Daten ein nur schlechtes Ansprechen bei schwerwiegenden Komplikationen auf eine systemische, zytotoxische Chemo- oder Radiotherapie beschreiben (Tsukada et al., 1991), wird in der aktuellen Literatur über deutlich bessere Ergebnisse berichtet. Alleinige und adjuvante Strahlentherapie führt im Vergleich zu rein chirurgischem Vorgehen signifikant häufiger zu einer lokalen Kontrolle der Erkrankung auch nach unvollständiger

Tumorresektion (Nuyttens et al., 2000). Auch wenn die Wahrscheinlichkeit lokaler Kontrolle durch externe Radiotherapie bei multiplen Rezidiven sinkt, scheint diese eine effektive Therapieoption zu sein (Zlotecki et al., 2002). Obwohl aufgrund des in der Regel langsamen Progresses und niedriger Zellteilungsrate der Erfolg klassischer zytotoxischer Chemotherapeutika unwahrscheinlich erscheint, werden in der Literatur positive Ergebnisse insbesondere nach Doxorubicin-basierter Chemotherapie berichtet (Molloy et al., 2012). Zusätzlich kommen zur Therapie nichtsteroidale Antirheumatika (NSAID), beispielsweise Meloxicam als Cyclooxygenase-2-Hemmer, oder Antiöstrogene wie Tamoxifen zur Therapieoptimierung bei gleichzeitiger Reduktion der Nebenwirkungen zum Einsatz. Durch den seltenen Charakter der Erkrankung fehlt es bisher an großen Studien zu dieser Thematik, weshalb derzeit auch keine allgemein anerkannte Therapieempfehlung existiert. Die meisten aufgeführten Studien beziehen sich auf eine relative geringe Fallzahl. Für die Zukunft wären weitere multizentrische Studien notwendig, um auf diesem Gebiet Klarheit zu schaffen. Die Molekularbiologie erlaubt möglicherweise durch detaillierte Untersuchungen in der Zukunft besser im Voraus zwischen den schweren, rapide progressiven und benignen Verlaufsformen zu unterscheiden. So ergibt sich die Option, eine individualisierte Therapiestrategie, die auf den einzelnen Patienten adaptiert ist, zu etablieren.

Die bereits erwähnte überproportionale Häufung von aggressiver Fibromatose bei FAP-Patienten hat Anlass für Untersuchungen nach molekulargenetischen Ursachen für die Entstehung von Desmoiden gegeben. Eine erbliche Mutation im APC-Gen führt bei diesen Patienten zu einer Stabilisierung und Kernlokalisierung des  $\beta$ -Catenin Proteins. Die Folge ist eine Überaktivierung des mitogenen *Wnt*-Signalwegs mit daraus resultierendem Wachstumsstimulus, unkontrollierter Zellproliferation und maligner Transformation. Klinisch zeigt sich die klassische Form der Erkrankung zunächst durch das massiv gehäufte Auftreten von Kolonpolypen mit der Tendenz zur malignen Entartung. Die FAP gilt als obligate Präkanzerose für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms, weshalb den betroffenen Patienten die frühzeitige, prophylaktische Kolektomie empfohlen wird (Galiatsatos and Foulkes, 2006). Das Auftreten von Desmoiden gehört im Rahmen einer FAP zu den häufigsten zum Tode führenden Komplikationen (Arvanitis et al., 1990). Auf der Suche nach molekulargenetischen Ursachen für die Häufung von Desmoiden bei FAP stand zunächst besonders der *Wnt*-Signalweg aufgrund der bekannten APC-Mutationen im Fokus. In immunhistochemischen Analysen zeigen 98 % der Desmoide eine Kernlokalisierung von  $\beta$ -Catenin. Tatsächlich lassen sich auch in sporadisch auftretenden Desmoiden in bis zu 85 % der Fälle Mutationen im *CTNNB1* Genlocus selbst nachweisen, die auch zu einer stabilisierten Form von  $\beta$ -Catenin führen und signifikant mit der Rezidivwahrscheinlichkeit korrelieren (Lazar et al., 2008). Insgesamt spielen Mutationen in den *APC* und *CTNNB1* Genen in bis zu 89 % der Fälle eine

wichtige Rolle in der Tumorgenese (Salas et al., 2010). Obwohl die Assoziation von Desmoiden und onkogenen Mutationen im *Wnt*-Signalweg einen Zusammenhang sehr wahrscheinlich macht, bleibt die hohe Varianz der Krankheitsverläufe weiterhin ungeklärt. Neben der erwähnten *Wnt*-Signalkaskade sind vermutlich noch weitere Faktoren für das Krankheitsgeschehen von Relevanz. Desmoide treten bei Frauen etwa doppelt so häufig auf wie bei Männern (Riede et al., 2004). Dieses ungleiche Geschlechterverhältnis sowie das Ansprechen mancher Formen von Desmoiden auf eine antiöstrogene Therapie oder auf die Behandlung mit COX-2-Hemmern lässt hormonbedingte Wachstumsstimuli vermuten. Verschiedene Publikationen zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen vorausgegangenen chirurgischen Interventionen und dem Auftreten einer aggressiven Fibromatose (Soravia et al., 2000). Möglicherweise führen die im Rahmen einer Wundheilungsreaktion ausgeschütteten Wachstumsfaktoren, insbesondere bei entsprechender Prädisposition, zur malignen Transformation. Der transformierende Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ist ein im Rahmen von Wundheilungsreaktionen und fibrosierenden Prozessen beteiligtes Zytokin (Fathke et al., 2004). Nach Aktivierung des membranständigen Rezeptors wird über einen aus SMAD3 und SMAD4 bestehenden Heterodimerkomplex Transkription und Translation beeinflusst (Wrana et al., 1992). In der folgenden Abbildung sind der *Wnt*-Signalweg und die TGF- $\beta$ -abhängige Signalkaskade dargestellt. Die Abbildung zeigt den genannten Heterodimerkomplex SMAD3/SMAD4 nach Stimulierung der Zelle durch TGF- $\beta$ . Bestimmte Mutationen des APC-Gens können den Abbau von  $\beta$ -Catenin durch ein funktionsloses APC-Protein erheblich stören. In der Folge kommt es zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration von  $\beta$ -Catenin entsprechend einer pathologischen Überaktivierung des *Wnt*-Signalwegs. Experimentell lässt sich eine physische Interaktion der Endstrecke der beiden unabhängigen Signalwege zeigen. Die gemeinsame Stimulation der beiden Signalwege führt zu einer deutlichen Steigerung der Genexpression bestimmter Zielgene (Letamendia et al., 2001).



**Abb. 3:** Intrazelluläre Signalkaskade der TGF- $\beta$  und Wnt-Faktoren. Abbildung modifiziert entnommen aus (Letamendia et al., 2001).

Über die in Abb. 3 skizzierten Wege hinaus lässt sich die Interaktion von *Wnt*- und TGF- $\beta$ -Signalweg bei MSC nachweisen. So realisiert TGF- $\beta$  in MSC den Prozess der Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Kern durch eine SMAD3-vermittelte Transportfunktion. Dies führt physiologisch zu einer Stimulation der Proliferation und verhindert die osteozytäre Differenzierung von MSC (Jian et al., 2006). Die gemeinsame Stimulation der beiden Signalwege führt auch im Mausmodell zu einer synergistischen Aktivierung bestimmter Zielgene. Diese Interaktion kann in der Folge das Spektrum exprimierter Gene entscheidend beeinflussen (Lei et al., 2004). In Betracht der Häufung von Störungen der *Wnt*-Signalgebung bei Desmoiden ist eine pathophysiologische Relevanz einer Koaktivierung von *Wnt*- und TGF- $\beta$  zumindest denkbar. Es bleibt zu klären, ob vielleicht diese Verbindung eine Erklärung für die hohe Varianz der Krankheitsverläufe darstellt. Möglicherweise besteht in der Zukunft die Aussicht, durch Verbesserung der Diagnostik im Sinne einer Identifikation relevanter molekularer Marker, rapide progressive Verlaufsformen früher zu erkennen.

Eine maligne Transformation von MSC *in vitro* wurde bereits von verschiedenen Forschungsgruppen beschrieben. Im Rahmen von Versuchen zur Immortalisierung von MSC können diese nach intensiver Subkultivierung, möglicherweise durch im Laufe der Passagen erworbene weitere onkogene Aktivierungen, maligne entarten (Tatrai et al., 2012). Die

Datenlage in Hinblick auf eine mögliche spontane Transformation von MSC ist widersprüchlich. Es gibt Publikationen, die über eine spontane maligne Transformation von MSC nach intensiver Langzeitkultivierung berichten (Rosland et al., 2009), während diese These von anderen Forschungsgruppen abgelehnt wird (Bernardo et al., 2007). Die von Rubio et al. 2005 publizierte Arbeit, in der spontane Transformationen von MSC beobachtet wurden, ist 2010 aufgrund fehlender Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zurückgezogen worden (Rubio et al., 2005). Weiterhin wurde eine maligne Entartung von MSC nach gemeinsamer ektopter Expression von SV40-LTAg, hTERT und H-ras beobachtet. Die resultierenden Zellen entsprechen phänotypisch Osteosarkomzellen (Li et al., 2009). Theoretisch ist eine vergleichbare Kausalkette pathophysiologisch für die Entstehung von Desmoiden aus MSC verantwortlich. Tierexperimentelle Daten unterstützen diese Hypothese (Wu et al., 2010). Die pathologische Aktivierung des *Wnt*-Signalweges mit zusätzlicher Überstimulation der TGF- $\beta$  Signalkaskade ist eine potentielle Kombination pathogenetisch relevanter onkogener Faktoren. Vorversuche zu der vorliegenden Arbeit ergaben, dass in entsprechend manipulierten MSC eine onkogen induzierte Seneszenz (OIS) durch aktiviertes  $\beta$ -Catenin ausgelöst wird und diese Zellen dann in Apoptose gingen. Hingegen könnte durch Ausschaltung von OIS infolge eines Funktionsverlusts von TP53 in diesen Zellen unter Umständen eine maligne Transformation ausgelöst werden. Möglicherweise lässt sich auf diese Weise die Kausalkette in der Tumorgenese der Desmoide vervollständigen und eine Tumorstammzelle etablieren.

## 1.2 Seneszenz

Das Zusammenspiel von Zellproliferation, Wachstum und Alterung von Zellen ist innerhalb der Gewebe und des menschlichen Organismus in einem hohen Maße organisiert und geregelt. Die Abfolge von Zellteilungs- und Differenzierungsvorgängen auf der einen Seite wird durch Alterungs- und Apoptosevorgänge auf der anderen Seite ergänzt. Als Apoptose wird der organisierte, programmierte Zelltod bezeichnet. Das Wort Apoptose wird von dem griechischen Wort *apoptosis* für „abfallen“ abgeleitet und steht im Gegensatz zu dem unkontrollierten Zelltod, der Nekrose. Zelluläre Apoptosevorgänge können sowohl von außen durch fremde Zellen, als auch durch zellinterne Signalmoleküle induziert werden. Der programmierte Zelltod hat die Aufgabe, den geregelten Ablauf von Zellproliferation und Zellerneuerung innerhalb eines Gewebes sicherzustellen, ohne dass inflammatorische Prozesse im Körper induziert werden. Diese aufwändig regulierten Vorgänge bieten dem Organismus die Möglichkeit, infizierte, überflüssige oder geschädigte Zellen zu entsorgen. Auf diese Weise werden die benachbarten Zellen im Gegensatz zu den Vorgängen im Rahmen einer von Nekrose ausgelösten Immunantwort nicht geschädigt (Gulbins and Lang, 2005).

Während man lange davon ausging, dass Zellen *in-vitro* unbegrenzt teilungsfähig seien, wurde diese Annahme nach Experimenten aus dem Jahr 1961 widerlegt. Die meisten humanen Zellen

unterlaufen nach einer bestimmten Anzahl von Populationsverdopplungen einem Zellalterungsprozess, der als replikative Seneszenz bezeichnet wird. Im Rahmen der Zellteilung kommt es zu einer Verkürzung der Telomere, die nach einer von der Telomerlänge bestimmten Zahl von Teilungen zu einem Proliferationsarrest führt. Die Zellen verharren nach Erreichen einer bestimmten kritischen Telomerlänge bei erhaltener metabolischer Funktion in diesem Wachstumsarrest (Wege und Brümmendorf, 2010). Mikroskopisch lassen sich an seneszenten Zellen Anreicherungen von Lipofuszin, einem Abfallprodukt aus Proteinen und Lipiden nach oxidativem Stress, und andere morphologische Auffälligkeiten nachweisen.

### **1.2.1 Onkogen induzierte Seneszenz**

Eine andere Ursache zellulärer Seneszenz kann die Aktivierung onkogener Signalwege sein und dadurch ebenfalls zu einem Proliferationsarrest führen. Auf diese Weise werden Zellen, die aufgrund von DNA-Mutationen, oxydativem Stress oder anderen Faktoren potentiell maligne Veränderungen erworben haben, an der weiteren Proliferation gehindert. Der als onkogen induzierte Seneszenz bezeichnete Wachstumsstop stellt einen zellulären Schutzmechanismus vor maligner Entartung auf zellulärer Ebene und damit Krebsentstehung für den Organismus dar (Yaswen and Campisi, 2007). Dem Tumorsuppressorprotein TP53 kommt im Rahmen dieser zellulären Schutzprozesse eine zentrale Rolle zu. Als Transkriptionsfaktor beeinflusst TP53 die Expression einer Reihe von Genen und reguliert den Zellzyklusarrest für DNA-Reparaturprozesse, die Apoptoseinduktion oder die zelluläre Seneszenz. Am besten erforscht ist derzeit die Aktivierung von TP53 durch DNA-Schäden, weshalb TP53 auch als der Wächter des Genoms bezeichnet wird (Lane, 1992). Weiterhin beeinflusst TP53 in seiner Rolle als Tumorsuppressor zusätzlich metabolische Prozesse und wirkt am Erhalt der zellulären Homöostase mit (Liang et al., 2013). In den Vorversuchen zu der vorliegenden Arbeit wurden MSC gentechnisch verändert, um eine Stimulation des *Wnt*-Signalweges bzw. der TGF- $\beta$  Signalkaskade zu simulieren. Entgegen der Erwartungen zeigten die manipulierten Zellreihen keinen Wachstumsvorteil, sondern eine deutlich erhöhte Seneszenz- und Apoptoseeigung. Möglicherweise sind die eingeführten onkogenen Mutationen der behandelten MSC Auslöser einer onkogen induzierten Seneszenz und damit ursächlich für die gesteigerte Apoptoserate. Um die Auswirkungen dieser potentiell onkogenen Stimulation weiter untersuchen zu können, sollten die nächsten Versuche unter Inhibition der TP53-vermittelten onkogen induzierten Seneszenz stattfinden.

### **1.2.2 Simian Virus 40 Large-T Antigen**

Das zur Gattung der Polyomaviren gehörende Simian Virus 40 (SV40) wurde 1960 erstmalig in der Kultur von aus dem Rhesusaffen stammenden Nierenepithelzellen nachgewiesen. Das zirkuläre, doppelsträngige Genom von SV40 kodiert vermutlich mindestens 6 virale Proteine; hierzu zählen unter anderem das Large Tumor Antigen (LT-Ag) und das Small Tumor Antigen (t-Ag). Nachdem zwischen 1955 und 1963 in Poliomyelitisimpfstoffen Verunreinigungen durch SV40 nachgewiesen wurden, sind eine Reihe unterschiedlicher humaner Tumore wie Mesotheliome, Osteosarkome, Non-Hodgkin Lymphome oder Hirntumore in Verbindung mit SV40 gebracht worden. Obwohl *in-vitro* Daten auf ein onkogenes Potential hindeuten, lässt sich aus den bisherigen Daten keine eindeutige Evidenz für oder gegen eine ursächliche Bedeutung von SV40 Infektionen für die Genese der genannten Tumorformen am Menschen ableiten (Shah, 2007). Das onkogene Potential von SV40 ist vor allem auf die Interaktionen von LT-Ag und t-Ag mit TP53 und Proteinen aus der Retinoblastom (RB)-Familie zurückzuführen (Martini et al., 2007).

### **1.3 Gentransfer in humane Zellen**

Für die Erforschung intrazellulärer Signalwege und ihrer spezifischen Auswirkungen ist die gezielte genetische Modifikation zu untersuchender Zellen ein wichtiger Baustein. Es gibt mittlerweile eine Vielzahl verschiedener physikochemischer Methoden des Gentransfers in humane Zellen, die sich in Bezug auf den notwendigen Aufwand oder die verwendeten Materialien und Geräte zum Teil deutlich unterscheiden (Bleiziffer et al., 2007).

Viele Bakterien besitzen die Fähigkeit freie DNA aufzunehmen. Die non-virale Übertragung freier DNA in kompetente Bakterienzellen wird als Transformation bezeichnet. Häufig befinden sich auf den transformierten Plasmiden Gene, die unter bestimmten Bedingungen einen Selektionsvorteil bieten. Hierzu zählen Fähigkeiten zur Toxinbildung oder Resistenzen gegenüber Antibiotika oder anderen äußeren Noxen. Die plasmidbasierte Resistenzbildung gegenüber verschiedener Antibiotika erschwert die Therapie bakterieller Infektionen im klinischen Alltag deutlich (Josenhans et al., 2009). In der Forschung hat man sich diese Fähigkeit bestimmter Bakterien zur Plasmidvermehrung zu Nutze gemacht. Kompetente *E. coli* Stämme werden labortechnisch verwendet, um bakterielle Plasmide zu amplifizieren.

Da der Begriff der Transformation für humane Zellen den Prozess der malignen Entartung beschreibt, wird der non-virale Gentransfer in humane Zellen als Transfektion bezeichnet. Es wird hierbei zwischen transienten und stabilen Formen der Transfektion unterschieden. Durch intrazelluläre DNase-basierte Abbauprozesse wird freie Fremd-DNA im Zytoplasma humaner Zellen rasch abgebaut. Eine vorübergehende, also transiente Expression der eingeschleusten

Gene ist die Folge. Um eine dauerhafte Expression der transfizierten Gene zu erzielen, ist eine Genomintegration der entsprechenden DNA-Abschnitte notwendig. Der Einbau in das Wirtsgenom schützt die eingeschleuste Fremd-DNA vor zellulären Abbauprozessen. Die Genomintegration der eingeschleusten DNA geschieht in der Regel an zufälliger Stelle und birgt damit für die Wirtszelle eine Reihe von Risiken. Intakte Gene der Wirtszelle können beispielsweise durch die Insertion der transfizierten DNA an kritischer Stelle modifiziert oder beschädigt werden. Dieser Vorgang wird als Insertionsmutagenese bezeichnet. Für den Gentransfer von Plasmid-DNA in humane Zellen werden chemische und physikalische Methoden verwendet. Zu den am häufigsten verwendeten Transfektionsmethoden zählen die Lipofektion und die Elektroporation. Bei der Lipofektion wird die Plasmid-DNA durch Vesikel, die mit der Zellmembran der Wirtszelle fusionieren, in die Zelle hineingebracht. Elektrische Pulse verändern im Rahmen der Elektroporation die Durchlässigkeit der Zellmembran. Die entstehenden Poren machen die Zellmembran für Sekundenbruchteile permeabel für die zu transfizierende DNA. Da nur ein Teil der Poren sich spontan wieder verschließt, ist diese Transfektionsmethode mit großem Stress für die Wirtszellen verbunden. Nur unter Inkaufnahme einer deutlichen Abnahme der Zellviabilität sind im Experiment an humanen Zellen akzeptable Transfektionsraten zu erreichen. Obwohl non-virale Transfektionsmethoden den Vorteil der vergleichsweise einfachen und kostengünstigen Anwendung bieten, sind die deutlich niedrigeren Transfektionseffizienzen im Vergleich mit viralen Transduktionsmethoden trotz Fortschritten derzeit von Nachteil.

Eine andere Möglichkeit des Gentransfers in humane Zellen ist die Verwendung viraler Vektoren. Dieser als Transduktion bezeichnete Vorgang hat im Vergleich zu den bereits genannten chemischen und physikalischen Transfektionsmethoden den Vorteil einer meist deutlich höheren Transfektionseffizienz bei gleichzeitig häufig besserer Verträglichkeit für die manipulierte Zellpopulation. Einen Überblick über die unterschiedlichen viralen Vektoren bietet die Übersichtsarbeit von Zhang und Godbey aus dem Jahr 2006 (Zhang and Godbey, 2006). Adenoviren können eine Vielzahl humaner Zellen infizieren und eignen sich für die Transduktion ruhender und teilender Zellen. Adenoviren integrieren nicht in das Wirtsgenom, weshalb die Transgenexpression in der Regel nur transient ist. Das neurotrope Herpes Simplex Virus eignet sich vor allem für die Transduktion neuraler Zellen (Lilley et al., 2001). Die meisten verwendeten viralen Transduktionsvektoren gehören zu der Gruppe der Retroviren, deren Biologie mittlerweile als weitgehend erforscht gilt. Die Integration des Virusgenoms stellt einen Vorteil dar und ermöglicht eine hohe Effizienz stabiler Transduktionen. Aufgrund der Forderung nach maximaler Sicherheit in der Anwendung hat sich die Verwendung replikationsdefizienter, viraler Partikel durchgesetzt. Zum Schutz vor Rückmutation und unkontrollierter Vermehrung der viralen Partikel werden die genetischen Informationen auf

mehrere verschiedene Plasmide verteilt, die gemeinsam in eine Verpackungszelllinie transfiziert werden müssen. Lentiviren, die eine Untergruppe der Retroviren darstellen, können im Gegensatz zu anderen Retroviren wie dem murinen Leukämievirus auch ruhende Zellen infizieren. Diese Eigenschaft stellt einen großen Vorteil bei der Transduktion der als langsam teilend beschriebenen (Banfi et al., 2000), multipotenten, mesenchymalen Stromazellen dar. In der Literatur werden bis zu 20% der MSC-Population als ruhende Zellen angegeben (Conget and Minguell, 1999). Die Verwendung lentiviraler Transduktionssysteme ermöglicht somit im Vergleich zu der Verwendung von Retroviren deutlich höhere Transduktionseffizienzen. Das humane Immunschwächevirus (HIV) bietet die Grundlage für die meisten derzeitigen lentiviralen Transduktionssysteme. Sicherheitsoptimierte lentivirale Expressionssysteme bestehen aus insgesamt vier Plasmiden, wozu neben dem Expressionsplasmid ein Hüllproteinplasmid und zwei Verpackungsplasmide gehören. Ein selbst-inaktivierendes 3'-*long terminal repeat* (LTR) minimiert das Risiko der Generierung replikationskompetenter Lentiviren. LTRs sind regulatorische Kontrollsequenzen in den nicht kodierenden, endständigen DNA-Abschnitten, die die Transkription steuern und für die Integration in das Wirtsgenom wichtig sind (Roßmann, 2008). Nach reverser Transkription führt eine Deletion in der U3-Region des 3'-LTR zu einer Inaktivierung der 5'-LTR (Lützkendorf, 2010), wodurch aktuellen Sicherheitsempfehlungen entsprochen wird.

#### **1.4 Immortalisierung humaner Primärzellen durch SV40 Large-T Antigen**

Die Interaktion von LT-Ag mit TP53 und Proteinen der RB-Familie kann zelluläre Apoptosevorgänge hemmen oder sogar unterbinden. Das 708 Aminosäuren große LT-Ag besitzt eine molekulare Masse von etwa 81 kDa und bindet an das DNA-Bindungssepitop von TP53. Die LT-Ag-Bindung verhindert die Interaktion von TP53 mit DNA-Promoterregionen und somit die Expression von Zielgenen. Zusätzlich scheint die Blockierung von TP53 durch LT-Ag noch über weitere, von der Bindungsstelle unabhängige, Mechanismen zu erfolgen (Ahuja et al., 2005). Die durch Seneszenz begrenzte Zeitspanne der *in-vitro* Kultivierung von Primärzellen initiierte bereits frühzeitig experimentelle Strategien zur Immortalisierung zu untersuchender Zellreihen. Das SV40 LT-Ag hat sich hierbei als ein wichtiges Instrument erwiesen. Durch Infektion mit SV40 oder nach Gentransfer von LT-Ag lässt sich eine Vielzahl primärer Zelllinien länger in Zellkultur propagieren. Während bei manchen Zelllinien die alleinige Expression von LT-Ag ausreicht, um die behandelten Zellen zu immortalisieren, durchlaufen andere Zellreihen mit eintretender Seneszenz eine durch zunehmenden Zelltod und Abnahme der Zellzahl gekennzeichnete kritische Phase. In manchen Fällen entwickelt sich dann, möglicherweise durch erworbene Mutationen, ein Fokus immortalisierter Zellen innerhalb der seneszenten Zellkultur (Shay et al., 1993). Neben einer gesteigerten Teilungs- und

Wachstumsrate kann es nach Infektion mit SV40 auch zu morphologischen Auffälligkeiten der infizierten Zellen kommen (Shein and Enders, 1962). Die Inaktivierung des als Wächter des Genoms bezeichneten Tumorsuppressorproteins TP53 ermöglicht weiterhin die Untersuchung potentiell onkogener Signalwege. Diese Erkenntnisse schaffen ein tieferes Verständnis der molekularen Basis der Tumorgenese und damit der Krebsentstehung (Iwata et al., 2007). In einigen Fällen lässt sich auf diese Weise, wie bereits weiter oben ausgeführt, eine Kausalkette nachweisen oder eine Modelltumorzelllinie etablieren.

### **1.5 Zielstellung**

Die oben beschriebenen biologischen Gemeinsamkeiten zwischen Desmoiden und MSC stützen die Arbeitshypothese eines möglichen zellulären Zusammenhangs. Wie für andere Tumorformen bereits gezeigt, könnte eine maligne transformierte multipotente, mesenchymale Stromazelle die Tumorstammzelle für die Ausbildung eines Desmoids darstellen. Die beiden in Desmoiden synergistisch aktivierten Signalwege von *Wnt* und TGF- $\beta$  sind mögliche onkogene Faktoren, die eine maligne Entartung hervorrufen könnten. Nach chirurgischen Traumata wird im Rahmen der Wundheilung eine Vielzahl von Wachstumsmediatoren ausgeschüttet. Besonders dem Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  kommt bei Wundheilungsreaktionen eine wichtige Rolle zu. Erhöhte Serumkonzentrationen von TGF- $\beta$  werden durch individuelle genetische Polymorphismen festgelegt (Grainger et al., 1999; Li et al., 1999), aber auch miRNA-basierte Regulationsmechanismen sind als Basis für variable TGF- $\beta$  Mengen denkbar (Martin et al., 2011). Des Weiteren laufen diese Reparaturvorgänge in der Regel unter Beteiligung der jeweiligen Stammzellpopulationen ab. Patienten, die unter einer adenomatösen Polyposis Coli leiden, besitzen eine mutierte Form des APC-Gens. Diese Mutation wirkt auf der Schiene des kanonischen *Wnt*-Signalweges proliferationsfördernd und ist für das erhöhte Auftreten kolorektaler Karzinome verantwortlich. Diese unterschiedlichen Faktoren stellen eine mögliche Erklärung für das gehäufte Auftreten von Desmoiden nach chirurgischer Intervention, insbesondere bei FAP-Patienten dar. Denkbar wäre somit eine maligne Entartung von MSC im Sinne einer überschießenden Wundheilungsreaktion in Abhängigkeit der genetischen TGF- $\beta$  Disposition und der Inaktivierung des APC-Gens durch dominant-negative Mechanismen (Su et al., 1993; Dihlmann et al., 1999).

Die Vorversuche zu der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass die alleinige Aktivierung der *Wnt*- und TGF- $\beta$ -Signalkaskade nicht ausreicht, um in MSC eine maligne Transformation auszulösen. Die auf diese Weise behandelten Zellen gingen vermehrt in Seneszenz. Als ursächlich hierfür ist am ehesten eine Onkogen-induzierte Seneszenz anzunehmen. Um diese auszuschalten, habe ich in dieser Studie geprüft, ob durch Expression von LT-Ag das

Tumorsupressorprotein TP53 inaktiviert wird und so die Verhinderung einer onkogen induzierten Seneszenz angenommen werden kann.

Die vorliegende Arbeit sieht sich demnach als ein Teilstück bei der Suche nach einer möglichen Tumorstammzelle für die Entstehung von Desmoiden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollen multipotente, mesenchymale Stromazellen genetisch modifiziert werden, um stabil LT-Ag zu exprimieren und auf diese Weise den Schutzmechanismus der Onkogen induzierten Seneszenz in MSC Zellen zu unterbinden.

Dazu war es notwendig, passende Expressionskonstrukte mit Verfahren der Molekulargenetik zu konstruieren und wichtige zellbiologische Aspekte ihrer Praktikabilität an einem begrenzten Spektrum unterschiedlicher Zelltypen zu prüfen. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten LT-Ag-spezifischen Expressionssysteme sind für unterschiedliche Zelltypen geeignet und stellen potente Werkzeuge dar, um Primärzellen *in-vitro* zu immortalisieren bzw. die Möglichkeiten der Langzeitkultur *in-vitro* auszuweiten. Meine Daten belegen, dass besonders lentivirale Expressionssysteme mit der Fähigkeit, auch ruhende Zellen zu infizieren, durch hohe Transduktionseffizienz überzeugen. LT-Ag-positive MSC Populationen liegen nun vor, um weitergehende Untersuchungen zur malignen Transformation dieser Zellen anzuschließen.

## 2 MATERIAL UND METHODIK

### 2.1 Zellen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen sind in der Tabelle 1 unter Angabe von Herkunft sowie Referenz bzw. American Type Culture Collection (ATCC) Nummer aufgelistet.

**Tab. 1:** Verwendete Zellen

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
MSC-KM	Primäre MSC aus humanem KM isoliert durch AG L. Müller.  (Ein positives Votum der hiesigen Forschungsethikkommission für <i>in vitro</i> -Versuche an KM Zellen erging mit Votum vom 20.4.2010 an Hr. Dr. L. Müller, KIM IV, MLU*)	Müller et al. (2006)
MSC-SC	Humane, primäre MSC, aus subkutanem Fettgewebe isoliert  (Ein positives Votum der hiesigen Forschungsethikkommission für <i>in vitro</i> -Versuche an KM Zellen mit Votum vom 18.1.2008 erging an Hr. Prof. Christ (Angewandte Molekulare Hepatologie, Universität Leipzig), ebenso wurde ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Leipzig erteilt [AZ 283-10-04102010])	Zuk et al. (2002)
NHDF	Humane, primäre Fibroblasten, aus Vorhautgewebe isoliert  Ein positives Votum der hiesigen Forschungsethikkommission für <i>in vitro</i> -Versuche an Fibroblasten erging mit Votum 24.11.2004 an Hr. Prof. Wohlrab (Dermatologie und Venerologie, MLU)	Lu et al. (2012)
NIH/3T3	Murine, embryonale Fibroblastenzelllinie	ATCC Nr. CRL-1658
HEK293T	Humane, embryonale Nierenzelllinie	DuBridge et al. (1987)
SW480-TCF1B	Humane Kolonkarzinomzelllinie	Liebig et al. (2005)

## 2.2 Bakterienstämme

Für die unten beschriebenen Plasmid Klonierungen wurde *E. Coli* vom Stamm DH5 $\alpha$  erworben (Ursprung: New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) und durch Zugabe von Calciumchlorid (Hanahan, 1983) chemisch kompetent gemacht.

