

**Von mesenchymalen Zellen sezernierte extrazelluläre Vesikel
protektieren letal bestrahlte hämatopoetische Stammzellen**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Eingereicht am Fachbereich Biologie
an der Universität Hamburg

vorgelegt von

Jill-Sandra Schoefinius

aus Obersteinbeck-Recke

2023

Diese Doktorarbeit wurde von Frau em. PD Dr. Claudia Lange betreut und in der Forschungsabteilung Zell- und Gentherapie (geleitet von Prof. Dr. Boris Fehse) der interdisziplinären Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation, Zentrum für Onkologie im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Deutschland im Zeitraum vom Mai 2016 bis Dezember 2019 durchgeführt.

Finanziert und gefördert wurde dies durch die Deutsche Krebshilfe. Des Weiteren wurde von der Gustav Spierling Stiftung die Teilnahme an der Spring School 2018 der *European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT)* in Oxford als Weiterbildung ermöglicht.

1. Gutachter: Prof. Dr. Boris Fehse

2. Gutachter: Prof Dr. Thomas Dobner

Die vorliegende Doktorarbeit wurde am 30. Oktober 2023 in Anwesenheit der folgenden Prüfungskommissionsmitglieder erfolgreich verteidigt:

Prof. Dr. Julia Kehr

Prof. Dr. Baris Tursun

Prof. Dr. Boris Fehse

Prof. Dr. Tobias Lenz

PD Dr. Kerstin Cornils

Zusammenfassung

Ionisierende großflächige oder Ganzkörperbestrahlung wie sie bei Strahlenunfällen und Radiotherapie – insbesondere der myeloablativen Konditionierung – vorkommt, gehen mit hohen Mortalitäts- und Morbiditätsraten einher. Ursache dafür sind die auftretenden schweren Nebenwirkungen wie z.B. irreversible Myelosuppression, deren einzige therapeutische Behandlungsmethode bis heute eine mit ebenfalls mit hohen Mortalitäts- und Morbiditätsraten einhergehende Stammzell- oder Knochenmarktransplantation ist. Demzufolge ist eine alternative risikoärmere Behandlungsform der strahlungsinduzierten Nebenwirkungen von besonderer klinischer Bedeutung.

Als besonders geeignete Kandidaten für die Protektion letal bestrahlter mHSCs/mHPCs und der damit verbundenen vollständigen Wiederherstellung der Hämatopoese haben sich parakrin wirkende von MSCs sezernierte EVs erwiesen.

Ziel dieser Arbeit war es, den Mechanismus hinsichtlich der nachgewiesenen Radioprotektion von mMSC-EVs weiter zu entschlüsseln. Dazu gehörte die Identifikation der Zielzellen *in vivo* sowie die Bestimmung der von den mMSC-EVs transportierten Moleküle (Proteine und RNAs). Darüber hinaus wurden aufgrund ihrer bereits bekannten biologischen Funktion geeignete Protein-Kandidaten ausgewählt, um diese *in vitro* auf eine mögliche radioprotektive Wirkung zu testen.

Die intravenöse Verabreichung PHK26-markierter mMSC-EVs in letal bestrahlte Empfängertiere zeigte, dass die EVs sich frei durch den Körper bewegten und gezielt ins Knochenmark (KM) strömten, wo sie bereits 2 h nach Transplantation detektierbar waren. Dort angekommen kolokalisiert die EVs bevorzugt direkt mit potentiell rekonstitutiven, pluripotenten Stammzellen, welche bekannterweise in Mäusen hoch SCA-1 positiv und nur gering C-KIT positiv sind. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass zum größten Teil nur ein einzelner EV mit einer Stammzelle interagiert und dies möglicherweise bereits für einen protektiven Effekt ausreicht.

Die drei anhand einer durchgeführten mMSC-EV Proteomanalyse ausgewählten Kandidaten (SOD1, GAL1 und PRDX1) konnten nachweislich sowohl einzeln, als auch alle drei zusammen erfolgreich auf Transkriptions- und Proteinebene mittels entsprechender lentiviral stabil eingebrachter shRNAs in mMSCs runterreguliert werden. Diese Suppression der Kandidaten spiegelte sich ebenfalls im RNA- und Proteinlevel der von den transduzierten mMSCs sezernierten EVs wider. Dabei ergab es keinen Unterschied, ob die Zellen während der EV-Produktion mit oder ohne Zytokin-Zugabe kultiviert wurden. Die daraufhin durchgeführten Radioprotektionsassays mit den unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen hergestellten mMSC-EVs ließ jedoch auf Grund Assay-untypischer Ergebnisse der mitgeführten Kontroll-EVs keine Aussage hinsichtlich der Beteiligung der drei Kandidaten an der Radioprotektion von mHSCs zu. Auch mit veränderten Assay-Parametern konnte keine Protektion letal bestrahlter mMNCs nachgewiesen werden. Daraufhin durchgeführte Untersuchungen zeigten im Gegensatz zu den früher etablierten mMSCs eine veränderte Expression charakteristischer mMSC-Oberflächenmarker gegenüber den in dieser Arbeit für die Runterregulation mit dazugehörigen Kontrollen verwendeten mMSCs. In wie weit diese Veränderungen einen Einfluss auf die Radioprotektion der EVs besitzt, bleibt abzuklären, ebenso wie die genaue Zuordnung der radioprotektiven Effekte zu einzelnen in EVs enthaltenen Komponenten.

Zusätzlich gelang es durch eine Transkriptomanalyse diejenigen RNAs in den mMSC-EVs zu identifizieren, die im Vergleich zu ihren parentalen Zellen signifikant angereichert oder reduziert vorlagen. Diese wurden anschließend anhand ihrer bekannten hauptsächlichen Funktionalität eingruppiert.

Insgesamt konnte mit der Entdeckung, dass mMSC-EVs letal bestrahlte mHSCs direkt ansteuern und es keinen Nachweis auf eine indirekte Beteiligung weiterer Zellen an der Protektion gibt, der vorliegende Protektionsmechanismus weiter aufgeklärt werden. Auch die Daten über die von den EVs transportierten RNAs bieten neue Beiträge zur Entschlüsselung einzelner Komponenten des Mechanismus. Somit hat diese Arbeit dazu beigetragen der Entwicklung einer effizienten und sicheren Behandlungsform von schweren strahlungsinduzierten hämatopoetischen Schäden wieder einige Schritte näher zu kommen.

Abstract

Irradiation of large area or even the whole body with ionizing radiation as it occurs in radiation accidents and radiotherapy - especially myeloablative conditioning - is associated with high mortality and morbidity rates. This is due to the severe side effects that occur, such as irreversible myelosuppression, for which the only therapeutic treatment to this day is stem cell or bone marrow transplantation. These treatments are also associated with high mortality and morbidity rates. Consequently, an alternative lower-risk treatment for radiation-induced side effects is of particular clinical importance.

It has been shown that paracrine-acting EVs secreted by MSCs are particularly suitable candidates for the protection of lethally irradiated mHSCs/mHPCs and the associated full restoration of hematopoiesis. The aim of this work was to further unravel the mechanism regarding the afore demonstrated radioprotection of mMSC-EVs. This included the identification of the target cells *in vivo*, as well as the identification of the molecules (proteins and RNAs) transported by the mMSC-EVs. Furthermore, based on their already known biological function, suitable candidates were selected to be tested *in vitro* for a potential radioprotective effect.

Intravenous administration of PHK26-labeled mMSC-EVs into lethally irradiated recipient animals showed that EVs moved freely through the body and targeted the bone marrow (BM) where they were verifiable as early as 2 h after transplantation. Once there, the EVs preferentially colocalized directly with potentially reconstitutive pluripotent stem cells, which are known to be highly SCA-1 positive and only slightly C-KIT positive in mice. In addition, it was shown that only a single EV interacted with a stem cell for the most part and this single interaction may already be sufficient for a protective effect.

The three candidates selected on the basis of a performed mMSC-EV proteomic analysis (SOD1, GAL1, and PRDX1) were shown to be successfully downregulated both individually and all three together at the transcriptional and protein levels using the appropriate with lentiviruses stably into mMSCs introduced shRNAs. This suppression of the candidates was also mirrored on RNA and protein levels of EVs secreted by the transduced mMSCs. There was no difference whether the cells were cultured with or without cytokine addition during EV production.

However, the subsequent radioprotection assays with the mMSC-EVs produced under different cultivation conditions did not allow any conclusion regarding the involvement of the three candidates in radioprotection of mHSCs due to assay atypical results of the included control EVs. Even with modified assay parameters, no protection of lethally irradiated mMNCs could be detected. Subsequent investigation showed altered expression of the characteristic mMSC surface markers of the previously established mMSCs compared to those of the mMSCs used for downregulation experiments with associated controls in this work. The extent to which this has an impact on the radioprotection of EVs remains to be elucidated. This applies alike to the radioprotective effects attributed to the individual components present in EVs.

In addition, transcriptome analysis identified those RNAs in mMSC-EVs that were significantly enriched or reduced compared to their parental cells. These were subsequently grouped regarding their known major functionality.

Overall, the discovery that mMSC-EVs directly target lethally irradiated mHSCs - and that there is no evidence for indirect involvement of other cells in protection – further elucidated the present protection

mechanism. Furthermore, the data on RNAs transported by EVs offer new contributions to decipher individual components of this mechanism. Therefore, this work has contributed to the development of an efficient and safe treatment for severe radiation-induced hematopoietic damage.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Abstract	iii
Inhaltsverzeichnis	v
Abkürzungsverzeichnis	xi
Abbildungsverzeichnis	xviii
Tabellenverzeichnis	xx
1. Einleitung	1
1.1. Ionisierende Strahlung	1
1.1.1. Akutes Strahlensyndrom	3
1.1.2. Radiotherapie	5
1.1.2.1. Myelosuppression.....	6
1.2. Hämatopoese	7
1.3. Mesenchymale Stromazellen	10
1.3.1. Biologische Funktion der MSCs	11
1.3.2. Therapeutische Anwendung von MSCs	12
1.3.3. MSCs als Therapie nach Ganzkörperbestrahlung	13
1.4. Extrazelluläre Vesikel	15
1.4.1. Isolation und Charakterisierung extrazellulärer Vesikel	17
1.4.2. Biologische Funktion von extrazellulären Vesikeln	19
1.4.3. Therapeutische Anwendung von aus mesenchymalen Stromazellen abstammenden extrazellulären Vesikeln	22
1.4.4. Radioprotektive Eigenschaften von MSC-EVs.....	23
1.5. Proteomanalyse von mMSC-EVs	25
1.5.1. Kupfer/Zink Superoxid Dismutase 1	26
1.5.2. Peroxiredoxin-1	26
1.5.3. Galectin-1	27
1.6. Lentivirale Vektoren	28
1.6.1. Lentivirale „Gene Ontology“-Vektoren.....	30
1.6.2. RNA-Interferenz mittels <i>short hairpin</i> RNA	31
1.7. Ziel der Arbeit	33

2. Material und Methoden	35
2.1. Material	35
2.1.1. Verbrauchsmaterialien	35
2.1.2. Chemikalien.....	37
2.1.3. Geräte und deren Zubehör.....	39
2.1.4. Software	41
2.1.5. Kits.....	42
2.1.6. Zelllinien und Primärkulturen.....	42
2.1.7. Zellkulturmedien, -lösungen und -zusätze	43
2.1.7.1. Zellkulturgrundmedien, Puffer und Seren.....	44
2.1.7.2. Kultivierungs-, Versuchs- und Einfriermedien.....	44
2.1.7.3. Medienzusätze.....	46
2.1.8. Puffer für die virale Transfektion von Zellen.....	46
2.1.9. Plasmide.....	46
2.1.9.1. Helferplasmide für Virusproduktion	46
2.1.9.2. shRNA LeGO-Vektoren zur gezielten Runterregulation von Zielgenen	46
2.1.10. Primer	47
2.1.11. RIPA Puffer für Proteinisolation.....	48
2.1.12. Lösungen für Protein-Elektrophorese und Western Blot.....	48
2.1.13. Polyacrylamid- und Agarosegele.....	49
2.1.13.1. Polyacrylamidgel.....	49
2.1.13.2. Agarosegel.....	50
2.1.14. Färbelösungen.....	50
2.1.15. Antikörper, Blocklösungen und Fluoreszenzfarbstoffe.....	50
2.1.15.1. Blockierungslösung und Fluoreszenzfarbstoffe für die Durchflusszytometrie	50
2.1.15.2. Antikörper für Durchflusszytometrie	51
2.1.15.3. Antikörper für ImageStream.....	51
2.1.15.4. Antikörper für Western Blot.....	51
2.1.15.5. Antikörper, Blockierungslösung und Fluoreszenzfarbstoffe für Cytospins	52
2.2. Methoden	52
2.2.1. Tierversuche.....	52
2.2.2. Zellkulturbedingungen	52
2.2.3. Zellzahlbestimmung.....	53
2.2.4. Murine Knochenmarksisolation	54
2.2.5. Isolation von murinen mononukleären Zellen (mMNCs)	54
2.2.6. Etablierung einer murinen mesenchymalen Stromazelllinie (mMSC-Linie)	55
2.2.7. mMSCs Kultivierung.....	56
2.2.7.1. Trypsinieren von mMSCs	56
2.2.7.2. Einfrieren von mMSCs.....	56

2.2.7.3.	Auftauen von mMSCs	57
2.2.8.	Charakterisierung von mMSCs	57
2.2.8.1.	Differenzierung von mMSCs	57
2.2.8.1.1.	Chondrogene Differenzierung (modifiziert nach Shakibaei <i>et al.</i> , 1997).....	58
2.2.8.1.2.	Adipogene Differenzierung (modifiziert nach Pittenger, 1998).....	58
2.2.8.1.3.	Osteogene Differenzierung (nach Jaiswal <i>et al.</i> 1997).....	59
2.2.8.2.	Histologische Färbungen	59
2.2.8.2.1.	Alcian-Blau Färbung	59
2.2.8.2.2.	Ölrot-O-Färbung (modifiziert)	60
2.2.8.2.3.	Van Kossa Färbung	60
2.2.8.3.	Nachweis der Anwesenheit von mMSC-Oberflächenantigenen und der Abwesenheit von epithelialen und hämatopoetischen Markern	61
2.2.9.	Expansion von mMSCs für die Ernte von extrazellulären Vesikeln	64
2.2.10.	Ernte und Isolation von extrazellulären Vesikeln	66
2.2.11.	NIH/3T3 und 293T Kultivierung	68
2.2.12.	Produktion infektiöser Vektorpartikel (Calcium-Phosphat-Transfektion).....	69
2.2.13.	Titer Bestimmung der infektiösen lentiviralen Vektoren	70
2.2.14.	Runterregulation von ausgewählten Zielgenen in mMSCs mittels Transduktion.....	71
2.2.14.1.	Transduktion von mMSCs	71
2.2.14.2.	Sortierung von transduzierten mMSCs auf hoch positive Zellen.....	73
2.2.15.	MS5-Kultivierung	75
2.2.15.1.	Trypsinieren von MS5.....	75
2.2.15.2.	Einfrieren von MS5	76
2.2.15.3.	Auftauen von MS5	76
2.2.16.	<i>In vitro</i> Radioprotektionsassay	76
2.2.16.1.	Vorkultur von mMNCs auf MS5 Stromalayer.....	78
2.2.16.2.	Methylcelluloseassay	80
2.2.17.	EV-Markierung mit PKH26	81
2.2.18.	EV-Transplantation.....	82
2.2.19.	Cytospins	82
2.2.19.1.	Herstellung von Cytospins	82
2.2.19.2.	Färbung von Cytospins	83
2.2.19.3.	Auswertung der gefärbten Cytospins	83
2.2.20.	ImageStream Analysen	84
2.2.20.1.	Probengenerierung für ImageStream Analysen	84
2.2.20.2.	Färbung von mMNCs für die ImageStream Analyse	85
2.2.20.2.1.	Färbung von mMNCs unbehandelter Tiere als Kompensationskontrollen.....	85
2.2.20.2.2.	Färbung von mMNCs der Analysetiere und Versuchs-Kontrolltiere.....	86
2.2.20.3.	ImageStream Messung der gefärbten mMNCs	86
2.2.20.4.	Auswertung der ImageStream Analyse	89

2.2.21.	EV-Pelletierung.....	89
2.2.22.	RNA-Isolation	89
2.2.23.	RNA-Aufkonzentration.....	91
2.2.24.	Sequenzierung der nächsten Generation von RNAs aus mMSCs und mMSC-EVs	91
2.2.25.	Komplementäre DNA Synthese	92
2.2.26.	Polymerase Kettenreaktionen	93
2.2.26.1.	Kontroll-PCR	93
2.2.26.2.	Quantitative Echtzeit PCR	94
2.2.26.2.1.	Auswertung der quantitativen Echtzeit PCR	95
2.2.26.2.2.	Überprüfung auf DNA-Kontamination in isolierten EV-RNAs.....	95
2.2.27.	Proteinisolation	96
2.2.28.	Proteinmessung mittels DC Protein Assay	96
2.2.29.	Berechnung der Proteinkonzentration.....	96
2.2.30.	Probenvorbereitung für Western Blot Analyse	97
2.2.30.1.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	97
2.2.30.2.	Western Blot	97
2.2.30.3.	Immundetektion	98
2.2.30.4.	Semiquantitative Auswertung der Western Blots	99
2.2.31.	Nanopartikel Verfolgungsanalyse via NanoSight	99
2.2.32.	Statistische Auswertungen	100
3.	Ergebnisse.....	101
3.1.	Identifikation der Zielzellen von mMSC-EVs in letal bestrahlten Mäusen.....	101
3.1.1.	Charakterisierung der für die EV-Produktion benötigten mMSCs.....	101
3.1.1.1.	<i>In vitro</i> Differenzierbarkeit der mMSCs.....	102
3.1.1.2.	Detektion charakteristischer Oberflächenantigene von mMSCs	103
3.1.2.	Charakterisierung von mMSC-EVs	105
3.1.2.1.	Detektion von EV-Markern.....	105
3.1.2.2.	Partikelkonzentration der transplantierten mMSC-EVs	106
3.1.3.	Kolokalisation von transplantierten PKH26-EVs mit Knochenmarkszellen nach letaler Bestrahlung.....	106
3.2.	Analyse ausgewählter Gene auf Beteiligung an Radioprotektion von letal bestrahlten hämatopoetischen Stammzellen.....	110
3.2.1.	Erfolgreiche Runterregulation der Zielgene <i>Gal1</i> , <i>Sod1</i> und <i>Prdx1</i> via lentiviral eingebrachter shRNAs in mMSCs.....	110
3.2.2.	Charakterisierung der von verschiedenen (nicht) transduzierten mMSC-Kulturen isolierten mMSC-EVs	115
3.2.3.	Einfluss der Runterregulation von Zielgenen in mMSC-EVs auf die Protektion letal bestrahlter mHSCs	117
3.2.4.	Wiederholung der Radioprotektionsassays unter optimierten Parametern zur Detektion der protektiven Effekte von mMSC-EVs auf letal bestrahlte mHSCs	121

3.2.5.	Überprüfung der mMSC-Charakteristika bei Kultivierung in Sigma-FCS-haltigem Medium mit und ohne Zytokin-Zugabe.....	125
3.2.5.1.	<i>In vitro</i> Differenzierbarkeit von mMSCs in Sigma-FCS Medium mit und ohne Zytokine	125
3.2.5.2.	Nachweis von charakteristischen mMSC-Oberflächenmarkern nach Kultivierung in Sigma-FCS-haltigem Medium mit und ohne Zytokin-Zugabe.....	128
3.3.	Transkriptomanalyse von mMSC-EVs und deren parentalen mMSCs	132
4.	Diskussion.....	136
4.1.	Identifikation der mMSC-EVs Zielzellen im Knochenmark letal bestrahlter Rezipienten	137
4.1.1.	Bei den für die EV-Produktion verwendeten Zellen handelte es sich um eine reine mMSC-Linie.....	137
4.1.2.	Ausgehend von der mMSC-Linie konnten reine EV-Präparate isoliert werden	138
4.1.3.	Murine MSC-EVs kolokalisieren im Knochenmark nach letaler Bestrahlung vordringlich mit pluripotenten Stammzellen	139
4.2.	Analyse ausgewählter Gene auf Beteiligung an Radioprotektion von letal bestrahlten hämatopoetischen Stammzellen.....	140
4.2.1.	Nachweislich reine EV-Isolation von verschiedenen transduzierten mMSCs möglich	141
4.2.2.	Erfolgreiche Runterregulation von ausgewählten Zielgenen mittels shRNA.....	141
4.2.3.	Radioprotektionsassays zeigen keine detektierbare Radioprotektion mit allen untersuchten EV-Präparaten.....	144
4.2.3.1.	Zu hohe Strahlendosis könnte Zellen irreversibel schädigen und somit den Protektionsverlust erklären	146
4.2.3.1.1.	Abnahme der Intensität der Strahlenquelle über die Zeit.....	146
4.2.3.1.2.	Austausch der Inzuchtmauskolonie und damit veränderter genetischer Hintergrund	146
4.2.3.1.3.	Erneute Titration zeigte 3 Gy als optimale Strahlendosis für die im Radioprotektionsassay benötigten mMNCs	147
4.2.3.2.	Verdreifachung der EV-Menge im Radioprotektionsassay bewirkte auch keine detektierbare Radioprotektion.....	148
4.2.3.3.	Einfluss der veränderten mMSC-Charakteristika auf den Protektionsverlust der EVs	148
4.2.3.4.	Einfluss der Zellkulturbedingungen auf die Radioprotektion	152
4.3.	Von Transkriptomanalyse hin zur Therapie	153
5.	Online Referenzen	156
6.	Referenzen.....	158

7. Anhang.....	I
7.1. Nukleotidsequenzen	I
7.2. Isotypkontroll-Gating für Charakterisierung der mMSCs	I
7.3. Titration	II
7.4. Sortierung auf hoch positive mMSCs nach Transduktion.....	III
7.5. Agarosegele.....	VI
7.6. Nachweis der Runterregulation auf Transkriptionsebene bei Zytokin-Zugabe.....	VII
7.7. Nachweis der Runterregulation auf Proteinebene bei Zytokin-Zugabe	VIII
7.8. Cytospin Versuche.....	X
7.9. NanoSight Messungen	X
Eidesstattliche Versicherung	XII

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
(e)GFP	(verbessertes) grün fluoreszierendes Protein; engl.: <i>enhanced green fluorescent protein</i>
(e)GFP/BSL	Fusionsprotein aus (verbesserten) grünen fluoreszierendem Protein und <i>Blasticidin-S deaminase</i>
(e)YFP	(verbessertes) gelb fluoreszierendes Protein, engl.: <i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
(q)PCR	(quantitative) Polymerase-Kettenreaktion, engl.: <i>(quantitative) polymerase chain reaction</i>
°C	Temperatur in Grad Celsius
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
↔	bestrahlt
7AAD	7-Aminoactinomycin
∞	<i>ad terminatio</i> = bis zur Unterbrechung / ohne vorgewähltes Ende
α	alpha
Abb.	Abbildung
AGO	Argonaut Protein
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
αMEM	Minimum Essential Medium α
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
APC/Cy7	Allophycocyanin-Cyanin-7 (Tandemfluorophor)
APC(s)	antigenpräsentierende Zelle(n); engl.: <i>antigen-presenting cell(s)</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARS	akutes Strahlensyndrom; engl.: <i>acute radation syndrom</i>
BCA	Bicinchoninsäure; engl.: <i>bicinchoninic acid</i>
BCL-2	engl.: <i>B-cell lymphoma 2</i>
bp	Basenpaar
Breg	regulatorische B-Zellen
BSA	Rinderserumalbumin; engl.: <i>bovine serum albumin</i>
BSD	Blasticidin Resistenzgen
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
Cer	Cerulean

CFC	Kolonie-bildende Zelle; engl.: <i>colony forming cell</i>
CFU(s)	Kolonie-bildende Einheit(en); engl.: <i>colony-forming unit(s)</i>
CLP(s)	gemeine lymphoide Vorläuferzelle(n); engl.: <i>common lymphoid progenitor(s)</i>
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CMP(s)	gemeine myeloide Vorläuferzelle(n); engl.: <i>common myeloid progenitor(s)</i>
CMV	Cytomegalievirus
CMV Promotor	Cytomegalievirus pol-II Promotor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cp	engl.: <i>crossing point</i>
cPPT	engl.: <i>central polypurine tract</i>
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
D ₀	Radiosensitivität
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA(s)	Desoxyribonukleinsäure(n), engl.: <i>desoxyribonucleic acid(s)</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
ds	doppelsträngig
DSB(s)	Doppelstrangbrüch(e), engl.: <i>double-strand break(s)</i>
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTT	1, 4 Dithiothreitol
ECO	ecotroper muriner Leukämievirus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	Europäische Arzneimittelbehörde
ENV	retrovirales Hüllprotein, engl.: <i>envelope protein</i>
Env	Gen/Transkript für retrovirales Hüllprotein
ESCRT	für Transportmaschine erforderliche endosomale Sortierkomplexe; engl.: <i>endosomal sorting complexes required for transport</i>
EtOH	Ethanol
EV(s)	extrazelluläre(n) Vesikel
evtl.	eventuell
FACS	engl.: <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	fötales Rinderserum; engl.: <i>fetal bovine serum</i>
FGF-2	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FSC	Vorwärtsstreuung; engl.: <i>forward scatter</i>
FSC-A	Fläche der Vorwärtsstreuung
FSC-H	Höhe der Vorwärtsstreuung
FSC-W	Weite der Vorwärtsstreuung
g	Gramm

g	g-Kraft, wirkende Beschleunigung
GAG	Glykosaminoglykan
Gag	Gen für retrovirales Gruppenantigen; das daraus entstehende Vorläuferprotein wird zu Matrix-, Capsid-, Nucleocapsid- und Link-Protein prozessiert
Gag/Pol	Gen für retrovirales Polyprotein; kodiert Gruppenantigen /Polymerase
Gal1	Galectin-1 (Gen, RNA, cDNA)
GAL1	Galectin-1 (Protein)
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GIS	gastrointestinales Syndrom
GKMZ	gesamten Knochenmarkszellen
GMP	Granulozyten/Makrophagen Vorläufer; engl.: <i>granulocyte/macrophage progenitor</i>
GvHD	Spender-gegen-Wirt-Krankheit; engl.: <i>Graft-versus-Host-Disease</i>
Gy	Gray
h	Stunde, engl.: <i>hour</i>
Ham`s F-12	Nutrient Mixture F-12
HBS	HEPES buffered saline
HCl	Salzsäure
HEPES	(N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure))
HF	Hellfeld
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor; engl.: <i>hepatocyte growth factor</i>
HIV-1	Humanes Immundefizienz-Virus 1
HLA	Humane Leukozytenantigene ≡ MHC
HPC(s)	hämatopoetische Progenitorzelle(n), engl.: <i>hematopoietic progenitor cell(s)</i>
HPS	hämatopoetisches Syndrom
HSC(s)	hämatopoetische Stammzelle(n), engl.: <i>hematopoietic stem cell(s)</i>
HSC-TX	hämatopoetische Stammzelltransplantation
I.E.	Internationale Einheit
i.v.	intravenös
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IgG	Immunglobulin G
IMDM	Iscoe`s Modified Dulbecco`s Medium
IN	Integrase
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
ISCT	Internationale Gesellschaft für Zelltherapie; engl.: <i>International Society for Cellular Therapy</i>
ISEV	Internationale Gesellschaft für extrazelluläre Vesikel; engl.: <i>International Society for Extracellular Vesicles</i>
k	Kilo
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare, syn. 1000 bp

kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KM	Knochenmark
KM-TX	Knochenmarktransplantation
KPA(s)	Kopfsteinpflasterareale
l	Liter
LeGO	<i>engl.: Lentiviral Gene Ontology Vector</i>
LT-HSC(s)	langzeit-repopulierende hämatopoetische Stammzelle(n); <i>engl.: long-term repopulating-hematopoietic stem cell(s)</i>
LTR	<i>engl.: long terminal repeat</i>
M	Molar (in Konzentrationsangaben)
m	milli (vorangestellt in Einheiten) oder Masse
mCherry	monomerisches rotes Fluoreszenzprotein
MCS	multiple Klonierungsstelle; <i>engl.: multiple cloning site</i>
MEP	Megakaryozyten/Erythrozyten Vorläufer; <i>engl.: megakaryocyte/erythroid progenitor</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, <i>engl.: major histocompatibility complex</i>
MHCI	Haupthistokompatibilitätskomplex Typ I, <i>engl.: major histocompatibility complex typ I</i>
MHCII	Haupthistokompatibilitätskomplex Typ II, <i>engl.: major histocompatibility complex typII</i>
min	Minute
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
mMNC(s)	murine mononukleäre Zelle(n)
MMP(s)	multipotente Vorläuferzelle(n)
mMSC	murine mesenchymale Stromazelle(n), <i>engl.: murine mesenchymal stromal cell(s)</i>
mMSC-EVs	von murinen mesenchymalen Stromazellen sezernierte extrazelluläre Vesikel
mMSC-TX	murine mesenchymale Stromazell-Transplantation
MOI	Multiplizität der Infektion
Mol	Mol, Stoffmenge
mRNA	Boten-RNA; <i>engl.: messenger ribonucleic acid</i>
MSC(s)	mesenchymale Stromazelle(n), <i>engl.: mesenchymal stromal cell(s)</i>
MSC-TX	mesenchymale Stromazell-Transplantation
mSv	Millisievert
MVB	multivesikuläre Körperchen; <i>engl.: multivesicular bodies</i>
MW	Molekulare Masse; <i>engl.: molecular weight</i>
N	Normalität, Stoffmengenkonzentration

n	Nano
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NGS	Sequenzierung der nächsten Generation (Hochdurchsatzsequenzierung); engl.: <i>next generation sequencing</i>
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
nt	Nukleotid
NTA	Nanopartikel Verfolgungsanalysen; engl.: <i>nanoparticle tracking analysis</i>
Ø	Durchmesser
p	Piko
PB	Primerbindungsstelle
PE	Phycoerythrin
PE/Cy7	Phycoerythrin-Cyanin-7 (Tandemfluorophor)
PEG	Polyethylenglykol
pg	Pikogramm
PGE-2	Prostaglandin E2
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
POL	retrovirales Polymerase Vorläuferprotein, welches zur Reversen Transkriptase, Protease und Integrase prozessiert wird
Pol	Gen für retrovirale Polymerase, das daraus entstehende Vorläuferprotein wird zu Reversen Transkriptase, Protease und Integrase prozessiert
<i>Prdx1</i>	Peroxiredoxin 1 (Protein)
PRDX1	Peroxiredoxin 1 (Gen, RNA, cDNA)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rev	Gen für posttranskriptionell wirkenden retroviralen Transaktivator; engl.: <i>regulator of expression of virion proteins</i>
REV	Regulatorprotein: posttranskriptionell wirkender retroviraler Transaktivator; engl.: <i>regulator of expression of virion proteins</i>
RISC	engl.: <i>RNA-inducing silencing complex</i>
rmEGF	muriner rekombinanter epidermaler Wachstumsfaktor (engl.: recombinant mouse epidermal growth factor)
rmPDGF-BB	muriner rekombinanter Plättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor BB (engl.: <i>recombinant mouse platelet-derived growth factor BB</i>)
RNA(s)	Ribonukleinsäure(n); engl.: <i>ribonucleic acid(s)</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies, engl.: <i>reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl.: <i>revolutions per minute</i>
RRE	Bindungsstelle für REV; engl.: <i>rev-response-element</i>
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkriptase

S27a	ribosomales 40S-Protein
SCF	Stammzellefaktor; engl.: <i>stem cell factor</i>
<i>scr</i>	engl.: <i>scrambled</i>
SC-TX	Stammzelltransplantation
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunde
SFFV	engl.: <i>spleen focus-forming virus</i>
shRNA(s)	engl.: <i>short hairpin RNA(s)</i>
SIN-LTR \equiv Δ LTR	engl.: <i>self-inactivating long terminal repeats</i>
siRNAs	engl.: <i>small interfering RNA</i>
<i>Sod1</i>	Superoxiddismutase 1 (Gen, RNA, cDNA)
SOD1	Superoxiddismutase 1 (Protein)
β	beta
ss	einzelsträngig
SSB(s)	Einzelstrangbruch(e), engl.: <i>single-strand break(s)</i>
SSC	Seitwärtsstreuung; engl.: <i>side scatter</i>
SSC-A	Flächen der Seitwärtsstreuung
SSC-H	Höhe der Seitwärtsstreuung
SSC-W	Weite der Seitwärtsstreuung
ST-HSC(s)	kurzzeit-repopulierende hämatopoetische Stammzelle(n); engl.: <i>short-term repopulating-hematopoietic stem cell(s)</i>
Sv	Sievert
SV-40	<i>Simian Virus 40</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TAT	Regulatorprotein: Transaktivator der Transkription; engl.: <i>trans-activator of transcription</i>
TBI	Ganzkörperbestrahlung; engl.: <i>total body irradiation</i>
TBS	engl.: <i>tris-buffered saline</i>
TBS-T	engl.: <i>tris-buffered saline with Tween20</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor beta; engl.: <i>transforming growth factor beta</i>
T _m	Schmelztemperatur
Treg	regulatorische T-Zellen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX	Transplantation
U	Units
U6	RNA Polymerase-III Promotor der U6-RNA
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt

v	Volumen
v/v	Volumenprozent
VE	vollentsalzt
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor; engl.: <i>vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	vergleiche
WB	Western Blot
wPRE	engl.: <i>woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element</i>
x	-fach, Vielfaches einer Konzentration
x Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
ZVS	zerebrovaskuläres Syndrom
κ	kappa
Ψ	Psi: Verpackungssignal
Ω	shRNA

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Überblick über mögliche Nebenwirkungen bei einer Strahlentherapie.....	6
Abb. 2: Klassische schematische Darstellung der hierarchisch organisierten Hämatopoese.....	9
Abb. 3: Wiederherstellung der murinen Hämatopoese nach letaler Ganzkörperbestrahlung durch MSC-Transplantation.....	14
Abb. 4: Schematische Darstellung der wichtigsten Biogenesewege für verschiedene Subtypen von extrazellulären Vesikeln.....	16
Abb. 5: Zell-Zell-Kommunikation mittels extrazellulärer Vesikel.....	21
Abb. 6: Kaplan-Meier-Graph zeigt die Überlebensrate bei Mäusen nach letaler Ganzkörperbestrahlung (9,5 Gy) mit und ohne Behandlung.....	24
Abb. 7: Funktionale Gruppierung der in mMSC-EVs gefundenen Proteine.....	25
Abb. 8: Aufbau eines LeGO-Vektors mit shRNA und co-exprimiertem Transgen mit Fluoreszenzmarker.....	31
Abb. 9: Schematischer Verlauf der RNA-Interferenz ausgehend von einer shRNA.....	33
Abb. 10: Zählnetz einer Seite in einer Neubauer improved Zellzählkammer.....	53
Abb. 11: Gatingstrategie für mMSCs Charakterisierung.....	64
Abb. 12: Transfektor-Plasmide, die zur Produktion infektiöser viraler Vektoren genutzt wurden....	70
Abb. 13: Alle aus mHPCs im Methylcelluloseassay entstehenden Kolonietypen.....	77
Abb. 14: Repräsentative Darstellung der verschiedenen Größen von gebildeten Kopfsteinpflaster Arealen.....	80
Abb. 15: Aufteilung einer 24-Loch-Zellkulturplatte für einen Methylcelluloseassay.....	81
Abb. 16: Verwendetes Gating für die ImageStream Analysen.....	88
Abb. 17: Adipozyten, Osteoblasten und Chondroblasten gehen aus der <i>in vitro</i> Differenzierung von mMSCs hervor.....	103
Abb. 18: Murine MSCs exprimieren ausschließlich SCA 1, CD73 und CD105 und sind negativ für CD34, CD45, CD90.2, CD117, CD11b und MHCII.....	104
Abb. 19: Charakterisierung von mMSC-EVs anhand Immundetektion ausgewählter EV-Marker.....	105
Abb. 20: Kolokalisation von Knochenmarkszellen mit transplantierten mMSC-EVs.....	107
Abb. 21: Anzahl an mit SCA-1 ⁺ oder C-KIT ⁺ Knochenmarkszellen kolokalisierten PKH26-EVs 2 h und 4 h nach Transplantation in letal bestrahlte Rezipienten.....	108
Abb. 22: Quantifizierung von mit Knochenmarkszellen kolokalisierten PKH26-EVs.....	109
Abb. 23: Erfolgreiche transkriptionale Runterregulation der Zielgene <i>Gal1</i> , <i>Sod1</i> und <i>Prdx1</i> mittels eingebrachter shRNA	111
Abb. 24: Immundetektion der Runterregulation von GAL1, SOD1 und PRDX1 verschiedener mMSC-Kulturen sowie in deren sezernierten EVs.....	113
Abb. 25: Erfolgreiche Runterregulation der Zielgene <i>Gal1</i> , <i>Sod1</i> und <i>Prdx1</i> mittels eingebrachter shRNA auf Proteinebene.....	114
Abb. 26: Nachweis von EV-Markern in verschiedenen EV-Präparaten.....	117
Abb. 27: EV-Behandlung hat keinen nachweisbaren Effekt auf das Überleben letal bestrahlter mHSCs.....	120

Abb. 28: Auch Zytokin-Zugabe bewirkt kein Überleben letal bestrahlter mHSCs nach EV-Behandlung.....	124
Abb. 29: Zu Chondroblasten, Osteoblasten und Adipozyten in vitro differenzierte mMSCs (+/- Zytokin-Zugabe).....	128
Abb. 30: Murine MSCs exprimieren in Sigma-FCS haltigem Medium mit Zytokin-Zugabe SCA-1 und CD44, aber kein CD73 und CD105. Sie sind jedoch weiterhin negativ für CD34, CD45, CD90.2, CD11b und MHCII.....	130
Abb. 31: Funktionale Gruppierung der in mMSC-EVs angereicherten oder reduzierten RNAs.....	133
Abb. 32: Morphologie der mMSCs unter Kultivierung mit Sigma-FCS.....	145
Abb. 33: Expression ausgewählter mMSC-Oberflächenantigene bei Verwendung verschiedener FCS.....	150
Abb. S1: Individuelles Gating der Isotypkontrollen.....	I
Abb. S2: Titration der lentiviralen Vektoren.....	II
Abb. S3: Sortierung hoch positiver mMSCs nach Transduktion.....	IV
Abb. S4: Elektrophoretisch aufgetrennte Kontroll-PCRs zur Verifizierung einer erfolgreichen cDNA-Synthese von transduzierten mMSC-Proben auf Agarosegelen (1,5 %).....	VI
Abb. S5: Zytokin-Zugabe beeinflusst nicht die erfolgreiche transkriptionale Runterregulation der Zielgene Gal1, Sod1 und Prdx1 mittels eingebrachter shRNA	VII
Abb. S6: Immundetektion der Runterregulation von GAL1, SOD1 und PRDX1 in Anwesenheit von Zytokinen in verschiedenen mMSC-Kulturen sowie in deren sezernierten EVs.....	VII
Abb. S7: Zytokin-Zusatz beeinflusst nicht die erfolgreiche Runterregulation der Zielgene Gal1, Sod1 und Prdx1 mittels eingebrachter shRNA auf Proteinebene.....	IX
Abb. S8: Messkurven von Nanopartikel Verfolgungsanalysen (NTA).....	X

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die drei Leitorgansystem-abhängigen Syndrome des akuten Strahlensyndroms.....	4
Tab. 2: Cis-aktive Elemente des Transgenvektors und ihre jeweilige Funktion.....	29
Tab. 3: Auflistung der Verbrauchsmaterialien.....	35
Tab. 4: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Substanzen mit Herstellerangabe und Artikelnummer.....	37
Tab. 5: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte.....	39
Tab. 6: Angabe zu verwendeten Softwares, Version und Hersteller.....	41
Tab. 7: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Kits mit Angabe des Herstellers.....	42
Tab. 8: Auflistung der kommerziell erworbenen sterilen Medien, Seren und Puffer für die in dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturarbeiten.....	44
Tab. 9: Zusammensetzung des verwendeten NIH/3T3- und 293T-Kultivierungsmediums.....	44
Tab. 10: Zusammensetzung des verwendeten mMSC-Kultivierungsmediums.....	44
Tab. 11: Zusammensetzung des Mediums, welches zur Ernte und Isolation von mMSCs produzierten EVs verwendet wurde.....	45
Tab. 12: Zusammensetzung des verwendeten MS5-Kultivierungsmediums.....	45
Tab. 13: Zusammensetzung des verwendeten mMSC- und MS5-Einfriermediums.....	45
Tab. 14: Zusammensetzung des verwendeten MNC-Isolationsmediums.....	45
Tab. 15: Zusammensetzung des verwendeten Methylcellulose Mediums pro Aliquot.....	45
Tab. 16: Auflistung der in der Zellkultur verwendeten Medienzusätze.....	46
Tab. 17: Kommerziell erworbene Helferplasmide für die Herstellung von lentiviralen Vektoren.....	46
Tab. 18: Transferplasmide zur Runterregulation von Zielgenen mittels integrierter shRNA.....	47
Tab. 19: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Primer.....	48
Tab. 20: Zusammensetzung des Basis-RIPA-Puffers.....	48
Tab. 21: Zusammensetzung des gebrauchsfertigen reduzierenden RIPA-Puffers.....	48
Tab. 22: Zusammensetzung eines Acrylamidgels mit 12 %-igem Trenn- und 3,85 %-igem Sammelgel.....	49
Tab. 23: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Blockierungslösungen und Fluoreszenzfarbstoffe in durchflusszytometrischen Analysen.....	50
Tab. 24: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper für durchflusszytometrische Analysen am BD FACS Canto II.....	51
Tab. 25: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Isotypkontrollen für durchflusszytometrische Analysen am BD FACS Canto II.....	51
Tab. 26: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper für ImageStream Analysen.....	51
Tab. 27: Auflistung der in dieser Arbeit für Western Blot Analysen verwendeten primären Antikörper.....	51

Tab. 28: Auflistung der in dieser Arbeit für Western Blot Analysen verwendeten sekundären Antikörper.....	52
Tab. 29: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper für Cytospins.....	52
Tab. 30: Auflistung des in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörpers für Cytospins.	52
Tab. 31: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Blockierungslösung und des Fluoreszenzfarbstoffes für Cytospins.....	52
Tab. 32: Auflistung der verwendeten Kultivierungsbedingungen von mMSCs.....	56
Tab. 33: Auflistung der verschiedenen in dieser Arbeit für EV-Ernten expandierten mMSCs.....	68
Tab. 34: Auflistung der verwendeten Kulturgefäße zur Kultivierung der MS5.....	75
Tab. 35: Auflistung der bei den Radioprotektionsassys verwendeten Vorkulturbedingungen.....	79
Tab. 36: Auflistung der verwendeten Versuchstiere für die ImageStream Analysen.....	84
Tab. 37: Auflistung der für die ImageStream Analysen verwendeten Anregungslaser und deren jeweilige Intensitätskonfiguration.....	86
Tab. 38: INSPIRE-generierte Kompensationsmatrix mit den berechneten Kompensationskoeffizienten für die ImageStream Analysen.....	87
Tab. 39: Verwendetes Messprogramm für quantitative Echtzeit PCRs im LightCycler 480 II bei Verwendung des TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) Kits.....	94
Tab. 40: Auflistung der in dieser Arbeit für Western Blot verwendeten Primärantikörper (1. AK) Verdünnungen und die dazugehörigen Sekundärantikörper (2. AK).....	98
Tab. 41: Gesamtanzahl an isolierten EVs pro Präparat.....	106
Tab. 42: Ergebnisse der Nanopartikel Verfolgungsanalyse (NTA) von aus unbehandelten und mit verschiedenen shRNAs transduzierten mMSC-Kultur isolierten EVs.....	115
Tab. 43: Zur Charakterisierung der mMSCs, kultiviert ohne Zytokin-Zugabe, wurden spezifische Oberflächenantigene gefärbt.....	131
Tab. S1: Nukleotidsequenzen der verwendeten shRNAs.....	I
Tab. S2: Auflistung der ermittelten Titer der produzierten infektiösen lentiviralen Partikel.....	II
Tab. S3: Einstellungsparameter des BD Aria Fusion in der FACS Sorting Core Unit des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für die Sortierung von transduzierten mMSCs.....	III
Tab. S4: Kompensationsmatrix für die Sortierung transduzierter mMSCs am BD Aria Fusion in der FACS Sorting Core Unit des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.....	III
Tab. S5: Auflistung der Werte zur Analyse transduzierter mMSCs auf hoch positive Zellen.....	V
Tab. S6: Auflistung der Anzahl an SCA-1- oder C-KIT-positiven Zellen sowie die Anzahl an PKH26-markierten mMSC-EVs in Kolokalisation mit diesen Zellen 2 oder 4 h nach Transplantation.....	IX
Tab. S7: Ergebnisse der Nanopartikel Verfolgungsanalyse (NTA) von EVs isoliert aus unter Anwesenheit von Zytokinen kultivierten unbehandelten oder mit verschiedenen shRNAs transduzierten mMSCs.....	XI

1. Einleitung

1.1. Ionisierende Strahlung

Alle Lebewesen sind täglich unterschiedlichster Strahlung ausgesetzt. Dabei ist Strahlung definiert als Energietransport oder Energieemission in Form einer elektromagnetischen Welle (Radiowellen, Mikrowellen, sichtbares Licht, Wärmestrahlung, UV-Strahlung, Gamma- und Röntgenstrahlung) oder eines Teilchenstroms (Elektronen-, Protonen-, Neutronen-, Meson-, α -, β -Strahlung und Strahlung von schweren Ionen). Die Strahlungen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Wellenlänge, ihres Energiegehalts sowie ihrer Durchdringungstiefe und biologischer Wirkung. Zu ihr gehört z.B. optische Strahlung wie die natürliche Sonnenstrahlung, welche verschieden auf Organismen wirkt. So wirken sich Licht und Wärme positiv auf das Leben aus, wohingegen die energiereiche UV-Strahlung der Sonne dafür bekannt ist Sonnenbrand und Krebs zu verursachen. Auch Radio- und Mikrowellen sowie Wechselstrom senden Strahlung ab, die uns täglich begleitet ohne uns einen Schaden zuzufügen. All diese eben aufgeführten Strahlenformen werden unter nicht-ionisierender Strahlung zusammengefasst. Demgegenüber steht die ionisierende Strahlung, wozu z.B. Gamma-, Röntgen-, Protonen-, α - und β -Strahlung gehören. Diese wird ausschließlich Thema im weiteren Verlauf sein, da sie die Grundlage für diese Arbeit bildet. Die ionisierende Strahlung ist im Gegensatz zur nicht-ionisierenden Strahlung so energiereich, dass diese beim Auftreffen auf Materie direkt oder indirekt die vorliegenden Atome oder Moleküle ionisiert sowie chemische Verbindungen aufbrechen kann. Die dadurch gebildeten Radikale können zu erheblichen Schäden in einem betroffenen Organismus führen (online Referenz 1, 6, 16; Obrador *et al.* 2020). Grundsätzlich ist jedoch jeder Organismus tagtäglich auf der Welt ionisierender Strahlung ausgesetzt, ohne dass dies schädliche Auswirkungen hat. Natürlich vorkommende ionisierende Strahlung entsteht beim radioaktiven Zerfall verschiedener radioaktiver Materialien. Man unterscheidet dabei äußere (terrestrisch und kosmische Strahlung auf Haut und Kleidung) und innere (Aufnahme von radioaktiven Stoffen mit Luft, Nahrung und Wasser) Strahlenexposition (Shahbazi-Gahrouei *et al.* 2013; Zakariya and Kahn 2014). In Deutschland beträgt die durchschnittliche jährliche Strahlenbelastung 2,1 Millisievert (mSv; 1 Sievert \triangleq 1 Joule absorbiertes Strahlenenergie pro kg humanen Gewebes), insgesamt schwankt sie jedoch je nach Wohnort, Ernährungs- und Lebensgewohnheiten zwischen 1 und 10 mSv. Neben der natürlichen Strahlenbelastung gibt es heutzutage zusätzlich zivilisatorische Expositionen durch technisch erzeugte Strahlung (online Referenz 2). Anzutreffen ist diese in Gesundheitssystem/Forschung (Röntgen, Radiologische Untersuchungen, Nuklearmedizin, Computertomographie) und in der Technik (nukleare Waffen und Reaktoren, nukleare Techniken in der Industrie). Die effektive Dosis dieser Belastung wird auf ca. 1,7 mSv pro Jahr geschätzt (online Referenz 2). Die ebenfalls in der Medizin angewandte Strahlentherapie ist hierbei nicht berücksichtigt, da in diesem Gebiet mit sehr unterschiedlichen und zugleich hohen Strahlendosen gearbeitet wird, die teilweise nur auf einzelne Gewebe/Organe gerichtet werden. All die damit verbundenen Parameter zu berücksichtigen ist enorm komplex und erschwert die Berechnung einer allgemein geltenden effektiven Strahlenexpositionsdosis für alle Bürger. Hinzu kommt, dass im Verhältnis zu allen Bürgern, nur sehr wenige von diesen eine solche Behandlung erhalten, weshalb insgesamt von einer Berechnung abgesehen wurde (Obrador *et al.* 2020).