## 2.3 Chemikalien und Kits

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in Analysequalität bei den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) und Merck (Darmstadt, Deutschland) erworben. Materialien und Kits werden im Weiteren jeweils im Zusammenhang mit der spezifischen Methode aufgeführt.

## Antikörper

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die jeweils verwendeten Verdünnungen sind der entsprechenden Spalte zu entnehmen.

**Tab. 2:** Primäre Antikörper

Antikörper	Klon	Hersteller	Verwendung	Verdünnung
Maus anti-Actin	AC-40	Sigma	WB, IF	1:1000
Maus anti-BRG	G-7	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)	IF	1:1000
Maus anti- $\beta$ -Catenin	14	BD Biosciences (Heidelberg, BRD)	IF	1:250
Maus anti-CD14 FITC	M $\phi$ P9	BD Biosciences	FC	1:1
Maus anti-CD19 PE	4G7	BD Biosciences	FC	1:1
Maus anti-CD34 FITC	581	BD Biosciences	FC	1:1
Maus anti-CD45 FITC	2D1	BD Biosciences	FC	1:1
Maus anti-CD73 PE	AD2	BD Biosciences	FC	1:1
Maus anti-CD90 PE	5E10	BD Biosciences	FC	1:1
Maus anti-CD105 FITC	SN6	AbD Serotec (Düsseldorf, BRD)	FC	1:1
Maus anti-FLAG	M2	Sigma	WB, IF	1:500-1000
Kaninchen anti-FLAG	Polyclonal	Acris Antibodies (Herford, Deutschland)	WB	1:2500

Maus anti-HLA-DR FITC	L243	BD Biosciences	FC	1:1
Maus anti-p53	PAB1801	Zymed Laboratories Inc.	IP	1:1
			IF	1:100

In der folgenden Tabelle 3-3 sind die für die vorliegende Arbeit verwendeten Sekundärantikörper Kontrollantikörper aufgelistet. Die Spalte Verdünnung gibt die jeweils verwendete Verdünnung an.

**Tab. 3:** Sekundäre Antikörper und Kontrollantikörper

Antikörper	Hersteller	Verwendung	Verdünnung
Ziege anti-Mouse IgG FITC-konjugiert	BD Biosciences	IF	1:20
Ziege anti-Mouse IgG HRP-konjugiert	Sigma	WB	1:4000
Anti-Rabbit IgG HRP-konjugiert	Cell Signaling (Danvers, USA)	WB	1:9000
<b>Isotypkontrolle für Durchflusszytometrie</b>			
Simultest Control $\gamma 1/\gamma 1$ FITC, PE	BD Biosciences	FC	1:1

### Enzyme

Sämtliche verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) bezogen. Für Ligationen setzten wir T4 DNA Ligase der Firma Fermentas ein. Das im Rahmen der Klonierungen benötigte Klenow Enzym zum Auffüllen überhängender Einzelstränge wurde von Roche (Grenzach, Deutschland) erworben. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den Vorgaben der Hersteller.

### Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden kommerziell synthetisiert (MWG; Ebersberg, Deutschland). Die Nukleotidsequenzen wurden mit Hilfe der Sequenzeinträge der *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) Datenbank „Entrez Nucleotide“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) generiert. Die folgende Tabelle 4 führt verwendete Oligonukleotide auf, die für die PCR bzw. zur Herstellung eines kurzen, multiple RE-Erkennungssequenzen enthaltenden DNA-Doppelstranges eingesetzt wurden.

**Tab. 4:** Verwendete Oligonukleotide

Primerset	Nukleotidsequenz	T <sub>A</sub> in °C
LT-Ag	5'-AAAAGGATCCATGGACTACAAGGACGACGACGACAAGA TTCATATGGATAAAG-3' 5'-AAAAGAATTCTCATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGT-3'	57
MCS-Oligos*	5'-TCGAGGATCCAGATCTAGTACTG-3' 5'-TCGACAGTACTAGATCTGGATCC-3'	45

\* das doppelsträngige Oligonukleotid enthält die RE-Erkennungssequenzen:  
Sall – ScaI – BglII - BamHI – Sall/XhoI\*\* (\*\*REs eliminiert)

## 2.4 Puffer, Lösungen und Medien

Blockpuffer für WB	5 % Milchpulver in PBS
Blotpuffer für WB	50 mM Tris, 40 mM Glycin, 0,037 % SDS, 20 % Methanol
dest. H <sub>2</sub> O	„Aqua B. Braun“, steril (B. Braun, Melsungen, Deutschland)
Eindeckmedium	Mounting Medium, Vectashield
Gelextraktionswaschpuffer	TE, 0,1 M NaCl
Gelextraktionselutionspuffer	TE, 1 mM NaCl
2x HBS	283 mM NaCl, 23 mM HEPES, 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,05; sterilfiltriert
IP-Puffer	150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2 mM EDTA (pH 8), 1 % Triton X-100, 0,5 % NP 40 in Aqua dest gelöst. 0,2 mM PMSF unmittelbar vor Lyse
Laemmli-Puffer	60 mM Tris-HCl(pH 6,8), 2 % SDS, 0,1 M DTT in Aqua dest.
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *12 H <sub>2</sub> O, 1,76 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6,8
3x SDS Ladepuffer	187,5 mM Tris-HCL (pH 6,8), 6 % SDS, 30 % Glycerol, 150 mM DTT, 0,03 % Bromphenolblau, 2% β-Mercaptoethanol
TE-Puffer	Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5 autoklaviert

## Färbelösungen

Alizarin S	10 mg/ml in dest. H <sub>2</sub> O, pH 4,2 (Sigma- Aldrich)
------------	--

Kristallviolett	0,005 % in dest. H <sub>2</sub> O (Sigma-Aldrich)
Sudan III	Gebrauchsfertig (Merck)
Sudan III Lösung	1 g in 100 ml Ethanol (70%) gelöst, vor Gebrauch filtriert
Schiffs Reagenz	Gebrauchsfertig (Merck)
Trypan Blau	0,4 %, gebrauchsfertig (Sigma-Aldrich)

### **Lösungen für die Zellkultur**

DMEM	4,5 g/l Glukose, ohne L-Glutamin, Flüssigmedium (PAA Laboratories; Cölbe, Deutschland)
DMEM-HG	4,5 g/l Glukose, mit L-Glutamin, ohne Natriumpyruvat (PAA Laboratories)
DMEM ohne Glukose	mit L-Glutamin, ohne Natriumpyruvat (PAA Laboratories)
FKS	vor Gebrauch zur Complement-Inaktivierung 1 h bei 56°C hitzebehandelt (Invitrogen)
L-Glutamin	flüssig gebrauchsfertig (PAA Laboratories)
MEM with Earle's Salts	Flüssigmedium (PAA Laboratories)
NEAA	gebrauchsfertig (PAA Laboratories)
Natriumpyruvat	11,0 g/L (PAA-Laboratories)
Penicillin/Streptomycin	10.000 Units/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin (PAA Laboratories)
Polybrene	Stammlösung 8 mg/ml in dest. H <sub>2</sub> O (Sigma-Aldrich)
Trypsin-EDTA	0,5 mg/ml Trypsin, 0,22 mg/ml EDTA (PAA Laboratories)

### **Wachstums- und Differenzierungsmedien**

Kulturmedium für <i>E. Coli</i>	LB-Medium (Bertani, 1951), Selektion auf Ampicillinresistenz sowohl in Flüssigkultur als auch in Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin
Wachstumsmedium für HEK 293T	DMEM, 15 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin
Wachstumsmedium für MSC	MEM with Earle's Salts, 15 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % NEAA, 1 % Natriumpyruvat
Wachstumsmedium für NHDF	DMEM, 10 % FKS, 2 % L-Glutamin, 1 %

	Penicillin/Streptomycin
Wachstumsmedium NIH/3T3	DMEM, 5 % FKS, 2 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin
Adipogenes Differenzierungsmedium	DMEM, 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin 10 µg/ml bovines Insulin 100 µM Indomethazin 500 µM 3-Isobutyl-1-methylxanthin 50 µM Dexamethason 5 µM Rosiglitazon (Axxora)
Hepatogenes Differenzierungsmedium	50 % DMEM-HG, 25 % DMEM ohne Glukose, 25 % MEM mit 4 mM NaHCO <sub>3</sub> (zugegeben), 2 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin 0,1 % Albumin 5,55 mM Galaktose 0,3 mM Ornithin 0,13 mM Prolin 4,99 mM Hepes 1,25 mM Nicotinamid 0,5 mM L-Glutamin 2 mM ZnCl <sub>2</sub> 0,8 mM CuSO <sub>4</sub> 2,6 mM ZnSO <sub>4</sub> 14,8 mM MnSO <sub>4</sub> 50 µg/ml Insulin 50 mg/ml Gentamycin 50 nM Dexamethason 0,0025 % ITS Zusammengefügt und sterilfiltriert 20 µg/l EGF (PeproTech; Hamburg, Deutschland) und 40 µg/l HGF (Strathmann Biotec AG; Hamburg, Deutschland) vor Gebrauch zugesetzt
Osteogenes Differenzierungsmedium	DMEM, 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin 200 µM Ascorbinsäure-2-phosphat 50 µM Dexamethason 10 mM Glycerol-3-phosphat

## 2.5 Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden bei den Firmen Carl Roth und Eppendorf (Hamburg, Deutschland) erworben. Die für die Zellkultur notwendigen Verbrauchsmaterialien wie Zellkulturflaschen, Zentrifugenröhrchen, Lochplatten und serologische Pipetten wurden bei

TPP (Trasadingen, Schweiz) bezogen. Die den üblichen Laborstandards entsprechenden Geräte und Materialien sind im Weiteren nicht speziell aufgeführt.

## 2.6 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der verwendeten Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Sämtliche Manipulationen fanden unter Laminar-Flow Sterilsicherheitswerkbänken statt. Die unterschiedlichen Zelllinien wurden in den jeweiligen Wachstumsmedien kultiviert. In 3-4 tägigen Intervallen erfolgte ein Mediumwechsel. MSC wurden beim Erreichen von 50% Konfluenz, alle übrigen Zelllinien beim Erreichen von 80-100% Konfluenz mit Trypsin-EDTA abgelöst und passagiert. Die Zellzahl wurde bei Passagierung mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt, MSC wurden mit einer Dichte von 200 Zellen/cm<sup>2</sup> und NHDF mit einer Dichte von 1000 Zellen/cm<sup>2</sup> neu ausgesät.

## 2.7 Erstellung einer Wachstumskinetik

Um das Proliferationsverhalten der transgenen Primärzellen mit ihren Ursprungszelllinien vergleichen zu können, wurden Wachstumskinetiken erstellt. Hierzu wurden die Zellen mit einer definierten Dichte ausplattiert und die Zellzahl zum Zeitpunkt der Passagierung ermittelt. Aus diesen Daten wurden nach den folgenden Formeln (Baxter et al., 2004) die Populationsverdopplungen (PD) und die Populationsverdopplungszeit (PDT) errechnet. Die Zahlenwerte wurden verwendet, um graphische Wachstumskurven zu erstellen.

$$PD = \frac{\lg\left(\frac{\text{Gesamtzellzahl zum Zeitpunkt der Passagierung}}{\text{Zellzahl ursprünglich gesetzt}}\right)}{\lg 2}$$

$$PDT = \frac{n \text{ Tage zwischen den Passagierungen}}{\text{zugehörige PD}}$$

## 2.8 Durchflusszytometrische Analyse

Zur Analyse der Oberflächenantigenexpression der MSC erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse. Hierzu wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst und mit PBS gespült. Die Zellen wurden in Rundboden-FACS-Röhrchen aliquotiert und für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets anschließend mit je 20 µl FITC-, PE-, oder PerCP-konjugierten Primärantikörpern resuspendiert und für 15 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden ein weiteres Mal mit PBS gespült und im Anschluss am

Durchflusszytometer (FACSCalibur) mit CellQuest Software (beides BD Biosciences) analysiert. Die jeweils mit Immunglobulinisotypkontrollen vorgenommenen Geräteeinstellungen wurden im Rahmen der Messungen konstant gehalten.

## **2.9 Nachweis des Differenzierungspotentials von MSC**

Die Zellen wurden anfänglich mit 200 Zellen/cm<sup>2</sup> in 6-Well Schalen ausplattiert und bis zum Erreichen einer Konfluenz von 90% wie oben beschrieben kultiviert. Zur osteogenen und adipozytären Differenzierung erfolgte die weitere Kultur im jeweiligen Wachstumsmedium. Den für eine hepatogene Differenzierung bestimmten Zellen wurde nach Erreichen von 90% Konfluenz zunächst zur Demethylierung der DNA für 24 h 5'-Azacytidine in einer Endkonzentration von 20 µM zugegeben. Danach erfolgte der Wechsel zum hepatozytären Differenzierungsmedium für 10-21 Tage. Die Mediumwechsel an den zur Differenzierung bestimmten Zelllinien erfolgten alle 3-4 Tage bis morphologische Zeichen der entsprechenden Differenzierung wie Kalzium- oder Fetteinlagerungen sichtbar wurden.

Der Nachweis der Differenzierung erfolgte per zytochemischer Färbung. Zum Nachweis adipogener und osteogener Differenzierung wurden differenzierte und undifferenzierte Zellen mit PBS gespült und bei RT für 15 min mit 2% Formalin fixiert. Nach einer weiteren Spülung mit PBS erfolgte die immunzytochemische Färbung. Der Nachweis der Fetteinlagerung bei adipogener Differenzierung erfolgte durch Färbung mit Sudan III Rot. Hierzu wurde eine gesättigte Sudan III Lösung in 70% Alkohol hergestellt, filtriert und auf die Zellen gegeben. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden die Zellen drei Mal mit PBS gespült und anschließend photographisch dokumentiert. Zum Nachweis der osteogenen Differenzierung wurden die Ablagerungen von Kalziumhydroxylapatit mit Alizarin S angefärbt. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit dest. H<sub>2</sub>O gespült und für 5 min bei Raumtemperatur mit Alizarin S gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit dest. H<sub>2</sub>O gespült und photographisch dokumentiert. Nach hepatogener Differenzierung wurden die Zellen zum Nachweis der Glykogenspeicherung mittels Perjodsäure-Schiff Reaktion (PAS-Methode) gefärbt. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit PBS gespült und anschließend für 20 min bei 4°C mit -20°C kaltem Methanol/Aceton im Verhältnis 7:3 fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit dest. H<sub>2</sub>O wurden die Zellen für 10 min mit 1% Perjodsäure bei RT inkubiert und im Anschluss erneut zweimal mit dest. H<sub>2</sub>O gewaschen und photographisch dokumentiert.

## **2.10 Immunfluoreszenzmikroskopie**

Für immunzytochemische Färbungen wurden die Zellen in 24 Well-Schalen in den jeweiligen Zelldichten ausplattiert und bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert. Die Fixierung der Zellen

erfolgte nach zweimaliger Spülung mit PBS mit 2% Formalin für 15 min bei RT oder mit -20°C kaltem Methanol/Aceton im Verhältnis 7:3 für 10 min bei 4°C. Nach der Fixierung wurden die Zellen zweifach mit PBS gespült und danach für 10 min bei RT mit 0,1% Triton X-100 in PBS mit 1% BSA permeabilisiert. Nach einem weiteren zweimaligen Waschvorgang mit PBS folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in PBS mit 1% BSA über Nacht bei 4°C. Die Zellen wurden am Folgetag wieder zwei Mal mit PBS gespült und anschließend mit dem Sekundärantikörper in PBS mit 1% BSA für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen und der Zugabe von einem Tropfen Eindeckmedium erfolgte die Analyse und Dokumentation am Fluoreszenzmikroskop (Nikon DS Camera Head Control Unit DS-U2, bzw. Nikon Coolpix 995)

### **2.11 Proteinanalyse und Westernblot**

Mit Ausnahme der zur Immunpräzipitation bestimmten Proben erfolgten sämtliche Proteinextraktionen mittels des anionischen Detergenz SDS nach dem Protokoll von Laemmli (Laemmli, 1970). Adhärente Zellen wurden mittels eines Zellschabers von der Wachstumsoberfläche gelöst und in PBS resuspendiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS und jeweils anschließender Zentrifugation für 10 min bei 300 x g wurden die Zellen in Laemmli-Puffer aufgenommen und dreimal für 15 min bei 4°C mit Ultraschall behandelt. Das Lysat wurde anschließend mit einer Spritze vorsichtig homogenisiert und für 15 min bei 4°C mit 12.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Für die Immunpräzipitationen wurden die Proteinextraktionen SDS-frei durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen von der Wachstumsoberfläche gelöst und in PBS, wie oben beschrieben, gewaschen. Die so erhaltenen Pellets wurden in IP-Puffer aufgenommen und dreimal für je 5 min bei 4°C mit Ultraschall behandelt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 12.000 x g wurden die Überstände aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Sämtliche Arbeitsschritte der Proteinextraktion wurden auf Eis durchgeführt.

Proteinkonzentrationen der einzelnen Lysate wurden anhand der kolorimetrischen Methode nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Hierzu wurde kommerziell erhältliche Färbelösung (Roti-Nanoquant, Carl-Roth) verwendet und die Proben nach Herstellerprotokoll bei 590 nm und 450 nm UV-spektrometrisch vermessen.

Für die Immunpräzipitation wurden Dynabeads Protein G der Firma Dynal zunächst durch Vortex-Mischen für 1-2 min resuspendiert und 14 µl der Suspension pro Immunpräzipitation in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde nun für 2 min einem Magneten

ausgesetzt, bis der Überstand klar wurde und sich abpipettieren ließ. Die Dynabeads wurden nun zweimal in je 500 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 5,7) aufgenommen und durch das Magnetfeld vom Überstand getrennt. In 100 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer wurden nun 0,5-2 µg des jeweiligen Primärantikörpers gelöst, zu den Dynabeads gegeben und für 40 min bei RT auf einem Rollenmischer sachte bewegt. Im Anschluss wurden die Dynabeads zweimal mit je 500 µl 0,1 M Natriumphosphatpuffer mit 0,1 % Tween wie oben beschrieben gewaschen. Zu den antikörpergekoppelten Dynabeads wurden nun ca. 200 µg Proteinlysate der jeweiligen Zelllinie gegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Rollenmischer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS mit 0,1 % Tween wurden die Dynabeadspelletts in 30 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 90°C aufgeköcht. Nach erneutem Trennen mittels Magnetfeld wurde das erhaltene Immunpräzipitat mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte als SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese in 10 %-igen Polyacrylamidgelen. Nach der Auftrennung wurden die Gele mittels Semi-Dry Blotkammer (OWL-Elektroblotter; Thermo Scientific Owl Separation Systems; Asheville, USA) für 2,5 h bei 60 mA geblottet und dabei auf PVDF Membranen überführt. Nach dem Blot-Vorgang wurden die Membranen zunächst kurz mit Aqua dest. gespült und anschließend für 1 h unter kontinuierlicher Bewegung auf dem Rollenmischer bei RT mit Blockpuffer inkubiert. Die Membranen wurden nun für 15 min unter mehrfachem Wechsel in reichlich Puffervolumen gewaschen. Auf diese Waschschrte folgte die Inkubation mit dem in Blockpuffer verdünnten Primärantikörper in den jeweiligen Verdünnungen bei 4°C über Nacht. Danach wurden die Membranen zweimal für je 10 min mit Waschpuffer gewaschen und anschließend für 1 h mit HRP-gekoppeltem, in Blocklösung verdünntem Sekundärantikörper bei RT auf dem Rollenmischer inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte die Detektion der Membranen mit ECL Prime (GE Health Care Life Sciences; München, Deutschland) gemäß Herstellerprotokoll.

## **2.12 Plasmidpräparation und Agarosegelelektrophorese**

Die Plasmidpräparationen wurden nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mittels kommerziell erhältlicher Kits (Plasmid Mini Kit und Plasmid Midi Kit; Quiagen; Hilden, Deutschland) gemäß des Herstellerprotokolls durchgeführt.

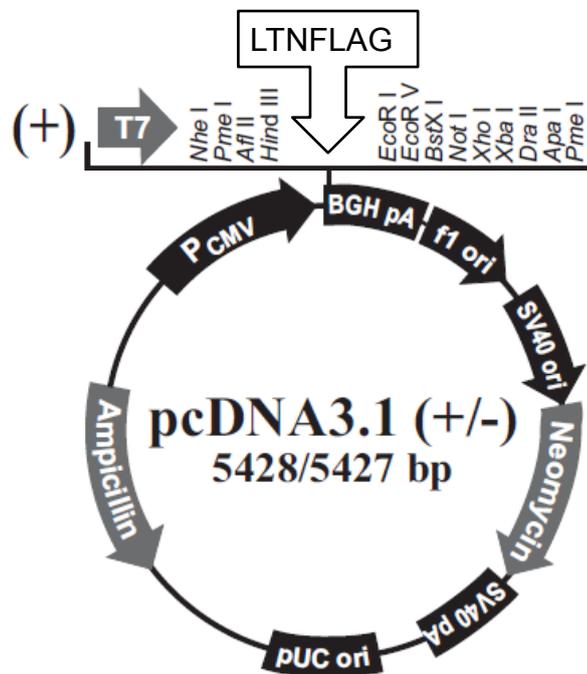
Die Überprüfung der Qualität der Plasmidpräparationen sowie der Resultate der Restriktionsverdau erfolgte mittels Ethidiumbromidfärbung nach Elektrophorese in 0,75-1 % Agarosegelen.

### 2.13 Herstellung der verwendeten Expressionsplasmide

Die grundlegenden Methoden der Klonierung von DNA wie enzymatische Restriktion, DNA-Ligation oder Klenow-Enzym vermitteltes Auffüllen von endständigen DNA-Einzelsträngen wurden mithilfe des Labormanuals „*Molecular Cloning*“ von Sambrook et al. (Sambrook and Russell, 2000) umgesetzt und sind dort in aller Ausführlichkeit zu entnehmen.

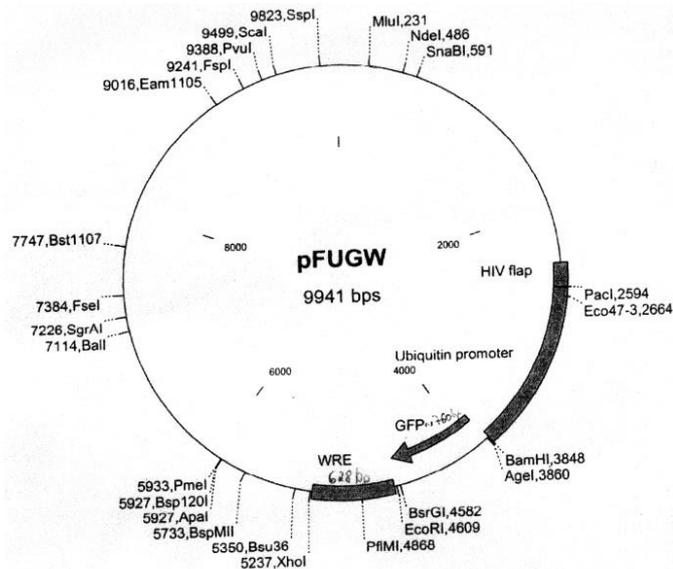
#### 2.13.1 Plasmide

Als Ausgangsplasmid für die Klonierungen diente LTNFLAG, das uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um T. Iwata, Tokyo zur Verfügung stand. Hierbei handelte es sich um das kommerziell erhältliche Expressionsplasmid pcDNA3.1+, in das die SV40 Large T Antigen cDNA mit einen aminoterminalen FLAG-Tag einkloniert vorlag (Iwata et al., 2007).

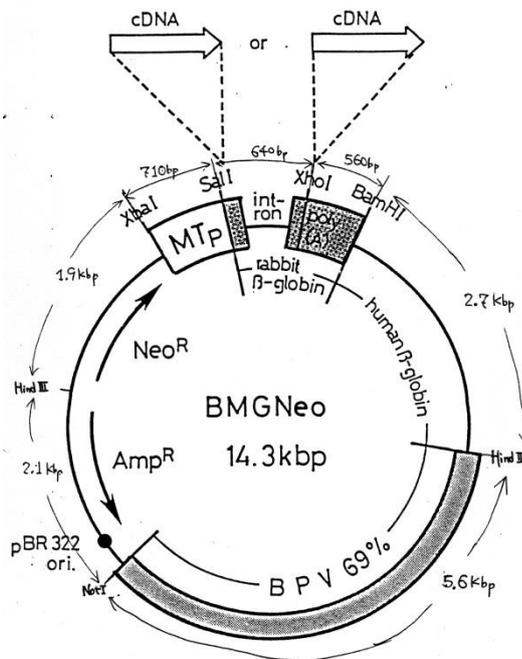


**Abb. 3:** Ausgangsplasmid pcDNA3.1+ LTNFLAG.

Das episomale Expressionsplasmid BMGNeo wurde uns von Dr. Karasuyama, Basel zur Verfügung gestellt (Karasuyama and Melchers, 1988).



**Abb. 4:** Plasmidkarte des lentiviralen Expressionsplasmids pFUGW.



**Abb. 5:** Plasmidkarte des episomalen Expressionsplasmids BMGNeo.

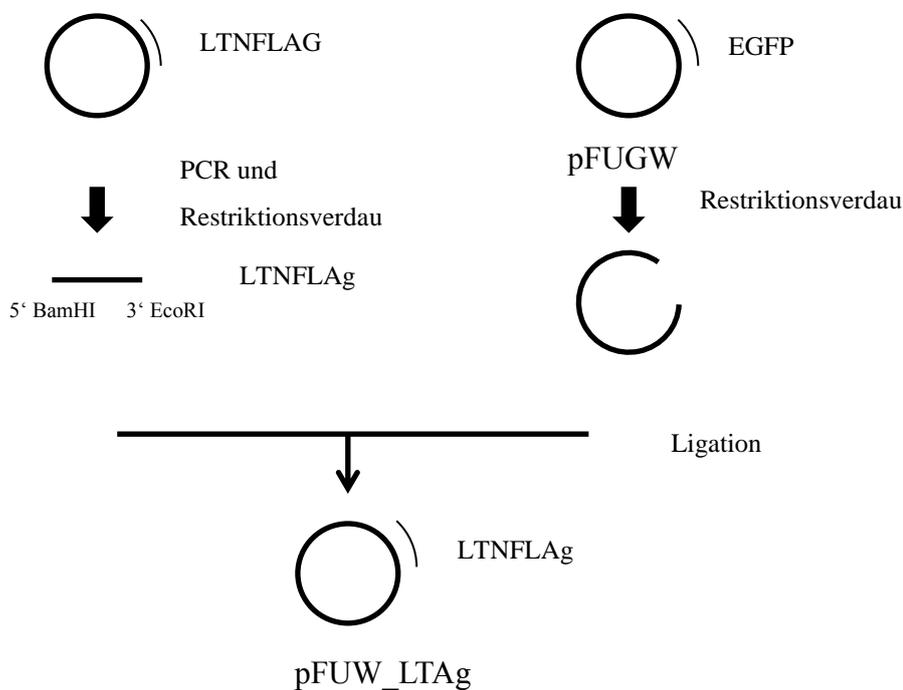
Die Arbeiten mit dem lentiviralen Expressionssystem erfolgten in enger Zusammenarbeit mit der AG Lutz Müller der KIM IV an der Martin-Luther Universität Halle Wittenberg unter Laborbedingungen der Sicherheitsstufe II nach Gentechnikgesetz. Es handelt sich bei diesem Expressionssystem um einen lentiviralen Vektor mit selbst inaktivierender 3'-LTR und einem Verpackungssystem der 3. Generation. Das lentivirale Plasmid pFUGW (Lois et al., 2002) sowie die Verpackungsplasmide pMDLg/pRRE und pRSV-Rev (Dull et al., 1998) und das Hüllproteinplasmid pVSVG (Lois et al., 2002) waren der AG L. Müller freundlicherweise von

Prof. Dr. Dr. Thomas Braun, Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim zur Verfügung gestellt worden.

Weiter zur Verwendung kam im Rahmen der Klonierungen das Plasmid pDPL15, das in der AG Prof. Mak/Toronto als spezielles Klonierungsplasmid mit einer ausgedehnten MCS-Sequenz entwickelt worden war (Ballhausen, pers. Mitteilung).

### 2.13.2 Klonierung von pFUW\_LTA<sub>g</sub>

Das für das lentivirale Expressionssystem benötigte Plasmid pFUW\_LTA<sub>g</sub> wurde wie nachfolgend illustriert in mehreren Klonierungsschritten erstellt.



**Abb. 6:** Flussdiagramm, Schematische Darstellung der Klonierung von pFUW\_LTA<sub>g</sub> ausgehend von pCDNA3.1\_LTNFlag und pFUGW. Durch Herausschneiden der GFP-cDNA aus pFUGW entstand das entsprechende Aufnahmeplasmid, das den directionalen Einbau des LTNFLAG-Gens erlaubte. Flankierende Abschnitte der Klonierungsübergänge wurden sequenziert.

Der offene Leserahmen (ORF) des FLAG-Tag markierten Large T Antigens (LT-Ag) wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und durch Wahl entsprechender Primer-Sequenzen mit den gewünschten Restriktionsschnittstellen versehen (s. Tab. 4). Als Matrize diente das Plasmid LTNFlag. Die PCR wurde an einem Thermocycler Gradient (Eppendorf, Deutschland) mit Hilfe des Fast Start High Fidelity Kits (Roche) unter Verwendung der Herstellerempfehlungen nach folgendem Schema durchgeführt:

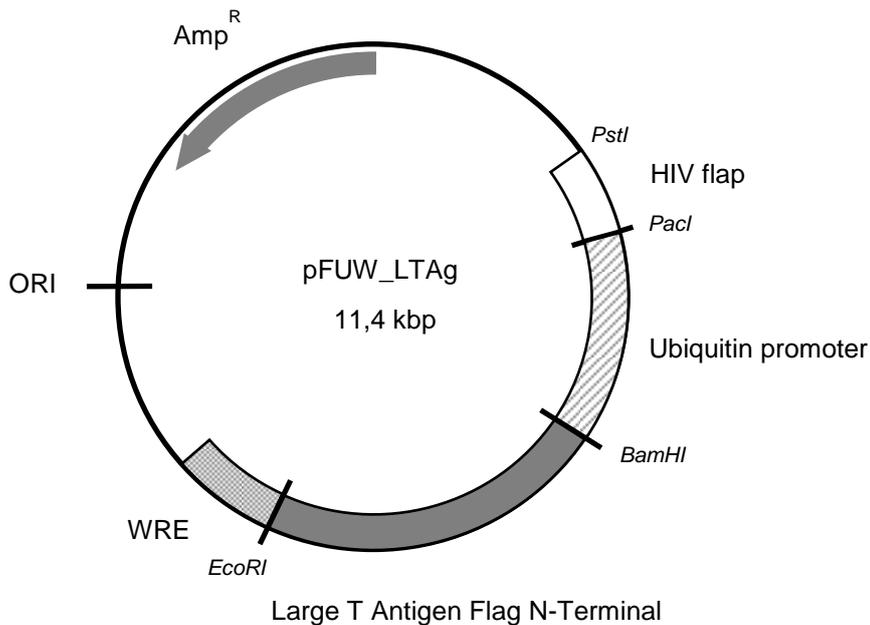
34,5 µl DDW  
5,0 µl Fast Start Reaction Buffer (10x)  
3,0 µl DMSO  
1,0 µl dNTP  
2,0 µl Primer 3\_LTNFLAG\_FUGW\_REVIS  
2,0 µl Primer 5\_LTNFLAG\_FUGW\_REVIS  
2,0 µl pcDNA3.1-LT\_NFLAG (c=4,65 ng/µl)  
0,5 µl Enzyme Blend (beinhaltet die Thermostabile Proofreading DNA-Polymerase)

PCR Profil:

- 2 min 95 °C (Deckelheizung 105 °C)
- 35 Zyklen aus jeweils:
  - Hitzedenaturierung für 30 sec bei 95 °C
  - Annealing für 30 sec bei 62 °C, Gradient 6 °C
  - Elongation für 1 min bei 72 °C
  - Finale Elongation 5 min bei 72 °C
- Abschließend bis zur Probenentnahme Kühlung auf 4 °C.

Die erhaltenen PCR-Amplifikate wurden zusammengefügt und mittels MSB Spin PCRapace Kit (STRATEC Molecular GmbH; Berlin, Deutschland) aufgereinigt. Im Anschluss erfolgte eine doppelte Restriktion des Amplifikates mit *Eco RI* (Fermentas) und *Bam HI* (Fermentas). Von der Arbeitsgruppe Dr. Lutz Müller, hiesige Klinik für Innere Medizin IV, erhielten wir das GFP-kodierende lentivirale Expressionsplasmid pFUGW. Aus diesem wurde durch Verdau mit *Eco RI* und *Bam HI* die GFP-cDNA herausgeschnitten. Die Aufreinigung der Verdau von Insert und Plasmidrückgrat wurde nach Agarosegelelektrophorese in 0,75 %igen Agarosegelen durch Gelextraktion mit Hilfe von Whatman Filterpapier durchgeführt. Hierzu wurden die ethidiumbromidgefärbten DNA-Banden unter langwelligem (280 nm) UV-Licht sichtbar gemacht und als Block aus dem Gel ausgeschnitten. An einer anderen (DNA-freien) Stelle des Gels wurde ein Block von identischer Größe ausgeschnitten und verworfen. An dieser Stelle wurde ein DE81-Whatman Filterpapier eingelegt und der die zu isolierende DNA-Bande enthaltende Gelblock eingefügt. Die Elektrophorese wurde nun für weitere 15-30 min laufen lassen, bis sich das DNA-Fragment auf dem Filterpapier befand und der nun leere Gelblock entsorgt werden konnte. Das Filterpapier an dem die DNA haftete wurde zurechtgeschnitten und in ein 0,5 ml Eppendorf-Tube transferiert, welches zuvor am Boden mit einer heißen Nadel punktiert wurde. Das Filterpapier wurde viermal durch Zugabe von 100 µl Gelextraktionswaschpuffer und anschließende kurze Zentrifugation gewaschen. Die Elution erfolgte durch viermalige Zugabe von je 100 µl Gelextraktionselutionspuffer mit jeweils anschließender kurzer Zentrifugation. Das Eluat wurde mit 1000 µl eiskaltem Ethanol bei -20 °C über Nacht gefällt und in TE-Puffer gelöst. Die Ligation der so vorbereiteten Fragmente erfolgte mit T4-DNA-Ligase (Fermentas) gemäß dem Herstellerprotokoll. Nach der

Ligation wurden die erhaltenen Proben in kompetente DH5 $\alpha$  mittels Hitzeschock transformiert. Der Transformationsansatz wurde auf ampicillinhaltigen LB-Platten (100  $\mu$ g/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von den entstandenen Kolonien wurden Plasmid-Minipräparationen durchgeführt und mittels Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese auf Insertion überprüft. Eine Plasmidkarte des so entstandenen Plasmids pFUW\_LTA<sub>g</sub> mit den für diese Arbeit wichtigsten Restriktionsschnittstellen zeigt die folgende Abbildung.



**Abb. 7:** Plasmidkarte von pFUW\_LTA<sub>g</sub>, eingezeichnet sind die für diese Arbeit wichtigsten Restriktionsschnittstellen.

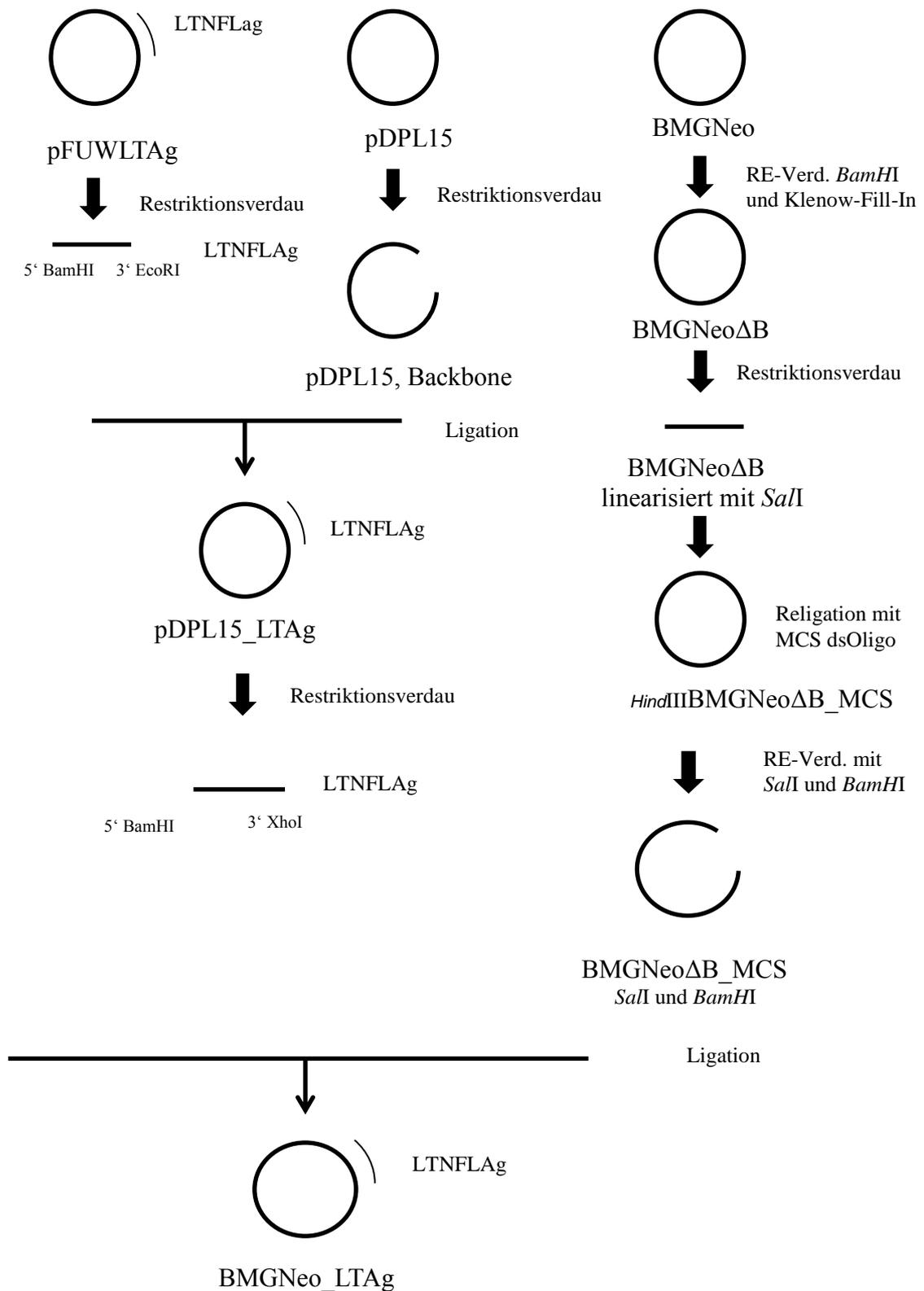
### 2.13.3 Klonierung von BMGNeo\_LTA<sub>g</sub>

Als alternatives Gentransfer-Vehikel zu infektiösen lentiviralen Viruspartikeln sollte ein nicht ins Genom integrierendes, episomales Expressionssystem für das FLAG-markierte LT-Antigen etabliert werden. Das BMGNeo Plasmid ist ein Papillomavirus-basierter, episomal replizierender Vektor mit einem induzierbaren Metallothionein-Promoter, der zur Expression von Transgenen in eukaryotischen Zellen gut geeignet ist (Karasuyama and Melchers, 1988). Hierzu mussten jedoch verschiedene Voraussetzungen für eine erfolgreiche Klonierung erfüllt werden. Ausgehend vom zuvor positiv getesteten pFUW\_LTA<sub>g</sub>-Plasmid sollte der Vektor BMGNeo\_LTA<sub>g</sub> hergestellt werden.

Des Überblicks halber sind die einzelnen Klonierungsschritte im folgenden Flussdiagramm zusammengefasst.

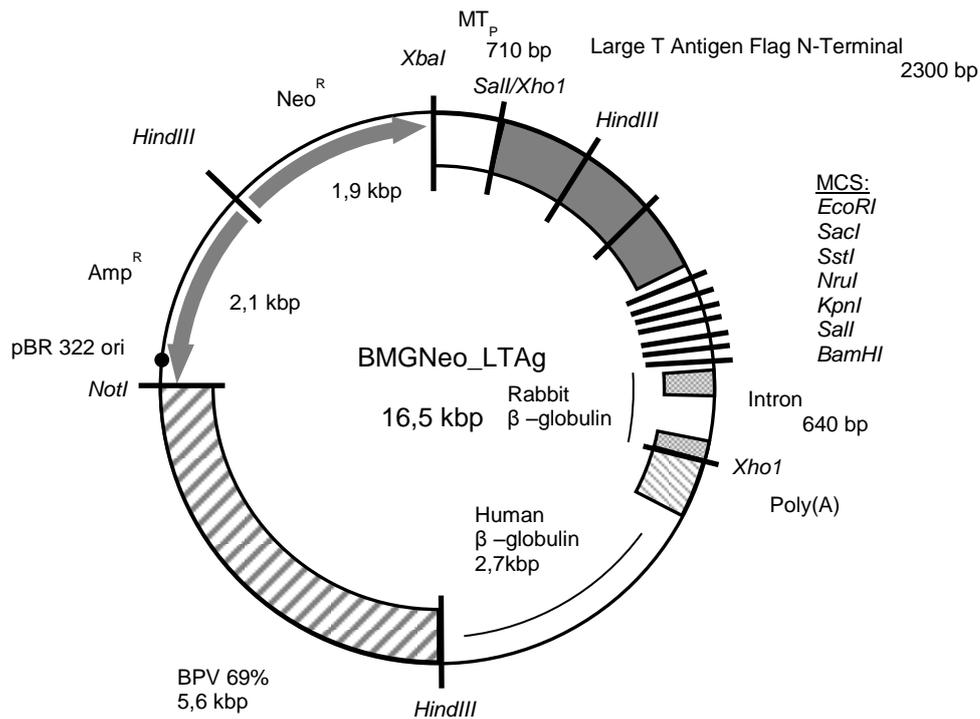
Zunächst isolierten wir die FLAG-LT-Ag Sequenz nach Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Eco*RI aus pFUW\_LTA<sub>g</sub>. Um die Insertion der durch *Bam*HI/*Eco*RI-begrenzten LT-Ag-cDNA stromabwärts vom Promotor in BMGNeo zu realisieren, mussten 3 Klonierungszwischenschritte erfolgen. Erstens, die Eliminierung einer interferierenden *Bam*HI-Stelle im Vektor und zweitens der sich daran anschließende Einbau einer *Bam*HI-enthaltenden Multiple Cloning Site (MCS). Drittens ergab sich aus dem Vorhandensein von mehreren endogenen *Eco*RI-Schnittstellen in BMGNeo die Notwendigkeit, die flankierende *Eco*RI-RE-Stelle der LT-Ag-DNA durch Umklonierung in das Plasmid pDPL15 in *Xho*I zu modifizieren. Im Einzelnen wurde zunächst BMGNeo mit *Bam*HI geschnitten und die Restriktionsenden mit Klenow Enzym zum Doppelstrang aufgefüllt, religiert und in kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Die Inaktivierung der *Bam*HI Restriktionsstelle in den erhaltenen Plasmiden wurde mittels Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese überprüft. Das resultierende BMGNeo $\Delta$ B-Plasmid wurde nun durch Verdau mit *Sal*I (Fermentas) linearisiert. Für den Einbau der Multiple Cloning Site wurden die einzelsträngigen MCS-Oligos in äquimolaren Verhältnissen gemischt, bei 94 °C für 3 min denaturiert und bei RT langsam zum Doppelstrang renaturieren lassen. Das *Sal*I-linearisierte BMGNeo $\Delta$ B-Plasmid wurde in Anwesenheit des renaturierten MCS-Doppelstrang-Oligonukleotids ligiert und in kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Resultierende Bakterienkolonien wurden präpariert und BMBNeo $\Delta$ B auf Linearisierbarkeit mit *Bam*HI infolge der Aufnahme der MCS-Sequenz getestet. Rekombinanten mit *Bam*HI-sensitivem Plasmid erhielten die Bezeichnung BMGNeo $\Delta$ B\_MCS.

Das oben beschriebene Plasmid pFUW\_LTA<sub>g</sub> wurde mit *Bam*HI und *Eco*RI verdaut und das LT-kodierende Insert, wie oben beschrieben, per Gelextraktion mittels Whatman DE81 Filterpapier isoliert. Als Plasmid zur Zwischenklonierung diente pDPL15, welches zuvor mit *Bg*III (Fermentas) und *Eco*RI verdaut und per Gelextraktion aufgereinigt wurde. Das leere pDPL15 Plasmidrückgrat wurde nun mit dem LT-kodierenden Insert ligiert und in kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert.



**Abb. 8:** Flussdiagramm zur Erläuterung der Klonierungsstrategie von BMGNeo\_LTA ausgehend von pFUW\_LTA, BMGNeo und pDPL15 (vergleiche auch Plasmidkarten).

Mittels Gelextraktion wurde nach Triple-Verdau mit *Bam*HI und *Xho*I sowie *Pvu*I das LT-kodierende Insert nun aus dem erhaltenen pDPL15\_Bg/II\_LTAG Plasmid ausgelöst und gleichzeitig das Plasmid in 2 kleinere Stücke zur Vereinfachung der Fragmentisolierung zerschnitten. Das oben beschriebene BMGNeoΔB\_MCS Plasmid wurde schließlich nach Verdau mit *Sal*I und *Bam*HI und Aufreinigung per Gelextraktion mit dem so erhaltenen Insert ligiert und in kompetente *E. coli* DH5a transformiert. Die folgende Abbildung zeigt eine Plasmidkarte des auf diese Weise erhaltenen BMGNeo\_LTAG Expressionskonstrukts.



**Abb. 9:** Plasmidkarte von BMGNeo\_LTAG, eingezeichnet sind die für diese Arbeit wichtigsten Restriktionsschnittstellen.

## 2.14 Generierung transgener Zellen

### 2.14.1 Transfektionen

Transfektionen erfolgten mit liposomalen und nicht-liposomalen Transfektionsreagenzien, Nucleofektion und Elektroporation.

Promofectin (Promokine) und Lipofectamin LTX mit Plus Reagenz (Invitrogen) wurden entsprechend der Herstellerempfehlungen und -protokolle verwendet. Nucleofektionen von MSC erfolgten mittels Amaxa Nucleofektion gemäß der Herstellerprotokolle mit Human MSC Nucleofector Kit (Amaxa) und den Programmen C17 und U23. Die physikalischen Parameter sind für unterschiedliche Zelltypen optimiert und werden von der Firma nicht bekannt gegeben.

Elektroporationen von NIH/3T3 und NHDF erfolgten in Anlehnung an das vom Hersteller empfohlene Protokoll mittels Multiporator (Eppendorf) in hypoosmolarem Elektroporationspuffer (Eppendorf) unter Verwendung von Elektroporationsküvetten mit 4 mm Spaltbreite mit 320-1200 V und einer Feldstärke von 800-3000 V/cm mittels eines einzelnen Pulses und einer Zeitkonstante von 100  $\mu$ s bei Raumtemperatur.

#### **2.14.2 Generierung infektiöser lentiviraler Partikel**

Die Gewinnung lentiviraler Partikel erfolgte durch transiente  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Transfektion (Chen and Okayama, 1987) von Zellen der Verpackungszelllinie HEK 293T mit Hilfe eines Vier-Plasmid-Expressionssystems (Mochizuki et al., 1998).

In Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm wurden HEK 293T Zellen in einer Dichte von 60.000 Zellen/cm<sup>2</sup> frisch ausgesät. Am Folgetag wurden für den Transfektionsansatz in einem Endvolumen von jeweils 800  $\mu$ l H<sub>2</sub>O pro Petrischale jeweils 10  $\mu$ g des Expressionsplasmides pFUW\_LTA<sub>g</sub>, 5  $\mu$ g der Verpackungsplasmide pRSV-Rev und pMDLg/pRRE sowie 5  $\mu$ g des Hüllproteinplasmids pVSVG gelöst. Nach Zugabe von 200  $\mu$ l 1,25 M CaCl<sub>2</sub> und 1 ml HBS (2-fach konzentriert) wurde der Ansatz mit einer serologischen Pipette gründlich durchmischt. Die Präzipitatbildung wurde zur Kontrolle lichtmikroskopisch überprüft. Der vollständige Transfektionsansatz wurde nun tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und durch Schwenken mit dem Wachstumsmedium vermischt. Nach 4 h erfolgte ein Mediumwechsel. Der virale Partikel enthaltende Überstand wurde nach 48 h gesammelt, bei 4°C für 7 min bei 800 x g zentrifugiert und anschließend durch 0,45  $\mu$ m PVDF Spritzenfilter (Fa. Roth) sterilfiltriert. In einer Sorvall Discovery 100SE Zentrifuge wurden die Filtrate anschließend mit einem TH-641 Thermo-Festwinkelrotor für 90 min bei 4°C mit 115.000 x g ultrazentrifugiert. Die Partikel wurden in kaltem PBS über Nacht bei 4°C resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Nach erfolgreicher Transduktion wurde unter der Annahme einheitlicher Titer der Aliquots aus einer Virusgenerierung auf die Titerbestimmung verzichtet.

#### **2.14.3 Lentivirale Transduktion adhärenter Zellen**

Zur lentiviralen Transduktion wurden MSC und NHDF der ersten oder zweiten Passage in 6- oder 12-Wellplatten bis zu einer Konfluenz von 70 % kultiviert. Die Platten wurden mit frischem Wachstumsmedium mit 8  $\mu$ g/ml Polybrene überschichtet und jedem Well 9-15  $\mu$ l der virushaltigen Suspension zugegeben. Nach 24 h wurde das Wachstumsmedium gewechselt. Nach weiteren 24 h wurden die adhärenter Zellen passagiert und in den jeweiligen Zelldichten der Ausgangszelllinien zur Weiterkultur ausplattiert.

### **2.15 Analyse des Wachstums in Softagar**

Die Softagarversuche wurden in 6-Well-Schalen durchgeführt. Hierzu wurde autoklavierte 2%ige Agarose im Wasserbad auf 42 °C erwärmt und in einer Endkonzentration von 0,5 % in das Wachstumsmedium gegeben. Nach dem Mischen wurden jeweils 1,5 ml sofort in jedes Well als Basal-Agar pipettiert und auskühlen lassen. In der Zwischenzeit wurden in den jeweiligen Wachstumsmedien jeweils 5000 Zellen pro ml resuspendiert. Nach dem Auskühlen des Basal-Agars wurde Agarose in einer Endkonzentration von 0,35 % mit Wachstumsmedium gemischt. Der Basal-Agar wurde nun zügig in jedem Well mit je einem ml der Softagar-Zell-Suspension als Top-Agar überschichtet und ebenfalls auskühlen lassen. Im Anschluss wurden alle Wells mit je einem ml Wachstumsmedium überschichtet und die Platten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank für 14-21 Tage inkubiert. Als Positivkontrolle dienten Zellen der Kolonkarzinomlinie SW480-TCF1B (Liebig et al. 2005), als Negativkontrolle dienten die jeweiligen untransfizierten Ausgangszelllinien. Für jede Probe erfolgte der Ansatz im Triplikat. Frühestens zum Zeitpunkt des Sichtbarwerdens von makroskopisch sichtbaren Klonen bei der Positivkontrolle, spätestens nach 21 Tagen erfolgte die Auswertung. Das überständige Medium wurde entfernt und die Löcher je zweimal mit PBS gespült. Die Färbung erfolgte bei 4°C für 1h mit 0,005% Kristallviolett-färbelösung. Die Platten wurden im Anschluss mit kaltem dest. H<sub>2</sub>O gespült und fotografisch dokumentiert.

### **2.16 Statistische Auswertung**

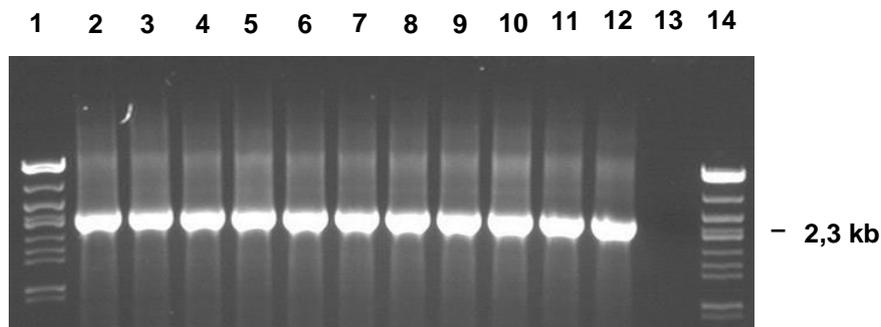
Die für die vorliegende Arbeit verwendeten statistischen Auswertungen wurden mithilfe von Microsoft Excel 2010 (Microsoft; Unterschleißheim, Deutschland) und SAS Version 9.2 (SAS Inc.; Cary NC, USA) durchgeführt. Zur Anwendung kamen ein allgemeines lineares Modell mit Messwertwiederholung, sowie gemischte Modelle zur Quantifizierung von Gruppeneffekten. Es wurden Mittelwerte, sowie die entsprechenden Effektschätzer mit den dazugehörigen 95%- Konfidenzintervalle ermittelt. Für die Bestimmung des Schätzers für das Effektmaß wurde ein gemischtes Modell mit Messwertwiederholung verwendet. Weiter wurden auch für den Schätzer Konfidenzintervalle bestimmt. Für alle statistischen Analysen wurde ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 5 \%$  vorausgesetzt, ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als signifikant angenommen.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Klonierung der Expressionsvektoren

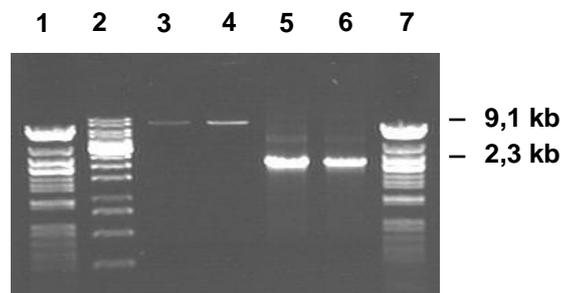
##### 3.1.1 Herstellung des lentiviralen Expressionsplasmids pFUW\_LTA<sub>g</sub>

Wie oben beschrieben (Pkt. 2.13.2) wurde der offene Leserahmen (ORF) des FLAG-Tag markierten Large T Antigens (LT-Ag) mittels PCR unter Einbeziehung eines Proofreading-Enzyms amplifiziert. Die zur Darstellung der Amplifikate durchgeführte Agarose-Gelelektrophorese zeigt in allen Proben eine einheitliche Bande, deren Größe von etwa 2300 bp somit der des FLAG-Tag markierten LT Antigens entspricht.



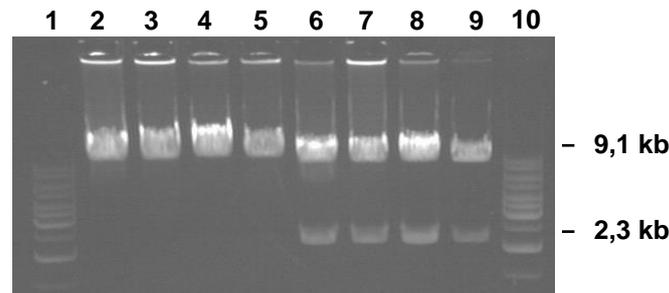
**Abb. 10:** Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Amplifikaten des LT-Antigens anhand des Matrizenplasmids pCDNA3.1LTNFLAG (Spuren 2-12) an einem *Annealing*-Temperaturgradienten von 56-65 °C. Größenmarker M13 (Spuren 1 und 14) und Leerwert/*blank* (Spur 13).

Nach dem Restriktionsverdau und der Aufreinigung von Insert und Vektor-Backbone erfolgte eine Elektrophorese zum Vergleich der unterschiedlichen DNA-Konzentrationen. Aus der erfolgten Agarosegelelektrophorese wurden so die molaren Verhältnisse von Insert und Backbone für die Ligationsreaktion abgeschätzt.



**Abb. 11:** Agarosegelelektrophorese der aufgereinigten DNA-Fragmente vor Ligation. Spur 1 und 7: Größenmarker M13, Spur 2: Größenmarker GeneRuler 1kb, Spur 3 und 4: pFUGW-Backbone, Spur 5 und 6: PCR-Produkt LT Antigen.

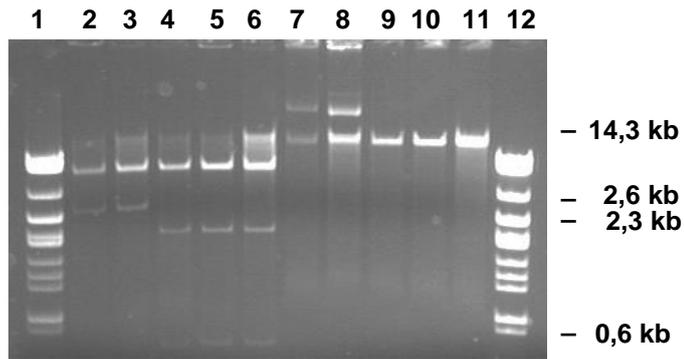
Die rekombinanten Plasmide aus der Ligation des FLAG-Tag markierten LT Antigens mit dem leeren pFUGW-Vektorbackbone wurden nach der Plasmid-Minipräparation zur Größenbestimmung durch Restriktionsverdau mit *Bam*HI linearisiert. Anhand eines Doppelrestriktionsverdaus mit *Bam*HI und *Eco*RI wurden die rekombinanten Plasmide auf Insertion überprüft. Die Agarosegelelektrophorese zeigt in den Spuren der Doppelrestriktion die der LT Antigen-cDNA entsprechende Bande von etwa 2300 bp.



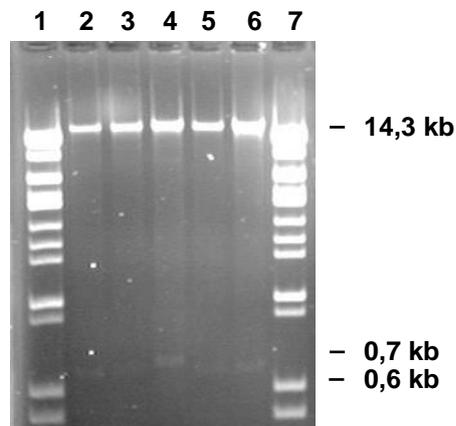
**Abb. 12:** Agarosegelelektrophorese pFUW\_LTAg nach Minipräparationen der gepickten Klone. Spur 1 und 10: Größenmarker GeneRuler 1kb, Spuren 2-5: pFUW\_LTAg linearisiert, Spuren 6-9: pFUW\_LTAg nach Doppelverdau BamHI/EcoRI.

### 3.1.2 Herstellung des episomalen Expressionsvektors BMGNeo\_LTAg

Die Elimination der *Bam*HI-Restriktionsstelle in BMGNeo wurde nach Eröffnung und Klenow-Fill-In durch Restriktionsverdau mit *Bam*HI überprüft und bestätigt. Der erfolgreiche Einbau der MCS konnte an den untersuchten BMGΔB\_MCS-Klonen durch Linearisierung nach Verdau mit *Bam*HI (14,3 kb) und das charakteristische Bandenmuster (7 kb und 2,3 kb) nach Restriktion mit *Bgl*II im Vergleich zu den BMGNeoΔB-Ausgangsklonen (7 kb und 2,6 kb) wie unten ersichtlich in der Elektrophorese dargestellt werden. Zur Überprüfung der Orientierung der MCS nach Einklonierung erfolgte ein *Sal*I/*Xho*I-Doppelverdau mit anschließender gelelektrophoretischer Überprüfung. Die Insert-Bande lief bei dem für die weiteren Klonierungen verwendeten Klon mit etwa 640 bp ca. 23 Basenpaare höher als bei den beiden anderen untersuchten BMGΔB\_MCS-Klonen entsprechender in Abbildung 9 dargestellten Orientierung der einklonierten MCS-Sequenz.

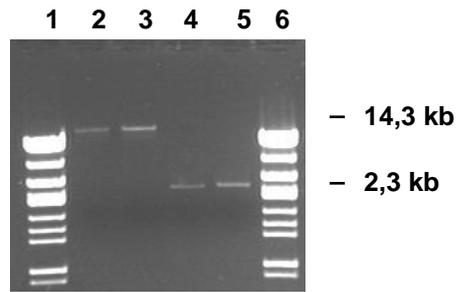


**Abb. 13:** Kontrollelektrophorese von BMGNeo nach Elimination der ursprünglichen BamHI-Schnittstelle und Einbau der MCS. Spur 1 und 14: Größenmarker M13, Spur 2 und 3: BMGNeo $\Delta$ B nach Verdau mit BglII, Spur 4-6: BMGNeo $\Delta$ B\_MCS nach Verdau mit BglII. Spur 7 und 8: BMG BMGNeo $\Delta$ B nach Verdau mit BamHI, Spur 9-13: BMGNeo $\Delta$ B\_MCS nach Verdau mit BamHI.