Ob eine Strahlenexposition einen biologischen Effekt auswirkt und in welcher Stärke dieser in Form von Schädigung auftritt, hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab. So wie z.B. von der Art der Strahlung und deren Energiegehalt, der auf Materie pro Distanzeinheit trifft (linearer Energietransfer), der Expositionsdauer (einmalig in kurzer Zeit oder über längeren Zeitraum fraktioniert) und der effektiven Strahlendosis. Des Weiteren wird die Schwere des Schadens durch die Strahlenexposition nicht nur durch das Alter des Organismus beeinflusst, sondern auch durch den genetischen Hintergrund des Individuums, durch das betroffene Gewebe/Organ (unterschiedliche Radiosensitivitäten), durch vorhandene Reparaturmechanismen, dem Vorliegen von radioprotektiven Stoffen/Mitteln und durch Bystander-Effekte. Unter Bystander-Effekt versteht man in diesem Zusammenhang das Auftreten von strahleninduzierten Effekten in nicht direkt bestrahlten Zellen. Ausgelöst werden diese Effekte, indem nach Bestrahlung geschädigte Zellen durch Zell-Zell-Kontakte oder durch lösliche Faktoren wie z.B. Zytokine und reaktive Sauerstoffspezies einen Strahlenschaden in den benachbarten, nicht bestrahlten, Zellen auslösen oder bei diesen sogar die Apoptose induzieren (Lorimore *et al.* 2001; Prise *et al.* 2005; Obrador *et al.* 2020). Ionisierende Strahlung führt zur Schädigung der DNA in Form von Basenschäden, Einzel- (SSBs, engl.: *single-strand breaks*) und Doppelstrangbrüchen (DSBs, engl.: *double-strand breaks*) der DNA, DNA-DNA- und DNA-Protein-Quervernetzungen. Diese Schäden können direkt durch die Ionisierung der DNA entstehen oder indirekt, indem die Strahlung zuerst in der betroffenen Zelle freie Radikale entstehen lässt, welche im Weiteren für DNA-Schäden in derselben Zelle oder sogar den benachbarten Zellen (Bystander-Effekt) sorgt (Ward 1998; Prise *et al.* 2005; Dörr and Meineke 2011). Prinzipiell besitzen eukaryotische Zellen eine Vielzahl an verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen, die diese Strahlenschäden bis zu einem gewissen Grad beheben können, so dass kein nachweisbarer Effekt feststellbar ist. Trifft dieses nicht zu, wird zwischen stochastischen und deterministischen Schäden unterschieden. Stochastische Schäden sind meist unizelluläre Ereignisse, die zufällig ohne bekannten Strahlendosis-Schwellenwert Karzinome, Leukämien und genetische Schäden in der Keimbahn auslösen. Die Wahrscheinlichkeit für eine Krebserkrankung steigt jedoch durch fehlerhaft oder unzureichend reparierte strahlungsinduzierte DNA-Brüche in einzelnen Zellen mit der Strahlendosis um eine Rate von 5,5 % pro Sv linear (lineares No-Threshold-Modell, online Referenz 3 und 4). Bevor jedoch die Erkrankung induziert durch eine Strahlenexposition auftritt, können Jahre vergehen. Wird hingegen der Schwellenwert von 0,5 Sv (bei gesunden Erwachsenen) bzw. 50 bis 100 mSv (bei ungeborenem Kind) überschritten, ist eine vollständige Reparatur der Zellen in einem betroffenen Gewebe/Organ nicht mehr möglich. Bereits bei der Strahlendosis von 1 Gray (Gy; $1 \text{ Gy} \triangleq 1 \text{ Joule absorbiertes Strahlenenergie pro kg Materie}$) entstehen ca. 40 DSBs, 1000 SSBs und insgesamt 2500 – 3000 Basenschäden pro einzelner Zelle. Der Zelltod kann jedoch bereits durch einen einzelnen nicht reparierten DSBs eingeleitet werden. Ebenso können nicht vollständig oder falsch reparierte Schäden sowie Basenmodifikationen zu Mutationen führen und den Zelltod zur Folge haben. Bei niedrigen Strahlendosen wird der Zelltod meist in Form der Apoptose ausgeführt, wohingegen es bei weiterer Strahlendosiserhöhung und/oder massiven Schädigungen der bestrahlten Zellen sogar zu Nekrosen kommt (Lobrich *et al.*, 1995; Prise *et al.*, 2005; Ward, 1998; online Referenz 3). Im Gegensatz zu den stochastischen Schäden nimmt nach Überwindung des Schwellenwerts bei weiterer Erhöhung der Dosis die Schwere des Schadens zu, die Eintrittsdauer jedoch gleichzeitig ab. Solche Strahlenschäden werden als deterministisch bezeichnet, sie sind multizellulär (Gewebereaktion) und

werden in akute und späte Schäden unterteilt. Bei akuten Schäden kommt es bei Zellen/Geweben/Organen mit schnellen Proliferationsraten wie z.B. Knochenmark, Epidermis und Mukosa des Magen-Darm-Trakts oder hoher Radiosensitivität (z.B. kleine Lymphozyten) je nach effektiver Strahlendosis zu einem erheblichen Zellsterben durch Apoptose und/oder Nekrose sowie weiteren Mechanismen. Dies geschieht in einem Zeitraum von Tagen oder Wochen und führt folglich zum Verlust der Funktion des betroffenen Gewebes/Organ (McBride and Schaeue, 2020; online Referenz 3). Sowohl die Strahlung an sich als auch das durch diese induzierte Zellsterben stehen in Verbindung mit einer inflammatorischen Antwort in den betroffenen Geweben, welche zu einem lokalen Anstieg an pro-inflammatorischen Faktoren führt, die wiederum die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) unterstützen. Diese schädigen zusätzlich zu den durch die Strahlenexposition entstandenen Radikalen das betroffene Gewebe/Organ und können zu Bystander-Effekten führen (Lorimore *et al.* 2001; Bentzen 2006; McBride and Schaeue 2020). Eine dadurch entstehende andauernde Inflammation kann im weiteren Verlauf zu Fibrosen in betroffenen Geweben wie der Haut, subkutanen Geweben, dem Magen-Darm-Trakt, der Lunge oder dem urogenitalen System führen. Da sich dies erst 4-12 Monate nach Strahlenexposition zeigt, gehört die Fibrose zu den späten deterministischen Strahlenschäden, des Weiteren werden späte deterministische Strahlenschäden (Gefäß- und Gewebeveränderungen) vorwiegend in Geweben mit langsamer bis keiner Zellproliferationsrate (wie Leber, Nieren, Muskeln und zentrales Nervensystem) gefunden (McBride and Schaeue, 2020; Obrador *et al.*, 2020; Straub *et al.*, 2015; online Referenz 3).

1.1.1. Akutes Strahlensyndrom

Das akute Strahlensyndrom (ARS; engl.: *acute radiation syndrome*) zählt ebenfalls zu den deterministischen Schäden, da es erst ab hohen Strahlendosen (1 Gy, darunter meist symptomfrei) auftritt (online Referenz 7). Das ARS wird durch eine akute Ganzkörper- oder großvolumige Teilexposition mit energiereicher, penetrierender Strahlung (z.B. Gamma- oder Röntgenstrahlung) ausgelöst, wobei die hohe Strahlendosis innerhalb einer kurzen Zeitspanne (meist Minuten) vom Betroffenen absorbiert wurde. Insgesamt handelt es sich bei dem ARS um ein Multiorgangeschehen, wobei je nach Strahlendosis verschiedene Organe abhängig von ihrer Radiosensitivität unterschiedlich stark betroffen sind. Bedingt von dem Dosisbereich wird das allgemeine ARS noch in drei etwas spezifischere Syndrome unterteilt, die Aussage darüber geben, welches wichtigste Leitorgansystem in dem Strahlungsbereich hauptsächlich betroffen ist. Ab 1 Gy bis 6 Gy spricht man vom hämatopoetischen Syndrom, da das hämatopoetische System das radiosensitivste Organ ist. Das Absterben der Blutzellen wird ab 5 Gy bis ca. 20 Gy durch die Zerstörung der Magen-Darm-Schleimhaut überlagert (gastrointestinales Syndrom). Bei einer Strahlenexposition größer als 20 Gy spricht man vom zerebrovaskulären Syndrom, welches als Hauptmerkmal das Versagen der zentralnervösen Regulationsmechanismen aufweist (siehe Tab. 1). Parallel kann ab 3 Gy zu den eben beschriebenen Syndromen noch das kutane Strahlensyndrom auftreten, welches mit steigender Strahlendosis von Erythema, über Hautschuppung bis hin zu Nekrosen auftritt, jedoch im Weiteren nicht näher ausgeführt wird (Dörr and Meineke, 2011; online Referenz 6, 7 und 9).

Tab. 1: Übersicht über die drei Leitorgansystem-abhängigen Syndrome des akuten Strahlensyndroms. Zu jedem der drei Syndrome sind die wichtigsten Informationen zusammengefasst. Dazu zählt die Angabe, welches Organ oder Gewebe das Syndrom ausmacht, in welchen Strahlendosisbereich es auftritt sowie kurze Beschreibungen über die dazugehörige Prodromalphase, die latente asymptomatische Phase, die manifeste Erkrankung und die anschließende Erholungsphase. Zusätzlich sind prozentuale Angaben über die akute Mortalität mit oder ohne medizinische Versorgung sowie das Eintreten des Todes nach Strahlenexposition angegeben. Basierend auf online Referenz 5, 6, 7 und 9.

Syndrom	Hämatopoetisches (HPS)	Gastrointestinales (GIS)	Zerebrovaskuläres (ZVS)
Betroffene Organe/Gewebe	Knochenmark, Milz, Thymus	Magen-Darm-Schleimhaut	Zentrales Nervensystem, Herz
Dosis [Sv]	1 - 6	5 - 20	>20
Prodromalphase	Auftreten: 30 min bis 6 h nach Exposition Dauer: 24 bis 48 h Symptome: Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall und Speichelbildung	Auftreten: 15 min bis 2 h nach Exposition Dauer: bis zu 72 h Symptome: Speichelbildung, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerz, getrübbtes Bewusstsein	Auftreten: innerhalb von min nach Exposition Dauer: min bis h Symptome: Speichelbildung, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerz, getrübbtes Bewusstsein
Latente asymptomatische Phase	1 - 6 Wochen	3 - 5 Tage	eher keine
Manifeste Erkrankung	Myelosuppression (Panzytopenie), Appetitlosigkeit, Unwohlsein, Schwäche, Erschöpfung, Purpura, Blutungsneigung, Fieber und ab 3 Gy: Haarausfall, Radiodermatitis und Schleimhautgeschwüre	siehe HPS + massiver (blutiger) Durchfall, Schock, Infektionen, hohes Fieber, Orientierungslosigkeit, Elektrolytstörung	siehe GIS + Hirnödem, Krämpfe, Bewusstseinsverlust mit kardio-zirkulatorischem Schock, Ataxie, Versagen der zentralnervösen Regulationsmechanismen
Erholungsphase	Beginnt nach 2 Monaten; Dauer bis zu Jahren	Existiert nur im unteren Dosisbereich	Existiert nicht
akute Mortalität mit/ ohne medizinische Versorgung	Ohne: 0 - 100 % Mit: 0 - 50 %	Ohne: 95 - 100 % Mit: 50 - 100 %	Ohne: 100 % Mit: 100 %
Eintreten des Todes nach Strahlenexposition	4 - 8 Wochen	2 Tage - 4 Wochen	Stunden bis 2 Tage

Die unterschiedlichen Syndrome setzen sich aus den folgenden vier Phasen zusammen: Der Prodromalphase, in der die ersten diffusen Symptome wie z.B. Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Fieber auftreten können. Auch hier gilt, dass mit steigender Strahlendosis die Auswirkungsschwere zunimmt und die Zeitspanne bis die ersten Symptome auftreten abnimmt. Es folgt die latente Phase, in der die Patienten entweder komplett symptomfrei sind oder zumindest die Symptome stark abgenommen haben. Auch diese Phase verkürzt sich deutlich mit steigender Strahlendosis. In der dritten Phase manifestiert sich die Krankheit mit dem Auftreten von spezifischeren Symptomen für das jeweils vorliegende Syndrom. Und zuletzt folgt die Erholungsphase. Diese dauert je schwerer die Krankheit ausfällt umso länger. Gleichzeitig sinkt mit längeren Erholungsphasen auch die Überlebenschance des Patienten drastisch (Fliedner *et al.* 2001; Hall and Giaccia 2006). Ab einer akuten Strahlenbelastung von über 10 Gy ist selbst bei sofortiger und optimaler medizinischer Versorgung ein Überleben fast vollständig ausgeschlossen. Ohne medizinische Versorgung tritt jedoch bereits ab 7 Gy in 100 % der Fälle der Tod ein. Bei 4 Gy sterben ohne medizinische Behandlung 50 % der exponierten Menschen, wohingegen 1 Sv auch ohne medizinische Betreuung selten zum Tode führt (online Referenz 7 und 8).

Solch gravierende Strahlenunfälle mit einem ARS kommen nur äußerst selten vor, betreffen jedoch bei Auftreten meist viele Menschen wie beispielsweise der Reaktorunfall in Tschernobyl 1986 oder die Atombomben auf Hiroshima und Nagasaki eindrucksvoll zeigten. Demzufolge ist es von größerer Wichtigkeit, dass für den Notfall ein adäquater Behandlungsplan für die geschädigten Personen existiert sowie eine schnelle Versorgung gewährleistet werden kann (Dörr and Meineke 2011). Allerdings gibt es wie bereits erwähnt ab einer in kurzer Zeit erfolgten Ganzkörperbestrahlung von 10 Gy selbst bei sofortiger optimaler Klinikversorgung kaum eine Überlebenschance für Patienten. Dementsprechend

werden ZVS und GIS im Dosisbereich über 10 Gy nur palliativ behandelt. Bei GIS im unteren Dosisbereich wird hingegen zumindest der Flüssigkeitsverlust mit aggressiver Volumen- und Elektrolytsubstitution behandelt, wohingegen zur Unterstützung der geschädigten Magen-Darm-Schleimhaut keine aktive Behandlung existiert (online Referenz 6). Anders verhält es sich bei dem HPS. Zur Verhinderung von Infektionen, werden in erster Linie - antibiotische, antivirale und antimykotische Medikamenten verabreicht. Des Weiteren werden Antioxidantien, Zytokine und Wachstumsfaktoren eingesetzt, um freie Radikale abzufangen und bei stark geschädigtem hämatopoetischen System kolonie-stimulierende Faktoren sowie Bluttransfusionen verabreicht, und/oder Stammzelltransplantationen vorgenommen (Dainiak, 2010; Waselenko *et al.*, 2004, online Referenz 9), welche direkt die geschädigten HSCs/HPCs unterstützen oder sie gleich komplett durch neue funktionsfähige Zellen ersetzen, um die Hämatopoese wieder herzustellen.

1.1.2. Radiotherapie

Die Radiotherapie ist eine von drei Säulen der modernen Krebstherapie. Die beiden weiteren Therapieformen sind die Chemotherapie und Operationen. Alle drei Therapieformen können, je nachdem welche eine Tumorerkrankung behandelt werden muss, alleine oder kombiniert angewendet werden, so dass der bestmögliche Ausgang erzielt werden kann (online Referenz 10). Insgesamt bekommen ca. 50 % aller Krebspatienten im Laufe ihrer Behandlung eine Radiotherapie (Ringborg *et al.* 2003; Delaney *et al.* 2005; Barton *et al.* 2014). Bei der Radiotherapie wird gezielt das maligne Gewebe mit hochenergetischer ionisierender Strahlung zerstört. Ausgenutzt wird hierbei die DNA-zerstörende Wirkung der Strahlung und der Fakt, dass Tumorzellen häufig nur noch einen eingeschränkt funktionsfähigen Reparaturmechanismus besitzen, so dass sie nach der Bestrahlung in den Zelltod übergehen (Barnett *et al.* 2009; Jackson and Bartek 2009). Wichtig ist, dass zuvor das Zielvolumen (Tumor und sein Ausbreitungsgebiet) genau definiert wird, um es anschließend mit einer idealen Dosisverteilung zu behandeln, so dass das umliegende gesunde Gewebe/Organe nicht unnötig der schädigenden Strahlung ausgesetzt wird. Die ideale Strahlendosis ist so hoch wie nötig, um möglichst alle Tumorzellen zu eliminieren, aber gleichzeitig auch so niedrig wie möglich, um die Strahlentoxizität im gesunden Gewebe/Organ minimal zu halten. Demzufolge wird diese für jeden Patienten anhand verschiedener Faktoren wie der Strahlensensitivität des/der umliegenden Gewebes/Organe, dem Volumeneffekt, der vorliegenden Krebsart und weiteren individuellen Eigenschaften ausgewählt (Barnett *et al.*, 2009; Baskar *et al.*, 2012; online Referenz 10). Zur Eradikation solider Tumore werden Patienten normalerweise mit einer Gesamtstrahlendosis von 40 bis 70 Gy fraktioniert bestrahlt (online Referenz 11). Bei einer Fraktionierung wird die Gesamtdosis in viele kleine Einzeldosen von 1,5 bis 3 Gy über längeren Zeitraum aufgeteilt verabreicht. Dies ermöglicht dem Normalgewebe ausreichende Erholungsphasen zur Reparatur von Schäden und reduziert die Nebenwirkungen drastisch (Baskar *et al.* 2012). Bei malignen hämatopoetischen Erkrankungen wie Leukämien wird hingegen eine Ganzkörperbestrahlung im Rahmen der Konditionierung vorgenommen. Aufgrund der hohen Radiosensitivität von myeloiden und lymphatischen Zellen sind hierbei die benötigten Strahlendosen erheblich geringer. Myeloablative Behandlungen erfolgen entweder als Einzeldosis ab 2 Gy oder fraktioniert bis zu einer Gesamtdosis von 15 Gy (Song *et al.* 1981; Sauer 2010; Pearlman *et al.* 2021). Bei einer Konditionierung werden somit nicht nur weitestgehend alle malignen Zellen eradiziert, sondern

gleichzeitig auch noch die verbleibenden gesunden Knochenmarkszellen. So entsteht Platz für gesunde Zellen, die nach einer allograften Knochenmark- (KM-TX) oder Stammzelltransplantation (SC-TX) das Knochenmark des Patienten repopulieren und ohne die eine solche Behandlung letal wäre. Darüber hinaus erzeugt die Konditionierung eine Immuntoleranz im Patienten, so dass die transplantierten HSCs des Spenders, sowohl anwachsen als auch regenerieren können und ein primäres Transplantatversagen verhindert wird (Leiper, 1995; online Referenz 12).

Die Nebenwirkungen, die bei einer der Radiotherapie auftreten können, werden in frühe (akute) und späte Effekte unterteilt wie in Abb. 1 dargestellt. Frühe Nebenwirkungen treten bereits während oder kurz nach der Behandlung auf, betreffen schnell proliferierende Zellen wie epitheliale Haut- oder Darmzellen sowie das hämatopoetische System und sind meist reversibel. Ausnahme davon stellt jedoch z.B. die Myelosuppression dar, welche ab einem gewissen Grad irreversibel ist und im weiteren Verlauf dieser Arbeit noch ausführlicher thematisiert wird (siehe Kapitel 1.1.2.1). Späte Nebenwirkungen hingegen manifestieren sich erst 6 Monate oder sogar Jahre nach der Behandlung. Betroffen sind vor allem langsam proliferierende Gewebe wie das Herz und das zentrale Nervensystem. Die Schäden sind in den meisten Fällen irreversibel (Barnett *et al.* 2009; Majeed and Gupta 2021). Allerdings lassen sich einige Spätfolgen zumindest symptomatisch therapieren wie z.B. der Katarakt oder eine Schilddrüsenunterfunktion (Leiper 1995; Thomas *et al.* 2001).

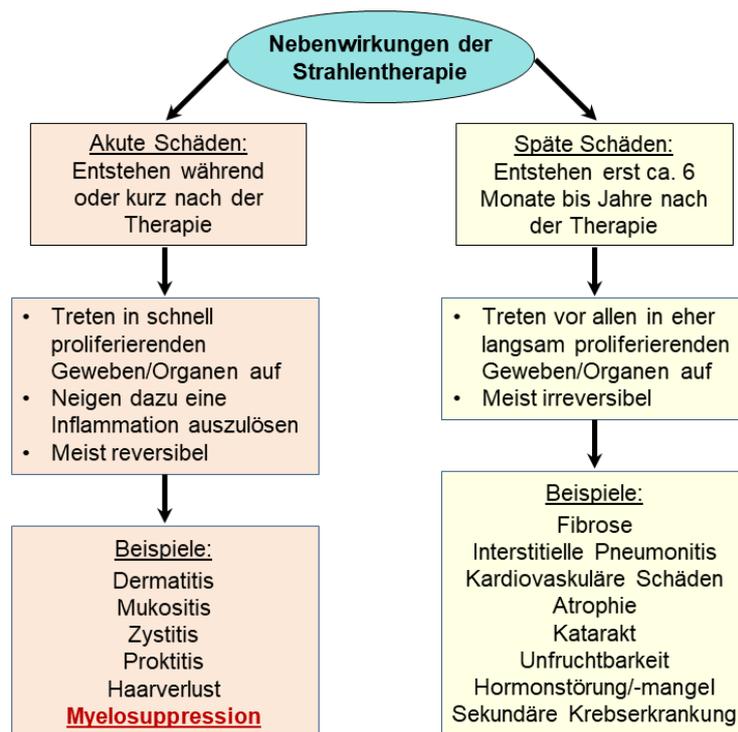


Abb. 1: Schematischer Überblick über mögliche Nebenwirkungen bei einer Strahlentherapie. Eingeteilt sind diese in akute und späte Schäden mit Erläuterung zum zeitlichen Auftreten, welche Gewebe hauptanteilig betroffen sind und ob sie reversibel oder irreversibel sind. Für beide Schadensformen sind einige typische Beispiele genannt. Erstellt wurde die Abb. nach Informationen aus Barnett *et al.*, 2009; Leiper, 1995; Pearlman *et al.*, 2021.

1.1.2.1. Myelosuppression

Myelosuppression, auch bekannt als Knochenmarkshemmung, wird die Schädigung des Knochenmarks bezeichnet, wodurch die Hämatopoese je nach Schwere nur beeinträchtigt oder vollständig ausgefallen ist. In allen Fällen wird jedoch immer eine Panzytopenie auslöst (Bohlius and Hallek, 2010; online

Referenz 13). Als endogene Ursache für eine Myelosuppression sind unter anderem Knochenmarkskarzinosen bekannt und als exogene z.B. virale Erkrankungen, Strahlenunfälle, Radio- und Chemotherapien (online Referenz 13). Da die beiden genannten Anti-Krebs Therapien auf schnell proliferierende Zellen ausgerichtet sind, werden davon nicht nur Tumorzellen eradiziert, sondern auch blutbildende Zellen, wodurch die Myelosuppression als eine der häufigsten Nebenwirkungen bei den Behandlungen auftritt (Gordon 2001; Wang *et al.* 2006). Auf Grund einer verringerten Sauerstofftransportkapazität bei einer Anämie klagen betroffene Personen unter anderen über Abgeschlagenheit, Müdigkeit und Schwindel. Die Leukopenie/Neutropenie zeigt sich durch gehäufte Infektionen und durch eine Thrombozytopenie erhöht sich die Blutungsneigung was sich unter anderem durch schwer stillbare Wunden, verstärkte Menstruation und Nasenbluten erkennen lässt (online Referenz 13). Die Behandlung einer Myelosuppression ist abhängig von dem Schädigungsgrad des Knochenmarks, wobei ein frühes Erkennen immer hilfreich ist. Eine leichte Form, in der die Zellzahl erst nach frühestens einer Woche sinkt, kann sogar ohne weitere Unterstützung von selber nach einigen Wochen reversibel sein. Bei schweren Verläufen wird für den Fall, dass medizinische Behandlung o.ä. ursächlich dafür ist, diese erst einmal ausgesetzt und/oder Medikamente zur Unterstützung der Blutbildung wie Erythropoetin und Kolonie-stimulierende Faktoren verabreicht. Des Weiteren kann eine Erythrozytenspende angebracht sein (Patchen *et al.* 1990; Maxwell and Maher 1992; Bustin *et al.* 2009; Bohlius and Hallek 2010). Sollte jedoch eine myeloablative Schädigung vorliegen, ist eine Knochenmark- oder Stammzellspende unumgänglich, da eine Reversibilität des Zustands ausgeschlossen ist (online Referenz 13). In Bezug auf ionisierende Strahlung ist bekannt, dass akute und transiente Myelosuppressionen durch eine moderate Ganzkörperbestrahlung (TBI; engl.: *total body irradiation*) von $> 3,5$ Gy ausgelöst werden. Durch diese Strahlendosis werden nicht nur Lymphozyten, die die höchste Radiosensitivität (D_0 von 0,2 - 0,3 Gy) aufweisen, geschädigt, sondern auch die schnell proliferierenden hämatopoetischen Progenitoren mit einer Radiosensitivität von D_0 0,86 bis 2,4 Gy. Über einer TBI von 3,5 Gy werden nun auch die hämatopoetischen Stammzellen (HSCs; D_0 von 0,95 Gy) schwer geschädigt, was zu einer anhaltenden Myelosuppression bis hin zum Tode führen kann (Dainiak 2002; Shao *et al.* 2014).

1.2. Hämatopoese

Pro Tag müssen mehr als 10^{11} neue Blutzellen gebildet werden, um ein homöostatisches Gleichgewicht zu erhalten, da neutrophile Granulozyten nur durchschnittlich 7 Std überleben, Thrombozyten ein Überleben von 7-10 Tagen aufweisen und Erythrozyten nach 120 Tagen in die Apoptose übergehen. Ebenso muss der Organismus auf Infektionen, Blutungen oder Ähnliches schnell reagieren und den für die jeweilige Situation benötigten Zelltyp nachproduzieren (Mauch *et al.* 1995; Gordon 2001; Catlin *et al.* 2011; Hoggatt and Pelus 2013). Der Ursprung all dieser hämatopoetischer Zellen liegt im Knochenmark: Genauer gesagt in der *Substantia Spongiosa*, wo sich die hämatopoetischen Stammzellen (HSCs, engl.: *hematopoietic stem cells*) in der sogenannten hämatopoetische Stammzellnische befinden. Das Überleben, der Ruhezustand, die Selbsterneuerung, die Proliferation und die Differenzierung der HSCs in der Nische wird durch ein entsprechendes Mikromilieu gewährleistet, welches sich aus zellulären Komponenten wie Osteoblasten und -klasten, mesenchymalen Stromazellen, Adipozyten, Makrophagen und Endothelzellen feiner Blutgefäße sowie

extrazellulärer Matrix und Zytokinen als nicht zelluläre Komponenten zusammensetzt (Celso and Scadden 2011; Aggarwal *et al.* 2012). Die Zusammensetzung bezüglich der Komponenten ist je nach Lage im Knochenmark (KM) verschieden. Auf dieser Grundlage werden zwei Nischen mit unterschiedlichen Milieus differenziert (Orkin and Zon 2008). Die endostale Nische liegt an der Bindegewebsschicht, welche das Innere des Knochens auskleidet. Bereits Lord *et al.* erkannten 1975, dass in diesem Bereich im Vergleich zur Knochenmitte die Anzahl an HSCs deutlich höher ist (Lord *et al.* 1975). Die Nische wird definiert durch Osteoblasten und einem hypoxischem Umfeld, welche vor allem den Ruhezustand (Quieszenz) der HSCs unterstützen (Yoshihara *et al.* 2007; Anthony and Link 2014). 2005 wurde hingegen gezeigt, dass 60 % der knochenmarkstämmigen HSCs an die Sinusoide (Blutkapillarwänden) im KM angrenzen, welches die vaskuläre Nische darstellt (Kiel *et al.* 2005). HSCs, die in dieser Nische lokalisiert sind, befinden sich vorwiegend in ihrer aktiven Phase und sind mit Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung beschäftigt. Auf Grund der kurzen Distanz zum Blutkreislauf wird angenommen, dass entsprechende Signale schnell die HSCs erreichen und diese innerhalb weniger Minuten mit Proliferation und Differenzierung oder dem Auswandern in den Blutkreislauf reagieren können (Kiel and Morrison 2008; Chotinantakul and Leeansaksiri 2012; Pilo and Angelucci 2018). Welche Nische jedoch tatsächlich wann und wie zur Unterstützung der HSCs dient, wird weiterhin sehr kontrovers gesehen (Anthony and Link 2014; Shao *et al.* 2014). Ebenso wird auch heutzutage noch dran geforscht, welche Zellen und Faktoren genau und in welcher Weise bei dem Erhalt der HSCs beteiligt sind (Kiel and Morrison 2006). Bekannt ist jedoch, dass die Hämatopoese in den Nischen als stufenweiser Prozess stattfindet. Im klassischen Modell beginnt die Blutbildung mit einer vorwiegend ruhenden primitiven, pluripotenten, langzeit-repopulierenden hämatopoetischen Stammzelle (LT-HSC, engl.: *long-term repopulating-hematopoietic stem cell*), die ein lebenslanges Selbsterneuerungs- und *multi-lineage* Differenzierungspotential (Befähigung sämtliche Blutzellen der myeloiden und lymphoiden Linie zu bilden) besitzt. Aus den LT-HSCs entwickeln sich sogenannte pluripotente, kurzzeit-repopulierende hämatopoetische Stammzellen (ST-HSCs, engl.: *short-term repopulating-hematopoietic stem cells*). Diese können im Vergleich zu den LT-HSCs nicht mehr ein ganzes Leben lang, sondern nur noch ca. 6 Wochen das gesamte Blutsystem wiederherstellen. Demzufolge sind sie zwar immer noch als pluripotent und *multi-lineage* differenzierungsfähig, besitzen jedoch nur eine eingeschränkte Selbsterneuerung (Bellantuono 2004; Mosaad 2014). Die ST-HSCs differenzieren entweder in ihrer Lebenszeit weiter in multipotente Vorläuferzellen (MMPs) oder versterben durch Apoptose. Die Selbsterneuerungsfähigkeiten der MMPs ist zwar vollständig verloren, jedoch sind sie weiterhin zur *multi-lineage* Differenzierung befähigt. So können MMPs entweder in oligopotente gemeine myeloide Vorläuferzellen (CMPs, engl.: *common myeloid progenitors*) oder oligopotente gemeine lymphoide Vorläuferzellen (CLPs, engl.: *common lymphoid progenitors*) differenzieren. Ab diesem Differenzierungsschritt geht die Multipotenz der Zellen verloren was bedeutet, dass die oligopotenten Vorläuferzellen nicht mehr das gesamte blutbildende System wiederherstellen können, sondern darauf determiniert sind nur noch Blutzellen der myeloiden (CMP) oder der lymphoiden (CLP) Reihe bilden zu können (Giebel and Punzel 2008; Chotinantakul and Leeansaksiri 2012). Aus CLPs gehen über entsprechend auf einen Zelltyp determinierte Vorläuferzellen (Pro-Zellen) T-, B- und NK-Zellen hervor (Kondo *et al.* 1997). Im Rahmen der Lymphopoese finden nur die Reifungen der naiven B- und NK-Zellen noch im Knochenmark statt, so dass erst die reifen Zellen ins Blut abgegeben

werden. Bei der Thymopoese hingegen wandern die Pro-T-Zellen (Vorläuferzellen) bereits aus dem Knochenmark über die Blutbahn in den Thymus ein, um dort in naive T-Zellen weiter zu differenzieren (Murphy *et al.* 2009). Die Verfolgung der myeloiden-erythroiden Abstammungslinie hingegen erfolgt ausschließlich im Knochenmark. Die CMPs differenzieren dabei zum einen weiter zu Megakaryozyten/Erythrozyten Vorläufern (MEPs, engl.: *megakaryocyte/erythroid progenitors*) aus denen schlussendlich reife Erythrozyten und Megakaryozyten entstehen. Über anschließende Abschnürungen der Megakaryozyten werden schlussendlich mehrere tausende Thrombozyten gebildet. Zum anderen können sich CMPs auch zu Granulozyten/Makrophagen Vorläufern (GMPs, engl.: *granulocyte/macrophage progenitors*) weiterentwickeln, die zu allen drei Granulozyten Varianten (neutrophil, eosinophil und basophil) sowie Monozyten/Makrophagen weiter heranreifen (Akashi *et al.* 2000). Interessanterweise können sowohl aus den CMPs, als auch aus den CLPs Dendritische Zellen entstehen (Manz *et al.* 2001). Der gesamte hierarchische Hämatopoesevorgang ist zusammenfassend in Abb. 2 dargestellt. In wie weit dieses eher klassische Modell den tatsächlichen Ablauf widerspiegelt, ist umstritten. Auf Basis diverser Studien liegt mittlerweile eine Vielzahl an verschiedenen schematischen Abläufen für die Hämatopoese vor (Laiosa *et al.* 2006).

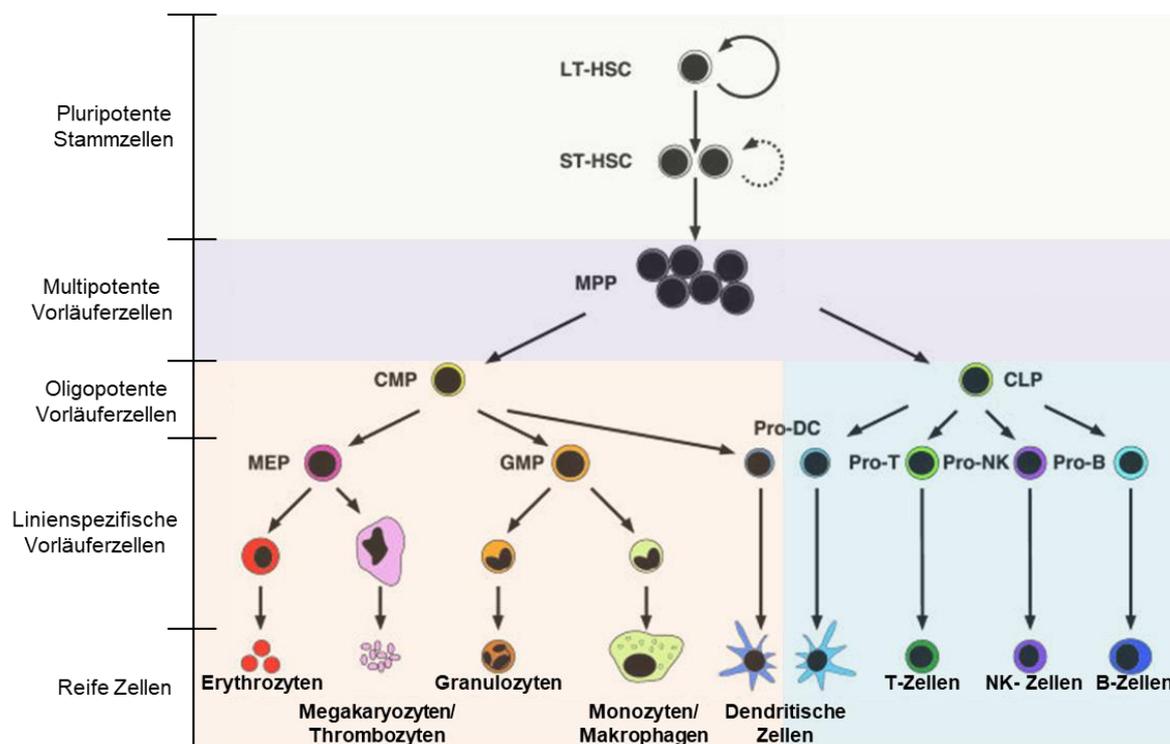


Abb. 2: Klassische schematische Darstellung der hierarchisch organisierten Hämatopoese. Die Hämatopoese ist ein geordneter und streng regulierter Prozess, der hauptsächlich im Knochenmark abläuft. So können externe Signale z.B. dazu führen, dass aus einer *long-term* hämatopoetischen Stammzelle (LT-HSC), eine *short-term* hämatopoetische Stammzelle (ST-HSC) wird, die wiederum weiter zu einer multipotenten Progenitorzelle (MPP) differenziert. MPPs entwickeln sich anschließend entweder in eine gemeinsame myeloische (CMP) oder gemeinsame lymphatische Vorläuferzelle (CLP) weiter. Entsprechend der lymphatischen Reihe differenzieren die CLPs über eine auf die jeweils reife Zelle determinierte Vorläuferzelle (Pro-Zelle) zu T-, B-, NK- und Dendritischen Zellen. Die CMPs hingegen entwickeln sich entsprechend der myeloiden Abstammungslinie zu Megakaryozyten/Erythrozyten Vorläufer (MEP), Granulozyten/Makrophagen Vorläufer (GMP) oder Dendritischen Vorläufer (Pro-DC) weiter. Ausgehen von den Vorläufern entstehen schlussendlich Erythrozyten, Granulozyten, Makrophagen/Monozyten, Dendritische Zellen und Megakaryozyten. Wobei aus letzteren über Abschnürungen anschließend noch Thrombozyten werden.

Übernommen und modifiziert nach Passetgué *et al.*, © 2003 mit Erlaubnis von Prof. Dr. I. Weismann.

1.3. Mesenchymale Stromazellen

Bereits in den 1960er und 70er Jahren haben Friedstein und Kollegen bei Transplantationsversuchen von murinen Knochenmarkszellen neben den hämatopoetischen Zellen noch weitere Zellen gefunden. Diese wiesen *in vitro* ein Fibroblasten-ähnliches Erscheinungsbild auf sowie die Fähigkeit *in vivo* Knochen-, Knorpel-, Fett- und Sehngewebe zu bilden. Zu dem damaligen Zeitpunkt wurden diese Zellen als osteogene Stammzellen oder Knochenmarksstroma-Stammzellen bezeichnet (Friedenstein *et al.* 1990). Einige Zeit später setzte sich jedoch die Bezeichnung mesenchymale Stammzelle (MSC) durch (Caplan 1991). Ebenso wie die Theorie, dass diese Zellen eine enorme Multipotenz aufweisen und nicht nur in Knochen, Fett, Knorpel und Sehnen differenzieren können, sondern nur um einige Beispiele zu nennen auch in Herzmuskel (Makino *et al.* 1999; Fukuda 2001) und neuronales Gewebe (Kopen *et al.*, 1999; Mezey and Chandross, 2000; Woodbury *et al.*, 2000). Bis heute ist diese umfangreiche Differenzierbarkeit stark umstritten und wird eher auf eine spontane Fusion von MSCs mit anderen Zellen zurückgeführt, wodurch der entsprechende Phänotyp übernommen wurde (Terada *et al.* 2002). Trotz alledem wurde das biologische und therapeutische Interesse an diesen „neu“ entdeckten Zellen immer größer. Dies führte dazu, dass die Zellen nicht nur aus verschiedenen Ausgangsgeweben wie z.B. Knochenmark, Fettgewebe oder Nabelschnurblut isoliert werden, sondern auch eine Heterogenität bei der anschließenden Kultivierung existiert. Aufgrund dieser unterschiedlichen Isolations- und Kultivierungsbedingungen sind die zu dieser Zeit generierten Ergebnisse nicht direkt miteinander vergleichbar. Darüber hinaus wird die Vergleichbarkeit durch das Fehlen definierter molekularer und zellulärer Marker zur Beschreibung der vorliegenden Zellpopulation erschwert (Wagner and Ho 2007). Aus diesem Grund hatte es sich die Internationale Gesellschaft für Zelltherapie zur Aufgabe gemacht eine Vereinheitlichung zu schaffen, was bereits bei der Namensgebung mit dem Vorschlag begann die Zellen als mesenchymale Stromazellen (MSCs) anstatt Stammzellen zu bezeichnen (Horwitz *et al.* 2005). Des Weiteren sollten diese Zellen als minimalste Anforderung folgende drei Kriterien erfüllen (Dominici *et al.* 2006):

1. Bei Verwendung von Zellkulturflaschen unter Standard-Kulturbedingungen müssen die Fibroblasten-ähnlichen spindelförmigen MSCs eine Plastikadhärenz aufweisen.
2. Der Phänotyp sollte mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt werden, wobei mehr als 95 % der Zellen die Oberflächenantigene CD105, CD73 und CD90 exprimiert haben sollten. Zusätzlich wird gefordert zu beweisen, dass die Zellen keine hämatopoetischen oder epithelialen Oberflächenmarker aufweisen, indem der dafür positiv gemessene Anteil unter 2 % liegt. Angebrachte Kombinationen dafür sind CD45, CD34, CD14 oder CD11b mit CD79α oder CD19 und HLA Klasse II.
3. MSCs müssen *in vitro* eine multipotente Differenzierbarkeit in Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten besitzen, welche es durch geeignete Färbungen nachzuweisen gilt.

Allerdings reichen auch diese festgelegten Kriterien bei weiten noch nicht für eine eindeutige Bestimmung von MSCs bzw. dem vollständigen Ausschluss anderer Zellen aus. Außerdem beziehen sich die Kriterien lediglich auf humane MSCs und lassen andere Spezies vollkommen außen vor (Lindner *et al.* 2010). So können zwar Punkt 1 und 3 ebenfalls z.B. für murine MSCs übernommen werden, jedoch nicht der Phänotyp in Form von An- und Abwesenheit der Oberflächenantigene.

1.3.1. Biologische Funktion der MSCs

Wie bereits in Kapitel 1.2 erwähnt, sind MSCs im Knochenmark Bestandteil der hämatopoetischen Nische. Ihnen wird dort eine wichtige Rolle zugesprochen, da sie unter anderem in Osteoblasten differenzieren, welche zum einen für die Knochenregeneration wesentlich sind und zum anderen auch einen essentiellen Bestandteil der endostalen Nische darstellen. Die direkte Beteiligung der Osteoblasten bzw. osteoabstammender Zellen am Support der hämatopoetischen Stamm-/Progenitorzellen (HSCs/HPCs) ist allerdings umstritten (Kfoury and Scadden 2015; Asada *et al.* 2017). Hingegen sind reine MSCs anerkannte und maßgebliche Bestandteile der Nische, da sie einen großen Anteil an den wichtigen Nischen-Faktoren wie CXCL12 und SCF sezernieren. Beide genannten Faktoren unterstützen beispielsweise die Homöostase von HSPCs (Wei and Frenette 2018). Mendez-Ferrer und Kollegen entdeckten Nestin-positive MSCs, welche besonders viel CXCL12 exprimieren und in räumlicher Nähe zu HSCs an den Blutgefäßen liegen. Eine Beseitigung dieser MSCs führte zur Depletion der HSCs, was ihre Wichtigkeit in der Nische für den Erhalt der Hämatopoese zeigte (Méndez-Ferrer *et al.* 2010; Crippa and Bernardo 2018).

Allgemein wurde bei Transplantationsversuchen von MSCs entdeckt, dass die beobachteten Wirksamkeiten auf parakrine Effekte zurück zu führen sind. Die Zellen selber können meist nur über ca. 48 h nachgewiesen werden und sezernieren in der Zeit biologisch aktive Zytokine, Wachstumsfaktoren und Chemokine als Effektormoleküle sowie extrazelluläre Vesikel (EVs). So können MSCs durch Produktion von anti-apoptotischen Proteinen wie Survivin und BCL-2 die Apoptose inhibieren und die Gewebemöostase wieder herstellen (Okazaki *et al.* 2008). Hohe Expressionslevel von VEGF, FGF-2, HGF und Angiopoetin-1, welche in MSCs detektiert wurden, unterstützen hingegen die Angiogenese und verbessern dadurch die Vaskularisation von Geweben, was die Gewebeheilung insbesondere nach Ischämien begünstigt (Cunha *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2012). Ebenfalls bekannt sind die immunmodulierenden Eigenschaften von MSCs, sowohl auf das angeborene als auch das adaptive Immunsystem. Durch die Sekretion von immunsuppressiven Molekülen wie TGF- β und PGE-2 von anwesenden MSCs werden natürliche Killerzellen, ebenso wie aktive Antigen-spezifische T-Zellen, in ihrer Proliferation und Zytotoxizität inhibiert. Zusätzlich begünstigen MSCs die Bildung von immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen (Treg), was ebenfalls zur Abschwächung der Immunantwort beiträgt. Sowohl durch direkten Zell-Zell Kontakt, als auch durch die parakrinen Effekte werden B-Zellen von MSCs beeinflusst. Auch diese Zellen werden in ihrer Proliferation inhibiert, die Bildung von Plasmablasten reduziert, dafür jedoch die Bildung immunsupprimierender regulatorischer B-Zellen (Breg) gefördert, die wiederum eine Immuntoleranz und die Induktion von Treg bewirken. Allerdings gibt es im Gegensatz zu der anti-inflammatorischen Wirkung auch Hinweise darauf, dass mangelhafte oder z.B. pathogen-assoziierte inflammatorische Signale MSCs dazu bringen, anstatt einer supprimierenden Wirkung, einen aktivierenden Effekt auf T- und B-Zellen auszuüben (Wu *et al.* 2020). Pro-inflammatorische M1 Makrophagen werden in einem stark inflammatorischen Umfeld von MSCs dabei unterstützt in den anti-inflammatorischen M2 Phänotyp überzugehen, was die Phagozytoseaktivität begünstigt, die Inflammation reduziert und somit einen Heilungsprozess unterstützt (Li *et al.* 2013; Melief *et al.* 2013). Reis *et al.* zeigte, dass mit mikro RNAs angereicherte von MSCs sezernierte extrazelluläre Vesikel für die Blockierung der Reifung dendritischer Zellen sowie der

Beeinträchtigung der Antigenaufnahme mitverantwortlich sind, was auch hier wieder einen immunsupprimierenden und anti-inflammatorischen Zustand unterstützt (Reis *et al.* 2018).

1.3.2. Therapeutische Anwendung von MSCs

Auf Grund des multipotenten Differenzierungspotentials der MSCs in verschiedene mesenchymale Gewebe, sind die Zellen für die Gewebezüchtung von besonderer Bedeutung. Des Weiteren besteht ein Interesse an ihnen für die regenerative Medizin. Dieses wird ausgelöst durch die immunregulatorischen und regenerativen Eigenschaften der MSCs, welche größtenteils durch das Sezernieren von einem breiten Spektrum an parakrin-wirkenden bioaktiven Molekülen und EVs gewährleistet werden (Caplan 2007). Zusätzlich zu der allgemeinen immunsupprimierenden Wirkung von MSCs auf Lymphozyten, liegt in humanen MSCs Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC; engl.: *Major Histocompatibility Complex*) Typ II nur cytosolisch und MHCI nur in geringer Anzahl auf der Zelloberfläche ohne weitere co-stimulierenden Moleküle vor, wodurch eine Immunantwort bei dem Zusammentreffen mit allogenen Lymphozyten ausbleibt. Unter Anwesenheit des immunstimulierenden Zytokins IFN- γ werden humane MHCII Moleküle auf die Zelloberfläche gebracht, die jedoch keine T-Zellantwort auslösen. Demzufolge sind MSCs von Natur aus nicht immunogen und können sogar als universale Zelle auch bei einer nicht vorhandenen Übereinstimmung der MHCI Oberflächenmarker für jeden Patienten verwendet werden (Le Blanc *et al.* 2003; Tse *et al.* 2003; Haddad 2011). Folglich ist es nicht verwunderlich, dass die Anzahl an klinischen Studien zur Behandlung verschiedenster Erkrankungen mit MSCs immer weiterwächst. Im Folgenden werden einige davon beispielhaft genannt.

Spender-gegen-Wirt-Krankheit (GvHD, engl.: *Graft-versus-Host-Disease*), die eine möglicherweise tödlich endende systemisch vorliegende zytotoxische Reaktion darstellt, bei der die Spender T-Zellen der KM-TX den Empfänger als feindlich erkennen und bekämpfen, betrifft ca. 50 % der Patienten als akute Form, die eine allogene HSC-TX erhalten haben und geht mit einer hohen Mortalitäts- und Morbiditätsrate einher. Als Standardtherapie werden hochdosierte Kortikosteroide verabreicht. Jedoch gibt es häufig Formen von GvHD, die resistent gegen Steroide sind (Ferrara *et al.* 2009; Westin *et al.* 2011). Gerade bei dieser Form, und insbesondere bei Kindern, zeigt die Behandlung mittels MSC-TX positive und vielversprechende Erfolge bei der Reversion einer GvHD. Demzufolge ist die Hoffnung groß durch weitere Forschung eine effiziente MSC-Therapie für schwere Formen der GvHD zu entwickeln (Le Blanc *et al.* 2008; Kelly and Rasko 2021; Justiz Vaillant *et al.* 2022).