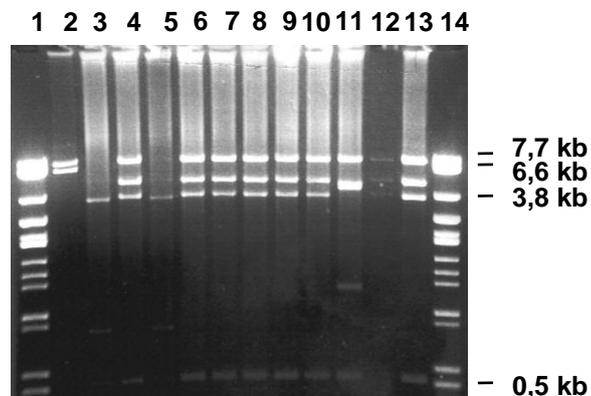
**Abb. 14:** Agarosegelelektrophorese zur Identifikation rekombinanter BMGNeo $\Delta$ B\_MCS Klone nach Verdau mit SalI und XhoI. Spur 1 und 7: Größenmarker M13, Spuren 2-3: BMGNeo $\Delta$ B Klone, 4-6: BMGNeo $\Delta$ B\_MCS Klone. Der BMGNeo $\Delta$ B\_MCS-Klon in Spur 4 entspricht dem Einbau der MCS in der in Abb. 9 gezeigten Orientierung.

Zur Vorbereitung auf die Ligation des FLAG-Tag markierten LT-Antigens aus pDPL15 mit dem präparierten BMGNeo $\Delta$ B\_MCS-Plasmid wurden die Konzentrationen der DNA-Fragmente und die für die Ligation einzusetzenden molaren Verhältnisse von Insert und Vektorbackbone wie bereits oben für pFUW\_LTag beschrieben durch gemeinsame Gelelektrophoresen abgeschätzt.



**Abb. 15:** Agarosegelelektrophorese zum Nachweis der Präparationsqualität und zur Mengenabschätzung der DNA-Fragmente vor Ligation. Spur **1** und **6**: Größenmarker M13, Spur **2** und **3**: BMGNeo $\Delta$ B\_MCS nach Eröffnung mit *SalI*/*BamHI*, Spur **4** und **5**: LT-Antigen aus pDPL15 mit *XhoI*/*BamHI*-Enden.

Nach erfolgreicher Ligation der FLAG-Tag markierten LT-Antigen-DNA mit BMGNeo $\Delta$ B\_MCS wurden Minipräparationen gepickter Bakterienkolonien durch Verdau mit *HindIII* auf die Insertion des LT-Antigens untersucht. Ein Großteil der untersuchten Proben zeigte ein 526 bp umfassendes DNA-Fragment, das durch zwei endogene, in der LT-Ag-DNA vorhandenen *HindIII*-Restriktionsstellen bedingt und somit indikativ für den Einbau der LT-Ag-Sequenz ist. Das Spaltungsmuster mit 4 deutlich getrennt laufenden Banden (7,7 kb, 4,41 kb, 3,8 kb und 0,5 kb) ist klar different zu dem Ausgangsplasmid, das nach diesem Restriktionsverdau nur 2 Banden (7,7 kb und 6,6 kb) zeigt.



**Abb. 16:** Agarosegelelektrophorese zur Identifikation rekombinanter Plasmide nach Ligation. Spur **1** und **14**: Größenmarker M13, Spur **2**: BMGNeo Ausgangsplasmid, Spuren **3-13**: rekombinante Plasmide BMGNeo\_LTAg.

Parallel zur Herstellung der beiden für die Expression des SV40 Large T-Antigen vorgesehenen Gentransfersysteme wurde die Integrität des LT-Antigens überprüft. Neben der DNA-Sequenzierung der Klonierungsübergänge sollte vor allem das LT-Ag-Protein hinsichtlich seiner in der Literatur beschriebenen zellbiologischen Parameter wie molekulare Masse, Kernlokalisierung und physische Bindung an den Tumorsuppressor TP53 (Pipas, 2009; Fanning and Knippers, 1992) geprüft werden. Bei Erfüllung der bekannten Eigenschaften sollte

nachfolgend untersucht werden, ob das LT-Ag Einfluss auf Wachstum und Plastizität verschiedener Zelltypen ausübt.

## **3.2 Transfektionsexperimente mit BMGNeo\_LTA<sub>g</sub>**

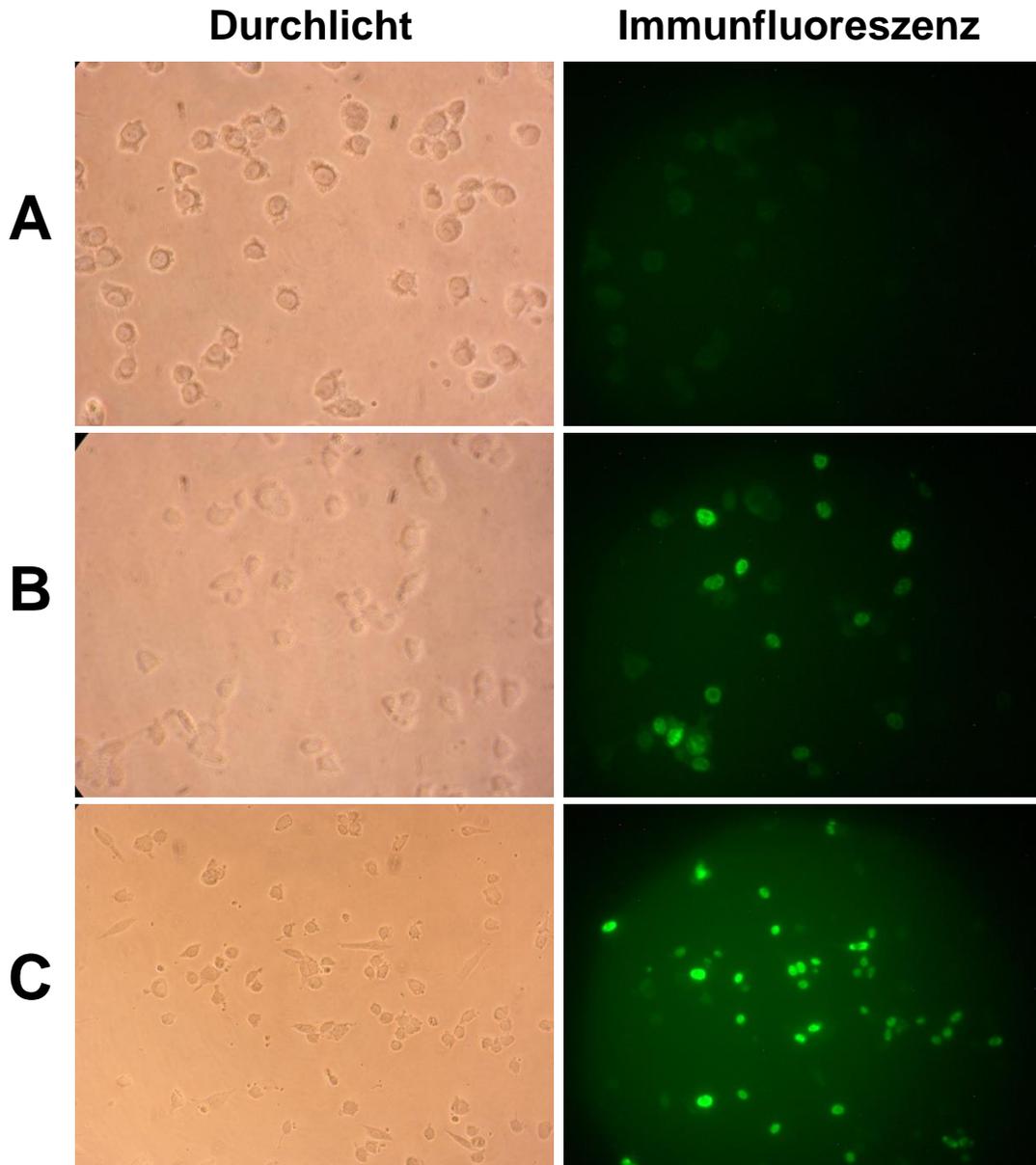
### **3.2.1 Transfektionen von NIH3T3 mit BMGNeo\_LTA<sub>g</sub>**

Als Einstiegssystem für die Charakterisierung der LT-Ag Expression wurden NIH3T3-Mausfibroblasten mit Promofectin sowie durch Elektroporation mit BMGNeo\_LTA<sub>g</sub> transfiziert. Transfektanten wurden für 2 Wochen einer Selektion durch Zugabe von 500 µg/ml G418 zum Wachstumsmedium unterzogen und nachfolgend immunzytochemisch und per Western Blot Analyse mit einem spezifischen Anti-FLAG Antikörper auf die Expression von LT-Ag untersucht. Da der die Transkription der LT-Ag-Sequenz steuernde Metallothionein-Promotor durch Schwermetalle induzierbar ist, erfolgte bei einem Teil der Proben 48 h vor dem Nachweis eine Induktion der Expression durch Zugabe von CdCl<sub>2</sub> in einer Endkonzentration von 5 µM. Immunzytochemisch ließ sich die Kerntranslokation des FLAG-Tag-markierten LT-Antigens durch eine deutliche Kernfluoreszenz der transfizierten Zellen nachweisen (Abb. 17 - B). Die zusätzliche Induktion der Expression von LT Antigen nach CdCl<sub>2</sub>-Exposition zeigte sich in einer signifikanten Zunahme der Kernfluoreszenz (Abb. 17 - C). In der Western Blot Analyse wurde eine transgenspezifische Polypeptidkette bei 80 kDa in den Lysaten der transfizierten Zellen in Übereinstimmung mit der publizierten molekularen Masse für das LT-Ag im SDS-Gel nachgewiesen (nicht dargestellt).

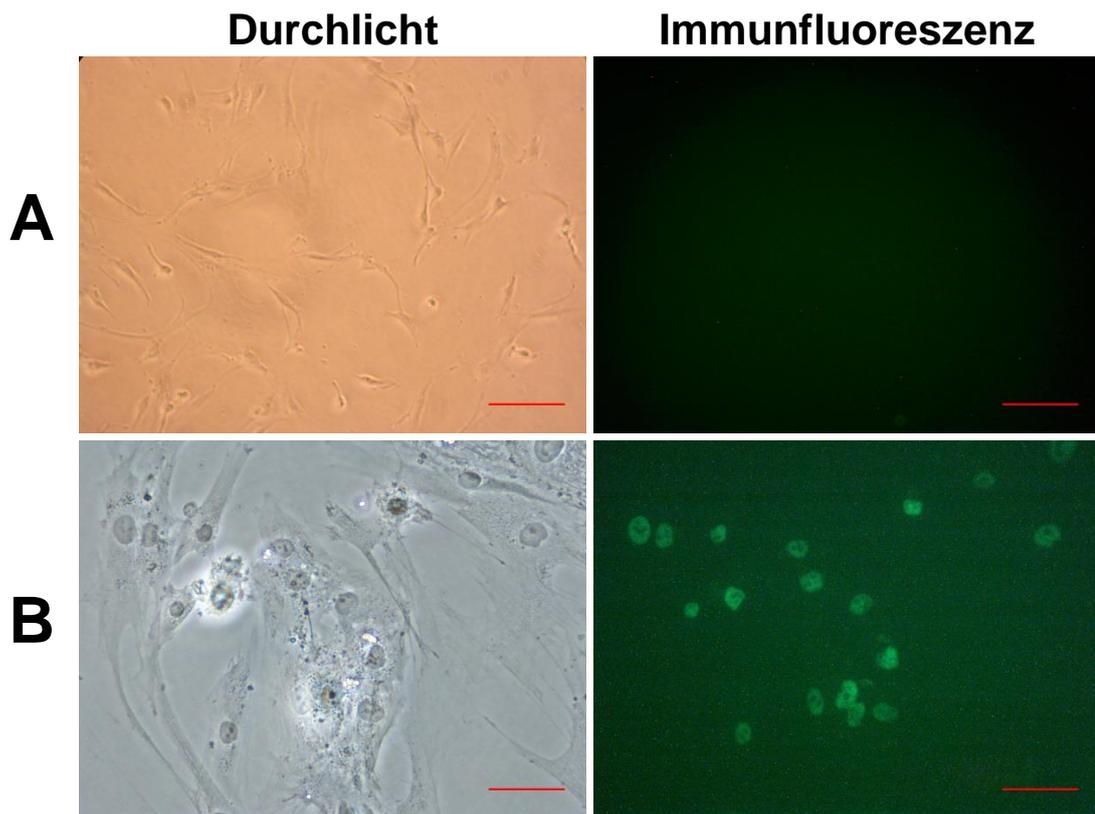
### **3.2.2 Transfektionen von hMSC mit BMGNeo\_LTA<sub>g</sub>**

Mittels Amaxa Nucleofection wurden hMSC in erster Passage mit BMGNeo\_LTA<sub>g</sub> transfiziert. Nach Transfektion erfolgte eine Selektion der behandelten Zellen durch Supplementierung des Wachstumsmediums mit G418 in einer Endkonzentration von 250 µg/ml. Nach 2 Wochen Selektion ließen sich resistente Zellen ausgehend von 5 Klonen identifizieren, die weiter kultiviert wurden. Die resistenten Zellen wurden immunzytochemisch und proteinanalytisch auf die Expression von Large T untersucht. Zur Aktivierung des Metallothionein-Promotors wurde dem Wachstumsmedium vor der Untersuchung für 48 h CdCl<sub>2</sub> in 5 µM Endkonzentration zugesetzt. Die Expression von LT-Ag konnte durch einen FLAG-Tag spezifischen Antikörper immunzytochemisch als Kernfluoreszenz (Abb. 18 - B) und im Western Blot durch die charakteristische Bande bei 80 kDa im SDS-PAA-Gel (Abb. 20) nachgewiesen werden. Die transgenen Zellen wurden im daraufhin aufgeteilt und in drei separaten Zellreihen weiterkultiviert. Eine Zellreihe erhielt ausschließlich G418, eine nur CdCl<sub>2</sub> und die dritte

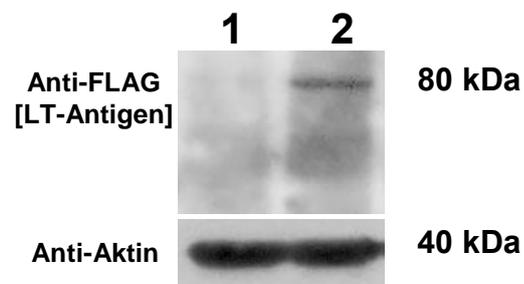
Zellreihe erhielt G418 und CdCl<sub>2</sub>. Das Wachstumsverhalten dieser Zellreihen wurde dokumentiert und anschließend ausgewertet.



**Abb. 17:** Expression und Kernlokalisierung von LT-Antigen. Immunzytochemische Färbung mit den oben genannten Antikörpern. Untransfizierte NIH3T3 (**A**) zeigen keine Expression von LT Antigen. Expression von LT Antigen lässt sich an transgenen Zellen (**B**) durch Zugabe von CdCl<sub>2</sub> (5 μM) induzieren (**C**). Originalvergrößerung 200-fach, Größenmarker bei Verwendung von Nikon Coolpix 995 nicht anwendbar. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für eine Reihe von transienten und stabilen Transfektionen von NIH3T3 mit BMGNeo\_LTAG.



**Abb. 18:** Immunzytochemische Färbung des FLAG-Tag markierten LT-Ag. Deutlich sichtbar ist die Kernfluoreszenz der transgenen hMSC HFSZ0310\_BMGNeo\_LTAg (**B**, Originalvergrößerung 200-fach, Größenmarker entspricht 50  $\mu\text{m}$ ) im Vergleich zu den untransfizierten Kontrollen (**A**, Originalvergrößerung 100-fach, Größenmarker entspricht 25  $\mu\text{m}$ ).

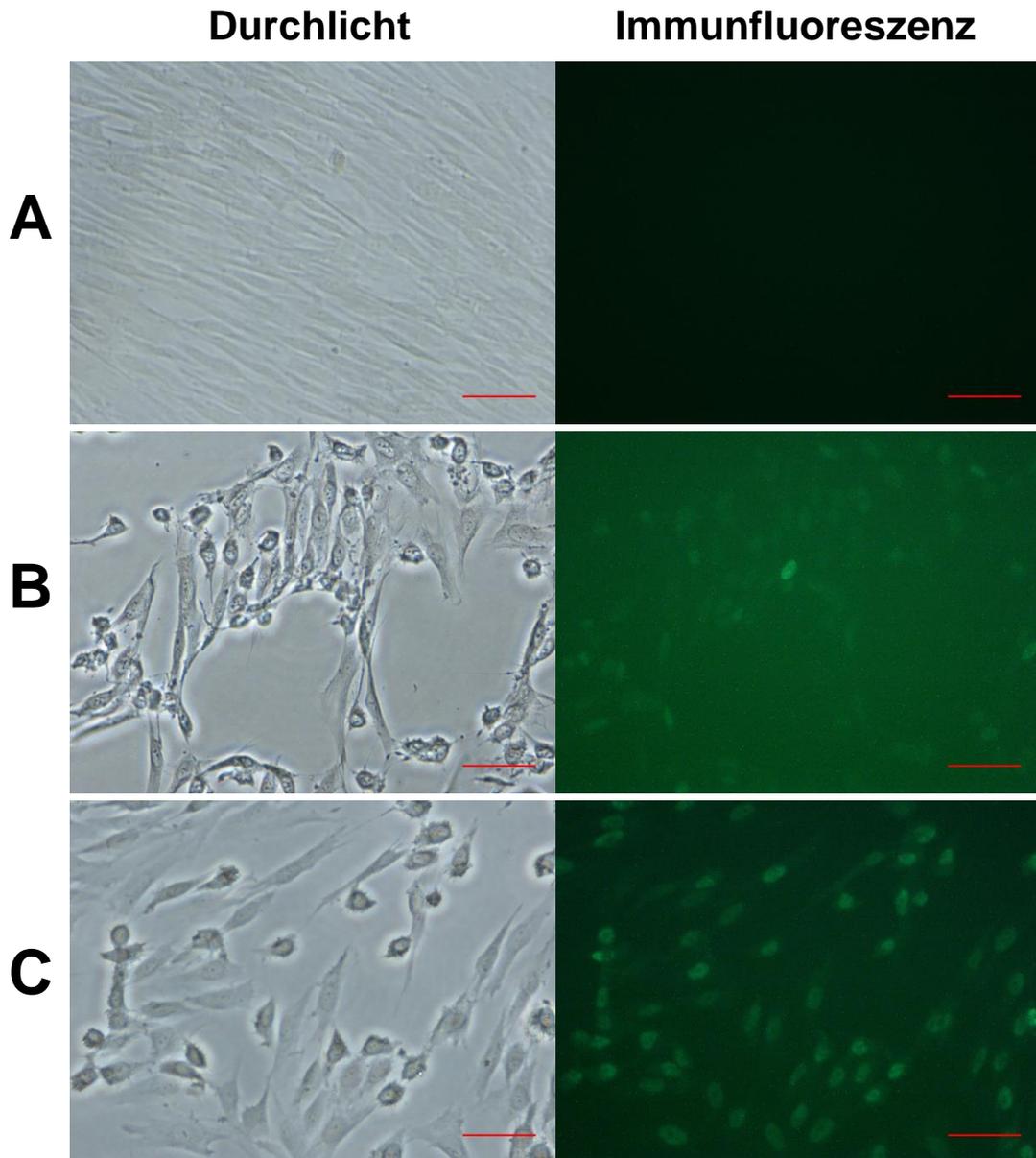


**Abb. 19:** Westernblotanalyse zum Nachweis der Expression des transgenen LT-Antigens der mit BMGNeo\_LTAg transfizierten hMSC nach Induktion mittels 5  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  (Spur 2), im Vergleich zu den untransfizierten Kontrollen (Spur 1).

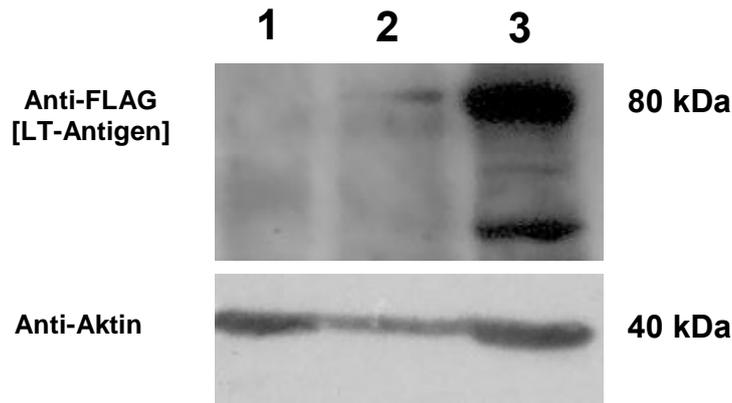
### 3.2.3 Transfektionen von NHDF mit BMGNeo\_LTAg

NHDF der ersten und zweiten Passage wurden unter Verwendung von Lipofectamin LTX mit BMGNeo\_LTAg transfiziert. Dem Wachstumsmedium wurde 48 h nach der Transfektion G418 in einer Endkonzentration von 500  $\mu\text{g/ml}$  zugesetzt. Unter dieser Selektion ließen sich nach 2 Wochen resistente Klone selektieren und weitervermehren. Zum Nachweis der Expression von

LT Antigen erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung sowie eine Westernblotanalyse, bei der, wie oben beschrieben, einem Teil der Proben und den Kontrollen zuvor für 48h zusätzlich CdCl<sub>2</sub> in einer Konzentration von 5 µM in das Wachstumsmedium zugesetzt wurde. Es zeigte sich in der Immunfluoreszenzmikroskopie eine deutliche Kernfärbung der transgenen Zellen nach Färbung mit dem spezifischen Anti-FLAG Antikörper, die sich durch Induktion mit CdCl<sub>2</sub> weiter steigern ließ.



**Abb. 20:** Immunzytochemische Färbung von NHDF nach Transfektion mit BMGNeo\_LTAgen und Anfärbung des FLAG-Tag markierten LT-Antigens. Bei den mit CdCl<sub>2</sub> behandelten Zellen (C) ist im Vergleich zu denen in unbehandeltem Zustand (B) eine deutliche Zunahme der Kernfluoreszenz nachzuweisen. Die Kontrollen (A) sind negativ für LT-Ag. Originalvergrößerung 200-fach, Größenmarker entspricht 50 µm. Diese Analyse ist repräsentativ für die Etablierung von 2 weiteren, über diesen episomalen Expressionsvektor etablierten NHDF-Transfektantenlinien.

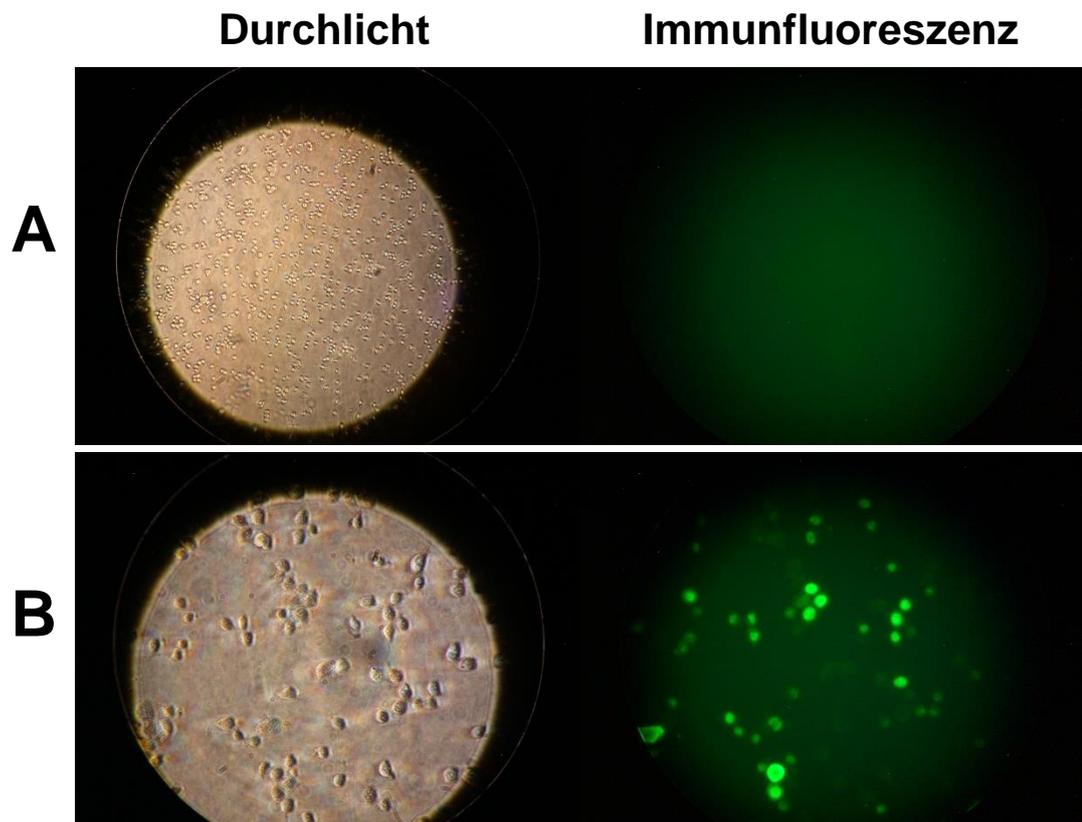


**Abb. 21:** Westernblotanalyse der mit BMGNeo\_LTAg transfizierten NHDF, im Vergleich zu den untransfizierten Kontrollen (Spur 1). Deutlich zu erkennen ist die Zunahme der Expression von LT-Antigen durch CdCl<sub>2</sub> (Spur 3) im Vergleich mit den unbehandelten Transfektanten (Spur 2).

### 3.3 Transfektionen und Transduktionen mit pFUW\_LTAg

#### 3.3.1 Transfektionen von NIH3T3 mit pFUW\_LTAg

NIH/3T3 wurden entsprechend des Herstellerprotokolls durch Zugabe von Promofectin mit pFUW\_LTAg transfiziert.

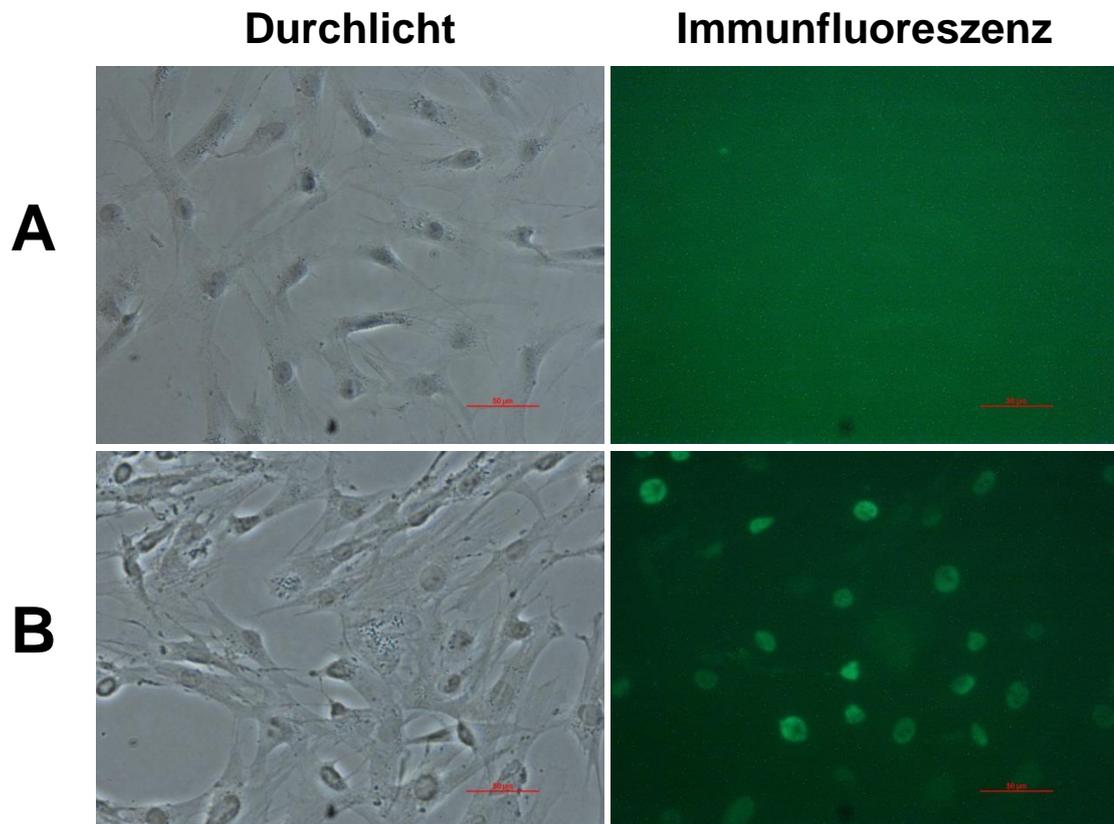


**Abb. 22:** Immunzytochemische Färbung von NIH3T3 72 h nach Transfektion mit pFUW\_LTAg. Im Vergleich zu den untransfizierten Kontrollen (A, Originalvergrößerung 100-fach, Größenmarker bei Verwendung von Nikon Coolpix 995 nicht anwendbar) zeigt sich bei den Transfektanten (B, Originalvergrößerung 200-fach, Größenmarker bei Verwendung von Nikon Coolpix 995 nicht anwendbar) die Expression des LT-Antigen durch Kernfluoreszenz. Die zellmorphologischen Veränderungen der abgebildeten Zellen sind auf fixierungsbedingte Artefakte zurückzuführen.

Die behandelten Zellen wurden weiter kultiviert und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie unter Verwendung eines FLAG-Tag-spezifischen Antikörpers auf die Expression von LT-Antigen untersucht. Immunfluoreszenzmikroskopisch ließ sich erwartungsgemäß die erfolgreiche Transfektion der NIH/3T3 und Expression von LT-Antigen anhand der Kernfluoreszenz der transfizierten Zellen nachweisen.

### 3.3.2 Transduktionen von NHDF mit pFUW\_LTAG

Nach Generierung infektiöser Partikel wurden NHDF erster und zweiter Passage mit pFUW\_LTAG lentiviral transduziert.