Ein weiteres Gebiet, für welches MSC-Therapien entwickelt werden, sind Autoimmunerkrankungen. Viele Patienten mit der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn sind gegenüber herkömmlichen Behandlungsmethoden resistent. Neben HSC-Therapien wurden auf Grund derer Nebenwirkungen zusätzlich MSC-Therapien als Behandlung ausgetestet, welche sich als äußerst erfolgreich in der Behandlung von Morbus Crohn, insbesondere bei dem fistulären Krankheitsbild, herausstellten (Adak *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2017). 2018 gab die Europäische Arzneimittelbehörde (EMA) bereits die Behandlung von perianalen Fisteln in Morbus Crohn Patienten mit allogenen aus fettgewebestammenden MSCs frei (Wu *et al.* 2020). Für die Autoimmunerkrankungen Systemischer Lupus Erythematoses, Typ 1 Diabetes und Multiple Sklerose werden ebenfalls MSCs zur Linderung der Erkrankung erforscht und in einigen Studien oder Versuchen zeigt sich bereits eine signifikante Verbesserung der jeweiligen Erkrankung nach MSC-TX (Frenette *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018). In

Bezug auf die regenerativen Eigenschaften von MSCs gibt es ebenfalls verschiedenste Studien, um diese therapeutisch zu nutzen, wie z.B. für kardiovaskuläre Herzerkrankungen. Diese sind heutzutage die häufigste Todesursache weltweit und es besteht somit ein großes Interesse daran eine effiziente Behandlung zu entwickeln, insbesondere im Hinblick auf Regeneration und Wiederherstellung der Funktionalität (Yun and Lee 2019). Leider konnten in klinischen Studien im Vergleich zu den präklinischen Studien für Herzinfarkt, wiederkehrende *Angina pectoris*, pädiatrische Kardiomyopathie und angeborene Herzerkrankungen kaum positive Effekte nach allogener oder autologer MSC-TX nachgewiesen werden. Für ischämische Herzerkrankungen hingegen waren sehr wohl mit präklinischen Studien übereinstimmende Ergebnisse hinsichtlich Neoangiogenese, anti-fibrotischen Ereignissen und Verbesserung der Kontraktilität zu finden. Diese Faktoren trugen insgesamt zur Regeneration des geschädigten Gewebes und einer Verbesserung in der Herzfunktionalität bei (Wu *et al.* 2020).

1.3.3. MSCs als Therapie nach Ganzkörperbestrahlung

Auf Grund der beschriebenen Charakteristika von MSCs stellen sie geeignete Kandidaten für die Behandlung von schwerer Myelosuppression nach Strahlentherapie oder -unfall dar. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass im Vergleich zu einer reinen HSC-Transplantation die gemeinsame Transplantation von MSCs mit HSCs nach Radio-/Chemotherapie die Wiederherstellung der Hämatopoese signifikant verkürzt (Koç *et al.* 2000). Der Einsatz von MSCs ist selbst nach einer myeloablativen Ganzkörperbestrahlung, welche für das Überleben des Patienten eigentlich eine HSC-Transplantation (HSC-TX) unabdingbar macht, noch vorstellbar. Begründung dafür sind zum einen HSCs und HPCs im Knochenmark, welche auf Grund der Heterogenität in der Verteilung einer Strahlendosis nicht hinreichend exponiert wurden, um abzusterben, und zum anderen, weil bekannt ist, dass ruhende, radioresistente HSCs im Knochenmark existieren und dieses wieder repopulieren können (Hérodin and Drouet 2005). Diese Zellen sollen demnach durch MSCs erreicht, aktiviert und bei der Wiederherstellung der Hämatopoese unterstützt werden.

Um diese Hypothese zu beweisen, wurden von Frau PD Dr. Lange und Kollegen weibliche Empfänger Mäuse mit 9,5 Gy letal bestrahlt und erhielten anschließend intravenös (*i.v.*) 10^6 MSCs transplantiert. Diese stammten von unbehandelten männlichen Spendertieren und wurden als Bulk-Kultur vorher expandiert. Die Messung der Leukozyten- sowie Thrombozytenzahl nach MSC-TX über fast 8 Wochen ergab eindeutig wie in Abb. 3 zu sehen ist, dass die Hämatopoese nach 4 Wochen fast vollständig wiederhergestellt war, so wie man es auch nach einer HSC-TX (nicht gezeigt) beobachten konnte. Außerdem waren 2/3 der behandelten Tiere auch noch nach 7 Monaten am Leben, wohingegen ein solch langes Überleben bei keiner Bestrahlungskontrolle auftrat (Lange *et al.* 2011; Lange *et al.* 2015). Ähnliche Überlebensraten wurden auch bei Yang *et al.* gezeigt, wo ebenfalls mit 7 Gy letal bestrahlte Mäuse *i.v.* eine MSC-TX erhalten hatten (Yang *et al.* 2012).

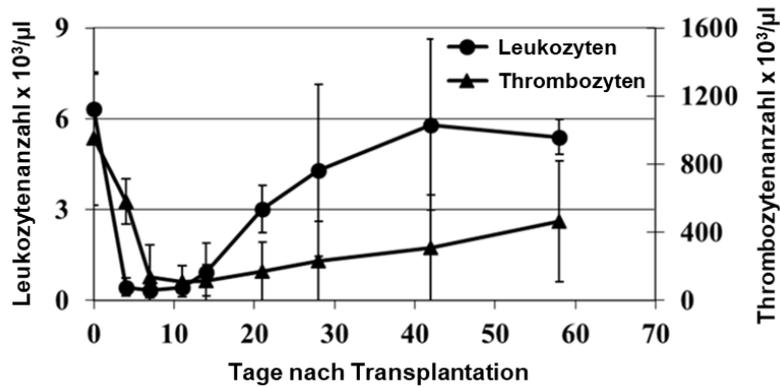


Abb. 3: Wiederherstellung der murinen Hämatopoese nach letaler Ganzkörperbestrahlung durch MSC-Transplantation. Die Leukozytenzahl hatte sich in letal bestrahlten Empfängertieren 4 Wochen nach MSC-Transplantation bereits wieder normalisiert. Die Thrombozyten-Erholung hingegen brauchte fast 8 Wochen. Modifiziert nach Lange *et al.*, © 2011; *Creative Commons Attribution License*.

Weitere Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, wo sich die transplantierten MSCs ansiedelten. Interessanterweise konnten Spender-MSCs nur in der Lunge und sonst in keinen anderen Organen gefunden werden. Die Anreicherung dort erfolgte in den ersten 24 Stunden und bereits nach 10 Tagen waren auch in der Lunge sowie weiterhin in keinem anderen Organ, transplantierte Zellen mehr detektierbar (Lange *et al.* 2011). Gleiches wurde ebenfalls 2012 von Yang *et al.* in deren Experimenten zur Wiederherstellung der Hämatopoese in letal bestrahlten Tieren mittels MSC-TX beobachtet (Yang *et al.* 2012). Diese Entdeckungen widerlegen unter anderen die von Hu *et al.* 2010, bei denen die *i.v.* transplantierten MSCs nach Bestrahlung ins Knochenmark der Empfängertiere wanderten (Hu *et al.* 2010). Da jedoch offensichtlicher Weise auch MSCs in der Lunge irgendwie die bestrahlten HSCs/HPCs bei der Wiederherstellung der Hämatopoese unterstützten, wurde die Genexpression im Knochenmark genauer angeschaut. Im Vergleich zum Kontroll-Knochenmark unbehandelte Tiere sind nach TBI und MSC-TX z.B. Gene, welche an Stressmanagement, Detoxifikation, Zellbeweglichkeit, Anti-Apoptose, Anti-Inflammation, Immunabwehr, Zellzyklus/Proliferation und Überleben beteiligt sind, stark hochreguliert. Wohingegen die Expression von Genen für z.B. die Inhibition des Zellzyklus/Proliferation und des Überlebens runter reguliert vorlagen, ebenso wie für Toxifikation, Apoptose, Inflammation und Zellretention (Lange *et al.* 2015). Die Frage, wie MSCs in der Lunge die Genexpression im Knochenmark beeinflussen können und somit eine Protektion von bestrahlten HSCs/HPCs bewirken, konnte durch parakrine Effekte beantwortet werden (Lange *et al.* 2011). Diese sind, wie bereits in Kapitel 1.3.1 erwähnt, für MSCs bekannt und Grundlage für viele regenerative und immunmodulierende Eigenschaften der Zellen. Auf Grund der langen Distanz, welche die von den mMSCs in der Lunge sezernierten parakrin wirkenden Stoffe bis zum Wirkort KM zurückgelegt werden muss, ist es höchst wahrscheinlich, dass die therapeutische Wirkung von extrazellulären Vesikeln ausgelöst wird. Einzelne Moleküle könnten zwar ebenfalls die Strecke überwinden, jedoch wäre die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass ein Großteil von ihnen vor Eintreffen im KM abgebaut wird. EVs hingegen bieten nicht nur ein gut geschütztes Kompartiment gegen den Abbau, sondern es werden auch in einem einzigen EV gleichzeitig ein ganzes Arsenal an Informationen in Form verschiedener Moleküle transportiert.

1.4. Extrazelluläre Vesikel

Zellen von allen Eukaryoten sowie die von Prokaryoten, können unterschiedliche membranumhüllte Vesikel in ihr extrazelluläres Umfeld abgeben. Dieser Prozess ist evolutionär konserviert (Colombo *et al.* 2014). Erwartungsgemäß wurden zum einen extrazelluläre Vesikel (EVs) in Zellkulturüberständen gefunden und zum anderen in diversen Körperflüssigkeiten wie Urin, Muttermilch, Blut, Samen, Speichel, Liquor, Galle und Fruchtwasser (Witwer *et al.* 2013). Auf Grund der Diversität von EVs in Bezug auf Größe, Herkunft und Eigenschaften ist auch die Namensgebung für die unterschiedlichen Partikel sehr vielfältig (Abgeleitet von Partikelgröße, Organ- oder Gewebeherkunft, Funktion oder Zellbezogene Lokalisation). Eine einheitliche Bezeichnung ist dementsprechend nicht vorhanden, was bis heute immer wieder als Grundlage für Diskussionen in der Fachwelt dient. 2011 wurde die Internationale Gesellschaft für extrazelluläre Vesikel (ISEV) gegründet, um eine gemeinsame Grundlage für Namensgebung, Isolation, Charakterisierung und weiterer experimenteller Anforderungen zu schaffen (Gould and Raposo 2013). „Extrazelluläre Vesikel“ gilt mittlerweile als allgemeine Bezeichnung für Partikel, welche von einer Lipiddoppelmembran umhüllt sind und auf natürlichem Weg von einer Zelle abgeschieden wurde. Des Weiteren sind diese Partikel auf Grund eines fehlenden Nukleus nicht in der Lage selbst zu replizieren (Théry *et al.* 2018). Historisch wurden die verschiedenen EVs lange Zeit abhängig von ihrem Biogeneseweg in verschiedene Subtypen eingeteilt. Exosome sind im Durchmesser 40-160 nm groß und entstammen dem endosomalen System. Es handelt sich bei ihnen um intraluminale Vesikel, die bei der Endosomenreifung entstehenden, indem eine Abschnürung der endosomalen Lipiddoppelmembran in das Innere der späteren Endosomen, den sogenannten multivesikuläre Körperchen (MVB; engl: *multivesicular bodies*), stattfindet (siehe Abb. 4). Bei der Fusion dieser MVB mit der Plasmamembran werden die Exosome in das extrazelluläre Milieu abgegeben (Ludwig and Giebel 2012; Raposo and Stoorvogel 2013). Mikrovesikel werden hingegen direkt von der Plasmamembran in den extrazellulären Raum abgeschnürt und sind mit einem Durchmesser von 100-1000 nm wesentlich größer (Théry *et al.*, 2009). Die größte Gruppe der EVs mit einem Durchmesser von 500-2000 nm sind jedoch die apoptotischen Körperchen, welche beim programmierten Zelltod als kleine fragmentierte Teilstücke von der sterbenden Zelle abgespalten werden (Reiners *et al.* 2017).

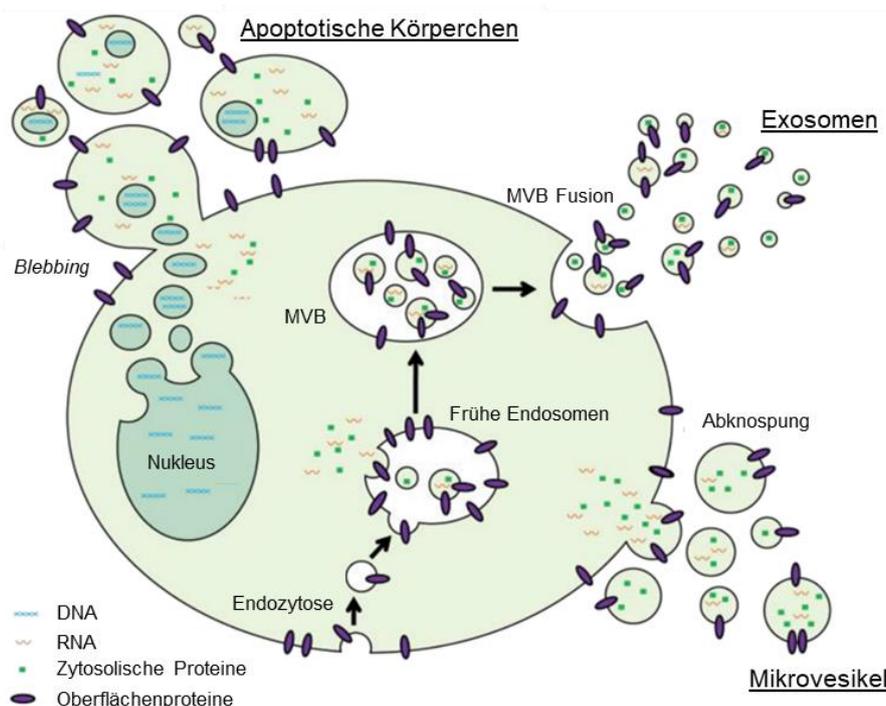


Abb. 4: Schematische Darstellung der wichtigsten Biogenesewege für verschiedene Subtypen von extrazellulären Vesikeln. Mikrovesikel entstehen durch direkte Abknospung der Plasmamembran nach außen in den extrazellulären Raum. Exosomen hingegen werden geformt, indem sich die Membran der frühen Endosomen nach innen stülpt und abgeschnürt wird. Im Verlauf der Endosomenreifung werden aus den frühen späten Endosome, die sogenannten *multivesicular bodies* (MVB). Bei Fusion der MVB mit der Plasmamembran werden die Exosomen in das extrazelluläre Milieu freigesetzt. Beim programmierten Zelltod werden apoptotische Körperchen durch *Blebbing* der Zytoplasmamembran gebildet. Modifiziert nach Hartjes *et al.*, © 2019; *Creative Commons Attribution 4.0 (CC BY 4.0) International Public License*.

Für die unterschiedlichen EV-Subtypen existieren keine spezifischen Marker zum Nachweis dieser, sodass von der ISEV davon abgeraten wird in Publikationen davon zu sprechen, ob mit Exosomen oder Mikrovesikeln gearbeitet wurde, da eine genaue Unterscheidung nur bei Verwendung einer in Echtzeit bildgebenden Technik möglich wäre. Auf Grund des dynamischen Prozesses kann jedoch selbst dies nicht immer genau erfasst werden. Stattdessen sollten die verwendeten Subtypen durch Verwendung von mind. 2 der folgenden Kriterien beschrieben werden (Théry *et al.* 2018):

1. Physikalische Charakterisierung durch z.B. der Größe/den Größenbereich
2. Biochemischer Aufbau der EVs unter Angabe, welche Markerproteine vorhanden sind
3. Beschreibung, unter welchen Konditionen die EVs entstanden sind (z.B. Hypoxie EVs) oder von welchen Zellen sie gebildet wurden (z.B. wie die in diesem Projekt verwendeten EVs von murinen MSCs (mMSC-EVs)).

Diese Uneinheitlichkeit in der genauen Beschreibung und Zuordnung von verschiedenen EV-Subpopulationen ist darin begründet, dass dieses Forschungsgebiet sich noch in einer frühen Entwicklungsphase befindet. Die Existenz von sezernierten Vesikeln ist zwar schon lange bekannt, jedoch wurden diese zunächst als zellulärer Müll angesehen (Théry 2011). Erst 1969 wurde von Anderson und 1971 von Crawford etwas genauer auf die von ihnen gefundenen Vesikel geschaut und die ersten Andeutungen gemacht, dass diese nicht nur Zellschutt sind, sondern wichtige biologische Funktionen erfüllen (Anderson 1969; Crawford 1971). Der Exosomen-Biogeneseweg wurde dann in den frühen 1980er Jahren entdeckt (Harding *et al.* 1983; Pan and Johnstone 1983) und das Interesse an der EV-Forschung wuchs zunehmend. Heutzutage gibt es ähnlich wie bei den MSCs ein enormes

Wachstum an Forschungsgruppen, die mit EVs arbeiten und diese untersuchen. Die Vielzahl an Untersuchungsansätzen unterscheiden sich neben der EV-Namensgebung ebenso durch viele noch nicht konsentrierte Methoden und unterschiedliche, nicht einheitliche Charakterisierung.

1.4.1. Isolation und Charakterisierung extrazellulärer Vesikel

Wie bereits in Kapitel 1.4. erwähnt, ist das Forschungsfeld um die EVs nach Erkenntnis über ihre Anwendungsvielfalt und biologischem Nutzen in sehr kurzer Zeit sprunghaft angewachsen. Allein die Vielzahl an EV-Quellen wie Zellkulturüberstände, verschiedenste biologische Flüssigkeiten, welche allein schon eine große Divergenz in ihrer jeweiligen Beschaffenheit besitzen sowie Geweben benötigen alle für sich betrachtet eine einheitliche Regelung wie diese behandelt werden müssen, um aus ihnen vergleichbare EV-Populationen isolieren zu können. In diesem Zusammenhang hat die ISEV sich zur Aufgabe gemacht, genaue Anweisungen zu erstellen, welche Informationen bei der EV-Beschaffung für die jeweilige Quelle notwendig sind, welche Bedingungen eingehalten werden sollten und was es darüber hinaus noch zu beachten gilt. Tieferführende Einblicke würden den Rahmen dieser Arbeit jedoch überschreiten, daher sei nur beispielhaft etwas über die EV-Ernten aus Zellkulturmedien gesagt. Neben genauen Angaben zu den verwendeten Kulturbedingungen (Zellart, Konfluenz zum Zeitpunkt der Ernte, Kulturgefäß, -volumen etc.), ist eine detaillierte Auflistung des verwendeten Zellkulturmediums und dessen Zusätze, insbesondere den Angaben ob und ab wann Serum-frei gearbeitet wurde oder ob und ab wann EV-depletiertes Serum – unter genauer Angabe wie die Depletion erfolgte –, zu erbringen. Die Angabe über das verwendete Serum ist von besonderer Wichtigkeit, da dieses sowohl selber EVs enthält, welche bei nicht ausreichender Depletion als Verunreinigung in den eigentlich zu isolierenden EVs vorliegen, als auch einen Einfluss auf die Eigenschaften der Zellen und somit auch auf die Qualität der von ihnen gebildeten EVs haben kann (Théry *et al.* 2018). Auch für die Isolation und Charakterisierung der EVs gibt es wie bei den MSCs viele verschiedene Protokolle, welche alle Vor- und Nachteile je nach Anwendung mit sich bringen, insgesamt jedoch eine Vergleichbarkeit von Daten aus unterschiedlichen Laboren und Aufreinigungen erschwert, wenn nicht sogar teilweise in Frage stellt.

Für die Aufreinigung wird auch heute noch häufig eine differentielle Zentrifugation verwendet, wobei die EVs zum Schluss mittels Ultrazentrifugation pelletiert werden. Insgesamt kann die erhaltene EV-Population nach dieser Aufreinigung jedoch nicht als komplett rein betrachtet werden, da unter anderem noch Proteinaggregate und/oder deren Komplexe enthalten sind. Eine Methode, die diese Verunreinigung verringert, ist die Dichtegradientenzentrifugation. Diese hat jedoch den Nachteil, dass vermutet wird, dass die am häufigsten für den Gradienten verwendete Saccharose die biologische Funktion der EVs beeinflusst und somit funktionelle Tests nicht aussagekräftig sind. Bei der Immunadsorption werden durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern EVs anhand ihrer Oberflächenproteine z.B. verschiedener Tetraspanine wie CD63 oder CD81, die auf fast allen EVs zu finden sind, oder HLA-Molekülen, welche spezifischer und nur für bestimmte Zelltypen gelten, aufgereinigt. Auf Grund der Spezifität dieser Aufreinigungsmethode wird davon ausgegangen, dass der Anteil von Vereinigungen und Störfaktoren – wie makromolekulare Aggregate, die dasselbe wie für die EV-Aufreinigung verwendete Oberflächenantigen tragen – gering ausfällt. Allerdings findet eine Selektion der EV-Populationen statt, was bei den weiterführenden Untersuchungen zur Beantwortung

der ursprünglichen Fragestellung berücksichtigt werden sollte. Um EVs leicht aus großen Mengen an Ausgangsmaterial, wie mehreren Litern Zellkulturmedium, zu isolieren, werden auch Präzipitationsverfahren auf Polyethylenglykol (PEG) Basis verwendet. Es ist dabei jedoch nicht auszuschließen, dass dieses Verfahren auf Grund von Co-Präzipitation vieler unerwünschter Moleküle keine reinen EV-Präparate hervorbringt. Des Weiteren ist PEG stark hygroskopisch was die für enzymatische Reaktionen geeignete Salzkonzentration in dem verwendeten Puffer soweit verändern könnte, dass Enzymaktivität vermindert wird oder die Reaktion ganz zum Erliegen kommt (Giebel and Helmbrecht 2015). Auch Größenausschlussverfahren durch physikalische Barrieren wie bei Filtrationen oder Chromatographie stehen zur Auswahl, bei denen jedoch ebenfalls keine reinen EVs erhalten werden. Um die Isolation der EVs zu optimieren, werden mittlerweile häufig einige der beschriebenen Methoden kombiniert. Bei Anwendung einer sequentiellen Zentrifugation folgt häufig vor oder nach der Ultrazentrifugation eine Filtration, um z.B. Aggregate zu entfernen oder präzipitierte EVs werden nach einem Waschschrift nochmal mittels Ultrazentrifugation pelletiert, um das PEG zu entfernen (Witwer *et al.* 2013; Giebel and Helmbrecht 2015). Je vielfältiger die Isolationsmethoden für EVs sind, umso mehr verschiedene Herangehensweisen gibt es für die anschließende Charakterisierung und Quantifizierung derer. Denn auch hierfür existiert bis heute noch keine Methode, die es ermöglicht alle Eigenschaften der EVs (Konzentration, Größenverteilung, Proteingehalt und -zusammensetzung) zu erfassen. Mit physikalischen Analysemethoden werden die Morphologie, Größe und/oder Konzentration ermittelt. Zur genauen Morphologiebestimmung werden vor allem Elektronenmikroskopie und als neuere Verfahren auch Rasterkraft- und Rastertunnelmikroskopie angewendet. Die Vorbereitung der Proben für diese Verfahren ist jedoch zeitaufwändig und die Qualität der Ergebnisse stark abhängig von der Art der Probenvorbereitung, welche zu Verformungen der EVs führen kann. Auch sind keine quantitativen Aussagen mit diesen Methoden möglich. Zur zusätzlichen Quantifizierung neben der Charakterisierung werden stattdessen optische Verfahren angewendet, bei denen die EVs mittels Laserlicht angeleuchtet und Informationen über die Beschaffenheit der EVs aus der dynamischen Lichtstreuung sowie der auftretenden Brown'schen Molekularbewegung der Partikel gewonnen werden. Diese Art von Untersuchung kann in wenigen Minuten durchgeführt werden. Auf Grund der heutigen Rechenleistung von Computern erfolgt unmittelbar die Analyse als mathematische Berechnung der Messung mittels hinterlegter komplexer Algorithmen. Als Ergebnis wird die Partikelgröße bzw. eine Größenverteilung ausgegeben. Die erste Methode dieser Art war die dynamische Lichtstreuung mit der sich Partikel zwischen 1 nm und 6 µm analysieren lassen. Mittlerweile wird wesentlich häufiger die neuere und genauere Nanopartikel Tracking Analyse (NTA) durchgeführt. Diese vermisst Partikel von 20 bis 1000 nm und gilt als Absolutmethode, da sie zusätzlich zur Größenverteilung auch direkt die vorliegende Partikelkonzentration ermittelt. Ebenfalls eine Kombination aus Größenverteilung von 50 nm bis 10 µm und der Partikelkonzentration kann mit *resistive puls sensing* erhalten werden. Bei dieser Messmethode liegen die Partikel, also in dem Fall die EVs, ebenfalls in Suspension in einem Zweikammersystem vor, die mittels einer Pore miteinander verbunden sind. Durch das Anlegen einer Spannung werden die Partikel von der einen in die andere Kammer durch die Pore gezogen. Die dabei entstehende Widerstandsänderung ist proportional zu dem Volumen des durchtretenden Partikels und gibt somit Auskunft über seine Größe. Für die Bestimmung der EV-Konzentration wird außerdem die Durchflusszytometrie angewendet. Allerdings ist dies nur bei neueren Geräten oder einer geeigneten

Aufrüstung älterer Geräte möglich, da ansonsten die Partikelgröße unterhalb des Detektionslimits liegt beziehungsweise nur EVs ab einer Größe von ca. 300 nm detektiert werden können. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist die sogenannte *swarm detection*. Diese tritt immer dann auf, wenn die Partikelkonzentration so hoch ist, dass eine Einzelpartikelmessung nicht mehr gewährleistet werden kann und somit die Ergebnisse verzerrt. Der Vorteil hingegen ist, dass durch die Anwendung von verschiedenen Antikörpern gleichzeitig zur Konzentrationsbestimmung auch verschiedene Oberflächenantigene auf den EVs quantitativ nachgewiesen werden können. Ein weiteres Verfahren ist die Feldflussfraktionierung, bei der verschiedene Möglichkeiten existieren das sogenannte Kreuzstromprinzip anzuwenden. Die zu analysierenden Partikel werden dabei fraktioniert und deren Durchmesser bestimmt, indem zwei zueinander senkrecht stehende Kräfte auf die zu analysierenden Partikel wirken (Giebel and Helmbrecht 2017).

Um den Proteingehalt und die -zusammensetzung zu analysieren, werden biochemische Verfahren angewendet. Der Gesamtproteingehalt zum Beispiel lässt sich einfach mittels Standardverfahren wie einem BCA (Bicinchoninsäure, engl.: *bicinchoninic acid*) oder Bradford Protein Assay bestimmen. Es gilt jedoch zu beachten, dass diese Verfahren Kontaminanten wie freie Proteine, die mit den EVs isoliert wurden, auf Grund ihrer geringen Spezifität nicht ausschließen können. Daher ist zur Charakterisierung der EV-Präparate der Nachweis spezifischer EV-Proteine für die Identifizierung und Quantifizierung der EVs von größerer Bedeutung als die Messung des Gesamtproteingehaltes. Allerdings ist auch hier zu erwähnen, dass es – ähnlich wie bei der MSC-Charakterisierung – zurzeit keine einzigartigen EV-Marker und auch keine Markerpanels für die exakte Diskrimination zwischen Exosomen und Mikrovesikeln gibt. Von der ISEV wird daher empfohlen mindestens ein Transmembranprotein, wie z.B. die Tetraspanine CD63, CD81 und CD82 (nicht gewebespezifisch) oder CD9 und CD53 (gewebespezifisch), nachzuweisen. Zweitens muss ein zytosolisches Protein detektiert werden. Zur Auswahl stehen dafür typischerweise TSG101 als ESCRT Protein oder dessen assoziierte Proteine wie ALIX und FLOTTELIN, die am endosomal Sortierkomplex beteiligt sind. Auch möglich ist der Nachweis von promiskuitiv in EVs zu findenden Proteinen wie HSP70 und Aktin. Zusätzlich sollte die Abwesenheit von Kontaminationen gezeigt werden. Allgemeine zelluläre Kontaminanten werden z.B. mittels Calnexin (Protein des sekretorischen Signalweges) oder Aktin (Protein des Zytoskeletts) Detektion in den EVs nachgewiesen. Albumin oder Apolipoproteine hingegen sind Plasmaproteine und ihre Abwesenheit bedeutet, dass ein reines z.B. aus Blutserum isoliertes EV-Präparat vorliegt. Für die Detektion der EV-Marker wird am häufigsten der klassische Western Blot angewendet. Es stehen jedoch auch verschiedene andere Methoden wie an EVs angepasste Immunocapture-basierende ELISA (engl.: *enzym-linked immunosorbent -assay*) oder Durchflusszytometrie, wodurch mehrere Epitope gleichzeitig detektiert werden können, zur Verfügung. Des Weiteren werden für tieferegehende Analysen anschließend auch noch der Inhalt der EVs mittels Proteomik, Transkriptomik oder Lipidomik untersucht (Théry *et al.* 2018; Hartjes *et al.* 2019).

1.4.2. Biologische Funktion von extrazellulären Vesikeln

Wie bereits erwähnt, sind alle eukaryotischen Zellen in der Lage EVs zu generieren. Diese dienen vor allem der interzellulären Zell-Zellkommunikation zum Informationsaustausch (Ratajczak *et al.* 2006). Die dafür wichtigen Informationsträger sind durch die doppelte Lipidmembran vor Abbau geschützt im

Innen der EVs eingelagert. Bis jetzt ist bekannt, dass EVs mRNAs, microRNAs, nicht-kodierende RNAs, Lipide, Proteine und sogar DNA transportieren (Ramachandran and Palanisamy 2012; Fischer *et al.* 2016). Die Funktion der EVs ist dabei von deren Ursprung abhängig, da durch diesen die Zusammensetzung der jeweiligen EV-Fracht variiert und somit die Funktionalität maßgeblich bestimmt. Es wird angenommen, dass die Beladung gezielt verläuft, genaues ist jedoch noch nicht bekannt und wird weiterhin untersucht. Datenbanken wie ExoCarta (<http://exocarta.org>) und Vesiclepedia (<http://www.microvesicles.org>) versuchen währenddessen alle in EVs bereits detektierten Moleküle zu dokumentieren. Die bis jetzt erhobene Mannigfaltigkeit lässt auf viele verschiedene EV-Phänotypen schließen, die mutmaßlich unterschiedliche Einflüsse auf die jeweiligen Zielzellen besitzen (Reiners *et al.* 2017). Da von dieser Varianz der EVs auch die Zelladhäsionsmoleküle und Integrine in der umhüllenden Lipidmembran der EVs betroffen sind, wird vermutet, dass dieses – wie bereits von Viren bekannt – zu einem Tropismus führt, so dass ein gerichteter Informationsaustausch zwischen bestimmten Zellen gewährleistet wird. Der genaue Adresscode muss jedoch noch entschlüsselt werden (Rana *et al.* 2012). Prinzipiell gibt es verschiedenste Möglichkeiten, welche vereinfacht in Abb. 5 dargestellt sind, wie schlussendlich die EVs ihre Informationen an die Zielzelle weitergeben können und diese somit beeinflussen. Ein Weg ist der mittels direkten Kontaktes zwischen EV und Zielzelle durch Ligand-Rezeptorbindung. So tragen z.B. EVs von B-Zellen und anderen Antigenpräsentierenden Zellen wie dendritische Zellen MHCII mit gebundenem Antigen. Bei Kontakt mit T-Zellen löst diese Verbindung eine Aktivierung und damit einhergehende T-Zell-Immunantwort aus. Ein weiteres Beispiel für den direkten Kontakt sind EVs, die das Protein WNT auf ihrer Oberfläche tragen und somit den WNT-Signalweg in Zielzellen durch Bindung des entsprechenden Rezeptors auf der Zelloberfläche auslösen. Der zweite Weg ist das Entleeren der EV-Fracht in die Zielzelle. Durch die Fusion der EV-Membran mit der Zytoplasmamembran der Zielzelle, wird der Inhalt mit den verschiedenen RNAs, Lipiden, Proteinen und DNA in das Zytoplasma der Zielzelle abgegeben. Der Hauptaufnahmeweg ist jedoch die Endozytose, wobei in Zusammenhang mit der EV-Aufnahme in eine Zielzelle bisweilen alle 5 möglichen Wege (Clathrin-vermittelt, Caveolin-vermittelt, Lipid-Raft-vermittelt, Phagozytose und Makropinozytose) beobachtet werden konnten (Teng and Fussenegger 2021). Die in die Zielzelle entleerte EV-Fracht kann dann dort angekommen, ihre Funktion ausführen. So ist bereits gezeigt worden, dass RNAs nach Aufnahme in Zielzellen dort translatiert werden (mRNA) oder die Genexpression der Zielzelle modulieren (miRNA) (Valadi *et al.* 2007). Neben diesen klassischen und gut beschriebenen Wegen wird mittlerweile vermutet, dass Membrandomänen auf EVs, wie spezifische Tetraspanin-Integrin-Komplexe, ebenfalls maßgeblich bei der Bindung an Zielzellen sowie einer gezielten Signalwegaktivierung und/oder einer Aufnahme in die Zielzelle verantwortlich sind und somit eine gezielte Kommunikation ermöglichen (Jankovičová *et al.* 2020).

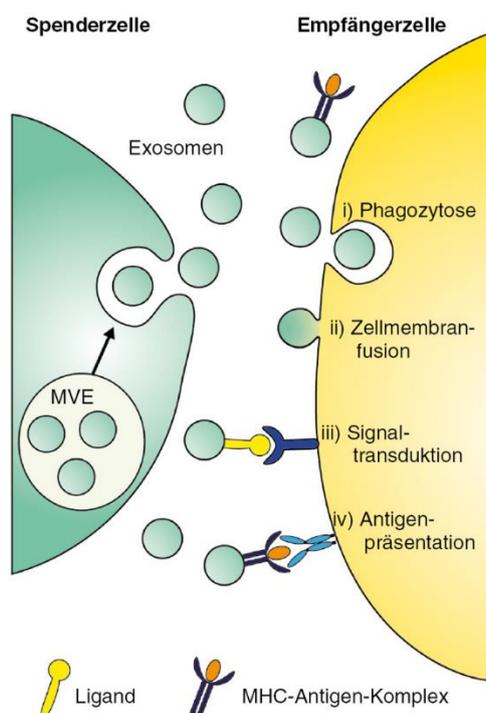


Abb. 5: Zell-Zell-Kommunikation mittels extrazellulärer Vesikel. Es gibt mehrere Wege, wie EVs die Informationen der Spenderzelle an die Empfängerzelle weitergeben können. EVs können mittels verschiedener Endozytosewege wie z.B. der Phagozytose (i) oder einer einfachen Zellmembranfusion (ii) ihre Fracht funktioneller Moleküle an die Zielzelle weitergeben. Des Weiteren können die Informationen mittels direkten Kontakts über eine Rezeptor-Ligandenbindung, welche zu einer Signaltransduktion (iii) führt oder bei der es sich um eine Antigenpräsentationsinteraktion (iv) handelt, die wiederum entsprechende interne Signalwege aktiviert, vermittelt werden. Reiners *et al.*, © 2017; Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported (CC BY-NC-ND 3.0).

Es ist bekannt, dass EVs auf Grund ihrer Mannigfaltigkeit an verschiedensten physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind. Im Folgenden sollen einige ausgewählte Beispiele dies genauer verdeutlichen und so einige der wichtigsten EV-Funktionen hervorheben. Wie bereits erwähnt, können EVs, welche von B-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen (APCs; engl.: *antigen-presenting cells*; vorwiegend dendritische Zellen) stammen, über einen MHCII-Komplex auf ihrer Oberfläche Antigene präsentieren. Durch die Anwesenheit weiterer co-stimulierender Moleküle, können sie so eine T-Zellantwort auslösen. Des Weiteren können APCs diese antigenpräsentierenden EVs aufnehmen, um dann anschließend selber das Antigen, welches von den EVs stammt, oder den entsprechenden für sie neuen MHCII Komplex der EVs auf ihrer eigenen Oberfläche für die Antigen-Präsentation verwenden. Durch diese Informationsweitergabe kann die Immunantwort verstärkt werden (Robbins and Morelli 2014). Dies ist nicht die einzig bekannte immunmodulierende Wirkung von EVs. Es wurden des Weiteren unterschiedliche Zytokine und Chemokine in EVs, welche von aktivierten Monozyten und dendritischen Zellen sezerniert wurden, gefunden wie z.B. nicht membrangebundenes pro-inflammatorisch wirkendes IL-1 β . Anscheinend dienen hier die EVs als sekretorischer Weg für eine schnelle Abgabe und Freisetzung von IL-1 β . (MacKenzie *et al.* 2001; Pizzirani *et al.* 2007). Auch EV-vermittelte protektive Funktionen bei internem oder externem Stress sind bekannt. Beispielsweise Thrombozyten, die mit dem Komplement Komplex in Kontakt kommen, nutzen EVs dazu, dieses wieder zu entfernen und sich so selber vor einer Lyse zu schützen. In von Endothelzellen abgeleiteten EVs hingegen wurde Caspase 3 gefunden. Verhindert man das Beseitigen der Caspase 3 via EVs, wird in den Zellen Apoptose induziert (Turturici *et al.* 2014). Darüber hinaus wurde in EVs aus Speichel der

Tissue Faktor nachgewiesen, welcher eine Koagulation unter pathologischen Bedingungen initiiert und somit die Wundheilung beschleunigt (Berckmans *et al.*, 2011). EVs aus Neuronen, Mikrogliazellen, Astrozyten und neuronalen Stammzellen sind hingegen an der neuronalen Protektion, der Nervenregeneration, der neuronalen Entwicklung und der Synapsenplastizität beteiligt. Allerdings können sie auch Krankheiten auslösen oder deren Verlauf unterstützen. So gibt es z.B. Hinweise dafür, dass sie an der Prionen, Alzheimer und Parkinson Erkrankung mitwirken. Durch EVs werden fehlerhafte oder toxische Proteine an andere noch gesunde Zellen weitergeleitet, wodurch die Ausbreitung oder das Fortschreiten der Erkrankung gefördert wird (Kalani *et al.* 2013). Auch ist bekannt, dass Tumore EVs in großer Anzahl sezernieren. Diese haben meist eine immunsupprimierende Wirkung und dienen somit der Tumorprogression, indem sie Apoptose in T-Zellen induzieren, Stromazellen zur Freisetzung von pro-angiogenen Faktoren stimulieren, die Proliferation von Endothelzellen unterstützen und durch den Transport und die Freisetzung von Metalloproteasen aus ihrem Inneren das invasive Wachstum des Tumors unterstützen (Turturici *et al.* 2014). Auf Grund dieser Funktionen sowie der Tatsache, dass EVs je nach Ursprung einen unterschiedlichen Phänotyp aufweisen, können EVs als potentielle Biomarker für verschiedenste Erkrankungen angesehen werden (Giebel and Helmbrecht 2015). Außerdem sind sie wegen ihrer protektiven und immunmodulierenden Eigenschaften geeignete Kandidaten für eine therapeutische Anwendung. Alternativ wird versucht EVs dahingehend weiterzuentwickeln, um als gezielter Vektor für z.B. gentherapeutische Anwendung zu fungieren (Lee *et al.* 2012).

1.4.3. Therapeutische Anwendung von aus mesenchymalen Stromazellen abstammenden extrazellulären Vesikeln

Die regenerativen und immunmodulierenden Eigenschaften der MSCs werden hauptsächlich auf die Sekretion von bioaktiven Molekülen und EVs zurückgeführt, die in der Lage sind parakrin zu agieren (siehe Abschnitt 1.3.1 und 1.3.2). Auf Grund dieser Annahme wird nicht nur an einer therapeutischen Anwendbarkeit von MSCs geforscht, sondern ebenfalls daran, ob die von MSCs sezernierten EVs (MSC-EVs) auch alleine ein therapeutisches Potential besitzen und ob dieses dem der parentalen Zellen ähnelt. Der Vorteil an der Verwendung von EVs, weswegen ihre Erforschung unter anderem von großem Interesse ist, ist, dass sie im Gegensatz zu den parentalen Zellen einen Einfrier- und Auftauzyklus mit weniger Verlusten überstehen, da sie stabiler sind. Außerdem besitzen EVs keine Möglichkeit sich in irgendeiner Weise zu vermehren, wodurch sie eine höhere Sicherheit in der Anwendung im Patienten bieten als Zellen (Lener *et al.* 2015). Mittlerweile gibt es eine Vielzahl an Studien mit MSC-EVs in verschiedenen Tiermodellen und teilweise sogar bereits am Menschen. Einige der vielversprechenden Ergebnisse werden im folgenden Verlauf beispielhalber aufgeführt. So konnten nach Verabreichung von MSC-EVs nach Herzinfarkt/Reperfusionverletzung im Mausmodell signifikante kardioprotektive Effekte – Reduktion der Infarktgröße – nachgewiesen werden (Lai *et al.* 2010). Ebenso ergab die Verabreichung von MSC-EVs eine Verminderung bis hin zum Ausbleiben eines akutes Nierenversagen in einem entsprechenden Ratten- und Mausmodell. Ermöglicht wurde dies anscheinend durch die Inhibition der Apoptose und der gleichzeitigen Proliferationsstimulation der tubulären Epithelzellen, was schlussendlich die Nierenfunktion deutlich verbesserte oder sogar wiederherstellte (Gatti *et al.* 2011; Bruno *et al.* 2012). Selbst bei GvHD, wo bereits erste vielversprechende Erfolge mittels MSC-TX bei

insbesondere der steroidresistenten Form dokumentiert wurden, sollen die therapeutischen Effekte auf EVs zurück zu führen sein. Mittlerweile wurden daher sogar bereits erste Patienten mit von MSCs abgeleiteten und angereicherten EVs erfolgreich ohne Nebenwirkungen behandelt (Kordelas *et al.* 2014). Auch bei neuronalen Erkrankungen kommen MSC-EVs in unterschiedlichen Tiermodellen zum Einsatz, um deren therapeutisches Potential zu testen. Bei Schlaganfall z.B. scheinen die in EVs enthaltenden funktionalen mikroRNAs vor allem an der Regeneration der Neuronen beteiligt zu sein, was die funktionale Wiederherstellung dieser begünstigt (Xin, Li, Liu, *et al.* 2013; Xin, Li, Cui, *et al.* 2013). Bei dem direkten Vergleich zwischen der Verabreichung von MSCs und MSC-EVs in einem murinen Schlaganfallmodell konnten keine Unterschiede zwischen beiden Behandlungsformen festgestellt werden. Die EV-Gabe zeigte eine signifikante Verbesserung der neuronalen Funktion, indem nachweislich die Neuroregeneration und die neuronale Erholung unterstützt wurden. Auch wurde die nach Schlaganfall auftretende Immunsuppression, welche eine Prädisposition für weiterführende Infektionen ist, abgeschwächt (Doepfner *et al.*, 2015).

In der Alzheimerforschung werden MSC-EVs ebenfalls als Hoffnungsschimmer angesehen. Die EVs scheinen eine Rolle in der Beseitigung der A β -Proteine, welche als Ursache der Plaquebildung im Gehirn gelten, zu spielen. EVs, die aus Fettgewebe-stammenden-MSCs sezerniert werden, enthalten das A β zerstörende Protein Nephrilysin. Unter Zellkulturbedingungen konnte daraufhin gezeigt werden, dass diese EVs die extra- und intrazelluläre A β -Konzentration in N2a-Zellen (modifizierte Neuroblastomzellen, die humanes A β -Protein überproduzieren) signifikant reduzierten (Katsuda *et al.* 2013). Des Weiteren lassen sich MSCs genetisch leicht modifiziert, so dass die daraus resultierenden EVs weitere therapeutische Faktoren wie siRNAs gegen β - und γ -Sekretaseenzyme transportieren, die ebenfalls eine Reduktion des A β -Levels bewirken (Liew *et al.* 2017). Ein weiteres großes Forschungsgebiet für die therapeutische Anwendung von MSC-EVs sind akute inflammatorische Lungenerkrankungen. Auch hier werden erste positive Erfolge beobachtet, die die Hoffnung schaffen neue effektive und vor allem gegenüber den bisherigen zellbasierten Therapien wesentlich risikoärmere Behandlungen entwickeln zu können (Monsel *et al.* 2016).

1.4.4. Radioprotektive Eigenschaften von MSC-EVs

Als eine weitere therapeutische Anwendung von EVs wird die Verwendung dieser zur Radioprotektion diskutiert. Lange *et al.* konnte bereits eine Wiederherstellung der Hämatopoese durch Transplantation von murinen Knochenmarks-abstammenden MSCs nach letaler Bestrahlung (9,5 Gy) in den Empfängertieren nachweisen (Lange *et al.*, 2015, 2011; Kapitel 1.3.3). Auf Grund dessen, dass die MSCs ausschließlich in der Lunge nachweisbar waren, wird davon ausgegangen, dass parakrin wirkende EVs für die Protektion der HSCs und HPCs verantwortlich sind. Demzufolge wurden die radioprotektiven Eigenschaften von murinen MSC-EVs in weiteren Studien untersucht (Lange *et al.* 2015; Schoefinius *et al.* 2017). Es wurden dafür zuerst *in vitro* Protektionsassays durchgeführt. Für die Untersuchung der protektiven Eigenschaften von mMSC-EVs auf bestrahlte HPCs, wurden daher murine mononukleäre Zellen (mMNCs) isoliert, bestrahlt und mit oder ohne mMSC-EVs in Methylcellulose kultiviert. Diese Versuche ergaben keine Protektion der HPCs nach Bestrahlung durch mMSC-EVs. Die Protektion von hämatopoetischen Stammzellen wurde daraufhin ebenfalls untersucht, indem die mMNC nach Bestrahlung mit oder ohne EVs zuerst auf einem Stromalayer kultiviert und die

in diesem Schritt gebildeten HPCs anschließend in ein Methylcelluloseassay eingesetzt wurden. Diese Untersuchung ergab, dass die Anwesenheit von EVs zu einer signifikant höheren Anzahl an gebildeten Kolonien im Vergleich zu der Negativkontrolle (bestrahlte mMNCs ohne EVs) führte. Gleichzeitig war die Kolonienanzahl nicht signifikant unterschiedlich zu der Positivkontrolle (unbehandelte mMNCs ohne EVs). Diese Ergebnisse ließen schlussfolgern, dass EVs ohne weitere zelluläre Bestandteile in der Lage sind bestrahlte HSCs vor deren Untergang zu retten (Schoefinius *et al.*, 2017). Wen *et al.* führten ähnliche Experimente durch (Wen *et al.* 2016). In diesem Fall wurden die Spendertiere vor Entnahme der gesamten Knochenmarkszellen (GKMZ) mit 2 Gy – was eine deutlich reduzierte Strahlendosis im Vergleich zu Schoefinius *et al.* darstellt – bestrahlt. Die GKMZ wurden anschließend ebenfalls mit oder ohne EVs *in vitro* mehrere Tage behandelt, bevor sie in einem Methylcelluloseassay eingesetzt wurden. Auch hier wurden signifikant mehr Kolonien mit EV-Behandlung dokumentiert (Wen *et al.* 2016). Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden *in vivo* Versuche durchgeführt (Lange *et al.* 2015). Analog zu den mMSC-Versuchen wurden nun mMSC-EVs in letal ganzkörperbestrahlte Empfängertiere (9,5 Gy) transplantiert und die Wiederherstellung der Hämatopoese mittels Messung der Leukozyten- und Trombozytenanzahl über mehr als 8 Wochen dokumentiert. Dies ergab ein ähnliches Bild wie nach der mMSC-Transplantation (siehe Abb. 3, Kapitel 1.3.3), was bedeutet, dass die EVs tatsächlich an der Wiederherstellung der Hämatopoese beteiligt sind (Lange *et al.* 2015). In Langzeitüberlebensstudien zeigte sich außerdem, dass die transplantierten mMSC-EVs ein ähnliches Langzeitüberleben wie eine mMSC-TX in letal bestrahlten Tieren bewirkten. Lediglich das Kurzzeitüberleben in den ersten ca. drei Wochen ist mit einer EV-Transplantation nicht gegeben wie in Abb. 6 deutlich zu erkennen ist. Dieses Phänomen wird darauf zurückgeführt, dass EVs nur HSCs und keine HPCs vor dem Absterben schützen, welche jedoch für das Kurzzeitüberleben verantwortlich sind (Lange *et al.* 2015). Dies wiederum stimmt mit den *in vitro* Versuchen überein, in denen keine HPC-Protektion erzielt werden konnte (Schoefinius *et al.* 2017).

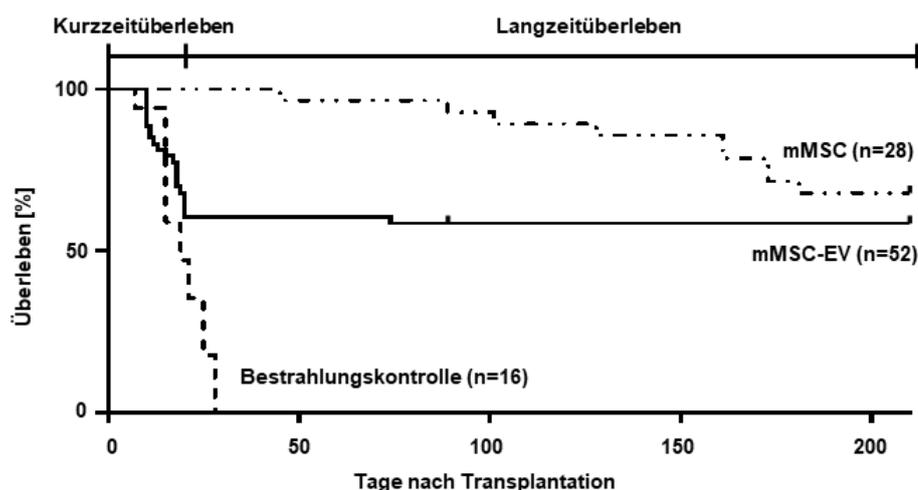


Abb. 6: Kaplan-Meier-Graph zeigt die Überlebensrate bei Mäusen nach letaler Ganzkörperbestrahlung (9,5 Gy) mit und ohne Behandlung. Das Überleben bestrahlter Mäuse wurde über Monate hinweg dokumentiert. Tiere, die keine weitere Behandlung erhielten (Bestrahlungskontrolle) sind alle binnen ca. eines Monats verstorben. Im Gegensatz dazu zeigen Tiere, welche nach der Bestrahlung eine mMSC-EVs *i.v.* Transplantation erhalten hatten ein Langzeitüberleben von ca. 60 %, ähnlich zu den Tieren, die eine reine MSC-Transplantation erhielten. Allerdings konnte mit mMSC-EVs kein Kurzzeitüberleben wie bei den parentalen mMSC nachgewiesen werden. Modifiziert und nachgedruckt aus: *Biological Responses, Monitoring and Protection from Radiation Exposure*, Autor Mishra KP, 1. Auflage, Artikel: *Treatment of acute radiation syndromes with transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells*, S.: 149-164, © 2015, Lange *et al.*, genehmigt von Nova Science Publishers, Inc..

Auch Wen *et al.* konnten *in vivo* zeigen, dass sowohl murine als auch humane MSC-EVs einen Strahlenschaden in Knochenmarkszellen (HSCs und HPCs) umkehren können. Dafür wurden Tiere mit 1 Gy bestrahlt, GKMZ isoliert, diese mit oder ohne EVs kultiviert, um anschließend in andere mit 2 oder 9,5 Gy letal bestrahlte Tiere transplantiert zu werden. Der Spender-Chimärismus wurde über mehrere Monate im Vergleich zu unbestrahlten und bestrahlten Kontrollen dokumentiert. Es zeigte sich bei allen Experimenten, dass mit EVs-behandelte bestrahlte Donorzellen einen signifikant höheren Donor-Chimärismus als bestrahlte unbehandelte Kontrolltiere aufwiesen. Zusätzlich wurden bestrahlten Tieren (5 Gy) humane MSC-EVs transplantiert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung die Konzentration verschiedener Blutzellen ermittelt. Auch hier zeigte sich eine Wiederherstellung der Hämatopoese nach EV-Gabe. Zusammenfassend konnte auch in diesen Untersuchungen gezeigt werden, dass MSC-EVs protektive Effekte auf bestrahlte HSCs/HPCs ausüben (Wen *et al.* 2016).

1.5. Proteomanalyse von mMSC-EVs

Wie bereits ausgeführt, konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass mMSC-EVs das Überleben letal bestrahlter HSCs unterstützen und somit eine vollständige Wiederherstellung der Hämatopoese gewährleistet wird (Lange *et al.* 2015; Wen *et al.* 2016; Schoefinius *et al.* 2017). Welche in den EVs enthaltene Moleküle diesen Effekt bedingen wurde vorerst in einer Proteomanalyse untersucht. In zwei voneinander unabhängigen EV-Präparaten aus *in vitro* kultivierten mMSC wurden übereinstimmend 236 Proteine ausfindig gemacht und einem von 9 definierten biologischen Prozessen zugeordnet (Abb.7) (Lange *et al.*, unveröffentlichte Daten).

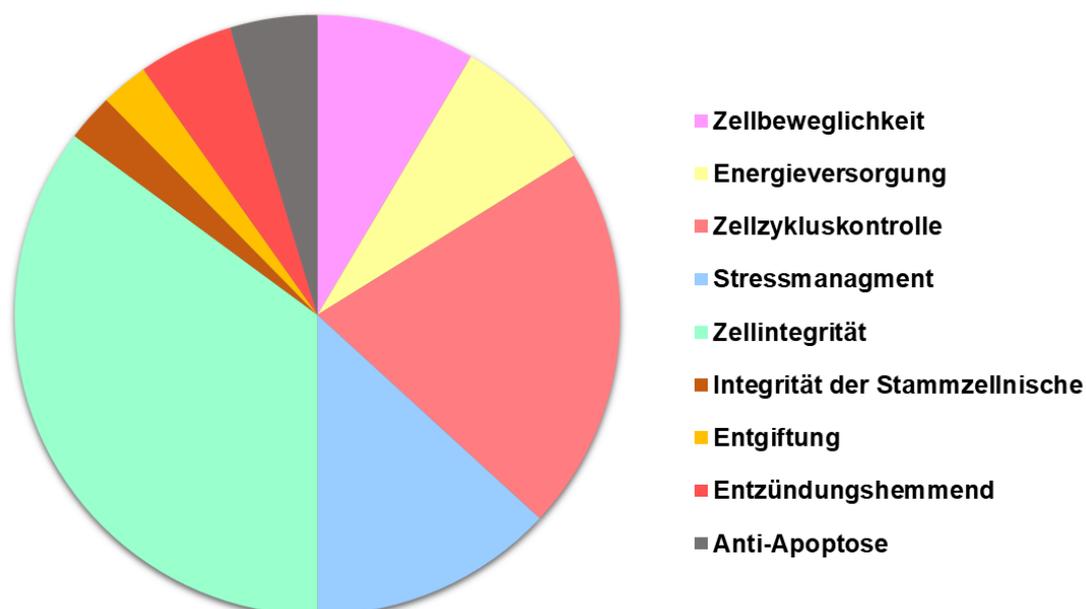


Abb. 7: Funktionale Gruppierung der in mMSC-EVs gefundenen Proteine. Jeweils ein EV-Präparat aus zwei verschiedenen *in vitro* mMSC-Kulturen wurden einer Proteomanalyse unterzogen. Nur die in beiden EV-Präparaten detektierten Proteine wurden berücksichtigt und anschließend deren Funktionalität im Organismus mittels Literaturrecherchen ermittelt. Des Weiteren wurde ein Auswahlkriterium für geeignete Kandidaten, die eine mögliche Radioprotektion letal bestrahlter HSCs besitzen könnten, festgelegt. Dieses besagt, dass die Kandidaten eine biologische Funktion aufweisen müssen, die zu einem der 9 aufgezählten Prozesse gehört. Diese Prozesse entsprechen denen, die in der Vergangenheit eine spezifische Erhöhung der Genexpression im KM letal bestrahlter Tiere nach MSC-Transplantation (Lange *et al.* 2015) aufwiesen. Insgesamt konnten unter diesen Bedingungen 236 Proteine klassifiziert werden (nach Lange *et al.*, unveröffentlichte Daten).

Basierend auf der Proteomanalyse wurden drei vermeintlich vielversprechende Kandidaten ausgewählt, um deren Beteiligung an dem Support bestrahlter HSCs zu eruieren. Sowohl die ausgewählte Kupfer/Zink Superoxid Dismutase 1 (SOD1), als auch das Peroxiredoxin-1 (PRDX1) als zweiter Kandidat, wurden auf Grund ihrer biologischen Funktion in die Gruppe des Stressmanagements eingeordnet. Als dritter Kandidat wurde das entzündungshemmende Galectin-1 (GAL1) gewählt.

1.5.1. Kupfer/Zink Superoxid Dismutase 1

Die Superoxid Dismutase 1 (SOD1) liegt in aktiver Form als 32 kDa großes Homodimer vor. Pro Untereinheit ist jeweils ein Kupfer- und ein Zinkion in dem katalytisch aktiven Zentrum gebunden, die als Cofaktoren für die dort stattfindende Redoxreaktion dienen (Tainer *et al.*, 1982; online Referenz 15). SOD1 liegt intrazellulär vor, wobei sich $\geq 95\%$ des Enzyms im Zytoplasma befinden und nur ein kleiner Anteil des Enzyms in den Organellen wie Lysosomen, Peroxisomen und dem Zellkern (Culotta and Luk 2004; Weydert and Cullen 2009). Die biologische Funktion des ubiquitär exprimierten SOD1 besteht darin die sehr zellschädigenden Superoxide in weniger radikales Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umzuwandeln. Diese reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) treten unter normalen physiologischen Bedingungen in geringen Konzentrationen als wichtige Signalstoffe auf und sind an der Regulation von Wachstums-, Stress- und Stoffwechselwegen beteiligt. Unter pathologischen Bedingungen hingegen, wie z.B. Hypoxie oder hohen Strahlendosen, entstehen noch weit mehr ROS, welche schlussendlich nicht nur zu veränderten regulatorischen Antworten führen, sondern die Zelle/das Gewebe reversibel oder im schlimmsten Fall irreversibel schädigen, was den Zelltod zur Folge haben kann (Xu *et al.* 2022). Oxidativer Stress ist außerdem ein häufiger Grund für häufig auftretende humane Erkrankungen wie Krebs, Typ II Diabetes sowie den neuronalen Erkrankungen Alzheimer und Parkinson (Alfadda and Sallam 2012; Lee *et al.* 2021). In Bezug auf SOD1 ist vor allem bekannt, dass in der neurodegenerativen Erkrankung Amyotrophe laterale Sklerose (ALS) das Enzym eine Vielzahl an verschiedenen Mutationen in der Aminosäuresequenz aufweist. Wie genau die Mutationen die Krankheit begünstigen und unterstützen, ist noch nicht vollständig erforscht. Eine Theorie ist jedoch, dass auf Grund der Mutation anstelle von ausschließlich Wasserstoffperoxid nun zusätzlich proteinverändernde Peroxynitrite produziert werden könnten (Maragakis and Rothstein 2007). Der komplette Verlust von SOD1 hingegen führt in *Drosophila* zu einem Anstieg an spontanen DNA-Schäden sowie einer verkürzten Lebensdauer (Woodruff *et al.* 2011) und in Mäusen neben einer ebenfalls deutlich verkürzten Lebenszeit zu der Ausbildung von Lebertumoren, begünstigt durch starke oxidative Schäden (Elchuri *et al.* 2005). Andererseits wird bei der Anwesenheit von SOD1 eine Reduktion von strahlungsinduzierten späten Nebenwirkungen im Lungengewebe (Verlust des Epithelgewebes, Fibrose etc.) vermutet. Bei den durchgeführten Versuchen wird angenommen, dass die gezeigten radioprotektiven Effekte auf das von mMSCs produzierte und parakrin wirkende SOD1 zurückzuführen ist (Klein *et al.* 2017).

1.5.2. Peroxiredoxin-1

Peroxiredoxin-1 (PRDX1) ist eine 22,1 kDa große Peroxidase, welche ubiquitär in hohen Leveln exprimiert wird und im Cytoplasma, Nukleus, Mitochondrien und Peroxisomen vorliegt. Ihre Aufgabe ist die Reduktion von zellschädigenden Oxidantien wie H_2O_2 , organischen Hydroperoxiden und Peroxynitriten zu Alkoholen und Wasser, um so oxidativen Stress zu eliminieren. Die katalytische

Funktion wird von zwei konservierten Cystein-Resten, eines N- und eines C-Terminal, ausgeführt, wobei ein Dimer über Disulfidbrücken gebildet wird (online Referenz 14; Neumann *et al.*, 2009). Anschließend wird das PRDX1 durch den Fortlauf des katalytischen Zyklus unter Beteiligung von Thioredoxin, Thioredoxin Reduktase und NADPH wieder in seine Ausgangsform gebracht (Rhee *et al.* 2005). Im Gegensatz zu SOD1 ist PRDX1 in der Lage, organische Hydroperoxide zu reduzieren, die zum größten Anteil den oxidativen Stress durch ionisierende Strahlung verursachen. 2020 konnte die Gruppe um Sharapov bereits zeigen, dass alleine durch eine intravenöse Verabreichung von rekombinantem PRDX1 (20 µg/g) 15 min vor letaler Bestrahlung 90 % der Tiere (Mäuse) überlebten und die Hämatopoese (Konzentration von Leukozyten, Granulozyten und Thrombozyten normalisiert) wiederhergestellt werden konnte (Sharapov and Gudkov 2020).

1.5.3. Galectin-1

Galectin-1 (GAL1) ist ein 14,5 kDa großes Lectin, welches zur Familie der β -Galactoside-bindenden Proteine gehört und vor allem das Disaccharid N-Acetylactosamin von Glykoproteinen an Zelloberflächen bindet (Barondes *et al.* 1994). Es ist evolutionär zwischen verschiedenen Spezies hoch konserviert, vor allem in der Kohlenhydrat-erkennenden Domäne, und entwickelt seine biologische Aktivität als Homodimer. Nach der Synthetisierung verbleibt es entweder im Cytoplasma, wo es durch Protein-Protein Interaktionen intrazelluläre Vorgänge regelt oder wandert in den Nukleus, wo angenommen wird, dass es Protein-DNA Interaktionen stabilisiert sowie an pre-mRNA Splicing teilnimmt. Es kann auch sezerniert werden und bindet dann wie bereits erwähnt vor allem Glykoproteine an der Zellmembran (Thiemann and Baum 2016). Auf Grund einer ubiquitären Expression und dem Vorliegen in verschiedenen Zellkompartimenten sowie dem extrazellulären Raum, ist GAL1 an einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen, wie der Regulation von Apoptose, Zellzyklus, Zelladhäsion und -migration, beteiligt (Džopalić *et al.* 2020). Von besonderem Interesse sind für diese Arbeit die Beeinflussung der hämatopoetischen Differenzierung sowie die immunmodulierende Wirkung von GAL1 (Camby *et al.* 2006). So wurde entdeckt, dass geringe Konzentrationen von GAL1 die Differenzierung der HSCs und HSPs unterstützten, während ab 10 µg/ml die Proliferation stark gehemmt wird und GAL1 eine pro-apoptotische Wirkung zeigt (Vas *et al.* 2005). Unter physiologischen Bedingungen bewahrt GAL1 die Homöostase der Immunantwort, sowohl parakrin als auch autokrin, durch Interaktionen mit verschiedenen Immunzellen. Hauptanteilig reagiert es dabei anti-inflammatorisch und immunsuppressiv, kann jedoch auch unter bestimmten Umständen, den gegenteiligen Effekt bewirken (Cutine *et al.* 2021). Es konnte beispielsweise mehrfach gezeigt werden, dass hohe GAL1 Konzentrationen bei aktivierten T-Zellen Apoptose induzieren sowie dafür sorgen, dass die IL-2-Produktion gehemmt wird und die IL-10-Produktion ansteigt. Die Inhibition der T-Zellen könnte auch als Erklärung dafür dienen, dass unter GAL1-Gabe die Entwicklung und das Fortschreiten von Autoimmunerkrankungen sowie GvHD verhindert wird (Camby *et al.* 2006). Eine weitere für unsere Anwendung zweckdienliche Funktion von GAL1 ist, dass dieses anscheinend an dem DNA-Reparatur-Mechanismus nach Bestrahlung beteiligt ist (E.Y. Huang *et al.* 2012).

1.6. Lentivirale Vektoren

Lentivirale Vektoren werden – wie der Name schon erahnen lässt – von Lentiviren abgeleitet. Lentiviren gehören zu der Familie der *Retroviridae* und in die Unterfamilie der *Orthoretrovirinae* zusammen mit den α - bis ϵ -Retroviren. Sie besitzen eine hohe Speziespezifität, wobei als Wirte bis jetzt ausschließlich Säugetiere wie Primaten, Equine, Bovine, Feline und Ovine/Caprine bekannt sind (Modrow *et al.* 2010). Die viralen Partikel sind von sphärischer Form (\emptyset 100 nm). Das diploide einzelsträngige (ss) RNA-Genom ist zusammen mit den viralen Enzymen Integrase (IN), reverse Transkriptase (RT) und Protease von einem Kapsid umschlossen, welches wiederum durch eine mit Matrixprotein ausgekleidete Lipidmembran umhüllt wird. Diese Hüllmembran ist von der Cytoplasmamembran des Wirtes abgeleitet und enthält zwei Virus spezifische Glykoproteine (ENV; engl.: *envelope protein*), welche den Tropismus des entsprechenden Lentivirus vorgibt (Dufait *et al.* 2012).

In der Wissenschaft wurden anhand dieser Lentiviren rekombinante Gentransfer-Vektoren abgeleitet, um mit diesen definiertes genetisches Material in Zielzellen zu schleusen, welches die Genexpression spezifisch in diesen Zellen verändert. Je nach verwendetem Material können so Zellen für eine Nachverfolgbarkeit mittels Reportergenen markiert oder selektierbar gemacht werden sowie Überexpressionsstudien durchgeführt oder gezielt Gene, z.B. durch einbringen einer shRNA, runterreguliert werden. Der Vorteil an der Verwendung von viralen Vektoren ist im Allgemeinen, dass das einzuschleusende genetische Material vor Nukleaseabbau geschützt vorliegt und je nach Anwendungszweck das geeignetste Vektorsystem ausgewählt werden kann (Alberts *et al.* 2007). Je nach Virusabstammung wird somit ein effizientes Einschleusen des genetischen Materials in die jeweils gewünschten Zielzellen, der anschließende Transport in den Nukleus und schlussendlich die Expression begünstigt (Dropulić, 2011). Zusätzlich bieten lentivirale Vektoren den Vorteil, dass sie ihr virales RNA-Genom mittels viraler RT in DNA umschreiben und anschließend mit Hilfe ihrer Integrase stabil in das Wirtsgenom integrieren, was eine lebenslange stabile Expression ermöglicht. Das Besondere bei lentiviralen Vektoren ist, dass diese sogar ruhende Zellen manipulieren können, wohingegen mit anderen Systemen nur sich teilende Zellen erreicht werden (Gallay *et al.*, 1995; Naldini *et al.*, 1996). Außerdem besitzen lentivirale Vektoren im Vergleich zu anderen Retroviren nur eine geringe Insertionsmutagenesefrequenz (Modlich *et al.* 2009).

Grundvoraussetzung für virale Vektoren, insbesondere wenn eine klinische Anwendung angestrebt wird, ist eine möglichst geringe bis keine Toxizität und dass sie vor allem keine pathogenen Eigenschaften des Ursprungsvirus mehr aufweisen. Demzufolge müssen bei der Entwicklung viraler Vektoren alle schädlichen Elemente, die den Replikationszyklus ermöglichen würden, entfernt, aber gleichzeitig die gewünschten Eigenschaften, wie die Integrationsfähigkeit, beibehalten werden. Lentivirale Vektoren werden hauptsächlich von dem hoch humanpathogenen HIV-1 abgeleitet für welchen es bis heute keine Möglichkeit der vollständigen Heilung gibt. Es können lediglich durch starke Medikamente die Viruslast und damit die Krankheit an sich unterdrückt werden, wodurch die Lebensqualität verbessert und die Lebensdauer verlängert wird. Somit ist es in diesem Fall besonders wichtig zu verhindern, dass aus einem zur Heilung generierten Vektor wieder ein replikationsfähiger humanpathogener womöglich tödlicher Virus wird. Eine solche Umkehr wäre bei nicht ausreichender Veränderung von HIV-1 abgeleiteten lentiviralen Vektoren sehr wahrscheinlich, da HIV-1 als RNA Virus eine hohe Rekombinationsrate besitzt. Bei einer Infektion mit einem anderen Retrovirus könnte es somit

zu einer Rekombination zwischen Vektorsequenz und retroviralem Genom kommen, was im schlimmsten Fall zu rekombinanten chimären infektiösen Lentiviren führt, die sogar an andere Organismen weitergegeben werden könnten (Pluta and Kacprzak 2009; Simon-Loriere and Holmes 2011; Escors *et al.* 2012). Dementsprechend wurden die Vektoren über die Zeit immer weiterentwickelt, um die Effizienz und biologische Sicherheit zu optimieren (Poznansky *et al.* 1991; Parolin *et al.* 1994; Naldini *et al.* 1996). Heutzutage wird mit lentiviralen Vektoren der dritten Generation gearbeitet. Zur Gewährleistung der Sicherheit wurden die essentiellen strukturellen und enzymatischen Gene für den Replikationszyklus Gag (codiert Link-, Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsid-Proteine), Pol (codiert RT, IN und Protease), Env (codiert transmembranes und äußeres Glycoprotein) sowie weitere cis-Elemente (akzessorische und regulatorische Gene) aus dem Genom entfernt und an deren Stelle z.B. eine Transgenkassette oder neue hilfreiche cis-Elemente, die die Effizienz steigern, inseriert. Der so erhaltene Transgenvektor enthält somit nur noch das Transgen sowie alle für die reverse Transkription, Integration, Transkription und Verpackung essentiellen cis-aktiven Elemente, welche in Tab. 2 aufgelistet sind (Naldini *et al.* 1996; Zufferey *et al.* 1999; Sirven *et al.* 2000; Modrow *et al.* 2010).

Tab. 2: Cis-aktive Elemente des Transgenvektors und ihre jeweilige Funktion.

Cis-aktives Element	Funktion
Ψ (Verpackungssignal)	Signal für Verpackung des viralen RNA-Genoms in neue Virione
wPRE (engl.: <i>woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element</i>)	Erhöht Virustiter und steigert Transgenexpression
PB (Primerbindungsstelle)	Start der reversen Transkription
cPPT (engl.: <i>central polypurine tract</i>)	Titersteigerung und Erhöhung der Transduktionseffizienz
RRE (engl.: <i>rev-response-element</i>)	Bindungsstelle für den REV Transaktivator, wodurch virale mRNA bevorzugt aus dem Kern exportiert und Translation gefördert wird

Zusätzlich wurde die Sicherheit dahingehend erhöht, dass der Provirus schlussendlich durch zwei SIN-LTRs (engl.: *self-inactivating-long terminal repeats*) flankiert wird. Die SIN-LTR-Bereiche bestehen aus einer mutierten U3-Region gefolgt von der ursprünglich viralen R- und U5-Region. Trotz der Veränderungen in der U3-Region werden die SIN-LTR Strukturen weiterhin von der Integrase erkannt und der Provirus in das Wirtsgenom integriert. Es wurden lediglich die Enhancer- und Promotorsequenz aus der U3-Region entfernt, die für die virale Transkription und Genexpression und somit der Produktion neuer viraler Bestandteile zuständig sind. Zusätzlich wurde der entfernte U3 Promotor durch einen starken viralen Promotor wie z.B. CMV ersetzt, um weiterhin eine Expression der im Provirus neu inserierten Gene zu gewährleisten. Die Vorteile an diesen Veränderungen sind, dass die Expression jetzt vollständig unabhängig von dem lentiviralen Transaktivator TAT verläuft und zusätzlich hohe Transkriptionslevel und Virustiter erzielt werden (Zufferey *et al.* 1997; Srinivasakumar 2001). Durch die Verwendung von SIN-LTRs wird die Wahrscheinlichkeit reduziert, dass replikationsfähige rekombinante HIV-ähnliche Viren entstehen, eine Transaktivierung von Wirtsgenen (z.B. Onkogene) am Integrationsort durch Promotoraktivität der LTRs vorliegt oder die integrierten Vektoren durch vorliegenden Wildtyp-Virus mobilisiert werden. Außerdem verringert es transkriptionelle Interferenzen und Suppressionen der LTRs. Die beschriebenen Transgenvektoren der 3. Generation sind zwar replikationsunfähig, jedoch weiterhin dazu befähigt Zellen zu infizieren und dort stabil ins Wirtsgenom zu integrieren. Zur Herstellung solcher Transfervektoren werden zusätzlich drei Helfervektoren benötigt. Diese beinhalten nun die essentiellen viralen trans-Elemente und besitzen im Gegensatz zum Transfektor kein Verpackungssignal und LTR-Bereiche, wobei die Expression stattdessen durch

einen starken konstitutiven viralen Promotor gewährleistet wird (Sakuma *et al.* 2012). Der Verpackungsvektor enthält die Gene für Gag und Pol. Hinzu kommt noch ein Rev-kodierender Vektor (Rev - engl.: *regulator of expression of virion proteins*, Transaktivator), der benötigt wird, da REV essentiell für die Replikation und somit den Erhalt von hohen viralen Titern ist (Dull *et al.* 1998). Das ebenfalls essentielle Env-Gen liegt separat auf einem dritten Vektor vor, dem sogenannten Hüllvektor, der den Tropismus für das Virus festlegt. HIV-1 zum Beispiel codiert ENV-Glykoproteine, welche an den CD4-Rezeptor mit einem entsprechenden Co-Rezeptor (CCR5/CXCR4) binden. Dieses lässt somit nur eine sehr eingeschränkte Verwendbarkeit zu (Landau *et al.* 1988; Weiss 2000). Da gezeigt wurde, dass eine Pseudotypisierung, also die Verwendung von Glykoproteinen anderer Viren, zu ebenfalls funktionsfähigen infektiösen viralen Partikeln führt, kann somit ein breiteres Wirtsspektrum erreicht werden (Cronin *et al.* 2005). In dieser Arbeit wurden ausschließlich lentivirale Vektoren verwendet, die mit dem ECO-ENV-Glykoprotein pseudotypisiert waren. Dieses Glykoprotein stammt von dem ecotropen murinen Leukämievirus und kann alle in dieser Arbeit verwendeten murinen Zellen infizieren (Jenkins *et al.* 1982; Morita *et al.* 2000).

1.6.1. Lentivirale „Gene Ontology“-Vektoren

Bei den Versuchen, die dieser Dissertationsschrift zu Grunde liegen, wurde sogenannte lentivirale „Gene Ontology“ (LeGO)-Vektoren verwendet. Diese wurden 2008 von Weber *et al.* auf der Basis des LeniLox 3.7 Vektors (lentiviraler Vektor der 3. Generation) von Rubinson *et al.* 2003 entwickelt (Rubinson *et al.* 2003; Weber *et al.* 2008). Der Transfervektor enthält alle wie in Absatz 1.6 beschriebenen Elemente. Demzufolge ist sein Aufbau als Provirus, wie in Abb. 8 gezeigt. Am 5'-Ende beginnt er mit dem SIN-LTR Bereich, in welchen der U3-Promotor durch den starken konstitutiven Cytomegalievirus pol-II (CMV) Promotor ersetzt wurde (nicht gezeigt) und eine effiziente Expression des Transgenvektors bei der Virusproduktion gewährleistet. Es folgen die essentiellen cis-aktiven Elemente ψ und RRE sowie das zusätzlich integrierte cPPT für den Erhalt höherer Titer und Steigerung der Transduktionseffizienz. Anschließend kommt eine monocistronische Transgenkassette, welche aus einer variabel auswählbaren shRNA (Ω) und dem für die shRNA Expression benötigten davor geschalteten RNA Polymerase-III Promotor der U6-RNA (U6) besteht. Diese Kassette ermöglicht eine gezielte Runterregulation eines ausgewählten Gens in den mit dem Vektor infizierten Zellen. Um hingegen ein Zielgen exprimieren zu können, wurde als Zweites eine multicistronische Kassette in den Vektor integriert, welche durch zwei flankierende LoxP-Seiten die Möglichkeit bietet, sie nach der stabilen Integration ins Wirtsgenom bei Bedarf wieder mittels einer CRE-Rekombinase zu entfernen. Die multicistronische Transgenkassette wird durch einen SFFV (engl.: *spleen focus-forming virus*)-Promotor mit hoher Expressionseffizienz reguliert. Ein beliebiges Transgen lässt sich anschließend einfach unter Verwendung der multiplen Klonierungsstelle (MCS; engl.: *multiple cloning site*) integrieren und wird mittels einer Enzephalitismyocarditis Virus abgeleiteter interner ribosomaler Eintrittsstelle (IRES) von einem Fluoreszenz- oder Selektionsmarker, oder einem Fusionsprotein aus beiden, getrennt. Dieser Kassettenaufbau gewährleistet sowohl eine effiziente Expression des Transgens, als auch durch den Einsatz von Fluoreszenz-/Selektionsmarkern eine Identifikation/Selektion der transduzierten Zellen. Diese können im Übrigen auch für die shRNA Expression genutzt werden. In diesem Fall wird kein Transgen in die zweite Kassette integriert sowie die IRES entfernt, wodurch

lediglich die Fluoreszenz-/Selektionsmarkern exprimiert werden. Da bei beiden Transgenkassetten alle enthaltenen Elemente durch einzigartige Restriktionsschnittstellen flankiert sind, können diese, wie bei einem Baukastensystem, alle entweder komplett entfernt oder gegen andere Sequenzen problemlos ausgetauscht werden. Zum Abschluss enthält der Transgenvektor ebenfalls zur Titer- und Expressionssteigerung ein wPRE Element gefolgt von dem 3'-SIN-LTR Bereich (Weber *et al.* 2008).

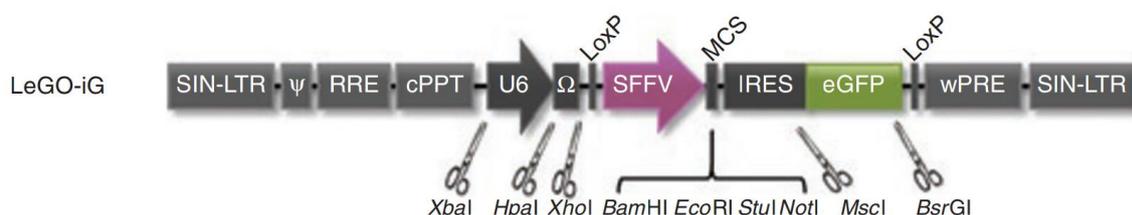


Abb. 8: Aufbau eines LeGO-Vektors mit shRNA und co-exprimiertem Transgen mit Fluoreszenzmarker. Durch die einzigartigen Restriktionsschnittstellen (als Schere gekennzeichnet) können alle Elemente einzeln oder eine ganze Transgenkassette entfernt oder durch andere Sequenzen ausgetauscht werden. Ebenso können ausgewählte Transgene problemlos mittels MSC in die multicistronische Kassette integriert und für eine anschließende Selektierbarkeit transduzierter Zellen zusammen mit einem Fluoreszenzprotein, wie dem eGFP, exprimiert werden. Die monocistronische Transgenkassette hingegen erlaubt die Runterregulationsstudien durch eine integrierte shRNA.

SIN-LTR: selbst-inaktivierende *long terminal repeat*; ψ : Verpackungssignal; RRE: *rev-responsive element*; cPPT: *central polypurine tract*; U6: RNA pol-III Promotor der U6-RNA; Ω : shRNA; SFFV: Promotor des *spleen focus-forming virus*; MCS: multiple Klonierungsstelle; IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle; eGFP: *enhanced green fluorescent protein*; wPRE: *Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element*.

Weber *et al.* © 2008. *Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivatives License (CC BY NC ND)*.

1.6.2. RNA-Interferenz mittels *short hairpin RNA*

Short hairpin RNA (shRNA) ist eine künstlich erzeugte kurze asymmetrische doppelsträngige RNA von 19 – 29 Basenpaaren (Stamm) mit einem 3'-Überhang von 2 Basen, bei der die beiden komplementären Stränge durch eine einzelsträngige Schlaufe (engl.: *Loop*) von 4 – 10 Basen miteinander verbunden sind. Somit entsteht das Bild einer Haarnadel, welches zur Namensgebung der RNA führte (Kim and Rossi, 2007). Die einer shRNA zugrunde liegende Nukleotidsequenz wird in virale Vektoren integriert, um anschließend in Zielzellen transportiert, im Falle von lentiviralen Vektoren dort sogar stabil ins Genom integriert, und dann exprimiert zu werden, um eine posttranskriptionale Genstilllegung zu bewirken (schematischer Verlauf in Abb. 9 gezeigt) (O'Keefe 2013). Die Expression wird mittels eines RNA-Polymerase III Promotors gesteuert, wie z.B. dem U6-Promotor. Nach der Expression wird die shRNA aus dem Nukleus mittels Exportin 5 ins Cytoplasma transportiert, dort vom Dicer (Endonuklease des RNase-III-Typs) auf Grund der spezifischen 3'-Überhänge erkannt und zu einer doppelsträngigen komplementären 19 Basenpaar langen *small interfering RNA* (siRNA) prozessiert, an deren beiden Enden sich zusätzlich ein 3'-Dinukleotidüberhang befindet (Kurreck *et al.* 2008; Miest *et al.* 2009; O'Keefe 2013). Unter Zuhilfenahme meist mehrerer verschiedener dsRNA-bindender Proteine, wird die siRNA von dem Dicer an ein Argonaut Protein (AGO) gebunden. In diesem Beladungsprozess wird bereits entschieden, welcher der beiden Stränge der siRNA als *guide* Strang und welcher als *passenger* Strang dient. Es wird angenommen, dass die Auswahl anhand der Thermodynamik der Stränge getroffen wird, wobei der Strang mit dem instabileren 5'-Ende als *guide* vom AGO gebunden wird. Der *passenger* Strang hingegen wird entfernt und abgebaut (Mittal 2004; Wilson and Doudna 2013). Der so gebildete Multikomponenten-Nuklease-Komplex, welcher endogener RNA-*inducing silencing complex* (RISC) genannt wird, sorgt nun für die Stilllegung/Runterregulation derjenigen mRNA, zu welcher der

eingebaute siRNA Strang komplementär ist. Nachdem eine komplett komplementäre Bindung mittels Basenpaarung zwischen *guide* siRNA und Ziel-mRNA aufgebaut wurde, wird die Zielsequenz durch die AGO-Nukleaseaktivität (wobei in Säugetieren nur AGO2 katalytisch aktiv ist) zerschnitten (Liu *et al.* 2004). Anschließend wird die zerschnittene mRNA durch andere zelluläre Exonukleasen weiter abgebaut und RISC wieder freigegeben, um anschließend wiederum erneut eine komplementäre mRNA zu finden und zu zerschneiden (Farrell 2010).

Die Anwendung von RNA-Interferenz ermöglicht somit, wie z.B. mit shRNAs, vor allem in Kombination mit lentiviralen Vektoren, eine stabile Runterregulation/Stilllegung des jeweiligen Zielgens auf mRNA-Ebene, welches in der Forschung eine Vielzahl an Anwendungen findet. So wird RNA-Interferenz standardmäßig zur Funktionsbestimmung neu entdeckter Gene herangezogen, zur Aufklärung von Stoffwechselwegen bzw. wie in dieser Arbeit zur Aufklärung der Beteiligung an biologischen Prozessen oder um neue Ansatzpunkte für die Entwicklung von Therapeutika zu finden. Im letzten Fall wird eine sogenannte reverse Genetik durchgeführt, bei der durch parallele Runterregulation vieler verschiedener mRNAs nach einem aberranten Phänotyp gesucht wird. Das Auftreten eines solchen erlaubt dann den Rückschluss, dass das Stilllegen des entsprechenden Gens an der Aberration maßgeblich beteiligt ist und somit mitverantwortlich für z.B. eine bestimmte Krankheit sein könnte (Kurreck *et al.* 2008). Erleichtert werden solche Untersuchungen durch das Vorliegen von umfangreichen lentiviralen shRNA Bibliotheken, die sowohl alle humanen als auch alle murinen Gene beinhalten (Dropulić 2011). Zur Generierung von effizienten und funktionsfähigen shRNAs hilft die Kenntnis darüber, dass ein instabiles 5'-Ende sowie weitere wichtige Eigenschaften, welche unter anderem von Mittal 2004 zusammengefasst wurden, dazu führen, dass dieser Strang als *guide* im RISC dient. Ob dies schlussendlich auch wirklich erfolgreich ist und ein effektives Stilllegen der Ziel-mRNA ermöglicht, kann nur nach der Anwendung anhand von Western Blot Analysen oder anderen immunologischen Techniken (z.B. ELISA) und einer quantitativen Echtzeit PCR validiert werden (Mittal 2004; Farrell 2010; Moore *et al.* 2010).

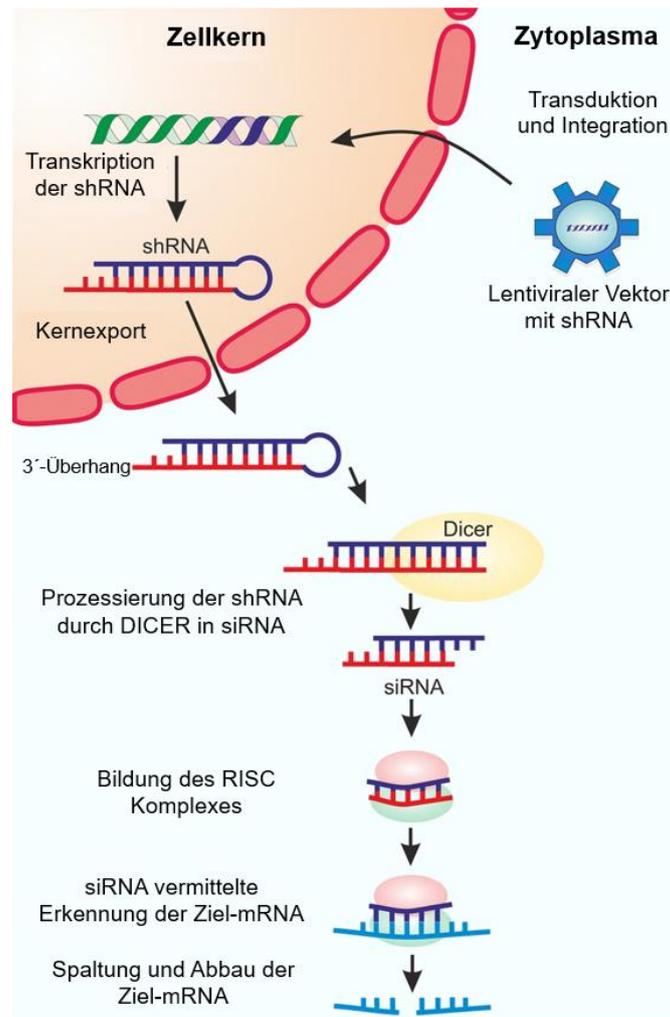


Abb. 9: Schematischer Verlauf der RNA-Interferenz ausgehend von einer shRNA. Die künstlich erzeugte shRNA wird mittels lentiviraler Transduktion in die Zielzellen gebracht, ins Wirtsgenom (grün) stabil integriert und von dort aus exprimiert (blauer Genabschnitt). Die gebildete haarnadelförmige shRNA wird durch die Anwesenheit von Exportin 5 aus dem Zellkern ins Cytoplasma transportiert, wo sie vom Dicer zu siRNA prozessiert wird. Der *guide* Strang der siRNA wird anschließend in RISC ein- und der *passenger* Strang abgebaut. RISC wird anhand des *guide* Stranges zur Zielsequenz einer vollständig komplementären mRNA geleitet. Diese wird zerschnitten und abgebaut, wodurch keine Translation stattfindet. Entnommen und modifiziert nach Barrass and Butcher, © 2019. Creative Commons CC BY license.

1.7. Ziel der Arbeit

Ein akutes Strahlensyndrom ist sowohl die Folge von Strahlenunfällen, als auch von Radiotherapien, bei denen ein Großteil oder der ganze Körper in kurzer Zeitspanne hohen Dosen ionisierender Strahlung ausgesetzt ist. Auf Grund der Vielzahl von teilweise sehr schweren Nebenwirkungen wie z.B. einer irreversiblen Myelosuppression geht dies mit hohen Mortalitäts- und Morbiditätsraten einher (Leiper 1995; Dörr and Meineke 2011; Macià i Garau *et al.* 2011). Ab einer Ganzkörperbestrahlung von 10 Gy ist ein Überleben trotz sofortiger medizinischer Hilfe aussichtslos (López and Martín 2011). Bei Strahlendosen unter 10 Gy hingegen kann eine medizinische Versorgung das Überleben begünstigen. Allerdings sind bei einer irreversiblen Myelosuppression bis heute Stammzell- oder Knochenmarktransplantationen die einzigen Behandlungsmethoden, welche jedoch ebenfalls schwere Nebenwirkungen wie GvHD mit hohen Mortalitäts- und Morbiditätsraten zur Folge hat (Waselenko *et al.* 2004; Barton-Burke *et al.* 2008; Mohty and Mohty 2011). Von diesem Standpunkt aus ist eine Reduktion

der Nebenwirkung von enormer klinischer Bedeutung. Auf Grund der bisher erfolgten Forschung, erwiesen sich bisher zumindest im Mausmodell murine mesenchymale Stromazellen (mMSCs) und deren sezernierte extrazelluläre Vesikel (EVs) für dieses Vorhaben als geeignete Kandidaten. Sowohl eine mMSC-Transplantation als auch die alleinige Verabreichung von mMSC-EVs in letal bestrahlte Empfängertiere führte zu einer kompletten Wiederherstellung der Hämatopoese, welche zuvor nur durch HSC-Transplantation erreicht wurde (Lange *et al.* 2011; Yang *et al.* 2012; Lange *et al.* 2015; Wen *et al.* 2016). Außerdem zeigten beide Transplantationen ein Langzeitüberleben der bestrahlten Tiere, wohingegen unbehandelte letal bestrahlte Tiere innerhalb eines Monats verstarben. Die Ergebnisse der mMSC- und mMSC-EV-Transplantation unterschieden sich lediglich darin, dass mMSC-EVs kaum das Kurzzeitüberleben im ersten Monat unterstützen (Lange *et al.* 2015). Dies wiederum war kongruent zu *in vitro* Daten, bei denen mit mMSC-EVs keine HPC-, aber eine deutliche HSC-Radioprotektion detektiert wurde (Schoefinius *et al.* 2017). EVs bieten im Gegensatz zu den parentalen Zellen den Vorteil, dass sie robuster gegenüber Ein- und Auftauzyklen sind sowie keine Gefahr einer unkontrollierten oder unerwünschten Vermehrung nach einer Transplantation im jeweiligen Organismus besteht. Somit bieten EVs mehr Sicherheit in der therapeutischen Anwendung als eine Zelltransplantation (Lener *et al.* 2015). Dadurch konzentrierte sich insbesondere in unserer Arbeitsgruppe die weitere Forschung bzgl. der Radioprotektion von letal bestrahlten HSCs/HPCs auf mMSC-EVs. Unter anderem stand die Frage, welche in den EVs enthaltenen Moleküle für die protektiven Effekte verantwortlich sind, im Vordergrund. Als erster Schritt zur Beantwortung dieser Frage wurde bereits eine Proteomanalyse an den mMSCs-EVs durchgeführt und anschließend aus den detektierten Proteinen anhand ihrer biologischen Funktionalität drei vielversprechende Kandidaten ausgesucht, die an der Radioprotektion beteiligt sein könnten (Lange *et al.*, unveröffentlichte Daten). Dementsprechend war das Ziel dieser Arbeit weitergehend den Mechanismus zu untersuchen wie mMSC-EVs letal bestrahlte mHSCs protektieren können, um langfristig alle beteiligten Komponenten zu entschlüsseln, wodurch die Basis für die Entwicklung einer effizienten und sicheren Behandlungsform gegeben wäre. In diesem Zusammenhang sollten in dieser Arbeit durch geeignete *in vitro* und *in vivo* Experimente bereits folgende drei Fragestellungen, die auf Grund der bereits vorangegangenen Versuche noch offen waren oder sich erst durch diese gestellt haben, beantwortet werden:

1. Welches sind *in vivo* die Zielzellen – findet die Protektion direkt über HSCs/HPCs oder indirekt über bis jetzt noch unbekanntere andere Zellen, wie z.B. Immunzellen, statt – für die nach letaler Bestrahlung transplantierte mMSC-EVs, insbesondere im Knochenmark?
2. Sind die drei basierend auf der Proteomanalyse ausgewählten, vielversprechenden Kandidaten (SOD1, PRDX1 und GAL1) tatsächlich an der Protektion letal bestrahlter HSCs beteiligt?
3. Welche mRNAs werden neben den bereits identifizierten Proteinen mittels mMSC-EVs transportiert?

2. Material und Methoden

2.1. Material

Alle für diese Arbeit benötigten Materialien sind nachfolgend aufgelistet und wurden nach Verwendung den jeweiligen Sicherheitsvorgaben entsprechend entsorgt.

2.1.1. Verbrauchsmaterialien

Tab. 3: Auflistung der Verbrauchsmaterialien. In Einzelfällen wurden neben Herstellerangabe und Artikelnummer, wenn vorhanden, zusätzliche Informationen über den genauen Typ gegeben.