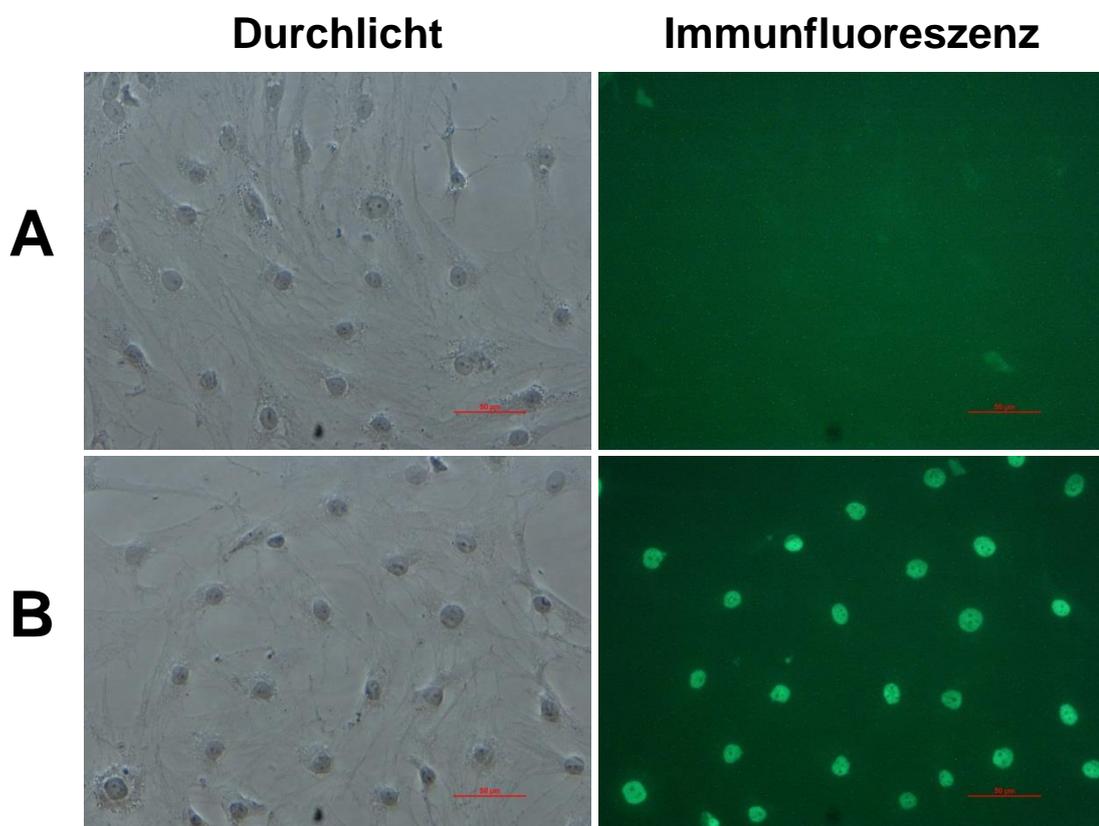
**Abb. 23:** Immunzytochemische Färbung von NHDF-Zellen nach lentiviraler Transduktion mit pFUW\_LTAG. Im Vergleich zu den untransduzierten Kontrollen (A) lässt sich bei den Transduktanten (B) die Expression des LT-Antigens durch Kernfluoreszenz darstellen. Originalvergrößerung 200-fach, Größenmarker entspricht 50 µm. Diese Analyse ist repräsentativ für die Etablierung von 2 weiteren, über diesen lentiviralen Expressionsvektor etablierten NHDF-Transfektantenlinien.

Nach Passagierung wurden die behandelten Zellen immunfluoreszenzmikroskopisch und durch Western Blot Analyse auf die Expression von LT-Antigen untersucht. Die untersuchten Zellen wiesen nach immunzytochemischem Nachweis mittels FLAG-Tag-spezifischen Antikörpers in hohem Ausmaß die zu erwartende Kernfluoreszenz auf. Die Ergebnisse der Untersuchungen

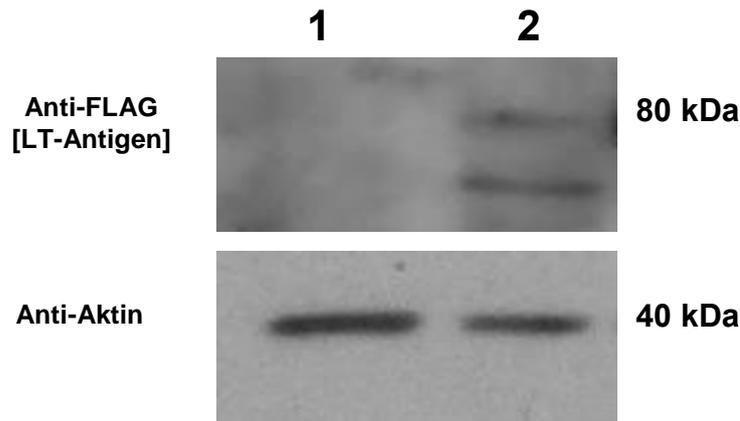
bestätigten somit die erfolgreiche Transduktion und Expression von LT-Antigen mit einer hohen Transduktionseffizienz von über 95% bereits unmittelbar nach Transduktion.

### 3.3.3 Transduktionen von hMSC mit pFUW\_LTA<sub>g</sub>

MSC der ersten und zweiten Passage wurden mit den gewonnenen lentiviralen Partikeln mit pFUW\_LTA<sub>g</sub> transduziert und anschließend auf die Expression von LT Antigen untersucht. Die Untersuchungen zeigten eine Expression des LT Antigen mit bereits initial hoher Transduktionseffizienz von über 95 %.



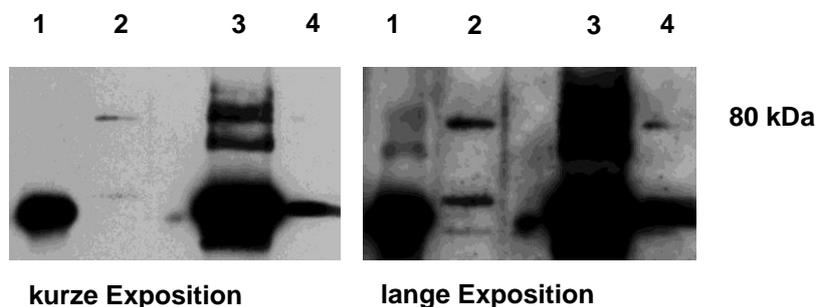
**Abb. 24:** Immunzytochemische Färbung von MSC nach lentiviraler Transduktion mit pFUW\_LTA<sub>g</sub>. Deutlich zu erkennen ist die fokussierte Kernfluoreszenz der Transduktanten (**B**) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (**A**). Originalvergrößerung 200-fach, Größenmarker entspricht 50 μm. Diese Analyse ist repräsentativ für die Etablierung von 6 weiteren, über diesen lentiviralen Expressionsvektor etablierten MSC-Transfektantenlinien.



**Abb. 25:** Westernblotanalyse zum Nachweis von FLAG-Tag-markiertem LT-Antigen in den transduzierten hMSC (Spur 2) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Spur 1). Bei der zusätzlichen Bande in Spur 2 handelt es sich am ehesten um ein Abbauprodukt des LT-Antigen.

### 3.4 Immunpräzipitation von p53 und LT-Ag

Da die funktionelle Inaktivierung von TP53 über eine physische Interaktion mit dem LT-Ag erfolgt, sollte dies in unserem Setting demonstriert werden, wozu wir eine Immunpräzipitation durchführten.



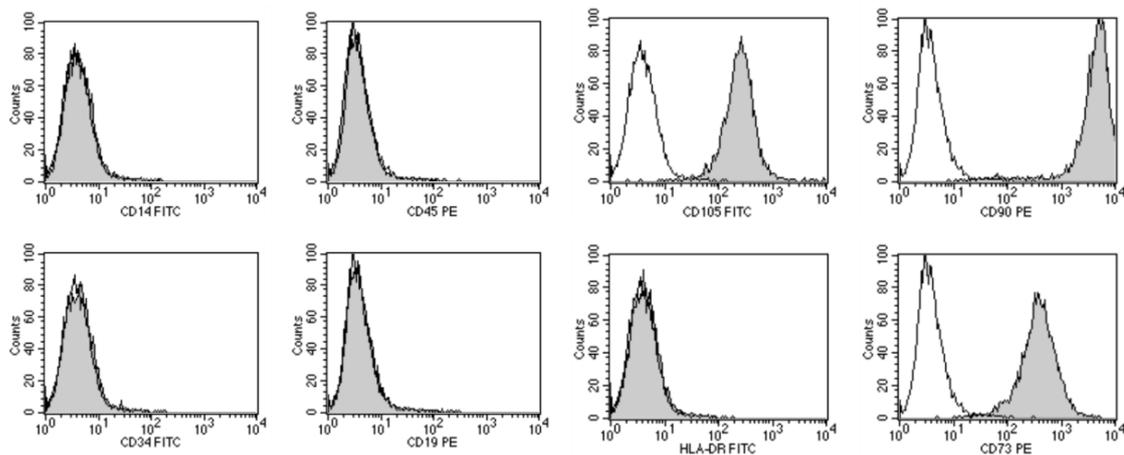
**Abb. 26:** Westernblotanalyse mit einem anti-FLAG-Tag Antikörper zum Nachweis der Coimmunpräzipitation (Co-IP) von LT Antigen mit einem p53-spezifischen mAk aus MSC-Transfektanten. Abgebildet sind die entwickelten Röntgenfilme nach kurzer Exposition (5 min) und nach langer Exposition (60 min) zur Unterscheidung zwischen anti-p53 Ak-spezifischen Immunglobulinketten und LT-Ag. Aufgetragen sind anti-p53 Antikörper (Spur 1); 1/40 Volumen IP-Input-Proteinlysate von pFUW\_LTAG-positiven MSC zum Nachweis des exprimierten 80 kDa Large T-Antigens (Spur 2); Immunpräzipitation von pFUW\_LTAG-positiven MSC (Spur 3) und der Überstand der Immunpräzipitation in einem entsprechenden Volumen zur IP-Input Probe von Spur 1. Er zeigt die verringerte LT-Ag-Menge als Resultat der erfolgten Co-IP (Spur 4).

Zu diesem Zweck wurden aus pFUW\_LTAG-positiven NHDF und MSC SDS-freie Proteinextrakte gewonnen und mittels eines hochaffinen monoklonalen anti-p53 Antikörpers immunpräzipitiert. Der Nachweis der Coimmunpräzipitation von TP53 und dem transfizierten LT-Antigen erfolgte mittels eines monoklonalen anti-FLAG-Tag Antikörpers per Western Blot Analyse. Anhand der spezifischen Detektionssignale konnten wir eine Interaktion des

exprimierten LT-Antigens der transgenen Zellen mit endogenem TP53 nachweisen. Dies stellt einen weiteren Hinweis auf die funktionelle Integrität des von uns hergestellten Konstrukts dar.

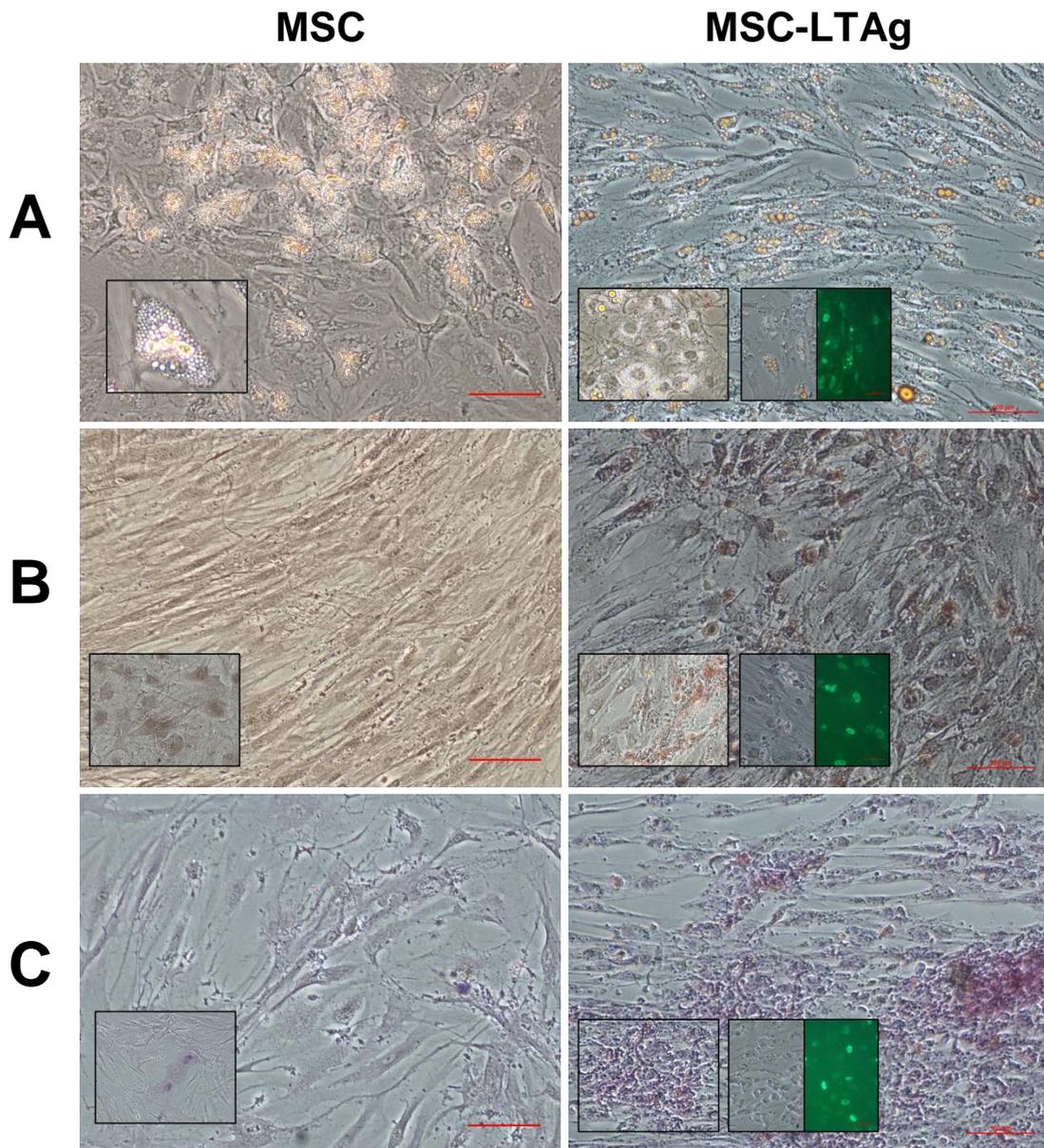
### 3.5 Charakterisierung der MSC nach Gentransfer von LT-Ag

LT-Antigen transgene MSCs wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit auf die Beibehaltung MSC-definierender Konsenseigenschaften (Dominici et al., 2006) untersucht. Hierzu gehörten die Analyse typischer Oberflächenantigene sowie Differenzierungsversuche zum Nachweis des multipotenten Differenzierungsvermögens in Zellen mit adipogenen, osteogenen und hepatogenen Eigenschaften. Das Muster der untersuchten Oberflächenmarker (CD14-, CD45-, CD34-, CD19-, CD105+, CD90+, CD73+, HLA-DR-) der pFUW\_LTA<sub>g</sub>-positiven MSC unterschied sich nicht von dem der Ausgangszelllinie.



**Abb. 27:** FACS-Analyse von LT-Ag-positiven MSC, graue Peaks entsprechen der Isotypkontrolle. Das Muster der bestimmten Oberflächenmerkmale (CD14-, CD45-, CD34-, CD19-, CD105+, CD90+, CD73+, HLA-DR-) entspricht den Konsensuskriterien nach Dominici et al. (2006).

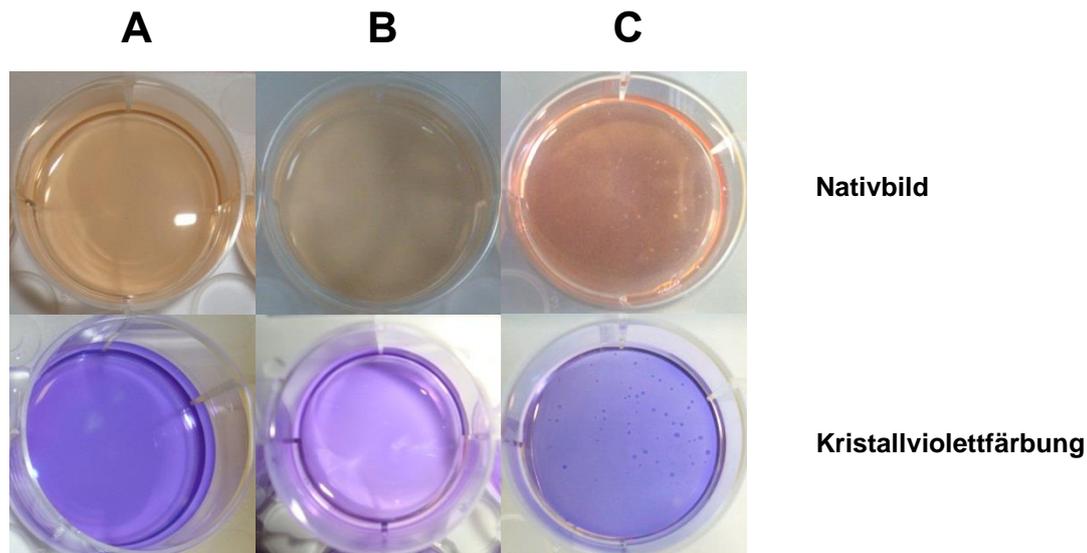
In den durchgeführten Differenzierungsversuchen ließen sich die transgenen MSC ebenso wie die unbehandelten Kontrollen durch Zugabe der entsprechenden Wachstumsfaktoren innerhalb von 14-21 Tagen zur Differenzierung anregen. Neben den definierenden adipogenen und osteogenen Differenzierungen führten wir in enger Absprache mit der AG Christ auch hepatogene Differenzierungen an den untersuchten Zellen durch (Abb. 28 - C). Bei den von pFUW\_LTA<sub>g</sub>-positiven MSC ausgehenden differenzierten Zellen ließ sich auch nach Differenzierung immunfluoreszenzmikroskopisch die Expression von LT-Antigen nachweisen.



**Abb. 28:** Dargestellt sind repräsentative Bilder aus den Differenzierungsversuchen. Verglichen werden jeweils unbehandelte und pFUW\_LTA<sub>g</sub>-positive MSC. Der Nachweis der adipozytären Differenzierung (A) erfolgte durch Färbung mit Sudan III-Lösung, nach osteozytärer Differenzierung (B) erfolgte die Färbung der Kalziumhydroxylapatitablagerungen mit Alizarin S, die Darstellung der Glykogenablagerungen nach hepatozytärer Differenzierung (C) erfolgte durch PAS-Färbung. Die Inserts zeigen eine vergrößerte Ansicht der Differenzierungsmerkmale, bzw. den immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis des LTA<sub>g</sub> an differenzierten Transduktanten. Die Abbildungen sind repräsentativ für je 3 unabhängige Versuche pro Zellreihe. Originalvergrößerung 100-fach, Größenmarker entspricht 100  $\mu$ M.

Zum Ausschluss einer onkogenen Transformation der pFUW\_LTA<sub>g</sub>-positiven MSC als Folge der Expression des LT-Antigens oder der Genomintegration lentiviraler Sequenzen wurden Softagarwachstumsversuche durchgeführt (Abb. 29). In diesen Versuchen wird die Fähigkeit zum Wachstum ohne Adhäsion an Basallamina-ähnliche Strukturen untersucht, was einem

möglichen Kriterium für *in-vivo*-Malignität entspricht (Hahn et al., 1999). In den durchgeführten Softagarversuchen bildeten unbehandelte MSC und transgene MSC im Gegensatz zu den als Positivkontrolle geführten SW480-TCF1B keine Kolonien. Es wurde deshalb davon ausgegangen, dass bei den pFUW\_LTA<sub>g</sub>-positiven MSC keine Malignität vorliegt. Diese Versuche zeigen somit, dass die pFUW\_LTA<sub>g</sub>-positiven MSC im Vergleich zu den WT-MSC unverändert die definierenden Charakteristiken von MSC gemäß der Konsensusdefinition (Dominici et al., 2006) besitzen.



**Abb. 29:** Repräsentative Bilder des Softagar-Assays von (A) unbehandelten MSC; (B) von pFUW\_LTA<sub>g</sub>-positiven MSC, die im Gegensatz zu (C) SW480-TCF1B keine Kolonien bilden.

### 3.6 Statistische Analyse der Wachstumsverläufe

In Langzeitkultivierungen wurde das Proliferationsverhalten der transgenen MSC mit den jeweiligen Ausgangslinien verglichen und die gewonnenen Daten statistisch und in Form von Wachstumskurven graphisch aufgearbeitet. Um den biologischen Effekt der Expression des LT-Antigens in den transgenen Zellen zu messen, wurden diese bis zur Seneszenz kultiviert und die Wachstumsverläufe mit denen der Wildtyp-MSC verglichen. Seneszenz wurde, wie bereits weiter oben beschrieben, angenommen, wenn die Zellen innerhalb von 14 Tagen kein sichtbares Wachstum mehr zeigten und sich lichtmikroskopisch typische morphologische Veränderungen in Form ausgedehnter intrazellulärer Vakuolen feststellen ließen.

Während die Seneszenz bei den MSC-KM bereits nach durchschnittlich 12,89 (95%KI: -1,44-27,22) PD erreicht ist, beträgt die Kultivierungsdauer der MSC-SC durchschnittlich 43,13 (95%KI: 28,79-57,47) PD. Die LT-Ag-positiven MSC-KM lassen sich für durchschnittlich für 41,87 (95%KI: 20,71-63,03) PD in Kultur halten, während nach durchschnittlich 67,45 (95%KI: 46,29-88,61) PD der LT-Ag-positiven MSC-SC Seneszenz

eintritt. Das ergibt einen deutlichen Gruppeneffekt von durchschnittlich 30,24 (95%KI: 9,96-50,51) PD. Die Kultivierungsversuche der untersuchten Zelllinien zeigen damit einen signifikanten Wachstumsvorteil der MSC-SC im Vergleich zu den MSC-KM. Auch in Hinblick auf die durchschnittlichen Populationsverdopplungszeiten (PDT) zeigen sich ähnliche Unterschiede. Die PDT ist für MSC-SC in unseren Versuchen mit durchschnittlich 4,03 (95%KI: -3,38-11,45) Tagen deutlich kürzer als für MSC-KM. Bei den untersuchten MSC-KM beträgt die PDT durchschnittlich 21,04 (95%KI: 7,96-34,11) Tage. Der Gruppeneffekt beträgt somit 17,00 (95%KI:1,98-32,02) Tage. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die genannten Werte in der folgenden Tabelle 5 noch einmal einzeln aufgeführt. Es ist aber auch festzustellen, dass unbehandelte MSC individueller Spender ein unterschiedliches Wachstumspotential besitzen, vgl. beispielsweise in Abb. 30 Wachstumsverläufe von HFSZ0111 und HFSZ0310 (Abb. 30 – B). Bei den geringen Fallzahlen der untersuchten MSC ist deshalb eine Beeinflussung der Mittelwerte durch die Ergebnisse einzelner Ausreißer nicht auszuschließen. Dies betrifft insbesondere die aus Knochenmark stammenden MSC-KM, die insgesamt ein deutlich inhomogeneres Wachstumsverhalten zeigen als die MSC-SC

**Tab. 5:** Übersicht der Auswertungen zu PD, PDT und Gruppeneffekt

Zellreihe	Wildtyp (95%KI)		LT-positiv (95%KI)	
	PD	PDT (d)	PD	PDT (d)
MSC-KM	12,89 (-1,44–27,22)	21,04 (7,96-34,11)	41,87 (20,71–63,03)	2,19 (1,86-2,52)
MSC-SC	43,13 (28,79-57,47)	4,03 (-3,38-11,45)	67,45 (46,29-88,61)	1,84 (1,52-2,08)
Gruppeneffekt	30,24 (9,96-50,51)	17,00 (1,98-32,02)	25,58 (-4,34-55,51)	0,39 (-0,05-0,81)

Angegeben sind die durchschnittlichen PD und PDT in Tagen gegliedert nach Zelltyp sowie das Ausmaß des Gruppeneffekts vor und nach Intervention mit den 95% Konfidenzintervallen entsprechend der statistischen Auswertung.

Der Interventionseffekt für die Expression des LT-Ag beträgt nach der statistischen Auswertung einen Zuwachs von 26,65 (95%KI: 12,65-40,64) PD. Dies ergibt einen statistisch signifikanten Wachstumsvorteil durch die Transduktion von pFUW\_LTA<sub>g</sub> in MSC unabhängig von der Herkunft der Ausgangszelllinie aus Knochenmark oder subkutanem Fettgewebe. Auch in den nach Herkunftsgewebe getrennten Analysen des Wachstumsverhaltens zeigt sich die genannte Verlängerung der *in-vitro* Lebensspanne. Die Auswertungen ergeben durchschnittlich 41,87 (95%KI: 20,71-63,03) kumulative PD für die MSC-KM und 67,45 (95%KI: 46,29-88,61) PD

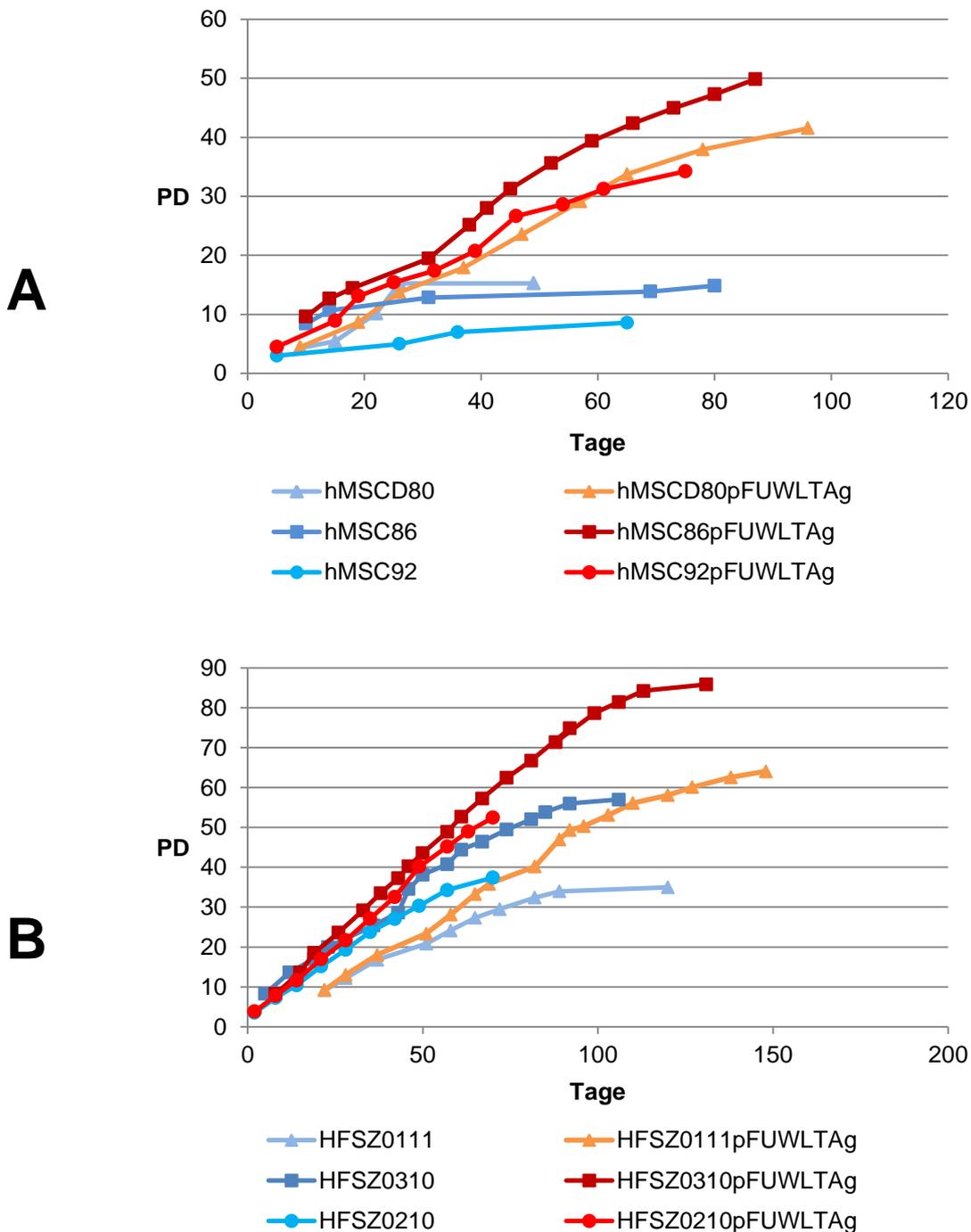
für die MSC-SC nach Expression von Large T. Der geschätzte Gruppeneffekt der kumulativen PD beträgt 25,58 (95% KI: -4,34-55,51) PD. Es ist demnach anzunehmen, dass der beschriebene Wachstumsvorteil der MSC-SC gegenüber den untersuchten MSC-KM weiter erhalten bleibt. Aufgrund der Schwankungsbreite der individuellen Wachstumsmuster und der kleinen Fallzahl ist dieser Effekt jedoch in unseren Analysen statistisch nicht signifikant. Nach Expression von LT-Ag verkürzen sich erwartungsgemäß auch die Populationsverdopplungszeiten auf 1,84 (95% KI: 1,52-2,08) Tage für MSC-SC und 2,19 (95% KI: 1,86-2,52) Tage für MSC-KM. Die Auswertung des Gruppeneffekts in Hinblick auf die Populationsverdopplungszeiten nach Transduktion des LT-Ag zeigt, dass der Wachstumsvorteil der MSC-SC vermutlich auch hier nach Expression des LT-Ag weiter erhalten bleibt. Die gemessene Verkürzung der PDT ist ebenso aufgrund der kleinen Fallzahl des geringen Umfangs des Untersuchungskollektivs durch weite Konfidenzintervalle gekennzeichnet. Der genannte Wachstumsvorteil der transgenen Zellen lässt sich in den erstellten Wachstumskurven auch graphisch nachvollziehen. Die Resultate unserer Analysen zeigten, dass die Expression von LT-Antigen nicht zu einem unbegrenzten Zellwachstum führt, sondern lediglich mit einer signifikanten Verlängerung der *in-vitro* Kulturdauer, bzw. mit einer höheren Zahl von Populationsverdopplungen bis zum Eintreten der Seneszenz gekoppelt ist. Trotz der niedrigen Fallzahlen ( $n = 6$ ), der von uns im Rahmen dieser Experimente transduzierten Zelllinien sind die meisten der genannten Ergebnisse statistisch signifikant, was mit einem ausgeprägten Interventionseffekt einhergeht. Durch weitere Transduktionen von MSC, und damit einer Zunahme der Fallzahl, ist bei der Höhe des Schätzers für das Effektmaß mit einer raschen Zunahme der statistischen Aussagekraft zu rechnen. In der folgenden Tabelle 6 sind die genannten Interventionseffekte durch die Expression des LT-Ag noch einmal tabellarisch aufgeführt. Die Auswertung der Populationsverdopplungen und Populationsverdopplungszeiten der für diese Versuche ebenfalls transduzierten Fibroblasten (NHDF) zeigt in Analogie zu den bereits erwähnten MSC ähnliche Effekte nach Transgenexpression.

**Tab. 6:** Übersicht der Effekte durch Expression von LT-Antigen in Abhängigkeit der Zelllinie

Zelllinie	Einfluss auf PD		Einfluss auf PDT	
	Interventionseffekt (95%KI)	Signifikanzniveau (p-Wert)	Interventionseffekt (95%KI) (d)	Signifikanzniveau (p-Wert)
MSC	26,65 (12,65-40,64)	0,002*	3,84 (-0,88-8,56)	0,11
NHDF	20,65 (5,79-35,51)	0,027*	0,97 (0,62-1,34)	<0,0001*

\* Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen. Angegeben sind der durchschnittliche Wachstumsvorteil in PD sowie das jeweilige 95% Konfidenzintervall.