Material	Typinformation	Hersteller	Artikelnr.
5 ml Röhrchen		SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)	55.476.013
13 ml Röhrchen		SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)	62.515.006
15 ml Röhrchen	CELLSTAR	Greiner Bio-One GmbH (72636 Frickenhausen, Deutschland)	188271
30 ml Mehrzweckgefäß		Greiner Bio-One GmbH (72636 Frickenhausen, Deutschland)	201170
50 ml Röhrchen	CELLSTAR	Greiner Bio-One GmbH (72636 Frickenhausen, Deutschland)	227264
6-Loch-Zellkulturplatte	CELLSTAR	Greiner Bio-One GmbH (72636 Frickenhausen, Deutschland)	657160
12-Loch-Zellkulturplatte	CELLSTAR	Greiner Bio-One GmbH (72636 Frickenhausen, Deutschland)	665180
24-Loch-Zellkulturplatte	CELLSTAR	Greiner Bio-One GmbH (72636 Frickenhausen, Deutschland)	662160
96 Loch ELISA Microplatte		Greiner Bio-One GmbH (72636 Frickenhausen, Deutschland)	655081
96 Loch Lightcycler Platte		SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)	72.1982.202
Adhäsive qPCR Folie		SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)	95.1999
Chromatographiepapier		Whatman - GE Healthcare (79111 Freiburg, Deutschland)	3030-392
Combitips advanced 0,1 ml		Eppendorf AG (22331 Hamburg, Deutschland)	30089405
Combitips advanced 0,5 ml		Eppendorf AG (22331 Hamburg, Deutschland)	30089421
Combitips advanced 1 ml		Eppendorf AG (22331 Hamburg, Deutschland)	30089430
Combitips advanced 2,5 ml		Eppendorf AG (22331 Hamburg, Deutschland)	30089448
Combitips advanced 5 ml		Eppendorf AG (22331 Hamburg, Deutschland)	30089456
Deckgläschen	18x18 mm	Paul Mariefeld GmbH & Co. KG (97922 Lauda-Königshofen, Deutschland)	101030
Durchflusszytometrierröhrchen 5ml		SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)	55.1579
Feindosierungsspritzen 1 ml	Omnifix-F Luer Solo	B. Braun Melsungen AG (34212 Melsungen, Deutschland)	91614060
Filterpapier Ø 240 mm		Hahnemühle FineArt GmbH (37586 Dassel, Deutschland)	DF 2555240
Filterspitze 0,1 - 20 µl	Biosphere LowRet Fil.Tip 20	SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)	701.116.215
Filterspitze 20 µl	Biosphere Fil.Tip 20	SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)	70.760.213
Filterspitze 100 µl	Biosphere Fil.Tip 100	SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)	70.760.212
Filterspitze 200 µl	Biosphere Fil.Tip 200	SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)	70.760.211
Filterspitze 1000 µl	Biosphere Fil.Tip 1000	SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)	70.762.211
Flaschenaufsatzfilter mit Gewinde	Steritop-GP, 0,22 µm, 500 ml, 45 mm, Polyethersulfon, gamma-sterilisiert	EMD Millipore Corporation (01821 Billerica, USA)	SCGPT05RE

Gefrierbehälter	Nalgene® Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific (02451 Waltham, USA)	5100-0001
Kapillarspitzen		Biozym Scientific GmbH (D-31840 Hess Oldendorf)	729011
Kleiner Sterilfilter	Midisart® 2000 PTFE	Sartorius AG (37079 Göttingen, Deutschland)	17805
Kryoröhrchen	Nunc	Thermo Fisher Scientific (02451 Waltham, USA)	377224
Objektträger	ELKAMED ECO, Kanten geschnitten, mit Mattstreifen beidseitig, CE	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG (97647 Sondheim vor der Rhön, Deutschland)	42406
OP-Tuch	BARRIER	Mölnlycke Health Care GmbH (40237 Düsseldorf, Deutschland)	800330
Parafilm M	4 in. x 125 ft	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	P7793
Pasteurpipetten		VWR International GmbH (64295 Darmstadt, Deutschland)	612-1702
Petrischale	Bio-One Non-Vented Polystyrene Petri Dishes	Greiner Bio-One GmbH (72636 Frickenhausen, Deutschland)	632181
Pipettenspitzen 0,1 - 10 µl	epT.I.P.S. Standard/Bulk	Eppendorf AG (22331 Hamburg, Deutschland)	22492004
Pipettenspitzen 200 µl		SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)	70.760.002
Pipettenspitzen 1000 µl		SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)	70.762
PVDF Membran	Immobilon - P Transfer Membran; Pore Size 0.45µm	EMD Millipore Corporation (01821 Billerica, USA)	IPVH00010
Reaktionsgefäß 0,2 ml	Multiply-Pro Gefäß	SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)	72.737.002
Reaktionsgefäß 0,5 ml		SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)	72.699
Reaktionsgefäß 1,5 ml	SafeSeal	SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)	72.706.200
Reaktionsgefäß 1,5 ml		SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)	72.690.001
Reaktionsgefäß 1,5 ml	DNA LoBind Tubes	Eppendorf AG (22331 Hamburg, Deutschland)	0030108051
Reaktionsgefäß 2 ml	Safe-Lock Tubes	Eppendorf AG (22331 Hamburg, Deutschland)	0030120094
Reaktionsgefäßkette 0,2 ml	Multiply®-µStrip Pro 8er Kette	SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)	72.991.002
Röntgenfilme (medizinische)	CEA RP NEW	Agfa HealthCare NV (2640 Mortsel, Belgien)	222101
Serologische Pipette 2 ml		SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)	86.1252.001
Serologische Pipette 5 ml		SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)	86.1253.001
Serologische Pipette 10 ml		SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)	86.1254.001
Serologische Pipette 25 ml	Falcon	Corning International (14831 New York, USA)	356525
Shandon™ Cytoclip™ Stainless- Steel Slide Clip		Shandon INC (15275 Pittsburgh, USA)	59910052
Shandon™ Einfach-Cytofunnel™ mit weißen Filterkarten		Shandon INC (15275 Pittsburgh, USA)	5991040
Sicherheitsaufziehkanülen	BD™ Blunt Fill 18Gx 1 1/2", 1,2 mm x 40 mm	BD (69126 Heidelberg, Deutschland)	303129
Sicherheitsinjektionskanülen	BD Eclipse 21Gx 1 1/2", 0,8 mm x 40 mm	BD (69126 Heidelberg, Deutschland)	305895
Spritzenvorsatzfilter (Ø 0,45 µm)	Puradisc™ FP 30/0.45 CA-S Filter Unit	Whatman - GE Healthcare (79111 Freiburg, Deutschland)	10462100
Spritzenvorsatzfilter (Ø 0,2 µm)	Puradisc™ FP 30/0.2 CA-S Filter Unit	Whatman - GE Healthcare (79111 Freiburg, Deutschland)	10462200
Spritzenvorsatzfilter (Ø 0,1 µm)	MILLEX VV PVDF Durapore® Membrane 0,1µm	EMD Millipore Corporation (01821 Billerica, USA)	SLVV033RS
Stericlin® Klarsichtbeutel ohne Seitenfalte aus Papier und Folie	15x30 cm	Vereinigte Papierwarenfabriken GmbH (91555 Feuchtwangen, Deutschland)	3FKFB210140
Viergeteilte Platte	CELLSTAR® FourWell Plate	Greiner Bio-One GmbH (72636 Frickenhausen, Deutschland)	96077307
Zellkulturflasche 25 cm ²	CELLSTAR® TC, FILTER- SCHRAUBVERSCHLUSS	Greiner Bio-One GmbH (72636 Frickenhausen, Deutschland)	690175

Zellkulturflasche 25 cm ²	Falcon	Corning International (14831 New York, USA)	353014
Zellkulturflasche 75 cm ²	CELLSTAR TC, FILTER-SCHRAUBVERSCHLUSS	Greiner Bio-One GmbH (72636 Frickenhausen, Deutschland)	658175
Zellkulturflasche 175 cm ²	TC-Flasche T175, Stand., Bel. K.	SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)	83.3912.002
Zellkulturflasche mit mehreren Ebenen 875 cm ²	Falcon TC, 5-Ebenen a 175 cm ²	BD Biosciences (01730 Bedford, USA)	353144
Zellkulturflasche mit mehreren Ebenen 1264 cm ²	Nunc EasyFill Cell Factory Systeme, 2 Ebenen a 632cm ²	Thermo Fisher Scientific (02451 Waltham, USA)	140250
Zellkulturflasche mit mehreren Ebenen 2528 cm ²	Nunc EasyFill Cell Factory Systeme, 4 Ebenen a 632cm ²	Thermo Fisher Scientific (02451 Waltham, USA)	140360
Zellkulturschale	TC-Schale, 100 Standard	SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)	83.3902
Zellsieb 30 µm	sterile single-pack CellTrics® filters	Sysmex Deutschland GmbH (22848 Norderstedt, Deutschland)	04-004-2326
Zellsieb 70 µm	Falcon 352350	Thermo Fisher Scientific (02451 Waltham, USA)	10788201
Zellsieb 100 µm	Falcon 352360	Thermo Fisher Scientific (02451 Waltham, USA)	10282631
Zentrifugenflaschen mit Dichtungsverschluss	Nalgene™ PPCO	Thermo Fisher Scientific (02451 Waltham, USA)	3141-0250

2.1.2. Chemikalien

Tab. 4: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Substanzen mit Herstellerangabe und Artikelnummer.

Substanzen	Hersteller	Artikelnr.	MW
1, 4 Dithiothreitol (DTT)*	biomol (22525 Hamburg, Deutschland)	4010.25	154,25
2-Mercaptoethanol [50 mM]	Gibco by life technologies: Fisher Scientific GmbH (58239 Schwerte, Deutschland)	31350-010	
2-Mercaptoethanol mind. [98 %]	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	M3148	78,13
2-Propanol	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	59304-1L-F	60,10
6X DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific (02451 Waltham, USA)	R0611	
Aceton	J.T.Baker (7418 AM Deventer, Niederlande)	8002	58,08
Alcian-Blau 8 GX	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	A-5268	1298,86
ALGENEX PLUS	TETENAL Europe GmbH (22844 Norderstedt, Deutschland)	104575	
Ambion nukleasefreies Wasser (nicht mit DEPC behandelt)	Invitrogen: Thermo Fisher Scientific GmbH (02451 Waltham, USA)	AM9937	
Ammoniumperoxidsulfat (APS)**	Merck (64271 Darmstadt, Deutschland)	1.01201	228,20
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	9718	53,49
antifect N liquid	Schülke & Mayr (22851 Norderstedt, Deutschland)	113940	
Aprotinin [10 mg/ml] from bovine lung saline solution, 3-7 TIU/mg protein	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	A6279	6511,44
Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	A-8960	289,5
beta-Glycerolphosphate	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	G-9891	216
Bromphenolblau Natriumsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG (76185 Karlsruhe, Deutschland)	A512.2	691,90
Calciumchlorid	Merck (64271 Darmstadt, Deutschland)	102820	110,99
Chloroquin Diphosphats	Merck (64271 Darmstadt, Deutschland)	PHR1258	515,86
Dapi	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	D9542	350,2
DC Protein Assay Reagent A	Bio Rad Laboratories GmbH (85622 Feldkirchen, Deutschland)	5000115	
DC Protein Assay Reagent B	Bio Rad Laboratories GmbH (85622 Feldkirchen, Deutschland)	5000114	
DC Protein Assay Reagent S	Bio Rad Laboratories GmbH (85622 Feldkirchen, Deutschland)	5000113	
Deoxynukleotid Lösungen mit je 100 mM: dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Thermo Fisher Scientific (02451 Waltham, USA)	R0141,R0151, R0161,R0171	
Dexamethasone	Fluka Chemie GmbH (9471 Buchs, Schweiz)	31381	392,47
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG (76185 Karlsruhe, Deutschland)	4984.1	177,99
DNA/RNA-Farbstoff, peqGREEN	VWR International GmbH (64295 Darmstadt, Deutschland)	732-2960	
Entwicklerlösung: Roentrol25 Developer	TETENAL Europe GmbH (22844 Norderstedt, Deutschland)	104700	
Epoetin alfa HEXAL® 10.000 I.E./ 1 ml Injektionslösung	Hexal AG (83607 Holzkirchen, Deutschland)	P034429074	
Essigsäure [100 %]	Merck (64271 Darmstadt, Deutschland)	1.00063	60,05
Entellan	Merck (64271 Darmstadt, Deutschland)	1.079.610.100	

Ethanol [80 %] vergällt mit MEK, Bitrex, IPA	Th. Geyer GmbH & Co. KG (71272 Renningen, Deutschland)	2203	
Ethanol absolut	Merck (64271 Darmstadt, Deutschland)	1.00983	46,07
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)***	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	E5134	372,20
Fettrot 7B	Chroma-Waldeck GmbH & Co. KG (48161 Münster, Deutschland)	1A272	379,46
Fixierlösung: Roentoroll 25 Superfix Fixierer	TETENAL Europe GmbH (22844 Norderstedt, Deutschland)	104701	
Fluoromount-G	Southern Biotechnology (35209 Birmingham, USA)	0100-01	
Formaldehyd [37 %]	Merck (64271 Darmstadt, Deutschland)	1.04002	30,03
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (02451 Waltham, USA)	SM0311	
Glucose Monohydrat	Merck (64271 Darmstadt, Deutschland)	8346	198,17
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG (76185 Karlsruhe, Deutschland)	7530.1	92,09
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG (76185 Karlsruhe, Deutschland)	3908.2	75,07
Hellmanex III	Hellma GmbH & Co. KG (79379 Müllheim, Deutschland)	9-307-011 -4-507	
HEPES	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	H4034	238,3
HEPES Pufferlösung [1 M]	Gibco by life technologies: Fisher Scientific GmbH (58239 Schwerte, Deutschland)	15630-056	
Hexadimethrine bromide (Polybrene®)	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	H9268	
Hoechst 33258 Lösung [1 mg/ml]	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	94403	533,88
Indomethacin	Fluka Chemie GmbH (9471 Buchs, Schweiz)	57413	357,81
Insulin aus Rinderpankreas, (≥ 27 USP units/mg)	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	I-5500	
Isobutylmethylxanthine	Fluka Chemie GmbH (9471 Buchs, Schweiz)	58620	222,25
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG (76185 Karlsruhe, Deutschland)	6781.3	74,56
Kristallviolett	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	C-3886	407,99
KWS-Schliff-Fett	Carl Roth GmbH + Co. KG (76185 Karlsruhe, Deutschland)	930.2	
Leupeptin [10 mg/ml]	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	L2884	475,59
L-Glutamine [200 mM]	Gibco by life technologies: Fisher Scientific GmbH (58239 Schwerte, Deutschland)	25030-024	
Magnesiumchlorid	Fluka Chemie GmbH (9471 Buchs, Schweiz)	63063	95,21
Mayers Hämalaunlösung	Merck (64271 Darmstadt, Deutschland)	9249	
Methanol [≥ 99.9 %]	Carl Roth (76185 Karlsruhe, Deutschland)	4627.6	32,04
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	GE Healthcare (79111 Freiburg, Deutschland)	17-1312-01	116,21
Natrium Pyruvate [100 mM]	Gibco by life technologies: Fisher Scientific GmbH (58239 Schwerte, Deutschland)	11360-039	
Natriumalginat aus Braunalgen	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	A-0682	
Natriumazid	Merck (64271 Darmstadt, Deutschland)	106688	65,01
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG (76185 Karlsruhe, Deutschland)	9265.2	58,44
Natriumdeoxycholate	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	D6750	414,55
Natriumlaurylsulfat****	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	L4390	288,40
Natronlauge [5 N]	Merck (64271 Darmstadt, Deutschland)	1.09913	40,00
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	N6507	
Nuklease-freies Wasser	Ambion by life technologies: Fisher Scientific GmbH (58239 Schwerte, Deutschland)	AM9937	
Oberflächendekontaminationsmittel: Molecular BioProducts RNase AWAY	Thermo Fisher Scientific (02451 Waltham, USA)	7002	
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (02451 Waltham, USA)	26619	
Paraffinöl dickflüssig	Carl Roth GmbH + Co. KG (76185 Karlsruhe, Deutschland)	8904.1	
Penicillin/Streptomycin Lösung [10.000 U/ml //10.000 µg/ml]	Gibco by life technologies: Fisher Scientific GmbH (58239 Schwerte, Deutschland)	15140-122	
Pepstatin A [1 mg/ml]	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	P5318	685,9
Phenylmethanesulfonylfluorid-Lösung [100 mM]	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	93482	174,19
rmEGF (engl.: <i>recombinant mouse epidermal growth factor</i> , muriner rekombinanter epidermaler Wachstumsfaktor)	ImmunoTools GmbH (26169 Friesoythe, Deutschland)	12343407	
rmPDGF-BB (engl.: <i>recombinant mouse platelet-derived growth factor BB</i> , muriner rekombinanter Plättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor BB)	ImmunoTools GmbH (26169 Friesoythe, Deutschland)	12343675	
RNase-free Water	Qiagen (40724 Hilden, Deutschland)	160042240	
Roti-Block [10x Konzentrat]	Carl Roth GmbH + Co. KG (76185 Karlsruhe, Deutschland)	A151.1	
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG (76185 Karlsruhe, Deutschland)	3029.2	
Salzsäure [37 %], rauchend	Merck (64271 Darmstadt, Deutschland)	1.00314	36,46
Salzsäure [5 N]	Merck (64271 Darmstadt, Deutschland)	1.09911	36,46

Silbernitrat	Merck (64271 Darmstadt, Deutschland)	101510 0050	169,87
SUCOFINE Magermilchpulver leicht löslich	TSI GmbH & CO KG (27404 Zeven, Deutschland)		
Sudan rot B	Fluka Chemie GmbH (9471 Buchs, Schweiz)	86010	380,45
Trizma Base	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	T1503	121,14
Trypanblau-Lösung, 0,4 %	Gibco by life technologies: Fisher Scientific GmbH (58239 Schwerte, Deutschland)	15250-061	
Trypsin-EDTA [0,05 %], Phenolrot	Gibco by life technologies: Fisher Scientific GmbH (58239 Schwerte, Deutschland)	25300-054	
Trypsin-EDTA [0,25 %], Phenolrot	Gibco by life technologies: Fisher Scientific GmbH (58239 Schwerte, Deutschland)	25200-072	
TWEEN-20	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	P1379	~1228
Ultra Pure Agarose	Invitrogen: Thermo Fisher Scientific GmbH (02451 Waltham, USA)	16500500	
Ultra Pure DNA Typing Grade 50x TAE (Tris/Acetat/EDTA) Puffer; mit VE-Wasser auf 1x TAE Puffer verdünnt	Invitrogen: Thermo Fisher Scientific GmbH (02451 Waltham, USA)	24710030	
Xylol Isomerengemisch	Honeywell Riedel-de Haën AG (30926 Seelze, Deutschland)	16446	106,17

* gelöst lichtgeschützt und bei 4 °C gelagert

** gelöst bei -20 °C gelagert

*** bei pH 8 löslich in Reinstwasser

**** unter Wärmezufuhr gelöst

2.1.3. Geräte und deren Zubehör

Tab. 5: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte. Für eine genaue Zuordnung wurde die entsprechende Typbezeichnung und/oder Nennung alle benötigten Bestandteile sowie der jeweilige Hersteller aufgeführt.

Gerät	Typ/Bestandteile	Hersteller
Bildgebendes Durchflusszytometer	Amnis ImageStream X mk II: Kanal 1 = Hellfeld; Kanal 2 Laser 488 für AF488 → Band 480-660 nm (528/65); Kanal 3 Laser 488 für PKH26 → Band 560-595 nm (577/35); Kanal 7 Laser 405 für Hoechst → Band 435-505 nm (457/45)	Luminex B.V. (5215 MV 's-Hertogenbosch, Niederlande)
CO ₂ Inkubator	92400026 CB150	BINDER GmbH (478532 Tuttlingen, Deutschland)
Cytozentrifuge	shandon cytospin 2	Shandon INC (15275 Pittsburgh, USA)
Digitale Spiegelreflexkamera	D5200	Nikon GmbH (40472 Düsseldorf, Deutschland)
Durchflusszytometer	BD FACS Canto II Flow Cytometer: Laser 488 nm: 1. PE-Cy7 mit LP Filter 735 und BP Filter 780/60; 2. 7-AAD mit LP Filter 655 und BP Filter 670LP; 3. PE mit LP Filter 556 und BP Filter 585/42; Laser 633 nm: 1. APC-Cy7 mit LP Filter 735 und BP Filter 780/60; 2. APC mit LP Filter leer und BP Filter 660/20; BD LSR Fortessa: Laser 405 nm für Cerulean mit LP Filter 475 und BP Filter 525/50; Laser 488 nm für eGFP/eYFP mit LP Filter 505 und BP Filter 530/30; Laser 561 nm für mCherry mit LP Filter 600 und BP Filter 610/20	BD Biosciences (01730 Bedford, USA)
Electrophoresis Power Supply	EV202	Consort bvba (2300 Turnhout, Belgien)
Electrophoresis Power Supply	Biometra Power Pack P25	Analytik Jena AG (07745 Jena, Deutschland)
Elektrophoresesystem, horizontal	peqlab PerfectBlue Gelsystem Mini L Model 401214	VWR International GmbH (64295 Darmstadt, Deutschland)
Entwicklungssystem für Filme	Curix 60	Agfa HealthCare NV (2640 Mortsel, Belgien)
Fluoreszenzmikroskop	IX81 mit Color-View II; Digitalkamera U-MNU2 Anregungsfilter für DAPI: 360-370, Dichromatischer Spiegel: 400, Emissionsfilter: 420 U-MNIBA2 Anregungsfilter für Alexa Fluor488: 470-490, Dichromatischer Spiegel: 505, Emissionsfilter: 510-550 U-MWIG2 Anregungsfilter für PKH26: 520-550, Dichromatischer Spiegel: 565, Emissionsfilter: 580IF	OLYMPUS EUROPA SE & CO. KG (20097 Hamburg, Deutschland)
Fluorometer	Qubit 2.0	Invitrogen: Thermo Fisher Scientific GmbH (02451 Waltham, USA)

Gel-Dokumentation	UV-Transilluminator: 312 nm UV-Lampe; Kamera: Foculus IEEE 1394 Digital Camera	PHASE Gesellschaft für Phorese, Analytik und Separation mbH (23564 Lübeck, Deutschland)
Gelgießstand für horizontale Elektrophorese	Multi Cast, Gießschiene + 3 Gelträger L4 mit Dichtungen	VWR International GmbH (64295 Darmstadt, Deutschland)
Horizontalschüttler	KS250	IKA@Werke GmbH & Co. KG (79219 Staufen, Deutschland)
Inversmikroskop	CKX41	OLYMPUS EUROPA SE & CO. KG (20097 Hamburg, Deutschland)
Magnetrührer	IKAMAG REO	IKA@-Werke GmbH & CO. KG (79219 Staufen, Deutschland)
Membranpumpe	MZ2C	ABM Greiffenberger Antriebstechnik GmbH (95615 Marktredwitz, Deutschland)
Mikroplattenlesegerät	Nanoquant Infinite® 200 PRO	Tecan Group Ltd. (8708 Männedorf, Schweiz)
Mikro-Ultrazentrifuge	Sorvall Discovery M120; Festwinkelrotor S100-AT4 -523 100k RPM	Thermo Fisher Scientific (02451 Waltham, USA)
Mikrowelle	Comi Ce117PF	Samsung Electronics GmbH (65824 Schwalbach / Ts., Deutschland)
Minizentrifuge	MC 6 für Mikrogefäße (1,5/2,0 ml) oder Achterketten (0,2 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG (51588 Nümbrecht, Deutschland)
Multipipette	Multipipette Xstream	Eppendorf AG (22331 Hamburg, Deutschland)
Nanopartikel-Verfolgungs- Analysesystem	NanoSight LM14C; Laser rot 638 nm; Marlin F-033B IRF camera allied vision technologies	Malvern Panalytical GmbH (34123 Kassel, Deutschland)
PCR Werkbank	peqlabPCR Workstation Pro	VWR International GmbH (64295 Darmstadt, Deutschland)
pH-Elektroden mit Temperaturfühler	WTW SenTix® 81	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, WTW (82362 Weilheim, Deutschland)
pH-Meter	WTW inoLab pH 720	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, WTW (D-82362 Weilheim)
Pipette	Eppendorf Research, single channel, variabel	Eppendorf AG (22331 Hamburg, Deutschland)
Pipettierhilfen	PIPETBOY acu 2	INTEGRA Biosciences GmbH (35444 Biebertal, Deutschland)
Plattenschüttler	Biometra WT16 mini rocking platform	Analytik Jena AG (07745 Jena, Deutschland)
Präzisionswaage	MC1 Laboratory LC620S	Sartorius AG (37079 Goettingen, Deutschland)
Präzisionswaage	KB2400-2N	Kern&Sohn (72336 Balingen, Deutschland)
qPCR Maschine	LightCycler® 480 Instrument II	Roche Diagnostics Deutschland GmbH (68305 Mannheim, Deutschland)
Reinstwasseranlage	PURELAB flex 2	ELGA LabWater Veolia Water Technologies Deutschland GmbH (29227 Celle, Deutschland)
Rollschüttler	Stuart SRT9D	Cole-Parmer GmbH (97877 Wertheim, Deutschland)
Röntgenbestrahlungsgerät	Gulmay RS225 Research System	Gulmay GmbH (47807 Krefeld, Deutschland)
Sicherheitswerkbank	Baker BD 400	BD Biosciences (01730 Bedford, USA)
Sicherheitswerkbank	Heraeus HERAsafe HS12/HS18	Kendro Laboratory (63405-Hanau, Deutschland)
Sonifizierer	Sonifier 450 cell disruptor mit Ultrasonics Sonifier Cup Horns	Branson Ultrasonics Corporation (06813-1961 Danbury, USA)
Sortierer	BDFACS Aria Fusion Special Order System: Laser 405 nm für Cerulean mit LP Filter 505 und BP Filter 525/50; Laser 488 nm für eGFP/eYFP mit LP Filter 502 und BP Filter 530/30;	BD Biosciences (01730 Bedford, USA)

	Laser 561 nm für mCherry mit LP Filter 600 und BP Filter 610/20	
Spektralphotometer	NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific (02451 Waltham, USA)
Sprout Minizentrifuge		Biozym Scientific GmbH (31840 Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Standzentrifuge	Sorvall RC5CPlus; Festwinkelrotor: Sorvall SLA 1500 Super-LITE	Thermo Fisher Scientific (02451 Waltham, USA)
Thermocycler	TProfessional standard Blocktyp 96 well (gradient)	Analytik Jena AG (07745 Jena, Deutschland)
Thermomixer	comfort	Eppendorf AG (22331 Hamburg, Deutschland)
Tischinkubationsrüttler	Certomat IS	B.Braun Biotech International GmbH (34212 Melsungen, Deutschland)
Tischzentrifuge	ROTANTA 460 R	Hettich lab technology - Andreas Hettich GmbH & Co. KG (78532 Tuttlingen, Deutschland)
Tischzentrifuge	5417R, 5424, 5415C	Eppendorf AG (22331 Hamburg, Deutschland)
Ultrazentrifuge	Optima LE-80K; Ausschwingrotor: SW28, S.Nr. 96U 9377; Buckets: für SW 28, 116.8, 35 ml; Zentrifugenröhrchen: 38,5 ml Polyallomer (326823)	Beckman Coulter GmbH (47807 Krefeld, Deutschland)
Universalzentrifuge	MEGAFUGE® 1.0 R	Heraeus Instruments GmbH (63405 Hanau, Deutschland)
UV-Lampe	langwelliges UV-Licht (366 nm)	CAMAG (12169 Berlin, Deutschland)
Vakuum Pumpe	Absauggerät Miniport	Servox Medizintechnik GmbH (53842 Troisdorf, Deutschland)
vertikale Gel Elektrophorese mit Gelgießstand	Mini-PROTEAN Tetra cell	Bio-Rad Laboratories GmbH (85622 Feldkirchen, Deutschland)
Vortexer	VF2	IKA®-Werke GmbH & CO. KG (79219 Staufen, Deutschland)
Wasserbad	Typ 1008	GFL Gesellschaft für Labordiagnostik GmbH (30938 Burgwedel, Deutschland)
Western Blotting Transfer Systeme	Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH (85622 Feldkirchen, Deutschland)
Zellzählkammer	Neubauer improved ohne Federklemmen und 0,1 mm Kammertiefe	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG (97922 Lauda Königshofen, Deutschland)

2.1.4. Software

Tab. 6: Angabe zu verwendeten Softwares, Version und Hersteller.

Software	Version	Hersteller
BioRender.com		BioRender (M5V 2J1 Toronto, Kanada)
Microsoft Excel	2010	Microsoft Corporation (98052-6399 Redmond, USA)
Microsoft Word	2010	Microsoft Corporation (98052-6399 Redmond, USA)
Microsoft Powerpoint	2010	Microsoft Corporation (98052-6399 Redmond, USA)
GraphPad Prism	6.05 / 9.02	GraphPad Software (92108 San Diego, USA)
FACSDiva	4.2.2	BD Biosciences (01730 Bedford, USA)
FireCam Control software	2.03	PHASE Gesellschaft für Phorese, Analytik und Separation mbH (23564 Lübeck, Deutschland)
Adobe Illustrator CC2017	14.0.0	Adobe Systems Software Ireland Limited (24 Dublin, Irland)
IDEAS image analysis software	6.2.187.0	Amnis Part of EMD Millipore (98119 Seattle, USA)
INSPIRE ImageStreamX System Software		Amnis Part of EMD Millipore (98119 Seattle, USA)
OligoAnalyzer		Integrated DNA Technologies, BVBA (3001 Leuven, Belgien)
Primer3web	4.0.0	http://primer3.de/primer3web/primer3web_input.htm
Quantity One	4.6.8 (Basic)	Bio-Rad Laboratories GmbH (85622 Feldkirchen, Deutschland)
LightCycler 480 Software	1.5.0.39	Roche Diagnostics Deutschland GmbH (68305 Mannheim, Deutschland)
NanoSight NTA	3.0	Malvern Panalytical GmbH (34123 Kassel, Deutschland)

2.1.5. Kits

Alle Kits wurden gemäß Herstellerangaben unter Verwendung der im jeweiligen Kit enthaltenen und vom Hersteller empfohlenen Puffer sowie Lösungen genutzt.

Tab. 7: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Kits mit Angabe des Herstellers.

Kit	Hersteller	Artikelnummer
GeneJET RNA Cleanup and Concentration Micro Kit	Thermo Fisher Scientific (02451 Waltham, USA)	K0841
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	PKH26GL
QIAshredder	Qiagen GmbH (40724 Hilden, Deutschland)	79654
Qubit™ RNA HS Assay Kit	Invitrogen: Thermo Fisher Scientific GmbH (02451 Waltham, USA)	Q32852
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific (02451 Waltham, USA)	K1622
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH (40724 Hilden, Deutschland)	79254
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH (40724 Hilden, Deutschland)	74104
SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific (02451 Waltham, USA)	34580
TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)	TaKaRa (525-0058 Shiga, Japan)	RR820A

2.1.6. Zelllinien und Primärkulturen

Für diese Arbeit wurden die Zelllinien NIH/3T3, 293T und MS5 verwendet. Alle Zelllinien stammten aus dem Bestand der Forschungsabteilung Zell- und Gentherapie (Leitung: Prof. Dr. Boris Fehse). Zusätzlich standen selbst etablierte murine mesenchymale Stromazelllinien aus Knochenmark zur Verfügung.

Des Weiteren wurden regelmäßig mononukleäre Primärkulturen aus murinem Knochenmark gewonnen.

Murine mononukleäre Zellen (mMNCs)

Mononukleäre Zellen wurden in dieser Arbeit für jeden Versuch frisch aus dem Knochenmark (KM) von Femur und Tibia (siehe Kapitel 2.2.4) weiblicher 8 bis 12 Wochen alter C57BL/6 Ly5.1 Mäuse (Tierversuchsgenehmigungsnummern 25/12 und 89/14) isoliert.

Murine MNCs bestehen aus einer heterogenen Zellpopulation mit der Gemeinsamkeit, dass alle Zelltypen einen einzelnen Zellkern besitzen. Dazu gehören neben den durch die Isolation angestrebten hämatopoetischen Stamm- (HSCs) und Progenitorzellen (HPCs) auch unter anderem (unreife) Monozyten und Lymphozyten sowie epitheliale und mesenchymale Vorläuferzellen (Henrich *et al.* 2015).

Murine mesenchymale Stromazellen (mMSCs)

Mesenchymale Stromazellen treten *in vitro* morphologisch als heterogene Zellpopulation auf, wobei spindelförmige fibroblastoide Zellen den Hauptanteil ausmachen. Des Weiteren werden immer wieder größere, flachgedrückt erscheinende Zellen mit prominenten Zellkern und breitem Zytoplasmasaum gefunden (Neuhuber *et al.* 2008). *In vitro*-Charakteristika sind ihre Plastikadhärenz sowie die Differenzierbarkeit in Adipozyten, Chondro- und Osteoblasten (Dominici *et al.* 2006).

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit aus dem Knochenmark von Femur und Tibia mehrerer männlicher mindestens 6 und höchstens 8 Wochen alter C57BL/6 Ly5.2 Mäuse gewonnenen mMSCs (siehe Kapitel 2.2.4) gearbeitet. Die isolierten und gepoolten KM-Zellen wurden anschließend nach dem in der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Lange etabliertem Protokoll (siehe Kapitel 2.2.6) in geeigneten Zellkulturgefäßen und Medium zum Erhalt einer reinen mMSC-Kultur kultiviert.

MS5-Zelllinie

MS5 sind adhärent wachsende murine Knochenmarksstromazellen, die aus dem Mausstamm C3H/HeNSlc isoliert und anschließend *in vitro* durch Röntgenstrahlung etabliert wurden. Des Weiteren wachsen die fibroblastischen Zellen *in vitro* in Einzelzellschicht und werden als unterstützende Stromaschicht für die Kultivierung und das Wachstum von hämatopoetischen Stammzellen verwendet (Itoh *et al.* 1989).

NIH/3T3-Zelllinie

Bei der NIH/3T3-Zelllinie handelt es sich um adhärent wachsende, embryonale murine Fibroblasten. Die Etablierung der Zelllinie erfolgte 1962 aus denjenigen Zellen, die nach der Isolation aus der Mauslinie Swiss Albino spontan in der Kultur immortalisierten (Todaro and Green 1963). Diese Zelllinie ist eine verbreitete Fibroblastenzelllinie und zeichnet sich durch eine gute Transduzierbarkeit mit verschiedenen Viren aus, was auch für die in dieser Arbeit verwendeten Lentiviren gilt.

293T-Zelllinie

Die 293T-Zellen sind adhärent wachsende Epithelzellen. Sie sind abgeleitet von der humanen primären embryonalen Nierenzelllinie 293, die in diesem Fall ein stabil integriertes großes T-Antigen des SV-40 trägt. Die 293T-Zelllinie wurde für die lentivirale Virusproduktion verwendet, da sie sich einerseits gut transfizieren lässt und andererseits hohe Virustiter liefert (Pear *et al.* 1993).

2.1.7. Zellkulturmedien, -lösungen und -zusätze

Alle in der Zellkultur verwendeten Materialien, Lösungen, Zusätze oder Medien wurden entweder steril bezogen, autoklaviert oder mittels eines 0,2 µm Spritzenvorsatzfilters oder 0,22 µm Flaschenaufsatzfilters mit Gewinde steril filtriert. Um die Sterilität aller Lösungen und Medien auch bei Benutzung oder deren Weiterverarbeitung, wie dem Ansetzen gebrauchsfertiger Medien/Lösungen, zu gewährleisten, erfolgte dies ausschließlich unter der mit antifect N liquid desinfizierten Sicherheitswerkbank.

2.1.7.1. Zellkulturgrundmedien, Puffer und Seren

Tab. 8: Auflistung der kommerziell erworbenen sterilen Medien, Seren und Puffer für die in dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturarbeiten.

Medium/Serum/Puffer	Hersteller	Artikelnummer
Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12 (DMEM/Ham's F-12), [-] L-Glutamine und geringe Endotoxine	Biochrom GmbH (12247 Berlin, Deutschland)	F4815
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), high glucose, GlutaMAX Supplement, pyruvate	Gibco by life technologies: Fisher Scientific GmbH (58239 Schwerte, Deutschland)	31966021
Dulbecco's phosphate-buffered saline (1x DPBS), [-] Calcium, [-] Magnesium	Gibco by life technologies: Fisher Scientific GmbH (58239 Schwerte, Deutschland)	14190-094
Fötales Rinderserum für murine MSCs (Lot 020M3396)	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	F0804
Fötales Rinderserum für murine MSCs (Lot 01118911)	BioWhittaker-Lonza Walkersville, Inc. (21793 Walkersville, USA)	14492F
Fötales Rinderserum für NIH/3T3- und HEK-Zellen (hitzeinaktiviert)	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	F7524
HEPES Pufferlösung [1 M]	Gibco by life technologies: Fisher Scientific GmbH (58239 Schwerte, Deutschland)	15630-056
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), [+ L-Glutamine; [+ 25 mM HEPES	Gibco by life technologies: Fisher Scientific GmbH (58239 Schwerte, Deutschland)	12440053
MethoCult GF (<i>Methylcellulose-based medium with recombinant cytokines</i> [-] erythropoietin) for mouse myeloid progenitor cells)	STEMCELL Technologies Germany GmbH (50933 Köln, Deutschland)	3534
Minimum Essential Medium α (α MEM), [+ L-Glutamine, [+ Ribonucleosides, [+ Deoxyribonucleoside	Gibco by life technologies: Fisher Scientific GmbH (58239 Schwerte, Deutschland)	12571063
Pferdeserum (durch 0,2 μ m Membran filtriert, Mycoplasmen getestet, Lot 941901)	Biological Industries USA (06416-1073 Cromwell, USA)	040041A
Rinderserumalbumin (BSA) Lösung [7.5 % in DPBS]	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)	A8412

2.1.7.2. Kultivierungs-, Versuchs- und Einfriermedienmedien

NIH/3T3 und 293T-Kultivierungsmedium

Tab. 9: Zusammensetzung des verwendeten NIH/3T3- und 293T-Kultivierungsmediums.

Bestandteile [Ausgangskonzentration]	Konzentration im fertigen Medium
Penicillin/Streptomycin Lösung [10.000 U/ml // 10.000 μ g/ml]	1 % (v/v)
HEPES Lösung [1 M]	25 mM
hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum (Produkt-Nr.: F7524)	10 % (v/v)
DMEM	86,5 % (v/v)

mMSC-Kultivierungsmedium

Tab. 10: Zusammensetzung des verwendeten mMSC-Kultivierungsmediums.

Bestandteile [Ausgangskonzentration]	Konzentration im fertigen Medium
2-Mercaptoethanol Lösung [50 mM]	50 μ M
L-Glutamin Lösung [200 mM]	2 mM
Fötales Rinderserum (Produkt-Nr.: F0804, Sigma-Aldrich bzw. 14492F, BioWhittaker-Lonza)	20 % (v/v)
DMEM/Ham's F-12	79 % (v/v)

Das BioWhittaker-Lonza-FCS wird der Einfachheit halber im weiteren Verlauf ausschließlich als Lonza-FCS und das Sigma-Aldrich FCS als Sigma-FCS bezeichnet.

EV-Produktionsmedium**Tab. 11: Zusammensetzung des Mediums, welches zur Ernte und Isolation von mMSCs produzierten EVs verwendet wurde.**

Bestandteile [Ausgangskonzentration]	Konzentration im fertigen Medium
2-Mercaptoethanol Lösung [50 mM]	50 µM
L-Glutamin Lösung [200 mM]	2 mM
Ultrazentrifugiertes, (120000 g, 4 °C, mind. 23 h) fötales Rinderserum (Produkt-Nr.: F0804, Sigma-Aldrich bzw.14492F, BioWhittaker-Lonza)	10 % (v/v)
DMEM/Ham's F-12	89 % (v/v)

MS5-Kultivierungsmedium**Tab. 12: Zusammensetzung des verwendeten MS5-Kultivierungsmediums.**

Bestandteile [Ausgangskonzentration]	Konzentration im fertigen Medium
L-Glutamin Lösung [200 mM]	2 mM
Pferdeserum (Produkt-Nr.: 040041A)	20 % (v/v)
α MEM	79 % (v/v)

mMSC- und MS5-Einfriermedium**Tab. 13: Zusammensetzung des verwendeten mMSC- und MS5-Einfriermediums.**

Bestandteile [Ausgangskonzentration]	Konzentration im fertigen Medium
DMSO	10 % (v/v)
Fötales Rinderserum für mMSCs und Pferdeserum für MS5	90 % (v/v)

MNC-Isolationsmedium**Tab. 14: Zusammensetzung des verwendeten MNC-Isolationsmediums.**

Bestandteile [Ausgangskonzentration]	Konzentration im fertigen Medium
Penicillin/Streptomycin Lösung [10.000 U/ml // 10.000 µg/ml]	1 % (v/v)
hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum (Produkt-Nr.: F7524)	10 % (v/v)
IMDM	79 % (v/v)

Methylcellulose Medium**Tab. 15: Zusammensetzung des verwendeten Methylcellulose Mediums pro Aliquot.**

Bestandteile [Ausgangskonzentration]	Konzentration im fertigen Medium
2 µl Epoetin alfa HEXAL (2,5 I.E./µL)	5 I.E./µl
20 µl Penicillin/Streptomycin Lösung [10.000 U/ml // 10.000 µg/ml]	2 % (v/v)
1 ml MethoCult GF3534	

Epoetin alfa HEXAL Stammlösung 10.000 I.E./ml \pm 10 I.E./µl wurde für den Einsatz in das Methylcellulose Medium vorher 1:4 mit 1x DPBS auf 2,5 I.E./µl verdünnt.

2.1.7.3. Medienzusätze

Tab. 16: Auflistung der in der Zellkultur verwendeten Medienzusätze.

Stammlösung	Arbeitskonzentration im entsprechenden Medium	Lösungsmittel
Chloroquin [25 mM]	25 µM	1x DPBS
Polybrene [8 mg/ml]	8 µg/µl	1x DPBS
Calciumchlorid [2,5 M]	250 mM	Reinstwasser
Dexamethason [10 mM]	10 µM und 0,1 µM	Vorgelöst in EtOH, absolut; aufgefüllt mit mMSC-Kulturmedium
IBMX [10 mM]	0,5 mM	mMSC-Kulturmedium
Insulin [10 mg/ml]	10 µg/ml	Reinstwasser
Indomethacin [50 mM]	100 µM	EtOH, absolut
Ascorbinsäure-2-phosphat [5 mM]	50 µM	Reinstwasser
beta-Glycerolphosphat [1 M]	10 mM	Reinstwasser
rmEGF [500 µg/ml]	40 pg/ml	0,1 % BSA (A8412) Lösung
rmPDGF-BB [100 µg/ml]	2 ng/ml	0,1 % BSA (A8412) Lösung

2.1.8. Puffer für die virale Transfektion von Zellen

2x Präzitationspuffer (2x HBS; pH 7,05)

273,7 mM Natriumchlorid
 10,2 mM Kaliumchlorid
 1,4 mM Dinatriumhydrogenphosphat
 42,0 mM HEPES
 11,0 mM Glucose

Als Lösungsmittel wurde Reinstwasser verwendet, anschließend der pH 7,05 mittels 1 N NaOH eingestellt und der fertige Puffer mittels 0,22 µm Flaschenaufsatzfilter mit Gewinde steril filtriert. Aliquotierter Puffer wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.1.9. Plasmide

2.1.9.1. Helferplasmide für Virusproduktion

Tab. 17: Kommerziell erworbene Helferplasmide für die Herstellung von lentiviralen Vektoren. Zusätzlich zu den jeweiligen Plasmidbezeichnungen sind die enthaltenen Gene, deren Funktion und deren Ursprungsorganismus aufgelistet. Alle Plasmide wurden von PlasmidFactory GmbH und Co.KG (33607 Bielefeld, Deutschland) bezogen.

Plasmid	Gene	Herkunft	Literatur
Verpackungsplasmid: pMDLg/pRRE	Gag und Pol	Humanes Immundefizienz-Virus	(Dull <i>et al.</i> 1998)
Regulatorisches Plasmid: pRSV-Rev	Rev	Humanes Immundefizienz-Virus	(Dull <i>et al.</i> 1998)
Hüllplasmid: ECO-Env (#522, K73)	Env	Murines Leukämievirus	(Morita <i>et al.</i> 2000)

2.1.9.2. shRNA LeGO-Vektoren zur gezielten Runterregulation von Zielgenen

Der scr-shRNA Vektor wurde von PD Dr. rer. nat. Jasmin Wellbrock (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Walter Fiedler) zur Verfügung gestellt. Alle anderen im Folgenden aufgelisteten Plasmide wurden in der Arbeitsgruppe von PD Dr. rer. nat. Claudia Lange im Rahmen der Masterarbeit von Frau Jorna Boswinkel kloniert.

Für die Klonierung der Vektoren wurden die jeweilige shRNA für das Zielgen als MISSION shRNA Bacterial Glycerol Stock (Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)) bezogen. Jede einzelne shRNA (Sequenzen sind im Anhang Kapitel 7.1 in Tab. S1 aufgelistet) wurden via PCR amplifiziert und anschließend in einen für shRNA-Expression geeigneten LeGO-Vektor (engl.: *Lentiviral gene ontology*) (Riecken 2015) kloniert. Die verwendeten LeGO-Vektoren beinhalteten alle zusätzlich zur Identifikation

und/oder Selektion von transduzierten Zellen die Sequenz eines Fusionsproteins bestehend aus spezifischem Fluoreszenzprotein konjugiert mit dem Resistenzgen Blasticidin S Deaminase (BSD). Die Plasmide dienten als Transfervektoren bei der Produktion von lentiviralen Vektoren, die anschließend zur Transduktion von mMSCs verwendet wurden und durch stabile Integration in das Empfängergeronom eine dauerhafte Expression der jeweiligen shRNA in den Zielzellen erlaubte.

Tab. 18: Transferplasmide zur Runterregulation von Zielgenen mittels integrierter shRNA. Die jeweils kommerziell erworbenen shRNAs wurden unter Einhalten des Leserahmens in einen entsprechenden LeGO-Vektor hinter einen U6-Promotor kloniert.

Vektorname	Ausgangs-LeGO-Vektor	shRNA (NCBI Accession Nummer)
LeGO-Cerulean/BSD-shRNA <i>Gal1</i>	LeGO-Cerulean/BSD	shRNA für <i>Gal1</i> (SHCLNG-NM_008495 TRCN0000011865)
LeGO-mCherry/BSD-shRNA <i>Sod1</i>	LeGO-mCherry/BSD	shRNA für <i>Sod1</i> (SHCLNG-NM_011434 TRCN0000101047)
LeGO-GFP/BSD-shRNA <i>Prdx1</i>	LeGO-GFP/BSD	shRNA für <i>Prdx1</i> (SHCLNG-NM_011034 TRCN0000120691)
LeGO-GFP/BSD-shRNA <i>scr</i>	LeGO-GFP/BSD	shRNA für <i>scr</i> (unbekannt)

2.1.10. Primer

Quantitative PCR Primerpaare wurden anhand der jeweils in NCBI eingetragenen *Mus musculus* mRNA-Sequenz für das jeweils nachzuweisende Transkript designt, so dass die Primerpaare ausschließlich im codierenden Bereich des Transkripts lagen und zusätzlich Exon-überspannend waren. Weiter wurden bei der Primerentwicklung die Empfehlungen des Herstellers des für die qPCR benötigten TB Green PremixTag II Kits berücksichtigt. Demnach ist in allen Fällen das qPCR-Produkt 100 bis 140 Nukleotide lang. Die Primerlänge beträgt 19 bis 22 nt mit einer Schmelztemperatur von 59,8 bis 62 °C (kalkuliert mit Primer3webVersion 4.0.0) und einem GC Gehalt <60 %. Zusätzlich wurden die Primer mittels OligoAnalyzer auf mögliche Hairpinstrukturen sowie Dimerbildung untersucht und anschließend nur solche ausgewählt, bei denen diese Störfaktoren als gering erachtet werden konnten. Von den erhaltenen Primern wurde anschließend in Vorversuchen ihre Effizienz anhand einer mMSC-cDNA Verdünnungsreihe (7 Schritte von 50 ng bis 3,2 pg in jeweils 1:5 Verdünnungen) in der angestrebten qPCR ermittelt.

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Synthesis GmbH (85560 Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die nicht modifizierten, salzfreien und lyophilisierten DNA Oligonukleotide wurden mit DNase freiem Wasser zu einer Zielkonzentration von 100 pmol/µl gelöst, bei -20 °C gelagert und vor dem Einsatz in (q)PCR in kleinen Mengen (100 – 200 µl Gesamtvolumen) mittels Nuklease-freiem Wasser auf eine Arbeitskonzentration von 10 pmol/µl verdünnt. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tab. 19 aufgelistet.

Tab. 19: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Primer. Neben der jeweiligen Bezeichnung sind die entsprechenden Sequenzen in 5' nach 3' Orientierung, Schmelztemperatur in Grad Celsius (ermittelt mit Primer3web), deren Verwendungszweck sowie die ermittelte Effizienz enthalten. Primerpaare für die qPCR wurden in dieser Arbeit eigenständig designt, während die Gapdh Primer Sequenzen aus dem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit übernommen wurden. Es wird davon ausgegangen, dass die endogene RNA vollständig in cDNA umgeschrieben wird, so dass cDNA Konzentration gleich der RNA Konzentration ist.

Name	Sequenz mit 5' nach 3' Orientierung	TM [°C]	Verwendung	Effizienz
mS27a_vorwärts	CCATCACGCTCGAGGTTGAAC	61,6	Nachweis der endogenen RNA Konzentration von <i>S27a</i> via qPCR (Referenzgen)	1,96
mS27a_rückwärts	GACAAAGTCCGGCCATCTTCC	61,3		
mGal1_vorwärts	TCGGACGCCAAGAGCTTTG	60,7	Nachweis der endogenen RNA Konzentration von <i>Gal1</i> via qPCR (Zielgen)	1,97
mGal1_rückwärts	CAGGTCCCATCTTCCCTTGGTG	60,3		
mSod1_vorwärts	ATGGGTTCCACGTCCATCAG	59,8	Nachweis der endogenen RNA Konzentration von <i>Sod1</i> via qPCR (Zielgen)	1,99
mSod1_rückwärts	CAACATGCCTCTCTTCATCCGC	61,9		
mPrdx1_vorwärts	CTGGCATGGATTAACACACCCA	60,9	Nachweis der endogenen RNA Konzentration von <i>Prdx1</i> via qPCR (Zielgen)	1,96
mPrdx1_rückwärts	GGCCCCTGAAAGAGATACCTTC	60,2		
Gapdh_vorwärts	CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG	58,2	Nachweis der endogenen RNA Konzentration von <i>Gapdh1</i> via PCR	Nicht ermittelt
Gapdh_rückwärts	GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG	63,1		

2.1.11. RIPA Puffer für Proteinisolation

Tab. 20: Zusammensetzung des Basis-RIPA-Puffers.

Reagenzien	Arbeitskonzentration
1 M Trizma Base Puffer (pH 8,0)	50 mM
5 M NaCl Stammlösung	150 mM
10 % SDS Stammlösung (pH 7,6)	0,1 % (v/v)
10 % Natriumdeoxycholate Stammlösung	0,5 % (v/v)
Nonidet P-40	1 % (v/v)
0,5 M EDTA	5 mM
Reinstwasser	81 % (v/v)

Der Basis-RIPA-Puffer wurde aliquotiert bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch die in Tab. 21 aufgelisteten Proteinaseinhibitoren auf Eis zu gegeben, um einen gebrauchsfertigen RIPA-Puffer zu erhalten.

Tab. 21: Zusammensetzung des gebrauchsfertigen reduzierenden RIPA-Puffers. Dieser bestand aus dem Basis-RIPA-Puffer und den entsprechenden verwendeten Konzentrationen der frisch zugegebenen Proteaseinhibitoren Pepstatin A, Leupeptin, Aprotinin und PMSF sowie dem Reduktionsmittel DTT. Für Proteinisolation aus EV-Präparaten wurde die Zusammensetzung so angepasst, dass auch nach Zugabe von 100 µl EV-Lösung die Arbeitskonzentration der Inhibitoren und des Reduktionsmittels der für die Zellpellet Behandlung entsprach. Für einen nicht reduzierenden Puffer wurde lediglich das DTT durch Reinstwasser ersetzt.

Reagenzien	Arbeitskonzentration für	
	Zellpellet	100 µl EV-Präparat
Basis-RIPA-Puffer	97 % (v/v)	64 % (v/v)
100 mM DTT Stammlösung	1 mM	1 mM
1 mg/ml Pepstatin A-Lösung	1 µg/ml	1 µg/ml
10 mg/ml Leupeptin-Lösung	1 µg/ml	1 µg/ml
10 mg/ml Aprotinin-Lösung	1 µg/ml	1 µg/ml
100 mM PMSF-Lösung	1 mM	1 mM

2.1.12. Lösungen für Protein-Elektrophorese und Western Blot

Alle verwendeten Stammlösungen wurden mit Reinstwasser angesetzt und der entsprechende pH-Wert mittels HCl oder NaOH Zugabe eingestellt.

10x Elektrophoresepuffer für Proteine (Stammlösung)

30,3 g Trizma Base

144 g Glycin

100 ml 10 % SDS Stammlösung (pH 7,2)

Ad 1 l Reinstwasser

1x Elektrophoresepuffer für Proteine (Arbeitslösung)

900 ml Reinstwasser
100 ml 10x Elektrophoresepuffer für Proteine

10x Towbin-Puffer $\hat{=}$ Transferpuffer (Stammlösung)

30,3 g Trizma Base
144 g Glycin
50 ml 10 % SDS Stammlösung (pH 7,2)
Ad 1 l mit Reinstwasser

1x Towbin-Puffer (Arbeitslösung)

1400 ml Reinstwasser
400 ml Methanol
200 ml 10x Towbin-Puffer (Stammlösung)

➔ Arbeitslösung des Towbin-Puffers wurde nach Gebrauch ca. 5-mal wiederverwendet; dazu wurde diese filtriert (Filterpapier Ø 240 mm) und bei 4 °C gelagert

10x TBS-Puffer (Stammlösung)

87,7 g NaCl
60,6 g Trizma Base
Ad 1 l Reinstwasser, nachdem pH 7,6 eingestellt wurde

1x TBS-T

900 ml Reinstwasser
100 ml 10x TBS-Puffer (Stammlösung)
1 ml Tween-20

4x Laemmli-Puffer (reduzierend)

5 ml 1 M Trizma Base Puffer (pH 6,8)
1,6 g SDS
8 ml Glycerin
0,2 ml 2% Bromphenolblau Stammlösung
4 ml 2-Mercaptoethanol
Ad 20 ml Reinstwasser

➔ 4x Laemmli-Puffer wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert
➔ Zusammensetzung von nicht reduzierendem Laemmli-Puffer: anstatt 2-Mercaptoethanol wurde Reinstwasser verwendet

2.1.13. Polyacrylamid- und Agarosegele

2.1.13.1. Polyacrylamidgel

Tab. 22: Zusammensetzung eines Acrylamidgels mit 12 %-igem Trenn- und 3,85 %-igem Sammelgel. Die angegebenen Mengen reichen für zwei Gele aus.

Reagenzien für Trenngel (12 %)	Ansatz
Reinstwasser	5 ml
1,5 M Trizma Base Lösung (pH 8,8)	3,75 ml
10% SDS Stammlösung (pH 7,6)	150 µl
Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid 37,5:1)	6 ml
10 % APS Stammlösung	75 µl
TEMED	7,5 µl

Reagenzien für Sammelgel (3,85 %)	Ansatz
Reinstwasser	6,1 ml
0,5 M Trizma Base Lösung (pH 6,8)	2,5 ml
10% SDS Stammlösung (pH 7,6)	100 µl
Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid 37,5:1)	1,3 ml
10 % APS Stammlösung	100 µl
TEMED	12 µl

Es wurden für die elektrophoretische Proteinauftrennung ausschließlich Polyacrylamidgele verwendet, die sich aus 12 %-igem Trenn- und 3,85 %-igem Sammelgel zusammensetzten und jeweils 10 Taschen mit einer Dicke von 1 mm besaßen.

Diese Gele wurden in einem Gelgießstand für eine vertikale Gel-Elektrophorese (Bio-Rad) gegossen. Polymerisierte Gele wurden in feuchte Tücher geschlagen und bis zur Benutzung bei 4 °C max. eine Woche aufbewahrt.

2.1.13.2. Agarosegel

In dieser Arbeit wurden 1,5 %-ige Agarosegele (12x14 cm) mit 1x TAE Puffer (120 ml) in einem Gelgießstand für horizontale Elektrophorese (VWR) verwendet. Für die Detektion der DNA-Banden wurde der DNA-Farbstoff PeqGreen (1:20.000) zu der Agaroselösung gegeben. Pro Gel wurden maximal 2 Kämme mit jeweils 16 Taschen verwendet und im Anschluss an die Polymerisation am selben Tag verwendet.

2.1.14. Färbelösungen

Alcian-Blau-Lösung (a+b)

- a) 50 ml 0,15 M NaCl
6 ml Essigsäure [100 %]
50 mg Alcian-Blau 8 GX
pH 1,5
- b) 49,8 ml 0,15 M NaCl
200 µl 20 mg/ml MgCl₂ Stammlösung (0,2 g MgCl₂ in 10 ml 0,15 M NaCl)

Lösung b wurde vorsichtig in Lösung a gegossen, mehrere Stunden auf einen Magnetrührer gestellt und anschließend mindestens 3 Tage stehen gelassen. Vor Gebrauch wurde die fertige Lösung nochmals aufgerührt und anschließend filtriert (0,45 µm Filter).

Fettrot 7B Stammlösung

100 ml 70 % EtOH (heiß)
0,2 - 0,3 g Fettrot 7B

Das Fettrot wurde in dem heißen EtOH durch schütteln verteilt, 24 Stunden zur Herstellung einer Lösung bei 60 °C inkubiert und nach Abkühlung filtriert (Filterpapier Ø 240 mm).

6 % Silbernitratlösung

6 g Silbernitrat wurden in 100 ml Reinstwasser gelöst.

Die Lösung wurde vor der Färbung frisch angesetzt und unter Lichtausschluss gelagert.

2.1.15. Antikörper, Blocklösungen und Fluoreszenzfarbstoffe

2.1.15.1. Blockierungslösung und Fluoreszenzfarbstoffe für die Durchflusszytometrie

Tab. 23: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Blockierungslösungen und Fluoreszenzfarbstoffe in durchflusszytometrischen Analysen.

Blockierungslösung/ Fluoreszenzfarbstoff	Spender- spezies	Konzentration [mg/ml]	Artikel- nummer	Lot	Firma
Fc-Block (Purified anti-mouse CD16/32 Antibody), IgG2a λ	Ratte	0,5	101302	B255480	BioLegend (56070 Koblenz, Deutschland)
Hoechst 33258 Lösung		1,0	94403		Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)
7AAD (Lebend/Tot Färbung)		0,5	559925	7061885	BD Biosciences-Pharmingen (92121 San Diego, USA)

Das Blockieren der Zellen erfolgte jeweils in 50 µl mit 1x DPBS verdünnter Fc-Block-Lösung [1 µg Fc-Block/1*10⁶ Zellen].

2.1.15.2. Antikörper für Durchflusszytometrie

Tab. 24: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper für durchflusszytometrische Analysen am BD FACS Canto II.

Antikörper	Konjugat	Klon	Spender-spezies	Isotyp	Konzentration [mg/ml]	Artikel-nummer	Lot	Firma
CD34	PE	RAM34	Ratte	IgG2a κ	0,2	551387	5216855	BD Biosciences-Pharmingen (92121 San Diego, USA)
CD90.2 (Thy-1.2)	PE	53-2.1	Ratte	IgG2a κ	0,2	553005	29804	
CD117 (C-KIT)	PE	2B8	Ratte	IgG2b κ	0,2	553355	74612	
CD11b (Itgam)	PE	M1/70	Ratte	IgG2b κ	0,2	553311	85062	
SCA-1 (Anti-Mouse Ly-6A/E)	PE	E13-161.7	Ratte	IgG2a κ	0,2	553336	40057	Invitrogen: Thermo Fisher Scientific GmbH (02451 Waltham, USA)
CD45	PE	30-F11	Ratte	IgG2b κ	0,2	12-0451-81	E01243-1636	
CD73	PE	eBioTY/11.8 (TY/11.8)	Ratte	IgG1 κ	0,2	12-0731-81	E01346-1631	
CD105 (Endoglin)	PE	MJ7/18	Ratte	IgG2a κ	0,2	12-1051-81	E01419-1633	
CD105 (Endoglin)	PE/Cy7	MJ7/18	Ratte	IgG2a κ	0,2	25-1051-81	E24406-101	BioLegend (56070 Koblenz, Deutschland)
CD105 (Endoglin)	APC	MJ7/18	Ratte	IgG2a κ	0,2	120414	B141670	
CD44	APC/Cy7	IM7	Ratte	IgG2b κ	0,2	103028	B262797	
HLA-DR (MHCII)	APC	M5/114.15.2	Ratte	IgG2b κ	0,2	107613	B19784	

Tab. 25: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Isotypkontrollen für durchflusszytometrische Analysen am BD FACS Canto II.

Isotyp-kontrolle	Konjugat	Klon	Spender-spezies	Konzentration [mg/ml]	Artikel-nummer	Lot	Firma
IgG2a κ	PE	R35-95	Ratte	0,2	553930	54211	BD Biosciences-Pharmingen (92121 San Diego, USA)
IgG2b κ	APC	A95-1	Ratte	0,2	553991	76934	
IgG2b κ	PE	eB149/10H5	Ratte	0,2	12-4031-81	E01641-1636	Invitrogen: Thermo Fisher Scientific GmbH (02451 Waltham, USA)
IgG1 κ	PE	eBRG1	Ratte	0,2	12-4301-81	E01653-1631	
IgG2a κ	PE/Cy7	eBR2a	Ratte	0,2	25-4321-81	E07616-1631	

2.1.15.3. Antikörper für ImageStream

Tab. 26: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper für ImageStream Analysen.

Antikörper	Konjugat	Klon	Spender-spezies	Isotyp	Konzentration [mg/ml]	Artikel-nummer	Lot	Firma
Ly-6A/E (SCA-1)	Alexa Fluor 488	E13-161.7	Ratte	IgG2a κ	0,5	122516	B200076	BioLegend (56070 Koblenz, Deutschland)
CD117/ C-KIT	Alexa Fluor 647	ACK2	Ratte	IgG2b κ	0,84	NBP1-43359AF647	4339493-061417	Novus Biologicals Europe (OX143NB Abingdon, England)

2.1.15.4. Antikörper für Western Blot

Tab. 27: Auflistung der in dieser Arbeit für Western Blot Analysen verwendeten primären Antikörper.

1. Antikörper	Klon	Spender-spezies	Isotyp	Konzentration [mg/ml]	Artikel-nummer	Lot	Firma
GAPDH	D16H11	Kaninchen	IgG	n.b.	5174	6	Cell Signaling Technology Europe, B.V. (D-60314 Frankfurt am Main)
FLOTELLIN	18/Flotellin-1	Maus	IgG1	0,25	610820	6295545	BD Biosciences (95131 San Jose, USA)
TSG101	C-2	Maus	IgG2a	0,2	sc-7964	F2816	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (69115 Heidelberg, Deutschland)
CD9	KMC8.8	Ratte	IgG2a	0,2	sc-18869	H1516	
HSP70	W27	Maus	IgG2a	0,2	sc-24	I1712	
SOD1		Ziege	IgG	0,2	AF3787	XPM0111111	R&D Systems, Inc. (USA-55413 Minneapolis, MN)
PRDX1		Ziege	IgG	0,2	AF3488	XLO0111041	
GAL1		Ziege	IgG	0,1	AF1245	IRE01	

Tab. 28: Auflistung der in dieser Arbeit für Western Blot Analysen verwendeten sekundären Antikörper.

2. Antikörper	Konjugat	Spender-spezies	Isotyp	Konzentration [mg/ml]	Artikel-nummer	Lot	Firma
Anti-Maus	HRP	Ziege	IgG	0,4	sc-2005	C0316 oder I2612	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (69115 Heidelberg, Deutschland)
Anti-Kaninchen	HRP	Ziege	IgG	0,4	sc-2004	B0416 oder H0913	
Anti-Ratte	HRP	Ziege	IgG	0,4	sc-2006	A0711	
Anti-Ziege	HRP	Esel	IgG	0,4	sc-2020	K0615	

2.1.15.5. Antikörper, Blockierungslösung und Fluoreszenzfarbstoffe für Cytospins

Tab. 29: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper für Cytospins.

1. Antikörper	Klone	Spender-spezies	Isotyp	Konzentration [mg/ml]	Artikel-nummer	Firma
CD117 (C-KIT)	ACK2	Ratte	IgG2b κ	0,5	14-1172	Invitrogen: Thermo Fisher Scientific GmbH (02451 Waltham, USA)
Ly-6A/E (SCA-1)	E13-161.7	Ratte	IgG2a κ	0,5	122502	BioLegend (56070 Koblenz, Deutschland)

Tab. 30: Auflistung des in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörpers für Cytospins.

2. Antikörper	Konjugat	Spender-spezies	Isotyp	Konzentration [mg/ml]	Artikel-nummer	Firma
Anti-Ratte	Alexa Fluor 488	Ziege	IgG (H+L)	2	A11006	Invitrogen: Thermo Fisher Scientific GmbH (02451 Waltham, USA)

Tab. 31: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Blockierungslösung und des Fluoreszenzfarbstoffes für Cytospins.

Blockierungslösung/Fluoreszenzfarbstoff	Spenderspezies	Konzentration [mg/ml]	Artikel-nummer	Firma
Rattenserum (Normal Rat Serum)	Ratte	60 ± 100%	012-000-001	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd (CB7 4EX Ely, England)
DAPI		1	D9542	Sigma-Aldrich (89552 Steinheim, Deutschland)

2.2. Methoden

2.2.1. Tierversuche

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente an Tieren sowie die Organentnahmen waren unter den Tierversuchsanträgen mit den Nummern 25/12 und 89/14 von der zuständigen Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz genehmigt und zugelassen. Die benötigten männlichen C57Bl/6J Ly5.2 und weiblichen C57Bl/6J Ly5.1 Inzuchttiere wurden unter Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz am Heinrich-Pette-Institut Hamburg gezüchtet und gepflegt, bevor sie unserer Arbeitsgruppe für Organentnahmen oder Kurzzeitexperimente zur Verfügung gestellt wurden. Alle Versuche waren als Sicherheitsstufe 1 eingestuft und wurden in einem S2-Labor durchgeführt.

Die Tiere wurden allgemein ausschließlich mittels zervikaler Dislokation getötet, um eine Beeinflussung der Knochenmarkszellen mittels Chemikalien/Gasen o.ä. zu vermeiden. Es wurde stets eine vollständige Dislokation und die Durchtrennung von Luftröhre, Blut- und Nervengefäßen sichergestellt. Alle Kadaver wurden entsprechend der Sicherheitsanweisungen entsorgt.

2.2.2. Zellkulturbedingungen

Die Kultivierung aller verwendeten Zelllinien und primären Zellkulturen fand im Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO₂-Atmosphäre und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit statt.

Alle steril auszuführenden Arbeiten wie Zellkultur, Lösungsansätze, Zellisolationen, Zellen auftauen und einfrieren wurden einheitlich unter einer mit antifect N liquid desinfizierten Heraeus HERAsafe HS12/HS18 Sicherheitswerkbank und kontaminationsfreien Bedingungen durchgeführt.

Die Entfernung jeglicher Art an Überständen erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, mittels einer Absaugvorrichtung (Schlauch/Abfallgefäß/Schlauch/Pumpe) unter Zuhilfenahme einer sterilen Pasteurpipette. Alle Zellen wurden im Allgemeinen mittels einer ROTANTA 460 R Tischzentrifuge pelletiert.

2.2.3. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl von in Suspension befindlichen Zellen (Suspensionszellen oder trypsinisierte adhärente Zellen) wurden in dieser Arbeit mittels Zählkammer ermittelt. Die Zellen wurden zuvor entweder mit 3 % Essigsäure-Lösung oder 0,4 % Trypanblau-Lösung in geeigneter Weise verdünnt.

3 % Essigsäure-Lösung wurde für die Zellzählung von frisch isolierten murinen mononukleären Zellen (mMNCs) verwendet, um die möglicherweise nicht durch die Erylyse lysierten restlichen Erythrozyten vor der Zellzählung zu zerstören. In allen Fällen wurde die Zellsuspension mit Essigsäure-Lösung (3 %) 1:10 verdünnt.

0,4 % Trypanblau-Lösung wurde hingegen zur Bestimmung der Vitalität der Zellsuspension und zur Diskriminierung von toten Zellen nach der Trypsinierung von allen adhären Zellen verwendet. Der Farbstoff Trypanblau ist nicht-membranpermeabel und färbt somit ausschließlich Zellen mit geschädigter Zellmembran (absterbende oder bereits tote Zellen) deutlich blau. Im Allgemeinen wurden NIH/3T3 und HEK293T Zellsuspensionen 1:10 und trypsinisierte MS5 sowie mMNCs 1:2 mit Trypanblau-Lösung (0,4 %) verdünnt.

Die Zellzahl vitaler Zellen (ungefärbt, rund und klar abgegrenzt) wurde mittels Neubauerzählkammer (Abb. 10) bestimmt und mittels nachstehenden Formeln 1 berechnet.

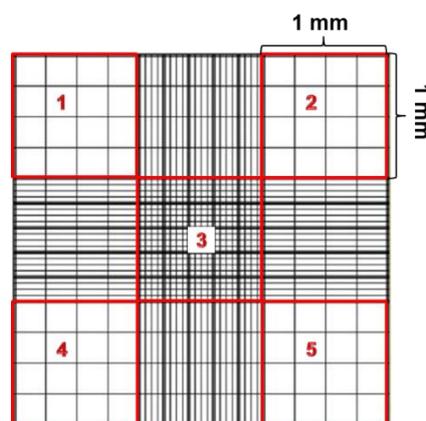


Abb. 10: Zählnetz einer Seite in einer Neubauer improved Zellzählkammer. Die Netzteilung weist 3 mal 3 Großquadrate mit je 1 mm² Fläche und einer Kammertiefe von 0,1 mm auf. Somit fasst der gesamte Zwischenraum von Deckgläschen und Netzteilung ungefähr 10 µl einer Zellverdünnung. Für die Zellzahlbestimmung wurden jeweils alle (lebenden) Zellen in den 5 rot umrandeten Großquadraten gezählt. Modifiziert nach <http://zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html>.

$$\text{Zellkonzentration} \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{gezählte vitale Zellen}}{\text{Anzahl ausgezählter Großquadrate}} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4 \quad (\text{Formel 1})$$

Bei Bekanntheit der Zellzahl in der vorliegenden Zellsuspension [Zellen/ml] kann die in dem Versuch vorliegende Zellzahl pro Ebenen (Gesamtzellzahl pro Ebene) nach Formel 2 berechnet werden. Benötigt wird dazu das vorliegende Gesamtvolumen der Zellsuspension sowie die Anzahl der dafür verwendeten Flaschen/Ebenen.

$$\text{Gesamtzellzahl pro Ebene/Flasche} = \frac{\text{Zellkonzentration} \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right] * \text{Zellsuspension [ml]}}{\text{Anzahl an trypsinierten Ebenen}} \quad (\text{Formel 2})$$

2.2.4. Murine Knochenmarksisolation

Für die Isolation von Knochenmark (KM) wurden zum einen männliche 6 bis 8 Wochen alte C57BL/6 Ly5.2 Tiere (mMSCs Etablierung) und zum anderen weibliche 8 bis 12 Wochen alte C57BL/6 Ly5.1 Tiere (*in vivo* und *in vitro* Radioprotektionsversuche) verwendet.

Die Oberfläche des mittels zervikaler Dislokation euthanasierten Tieres wurde vor der Entnahme von Tibiae und Femora desinfiziert. Die Präparation erfolgte steril unter der Sicherheitswerkbank.

Mit einem kleinen Scherenschnitt wurde die Haut im unteren Abdomen kürz über der Hüfte eröffnet und anschließend entlang des Beines bis hin zum Fußgelenk aufgeschnitten. Die Muskeln am Femur wurden großzügig mit der Schere entfernt und eine Pinzette unter die Knochen geschoben, um sie vorsichtig von der unterliegenden Haut zu lösen. Anschließend wurde die Tibia mittels Durchtrennung des Fußgelenks und Überdehnung aus dem Kniegelenk entnommen. Der Femur wurde anschließend durch Zerschneiden des Hüftgelenks ebenfalls entnommen. Alle präparierten Knochen wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis in MNC-Isolationsmedium aufbewahrt.

Nach Präparation aller benötigten Knochen wurden diese mit der rauen Seite eines sterilen OP-Tuchs von den übrigen Geweberesten, Hüft- und Kniegelenk befreit, die Tibia auf distaler Seite am Ansatz der Fibula und der Femur auf proximaler Seite möglichst kurz hinter dem Oberschenkelhalses eröffnet. Die Sicherheitsinjektionskanüle einer mit kaltem MNC-Isolationsmedium gefüllten 1 ml Spritze wurde dann durch die dem Kniegelenk zugewandten Seite des jeweiligen Knochens in die Markhöhle gestochen. Anschließend wurde das KM mit Druck durch das in der Spritze enthaltene Medium in ein 30 ml Mehrzweckgefäß mit gekühltem MNC-Isolationsmedium gespült. Anschließend wurde das Medium durch den auf der Kanüle aufgesteckten Knochen hindurch aspiriert und wieder ejiziert bis der jeweilige Knochen vollständig ausgespült war. Nach der vollständigen Isolation des KM aus allen entsprechenden Knochen, wurde dieses mit der Spritze im Medium nochmals gründlich suspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.5. Isolation von murinen mononukleären Zellen (mMNCs)

Murine MNCs wurden, sowohl für die *in vitro* Radioprotektionsassays, als auch zur Identifikation der Zielzellen von mMSC-EVs *in vivo*, ausschließlich aus dem KM der Hinterläufe (bestehend aus Tibia und Femur) 8 bis 12 Wochen alter weiblicher C57BL/6 Ly5.1 Tieren isoliert.

In vitro Versuche (Radioprotektionsassays):

Nach der Isolation des KM aus drei Spendertieren (pro Tier je ein Hinterlauf) in 10 ml MNC-Isolationsmedium, wurden die zusammengeführten Zellen pelletiert (400 g, 4 °C, 7 min), der Überstand abgesaugt und die Zellen in 5 ml 1x DPBS resuspendiert. Anschließend erfolgte nach der

Zugabe von 5 ml Erylysepuffer (1,6 % Ammoniumchloridlösung) zu der Zellsuspension für 5 min die Erylyse bei 37 °C unter kontinuierlichem Schwenken. Abgestoppt wurde die Lyse mit ca. 20 ml MNC-Isolationsmedium, die Zellen erneut pelletiert (400 g, 4 °C, 7 min) und der Überstand abgesaugt. Danach wurden die Zellen in 12 ml MNC-Isolationsmedium resuspendiert, 10 µl entnommen und damit eine 1:10 Verdünnung mit Essigsäure (3 %) hergestellt. Diese Verdünnung wurde zur Bestimmung der Zellzahl/ml nach Formel 1 verwendet (siehe Kapitel 2.2.3).

In vivo Versuche (Identifikation der Zielzellen von mMSC-EVs im KM):

Das gesamte KM beider Hinterläufe eines jeden Versuchstieres wurde in 10 ml MNC-Isolationsmedium isoliert und die Zellsuspension über ein 70 µm Zellsieb geben, welches mit 5 ml Isolationsmedium nachgespült wurde. Anschließend wurden die Zellen, welche mittels ImageStream analysiert werden sollten, in der gleichen Weise aufgearbeitet wie die Zellen für die *in vitro* Experimente. Der einzige Unterschied bestand lediglich darin, dass die Zellen nach der Lyse nur in 10 ml MNC-Isolationsmedium resuspendiert wurden, bevor die Zellzählung durchgeführt wurde.

Für die Generierung von Cytospins aus den isolierten MNCs wurde hingegen gleich nachdem die Zellsuspension über das Zellsieb gegeben wurde eine 1:10 Verdünnung mit Essigsäure (3 %) hergestellt, um die Zellzahl mittels Formel 1 zu bestimmen (siehe Kapitel 2.2.3). So konnte anschließend eine definierte Menge an Zellen auf die Objektträger gebracht werden.

2.2.6. Etablierung einer murinen mesenchymalen Stromazelllinie (mMSC-Linie)

Zur Etablierung einer neuen frischen mMSC-Linie wurden von 9 männlichen 8 Wochen alten C57BL/6 Ly5.2 Tieren KM aus je beiden Femora und Tibiae isoliert. Das gesamte KM eines Tieres wurde dafür in je 5 ml MNC-Isolationsmedium gespült (siehe Kapitel 2.2.4). Anschließend wurden alle Isolate in einem 50 ml Röhrchen gepoolt, indem die KM Isolate über ein 100 µm Zellsieb geben wurden, um mögliche Knochen- und Gewebereste zu entfernen. Die leeren Isolationsgefäße wurden nacheinander mit 5 ml MNC-Isolationsmedium gespült und dann ebenfalls über das Zellsieb gegeben. Die Zellen der Suspension wurde mit einer ROTANTA 460 R Tischzentrifuge pelletiert (400 g, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in 45 ml MSC-Kultivierungsmedium (enthielt Sigma-FCS) suspendiert, dann je 5 ml Zellsuspension in neun 75 cm² Kulturflaschen mit je 10 ml vorgelegtem MSC-Kultivierungsmedium überführt und die Zellen gründlich in den Flaschen verteilt (Passage 0). Nach 3 Tagen Kultivierung im Inkubator wurde das Medium abgesaugt, mit jeweils 12 ml 1x DPBS pro Flasche nicht adhärente und tote Zellen abgewaschen und frische 15 ml MSC-Kultivierungsmedium auf die Zellen gegeben. Die übrigen adhärennten Zellen zeigten alle eine typische heterogene Zellmorphologie von murinen MSCs. Ab diesem Zeitpunkt wurde nach weiteren 3 bis 4 Tagen das Medium gewechselt (weiterhin 15 ml pro Flasche) und nach spätestens einer Woche die Zellen trypsinisiert, wobei die Hälfte der Zellen als Reserve kryokonserviert und die andere Hälfte weiter bis Passage 6 kultiviert wurde. Ab dieser Passage zeichnen sich die mMSCs durch eine gleichbleibende schnelle Proliferationsrate (1:4 bis 1:6 Ausdünnungen führen nach 4 bis 7 Tagen zu einer optischen Konfluenz von ca. 95 %) aus. Im Vergleich dazu wurden die Zellpassagen bis P5 höchstens 1:2 ausgedünnt und auch ohne Erreichen einer Konfluenz von 95 % im Durchschnitt nach einer Woche trypsinisiert. Eine fast einheitliche spindelförmige Morphologie der Zellen bereits nach den ersten

Passagen lässt von einer reinen mMSC-Kultur ausgehen. Weitere Charakterisierungen der mMSCs (siehe Kapitel 2.2.8) zur Verifizierung sind jedoch empfehlenswert.

2.2.7. mMSCs Kultivierung

In dieser Arbeit wurden mMSCs in mMSC-Kultivierungsmedium (mit und ohne Zugabe von Zytokinen: 40 pg/ml rmEGF und 4 ng/ml rmPDGF_BB) in verschiedenen Zellkulturgefäßen expandiert. In allen Fällen wurde bei allgemeiner Kultivierung zweimal wöchentlich das Medium gewechselt, die Zellen spätestens ab einer optischen Konfluenz von 95 % trypsinisiert und anschließend nicht höher als 1:8 (ohne Zytokine)/1:10 (mit Zytokine) passagiert. Die verschiedenen verwendeten Zellkulturgefäße sind in Tab. 32 mit den für sie verwendeten Volumina für Medium, Trypsin und 1x DPBS aufgelistet.

Tab. 32: Auflistung der verwendeten Kultivierungsbedingungen von mMSCs. Neben der Angabe über die verschiedenen Größen der Kulturgefäße wurde zu jeder Größe zusätzlich die dafür verwendeten Volumina von Kultivierungsmedium, 1x DPBS (Waschen der Zellen), Trypsin (Ablösen der Zellen) und das anschließende Volumen an Medium zum Abstoppen der Reaktion aufgeführt.

Zellkulturflasche	Verwendung	mMSC-Kultivierungsmedium [ml]	1x DPBS zum Waschen [ml]	0,25% Trypsin-EDTA [ml]	mMSC-Kultivierungsmedium [ml] zum Trypsin Deaktivieren
75 cm ² (T75)	Allgemeine Kultivierung von mMSCs; Etablierung von mMSC-Linie	15	15	2-3	mind. 2-3
175 cm ² (T175)	Allgemeine Kultivierung von mMSCs; Expansion von mMSCs für EV-Ernte	30	30	5	mind.5
mit mehreren Ebenen 1264 cm ² (2 Ebenen a 632 cm ²)	EV-Ernte	200	2x200	50	150
mit mehreren Ebenen 2528 cm ² (4 Ebenen a 632 cm ²)	EV-Ernte	400			
Mit mehreren Ebenen 875 cm ² (T175 5er Layer)	Expansion von mMSCs für EV-Ernte	100	2x100	50	100

2.2.7.1. Trypsinieren von mMSCs

Für das Ablösen der adhärennten mMSCs von einem Zellkulturgefäßboden wurde das Kulturmedium abgesaugt und mindestens einmal 1x DPBS vorsichtig über den am Zellgefäßboden befindlichen Zellrasen sowie allen anderen Wänden laufen gelassen, um Medienreste, die das Trypsin inaktivieren könnten, zu entfernen. Anschließend wurde ein für das jeweilige Kulturgefäß angemessenes Volumen an Trypsin-EDTA (0,25 %) auf dem gesamten Zellrasen gleichmäßig verteilt und für 5 min im Brutschrank inkubiert, wobei das Ablösen durch zwischenzeitliches Abklopfen unterstützt wurde. Zum Schluss wurden die restlichen Zellen nochmals kräftig abgeklopft bevor die Zellen mit einer Stabpipette vereinzelt und in ein 50 ml Röhrchen überführt wurden. Die leere Kulturflasche wurden mit Medium nachgespült, welches anschließend zur Zellsuspension gegeben wurde, um somit die Trypsinreaktion abzustoppen. Alternativ wurde die Trypsin-Zellsuspension in der Zellkulturflasche direkt mit dem Medium inaktiviert. In beiden Fällen wurden die Zellen anschließend nochmals gründlich suspendiert bevor sie weiterverwendet wurden.

2.2.7.2. Einfrieren von mMSCs

Für die Kryokonservierung wurden mMSCs in T175 oder T75 kultiviert. Vor dem Erreichen von 100 % Konfluenz wurden die Zellen trypsinisiert (siehe 2.2.7.1) und anschließend pelletiert (Tischzentrifuge

ROTANTA 460 R: 400 g, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in kaltem mMSC-Einfriermedium suspendiert, anschließend sofort in vorbereitete Kryoröhrchen á 500 µl aliquotiert, in einen vorgekühlten Gefrierbehälter überführt und bei -80 °C eingefroren. Nach frühestens 24 Stunden wurden die eingefrorenen Zellen für die Langzeitlagerung in Stickstofftanks umgelagert.

Im Allgemeinen wurden mMSCs ab einer Konfluenz von 95 % und vor Erreichen von 100 % für die Kryokonservierung verwendet (Ausnahme: P0 bis P5, bei denen auch unter 95 % Konfluenz kryokonserviert wurde). Zellen aus einer T75 wurden auf 4 und aus einer T175 auf 8 Kryoröhrchen aufgeteilt, indem sie zuvor in einem entsprechenden mMSC-Einfriermediumvolumen suspendiert wurden. Lag eine geringere Konfluenz vor, wurde die Anzahl an Aliquots dementsprechend verringert.

2.2.7.3. Auftauen von mMSCs

Zum Auftauen von 500 µl Aliquots kryokonservierter mMSCs wurden 120 ml des entsprechenden auf Raumtemperatur erwärmten mMSC-Kultivierungsmediums (mit oder ohne Zytokine: 40 pg/ml rmEGF und 4 ng/ml rmPDGF_BB) in eine 175 cm² Zellkulturflasche vorgelegt. Das Kryotube wurde aus dem Stickstoffaufbewahrungstank geholt, in einem Wasserbad bei 37°C unter stetigem Schwenken aufgetaut, dann unter der Sterilwerkbank mit einer 1 ml Eppendorfpipette zügig suspendiert und in die vorbereitete T175 überführt, um das im Einfriermedium enthaltene zelltoxische DMSO schnellstmöglich auf unter 0,05 % zu verdünnen. Im Medium wurden die Zellen gleichmäßig verteilt, 60 ml der Zellsuspension in eine zweite T175 überführt, beide Flaschen in einen Brutschrank gelegt und mindestens 24 h, höchstens jedoch 72 h, kultiviert bevor der erste Medienwechsel mit 30 ml mMSC-Kultivierungsmedium (mit und ohne Zytokine) pro T175 erfolgte.

2.2.8. Charakterisierung von mMSCs

Die in dieser Arbeit verwendeten mMSC wurden durch Kultivierung von frisch isolierten murinen Knochenmark nach einem etabliertem Kultivierungsprotokoll erzeugt. Zur Überprüfung, ob tatsächlich eine reine mMSC-Kultur vorliegt, ist eine anschließende Charakterisierung der Zellen nötig.

Für die Charakterisierung von humanen MSCs wird von der *International Society for Cellular Therapy (ISCT)* neben der Plastikadhärenz und der *in vitro* Differenzierbarkeit in Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten ebenfalls ein Expressionsnachweis typischer MSC-Oberflächenmarker und die Abwesenheit von epithelialen und hämatopoetischen Markern mittels Durchflusszytometrie gefordert (Dominici *et al.* 2006). Gleiche Charakteristika gelten auch für MSCs aus anderen Spezies, wobei hierbei die Marker entsprechend angepasst werden müssen.

2.2.8.1. Differenzierung von mMSCs

Ein Charakteristikum der mMSCs ist die *in vitro* Differenzierbarkeit in Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten. Um diesen Nachweis zu erbringen, wurden die mMSCs in ihrem entsprechenden mMSC-Kultivierungsmedium (Sigma- oder Lonza-FCS) mit oder ohne Zytokin Zusatz in je zwei 175 cm² Zellkulturflaschen bis zu einer optischen Konfluenz von ca. 90 bis 95 % expandiert. Die Zellen wurden anschließend trypsiniert (siehe Abschnitt 2.2.7.1) und alle Zellen einer Bedingung in einem 50 ml Röhrchen vereinigt. Die T175 wurden mit je 5 ml des entsprechenden mMSC-Kultivierungsmediums

nachgespült, bevor damit die Trypsinreaktion im 50 ml Röhrchen abgestoppt und die Zellen als Einzelzellen im Medium verteilt wurden. Aus einer 1:2 Verdünnung der Suspension mit 0,4 % Trypanblau-Lösung wurde schlussendlich die Zellzahl ermittelt (siehe Kapitel 2.2.3.).

2.2.8.1.1. Chondrogene Differenzierung (modifiziert nach Shakibaei *et al.*, 1997)

Für die Differenzierung von mMSCs in Chondroblasten wurde im Vorfeld frische 4 % Alginate-Lösung angesetzt (Natriumalginate in 0,15 M NaCl₂ unter Hitzezufuhr auf einem Magnetrührer gelöst) und diese für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Pro Kultivierungsbedingung wurden jeweils in drei Löcher einer 6-Loch-Zellkulturplatte 3 ml steril filtrierte 0,1 M CaCl₂-Lösung vorgelegt, während je $1,8 \cdot 10^6$ Zellen pro Kultivierungsbedingung in einem 50 ml Röhrchen pelletiert wurden (Tischzentrifuge 5415C: 310 g, Raumtemperatur, 7 min). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in je 500 µl des entsprechenden mMSC-Kultivierungsmedium suspendiert und dann gründlich mit je 500 µl Alginate-Lösung (4 %) vermischt. Die entstandene Alginate-Zell-Mischung wurde mit einer 200 µl Filterspitze in die vorgelegte CaCl₂-Lösung [0,1 M] getropft, so dass in allen Löchern zum Schluss ungefähr 15 Alginate-Kugeln vorlagen. Nachdem die Kugeln 10 min geliert waren, wurden diese jeweils dreimal mit 1x DPBS und zweimal mit dem entsprechenden mMSC-Kultivierungsmedium gewaschen, bevor je 3 ml mMSC-Kultivierungsmedium mit und ohne Zytokine auf die Kugeln pro Loch gegeben wurden. Pro Loch wurden sofort im Anschluss jeweils ca. 5 Kugeln entnommen und als Differenzierungskontrolle einer Alcian-Blau Färbung unterzogen. Die weiteren Kugeln wurden 7 bis 14 Tage im Brutschrank kultiviert, wobei das jeweilige Medium in dem Zeitraum zweimal gewechselt wurde. Abschließend wurden die Kugeln einer Alcian-Blau Färbung (siehe Abschnitt 2.2.8.2.1) unterzogen, um zu ermitteln ob die mMSCs in Chondroblasten differenziert waren.

2.2.8.1.2. Adipogene Differenzierung (modifiziert nach Pittenger, 1998)

Pro Kultivierungsbedingung (Lonza-FCS; Sigma-FCS mit oder ohne Zytokine) wurden jeweils 1 ml des entsprechenden mMSC-Kultivierungsmediums mit $1 \cdot 10^4$ mMSCs in je 8 Löchern einer 24-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. Diese wurden mindestens 24 h kultiviert bis die Zellen adhären und fast vollständig konfluent waren, bevor die Zellen in 6 der je 8 Löcher pro Bedingung differenziert wurden. Die anderen beiden Löcher dienten jeweils als Kontrollen und wurden unter normalen Bedingungen (entsprechendes mMSC-Kultivierungsmedium mit und ohne Zytokine) parallel kultiviert, indem das Medium in gleicher Frequenz wie das der zu differenzierenden Zellen gewechselt wurde. Für die Differenzierung der mMSCs in Adipozyten wurden die Zellen abwechselnd mit Induktions- und Erhaltungsmedium kultiviert. Dies wurde mit je 1 ml Induktionsmedium (entsprechendes mMSC-Kultivierungsmedium mit und ohne Zytokine supplementiert mit 0,5 mM IBMX, 0,1 µM Dexamethason, 100 µM Indomethacin und 10 µg/ml Insulin) pro Loch begonnen. Nach 2 bis 3 Tagen wurde das Induktionsmedium für jeweils einen Tag durch je 1 ml Erhaltungsmedium (entsprechendes mMSC-Kultivierungsmedium mit und ohne Zytokine supplementiert mit 10 µg/ml Insulin) pro Loch ersetzt. Die Differenzierung wurde 3 bis 4 Wochen durchgeführt, bis unter dem Mikroskop bei ausreichend vielen Zellen deutliche vakuoläre Strukturen erkennbar waren. Um den Nachweis zu erbringen, dass es sich dabei um Fettvakuolen handelt, was ein Charakteristikum von Adipozyten ist

und diese nur unter Differenzierungsbedingungen auftreten, wurde anschließend eine modifizierte Ölrot-O-Färbung (siehe Abschnitt 2.2.8.2.2) vorgenommen.

2.2.8.1.3. Osteogene Differenzierung (nach Jaiswal *et al.* 1997)

Pro Kultivierungsbedingung (Lonza-FCS; Sigma-FCS mit oder ohne Zytokine) wurden jeweils 1 ml mMSC-Kultivierungsmedium mit oder ohne Zytokine mit 1×10^4 mMSCs in je 8 Löchern einer 24-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. Diese wurden mindestens 24 h kultiviert bis die Zellen adhärent und fast vollständig konfluent waren, bevor die Differenzierung in 6 der je 8 Löcher pro Bedingung begonnen wurde. Die anderen beiden Löcher dienten jeweils als Kontrollen und wurden unter normalen Bedingungen (mMSC-Kultivierungsmedium mit und ohne Zytokine) parallel kultiviert, indem das Medium in gleicher Frequenz wie das Differenzierungsmedium gewechselt wurde. Zur Differenzierung der mMSCs in Osteoblasten wurde ein Differenzierungsmedium bestehend aus entsprechenden mMSC-Kultivierungsmedium (mit oder ohne Zytokine) mit 100 nM Dexamethason (Stammlösung: 10 mM Dexamethason), 50 μ M Ascorbinsäure-2-phosphat (Stammlösung: 5 mM Ascorbinsäure-2-phosphat) und 10 mM beta-Glycerolphosphat (Stammlösung: 1 M beta-Glycerolphosphat) verwendet (Jaiswal *et al.* 1997). Pro Loch wurde jeweils 1 ml des entsprechenden Differenzierungsmediums vorsichtig auf die Zellen gegeben. Das Medium wurde alle 3 bis 4 Tage gewechselt, wobei das Differenzierungsmedium höchstens für eine Woche im Voraus angesetzt wurde.

Nach 2 bis 3 Wochen waren bereits mit bloßen Auge Plaques im Zellrasen der differenzierten Zellen zu erkennen, bei denen es sich um gebildete Knochenmatrix handeln könnte, so dass eine van Kossa Färbung (siehe Abschnitt 2.2.8.2.3) durchgeführt wurde.

2.2.8.2. Histologische Färbungen

2.2.8.2.1. Alcian-Blau Färbung

Chondroblasten sind an der Knorpelbildung beteiligt, indem sie die Knorpelmatrix (Proteoglykane und Kollagenfasern) synthetisieren bevor sie zu Chondrozyten ausdifferenzieren. Eine Grundsubstanz von Proteoglykanen ist Glykosaminoglykan (GAG), welches Carboxyl- und Sulfatgruppen besitzt. Diese beiden chemischen Gruppen lassen sich unter sauren Bedingungen (\leq pH 2,5) mittels einer Alcian-Blau Färbung nachweisen. Das Auftreten einer Blaufärbung ist daher nicht nur der Nachweis für das Vorliegen von Glykosaminoglykan, sondern auch für die Differenzierung der mMSCs in Chondroblasten.

Für die Färbung wurden die jeweiligen in einem Loch befindlichen Alginatkügelchen eines jeden Differenzierungsansatzes bzw. einer jeden Kontrolle in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 5 ml 10 % Formaldehyd (37 % Formaldehyd-Lösung mit 1xDPBS verdünnt) überführt und für 60 min auf einem Horizontalschüttler fixiert. Die Fixierlösung wurde vorsichtig ohne Verlust der Alginatkugeln abgesaugt, dann sofort jeweils 5 ml 2 % Essigsäure-Lösung (konzentrierte Essigsäure mit Reinstwasser 1:50 verdünnt) pro 50 ml Reaktionsgefäß zugegeben und die Kugeln darin 5 min auf einem Horizontalschüttler gewaschen, bevor zur Färbelösung gewechselt wurde. Pro Färbeansatz wurden die Kugeln ca. 5 bis 6 h auf einem Horizontalschüttler in je 5 ml gebrauchsfertiger und filtrierter Alcian-Blau-Lösung gefärbt. Anschließend wurde die Alcian-Blau-Lösung (da diese bei differenzierten Kugeln, bereits farblos war) nochmals durch 5 ml frische Färbelösung ersetzt. Nach einer Färbezeit von

insgesamt 24 h wurden die Kugeln jeweils dreimal mit Reinstwasser (5 ml pro Reaktionsgefäß) gewaschen und nacheinander mit je 5 ml aufsteigender Alkoholreihe (30 %, 50 %, 70 % und 90 %) jeweils 10 min auf einem Horizontalschüttler dehydriert. Zum Schluss wurde höchstens 5 ml Xylol pro Reaktionsgefäß auf die entsprechenden Kugeln gegeben und mindestens 10 min inkubiert bevor die Alginatkugeln für spätere Auswertungen eingedeckelt wurden. Beim Eindeckeln wurden ein bis zwei Alginatkugeln aus einem Ansatz auf einen Objektträger gelegt und vorsichtig mit Hilfe eines Deckgläschen und einer umgedrehten Pipettenspitze flach gedrückt. Anschließend wurde ausreichend Entellan auf die flache Kugel gegeben und mit dem Deckgläschen Luftblasenfrei bedeckt. Nach frühestens 24 h Trockenzeit konnten mittels einer digitalen Spiegelreflexkamera auf einem Inversmikroskop die gefärbten mMSCs in den Alginatkugeln mit verschiedenen Vergrößerungen dokumentiert und Kontrollen mit differenzierten Zellen verglichen werden.

2.2.8.2.2. Ölrot-O-Färbung (modifiziert)

Typisches Differenzierungsmerkmal von Adipozyten ist die Einlagerung von Lipid-Tropfen im Zytoplasma. Diese wurden in dieser Arbeit mittels einer Ölrot-O-Färbung als Nachweis für die Differenzierung von mMSCs in Adipozyten verwendet. Das Ölrot-O, oder wie bei dieser Färbung das verwendete Sudan 7B (Fettrot 7B), ist ein fettlöslicher Azofarbstoff, der sich in den Fett-Tropfen anreichert und diese orange-rot färbt.

Nachdem bereits unter dem Mikroskop in den differenzierungsinduzierten Löchern mehrere Areale von Zellen mit einer großen (univakuolär) oder vielen kleinen (multivakuolär) Fettvakuolen im Zytoplasma sichtbar waren, wurde die Färbung durchgeführt. Alle Zellen, undifferenzierte Kontrollen sowie differenzierte Zellen, die sich auf einer 24-Loch-Zellkulturplatte befanden, wurden gleichzeitig gefärbt. Das jeweilige Medium wurde entfernt und die Zellen mit je 1 ml 1x DPBS pro Loch vorsichtig gewaschen ohne den Zellrasen abzulösen. Anschließend wurden die Zellen 1 min mit 1 ml 10 % Formaldehyd (37 % Formaldehyd Lösung mit 1xDPBS verdünnt) fixiert und mit je 1 ml 50 % EtOH (absoluter EtOH mit Reinstwasser verdünnt) gewaschen, bevor je 1 ml Fettrot 7B Färbelösung (10 ml Fettrot 7B Stocklösung + 1 ml Reinstwasser) in jedes zellhaltige Loch der Zellkulturplatte gegeben wurde. Nach 15 bis 90 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Färbelösung entfernt, die Zellen erneut mit je 1 ml 50 % EtOH gewaschen und zusätzlich die Zellkerne mit je 1 ml Mayers Hämalaunlösung 5 min gegengefärbt. Nach Entfernung der Färbelösung wurden alle Löcher unter fließendem Leitungswasser gespült und somit die Zellkerne gebläut. Zum Schluss wurde jedes Loch nochmals dreimal mit jeweils 2 ml Reinstwasser gespült und für eine Langzeitlagerung mit 4 % Formaldehyd (37 % Formaldehyd Lösung mit 1x DPBS verdünnt) bis zum Lochrand bedeckt. Für die Dokumentation wurde der Formaldehyd möglichst vollständig abgenommen. Mittels einer digitalen Spiegelreflexkamera auf einem Inversmikroskop wurden in verschiedenen Vergrößerungen Aufnahmen von den gefärbten Kontroll- und differenzierten Zellen gemacht.

2.2.8.2.3. Van Kossa Färbung

Osteoblasten sezernieren Knochenmatrix, bestehend aus dem Osteoid mit mineralischen Ablagerungen (wie z.B. Hydroxylapatit). Das neben dem anorganischen Phosphat enthaltende Kalzium in den

Hydroxylapatit kann mittels der van Kossa Färbung (Silbernitratnachweis) indirekt sichtbar gemacht werden, indem Silberionen die Kalziumionen in den Kristallen ersetzen und dann durch UV-Licht zu kolloidalem Silber reduziert werden. Dies hat eine schwarze Färbung in den betroffenen Regionen zur Folge und kann somit als Nachweis von in Osteoblasten differenzierte mMSCs genutzt werden.

Von allen angesetzten Differenzierungen wurden alle 8 Löcher (6 differenzierte und 2 Differenzierungskontrollen) einer 24-Loch-Zellkulturplatte gefärbt. Dafür wurden die Zellen zuerst mit je 1 ml 1x DPBS pro Loch gewaschen, so dass der Zellrasen nicht abschwamm. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml 4 % Formaldehyd (37 % Formaldehyd Lösung mit 1x DPBS verdünnt) pro Loch 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die fixierten Zellen wurden dann erneut vorsichtig mit je 1 ml 1x DPBS pro Loch sowie zusätzlich 2-mal mit je 1 ml Reinstwasser pro Loch gewaschen. Nachdem die Zellen an der Luft getrocknet waren (ca. 45 min), wurde pro Loch der Zellkulturplatte 1 ml Silbernitratlösung (6 %) gegeben und die gesamte 24-Loch-Zellkulturplatte unter einer UV-Lampe 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Einzig in den differenzierten Löchern sollten nun schwarze Ablagerungen sichtbar geworden sein, so dass die Silbernitratlösung entfernt und die Zellen dreimal nacheinander mit Reinstwasser (1 ml/Loch) gewaschen werden konnten. Die Zellen wurden erneut an der Luft getrocknet und für eine Langzeitlagerung mit Paraffinöl überschichtet. Für die Dokumentation wurde das Öl möglichst vollständig abgenommen und mittels einer digitalen Spiegelreflexkamera auf einem Inversmikroskop in verschiedenen Vergrößerungen Aufnahmen gemacht.