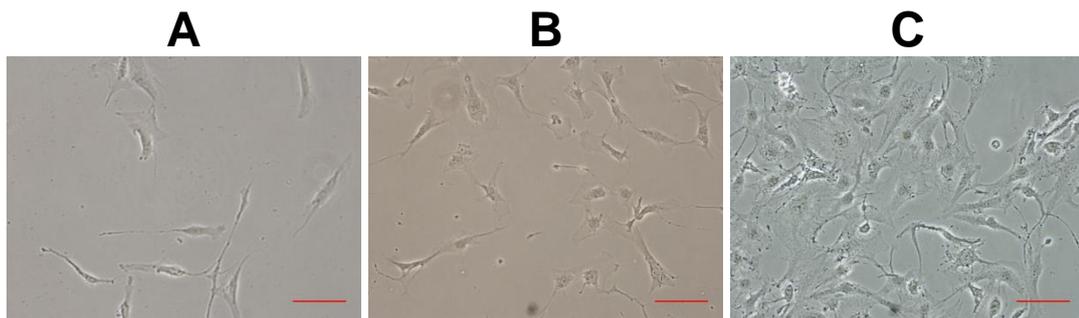
Die folgende Abb. 30 zeigt die graphische Auswertung der Wachstumsverläufe. Deutlich zu erkennen ist die höhere Zahl an kumulativen Populationsverdopplungen nach Expression von LT-Ag in den Wachstumskurven der transgenen Zelllinien (Rot) im Vergleich zu den jeweiligen untransfizierten Wildtypkontrollen (Blau).



**Abb. 30:** Wachstumskinetik verschiedener MSC-Linien. Verglichen sind die LTAg-positiven Transduktanten mit der unbehandelten Ausgangszelllinie humaner aus Knochenmark stammender MSC-KM (**A**) und aus Fettgewebe stammender MSC-SC (**B**). Zu erkennen ist der deutliche Überlebensvorteil durch die Expression von LT-Antigen. Die Kultur der Zelllinie HFSZ0210 musste aus labortechnischen Gründen vorzeitig beendet werden.

Die Analyse des Zellwachstums der BMGNeo\_LTA<sub>g</sub>-transfizierten Zellen zeigte entgegen der Erwartungen auch unter dauerhafter LT-Induktion durch Zugabe von CdCl<sub>2</sub> keinen deutlichen Wachstumsvorteil der transgenen Zellen gegenüber den unbehandelten Kontrollen, auf eine Darstellung der entsprechenden Daten wurde verzichtet. Als mögliche Ursache für dieses Ergebnis ist eine zu niedrige Expressionsmenge des LT-Antigens zu diskutieren.

Die Langzeitkultivierungen der LT-Ag-positiven MSC zeigten des Weiteren insbesondere in fortgeschrittenen Passagen eine bemerkenswerte Änderung der Zellmorphologie. Erste Veränderungen ließen sich bereits ab Passage 5 beobachten und wurden im weiteren Verlauf zunehmend auffälliger (vgl. Abb. 31 mit repräsentativen Bildern aus Passage 6 und 9 einer transgenen MSC-Linie). In den höheren Passagen der transduzierten MSC ließ sich eine Verschiebung des Kern-Plasmaverhältnisses zugunsten des Zellplasmas feststellen. Die Zellen verloren zunehmend ihre typische ausgefranste, spindelförmige Morphologie und wurden deutlich abgerundeter. Es ließ sich außerdem eine ausgeprägte Clusterbildung der Zellen bemerken.



**Abb. 31:** Durchlichtmikroskopische Bilder der gleichen LT-Ag positiven MSC-Zellreihe in (A) Passage 2, (B) Passage 6 und (C) Passage 9. Originalvergrößerung 200-fach, Größenmarker entspricht 50 µm.

Trotz dieser Auffälligkeiten konnten wir auch bei den fortgeschrittenen Passagen mit entsprechender Änderung der Morphologie die für MSC charakteristischen Oberflächenmarker entsprechend der bereits oben aufgeführten Typisierung sowie die Fähigkeit zur adipozytären, osteogenen und hepatogenen Differenzierung nachweisen. Dieses Wachstumsverhalten ließ sich später auch an den mit LT-Ag transduzierten NHDF beobachten.

### 3.7 Charakterisierung der NHDF nach Gentransfer von LT-Ag

Im Anschluss an die Transduktion von NHDF mit pFUW\_LTA<sub>g</sub> wurden die transgenen NHDF im direkten Vergleich zu den Kontrollzelllinien bis zum Erreichen der Seneszenz weiterkultiviert. Die erhaltenen Wachstumsdaten wurden statistisch ausgewertet und in Form von Wachstumskurven dokumentiert. Die Expression von LT-Antigen verlängert auch in humanen Fibroblasten in den pFUW\_LTA<sub>g</sub>-positiven Zellreihen die Lebensspanne bis zur

Seneszenz deutlich. Dieser Effekt ist in den BMGNeo\_LTA<sub>g</sub>-positiven Zellreihen ebenfalls zu beobachten. Die mit BMGNeo\_LTA<sub>g</sub> transfizierten Zellen wurden in drei separate Zellreihen aufgeteilt. Eine Zellreihe erhielt nach der Transfektion nur weiter G418 in Selektionskonzentration, eine Zellreihe erhielt zusätzlich 5 µM CdCl<sub>2</sub> zur Induktion der Expression von LT-Antigen. Die dritte Zellreihe wurde ohne G418 mit Zugabe von 5 µM CdCl<sub>2</sub> zu dem Wachstumsmedium kultiviert.

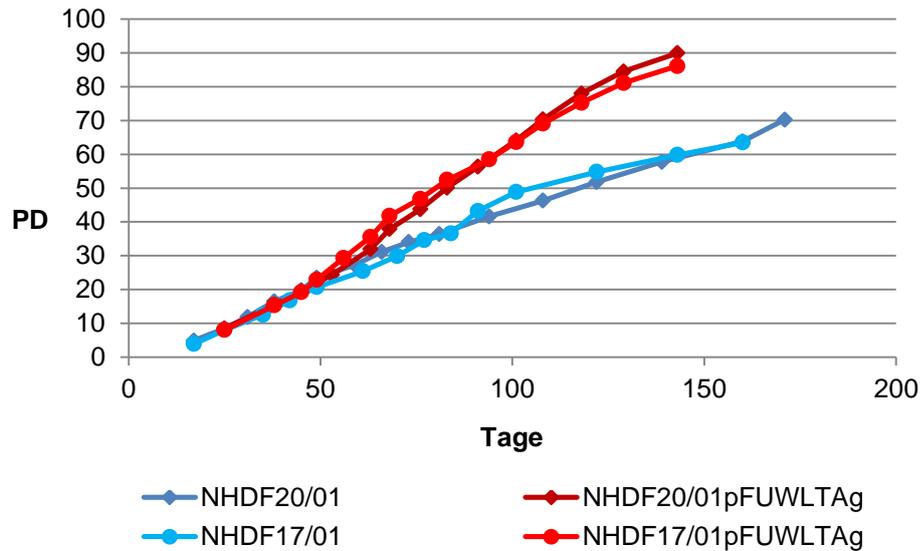
Die Analyse der Wachstumsverläufe zeigt für alle transgenen LT-Ag exprimierenden Zellreihen einen Anstieg der Populationsverdopplungen bis zum Erreichen der Seneszenz. Während die unbehandelten NHDF im Durchschnitt nach 67,35 (95% KI: 56,84-77,85) PD seneszent werden, tritt diese bei den LT-Ag-exprimierenden NHDF erst deutlich später ein. NHDF die zuvor mit pFUW\_LTA<sub>g</sub> transduziert wurden ließen sich durchschnittlich 87,99 (95% KI: 77,49-98,50) PD in Kultur halten. Die folgende Tabelle 7 zeigt zur Übersicht die durchschnittlichen kumulativen PD der untersuchten NHDF und die jeweiligen 95% Konfidenzintervalle. Entsprechend der Angaben in Tabelle 6 ist durch die Transduktion von pFUW\_LTA<sub>g</sub> in NHDF mit durchschnittlich 20,65 (95% KI: 5,79-35,51) PD zusätzlich bis zum Eintritt der zellulären Seneszenz zu rechnen. Trotz der mit nur 2 Zelllinien niedrigen Zellzahlen ist dieses Ergebnis mit einem p-Wert von 0,027 bereits statistisch signifikant.

**Tab. 7:** Übersicht der kumulativen PD von NHDF mit und ohne Transduktion von pFUW\_LTA<sub>g</sub>

Zellreihe	Merkmal	Wildtyp (95%KI)	LT-positiv (95%KI)
NHDF	PD (kumulativ)	67,35 (56,84-77,85)	87,99 (77,49-98,50)
	PDT (d)	2,35 (2,10-2,59)	1,37 (1,10-1,63)

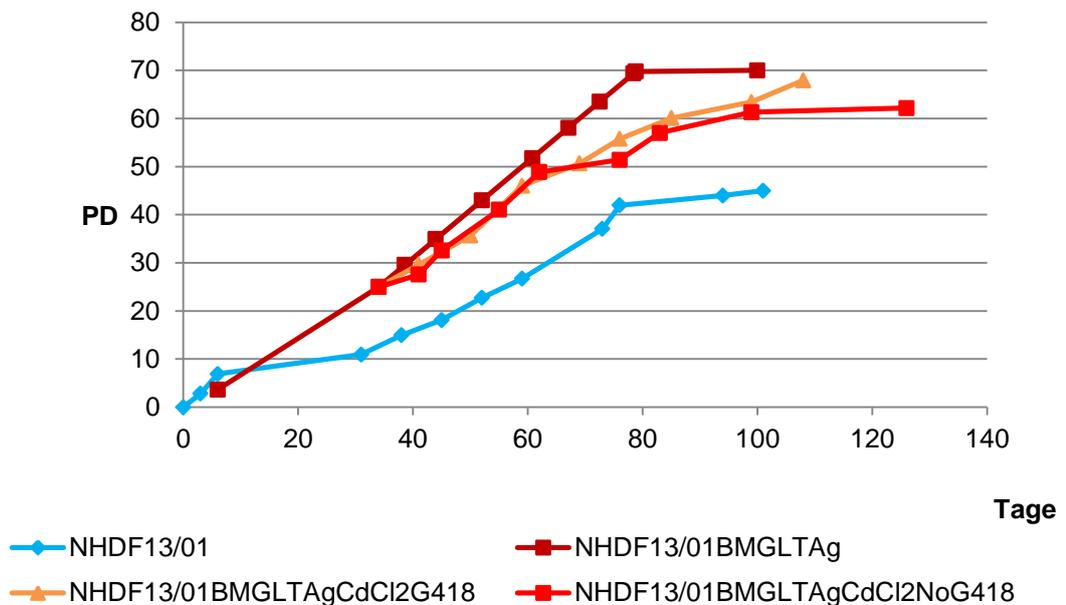
Angegeben sind die durchschnittlichen kumulativen PD und PDT in Tagen vor und nach Intervention mit den jeweiligen 95% Konfidenzintervallen entsprechend der statistischen Auswertung.

Wie aus Tabelle 7 ebenfalls zu entnehmen ist verkürzen sich nach Expression von Large T analog zu den Ergebnissen der MSC auch in den transgenen NHDF die Populationsverdopplungszeiten. Während die PDT der Wildtyp-NHDF durchschnittlich 2,35 (95% KI: 1,10-2,59) Tage beträgt, liegt diese bei durchschnittlich nur 1,37 (95% KI: 1,10-1,63) Tagen für die LT-positiven NHDF. Der gemessene Interventionseffekt für die Expression des LT-Ag beträgt wie in Tabelle 6 ersichtlich 0,97 (95% KI: 0,62-1,34) Tage. Da die Kultur der NHDF vergleichsweise homogen verläuft sind die Ergebnisse der genannten Auswertungen trotz der niedrigen Fallzahlen dieser Experimente statistisch signifikant.



**Abb. 32:** Wachstumskinetik NHDF17/01 und NHDF17/01\_pFUWLTAg, zu erkennen ist der deutliche Überlebensvorteil durch die Expression von LT-Antigenen.

NHDF die mit BMGNeo\_LTA<sub>g</sub> transfiziert wurden konnten im Durchschnitt 69,47 (95% KI: 66,36-72,58) PD kultiviert werden bevor Seneszenz eintrat. Die zum Vergleich kultivierten Ausgangszelllinien traten durchschnittlich nach 45,89 (95% KI: 43,33-48,46) PD in den Wachstumsarrest ein.

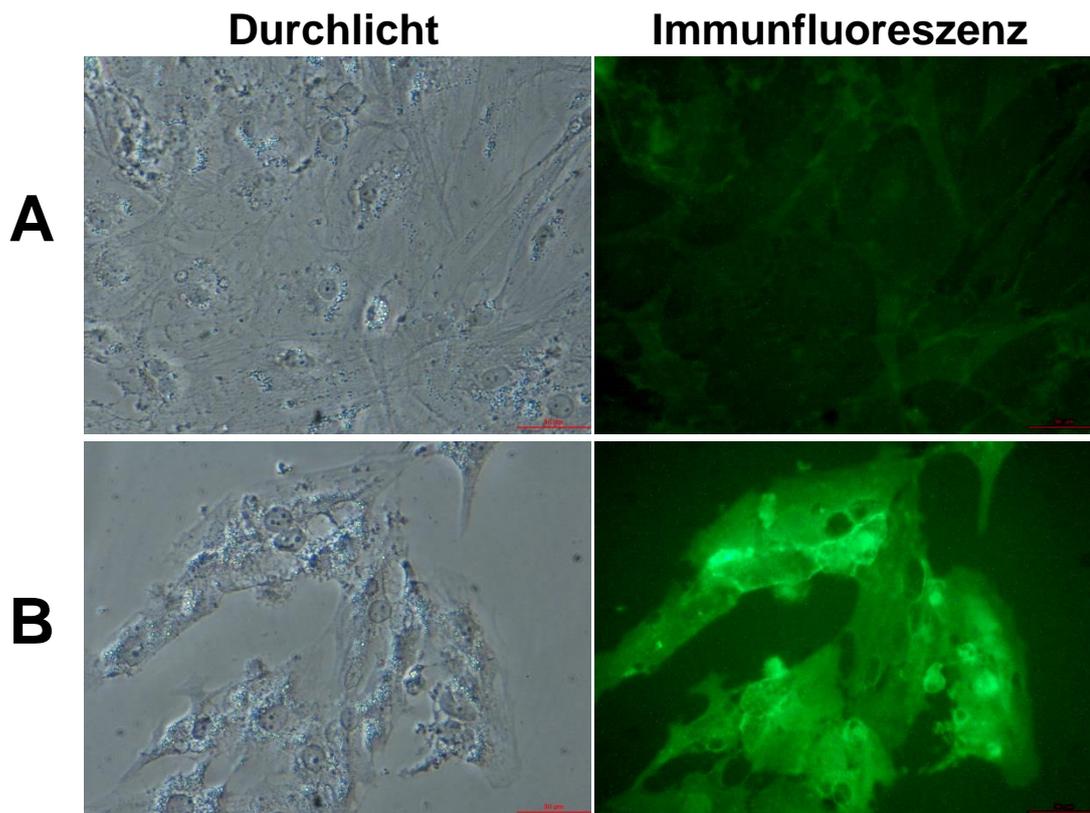


**Abb. 33:** Wachstumskinetik NHDF13/01 und NHDF13/01\_BMGNeoLTA<sub>g</sub>. Diese ist exemplarisch für 2 unabhängig transfizierte NHDF-Zellreihen

Es zeigt sich somit auch in diesem Setting ein signifikanter Wachstumsvorteil der transgenen Zellen durch die Expression von Large T. Die zusätzliche Induktion des LT-Antigens nach Transfektion von BMGNeo\_LTA<sub>g</sub> mittels CdCl<sub>2</sub> zeigt nach unseren Daten vermutlich keinen zusätzlichen Wachstumsvorteil. Die Unterschiede der Wachstumsverläufe der transgenen NHDF mit und ohne Induktion sind, wie in der repräsentativen Abbildung 33 ersichtlich, nur minimal. Aus diesem Grund wurde auf eine statistische Analyse bei der begrenzten Zahl zur Verfügung stehender transgener Zelllinien (n = 2) verzichtet.

### 3.8 Ausblick - Stimulierung des Wnt-Signalweges an transgenen MSC

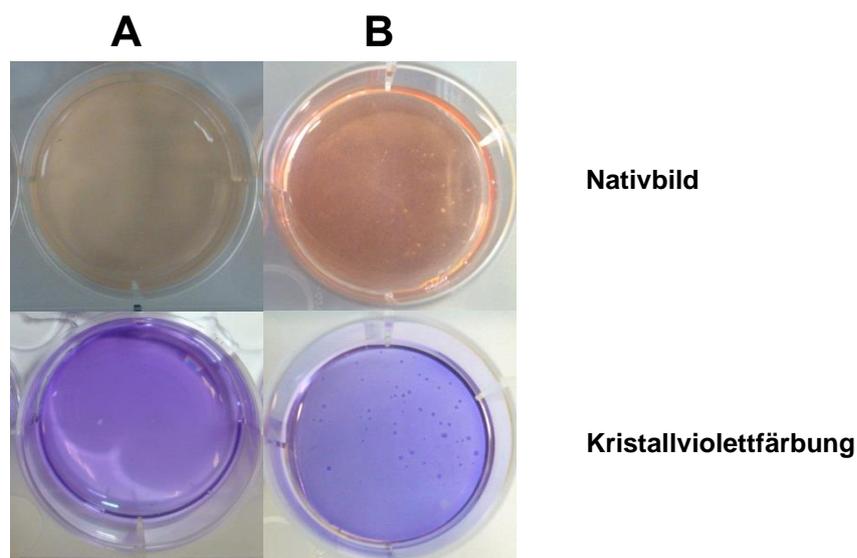
Im Hinblick auf die zu Beginn der vorliegenden Arbeit erläuterte Hypothese, dass MSC die Zielzellen sind, die nach onkogener Aktivierung des Wnt- und des TGFβ-Signalweges in Desmoid-Zellen transformiert werden, führten wir erste Versuche an den transgenen MSC durch.



**Abb. 34:** Immunfluoreszenz von hMSCD80\_pFUWLTA<sub>g</sub> mit Anti-β-Catenin spezifischem Antikörper. Zu erkennen ist die signifikant stärkere Kernlokalisierung von β-Catenin nach Zugabe von Lithiumchlorid (B) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (A). (Originalvergrößerung 200-fach, Größenmarker entspricht 50 μm)

Der Wnt-Signalweg wurde durch Zugabe von Lithiumchlorid in das verwendete Wachstumsmedium in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Die Inhibition der Glykogen Synthase Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) führt zu einer Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin und damit zu einer vermehrten Aktivierung des Wnt-Signalwegs (Hedgepeth et al., 1997). Die verwendeten Konzentrationen lagen mit 25-50  $\mu$ M Lithiumchlorid in dem in der Literatur (Sen et al., 2008) für diese Zwecke verwendeten Bereich. Zum Nachweis der erfolgreichen Stimulation führten wir immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durch. Mittels eines spezifischen Anti- $\beta$ -Catenin Antikörpers konnten wir eindeutig kernlokalisiertes  $\beta$ -Catenin nach Behandlung mit Lithiumchlorid im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen nachweisen (Abb. 34).

Die durch konstitutive Zugabe von Lithiumchlorid stimulierten transgenen MSC bildeten wie die nicht transduzierten und wie die transgenen MSC ohne Lithiumchloridstimulation keine Kolonien in Softagar-Wachstumsversuchen (Abb. 35). Dies zeigt, dass die Stimulation des Wnt-Signalweges allein nicht zu einer onkogenen Transformation der MSC führt.



**Abb. 35:** Dargestellt sind repräsentative Bilder von Softagar-Assays nach 21-tägiger Kultivierung von Zellen. Die pFUW\_LTAg-positiven MSC (A) bilden wie die bereits weiter oben dargestellten Kontrollen (Abb. 30) unter Stimulation mit LiCl keine Kolonien im Gegensatz zu den als Positivkontrolle verwendeten SW480-TCF1B (B).

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Transfektion und Transduktion von MSC

Am Beginn der vorliegenden Arbeit stand die Suche nach einer effizienten Methode des Gentransfers in MSC. Insbesondere die für unsere Zwecke der Immortalisierung notwendige stabile Expression des SV40 Large T-Antigens gestaltete sich problematisch. Humane Primärzelllinien sind häufig schwierig zu transfizieren und MSC bilden hierbei keine Ausnahme. Mit Standardverfahren wie der Transfektion von bakteriellen Plasmiden durch Lipofektion oder Elektroporation ließen sich nur geringe Transfektionseffizienzen erreichen. Auch die Verwendung optimierter Transfektionsprotokolle führte in unseren Versuchen nicht verlässlich zu positiven Ergebnissen (Helledie et al., 2008). Im Rahmen der Vorversuche war es uns deshalb nicht möglich auf diesem Weg eine stabil transfizierte MSC-Zelllinie zu generieren.

Eine alternative Möglichkeit des Gentransfers besteht in der Verwendung viraler Transduktionsmethoden; diese sind jedoch mit bestimmten Einschränkungen verbunden. Die hohen Sicherheitsanforderungen im Umgang mit infektiösem viralem Material und die vergleichsweise komplexen Transduktionsprotokolle limitieren die Anwendung trotz erfolgversprechender Transduktionseffizienzen. Sicherheitsaspekte wie das onkogene Potential der Insertionsmutagenese oder die Möglichkeit zur Bildung replikationskompetenter Lentiviren schränken die klinische Anwendung in der Therapie am Menschen zusätzlich ein (Dos Santos Coura and Nardi, 2007). Das episomal replizierende Plasmid BMGNeo sollte deshalb eine Alternative zu der Verwendung infektiöser viraler Partikel darstellen. Episomal replizierende Plasmide bieten den Vorteil einer stabilen Genexpression ohne Notwendigkeit einer Genomintegration. Auf diese Weise ist es möglich, Probleme der Insertionsmutagenese, die aus der zufälligen Genomintegration resultieren, zu umgehen. Während sich NIH/3T3 und NHDF mit diesem System leicht transfizieren ließen, konnten wir auch hier unter der Verwendung liposomaler und nicht-liposomaler Transfektionsreagenzien keine entsprechenden stabil transfizierten MSC-Zelllinien etablieren. Mögliche Ursachen für dieses Ergebnis könnten in der Größe des von uns klonierten BMGNeo\_LTA<sub>g</sub> Expressionsvektors liegen, der mit 16,5 kb vergleichsweise groß erscheint. Aber auch die im Vergleich zu anderen Zelltypen niedrigen Zellzahlen an MSC in den entsprechenden Transfektionsexperimenten könnten eine Rolle gespielt haben. Die Amaxa Nucleofection stellt eine modifizierte Form der Elektroporation dar und wird in der Literatur als hocheffiziente Methode des non-viralen Gentransfers in MSC beschrieben (Haleem-Smith et al., 2005). Es war uns möglich, das BMGNeo\_LTA<sub>g</sub> Konstrukt mit dem Programm U23 in MSC zu transfizieren und eine Zellreihe stabiler Transfektanten zu selektionieren. Die Kultur der stabil mit BMGNeo\_LTA<sub>g</sub> transfizierten MSC zeigte entgegen unserer Erwartungen jedoch auch unter dauerhafter Induktion des Metallothionein-Promotors

durch Zugabe von  $\text{CdCl}_2$  zur erhöhten Expression von LT-Ag keinen sichtbaren Wachstumsvorteil der Transfektanten. In den Wiederholungsversuchen ließ sich die Transfektion von BMGNeo\_LTA<sub>g</sub> in MSC durch Nucleofection nicht reproduzieren. Da wir NIH/3T3 und NHDF mithilfe von Elektroporationen mit BMGNeo\_LTA<sub>g</sub> transfizieren konnten, erscheint eine Schädigung der Plasmid-DNA durch den elektrischen Puls unwahrscheinlich. Möglicherweise sind neben einer zu niedrigen Expressionsmenge des LT-Antigens die Ursachen für dieses Resultat in einer initial niedrigen Transfektionseffizienz zu sehen, die nach der Selektion mit G418 den Wachstumsvorteil gegenüber der Ursprungszelllinie kaschiert. Die im Rahmen der Versuche an MSC verwendeten, im Vergleich mit anderen Zelllinien niedrigen Zellzahlen, stellen, wie bereits oben erwähnt, insbesondere bei niedrigen Transfektionseffizienzen eine zusätzliche Hürde dar.

In enger Zusammenarbeit mit der AG PD Dr. Lutz Müller begannen wir deshalb die Herstellung eines lentiviralen Vektors zur Transduktion von LT-Ag basierend auf dem Transfervektor pFUGW mit selbst inaktivierender 3'LTR und einem Verpackungssystem der dritten Generation (Lois et al., 2002). Lentivirale Transfektionssysteme bieten den Vorteil einer hohen Transduktionseffizienz von nahezu 100% auch in ruhenden Zellen und ermöglichen insbesondere durch Integration ins Genom in hohem Maße eine stabile Genexpression. Sämtliche Laborarbeiten an potentiell infektiösem Material fanden unter SII-Sicherheitsbedingungen nach Gentechnikgesetz statt. Das von uns verwendete Transfektionssystem erfüllt einen Großteil der für eine klinische Verwendung notwendigen Sicherheitsanforderungen (Neschadim et al., 2007), auch wenn eine klinische Verwendung, insbesondere unter dem Aspekt der potenziellen Onkogenität des Large T-Antigens, derzeit keine Rolle spielt. Neuere virale Vektoren bieten zusätzliche Sicherheitsmerkmale, um bei therapeutischer Verwendung die Sicherheit in der klinischen Anwendung zu verbessern. Hierzu zählen beispielsweise eine Art molekularer „*safety Switch*“ (Sato et al., 2007) oder die stabile Expression bestimmter Oberflächenantigene, die die zielgerichtete Eliminierung transduzierter Zellen mittels Antikörpertherapie erlauben (Ramsu<sub>bir</sub> et al., 2007). Unter Verwendung des von uns klonierten pFUW\_LTA<sub>g</sub> Konstrukts war es uns mit Transduktionseffizienzen über 95% bereits in den ersten Zellpassagen möglich, MSC hocheffizient mit LT-Ag zu transduzieren. Nachdem die ersten Transduktionsversuche bereits in diesem hohen Ausmaß erfolgreich waren, wurden die Transduktionsbedingungen in der Folge beibehalten und für die weiteren Versuche auf eine Titerbestimmung des zentrifugal angereicherten Viruspartikelpools verzichtet.

## **4.2 Simian Virus 40 und Large T Antigen**

Das 1960 entdeckte Simian Virus 40 wurde erstmals als Verunreinigung in Poliomyelitisimpfstoffen nachgewiesen. Bereits kurz nach der Entdeckung stand das onkogene Potential des Virus aufgrund der hohen Zahl exponierter Personen im Fokus der Untersuchungen. In Nagerzellen zeigte sich die Fähigkeit des Virus zur Immortalisierung und auch malignen Transformation von Primärzellen (Butel and Lednicky, 1999). Dieser Effekt ist in humanen Zelllinien deutlich geringer ausgeprägt; zumindest in den meisten primären Zelllinien adulter Personen ist eine alleinige Expression des LT-Ag für eine Immortalisierung unzureichend.