2.2.8.3. Nachweis der Anwesenheit von mMSC-Oberflächenantigenen und der Abwesenheit von epithelialen und hämatopoetischen Markern

Anhand verschiedener publizierter Ergebnisse zur Charakterisierung von mMSCs basierend auf der Anwesenheit und Abwesenheit bestimmter Marker, wurde ein geeignetes FACS-Panel zusammengestellt (siehe Tab. 24, Absatz 2.1.15.2). Als typische positive Marker wurden SCA-1, CD105, CD73 sowie teilweise CD44 und als negative Marker CD34 (HSC- und Epithel-Marker), CD45 (Leukozyten-Marker), CD90.2 (T-Zell-Marker), CD11b (z.B. Monozyten-Marker), CD117 (HSC-/HPC-Marker) und MHCII (Marker für Antigen-präsentierende Zellen) gewählt.

Murine MSCs wurden für jede Bedingung mit dem entsprechenden mMSC-Kultivierungsmedium (mit oder ohne Zytokine) in drei 175 cm² Zellkulturflaschen (T175) expandiert. Nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 90 % wurden die Zellen aller drei T175 einer Bedingung parallel trypsinisiert (siehe Kapitel 2.2.7.1) und die vereinzelt Zellen in einem 50 ml-Röhrchen vereinigt. Bevor mit 15 ml des entsprechenden mMSC-Kultivierungsmediums die Trypsinreaktion abgestoppt wurde, wurde damit die drei leeren T175 nacheinander ausgespült. Die Einzelzellen wurden mittels Stabpipette gleichmäßig im Medium verteilt und die Zellzahl mittels einer 1:2 Verdünnung mit 0,4 % Trypanblau-Lösung ermittelt, indem 10 Großquadrate ausgezählt wurden (siehe Kapitel 2.2.3).

Pro Behandlung wurden zur Einstellung der Messparameter des Durchflusszytometers BD FACS Canto II und dem Gating jeweils $5 \cdot 10^5$ ungefärbte Zellen (Kontrollen) verwendet. Des Weiteren wurde für die Analyse der Oberflächenantigene eine entsprechende Anzahl an Durchflusszytometrieröhrchen mit je $2 \cdot 10^5$ (für Sigma-FCS mit und ohne Zytokine) oder $2,5 \cdot 10^5$ (für Lonza-FCS) der entsprechenden Zellen

befüllt. Alle Zellen wurden pelletiert (Tischzentrifuge Rotanta: 400 g, Raumtemperatur, 3 min), der Überstand dekantiert, die Pellets der zu analysierenden Zellen in je 50 µl Fc-Block-Lösung (1 µg Fc-Block/1*10⁶ Zellen in 1x DPBS) mittels vortexen suspendiert und für 5 min inkubiert. Die Pellets der Kontrollen wurden unmittelbar in 500 µl 1x DPBS suspendiert und bis zur Messung bei 4 °C gelagert.

Färbung der Kompensationskontrollen:

Die Anzahl der benötigten Proben für die Kompensation eines jeweiligen Experimentes war abhängig von der Anzahl an zu detektierenden Fluoreszenzen in der Analyse. Um alle Fluoreszenzen möglichst effizient gegeneinander kompensieren zu können, wurden Antikörper verwendet, bei denen erwartet wurde, dass auf Grund der Expression des Antigens auf mMSCs auch eine Fluoreszenz detektierbar sein würde. Dementsprechend wurden folgende Antikörper für die Kompensation verwendet: CD105 (APC), SCA-1 (PE), CD105 (PE/Cy7) und CD44 (APC/Cy7). Die Fluoreszenzkonjugate PE/Cy7 und APC/Cy7 wurden nur in Versuchen mit Sigma-FCS haltigem Kultivierungsmedium mit und ohne Zytokine verwendet. Zusätzlich wurde in allen Versuchen 7AAD in die Kompensation mit einbezogen.

Zu jeder Probe in 50 µl Fc-Block-Lösung wurde je 1 µg des entsprechenden Antikörpers pro 1*10⁶ Zellen oder nichts zugegeben, kurz gevortext und die Proben dann für mindestens 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit jeweils 2 ml 1x DPBS aufgefüllt, zentrifugiert (Tischzentrifuge Rotanta: 400 g, Raumtemperatur, 3 min) und der Überstand dekantiert. Durch Vortexen der Zellen in 200 µl kaltem 1x DPBS wurden sie erneut suspendiert und alle gefärbten Proben bis zur Messung bei 4 °C gelagert. Die Probe ohne Antikörper wurde mit 0,25 µg 7AAD pro 1*10⁶ Zellen 10 min bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Die Hälfte der Probe wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, für 5 min bei 65 °C auf einem Thermoblock denaturiert, auf Eis abgekühlt, zurück zu der übrigen Probe im Durchflusszytometrieröhrchen pipettiert und ebenfalls bis zur Messung bei 4 °C gelagert.

Färbung Isotypkontrollen:

Isotypkontrollen oder auch unspezifische Immunglobuline dienen unter anderen in der Durchflusszytometrie zur Ermittlung des Hintergrundsignals (Bindung des Antikörpers an nicht spezifische Antigene, Autofluoreszenz der Zellen, weitere unspezifische Antikörperinteraktionen) eines Primärantikörpers. Entsprechend der Primärantikörper wurden solche Isotypkontrollen ausgewählt (siehe Tab. 25 in 2.1.15.2), die aus derselben Spezies isoliert wurden sowie aus demselben IgG-Subtyp bestanden und zusätzlich mit demselben Fluoreszenzkonjugat wie die Primärantikörper (siehe Tab. 24 in 2.1.15.1) versehen waren.

Pro Probe einer jeden Bedingung mit je 2*10⁵ (für Sigma-FCS mit und ohne Zytokine) oder 2,5*10⁵ (für Lonza-FCS) in der Fc-Block-Lösung wurde je 1 µg pro 1*10⁶ Zellen der entsprechenden Isotypkontrolle gegeben, durch vortexen vermischt und mindestens 30 min bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 2 ml 1x DPBS aufgefüllt und die gefärbten Zellen pelletiert (Tischzentrifuge Rotanta: 400 g, 3 min, Raumtemperatur). Die Überstände wurden verworfen, die Zellen in 200 µl kaltem 1x DPBS suspendiert und zu jeder Probe 7AAD [0,25 µg/1*10⁶ Zellen] für die Diskriminierung toter von lebenden Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend für mindestens 10 min bei 4 °C inkubiert, bevor sie vermessen wurden.

Primärantikörper-Färbung:

Pro Bedingung wurden die für die Analyse vorbereiteten in Fc-Block-Lösung suspendierten Zellen ($2 - 2,5 \cdot 10^5$) mit einem Panel aus 9 oder 11 verschiedenen Antikörpern (siehe Kapitelabschnitt 2.1.15.2, Ausnahme: CD105 mit APC konjugiert diente ausschließlich als Kompensationskontrolle) gefärbt. Die Zellen wurden mit je einem der entsprechenden Antikörper [$1 \mu\text{g}/1 \cdot 10^6$ Zellen] vermischt. Der Antikörper MHCII (APC) war hiervon ausgenommen, da von diesem lediglich $0,5 \mu\text{g}/1 \cdot 10^6$ Zellen verwendet wurde. Die Färbung fand bei 4°C unter Lichtausschluss für mindestens 30 min statt. Beendet wurde sie anschließend durch Zugabe von 2 ml 1x DPBS zu jeder Probe und dem Pelletieren der Zellen (Tischzentrifuge Rotanta: 400 g, 3 min, Raumtemperatur). Nachdem der Überstand dekantiert war, wurden die Zellen in je 200 μl kaltem 1x DPBS aufgenommen, mit 7AAD [$0,25 \mu\text{g}/1 \cdot 10^6$ Zellen] (lebend/tot Färbung) vermischt und mindestens 10 min im Kühlschrank (4°C) inkubiert, bevor die gefärbten Zellen analysiert wurden.

Analyse mittels Durchflusszytometrie:

Alle vorbereiteten Proben wurden am BD FACS Canto II in der FACS Sorting Core Unit des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf analysiert. Die dafür verwendete Gatingstrategie ist in Abb. 11 als Beispiel anhand von mMSCs (kultiviert in Sigma-FCS haltigem mMSC-Kultivierungsmedium mit Zytokinen) dargestellt und wurde anhand ungefärbter Kontrollzellen ($5 \cdot 10^5$ Zellen) erstellt. Anhand der linearen Auftragung der Flächen von Seitwärtsstreuung (SSC-A) gegen Vorwärtsstreuung (FSC-A), wurde die mMSC-Population fokussiert und mit dem Gate P1 ausgewählt. Diese mMSC-Population wurde dann zusätzlich bei allen Experimenten mit Sigma-FCS haltigem mMSC-Kultivierungsmedium (mit und ohne Zytokine) durch lineare Auftragung der Höhe der Vorwärtsstreuung gegen die Weite der Vorwärtsstreuung auf Einzelzellen untersucht, die durch ein weiteres Gate (P2) ausgewählt wurden.

Durch den Einsatz des fluoreszierenden Farbstoffes 7AAD konnten zusätzlich durch die Detektion der Intensität [relative Einheit] des Farbstoffes die toten Zellen ausgeschlossen werden. Denn nur bei bereits stark apoptotischen (toten) Zellen ist die Zellmembran ausreichend geschädigt, dass der Farbstoff aufgenommen werden und mit der DNA interkalieren kann. Demzufolge sind die lebenden Zellen negativ für das 7AAD-Signal (P3). Die lebenden Zellen wurden dann im Hinblick auf die Anwesenheit der entsprechenden an den verwendeten Antikörpern (CD34, CD45, CD90.2, CD117, CD11b, MHCII, SCA-1, CD105, CD73 und CD44) konjugierten Fluoreszenzproteine (PE (P4), APC (P5), APC/Cy7 (P6) und PE-Cy7 (P7)) analysiert, indem die Histogrammdarstellung (Auftragung der Anzahl Zellen gegen die jeweilige Fluoreszenz) gewählt wurde. Bei mMSCs, welche in Lonza-FCS-haltigem Kultivierungsmedium expandiert wurden, wurde das Einzelzell-Gating ausgelassen und gleich die mMSCs aus P1 auf lebendige Zellen (P2) untersucht. Von diesen wurde anschließend die Intensität der Fluoreszenzen PE (P3) für CD34, CD45, CD90.2, CD117, CD11b, SCA-1 und CD105 sowie APC (P4) für MHCII detektiert.

Nachdem das Gating gesetzt war, wurden die Kompensationskontrollen eingemessen und die Kompensation vom Messprogramm (FACSDiva) berechnet. Danach wurden sowohl die Isotypkontrollen als auch die antikörpergefärbten Zellen einer jeden Bedingung nacheinander gemessen, wobei mindestens 20.000 Zellen in P2 bzw. P1 bei Lonza-FCS vermessen wurden.

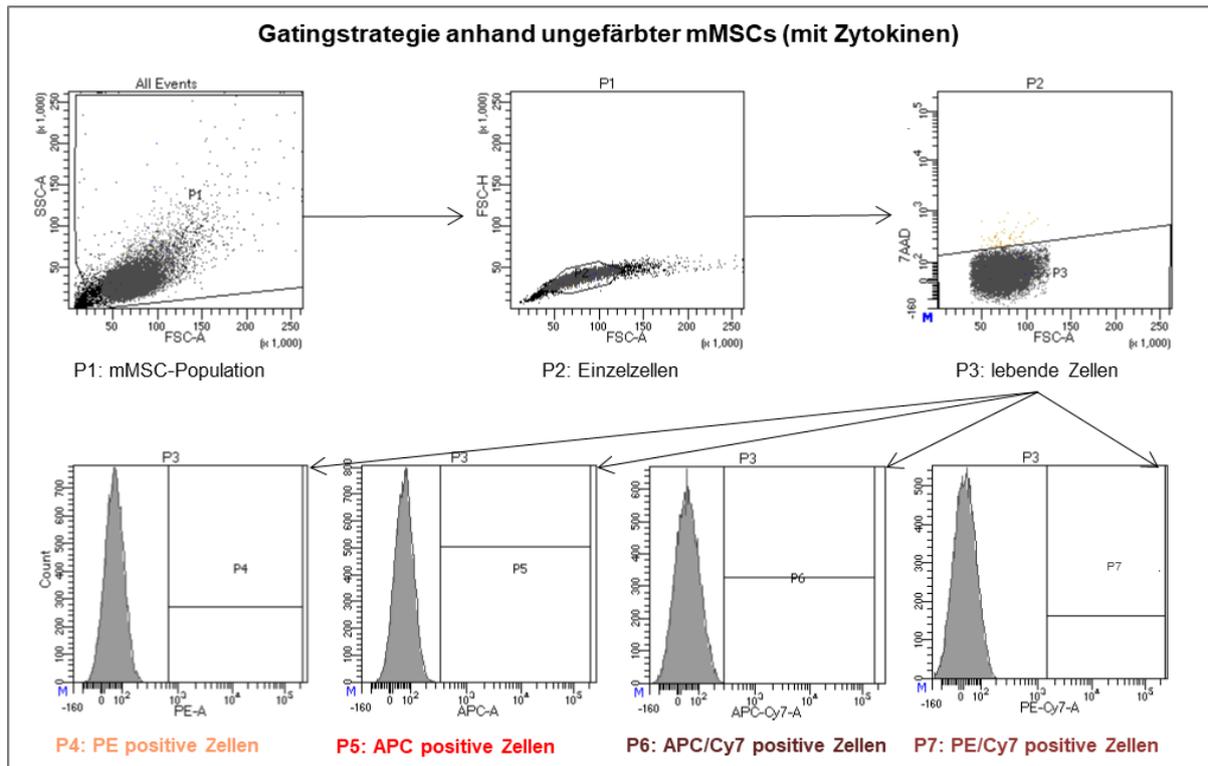


Abb. 11: Gatingstrategie für mMSCs Charakterisierung. Mittels der dargestellten Messeinstellung wurde in dieser Arbeit an einem Canto II Durchflusszytometer die Anwesenheit typischer mMSC-Marker und die Abwesenheit hämatopoetischer und epithelialer Marker auf mMSCs nachgewiesen. Die Zellen wurden dafür mit speziellen Antikörpern (AK) gegen diese ausgewählten Marker gefärbt, wobei jeder AK mit einem der vier dargestellten Fluoreszenzproteine gekoppelt war. Die Detektion der jeweiligen Fluoreszenz zeigt dementsprechend an, dass der jeweilige Marker auf den mMSCs exprimiert war.

Alle Fluoreszenzintensitäten (7AAD, PE, APC, APC/Cy7 und PE/Cy7) und Streuungen (FSC und SSC) sind relative Einheiten. Der Achsenauftrag von FSC und SSC erfolgte linear, wohingegen die Fluoreszenzintensität immer logarithmisch dargestellt wurde.

FSC = Vorwärtsstreuung; SSC = Seitwärtsstreuung, 7AAD = 7-Aminoactinomycin, APC = Allophycocyanin, APC/Cy7 = Allophycocyanin-Cyanin-7, PE = Phycoerythrin, PE/Cy7 = Phycoerythrin-Cyanin-7.

Auswertung:

Um die Anwesenheit oder Abwesenheit der Oberflächenmarker mittels Antikörperfärbung und FACS (engl.: *fluorescence-activated cell sorting*)-Analyse zu ermitteln, wurde ein Overlay der gemessenen Antikörperfärbung mit der entsprechenden passenden Isotypkontrolle (Negativkontrolle) verwendet. Dabei wurde das Gate, in welchem die jeweilige Fluoreszenz detektiert wurde, so gesetzt, dass für die Isotypkontrollen höchstens 0,1 % der Zellen positiv waren, was als Hintergrundsignal vernachlässigt werden kann. Das entsprechende Gate wurde dann ebenfalls für alle zu analysierenden Proben verwendet, die diese Isotypkontrolle benötigten. Somit wurde in allen Proben bei der Ermittlung des Anteils an positiven Zellen die Spezifität des jeweiligen Primärantikörpers berücksichtigt. Für den Antikörper CD44 (APC/Cy7) war keine Isotypkontrolle verfügbar, weshalb das Gate anhand der Isotypkontrolle von IgG2a-APC gebildet wurde.

2.2.9. Expansion von mMSCs für die Ernte von extrazellulären Vesikeln

Unbehandelte mMSCs wurden zur Isolation von EVs für NGS und Transplantationen in Lonza-FCS-haltigem mMSC-Kultivierungsmedium expandiert und daher im weiteren als Lonza-mMSCs bezeichnet. Die Expansion von transduzierten mMSCs, bei denen der Einfluss einer Runterregulation ausgewählter

Gene mittels lentiviral eingebrachter shRNAs sowohl in den Zellen als auch in den von ihnen produzierten EVs untersucht werden sollte, wurde hingegen in einem Sigma-FCS-haltigem mMSC-Kultivierungsmedium mit und ohne Zugabe von Zytokinen (40 pg/ml rmEGF und 4 ng/ml rmPDGF_BB) durchgeführt. Diese wurden in Analogie zu den Lonza-mMSCs Sigma-mMSCs genannt. Die Expansion von allen mMSCs fand in drei Stufen statt, um eine ausreichende Menge an EVs zu erhalten.

In der ersten Stufe wurden die benötigten Zellen aufgetaut (siehe Kapitel 2.2.7.3) und anschließend in zwei T175 bis zu einer optischen Konfluenz von 80-90 % kultiviert, was durchschnittlich nach 4 Tagen und spätestens nach 6 Tagen erreicht war. Die beiden Zellkulturflaschen wurden parallel trypsiniert, in einer der beiden Flaschen gepoolt, mit dem entsprechenden mMSC-Kultivierungsmedium abgestoppt und zusätzlich auf ein geeignetes Volumen gebracht, welches das Aussäen der Zellen in Bezug zu Zellkulturflaschenart und deren Anzahl für die zweite Stufe erlaubte. Für die Expansion der Lonza-mMSCs und Sigma-mMSCs ohne Zytokine wurden die Zellen auf ein Gesamtvolumen von 200 ml aufgefüllt, die Zellsuspension auf zwei T175 5er Layer aufgeteilt (1:5 Split) und die Zellen in diesen gleichmäßig auf allen Ebenen verteilt bevor sie für die weitere Kultivierung in den Brutschrank gestellt wurden. Die Sigma-mMSCs mit Zytokin-Zugabe hingegen wurden auf Grund von Materialänderungen bei den T175 5er Layer, welche das Wachstum der Zellen negativ beeinflusst hatte, stattdessen in einzelnen T175 weiter kultiviert. Dabei wurde die Zellsuspension entweder auf 240 ml (für 8 T175; 1:4 Split) oder 300 ml (für 10 T175; 1:5 Split) aufgefüllt. Pro T175 wurden je 30 ml Zellsuspension ausgesät. Zum erneuten Erreichen einer optischen Konfluenz von 80-90 % brauchten die Zellen in T175 5er Layer 3 bis 5 Tage und die Zellen in normalen T175 Flaschen 4 bis 6 Tage. Lag nach drei Tagen Kultivierung erst eine Konfluenz von ca. 50 % vor, wurde das entsprechende mMSC-Kultivierungsmedium gewechselt, ansonsten nicht. Die ausreichend konfluenten Zellen wurden erneut trypsiniert, indem die zwei T175 5er Layer parallel behandelt und bei den 8 oder 10 T175 ebenfalls immer nur zwei Flaschen parallel abgelöst wurden.

Die T175 5er Layer wurden wie in Abschnitt 2.2.7 beschrieben mit den in Tab. 32 aufgelisteten Volumina der benötigten Reagenzien trypsiniert und die abgeklopften Zellen beider Flaschen in einer sterilen 500 ml Schottflasche mit bereits 100 ml vorgelegtem entsprechendem mMSC-Kultivierungsmedium zusammengeführt. Die Zellen wurden gründlich suspendiert und die leeren Kulturflaschen jeweils mit 100 ml entsprechendem mMSC-Kultivierungsmedium nachgespült und ebenfalls in die Schottflasche überführt, so dass schlussendlich 400 ml Zellsuspension vorlag.

Die ersten beiden T175 wurden, wie in Kapitel 2.2.7.1 beschrieben, trypsiniert, die Zellen anschließend in eine der beiden T175 zusammengeführt und bevor 10 ml des entsprechenden mMSC-Kultivierungsmediums zum Abstoppen der Trypsinreaktion verwendet wurden, wurde mit diesem zuerst die leere Flasche ausgespült. Die weiteren T175 wurden in gleicher Weise trypsiniert, mit dem Unterschied, dass die abgelösten Zellen unmittelbar zu der bereits vorliegenden Zellsuspension in der ersten T175 überführt wurden. Dort erfolgte eine gründliche Vereinzlung der Zellen und beide leeren T175 wurden nacheinander mit demselben mMSC-Kultivierungsmedium (10 ml) ausgespült und dann das Medium in die Zellsuspension überführt. Durch dieses Vorgehen lagen zum Schluss insgesamt 80 oder 100 ml Zellsuspension vorlagen, welche dann mit entsprechendem mMSC-Kultivierungsmedium auf ein Gesamtvolumen von 200 ml gebracht wurden.

Die Zellsuspension (400 ml aus zwei T175 5 Ebenen oder 200 ml aus 8-10 T175) wurde anschließend gleichmäßig auf zwei Medienflaschen verteilt und entweder auf je 600 ml (für insgesamt 12 Ebenen á 632 cm² – zwei 4-Ebenen und zwei 2-Ebenen Flaschen: Sigma-mMSCs ohne Zytokine) oder je 500 ml (für insgesamt 10 Ebenen á 632 cm² – zwei 4-Ebenen und eine 2-Ebenen Flasche: Sigma-mMSCs mit Zytokine und Lonza-mMSCs für NGS) mit entsprechenden mMSC-Kultivierungsmedium (mit oder ohne Zytokine) aufgefüllt. Die Zellsuspension aus beiden Flaschen wurde gleichmäßig auf die entsprechenden Ebenen verteilt, wobei pro Ebene 100 ml Zellsuspension verwendet und die mMSCs anschließend bis zu einer optischen Dichte von mindestens 80 % kultiviert wurden. Dies stellte die letzte Stufe der Expansion vor der EV-Ernte dar.

2.2.10. Ernte und Isolation von extrazellulären Vesikeln

Um ausreichend mMSC-produzierte EVs für *in vitro* und *in vivo* Analysen zu erhalten, wurden die jeweils zu untersuchenden mMSCs auf 10 oder 12 Ebenen á 632 cm² expandiert. Bei einer optischen Konfluenz von mindestens 80 % wurde das zur Kultivierung verwendete Medium dekantiert und pro Ebene 100 ml EV-depletiertes mMSC-Medium zur Vorbereitung der EV-Ernte gegeben. Dieses Medium setzt sich wie das entsprechende mMSC-Kultivierungsmedium zusammen mit dem Unterscheid, dass das im Medium verwendete FCS zuvor zur Entfernung der generell in diesem enthaltenen eignen EVs (Sigma- und Lonza-FCS) ultrazentrifugiert (Optima LE-80K mit SW28 Rotor und entsprechenden Zentrifugenröhrchen: mindestens 22 h, 120.000 g mit geringer Bremse bei 4 °C) und anschließend zusätzlich zum Erhalt der Sterilität filtriert wurde (Flaschenaufsatzfilter mit Gewinde; 0,22 µm).

Die Zellen wurden mindestens 3 Tage in diesem Medium mit entsprechenden 20 % ultrazentrifugiertem-FCS (UZ-FCS) kultiviert. Dies diente zum einen dazu mögliche restliche FCS-EVs, die noch aus dem zuvor verwendeten Medium mit nicht UZ-FCS stammten, zu eliminieren und zum anderen, dass die Zellen eine Konfluenz von nahezu 100 % erreichten. Nachdem diese vorlag, wurde auf jede Ebene 80 ml EV-Produktionsmedium gegeben. Dieses für die Ernte der von mMSCs produzierten EVs verwendete Medium enthielt nur noch 10 % des entsprechendem UZ-FCS, um eine mögliche Kontamination mit evtl. doch noch enthaltenen restlichen FCS-EVs weiter zu minimieren. Die Zellen wurden 48 h mit dem EV-Produktionsmedium im Brutschrank kultiviert, bevor dieses in 50 ml Röhrchen vollständig aliquotiert wurde und erneut 80 ml frisches EV-Produktionsmedium pro Zell-Ebene für die zweite Ernte gegossen wurde. Durch sequentielle Zentrifugation (Protokoll modifiziert nach Théry *et al.*, 2006) wurden zuerst die abgelösten sich nun im Medium befindlichen Zellen und deren Überreste pelletiert (Tischzentrifuge ROTANTA: 2.000 g, ohne Bremse, 4 °C, 20 min). Der EV-haltige Überstand wurde anschließend in Zentrifugenflaschen mit Dichtungsverschluss überführt und die unerwünschten apoptotischen Körperchen und große Vesikel pelletiert (Standzentrifuge: 12.000 g, ohne Bremse, 4 °C, 20 min). Die nun im Überstand als einzige Zellkomponenten enthaltenden EVs wurden mittels Ultrazentrifugation (Optima LE-80K mit SW28 Rotor und entsprechenden Zentrifugenröhrchen: 100.000 g, mit geringer Bremse, 4 °C, 70 min) pelletiert. Die nachdem dekantieren des Überstandes erhaltenen EV-Pellets wurden abschließend zum Waschen in einem kleinen Volumen 1xDPBS suspendiert, in einem Zentrifugenröhrchen vereint, dieses mit 1x DPBS aufgefüllt und die EVs erneut pelletiert. Das 1xDPBS wurde vorsichtig vollständig von dem EV-Pellet abgesaugt und zum Suspendieren des gesamten EV-Pellets pro geernteter Zellkulturebene (á 632 cm²) jeweils 100 µl

α MEM – supplementiert mit 0,25 M HEPES – verwendet. Anschließend wurde die Probe aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Insgesamt wurden pro expandierter mMSC-Kultur jeweils 2 bis 3 aufeinanderfolgende EV-Ernten sowie deren Isolationen wie beschrieben durchgeführt, wobei zwischen jeder Ernte jeweils 48 h lagen.

Für die folgenden geplanten Experimente zur Analyse der geernteten EVs war entweder die Anzahl an produzierenden mMSCs und/oder die parentalen mMSCs für den direkten Vergleich zwischen diesen Zellen und ihren produzierten EVs nötig. Daher wurden die entsprechenden mMSCs einer Zellkulturflasche mit 2 Ebenen (á 632 cm²) spätestens nach der letzten EV-Ernte wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben mit den in Tab. 32 für die benötigten Reagenzien angegebenden Volumina trypsinisiert. Die abgelösten Zellen wurden in eine leere Mediumflasche oder sterile 500 ml Schottflasche überführt, mit einer Stabpipette vereinzelt, die leere Kulturflasche zweimal mit je 75 ml mMSC-Kultivierungsmedium gespült und anschließend damit die Trypsinreaktion in der Zellsuspension inaktiviert. Von den in der Zellsuspension gleichmäßig verteilten Einzelzellen wurde mit einem Quantum eine 1:2 Verdünnung mit 0,4 % Trypanblau-Lösung hergestellt und die lebenden Zellen ausgezählt (siehe Kapitel 2.2.3). Die Zellzahl in der Zellsuspension [Zellen/ml] wurde anschließend anhand von Formel 1 berechnet und davon ausgehend die Gesamtzellzahl in einer Ebene á 632 cm² mit Formel 2 ermittelt. Nach der Zellzahlbestimmung wurde die gesamte Zellsuspension auf 50 ml Röhrchen aufgeteilt, die Zellen zentrifugiert (Tischzentrifuge ROTANTA: 310 g, RT, 7 min) und die erhaltenen Pellets in insgesamt 10 ml 1x DPBS vereinigt. Von dieser Suspension wurde erneut die Zellzahl anhand einer 1:10 Verdünnung mit 0,4 % Trypanblau-Lösung bestimmt. Anschließend wurden jeweils 1*10⁶ Zellen in 2 ml Reaktionsgefäße überführt, pelletiert (Tischzentrifuge 5417R: 350 g, 4 °C, 7 min), der Überstand vollständig dekantiert und die Pellets bei -80 °C bis zur molekularbiologischen Analyse konserviert. Zusammenfassend ist in der nachfolgenden Tab. 33 aufgelistet, in wie vielen 632 cm² Ebenen jeweils die verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten (nicht) transduzierten mMSCs expandiert wurden, um im Anschluss die von diesen Kulturen geernteten EVs weiter zu analysieren. Ebenfalls mit angegeben ist die jeweils erhaltene Gesamtzellzahl einer jeder Expansion, wobei die Zellen einer Kulturflasche mit 2 Ebenen (á 632 cm²) nach der jeweils in der Tab. 33 unterstrichenden Ernte trypsinisiert, gezählt und wie beschrieben pelletiert wurden.

Tab. 33: Auflistung der verschiedenen in dieser Arbeit für EV-Ernten expandierten mMSCs. Angeben sind die Anzahl an Zellkulturebenen á 632 cm² pro Ernte, Anzahl der nacheinander durchgeführten Ernten (3 oder 2) sowie nach welcher Ernte eine Zellkulturflasche mit 2 Ebenen trypsinisiert wurde (hervorgehobene Zahl) und der davon abgeleiteten Gesamtzellzahl pro Ebene.

mMSCs transduziert mit:	Zell-passage [P]	ohne Zytokine				mit Zytokinen rmEGF [40 pg/ml] + rmPDGF-BB [4 ng/µl]			
		632 cm ² Ebenen pro Ernte (pro Ebene je 100 µl zum Suspendieren des EV Pellets)			Zellzahl [*10 ⁷] pro 632 cm ² Ebene	Zell-passage [P]	632 cm ² Ebenen pro Ernte (pro Ebene je 100 µl zum Suspendieren des EV Pellets)		Zellzahl [*10 ⁷] pro 632 cm ² Ebene
Nicht transduziert	P14	8*	8	8	1,80	P15	10	10	2,65
LeGO-eGFP/BSD-shRNA_scr	P14	12	12	12	2,16	P15	10	10	2,10
LeGO-Cerulean/BSD-shRNA_Gal1	P14	12	12	10	1,44	P14	10	10	1,56
LeGO-mCherry/BSD-shRNA_Sod1	P14	12	10	10	2,40	P14	10	10	2,22
LeGO-eGFP/BSD-shRNA_Prdx1	P14	12	12	10	1,80	P14	10	10	2,12
LeGO-Cerulean/BSD_shRNA_Gal1 LeGO-mCherry/BSD_shRNA_Sod1 LeGO-eGFP/BSD_shRNA_Prdx1	P14	12	12	10	1,12	P15	10	10	2,22

* eine Flasche mit 4 Ebenen war bereits vor der ersten EV-Ernte kontaminiert

unbehandelte mMSC-Kulturen für NGS	Zell-passage [P]	632 cm ² Ebenen pro Ernte (pro Ebene je 100 µl zum Suspendieren des EV Pellets)			Zellzahl [*10 ⁷] pro 632 cm ² Ebene
1	P14	10	10	-	4,34
2	P9	8*	8	8	2,04
3	P10	10	10	10	3,35

* eine Flasche mit 2 war bereits vor der ersten EV-Ernte kontaminiert

unbehandelten mMSC-Kulturen für Transplantationen	Zell-passage [P]	632 cm ² Ebenen pro Ernte (pro Ebene je 100 µl zum Suspendieren des EV Pellets)		Zellzahl [*10 ⁷] pro 632 cm ² Ebene
1	P8	5*		3,48
2	P11	10		1,92
3	P15	10		2,9

* insgesamt nur in 150 µl suspendiert

2.2.11. NIH/3T3 und 293T Kultivierung

Beide Zelllinien wurden in der Arbeitsgruppe durchgängig in Kultur gehalten, so dass es ohne Verzögerung möglich war, sie für anstehende Transfektionen und Transduktionen zu expandieren. NIH/3T3 wurden für die allgemeine Stammhaltung sowie Expansion für Versuche in T75 mit je 10 ml NIH/3T3-Kultivierungsmedium und 293T Zellen in Zellkulturschalen (Ø 10 cm) mit je 10 ml 293T-Kultivierungsmedium kultiviert. Vor dem Erreichen einer vollständigen Konfluenz wurden die Zellen passagiert, indem das Medium abgesaugt, der gesamte Zellrasen vorsichtig mit 10 ml 1x DPBS gewaschen und die Zellen mit jeweils 2 ml auf 37 °C vorgewärmtes Trypsin-EDTA (0,05 %) abgelöst wurden. Für ein effizientes Ablösen der Zellen, wurden die restlichen, noch adhärenen Zellen nach einer Inkubation von 2 bis 3 min im Brutschrank mit dem Zell-Trypsin-Gemisch unter Zuhilfenahme einer Stabpipette abgespült, dann die Enzymreaktion durch Zugabe von 8 ml NIH/3T3- oder 293T-Kultivierungsmedium abgestoppt und die Zellen gründlich durch mehrfaches auf und ab pipettieren vereinzelt. Ausgehend von der Zellsuspension wurde ein entsprechender Volumenanteil entnommen, dieser in eine neues geeignetes Zellkulturgefäß (NIH/3T3 in 75 cm² Zellkulturflaschen und 293T in 10 cm Zellkulturschale) mit je 10 ml entsprechendem Kultivierungsmedium überführt und dort gleichmäßig verteilt, bevor die Zellen im Brutschrank weiter kultiviert wurden. Im Allgemeinen wurden beide Zelllinien zweimal wöchentlich in der beschriebenen Weise in einem Verhältnis von 1:10 bis hin

zu 1:15 passagiert (ein Zehntel bis hin zu einem Fünfzehntel der trypsinisierten Zellen wurden weiter kultiviert), wobei die Anzahl an Zellkulturgefäßen für eine Expansion entsprechend erhöht wurde.

2.2.12. Produktion infektiöser Vektorpartikel (Calcium-Phosphat-Transfektion)

Um die Expression der drei Zielgene (*Sod1*, *Gal1* und *Prdx1*) in mMSCs via shRNA runterregulieren zu können, wurden infektiöse lentivirale Vektorpartikel der dritten Generation erzeugt, damit eine permanente Transduktion durchgeführt werden konnte. Die Produktion erfolgte in 293T-Zellen unter Verwendung einer Calcium-Phosphat-Transfektion mit vier Plasmiden nach dem Protokoll von PD Dr. K. Riecken (online Referenz 17). Virale Vektoren der dritten Generation bieten die größtmögliche Biosicherheit, da nur die zur Synthese von infektiösen Partikeln benötigten viralen Gene (Gag: kodiert gruppenspezifische Antigene; Pol: kodiert die essentiellen Enzyme Integrase, Protease und Reverse Transkriptase; Rev: ist ein essentielles regulatorisches Gen für die virale Replikation und Env: kodiert das Hüllprotein) verwendet werden. Als weiterer Sicherheitsfaktor wurden diese viralen Gene nicht auf mit in den Transfektor (LeGO-Vektor mit shRNA) integriert, sondern liegen auf drei verschiedenen Helferplasmiden getrennt voneinander, wodurch eine Bildung infektiöser viraler Vektoren außerhalb der gewählten Produktionszellen, in diesem Fall 293T-Zellen, verhindert wird.

Für jeden der vier Transfektoren (siehe Abb. 12) wurden jeweils zwei 10 cm Zellkulturschalen mit jeweils $5 \cdot 10^6$ 293T Zellen in 10 ml 293T-Kultivierungsmedium ausgesät. Nach ca. 16 h, in denen die Zellen sich adhären konnten, wurde das Medium entfernt und durch jeweils 10 ml chloroquinhaltiges [25 µM] 293T-Kultivierungsmedium ersetzt. Anschließend wurden 30 µg des entsprechenden Transfektor-Plasmids, 20 µg des Gag- und Pol-tragenden Plasmids pMDLg/pRRE [1 µg/µl], 5 µg des Rev-tragenden Plasmids pRSV-Rev [1 µg/µl] und 8 µg des Plasmids Eco-Env (#522, K73) [0,96 µg/µl] mit sterilem, nukleasefreiem Wasser auf 900 µl verdünnt. Die verdünnte Plasmid-Mischung wurde homogenisiert, mit 100 µl CaCl₂-Lösung [2.5 M] auf 1.000 µl Gesamtvolumen aufgefüllt, erneut homogenisiert und langsam in ein 15 ml Gefäß mit 1.000 µl Präzipitationspuffer (2x HBS-Puffer) getropft. Gleichzeitig wurde mit einer 2 ml Pipettierhilfe Luft in den Präzipitationspuffer geleitet. Der fertige Transfektionsansatz (2 ml) wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden auf jeder der zwei für das Konstrukt vorgesehenen Platte (Doppelansatz) je 1 ml des Transfektionsansatzes gleichmäßig auf den Zellen verteilt. Nach 8 h Inkubation im Brutschrank wurde das Medium für die einsetzende Virusproduktion der nun transfizierten Zellen durch 8 ml 293T-Kultivierungsmedium ersetzt. Nach weiteren 12 h Inkubation erfolgte die erste Ernte. Die beiden virushaltigen Mediumüberstände eines jeden Doppelansatzes wurde nacheinander mit einer 10 ml Spritze abgenommen, in ein 50 ml Reaktionsgefäß zusammengeführt und pro Platte auf die Zellen jeweils 8 ml neues 293T-Kultivierungsmedium gegeben. Die Virusüberstände wurden filtriert (0,45 µm Filter), zu á 1 ml aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Nach 24 h und 36 h, ausgehend von Beginn der Virusproduktion, wurden die Überstände ebenfalls wie oben beschrieben geerntet und die Zellen nach der 36 h Ernte entsorgt.

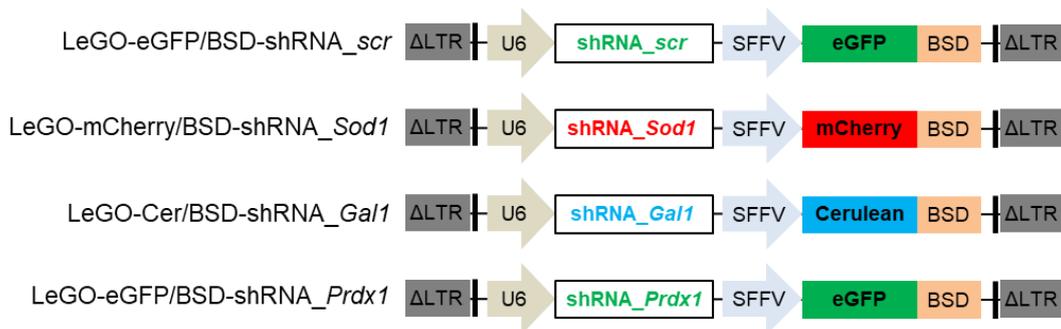


Abb. 12: Transfervektor-Plasmide, die zur Produktion infektiöser viraler Vektoren genutzt wurden. Drei der Konstrukte enthalten eine shRNA zur Runterregulation eines Zielgens (*Sod1*, *Gal1* und *Prdx1*), wohingegen das vierte Konstrukt als Kontrolle eine *scrambled* (*scr*) shRNA enthält, die kein Zieltranskript besitzt. Die Expression der shRNAs wird durch einen konstitutive aktiven U6 Promotor (RNA Polymerase-III Promotor der U6-RNA) gesteuert. Zusätzlich erlaubt jedes Konstrukt ebenfalls eine SFFV Promotor vermittelte konstitutive Expression eines Fusionsproteins bestehend aus einem Fluoreszenzprotein (eGFP oder Cerulean oder mCherry) und dem Resistenzgen BSD zur Identifikation/Selektion.

LeGO: *lentiviral gene ontology*; SFFV: *spleen focus-forming virus*; Δ LTR: *self-inactivating-long-terminal repeat*; eGFP/BSD: Fusionsprotein aus *green fluorescent protein* und *Blasticidin-S deaminase*.

2.2.13. Titer Bestimmung der infektiösen lentiviralen Vektoren

Zur Titer Bestimmung der infektiösen lentiviralen Vektoren in den geernteten Überständen (von vier Konstrukten nach 12, 24 und 36 h), wurden NIH/3T3 verwendet. Pro Loch einer 24-Loch-Zellkulturplatte wurden jeweils $5 \cdot 10^4$ Zellen in 500 μ l polybrenhaltigem [8 μ g/ μ l] NIH/3T3-Kultivierungsmedium überführt und für 6 h im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die bereits teilweise adhärenierten Zellen mittels definierter Volumina der Virusüberstände transduziert. Insgesamt wurden pro Virusüberstand 3 verschiedene Volumina (1 μ l, 5 μ l und 50 μ l) in Triplikaten verwendet, wobei ebenfalls Zellen unbehandelt blieben, um als Kontrolle (Triplikate) dienen zu können. Anschließend wurden die Zellkulturplatten 1 h zentrifugiert (Universalzentrifuge, 1.000 g, 22 °C). Nach ca. 24 h Inkubation im Brutschrank wurde das Medium durch je 1 ml frisches NIH/3T3-Kultivierungsmedium pro Loch ersetzt. Am dritten Tag wurden die Zellen für die FACS-Analyse vorbereitet; dazu wurden die Zellen mit 1x DPBS gewaschen, anschließend mit je 100 μ l Trypsin-EDTA (0,05 %) pro Loch 4 min bei 37 °C abgelöst, resuspendiert und in das entsprechende Durchflusszytometrierröhrchen (pro Loch ein Röhrchen), mit vorgelegtem NIH/3T3-Kultivierungsmedium (1 ml) überführt. Vor der Zentrifugation (Rotanta Tischzentrifuge, 335 g, RT, 5 min) zur Pelletierung der Zellen, wurden jeweils 2 ml 1x DPBS pro Röhrchen zugeben. Der Überstand wurde dekantiert und der Röhrchenrand vorsichtig auf einem Tuch abgetupft. Das Zellpellet wurde in 300 μ l 1x DPBS (4 °C) durch vortexen suspendiert und bis zur FACS-Analyse zur Ermittlung des prozentualen Anteils an transduzierten Zellen durch Detektion der jeweiligen exprimierten Fluoreszenz bei 4 °C gelagert.

Die Messungen wurde in der FACS Sorting Core Unit des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf an einem BD LSR Fortessa Durchflusszytometer durchgeführt. Die verwendeten Laser und Filter sind in Tab. 5 Abschnitt 2.1.3 aufgelistet. Mittels linearer Auftragung der Seitwärtsstreuung (SSC) gegen die Vorwärtsstreuung (FSC) wurde mit Gate P1 die mMSC-Population ausgewählt. Ausgehend von dieser wurde dann anschließend der prozentuale Anteil an positiven Zellen für die Fluoreszenz von eGFP (P2), mCherry (P3) und Cerulean (P4) ermittelt (beispielhaft für jeden Vektor dargestellt in Kapitel 7.3, Abb. S2, Anhang). Obwohl die Zellen jeweils nur eine der drei Fluoreszenzen aufweisen sollten, wurden für

alle Proben immer alle drei Kanäle mitgemessen, um eine Kreuzkontamination während der Transduktion ausschließen zu können.

Die Triplikate der ermittelten prozentualen Anteile an positiven Zellen für jedes Konstrukt zu jedem Erntezeitpunkt wurden gemittelt und anhand dieser Mittelwerte anschließend die Titer für die verschiedenen infektiösen lentiviralen Vektoren nach Formel 3 berechnet.

$$\text{Virustiter} \left[\frac{\text{infektiöse Partikel}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{verwendete Zellzahl} * \text{Anteil an transduzierten Zellen} [\%]}{\text{verwendetes Volumen an Virusüberstand [ml]} * 100} \quad (\text{Formel 3})$$

Dabei gilt es zu beachten, dass für die Berechnung nur diejenigen Messergebnisse, in welchen der Anteil an transduzierten Zellen zwischen 5 % und 20 % lag, herangezogen wurden. Dies liegt darin begründet, dass bei einem höheren prozentualen Anteil an transduzierten Zellen aus statistischer Sicht die Wahrscheinlichkeit für Mehrfachintegrationen zunimmt (Fehse *et al.* 2004). In dem verwendeten Analyseverfahren sollen Mehrfachintegrationen jedoch nicht berücksichtigt werden, da sie die Titer verfälschen und dementsprechend aus solchen Werten ermittelte Titer nicht vertrauenswürdig sind. Eine Grundvoraussetzung für die Titer Berechnungen ist daher eine Einfachintegration, weshalb für die Titration mehrere Virusvolumina verwendet wurden, um mit zumindest einem in dem erforderlichen Bereich zu liegen. Alle Messungen, die außerhalb des Bereiches von 5 bis 20 % lagen, wurden ausgeschlossen und sind nicht Teil dieser Arbeit.

Die berechneten Titer sind in Tab. S2 im Anhang (siehe Kapitel 7.3) aufgelistet. Für alle vier Konstrukte ist klar zu erkennen, dass der Titer der 12 h Ernte am niedrigsten lag, wohingegen er nach 24 h und 36 h deutlich anstieg und nur marginale Schwankungen zwischen den beiden Ernten auftraten. Das geringste eingesetzte Volumen der infektiösen lentiviralen Partikel mit 1 µl führte bei LeGO-eGFP/BSD-shRNA_scr und LeGO-eGFP/BSD-shRNA_Prdx1 bei der 24 h und 36 h Ernte bereits zu einem positiven Anteil > 20 %. Da dieser Wert bei beiden nach 24 h vernachlässigbar überschritten wurde, wurde für alle Konstrukte die 24 h Ernte für weitere Versuche verwendet.

2.2.14. Runterregulation von ausgewählten Zielgenen in mMSCs mittels Transduktion

2.2.14.1. Transduktion von mMSCs

Um die Beteiligung der 3 ausgewählten Zielgene (*Gal1*, *Sod1* und *Prdx1*) an der Protektion von letal bestrahlten mHSCs zu untersuchen, wurden die Gene *in vitro* in mMSCs mittels shRNA herunterreguliert. Dafür wurden mMSCs mit den hergestellten infektiösen lentiviralen Vektoren (siehe Kapitel 2.2.12) jeweils einzeln, als auch mit allen drei Konstrukten gemeinsam, stabil transduziert. Als Kontrollen dienten nicht transduzierte mMSCs sowie mMSCs die mit infektiösen lentiviralen Vektoren, welche eine shRNA_scr beinhalten, stabil transduziert wurden.