### **4.2.1 Wachstumsverhalten der kultivierten MSC**

In den Wachstumsverläufen der von uns kultivierten multipotenten, mesenchymalen Stromazellen lassen sich deutliche interindividuelle Unterschiede nachweisen. Interindividuell unterschiedliches Wachstumsverhalten von MSC ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben worden. Neben den vom Spender ausgehenden Faktoren sind auch Kultivierungsbedingungen (Wagner et al., 2008) und die Herkunft der MSC für das weitere Wachstumsverhalten relevant. Einen großen Einfluss auf den Wachstumsverlauf hat insbesondere die ausplattierte Zelldichte (Neuhuber et al., 2008). Aus diesem Grund wurden für unsere Versuche MSC durchgehend mit 200 Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert und diese Bedingungen für alle Untersuchungen beibehalten. Während standardisiertes Vorgehen es ermöglicht homogene MSC-Präparationen zu generieren, ist durch unterschiedliche Kulturbedingungen mit einem deutlichen Einfluss auf das Proliferationsverhalten und die entsprechende Genexpression zu rechnen (Wagner et al., 2006). Während die aus subkutanem Fettgewebe stammenden MSC in unseren Versuchen homogener wachsen, lässt sich mit durchschnittlich 43,13 (95%KI: 28,79-57,47) kumulativen PD ein signifikanter Wachstumsvorteil der MSC-SC gegenüber den aus Knochenmark stammenden MSC-KM nachweisen, deren durchschnittliche kumulative PD nur 12,89 (95%KI: -1,44-27,22) PD betragen. Der Gruppeneffekt als Maß für die Abhängigkeit des Wachstumsverhaltens abhängig von dem zu Grunde liegenden Gewebe beträgt 30,24 (95%KI: 9,96-50,51) PD. Trotz der wenigen Zellreihen, die für diese Untersuchungen transduziert werden können, zeigt sich somit ein erheblicher Wachstumsvorteil der aus subkutanem Hautfett gewonnenen MSC. Ähnliche Ergebnisse sind auch in der Literatur zu finden. Auch die durchschnittlichen PDT sind in unseren Untersuchungen für MSC-SC mit 4,03 (95%KI: -3,38-11,45) Tagen signifikant kürzer als für MSC-KM, bei denen die durchschnittlichen PDT 21,04 (95%KI: 7,96-34,11) Tage betragen. Als mögliche Ursachen für die unerwartet langen PDT der aus Knochenmark stammenden MSC sind verschiedene Ursachen zu diskutieren. Zum einen können aufgrund der niedrigen Fallzahlen (n=3) individuelle Ausreißer die Ergebnisse aufgrund

der bei insgesamt eher inhomogenem Wachstumsverhalten hohen Schwankungsbreite stärker beeinflussen. Weiterhin können aber auch spenderspezifische Faktoren Auswirkungen auf das individuelle Wachstumsverhalten der Zellreihe haben. In Untersuchungen zu dem Wachstums- und Differenzierungsverhalten von MSC konnten Kern und Kollegen spezifische Unterschiede, abhängig von dem Herkunftsgewebe, nachweisen. Während aus Nabelschnurgewebe stammende MSC deutlich schwerer zu extrahieren waren als andere MSC-Präparationen, zeigten diese die höchste proliferative Kapazität verglichen mit MSC-SC und MSC-KM. Die aus Knochenmark stammenden MSC haben in diesen Untersuchungen deutlich niedrigeres Wachstumspotential (Kern et al., 2006). Eine mögliche Ursache für diese Unterschiede liegt in dem Alter des Spenders, auch ein Einfluß von Geschlecht oder Vorerkrankungen und eine eventuelle Exposition gegenüber zytotoxischen Stoffen ist denkbar. Die uns für diese Versuche zur Verfügung stehenden MSC-KM stammen von onkologischen Patienten der Universitätsklinik Halle. Ein Non-Hodgkin Lymphom ist bei allen Spendern der von uns transduzierten MSC-KM zuvor diagnostiziert worden. In 2 der 3 Fälle haben die Spender zum Zeitpunkt der Zellentnahme bereits eine chemotherapeutische Vorbehandlung erhalten, eine maligne Infiltration des Knochenmarks liegt ebenfalls bei 2 der 3 Spender vor. Auch in Hinblick auf das Alter der Spender zeigen sich Unterschiede. Während aufgrund der niedrigen Fallzahlen eine statistische Aufarbeitung dieser Daten nicht sinnvoll erscheint, sind hier jedoch mögliche Ursachen für das interindividuell verschiedene Wachstumsverhalten zu erkennen. So verhält sich beispielsweise die untersuchte Zellreihe hMSC-D80 ähnlich wie die aus Hautfett stammenden MSC. Nach einer initialen Phase logarithmischer Proliferation verlangsamt sich das Wachstum vor Eintritt des Wachstumsarrests. Ein solches Plateau zeigen die anderen beiden MSC-KM-Zellreihen nicht. Hier ist bereits das initiale Wachstum deutlich langsamer als bei den hMSC-D80. Der Wachstumsarrest folgt dann letztlich nach einer Phase langsamen, stetigen Wachstums. Spenderbezogene Faktoren, die eine Erklärung für diese Unterschiede bieten können, sind neben dem Alter des Spenders auch eine Chemotherapie, die in diesen Untersuchungen die Spender der Zellreihe hMSC 86 und hMSC 92 zuvor erhalten hatten. Neben den Kultivierungsbedingungen sind diese spenderbezo-genen Faktoren vermutlich ebenfalls von Einfluß auf das Wachstumsverhalten und Genexpression der MSC *in-vitro* mit und ohne Expression von Large T. Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet mit höheren Fallzahlen könnten hier Aufschluss geben, waren aber nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

#### **4.2.2 Zellbiologische Auswirkungen der Expression des Large T Antigens auf MSC**

In den von uns durchgeführten Experimenten konnten wir primäre humane MSC mittels eines lentiviralen Expressionssystems stabil mit LT-Ag transduzieren. Die genetisch modifizierten Zelllinien wurden von uns nach Gentransfer weiter kultiviert und mit den jeweiligen

Ausgangszelllinien verglichen. Die Morphologie der transgenen Zellen war zu Beginn von der Ausgangszelllinie nicht zu unterscheiden, im Verlauf zeigten sich aber deutlich morphologische Auffälligkeiten. In späteren Passagen änderte sich das Kern-Plasma-Verhältnis der transgenen MSC zu Gunsten des Zellplasmas, auch die äußere Zellform wich im Verlauf von der ursprünglichen Spindelform ab. Das Wachstumsverhalten der transgenen Zellen verlief in diesem Zeitraum konzentriert auf Zellcluster mit einer hohen Teilungsrate. Morphologische Auffälligkeiten an LT-Ag exprimierenden Zellen sind in der Literatur auch von anderen Arbeitsgruppen bereits berichtet worden (Shein and Enders, 1962; Huschtscha and Holliday, 1983). Im Unterschied zu den beschriebenen Zellauffälligkeiten wiesen die von uns transduzierten MSC jedoch keinen Verlust der Kontaktinhibition auf. Auch die Softagar-Versuche der transgenen MSC ergaben keinen *in-vitro*-Hinweis auf Malignität. In frühen und späten Passagen konnten wir jeweils die für MSC charakteristische „*Cluster of Differentiation*“ (CD)-Oberflächenantigenkonstellation (CD14-, CD45-, CD34-, CD19-, CD105+, CD90+, CD73+, HLA-DR-) entsprechend der Konsensusdefinition (Dominici et al., 2006) nachweisen. Ebenso zeigten die LT-Ag-positiven MSC in unseren entsprechenden Versuchen nach Induktion mittels spezifischer Differenzierungsmedien ein mit den Ausgangszelllinien vergleichbares multipotentes Differenzierungspotenzial. In den durchgeführten Versuchen wurde die Fähigkeit zur adipogenen und osteogenen Differenzierung mittels zytochemischer Färbung nachgewiesen. Neben den für die Charakterisierung als MSC notwendigen Differenzierungen in Zelltypen der drei mesenchymalen Linien führten wir auch die Transdifferenzierung in Hepatozyten gemäß Protokoll der AG Prof. Christ erfolgreich durch. In den Differenzierungsversuchen ließen sich keine Unterschiede zwischen den transgenen MSC und den jeweiligen Kontrollzellen beobachten. Auch in den aus transgenen MSC differenzierten Zellen konnte LT-Ag weiter nachgewiesen werden. Diese Zellen wurden anschließend nicht weiter untersucht. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine Möglichkeit immortalisierte oder zumindest LT-Ag-positive Zellreihen der jeweiligen Differenzierungslinie *in-vitro* zu erzeugen. Auf diesem Wege können differenzierte Zellen *in-vitro* generiert werden und somit deren Kultivierung durch die Expression des LT-Antigens vereinfacht werden. Auch für Analysen zur Inhibition von p53 in differenzierten Zellen stellen sie eine potentielle Quelle dar. Speziell die Möglichkeiten der Transdifferenzierung erweitern das Untersuchungspotential auf schwer oder nur mit Risiko zu gewinnende Zellen wie Hepatozyten oder neuronale Zellen (Ashjian et al., 2003; Sgodda et al., 2007). Die im Rahmen dieser Versuche generierten differenzierten, transgenen MSC zeigen das Potential auf, ausgehend von MSC die gewünschten Zellen zu generieren. Die gleichzeitige Aktivierung von Large T bietet Spielraum für eine Reihe von Versuchen. Ein Beispiel einer möglichen Anwendung wäre die Untersuchung des Einfluß potentiell onkogener Faktoren und Mutationen unter Beteiligung des LT-Ag als *in-vitro* Modell eines funktionell inaktiven TP53-Komplexes.

Wie bereits weiter oben beschrieben, zeigte sich in unseren Untersuchungen eine signifikant längere Kultivierungszeitspanne der aus subkutanem Fettgewebe gewonnenen MSC-SC mit signifikant höheren durchschnittlichen kumulativen PD. Dieser Wachstumsvorteil bleibt in unseren Versuchen auch nach der transgenen Expression von LT-Ag weiter bestehen. Die Auswertungen ergeben durchschnittlich 41,87 (95%KI: 20,71-63,03) kumulative PD für MSC-KM und 67,45 (95%KI: 46,29-88,61) kumulative PD für MSC-SC nach Expression von LT-Ag. Der errechnete Gruppeneffekt beträgt somit 25,58 (95%KI: -4,34-55,51) PD. Dieser Wert ist wohl aufgrund der geringen Fallzahl statistisch nicht signifikant. Es ist aber anzunehmen, dass die statistische Aussagekraft durch höhere Fallzahlen Signifikanzniveau erreichen würde. Die Größenordnung des errechneten Gruppeneffektes für transgene MSC ist mit dem für die Ausgangszelllinie vergleichbar. Deutlich zeigt sich für alle transgenen MSC unabhängig von dem Ausgangsgewebe eine Zunahme der kumulativen PD nach Expression des transduzierten LT-Ag. Der Interventionseffekt als Maß für die durch Transgenexpression gewonnenen zusätzlichen Populationsverdopplungen beträgt durchschnittlich 26,65 (95%KI: 12,65-40,64) PD. Dieses Ergebnis ist trotz der niedrigen Fallzahlen statistisch signifikant. Entgegen unserer ursprünglichen Erwartungen konnten wir durch die Transduktion von LT-Ag jedoch keine vollständige Immortalisierung erzielen. Nach einem initial deutlichem Proliferationsvorteil verlangsamte sich das Wachstum der LT-Ag positiven MSC in späteren Wachstumsphasen. Wenn zwei Wochen nach der letzten Passagierung mikroskopisch kein Wachstum in den Zellkulturflaschen festgestellt werden konnte, wurde Seneszenz angenommen und die Zellen wurden verworfen. Eine echte Immortalisierung von MSC im Sinne einer unbegrenzten Zell-Proliferation konnte in unseren Versuchen nicht erreicht werden.

In einer Arbeit von Li und Mitarbeitern wurde untersucht, ob MSC möglicherweise nach tumorigener Entartung eine Ursprungszelllinie für die Entstehung von Sarkomen darstellen könne. Hierzu wurden humane MSC retroviral mit LT-Ag, *hTERT* und *H-ras* transduziert und mit Sarkomzellen verglichen (Li et al., 2009). Möglichkeiten der Immortalisierung von hMSC wurden auch von Tátrai et al. durch lentivirale Transduktion von LT-Ag, *hTERT* und *Bmi-1* in hMSC untersucht (Tatrai et al., 2012). Übereinstimmend wird publiziert, dass eine Expression von LT-Ag in MSC für eine Immortalisierung zwar notwendig, aber nicht ausreichend ist. Unsere Ergebnisse stimmen demnach mit den Daten anderer Arbeitsgruppen in diesem Aspekt überein. Leider wurde in der Arbeit von Tátrai et al. LT-Ag nur in Verbindung mit *hTERT* transduziert, was die Vergleichbarkeit mit unseren Ergebnissen einschränkt. Abweichend von unseren Ergebnissen wird jedoch von Tátrai et al. nach Transduktion von *hTERT* und LT-Ag über eine auffallend veränderte Morphologie und eine fehlende Ansprache auf die verwendeten Differenzierungsprotokolle berichtet. Während die publizierten lichtmikroskopischen Auffälligkeiten den Beobachtungen in unseren Versuchen gleichen, ließen sich die LT-Ag

positiven MSC in unseren Versuchen, wie oben berichtet, beispielsweise auch in Passage 8 noch ohne Auffälligkeiten differenzieren. Möglicherweise favorisiert eine zusätzliche Expression von *hTERT* die maligne Transformation der untersuchten Zellen und stellte damit eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse dar. Bemerkenswert ist die Beobachtung in der Publikation von Li und Mitarbeitern, dass die alleinige Expression von LT-Ag nicht für eine Immortalisierung der verwendeten hMSC ausreicht, es aber zu einem nichtadhärenten Wachstum in Softagarversuchen kommt. Dies widerspricht unseren Erkenntnissen, nach denen wir in unseren Versuchen kein entsprechendes Adhäsions-unabhängiges Wachstum verzeichnen konnten. Zellmorphologisch und in den Differenzierungsversuchen zeigten sich in der genannten Arbeit keine Auffälligkeiten. Eine andere Erklärung für die variierenden Ergebnisse könnte in der unscharfen Definition von MSC liegen. Die Konsensusdefinition von MSC beruht vor allem auf funktionellen Aspekten, weniger auf einem klar definierenden Oberflächenantigenmuster. So könnte abhängig von der jeweiligen Arbeit eine andere Subgruppe von MSC zu den jeweils unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben. Außerdem ist zu beachten, dass im Rahmen der Aktivierung potentiell onkogener Effektormoleküle, wie in unserem Fall das LT-Ag, genetische Instabilität zu weiteren Mutationen führen und damit das Ergebnis zusätzlich beeinflussen kann. In der Tabelle 8 sind die geschilderten Literaturdaten aus Gründen der Übersichtlichkeit noch einmal tabellarisch zusammengefasst.

**Tab. 8:** Auszugsweise Übersicht der Auswirkungen von LT Antigen in MSC

	<b>Expression</b>	<b>Morphologie</b>	<b>Wachstum</b>	<b>Malignität</b>	<b>Multipotenz</b>
Eigene Daten	SV40 LTA <sub>g</sub>	Verändert	PDT verkürzt Seneszenz	Keine Kolonien in Softagar	Nachweisbar
Li et al. (2009)	SV40 LTA <sub>g</sub>	Unverändert	PDT verkürzt Seneszenz	Wenige Kolonien in Softagar Kein Tumor <i>in vivo</i>	Nachweisbar
	SV40LTA <sub>g</sub> + hTERT	Unverändert	PDT verkürzt Immortalisierung	Wenige Kolonien in Softagar Kein Tumor <i>in vivo</i>	Nachweisbar
Tatrai et al. (2012)	SV40LTA <sub>g</sub> + hTERT	Verändert	PDT verkürzt Immortalisierung	Kein Tumor <i>in vivo</i>	Nicht Nachweisbar

### **4.2.3 Wachstumsverhalten der kultivierten NHDF**

Neben den Experimenten mit MSC führten wir zusätzlich Versuche an primären humanen Vorhautfibroblasten (NHDF) durch. Die im Rahmen unserer Experimente kultivierten NHDF wurden bis zum Eintritt der Seneszenz kultiviert. Übereinstimmend mit den in der Literatur publizierten Zahlen (Hayflick and Moorhead, 1961; Hayflick, 1965; Pazolli and Stewart, 2008) kam es in den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Versuchen nach 40-70 PD zu einem irreversiblen Wachstumsarrest. Durchschnittlich trat in unseren Analysen an Wildtyp-NHDF nach 67,35 (95%KI: 56,84-77,85) kumulativen PD Seneszenz ein. Dieser Wert entspricht den Erwartungen und deckt sich mit Ergebnissen anderer Forschungsgruppen (Shay and Wright, 1989). Das Wachstumsverhalten der von uns kultivierten unbehandelten NHDF war, wie in Abbildung 33 für zwei Zellreihen exemplarisch zu sehen ist, weitestgehend einheitlich. Zu auffälligen Abweichungen in Morphologie oder Proliferationsrate kam es nicht. Leider lassen sich aufgrund der Anonymisierung der Daten neben dem männlichen Geschlecht keine weiteren Erkenntnisse zu den Spendern der einzelnen Zellreihen gewinnen. Informationen zu dem klinischen Hintergrund und möglichen Vorerkrankungen sind somit zu den für die Versuche der vorliegenden Arbeit nicht verfügbar.

### **4.2.4 Zellbiologische Auswirkungen der Expression des Large T Antigens auf NHDF**

Zur Klärung der Frage nach einer möglichen Verallgemeinerung der erhaltenen Ergebnisse und der erstellten Konstrukte wurden die NHDF mit dem beschriebenen Plasmiden BMGNeo\_LTAG transfiziert und für lentivirale Transduktionsversuche mit pFUW\_LTAG transduziert.

Es war uns möglich NHDF sowohl unter Verwendung liposomaler Transfektionsreagenzien als auch mittels Elektroporationen mit BMGNeo\_LTAG zu transfizieren. Der Nachweis der erfolgreichen Transfektion erfolgte mittels immunzytochemischer Detektion der Kernlokalisierung des transgenen LT-Ag sowie per Westernblot Analyse (s. Abb. 20 und Abb. 21). Die Zellen wurden im Anschluss einer Selektion mit G418 unterzogen. Im Vergleich zu den unbehandelten Ausgangszelllinien zeigte sich mit durchschnittlich 69,47 (95%KI: 66,36-72,58) PD ein deutlicher Wachstumsvorteil der behandelten Zellen gegenüber den untransfizierten Kontrollzellen, die nach durchschnittlich 45,89 (95%KI: 43,33-48,46) PD Seneszenz erreicht hatten (s. Abb. 33). Entsprechend der errechneten 95% Konfidenzintervalle sind diese Ergebnisse bereits bei dieser kleinen Versuchsreihe statistisch signifikant. Eine weitere statistische Analyse dieser Daten erscheint jedoch aufgrund des geringen Umfangs der Versuchsreihe nicht sinnvoll. Eine zusätzliche Induktion der Genexpression über den induzierbaren Metallothioneinpromotor zeigt keinen deutlichen Wachstumsvorteil. Zwischen

den einzelnen mit BMGNeo\_LTA<sub>g</sub> transfizierten Zellreihen einer gemeinsamen Ursprungszelllinie konnten wir keinen eindeutigen Wachstumsunterschied beobachten. Der Zweck des induzierbaren Metallothioneinpromotor als funktioneller „An/Aus-Schalter“ kann demnach in diesen Versuchen vermutlich nicht erreicht werden. Eine solche Möglichkeit wird in der publizierten Literatur beispielsweise durch die Verwendung temperaturabhängiger Formen des LT-Ag realisiert (Radna et al., 1989). Durch Large T Antigen immortalisierte Fibroblasten sind zum Erhalt der Immortalisierung auch in der weiteren Kultur auf die dauerhafte Expression von LT-Ag angewiesen (Wright et al., 1989). Eine mögliche Erklärung unserer Beobachtungen wäre, dass die biologisch nur in sehr geringem Ausmaß anfallenden Mengen von TP53 bereits durch die Basisexpression von LT-Ag ausreichend funktional inaktiviert werden. Ob eine darüber hinausgehende Expression von LT-Ag in höheren Mengen, beispielsweise nach zusätzlicher Induktion des Promoters durch Zugabe von CdCl<sub>2</sub>, einen zusätzlichen Effekt hat, konnte aufgrund der wenigen transfizierten Zelllinien in unseren Versuchen nicht abschließend geklärt werden. Um den Effekt einer zusätzlichen Induktion von LT-Ag durch CdCl<sub>2</sub> statistisch nachweisen zu können, bedarf es einer Erhöhung der statistischen Power und damit einer Zunahme der Fallzahl unterschiedlicher Zelllinien und der sorgfältigen Einbeziehung potentieller zytotoxischer Effekte der Schwermetall-Ionen.

Auch lentivirale Transduktionen von NHDF mit pFUW\_LTA<sub>g</sub> wurden von uns unter entsprechenden Sicherheitsbedingungen durchgeführt (s. Abb. 32). Es war uns möglich, bereits unmittelbar nach den Transduktionen die hocheffiziente Transduktion von LT-Ag mittels immunfluoreszenzmikroskopischer Dokumentation nachzuweisen (s. Abb. 23). Zur Verwendung für die Transduktionsexperimente kamen ausschließlich Zellen aus frühen Passagierungen (Passage 2-3). Wie auch bei den Transfektionen mit BMGNeo\_LTA<sub>g</sub> konnten wir einen deutlichen Wachstumsvorteil der mit pFUW\_LTA<sub>g</sub> transduzierten NHDF im Vergleich zu den unbehandelten Ausgangszelllinien feststellen. Die Zahl der Populationsverdopplungen bis zum Erreichen der Seneszenz betrug bei den transduzierten NHDF durchschnittlich 87,99 (95%KI:77,49-98,50) PD und unterscheidet sich deutlich von den durchschnittlich erreichten 67,35 (95%KI: 56,84-77,85) kumulativen PD der Kontrollzellen. Obwohl bereits in älteren Publikationen über Immortalisierungen von NHDF durch Expression von LT-Ag berichtet wird (Huschtscha and Holliday, 1983; Radna et al., 1989), war es in unseren Versuchen nicht möglich, auf diesem Weg eine immortalisierte NHDF-Zellreihe zu etablieren. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis bietet die Untersuchung zur Immortalisierungsfrequenz unterschiedlicher Zelltypen von Shay und Kollegen aus dem Jahr 1993 (Shay et al., 1993). In dieser Arbeit zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Häufigkeit des Auftretens einer Immortalisierung nach Expression von LT-Ag zwischen humanen primären Fibroblasten und Brustepithelzellen. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass für die

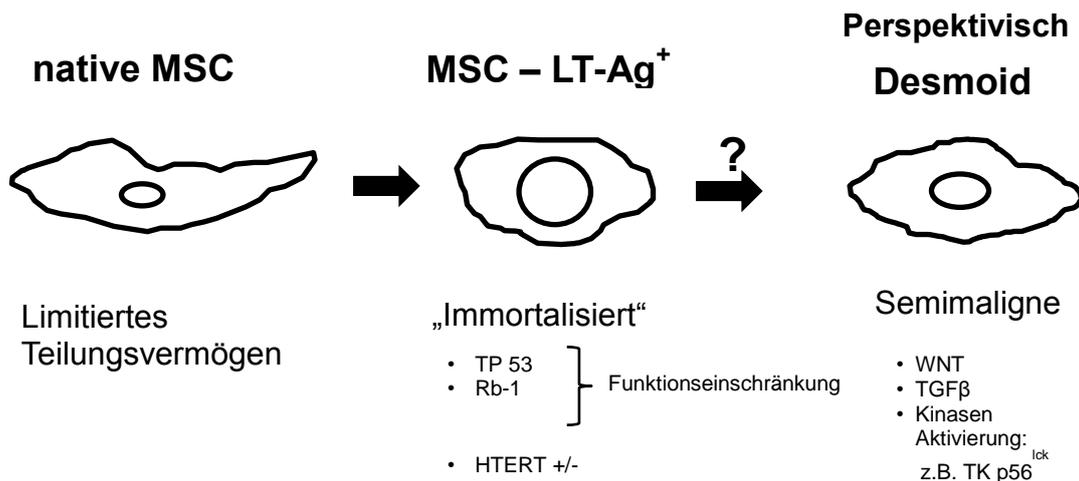
Immortalisierung von NHDF nach Expression von LT-Ag zusätzlich eine spontane Mutation notwendig ist. Die Häufigkeit einer Immortalisierung von NHDF nach Expression von LT-Ag wird mit einer Häufigkeit von  $3 \times 10^{-7}$  der initial ausplattierten Zellen angegeben. Dies lässt einen Vergleich zu den oben beschriebenen Ergebnissen der Transduktion von MSC zu, die neben der Expression von LT-Ag für eine dauerhafte Immortalisierung zusätzlich auf die Expression von *hTERT* angewiesen sind. Ebenso wären in diesem Kontext weitere klinische Informationen bezüglich der Spender der behandelten Zellreihen interessant. Insbesondere das Alter des jeweiligen Spenders könnte eine mögliche Rolle für eine eventuelle Immortalisierung spielen. Denkbar wäre zum Beispiel eine höhere Telomeraseaktivität in den Zellen besonders junger Spender mit einer daraus resultierenden höheren Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines immortalen Zellklons. Auch eine chemo- oder radiotherapeutische Vorbehandlung könnte beispielsweise durch therapieassoziiert eingetretene DNA-Schädigungen Mutationen und damit eine Immortalisierung sowohl begünstigen als auch erschweren. Für eine abschließende Beurteilung sind die wenigen von uns erstellten transgenen NHDF-Zellreihen sowie die fehlenden klinischen Informationen bezüglich der Spender nicht ausreichend. Zur Klärung dieser Frage sind somit weitere Untersuchungen notwendig die aber zu weit vom eigentlichen Thema der vorliegenden Arbeit fortführen und deshalb auch nicht Bestand der aktuellen Arbeit sein können. Die Möglichkeit neben MSC auch andere Zelltypen mit dem von uns erstellten Konstrukt zu behandeln und damit die *in-vitro* Lebensdauer der behandelten primären Zellreihen zu verlängern, zeigen unsere Daten bereits in dem von uns angewendeten Rahmen.

#### **4.3 BMGNeo\_LTAg und pFUW\_LTAg als labortechnische Werkzeuge**

In weiteren Forschungsarbeiten ist es möglich, auch andere Zellreihen, bei denen die begrenzte *in-vitro* Lebensspanne ein Problem darstellt, anhand der von uns erstellten Plasmide hocheffizient mit LT-Ag zu transduzieren und so voraussichtlich Zeit für weitere Experimente zu gewinnen. Auch wenn die Infektion mit SV40 vermutlich im Regelfall nicht ursächlich für ein Krebsentstehen ist, so ist eine Inaktivierung von TP53 doch in vielen Fällen molekularbiologisch nachzuweisen (Martini et al., 2007). Mit den hier entwickelten Expressionssystemen handelt es sich um weitere labortechnische Werkzeuge, um den Effekt einer entsprechenden Mutation zu beurteilen. Für das episomale BMGNeo\_LTAg Konstrukt ist es denkbar, den relativ schwachen Metallothionein-Promotor gegen transkriptionsregulatorische Sequenzen auszutauschen, die eine stärkere und enger regulierte Promotoraktivität erlauben. Dies kann eine Hilfestellung bei der Suche nach Ursachen und Signalwegen der Tumorgenese darstellen und über die Erstellung von „Modelltumorzellen“ zu einem tieferen Verständnis der molekularen Vorgänge der Tumorentstehung führen. Als Beispiel sei hier auf die Etablierung von „Modell-Sarkomzellen“ durch Li und Mitarbeiter verwiesen (Li et al., 2009).

### 4.3.1 MSC als Vorläuferzelle für die Entstehung von Desmoiden

In diesem Zusammenhang sieht sich auch die vorliegende Arbeit als Teilstück im Kontext der Suche nach einer möglichen malignen Transformation von MSC als Vorläuferzelle für die Entstehung von Desmoiden. Desmoide sind eine zu den Fibromatosen gehörende Tumorform, die klinisch als niedrig-maligne Sarkomform eingeordnet wird. Diese seltene Tumorform tritt vorwiegend nach abdominalchirurgischen Eingriffen (Soravia et al., 2000), insbesondere bei FAP Patienten auf (Heiskanen and Järvinen, 1996). Pathogenetisch spielen bei Patienten ohne hereditäre Tumorerkrankung vermutlich erworbene Genmutationen eine Rolle für die Entwicklung eines Desmoids (Brueckl et al., 2005). Wundheilreaktionen erfolgen in der Regel unter der Beteiligung mesenchymaler Stromazellen (Fathke et al., 2004). Das vermehrte Auftreten von Desmoiden bei FAP Patienten und die Beteiligung von MSC in Wundheilreaktionen bietet Raum für die These eines eventuellen Zusammenhangs.



**Abb. 36:** MSC als mögliche Vorläuferzelle für die Entwicklung von Desmoiden – Illustration möglicher Zwischenschritte der malignen Transformation.

Verschiedene Signalwege stehen im Verdacht nach pathologischer Aktivierung eine Rolle in der Tumorentstehung zu spielen. In unserem Fokus standen zunächst die Einflüsse und Auswirkungen einer Stimulation im *Wnt*-Signalweg der transgenen LT-Ag-positiven MSC. Zusammen mit dem Gerüstprotein Axin und dem APC-Protein bildet die Glykogen Synthase Kinase-3β einen Proteinkomplex, der das zytosolisch anfallende β-Catenin bindet und dem 26S-proteasomalen Abbau zuführt. Eine Störung dieses Abbaus führt zu einer zytosolischen Akkumulation und Kerntranslokation von β-Catenin. Diese Form der Aktivierung des *Wnt*-Signalweges ist konstitutiv bei FAP Patienten zu beobachten. Hier kann eine Mutation im APC-

Gen zu der Bildung eines defekten APC-Proteins führen. Eine verminderte Affinität von  $\beta$ -Catenin zu dem genannten Abbauproteinkomplex führt dadurch zu erhöhten zytosolischen Konzentrationen von  $\beta$ -Catenin und in der Folge kommt zu einer pathologischen Aktivierung des *Wnt*-Signalweges. Lithiumchlorid ist ein potenter Inhibitor der im Rahmen des *Wnt*-Signalweges beteiligten Proteinkinase GSK-3 $\beta$ . Ebenso wie auch eine Mutation des APC-Gens führt *in-vitro* die Behandlung mit LiCl an MSC zu einer deutlichen Stimulierung der Signalkaskade und bietet somit die Möglichkeit, eine Aktivierung des *Wnt*-Signalweges durch Überstimulierung oder Mutation zu imitieren (Hedgepeth et al., 1997). Die LTAG-positiven transgenen MSC wurden für die entsprechenden Versuche verschiedenen Konzentrationen von LiCl ausgesetzt und so Auswirkungen einer induzierten Stimulation des *Wnt*-Signalweges untersucht. Die LiCl-induzierte Stimulierung ließ sich immunfluoreszenzmikroskopisch deutlich sichtbar machen. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen wiesen die mit LiCl behandelten transgenen MSC sowohl deutlich höhere zytosolische Konzentrationen als auch eine vermehrte Kernlokalisierung von  $\beta$ -Catenin auf. Als Test auf eine mögliche maligne Transformation der Transfektanten führten wir Softagarversuche mit den entsprechend behandelten MSC unter kontinuierlicher *Wnt*-Stimulation durch LiCl-Induktion durch. Auch in diesen Wachstumsversuchen konnten wir keine Kolonien in den Softagar-Assays feststellen. Es ist deshalb anzunehmen, dass die Stimulierung im *Wnt*-Signalweg alleine nicht ausreicht, um ein Wachstum unabhängig von der Basalmembran zu ermöglichen. Das Fehlen dieses wichtigen Malignitätskriteriums weist daraufhin, dass eine alleinige Überaktivierung des *Wnt*-Signalweges nicht ausreicht, um eine tumorogene Entartung hervorzurufen. Diese Beobachtung deckt sich mit der eingangs genannten Hypothese, nach der neben einer *Wnt*-Aktivierung auch eine Stimulierung der TGF- $\beta$ -Signalgebung notwendig ist, um MSC maligne zu transformieren. Zur abschließenden Klärung dieser Frage sind weitergehende Untersuchungen der transgenen MSC geplant. Eine Stimulation der TGF- $\beta$  Signalkaskade könnte beispielsweise mittels rekombinanten, löslichen TGF- $\beta$  erfolgen. Interessant wären zum einen die isolierten Auswirkungen von TGF- $\beta$  auf die LT-Ag-positiven MSC als auch die kombinierte Stimulation von TGF- $\beta$ - und *Wnt*-Signalkaskade. Interaktionen und zum Teil auch synergistische Wirkungen nach kombinierter Stimulation dieser beiden Signalwege sind in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Letamendia et al., 2001). Nach aktuellen Erkenntnissen kommt es zu einer ausgeprägten Interaktion der genannten Signalwege. Die Smad3-vermittelte Kernlokalisierung von  $\beta$ -Catenin stellt hier eine mögliche Schnittstelle dieser Signalwege in der Proliferations- und Transkriptionsregulierung dar. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um herauszufinden, ob TGF- $\beta$  und der kanonische *Wnt*-Signalweg an dieser Stelle in der Transformation von MSC kooperieren. Im Rahmen von Wundheilungsreaktionen spielt die  $\beta$ -Catenin vermittelte TGF- $\beta$  Signalgebung für die beteiligten MSC eine wichtige Rolle (Cheon et al., 2006). Das mit chirurgischen Eingriffen und entsprechendem Trauma gehäufte Auftreten

von Desmoiden lässt unter diesen Gesichtspunkten einen Zusammenhang vermuten. Eine überschießende Wundheilreaktion hin zu einer malignen Entartung und Tumorgenese besonders bei entsprechend prädisponierten Personen, beispielsweise mit Mutationen im APC-Gen, ist in der Folge zumindest denkbar.

Neben den bereits genannten Untersuchungen sollten weitere Versuche auch die Auswirkungen und den Einfluß anderer Signalmoleküle und Signalkaskaden auf die mögliche Entstehung von Desmoiden mit einschließen. Wie bereits erwähnt beeinflusst  $\beta$ -Catenin auch die zelluläre Transkription. So ist beispielsweise der in Kolonkarzinomen exprimierte Transkriptionsfaktor TCF4 zur Transaktivierung der Transkription auf die Bindung an  $\beta$ -Catenin angewiesen. Erhöhte intrazelluläre Spiegel von  $\beta$ -Catenin können über einer vermehrten Expression von p56lck in einer Steigerung der Proliferation resultieren. Andere durch  $\beta$ -Catenin beeinflusste Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise SOX4 können für diese Entwicklung ebenfalls eine Rolle spielen. Die in ihrer Wirkung bislang noch unzureichend erforschte Tyrosinkinase p56lck spielt eine wichtige Rolle bei der T-Zell Aktivierung. Die Ergebnisse aus Untersuchungen an T-Zell Lymphomen lassen den Einfluß einer Überexpression von p56lck auf die maligne Transformation von T-Lymphozyten vermuten. Auch in anderen Tumorformen lässt sich eine Überexpression von p56lck nachweisen, so wird p56lck beispielsweise von bösartigen Neoplasien des Kolons, nicht aber von gesunden Kolonepithelzellen, exprimiert (McCracken et al., 1997). Diese Ergebnisse werfen Fragen nach einer möglichen klinischen Bedeutung auf. Die Transfektion einer genetisch veränderten, dauerhaft aktivierten p56lck-Variante führt beispielsweise in Mausfibroblasten zur malignen Transformation (Mayer et al., 1992), aber auch in Desmoiden wurde p56lck nachgewiesen (Li et al., 1998). Vielleicht eröffnen sich, falls die Relevanz diese Zusammenhänge in MSC bestätigt, in der Zukunft weitere Angriffspunkte für die Therapie von Desmoiden. Ähnliche Strategien werden beispielsweise bei der Therapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms oder des Pankreaskarzinoms durch Blockierung der Tyrosinkinaseaktivierung des EGF-Rezeptors mit dem spezifischen Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib verfolgt. Eine denkbare Therapieoption wäre dann die Behandlung mit spezifischen Tyrosinkinaseinhibitoren für p56lck.

Andere Arbeiten haben Zusammenhänge zwischen MSC und bestimmten Tumorformen bereits darstellen können. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten Zellreihen stellen eine mögliche Ausgangszellpopulation dar um die oben genannten und weitere Untersuchungen durchzuführen. Möglicherweise lassen sich auch für Desmoide auf diese Art die Ursachen der malignen Transformation nachvollziehen und eine entsprechende Modelltumorzellreihe als präklinisches Modell etablieren.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Multipotente, mesenchymale Stromazellen (MSC), früher auch als mesenchymale Stammzellen bezeichnet, stellen die Ausgangszellen für Reparatur- und Regenerationsvorgänge des mesodermalen Gewebes. Eine maligne Transformation von MSC könnte eine mögliche Ursache für die Entstehung von Desmoiden sein. Die Pathogenese dieser seltenen, semi-malignen Form der Fibromatosen ist bislang noch unzureichend geklärt. Genetische Analysen der Tumore weisen auf Mutationen in einer Reihe proliferationssteuernder Signalwege hin. Die Häufung des Auftretens von Desmoiden bei Patienten mit FAP und nach chirurgischen Eingriffen rückt den *Wnt*-Signalweg und die TGF- $\beta$ -Signalkaskade in unseren Fokus. Das Auftreten einer Onkogen induzierten Seneszenz erschwert in den Vorversuchen zu der vorliegenden Arbeit die Manipulation dieser beiden Signalwege. Um eine Zelllinie zu etablieren, die als Ausgang für die weitere Aufklärung der Pathogenese der malignen Transformation von MSC dienen soll, wurden im Rahmen dieser Arbeit humane MSC genetisch modifiziert, um Large T Antigen stabil zu exprimieren. Das aus dem Simian Virus 40 stammende LT-Ag bindet an TP53 und verhindert die Interaktion mit DNA-Promotorregionen. Eine Vielzahl von Zellen lässt sich durch Expression von LT-Ag immortalisieren, in unseren Versuchen sollte hierdurch eine Onkogen induzierte Seneszenz ausgeschlossen werden. Zu diesem Zweck wurden ein episomal replizierender (BMGNeo\_LTAg) und ein lentiviraler Expressionsvektor (pFUWLTAg) erstellt. Durch die Expression von LT-Ag konnte die Kultivierungsdauer von MSC um durchschnittlich 26,65 (95%KI: 12,65-40,64) PD verlängert und die PDT um 3,84 (95%KI: -0,88-8,56) Tage reduziert werden. Um weitere Anwendungsmöglichkeiten der erstellten Expressionskonstrukte zu demonstrieren, wurden zusätzlich humane Vorhautfibroblasten (NHDF) stabil mit LT-Ag transfiziert. Die Kultivierungsdauer der NHDF lässt sich durch die Expression von LT-Ag um durchschnittlich 20,65 (95%KI: 5,79-35,51) PD verlängern. Weiterhin lässt sich an NHDF durch Expression des LT-Ag eine Reduktion der PDT um 0,97 (95%KI: 0,62-1,34) Tage erreichen. Eine echte Immortalisierung wurde entgegen unserer ursprünglichen Erwartungen durch die Expression des LT-Ag nicht erreicht, hierzu ist vermutlich zusätzlich eine Expression von Telomerase notwendig. Die LT-Ag exprimierenden MSC wurden auf die für MSC charakteristische „*Cluster of Differentiation*“ (CD)-Oberflächenantigenkonstellation (CD14-, CD45-, CD34-, CD19-, CD105+, CD90+, CD73+, HLA-DR-) und die Fähigkeit zur adipozytären und osteogenen Differenzierung entsprechend der Konsensusdefinition untersucht. Zusätzlich war es uns möglich, hepatogene Differenzierungen der transgenen MSC durchzuführen. Durch Wachstumsversuche in Softagar konnten wir eine maligne Transformation der transgenen MSC durch alleinige Expression des potentiell onkogenen LT-Ag ausschließen. Die stabil LT-Ag exprimierenden MSC erfüllen damit weiterhin die definierenden Charakteristika gemäß der Konsensusdefinition. Als erste Schritte zur Klärung

der eingangs genannten Hypothese einer malignen Transformation von MSC durch Aktivierung der *Wnt*- und die TGF- $\beta$ -Signalgebung führten wir eine Stimulation des *Wnt*-Signalweges mittels Lithiumchlorid durch. Lithiumchlorid ist ein potenter Inhibitor der Proteinkinase GSK-3 $\beta$  und führt zu einer Aktivierung des *Wnt*-Signalweges. Dies eröffnet die Möglichkeit eine Mutation des APC-Gens zu imitieren. Die auf diese Weise behandelten transgenen MSC zeigten unserer Erwartung entsprechend kein Wachstum in Softgarversuchen. Eine zusätzliche Überaktivierung der TGF- $\beta$ -Signalgebung ließe sich beispielsweise durch die Zugabe von löslichem TGF- $\beta$  erreichen. In Desmoiden wurde bisher eine Vielzahl von genetischen Veränderungen nachgewiesen. Neben den bereits genannten Signalwegen scheinen weitere Faktoren wie die Tyrosinkinase p56<sup>lck</sup> oder Transkriptionsfaktoren wie SOX4 für die maligne Transformation eine Rolle zu spielen. Die in der vorliegenden Arbeit generierten transgenen MSC eignen sich daher, weitere Untersuchungen der auf diesem Gebiet beteiligten Signalwege durchzuführen. Möglicherweise führt ein detaillierteres Verständnis der an der Pathogenese der Desmoide beteiligten Faktoren in der Zukunft zu einer besseren Prognoseabschätzung oder zu einer individualisierten Therapie der Erkrankung.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Ahuja D, Saenz-Robles MT, Pipas JM (2005) SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene* 24(52):7729-7745.
- Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL (2001) Can stem cells cross lineage boundaries? *Nature Medicine* 7(4):393-395.
- Arvanitis ML, Jagelman DG, Fazio VW, Lavery IC, McGannon, E (1990) Mortality in patients with familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 33(8):639-642.
- Ashjian P, Elbarbary A, Edmonds B, DeUgarte D, Zhu M, Zuk P, Lorenz H, Benhaim P, Hedrick M (2003) In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast Reconstr Surg* 111(6):1922-1931.
- Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R (2000) Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol* 28(6):707-715.
- Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I (2004) Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* 22:675-682.
- Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, Montagna D, Maccario R, Villa R, Daidone MG, Zuffardi O, Locatelli F (2007) Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res* 67(19):9142-9149.
- Bleiziffer O, Eriksson E, Yao F, Horch RE, Kneser U (2007) Gene transfer strategies in tissue engineering. *J Cell Mol Med* 11(2):206-223.
- Bonvalot S, Desai A, Coppola S, Le Pechoux C, Terrier P, Domont J, Le Cesne A (2012) The treatment of desmoid tumors: a stepwise clinical approach. *Ann Oncol* 23(Suppl 10): x158-166.
- Bradford M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brueckl WM, Ballhausen WG, Fortsch T, Gunther K, Fiedler W, Gentner B, Croner R, Boxberger F, Kirchner T, Hahn EG, Hohenberger W, Wein A (2005) Genetic testing for germline mutations of the APC gene in patients with apparently sporadic desmoid tumors but a family history of colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 48(6):1275-1281.
- Butel JS, Lednicky JA (1999) Cell and molecular biology of simian virus 40: Implications for human infections and disease. *J Natl Cancer Inst* 91(2):119-134.
- Caplan AI (1991) Mesenchymal Stem Cells. *J Orthop Res* 9:641-650.
- Chen C, Okayama H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Biol Cell* 7(8):2745-2752.
- Chen MF, Lin CT, Chen WC, Yang CT, Chen CC, Liao SK, Liu JM, Lu CH, Lee KD (2006) The sensitivity of human mesenchymal stem cells to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66(1):244-253.
- Cheon SS, Wei Q, Gurung A, Youn A, Bright T, Poon R, Whetstone H, Guha A, Alman BA (2006) Beta-catenin regulates wound size and mediates the effect of TGF-beta in cutaneous healing. *FASEB J* 20:692-701.
- Conget P, Minguell J (1999) Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 181(1):67-73.

- Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy B, M, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Peault B (2008) A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3(3):301-313.
- Dihlmann S, Gebert J, Siermann A, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M (1999) Explanation for genotype-phenotype correlations in familial dominant negative effect of the APC1309 mutation: a possible adenomatous polyposis. *Cancer Res* 59:1857-1860.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4):315-317.
- Dos Santos Coura R, Nardi NB (2007) The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *Virol J* 4:99.
- DuBridges R, Tang P, Hsia H, Leong P, Miller J, Calos M (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Biol Cell* 7(1):379-387.
- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel R, Nguyen M, Trono D, Naldini L (1998) A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72(11):8463-8467.
- Fanning E, Knippers R (1992). Structure and function of simian virus 40 large tumor antigen. *Annu Rev Biochem* 61:55-85.
- Fathke C, Wilson L, Hutter J, Kapoor V, Smith A, Hocking A, Isik F (2004) Contribution of bone marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair. *Stem Cells* 22(5):812-822.
- Friedenstein A, Chailakhjan R, Lalykina K (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3(4):393-403.
- Galiatsatos P, Foulkes WD (2006) Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* 101(2):385-398.
- Grainger D, Percival J, Chiano M, Spector T (1999) The role of serum TGF-beta isoforms as potential markers of osteoporosis. *Osteoporos Int* 9(5):398-404.
- Gulbins E, Lang, F: Regulation von Zellproliferation und Zelltod. In: Schmidt RF, Lang F, Thews G (Hrsg.) *Physiologie des Menschen*. Springer Medizin Verlag, 29. Auflage, Heidelberg, 2005, S. 32-35.
- Hahn W, Counter C, Lundberg AS, Beijersbergen R, Brooks MW, Weinberg R (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400(6743):464-458.
- Haleem-Smith H, Derfoul A, Okafor C, Tuli R, Olsen D, Hall DJ, Tuan RS (2005) Optimization of high-efficiency transfection of adult human mesenchymal stem cells in vitro. *Mol Biotechnol* 30:9-19.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166(4):557-580.
- Hayflick L (1965) The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37:614-636.
- Hayflick L, Moorhead P (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25:585-621.
- Hedgpeeth CM, Conrad LJ, Zhang J, Huang HC, Lee VMY, Klein PS (1997) Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action. *Dev Biol* 185:82-91.
- Heiskanen I, Järvinen HJ (1996) Occurrence of desmoid tumours in familial adenomatous polyposis and results of treatment. *Int J Colorectal Dis* 11:157-162.

- Helledie T, Nurcombe V, Cool SM (2008) A simple and reliable electroporation method for human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 17:837–848.
- Heyde M, Partridge KA, Oreffo RO, Howdle SM, Shakesheff KM, Garnett MC (2007) Gene therapy used for tissue engineering applications. *J Pharm Pharmacol* 59(3):329-350.
- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A (2005) Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7(5):393-395.
- Huang S, Terstappen LWMM (1992) Formation of haematopoietic environment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature* 360:745-749.
- Huschtscha LI, Holliday R. (1983) Limited and unlimited growth of sv40-transformed cells from human diploid mrc-5 fibroblasts. *J Cell Sci* 63:77-99.
- Iwata T, Mizusawa N, Taketani Y, Itakura M, Yoshimoto K (2007) Parafibromin tumor suppressor enhances cell growth in the cells expressing SV40 large T antigen. *Oncogene* 26(42):6176-6183.
- Jian H, Shen X, Liu I, Semenov M, He X, Wang XF (2006) Smad3-dependent nuclear translocation of beta-catenin is required for TGF-beta1 induced proliferation of bone marrow-derived adult human mesenchymal stem cells. *Genes Dev* 20:666–674.
- Josenhans C, Hahn H, Streeck RE: Plasmide. In: Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz, TF, Suerbaum S. (Hrsg.) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 6. Auflage, 2009, S. 176-177.
- Karasuyama H, Melchers F (1988) Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *Eur J Immunol* 18:97-104.
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Biebackm K (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24(5):1294–1301.
- Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W (2002) Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant* 30(4):215-222.
- Laemmli U (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.
- Lane D (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358(6381):15-16.
- Lazar AJ, Tuvín D, Hajibashi S, Habeeb S, Bolshakov S, Mayordomo-Aranda E, Warneke CL, Lopez-Terrada D, Pollock RE, Lev D (2008) Specific mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) correlate with local recurrence in sporadic desmoid tumors. *Am J Pathol* 173(5):1518-1527.
- Lei S, Dubeykovskiy A, Chakladar A, Wojtukiewicz L, Wang TC (2004) The murine gastrin promoter is synergistically activated by transforming growth factor-beta/Smad and Wnt signaling pathways. *J Biol Chem* 279(41):42492-42502.
- Letamendia A, Labbé E, Attisano L (2001) Transcriptional regulation by Smads: crosstalk between the TGF-beta and Wnt pathways. *J Bone Joint Surg* 83A(Suppl 1, Part 1):31-39.
- Li B, Khanna A, Sharma V, Singh T, Suthanthiran M, Phyllis A (1999) TGF-beta1 DNA polymorphisms, protein levels, and blood pressure. *Hypertension* 33(II):271-275.
- Li C, Bapat B, Alman BA. (1998) Adenomatous polyposis coli gene mutation alters proliferation through its beta-Catenin-regulatory function in aggressive fibromatosis (desmoid tumor). *Am J Pathol* 153(3):709–714.

- Li N, Yang R, Zhang W, Dorfman H, Rao P, Gorlick R (2009) Genetically transforming human mesenchymal stem cells to sarcomas: changes in cellular phenotype and multilineage differentiation potential. *Cancer* 115(20):4795-4806.
- Liang Y, Liu J, Feng Z. (2013). The regulation of cellular metabolism by tumor suppressor p53. *Cell Biosci* 3(1):9.
- Liebig B, Brabletz T, Staeger MS, Wulfanger J, Riemann D, Burdach S, Ballhausen WG (2005). Forced expression of deltaN-TCF-1B in colon cancer derived cell lines is accompanied by the induction of CEACAM5/6 and mesothelin. *Cancer Lett* 223(1):159-167.
- Lilley CE, Branston RH, Coffin RS (2001) Herpes simplex virus vectors for the nervous system. *Curr Gene Ther* 1(4):339-358.
- Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D (2002) Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295(5556):868-872.
- Lu R, Bian F, Lin J, Su Z, Qu Y, Pflugfelder SC, Li DQ (2012) Identification of human fibroblast cell lines as a feeder layer for human corneal epithelial regeneration. *PLoS ONE* 7(6): e38825.
- Lützkendorf J: Mesenchymale Stammzellen bei Patienten mit malignen Erkrankungen - Untersuchung ihrer Eigenschaften und ihres Potentials als Vehikel einer Tumortherapie. Halle(Saale),Univ, Nat Fak I, Diss, 120 S, 2010.
- MacFarlane J, Robertson D (1832) Clinical reports on the surgical practise of the glasgow royal infirmary. Glasgow: 63–66.
- Martin J, Jenkins RH, Bennagi R, Krupa A, Phillips AO, Bowen T, Fraser DJ (2011) Post-transcriptional regulation of transforming growth factor beta-1 by microRNA-744. *PLoS ONE* 6(10):e25044.
- Martini F, Corallini A, Balatti V, Sabbioni S, Pancaldi C, Tognon M (2007) Simian virus 40 in humans. *Infect Agent Cancer* 2:13.
- Mayer KM, Ansotegui IJ, Ballhausen WG (1992) The Human lck cDNA clone YT16 is a transforming oncogene. *Anticancer Res* 12:485-488.
- McCracken S, Kim CS, Xu Y, Minden M, Miyamoto NG (1997) An alternative pathway for expression of p56lck from type I promoter transcripts in colon carcinoma. *Oncogene*(15):2929-2937.
- Mochizuki H, Schwartz JP, Tanaka K, Brady RO, Reiser J (1998) High-Titer Human Immunodeficiency Virus Type 1-Based Vector Systems for Gene Delivery into Nondividing Cells. *J Virol* 72(11):8873–8883.
- Molloy AP, Hutchinson B, O'Toole GC (2012) Extra-abdominal desmoid tumours: a review of the literature. *Sarcoma* 2012:578052.
- Müller LP, Luetzkendorf J, Mueller T, Reichelt K, Simon H, Schmoll HJ (2006) Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction. *Stem Cells* 24(12):2753-2765.
- Neschadim A, McCart JA, Keating A, Medin JA (2007) A roadmap to safe, efficient, and stable lentivirus-mediated gene therapy with hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 13(12):1407-1416.
- Neuhuber B, Swanger SA, Howard L, Mackay A, Fischer I (2008) Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Exp Hematol* 36(9):1176-1185.
- Nuytens JJ, Rust PF, Thomas CRJ, Turrisi III AT (2000) Surgery versus radiation therapy for patients with aggressive fibromatosis or desmoid tumors. *Cancer* 88(7):1517–1523.
- Pazolli E, Stewart S (2008) Senescence: the good the bad and the dysfunctional. *Curr Opin Genet Dev* 18(1):42-47.

- Pipas JM (2009) SV40: Cell transformation and tumorigenesis. *Virology* 384(2):294-303.
- Pittenger MF (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411):143-147.
- Radna RL, Caton Y, Jha KK, Kaplan P, Li G, Traganos F, Ozer HL (1989) Growth of immortal simian virus 40 tsa-transformed human fibroblasts is temperature dependent. *Mol Cell Biol* 9(7):3093-3096.
- Ramsbiri S, Yoshimitsu M, Medin JA (2007) Anti-CD25 targeted killing of bicistronically transduced cells: a novel safety mechanism against retroviral genotoxicity. *Mol Ther* 15(6):1174-1181.
- Riede UN, Olah AJ, Goebel HH, Mohr W, Peter HH, Höpker WW, Gerlach UV, Werner M: Desmoidfibromatosen. In: Riede UN, Olah AJ, Goebel HH, Mohr W, Peter HH, Höpker WW, Gerlach UV, Werner M (Hrsg.) *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2004, S. 1174.
- Rosland GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H, Mysliwicz J, Tonn JC, Goldbrunner R, Lonning PE, Bjerkvig R, Schichor C (2009) Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res* 69(13):5331-5339.
- Roßmann O: Optimierung und Charakterisierung des lentiviralen Gentransfers in humanen mesenchymalen Stammzellen. München, Univ, Med Fak, Diss, 160 S, 2008.
- Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd, AC, Bernad A (2005) Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 65(8):3035-3039.
- Salas S, Chibon F, Noguchi T, Terrier P, Ranchere-Vince D, Lagarde P, Benard J, Forget S, Blanchard C, Dômont J, Bonvalot S, Guillou L, Leroux A, Mechine-Neuville A, Schöffski P, Laë M, Collin F, Verola O, Carbonnelle A, Vescovo L, Bui B, Brouste V, Sobol H, Aurias A, Coindre JM (2010) Molecular characterization by array comparative genomic hybridization and DNA sequencing of 194 desmoid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 49(6):560-568.
- Sambrook J, Russell D: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2000.
- Sato T, Neschadim A, Konrad M, Fowler DH, Lavie A, Medin JA (2007) Engineered human tmprk/AZT as a novel enzyme/prodrug axis for suicide gene therapy. *Mol Ther* 15(5):962-970.
- Schiebler TH: Allgemeine Entwicklungsgeschichte. In: Schiebeler TH (Hrsg.) *Anatomie*, 9. Aufl., Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2005, S. 92-122.
- Sen B, Xie Z, Case N, Ma M, Rubin C, Rubin J (2008) Mechanical strain inhibits adipogenesis in mesenchymal stem cells by stimulating a durable beta-catenin signal. *Endocrinology* 149(12):6065-6075.
- Sgodda M, Aurich H, Kleist S, Aurich I, König S, Dollinger MM, Fleig WE, Christ B (2007) Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 313(13):2875-2886.
- Shah KV (2007) SV40 and human cancer: a review of recent data. *Int J Cancer* 120(2):215-223.
- Shay JW, Van Der Haegen B, Ying Y, Wright WE (1993) The frequency of immortalization human fibroblasts and mammary epithelial cells transfected with SV40 Large-T antigen. *Exp Cell Res* 209:45-52.
- Shay JW, Wright WE (1989) Quantitation of the frequency of immortalization of normal human diploid fibroblasts by sv40 large T-antigen. *Exp Cell Res* 184:109-118.
- Shein HM, Enders JF (1962) Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Microbiology* 48:1164-1172.

- Soravia C, Berk T, McLeod RS, Cohen Z (2000) Desmoid disease in patients with familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 43:363-369.
- Su L, Vogelstein B, Kinzler K (1993) Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 262(5140):1734-1737.
- Tatrai P, Szepesi A, Matula Z, Szigeti A, Buchan G, Madi A, Uher F, Nemet K (2012) Combined introduction of Bmi-1 and hTERT immortalizes human adipose tissue-derived stromal cells with low risk of transformation. *Biochem Biophys Res Commun* 422(1):28-35.
- Tögel F, Lange C, Zander AR, Westenfelder C (2007) Regenerative Medizin mit adulten Stammzellen aus dem Knochenmark. *Dtsch Arztebl* 104(23):1663-1670.
- Tsukada K, Church JM, Jagelman DG, Fazio VW, Lavery IC (1991) Systemic cytotoxic chemotherapy and radiation therapy for desmoid in familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 34(12):1090-1092.
- Valtieri M, Sorrentino A (2008) The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. *J Cell Physiol* 217(2):296-300.
- Wagner W, Feldmann Jr, RE, Seckinger A, Maurer MH, Wein F, Blake J, Krause U, Kalenka A, Bürgers HF, Saffrich R, Wuchter P, Kuschinsky W, Ho AD (2006) The heterogeneity of human mesenchymal stem cell preparations — Evidence from simultaneous analysis of proteomes and transcriptomes. *Exp Hematol* 34(4):536-548
- Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, Pfister S, Eckstein V, Ho AD (2008) Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS ONE* 3(5):e2213.
- Wege H, Brümmendorf TH (2010) Replikative Seneszenz Telomere und Telomerase in Zellalterung und Karzinogenese. *BIOspektrum* 16:271-273.
- Wrana JL, Attisano L, Cárcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF, Massague J (1992) TGF-beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71(6):1003-1014.
- Wright WE, Pereira-Smith OM, Shay JW (1989) Reversible cellular senescence: Implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* 9(7):3088-3092.
- Wu C, Nik-Amini S, Nadesan P, Stanford WL, Alman BA (2010) Aggressive fibromatosis (desmoid tumor) is derived from mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res*(70):7690-7698.
- Yaswen P, Campisi J (2007) Oncogene-induced senescence pathways weave an intricate tapestry. *Cell* 128(2):233-234.
- Zhang X, Godbey W (2006). Viral vectors for gene delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 58(4):515-534.
- Zlotecki RA, Scarborough MT, Morris CG, Berrey BH, Lind DS, Enneking WF, Marcus RBJ (2002) External beam radiotherapy for primary and adjuvant management of aggressive fibromatosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 54(1):177-181.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13(12):4279-4295.

## 7 THESEN

1. Der Gentransfer in mesenchymale Stromazellen (MSC) mittels physikalisch-chemischer Transfektionsmethoden wie der getesteten Elektroporation oder Lipofektion gestaltet sich schwierig. Die Verwendung lentiviraler Transduktionssysteme ist für menschliche Primärzellen mit höheren Transfektionseffizienzen verbunden.
2. Die *in vitro* Kultivierungsdauer von MSC ist begrenzt und lässt sich durch die Expression von SV40 Large Tumor Antigen (LT-Ag) signifikant verlängern.
3. MSC, die LT-Ag exprimieren, entsprechen durchlichtmikroskopisch und in dem Muster der charakteristischen Oberflächenmarkern unbehandelten MSC.
4. Ebenso lassen sich etablierte Protokolle zur Differenzierung in Fett-, Knochen- und Leberzellen an LT-Ag exprimierenden MSC erfolgreich anwenden.
5. Die alleinige Expression des potentiell onkogenen LT-Ag führt in MSC nicht unmittelbar zur malignen Transformation
6. Stabil mit LT-Antigen transduzierte MSC exprimieren LT-Ag auch nach einer Differenzierung in die untersuchten Zielzellen.
7. Analog zu dem Modell der MSC lassen sich die etablierten Expressionssysteme auch an anderen humanen Zelltypen wie z.B.: Vorhautfibroblasten (NHDF) anwenden.
8. Für eine Immortalisierung von MSC oder NHDF ist neben der Inhibition des Tumorsuppressor Proteins p53 durch LT-Ag auch eine Expression der Telomerase (hTERT) notwendig. Die Basisexpression von hTERT kann abhängig vom Alter des Zellspenders variieren und damit die Immortalisierungsfrequenz beeinflussen.
9. Eine naheliegende Erklärung für die Häufung von Desmoiden bei Patienten mit FAP stellen die bekannten Mutationen des APC-Gens und chirurgisch bedingte Wundheilungsreaktionen dar.
10. Die Aktivierung des *Wnt*-Signalweges kann zusammen mit einem *Transforming Growth Factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) -vermittelten Wachstumsstimulus der Auslöser einer malignen Transformation LT-Ag exprimierender MSC sein.
11. Eine Entschlüsselung pathogenetisch relevanter Signalkaskaden kann perspektivisch neue Angriffspunkte für die Therapie von Desmoiden aufzeigen. Tyrosin-Kinase-Inhibitoren könnten eine mögliche Therapieoption darstellen, falls sich die tumorbiologische Relevanz von p56<sup>lck</sup> durch weitere Untersuchungen in Desmoiden bestätigen sollte.

## TABELLARISCHER LEBENS LAUF

---

### **Persönliche Daten:**

Name	Bräuer
Vorname	Richard Nikolaus
Geburtsdatum	22.09.1985
Geburtsort	Frankfurt am Main
Familienstand	Ledig

### **Schul Ausbildung:**

September 1991- Juli 1997	Grundschule Weiler-la-tour (Luxemburg)
September 1997- Juli 2004	Gymnasium Lycée Michel Rodange (Luxemburg)

### **Medizinstudium**

Martin Luther Universität Halle-Wittenberg

Oktober 2004- Juli 2006	Vorklinischer Abschnitt
----------------------------	-------------------------

1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung 2006

Oktober 2006- Oktober 2010	Klinischer Abschnitt
-------------------------------	----------------------

2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung 2010

### **Promotionsstudium**

Martin Luther Universität Halle-Wittenberg

Oktober 2010 – Dezember 2011	Fortsetzung der experimentellen Arbeiten zur Dissertation, Abschluss der Laborarbeiten Ende 2011
---------------------------------	---

### **Arbeit**

Martha-Maria Klinikum Halle-Dölau

Januar 2012 – Dezember 2013	Beginn der Weiterbildung zum Facharzt für Anästhesiologie
--------------------------------	---

Klinikum Oldenburg

Januar 2014 bis heute	Fortsetzung der Weiterbildung zum Facharzt für Anästhesiologie
-----------------------	---

## **SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG UND**

### **ERKLÄRUNG ÜBER BISHERIGE PROMOTIONSVERSUCHE**

---

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Arbeit wurden zwischen 2007 und 2011 im Forschungslabor der Sektion Molekulare Onkologie des Institutes für Molekulare Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt. Die Versuche unter Verwendung von infektiösem lentiviralen Materials wurden in den Forschungslabors der Hämatologie/Onkologie der Klinik für Innere Medizin der Martin –Luther-Universität Halle Wittenberg unter S2-Sicherheitsbedingungen durchgeführt.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig erarbeitet und verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet und alle wörtlich oder sinngemäß übernommenen Textstellen als solche gekennzeichnet.

Ich versichere, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Universität oder Hochschule zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt wurde. Weiterhin versichere ich, mich bisher noch nicht um einen Doktorgrad beworben zu haben.

Richard Bräuer

Oldenburg, 17.8.2014

## DANKSAGUNG

---

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken die zur Entstehung und zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Der Direktorin Frau Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld danke ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit an Ihrem Institut.

Besonderer Dank gebührt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Wolfgang Ballhausen, Leiter der Sektion Molekulare Onkologie, für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, die hilfreiche Unterstützung in wissenschaftlichen Belangen, die stetige Diskussionsbereitschaft und die kritische Durchsicht des Manuskripts. Ganz besonders möchte ich mich bei ihm auch für die vielen hilfreichen Ratschläge, Kritiken und das entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Frau Jana Macho danke ich für die hilfreiche Begleitung, die unverzichtbare Unterstützung bei der Durchführung der Laborarbeiten und Versuche und auch für die angenehme Atmosphäre bei der täglichen Arbeit. Auch bei den Mitarbeitern des Instituts für Umwelttoxikologie möchte ich für die herzliche Aufnahme, Hilfe und das angenehme Umfeld bedanken.

Bei Herrn PD. Dr. Lutz P. Müller möchte ich mich für die hilfreichen Anregungen und die Möglichkeit der Durchführung der Versuche unter S2-Sicherheitsbedingungen in den Laborräumen der KIM IV bedanken. Frau Dr. Jana Lützkendorf danke ich für die Bereitstellung der MSC-KM, die Hilfe bei der Durchführung der Arbeiten mit dem lentiviralen System und die zahlreichen hilfreichen Ratschläge und Kritiken, ohne die ein Gelingen nicht möglich gewesen wäre. Auch den anderen Mitgliedern des Hämatologisch/Onkologischen Forschungslabors danke ich für die freundliche Aufnahme und die angenehme Arbeitsumgebung.

Herrn Prof. Dr. Bruno Christ und Frau Sabine Pohl danke ich für die Bereitstellung der MSC-SC und die Unterstützung bei der Durchführung der hepatozytären Differenzierungsversuche. Herrn Prof. Dr. Johannes Wohlrab und den Mitarbeitern des dermatologischen Forschungslabors danke ich für die Bereitstellung der NHDF.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mir dieses wundervolle Studium ermöglicht haben und mich zu jeder Zeit unterstützt haben. Zu guter Letzt bedanke ich mich auch bei Diana für Ihre Hilfe, Unterstützung, Kritik und Ihr Verständnis für meine Arbeit.