Da die 4 produzierten infektiösen lentiviralen Vektoren alle einen unterschiedlichen Titer aufwiesen, wurde durch Verwendung einer definierten Multiplizität der Infektion (MOI) von 5 eine Vergleichbarkeit geschaffen. Die MOI gibt das zahlenmäßige Verhältnis von infektiösen Viruspartikeln zu der Zielzelle an, wodurch davon ausgegangen wird, dass bei einer einheitlichen MOI der Anteil an infizierten Zellen für alle verwendeten infektiösen lentiviralen Vektoren gleich ist. Um das benötigte Volumen einer

Virussuspension für eine definierte MOI nach Formel 4 berechnen zu können, wird zuerst der jeweilige Titer (siehe Kapitel 2.2.13) eines jeden Konstrukts benötigt.

$$\text{Virusvolumen } [\mu\text{l}] = \frac{\text{MOI} \left[\frac{\text{Viruspartikel}}{\text{Zelle}} \right] \cdot \text{verwendete Zellzahl} \cdot 1000}{\text{Virustiter} \left[\frac{\text{infektiöse Partikel}}{\text{ml}} \right]} \quad (\text{Formel 4})$$

Für die Transduktion wurden jeweils 1×10^5 in 3 ml mMSC-Kultivierungsmedium (Sigma-FCS) enthaltene mMSCs in jeweils 3 Löcher (Triplikate) einer 6-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. Insgesamt wurde für jede Herunterregulation sowie für jede der beiden Kontrollen je eine eigene 6-Loch-Zellkulturplatte verwendet, um mögliche Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Nach der Aussaat der Zellen, wurden diese für 5 h im Brutschrank inkubiert, um zu adhären, bevor das Medium pro Loch durch 3 ml Polybren-haltiges [8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$] mMSC-Kultivierungsmedium (Sigma-FCS) ausgewechselt wurde. Zusätzlich wurden das entsprechende Volumen für eine MOI von 5 von dem entsprechenden infektiösen lentiviralen Vektor (24 h Ernte) zu jedem Loch eines Triplikats gegeben. Für die gleichzeitige Transduktion mit allen drei Konstrukten wurde pro Loch von jedem der drei infektiösen lentiviralen Vektoren (24 h Ernte) ebenfalls eine MOI von 5 verwendet, so dass die Zellen schlussendlich eine gesamte MOI von 15 erhielten. Für eine effektivere Transduktion wurden die Platten 1 h zentrifugiert (Universalzentrifuge, 1.000 g, 22 °C). Nach ca. 24 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen passagiert, da bereits eine optische Konfluenz von über 90 % erreicht war. Dazu wurden die Zellen eines jeden Lochs vorsichtig mit je 4 ml 1x DPBS gewaschen und anschließend mit je 0,5 ml Trypsin-EDTA (0,25 %) für 5 min im Brutschrank abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden mit einer Pipette suspendiert, dabei gleichzeitig die zusammengehörigen Triplikate in einem Loch zusammengeführt, anschließend mit 1,5 ml mMSC-Kultivierungsmedium (Sigma-FCS) die Trypsinreaktion inaktivieren und die vereinzelt Zellen dann in je eine 175 cm² Zellkulturflasche mit 76 ml vorgelegtem mMSC-Kultivierungsmedium (Sigma-FCS) überführt. Die drei leeren Löcher wurden anschließend nochmals nacheinander mit 1 ml Medium gespült und dies ebenfalls zur Zellsuspension gegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 80 ml vorlag. Im Anschluss wurden 40 ml der Zellsuspension in eine zweite T175 überführt. Nach 3 Tagen Kultivierung wurde das Medium gewechselt (pro T175 jeweils 30 ml mMSC-Kultivierungsmedium (Sigma-FCS)). Und nach weiteren 3 Tagen Kultivierung war bei allen transduzierten und nicht transduzierten Zellen eine optische Konfluenz von 90 – 98 % erreicht, so dass je eine der beiden T175 eines jeden Ansatzes für eine Sortierung auf hoch positive Zellen verwendet werden konnte. Die Zellen der jeweils zweiten T175 wurden kryokonserviert (siehe 2.2.7.2). Zum Einstellen des Gatings für die Sortierung wurden zuerst die nicht transduzierten mMSCs vorbereitet. Die Zellen wurden dafür trypsiniert (siehe Kapitel 2.2.7.1) und die Reaktion durch Zugabe von 15 ml mMSC-Kultivierungsmedium (Sigma-FCS) inaktiviert. Die gesamte Zellsuspension wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt, die Zellen pelletiert (Rotanta Tischzentrifuge: 400 g, 4 °C, 5 min) und anschließend der Überstand bis auf wenige Mikroliter entfernt. Das Zellpellet wurden in 500 μl Sortierungsmedium (DMEM/Ham's F-12 mit 50 μM 2-Mercaptoethanol und 2 mM L-Glutamin) resuspendiert und über ein Zellsieb (30 μm) in ein 15 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bis zur Sortierung mit einer 100 μm Sprühdüse (Nozzle) am Aria Fusion in der FACS Sorting Core Unit des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf auf Eis gelagert.

Alle transduzierten Zellen wurden anschließend nacheinander in der gleichen Weise wie die Kontrollzellen vorbereitet. Zur Vermeidung von unnötigem Zellstress wurde die Zeitspanne, in der die Zellen als Suspensionszellen vorlagen, möglichst kurzgehalten, so dass die Vorbereitung der nächsten Probe erst stattfand während eine andere Probe sortiert wurde.

2.2.14.2. Sortierung von transduzierten mMSCs auf hoch positive Zellen

Alle für die Sortierung verwendeten Einstellungen (Tab. S3) am Aria Fusion sowie die benötigte Kompensationsmatrix (Tab. S4) sind im Anhang in Kapitel 7.4 aufgeführt. Ebenso wurde die verwendete Gatingstrategie anhand unbehandelter Kontrollzellen, die auch zur Einstellung der Spannung dienten, schematisch in Abb. S3 A (Kapitel 7.4, Anhang) dargestellt. Durch Auftragung von Seitwärtsstreuung (SSC-A) gegen Vorwärtsstreuung (FSC-A) wurde die mMSC-Population fokussiert und mit dem Gate P1 ausgewählt. Von den in P1 befindlichen Zellen wurden die Einzelzellen mit P2 ausgewählt (Ausschluss von Dubletten), indem die Höhe der Vorwärtsstreuung gegen die Weite der Vorwärtsstreuung aufgetragen wurde. Ausgehend von P2 wurde zusätzlich die Höhe der Seitwärtsstreuung gegen die Weite der Seitwärtsstreuung aufgetragen, wodurch der Dubletten Ausschluss noch weiter verfeinert werden konnte, sodass P3 nur noch Einzelzellen beinhaltete. Diese Einzelzellen wurden dann auf die Anwesenheit der drei Fluoreszenzsignale eGFP, mCherry und Cerulean analysiert, indem der Detektionskanal der jeweiligen Fluoreszenz gegen die Vorwärtsstreuung aufgetragen wurde. Eine hohe Intensität [relative Einheit] der detektierten Fluoreszenz spricht zum einen dafür, dass mehrere Vektorkopien pro Zelle integriert wurden und zum anderen, dass der oder die integrierten Vektoren in einem Bereich des Genoms liegen, der dauerhaft und effizient exprimiert wird. Somit bieten diese Zellen ganz besonders gute Voraussetzungen (effiziente Expression mehrerer Kopien) für eine Herunterregulation des Zielgens mittels integrierter shRNA, die parallel zu der jeweiligen Fluoreszenz exprimiert wird. Demzufolge wurden nur hoch positive Zellen bei der Sortierung berücksichtigt. Dazu wurden die jeweiligen Gates (P4 = eGFP, P5 = mCherry und P6 = Cerulean) für die fluoreszenzpositiven Zellen nicht wie üblich direkt über der Negativpopulation (unbehandelte Zellen), sondern wesentlich höher gesetzt. Nur die in diesen Gates detektierten Zellen wurden, wie Abb. S3 (Anhang, Kapitel 7.4) beispielhalber an der Sortierung von mit allen drei shRNAs transduzierten mMSCs zeigt, in einem 15 ml Röhrchen mit 5 ml vorgelegten mMSC-Kultivierungsmedium (Sigma-FCS) aufgefangen.

Die Zellen aller 5 Proben (4x einfach und 1x dreifach transduzierte mMSCs) wurden vollständig sortiert. Die hoch positiven einfach transduzierten Zellen wurden anhand des jeweils enthaltenen Fluoreszenzproteins ausgewählt (eGFP-shRNA_ *scr*, Cerulean-shRNA_ *Gal1*, mCherry-shRNA_ *Sod1* oder eGFP-shRNA_ *Prdx1*). Die dreifach transduzierten mMSCs (3x shRNAs) hingegen wurden auf die Zellen sortiert, welche für alle drei Fluoreszenzsignale gleichermaßen hoch positiv waren. Die Anzahl an sortierten Zellen sowie der prozentuelle Anteil an der Gesamtzellzahl, ist in Tab. S5 im Anhang (Kapitel 7.4) dargestellt.

Die jeweils in 5 ml mMSC-Kultivierungsmedium (Sigma-FCS) sortierten Zellen wurden in eine 175 cm² Zellkulturflasche mit 50 ml vorgelegtem mMSC-Kultivierungsmedium (Sigma-FCS) überführt, das leere 15 ml Röhrchen mit 5 ml mMSC-Kultivierungsmedium (Sigma-FCS) gespült und ebenfalls in die T175 gegeben, so dass insgesamt 60 ml Zellsuspension vorlagen. Von dieser wurden 30 ml in eine zweite

T175 überführt und beide Flaschen einer jeder Probe sowie ausreichend Flaschen mit unbehandelten Kontrollzellen, weiter im Brutschrank kultiviert. Nach spätestens 3 bis 4 Tagen wurde das mMSC-Kultivierungsmedium (Sigma-FCS) gewechselt und die Zellen anschließend weiter kultiviert bis sie eine Konfluenz zwischen 50 und 70 % erreicht hatten (genaue Anzahl an Kulturtagen sowie die anschließende Konfluenz ist in Tab. S5, Kapitel 7.4 im Anhang aufgelistet), um sie nachfolgend erneut auf die Expression des/der Fluoreszenzproteins/e zu sortieren.

Die zweite Sortierung sollte ausschließen, dass bei der ersten Sortierung nicht transduzierte oder nur gering positive Zellen mit den hoch positiven Zellen mitgezogen wurden. Sie fand daher unter gleichen Kompensations- und Spannungseinstellungen sowie vergleichbaren Gatingeinstellungen (Beispiel siehe Abb. S3 B, Kapitel 7.4, Anhang), wie die erste Sortierung statt. Auch die Schritte der Zellvorbereitung blieben identisch bis auf den Unterschied, dass auf Grund der geringen Zellkonfluenz beide T175 einer Probe für die Sortierung verwendet wurden. In dem Fall wurden die Zellkulturflaschen parallel trypsinisiert (siehe Absatz 2.2.7.1) und die abgelösten Zellen zusammen in ein 50 ml Röhrchen überführt wurden, bevor die Reaktion mit 20 ml mMSC-Kultivierungsmedium (Sigma-FCS) abgestoppt wurde. Außerdem wurden die Zellpellets anschließend anstatt in 500 µl Sortierungsmedium in nur 400 µl suspendiert. Die Anzahl an sortierten Zellen sowie der prozentuelle Anteil an der Gesamtzellzahl sind ebenfalls im Anhang in Kapitel 7.4 Tab. S5 dargestellt. Die in 5 ml mMSC-Kultivierungsmedium (Sigma-FCS) sortierten Zellen wurden in 80 ml mMSC-Kultivierungsmedium (Sigma-FCS) überführt, das Röhrchen mit 5 ml Medium nachgespült und jeweils 30 ml der gut durchmischten Zellsuspension in drei neue T175 verteilt. Bei der anschließenden Kultivierung wurde zweimal wöchentlich ein Mediumwechsel durchgeführt bis die Zellen eine optische Konfluenz von 92 bis 95 % erreicht hatten. Es folgte Zellernten aus allen drei Flaschen einer Probe, um die Zellen sowohl zu kryokonservieren als auch für molekularbiologische Untersuchungen zu pelletieren. Die Anzahl an Kultivierungstagen und erreichte optische Konfluenz sind ebenfalls in im Anhang in Kapitel 7.4 Tab. S5 nachzulesen. Die Trypsinierung (siehe Kapitel 2.2.7.1) der drei zusammengehörigen T175 wurden parallel durchgeführt und die abgelösten Zellen in ein 50 ml Röhrchen mit 10 ml mMSC-Kultivierungsmedium (Sigma-FCS) überführt. Die leeren Flaschen wurden alle nacheinander zweimal mit je 10 ml mMSC-Kultivierungsmedium (Sigma-FCS) nachgespült und dieses ebenfalls zur Zellsuspension gegeben. Nachdem die Zellen vollständig suspendiert vorlagen, wurde ein Drittel (15 ml) der Zellsuspension für die Kryokonservierung in ein weiteres 50 ml Röhrchen überführt und gemeinsam mit den restlichen Zellen (30 ml) in dem ursprünglichen 50 ml Röhrchen durch Zentrifugation (Rotanta Tischzentrifuge: 400 g, 4 °C, 5 min) pelletiert. Die Überstände aus beiden Röhrchen wurden vorsichtig entfernt. Für die Kryokonservierung wurden die Zellen in 4 ml Einfriermedium suspendiert, auf 8 Kryoröhrchen aufgeteilt und eingefroren (siehe 2.2.7.2). Das Pellet aus den restlichen Zellen wurden in 5 ml 1x DPBS suspendiert und anhand einer 1:10 Verdünnung mit Trypanblau-Lösung (0,4 %) die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 2.2.3), welche in Tab. S5 (Kapitel 7.4, Anhang) aufgelistet wurde. Anschließend wurden jeweils 1×10^6 Zellen in mehrere 2 ml Reaktionsgefäße überführt, mit einer Tischzentrifuge (5415C) bei 300 g und 4 °C 7 min pelletiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet bei -80 °C eingefroren.

2.2.15. MS5-Kultivierung

In dieser Arbeit wurden MS5-Zellen als Stromalayer für die Kultivierung von murinen hämatopoetischen Stammzellen verwendet. Die MS5-Zellen wurden in MS5-Kultivierungsmedium in verschiedenen großen Zellkulturgefäßen (siehe Tab. 34) expandiert, um eine ausreichende Zellzahl für die in *vitro* Assays zu generieren. Im Allgemeinen wurden die Zellen vor dem Erreichen einer vollständigen Konfluenz passagiert, was bei der für diese Zellen angewandten Ausdünnung von 1:4, 1:6 oder 1:8 frühestens nach 3 Tagen und spätestens nach 7 Tagen der Fall war, so dass ein zwischenzeitlicher Mediumwechsel so gut wie nie notwendig war. Die Ausdünnung wurde nach der jeweiligen Wachstumsrate der Zellen gewählt, die während der Kulturzeit und auch zwischen verschiedenen Kulturen stark schwankte. Um dennoch eine ungefähr gleiche Stroma-Qualität in den angestrebten Assays zu gewährleisten, wurden die Zellen nie länger als 1 Monat in Kultur gehalten, was ausreichend war, um mindestens zwei Radioprotektionsassays anzusetzen. Die verschiedenen verwendeten Zellkulturgefäße sind im Folgenden mit den für sie verwendeten Volumina für Medium, Trypsin und 1x DPBS in Tab. 34 aufgelistet.

Tab. 34: Auflistung der verwendeten Kulturgefäße zur Kultivierung der MS5. Zusätzlich wurden verwendete Kultivierungsmedium-Volumina, die Menge an 1x DPBS (Waschen der Zellen) sowie des Trypsins (Ablösen der Zellen) und das Volumen an Medium zum Abstoppen der Reaktion für die jeweilige Gefäßgröße angegeben.

Zellkulturflasche	Verwendung	MS5-Kultivierungsmedium [ml]	1x DPBS zum Waschen [ml]	0,05 % Trypsin-EDTA [ml]	MS5-Kultivierungsmedium [ml] zum Inaktivieren des Trypsins	MS5-Kultivierungsmedium [ml] zum Spülen des Zellsiebes
25 cm ² (T25)	Auftauen, <i>in vitro</i> Radioprotektionsassay	7	2x 7	2	5 + 5	3
75 cm ² (T75)	Allgemeine Kultivierung/Expansion und Einfrieren von MS5	15	2x 12	3	6 + 3	5
175 cm ² (T175)	Allgemeine Kultivierung/Expansion von MS5	30	2x 30	5	10 + 5	5

2.2.15.1. Trypsinieren von MS5

Vor der Ablösung der adhärennten MS5 von dem jeweiligen Zellkulturgefäßboden, wurde das Kulturmedium abgesaugt und der Zellrasen vorsichtig zweimal mit 1x DPBS gewaschen. Anschließend wurde für das Ablösen der Zellen ein für das jeweilige Kulturgefäß angemessene Volumen an 0,05 %-igem Trypsin-EDTA (siehe Tab. 34) gleichmäßig auf dem Zellrasen verteilt. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank für 5 min, wobei zwischenzeitlich das Ablösen durch Abklopfen unterstützt wurde. Vor Ablauf der Inkubationszeit wurden die restlichen noch adhärennten Zellen kräftig abgeklopft. Die abgelösten Zellen wurden, bevor sie in ein 50 ml Röhrchen überführt wurden, mit einer Stabpipette vereinzelt. Anschließend wurde zweimal hintereinander die leere Zellkulturflasche zügig mit einem entsprechenden Volumen (siehe Tab. 34) an MS5-Kultivierungsmedium gespült und mit diesem dann die Trypsin Reaktion in dem 50 ml Röhrchen abgestoppt. Die Zellen wurden zum Schluss mittels einer Stabpipette noch einmal gründlich vereinzelt. Sollten mehreren Zellkulturflaschen trypsinieren werden, wurden immer nur zwei Flaschen parallel behandelt, die Zellen vereinigt und anschließend auf Eis gestellt bis die nächsten Flaschen trypsinieren waren, um diese ebenfalls mit der bereits vorliegenden Zellsuspension zu vereinigen. Nachdem alle Zellen zusammen geführt vorlagen, wurden die Zellen über ein 70 µm Zellsieb gegeben, um eine reine Einzelzellsuspension zu erhalten. Mit einigen Millilitern MS5-

Kultivierungsmedium wurde erst das leere Röhrchen und dann das Sieb nachgespült (genaue Volumina siehe Tab.34). Anschließend wurden die Zellen mittel Zentrifugation pelletiert (Tischzentrifuge ROTANTA: 219 g, 4 °C, 10 min), der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in einem für das weitere Vorgehen geeignetem Volumen MS5-Kultivierungsmedium suspendiert und die Zellen für die weitere Kultivierung in gewünschter Ausdünnung in einem oder mehreren Kulturgefäßen ausgesät.

2.2.15.2. Einfrieren von MS5

Zum Einfrieren von MS5 wurden die Zellen in mehreren T75 bis zu einer optischen Konfluenz von ca. 95 % in MS5-Kultivierungsmedium expandiert. Anschließend wurden die Zellen mittels vorgewärmten Trypsin-EDTA (0,05 %) vom Flaschenboden abgelöst (siehe Kapitel 2.2.15.1). Die Zellen wurden mittels Zentrifugation pelletiert (Tischzentrifuge ROTANTA: 219 g, 4 °C, 10 min), der Überstand abgesaugt, das Zellpellet zügig in MS5-Einfriermedium (pro T75 1,5 ml) suspendiert und jeweils 500 µl der Zellsuspension in ein vorbereitetes Kryoröhrchen überführt. Die Aliquots wurden sofort in einen vorgekühlten Gefrierbehälter überführt und bei -80 °C eingefroren. Nach frühestens 24 h wurden die eingefrorenen Zellen für die Langzeitlagerung in einen Stickstofftank umgelagert.

2.2.15.3. Auftauen von MS5

500 µl Aliquots kryokonservierter MS5 wurde in einem 37 °C warmen Wasserbad unter stetigem Schwenken aufgetaut, danach mehrfach auf und ab pipettiert bevor sie in ein 30 ml Röhrchen überführt wurden. Anschließend wurde 5 ml MS5-Kultivierungsmedium tröpfchenweise (Tropfenanzahl wurde nach jeder Zugabe verdoppelt, begonnen wurde mit einem Tropfen) mittels einer 5 ml Stabpipette zu den Zellen gegeben. Nach jeder Zugabe wurden die Zellen gründlich geschwenkt, um das Medium gleichmäßig zu verteilen und die Zellen langsam an den sich verändernden osmotischen Druck zu gewöhnen. Insgesamt wurde die Zellsuspension mit MS5-Kultivierungsmedium auf ein Gesamtvolumen von ca. 20 ml gebracht, die Zellen pelletiert (Tischzentrifuge ROTANTA: 219 g, 4 °C, 10 min), der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 7 ml MS5-Kultivierungsmedium vollständig suspendiert und die Zellen dann in eine 25 cm² Zellkulturflasche (Falcon) überführt. Nachdem das Vorliegen und die gleichmäßige Verteilung von genügend Einzelzellen unter dem Mikroskop kontrolliert worden war, wurden die Zellen zum Kultivieren in den Brutschrank gestellt.

2.2.16. In vitro Radioprotektionsassay

Durch *in vitro* Radioprotektionsassays wird ermittelt, ob letal bestrahlte mHSCs in Anwesenheit von EVs verschiedener mMNC-Kulturen im Vergleich zu letal bestrahlten mHSCs ohne EV-Zugabe (Negativkontrolle) wieder zur Hämatopoese befähigt werden, wie sie bei nicht bestrahlten mHSCs (Positivkontrolle) beobachtet werden kann. Für die Durchführung werden frisch isolierte und letal bestrahlte mMNCs mit und ohne EVs sowie nicht bestrahlte Kontrollen zuerst auf einem MS5-Zellrasen, welches als Stromalayer diente, kultiviert. Die in den mMNCs enthaltenen und überlebenden HSCs gelangen durch Lücken im Zellrasen unter die MS5, adhären dort und fangen, vermittelt durch den Kontakt zum Stromalayer, an zu proliferieren. Die Vermehrung, jeweils ausgehend von einer mHSC, lässt nach einer Woche Kultivierung unter dem Stromalayer ein deutlich erkennbares – an Kopfsteinpflaster (engl. *cobblestone area*) erinnerndes – Areal entstehen. Neben der Proliferation,

differenzieren die mHSCs zusätzlich in mHPCs, die von den Kopfsteinpflaster Arealen (KPA) ins Medium abgeschieden werden. Diese aus den überlebenden mHSCs hervorkommenden Progenitoren werden anschließend in einen Methylcelluloseassay eingesetzt. Dieser Assay basiert auf der Fähigkeit der mHPCs in einem semi-soliden Medium wie der Methylcellulose supplementiert mit entsprechenden Zytokinen zu proliferieren und zu differenzieren. Dabei entsteht aus jeder einzelnen Progenitorzelle nach der Vermehrung eine eigenständige Kolonie, weshalb sie auch als *colony-forming unit* (CFU) bezeichnet wird. Die Zusammensetzung der Kolonien richtet sich nach dem Entwicklungsstadium (multipotent oder prädisponiert für ein oder zwei Zelltypen) der CFU. Diese können somit aus einem einzigen Zelltyp (Erythrozyten (E), Granulozyten (G), Monozyten/Makrophagen (M)) oder einer Mischung aus mehreren Zelltypen wie Granulozyten, Makrophagen-Kolonien (CFU-GM) bestehen. Des Weiteren treten auch Kolonien aus multipotenten Vorläuferzellen auf, die sich aus Granulozyten, Erythrozyten, Makrophagen und Megakaryozyten-Kolonie (CFU-GEMM) zusammensetzen. Die verschiedenen Kolonietypen sind in Abb. 13 dargestellt.

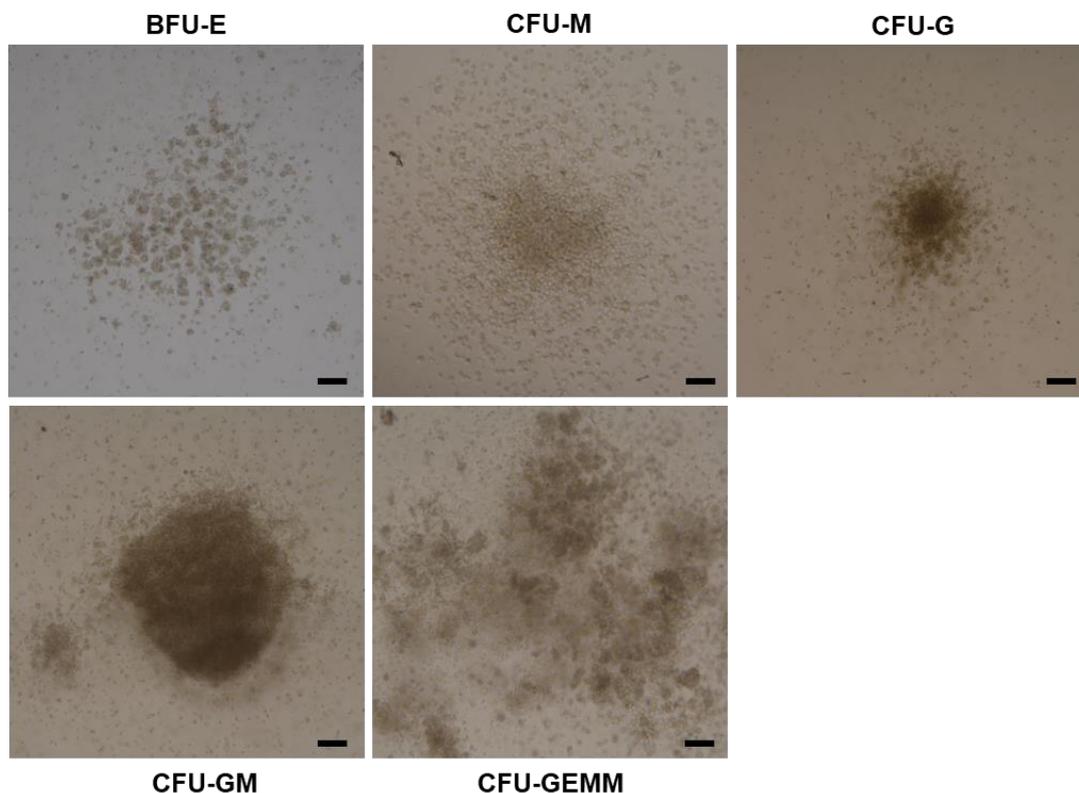


Abb. 13: Alle aus mHPCs im Methylcelluloseassay entstehenden Kolonietypen. HPCs sind dazu befähigt in Methylcellulose zu proliferieren und zu differenzieren, so dass verschiedenen Kolonien entstehen. Auf Grund des in der Arbeit verwendeten Methylcellulose Mediums sind gesprengte Erythrozyten Kolonien, sogenannte *burst-forming unit*-Erythrozyten (BFU-E) und verschiedene Typen von *colony-forming units* (CFUs) detektierbar. Die Aufnahmen wurden mittels auf einem Inversmikroskop (10-er Objektiv) angebrachter digitaler Spiegelreflexkamera aufgenommen.

G = Granulozyten; M = Monozyten/Makrophagen; GM = Granulozyten, Makrophagen; GEMM = Granulozyten, Erythrozyten, Makrophagen, Megakaryozyten; Maßstab = 100 µm.

Anhand der Anzahl an gebildeten Kolonien kann anschließend im Vergleich mit der Positiv- und Negativkontrolle eine Aussage darüber getroffen werden, ob durch die Zugabe von EVs eine Protektion der letal bestrahlte mHSCs eintrat und die Hämatopoese wieder hergestellt werden konnte.

2.2.16.1. Vorkultur von mMNCs auf MS5 Stromalayer

Um eine ausreichende Anzahl an MS5 für einen Versuch zu erhalten, wurden diese zuvor durch entsprechende Erhöhung der Kulturgefäßanzahl expandiert. Anschließend wurden die Zellen aller Zellkulturflaschen (T75 oder T175) trypsiniert (siehe Kapitel 2.2.15.1) und zusammen über ein 70 µm Zellsieb gegeben, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Von dieser wurde die Zellzahl [Zellen/ml] anhand einer 1:2 Verdünnung mit Trypanblau-Lösung (0,4 %) ermittelt (siehe Kapitel 2.2.3), bevor die Zellen pelletiert (Tischzentrifuge ROTANTA: 219 g, 4 °C, 10 min) wurden. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in einem definierten Volumen MS5-Kultivierungsmedium suspendiert, so dass eine Zellkonzentration von 1,4 bis $1,6 \cdot 10^6$ Zellen/ml vorlag. Da anschließend pro T25 (CELLSTAR) je 1 ml der eingestellten Zellsuspension ausgesät werden sollte, wurde entsprechend für die Anzahl an benötigten T25 (plus eine Reserve) das benötigte Volumen der eingestellten Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen überführt. Dieses wurde auf Eis stehend mit 30 Gray (Gy; Röntgenbestrahlungsgerät: Tischabstand 230 mm; 15 mA; 12 min mit 2,5 Gy/min) bestrahlt, um die Zellproliferation der enthaltenen MS5 fast vollständig zu inaktivieren. Anschließend wurden die Zellen gründlich durchmischt, jeweils 1 ml der bestrahlten Zellsuspension in eine mit jeweils 4 ml MS5-Kultivierungsmedium vorbereitete Zellkulturflasche (T25) überführt und die Zellen gleichmäßig verteilt, bevor die fertigen Zellkulturflaschen zur Kultivierung in den Brutschrank gestellt wurden. Nach ca. 20 h wurden Konfluenz und Verteilung der in den T25 angewachsenen MS5 unter dem Mikroskop begutachtet. Unter normalen Umständen waren die Zellen zu diesem Zeitpunkt gleichmäßig angewachsen und besaßen eine ausreichende Konfluenz (80 % bis höchstens 95 %), so dass ausreichend Lücken im Zellrasen vorlagen, die ein Einnisten von mHSCs erlaubten, woraufhin der Assay fortgeführt wurde. Bei nicht Erreichen der Konfluenz nach dieser Zeit – wie es in einem Experiment der Fall war (Konfluenz betrug höchstens 60 %) – wurden die Zellen noch einen weiteren Tag kultiviert, bevor die optimale Konfluenz erreicht war und der Assay fortgesetzt werden konnte.

Für das Fortführen des Assays wurden mMNCs (siehe 2.2.5 *In vitro* Versuche) isoliert und nach der Zellzählung (siehe Kapitel 2.2.3) in einem 30 ml Röhrchen eine Zellsuspension mit $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml in MNC-Isolationsmedium im Überschuss hergestellt (pro T25 wurden 500 µl mit jeweils $1 \cdot 10^5$ Zellen benötigt). Von dieser Zellsuspension wurden 3 bis 4 ml für die Positivkontrolle in ein weiteres 30 ml Röhrchen überführt, auf Eis gestellt und die restlichen Zellen auf Eis stehend mit 3 Gy (Versuche mit EVs, die unter Zytokin-Zugabe sezerniert wurden) oder 4 Gy (Versuche mit EVs, die ohne Zytokin-Zugabe sezerniert wurden) bestrahlt (Röntgenbestrahlungsgerät: Tischabstand 433 mm; 15 mA; 1 Gy pro Minute). Die beiden verwendeten Bestrahlungsdosen zeigten in verschiedenen Vorversuchen, dass anschließend in der Methylcellulose die behandelten Zellen nur noch ungefähr 10 % der Kolonien im Vergleich mit nicht bestrahlten Positivkontrollen hervorbringen. Dies gibt somit die Möglichkeit einen potentiellen Support der geschädigten mHSCs durch zugegebene EVs zu detektieren.

Von der bestrahlten Zellsuspension wurden jeweils 500 µl entnommen und in einem neuen 30 ml Röhrchen mit dem entsprechenden EV-Präparat vorsichtig vermischt. Von denjenigen EV-Isolaten, die von mMNCs ohne Zytokine stammen, wurden von 40 mMNCs produzierte EVs pro mMNC eingesetzt. Demgegenüber wurden von den unter Zytokin-Zugabe sezernierten EVs, EVs von 120 mMNCs pro mMNC verwendet. Die benötigten Volumina der EV-Isolate wurden nach Formel 5 berechnet.

$$EV \text{ Volumen } [\mu\text{l}] = \frac{\text{Anzahl mMNCs} * \text{Supportfaktor} * \text{EV Suspensionsvolumen pro Ebene}}{\text{mMSCs Zellzahl pro Ebene}} \quad (\text{Formel 5})$$

Anzahl mMNCs = $1 * 10^5$ Zellen

Supportfaktor = Anzahl EV-produzierender mMSCs pro mMNC (hier 40 oder 120)

EV-Suspensionsvolumen pro Ebene = 100 μl pro 632 cm^2 Ebene

mMSC-Zellzahl pro Ebene = sind in Abschnitt 2.2.10 in Tab. 33 zu finden

Während die EVs mit den bestrahlten mMNCs inkubierten, wurde das MS5-Kultivierungsmedium von dem benötigten Stromalayer (T25) abgesaugt. Anschließend wurde das mMNC-EV-Gemisch mit 7 ml MS5-Kultivierungsmedium sehr vorsichtig durch auf und ab pipettieren vermengt und zum Stromalayer gegeben. Zusätzlich zu den mMNC-EV-Proben wurden 500 μl nicht bestrahlte mMNCs als Positivkontrolle und 500 μl bestrahlte mMNCs als Negativkontrolle mitgeführt, die ebenfalls mit jeweils 7 ml MS5-Kultivierungsmedium vermischt und auf ein entsprechendes Stromalayer gegeben wurden. In dieser Arbeit wurden in allen durchgeführten Radioprotektionsassays mindestens zwei technische Replikate von jeder Probe angesetzt (genaue Anzahl der angesetzten Replikate ist der Tab. 35 zu entnehmen). Entsprechend wurde das Ansatzvolumen auf Grundlage der Replikatanzahl erweitert.

Tab. 35: Auflistung der bei den Radioprotektionsassays verwendeten Vorkulturbedingungen. In dieser Arbeit wurden EVs sowohl von (transduzierten) mMSCs die ohne und von welchen die mit Zytokinen kultiviert wurden auf ihren protektiven Eigenschaften hinsichtlich bestrahlter mMNCs untersucht. Die Analysen unterschieden sich jedoch in einigen Parametern wie der eingesetzten Menge an von mMSCs produzierten EVs pro mMNC, der Anzahl an technischen Replikaten sowie der Strahlendosis mit der die mMNCs bestrahlt wurden.

EVs von (transduzierten) mMSCs	ohne Zytokine			mit Zytokinen rmEGF [40 pg/ml] + rmPDGF-BB [4 ng/ μl]		
	pro mMNC eingesetzte EVs produziert von 40 mMSCs	Technische Replikate	Strahlendosis [Gray] für mMNCs	pro mMNC eingesetzte EVs produziert von 120 mMSCs	Technische Replikate	Strahlendosis [Gray] für mMNCs
keine (Positivkontrolle)	-	2	keine	-	3	keine
keine (Negativkontrolle)	-	2	4	-	3	3
unbehandelt	1:40	2	4	1:120	3	3
shRNA_scr	1:40	2	4	1:120	3	3
shRNA_Gal1	1:40	2	4	1:120	3	3
shRNA_Sod1	1:40	2	4	1:120	3	3
shRNA_Prdx1	1:40	2	4	1:120	3	3
3x shRNA: shRNA_Gal1/ shRNA_Sod1/ shRNA_Prdx1	1:40	2	4	1:120	3	3

Nach 6 Tagen Kultivierung im Brutschrank wurde begonnen die Anzahl der überlebenden mHSCs zu ermitteln, indem die gebildeten Kopfsteinpflaster Areale (KPA) ab einer Größe von 10 Zellen in einer T25 unter einem Inversmikroskop manuell ausgezählt wurden. Insgesamt wurden die KPA in drei Größen eingeteilt: „klein“ bestehend aus ca. 10 bis 50 Zellen, „groß“ aus ca. 50 bis 200 Zellen und „riesig“ ab ca. 200 Zellen (siehe Abb. 14).

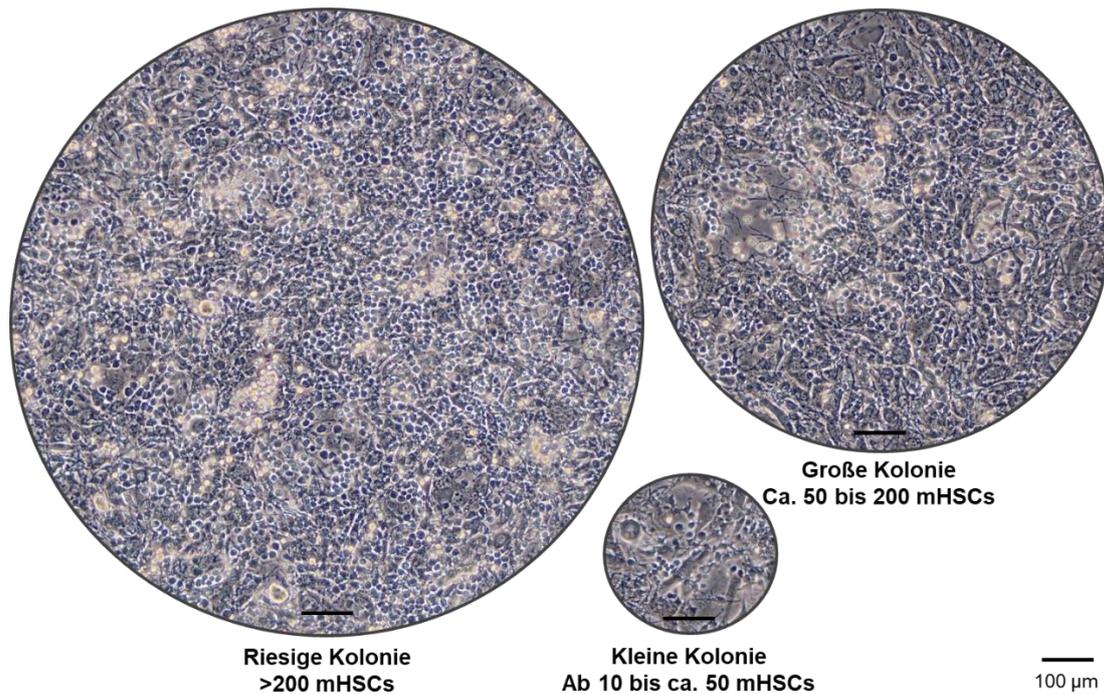


Abb. 14: Repräsentative Darstellung der verschiedenen Größen von gebildeten Kopfsteinpflaster Arealen. Einzelne überlebende mHSCs bilden unter dem MS5-Stromalayer durch Proliferation Kolonien aus Zellen, die wie ein Kopfsteinpflaster aussehen. Nach 6 Tagen Kultivierung wurde begonnen die Anzahl dieser Areale zu zählen, wobei die Areale anhand ihrer Größe bzw. zugrundeliegenden Zellzahl zusätzlich in drei Größen (klein, groß oder riesig) eingeteilt wurden. Die Aufnahmen wurden mittels auf einem Inversmikroskop (10-er Objektiv) angebrachter digitaler Spiegelreflexkamera aufgenommen.

Die ausgezählten T25 wurden anschließend weiter im Brutschrank inkubiert. Spätestens am 7. Tag mussten die KPA in allen Flaschen ausgezählt sein, damit die von den mHSCs gebildeten mHPCs für die weitere Analyse in einem Methylcelluloseassay eingesetzt werden konnten. Von den jeweils ausgezählten technischen Replikaten wurde ein Mittelwert gebildet und die Anzahl der KPA der Kontrollen mit denen der verschiedenen Behandlungen (verschiedene EV-Präparate) verglichen.

2.2.16.2. Methylcelluloseassay

Nach einwöchiger Vorkultur von letal bestrahlten mMNCs mit EVs oder ohne EVs (Negativkontrolle) sowie von nicht bestrahlten mMNCs (Positivkontrolle) auf einem MS5-Stromalayer (siehe Abschnitt 2.2.16.1) wurden die in dieser Zeit von den überlebenden mHSCs gebildeten mHPCs an Tag 8 geerntet. Dazu wurden die Kulturflaschen (T25) mehrfach, relativ stark hin und her geschwenkt, damit auch die letzten noch am MS5-Layer und den KPA anhaftenden mHPCs ins MS5-Kultivierungsmedium übergangen. Das mHPCs-haltige Medium wurde vorsichtig abgenommen, in ein 30 ml Röhrchen überführt und die Zellen pelletiert (Tischzentrifuge ROTANTA: 400 g, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde bis auf einen minimalen Rest von wenigen Mikroliter abgesaugt, das Pellet in 100 µl MNC-Isolationsmedium suspendiert und auf ein Aliquot Methylcellulose Medium in einem 5 ml Röhrchen gegeben. Für eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in der Methylcellulose wurde jede Probe mindestens 5-mal gevortext bis der entstandene Strudel den Gefäßboden erreichte. Nachdem alle durch das Vortexen entstandenen Luftbläschen wieder aus der Methylcellulose entwichen waren, wurden mindestens 900 µl der Methylcellulose-Zell-Mischung bläschenfrei mit einer Sicherheitsaufziehkanüle in einer 1 ml Feindosierungsspritze aufgezogen. Anschließend wurden die 900 µl möglichst gleichmäßig

und ohne Bläschenbildung auf drei Löcher einer 24-Loch-Zellkulturplatte (siehe Abb. 15) aufgeteilt, so dass nun pro Behandlung anstatt eines technischen Duplikats eine sechsfach und anstatt eines Triplikates eine neunfach Bestimmung vorlag. Durch vorsichtiges Klopfen gegen die Platte wurde dafür gesorgt, dass die Methylcellulose sich im gesamten Loch verteilte. Um zu verhindern, dass die Methylcellulose während der Kultivierung austrocknete, wurden die oberen und unteren sechs Löcher sowie die Zwischenräume der 24-Loch-Zellkulturplatte mit sterilem Reinstwasser gefüllt (siehe Abb. 15), wodurch eine konstante Luftfeuchtigkeit gewährleistet wurde. Die fertigen Platten wurden vorsichtig in den Brutschrank gestellt und für 14 Tage kultiviert.

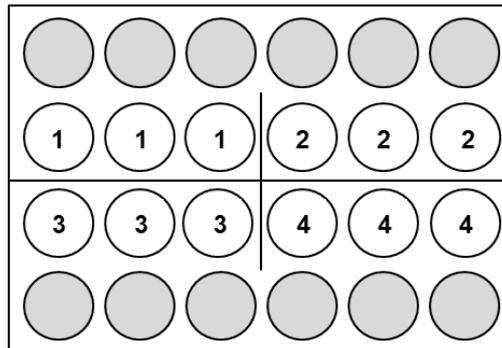


Abb. 15: Aufteilung einer 24-Loch-Zellkulturplatte für einen Methylcelluloseassay. Die grau hinterlegten Löcher wurden bis zum Rand mit sterilem Reinstwasser gefüllt, ebenso wie die Zwischenräume der Löcher. Die aus einer T25 geernteten mHPCs wurden mit einem Aliquot des Methylcellulose-Mediums vermischt. Von dieser Mischung wurden jeweils mind. 300 µl in drei nebeneinander liegende Löcher überführt, so dass insgesamt pro Platte von je vier T25 ein Methylcelluloseassay ausgesät werden konnte.

Ab dem dreizehnten Kultivierungstag wurde begonnen die Anzahl an *colony-forming units* (CFUs) pro Loch manuell am Inversmikroskop zu zählen. Um möglichst alle gebildeten Kolonien zu detektieren, wurde jedes Loch vollständig von der Oberfläche in die Tiefe abgesucht. Des Weiteren wurde versucht die vorliegenden Zelltypen in den Zellansammlungen zu bestimmen, um besonders bei vermeintlich ineinander gewachsenen Kolonien anhand der Zelltyp-Zusammensetzung abschätzen zu können, ob es sich um eine oder mehrere Kolonien handelte. War dies nicht ausreichend, wurde Zell- und Wuchsform miteinbezogen, um gegebenenfalls Kolonien voneinander zu unterscheiden. Kolonien, die zwischen 5 und 10 (eigentlich nur CFU-M) Zellen umfassten, wurden als mickrig, zwischen 10 und 25 Zellen als klein, von 25 bis 50 Zellen als mittel und ab 50 als groß angesehen.

Die Auszählung wurde immer am vierzehnten Kultivierungstag abgeschlossen, der Kolonieanzahlmittelwert der technischen Replikate berechnet und gegen die Kontrollen ausgewertet.

2.2.17. EV-Markierung mit PKH26

In dieser Arbeit wurden mMSC-EVs in letal bestrahlte Versuchstiere (siehe Kapitel 2.2.18) transplantiert, um Information über ihre Zielzellen/-gewebe *in vivo* zu bekommen. Für die Detektion der EVs in den Analysen der Experimente war es nötig die EVs vor der Transplantation (TX) zu markieren. Eine EV-Markierung nach TX bzw. während der Analysen war nicht möglich, da es keinen Marker gibt, der alle verschiedenen Formen, der von uns verwendeten EVs, spezifisch *in vivo* markieren könnte. Daher wurde zum Markieren der EVs vor der TX das PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit verwendet. PKH26 ist ein gelb-oranger Fluoreszenzfarbstoff (Extinktionsmaximum: 551 nm; Emissionsmaximum: 567 nm) mit langen aliphatischen Ketten, die eine Inkorporation des Farbstoffes in die Phospholipiddoppelschicht

der EVs und daher deren Kennzeichnung ermöglicht. Da dieser Farbstoff sich in alle lipophilen Strukturen wie z.B. jede Zellmembran integriert, ist diese Färbung *per se* nicht spezifisch und wurde daher *in vitro* an isolierten reinen EVs durchgeführt, um eine ungewollte Färbung anderer lipophiler Strukturen zu vermeiden. Für die Färbung der EVs wurde das Herstellerprotokoll des Kits für Zellmarkierung auf die EVs übertragen und etabliert. Die Färbung erfolgte am Vorabend der TX unter durchgängig sterilen Bedingungen.

Pro Versuchstier wurden jeweils EVs, welche von $1 \cdot 10^6$ mMSCs generiert wurden, transplantiert. Das entsprechende EV-Volumen wurde mit dem im Kit enthaltenen Diluent C in Ultrazentrifugenröhrchen auf ein Gesamtvolumen von 100 μ l gebracht. Gleichzeitig wurden mit weiteren 100 μ l Diluent C 0,4 μ l PKH26 Lösung vermischt und anschließend zu den verdünnten EVs gegeben. Die 200 μ l des EV/Diluent C/PKH26-Gemisches wurden gründlich durch auf- und abpipettieren vermengt, 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Färbung anschließend durch Zugabe des gleichen Volumens an FCS (200 μ l; F7524) bei 1 min Inkubation gestoppt. Das Waschen der gefärbten EVs wurde – anstatt 3- bis 5-mal wie bei Zellen vorgesehen – auf einen einzelnen Waschschrift beschränkt, da jeder Waschschrift unvermeidbar zu einem nicht nachvollziehbaren Verlust an gefärbten EVs führen würde. Dazu wurde gleich nach dem Abstoppen das Ultrazentrifugenröhrchen bis zum Rand mit 1x DPBS gefüllt, die EVs mittels Ultrazentrifugation (100.000 g, 4 °C, 2 h) pelletiert und der Überstand vollständig abgesaugt. Zum Schluss wurden die nun mit PKH26-markierten EVs in 200 μ l 1x DPBS suspendiert und bis zur TX bei 4 °C gelagert.

Insgesamt wurden immer mehrere Tiere mit demselben EV-Präparat transplantiert, so dass der Färbungsansatz pro Präparat aus der Anzahl an zu transplantierenden Tieren pro Versuch plus eine zusätzliche Probe bestand und dementsprechend alle Reagenzien zum Färben, Abstoppen und Suspendieren angepasst wurden.

2.2.18. EV-Transplantation

Zur *in vivo* Detektion der Zielzellen/-gewebe von mMSC-EVs wurden PKH26-markierte EVs, die jeweils von $1 \cdot 10^6$ mMSCs gebildet wurden, in einem Gesamtvolumen von 200 μ l 1x DPBS nach einer letalen Bestrahlung intravenös transplantiert. Als Rezipienten dienten weibliche 8 bis 12 Wochen alte C57Bl/6J Ly5.1 Tiere, die ungefähr 12 Stunden vor der TX mit einer letalen Gesamtdosis von 9,5 Gray über einem Zeitraum von 28 min 48 sec (Cs-137 Bestrahlungsquelle; Gerät am Heinrich-Pette-Institut) ganzkörperbestrahlt wurden.

2.2.19. Cytospins

In dieser Arbeit wurden Cytospins zur Identifizierung der Zielzellen transplantiert mMSC-EVs im Knochenmark von weiblichen C57Bl/6J Ly5.1 Mäusen nach letaler Bestrahlung verwendet.

2.2.19.1. Herstellung von Cytospins

Ein Experiment umfasste jeweils 8 Tiere (weibliche 8 bis 12 Wochen alte C57Bl/6J Ly5.1 Mäuse), denen 10 bis 12 Stunden nach letaler Bestrahlung jeweils PKH26-markierte EVs (von $1 \cdot 10^6$ mMSCs sezerniert) intravenös appliziert wurden. Insgesamt wurden zwei Experimente aufeinander folgend durchgeführt.

Zwei und vier Stunden nach TX wurde zu jedem Zeitpunkt von je 4 Tieren das Knochenmark (siehe Kapitel 2.2.4) und die darin enthaltenen mMNCs (siehe Kapitel 2.2.5, *In vivo* Versuche) isoliert. Ein Teil der Zellen wurde anschließend als Cytospins auf Objektträger gebracht. Dazu wurden jeweils 5×10^4 Zellen in einen Cytospineinsatz (Shandon™ Einfach-Cytofunnel™ mit weißen Filterkarten) geladen und auf einen Objektträger zentrifugiert (Cytozentrifuge: 400 g, RT, 5 min). Die Präparate wurden anschließend 20 min im Dunklen luftgetrocknet, bevor sie 10 min in eiskaltem Aceton bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert und bis zur Färbung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden.

2.2.19.2. Färbung von Cytospins

Die einzelnen Schritte der Cytospin-Färbung fanden, wenn möglich, unter Lichtausschluss statt. Vor der immunhistochemischen Färbung der Cytospins wurden diese weniger als 10 min auf Raumtemperatur erwärmt, bevor sie 20 min mit jeweils 200 μl 5 %-igem Rattenserum (mit 1x DPBS verdünnt) blockiert wurden. Nach Entfernung der Blockierlösung durch Abklopfen, wurde jeweils ein Teil der Cytospins pro Zeitpunkt und Tier mit je 100 μl 1:200 verdünnten Ly-6A/E (SCA-1) Erstantikörper und der andere Teil mit 100 μl 1:200 verdünnten CD117 (C-KIT) Erstantikörper 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Beide Erstantikörper wurden mit 0,1 % Rattenserum in 1x DPBS verdünnt.

Der jeweilige Erstantikörper wurde durch kurzes Eintauchen der Cytospins in einen Färbekasten (Marienfeld Superio Färbekästen und Gestelle; Artikelnummer: 15272579; Fisher Scientific GmbH; 58239 Schwerte; Deutschland), gefüllt mit 0,1 % Tween-20 in 1x DPBS, entfernt. Anschließend wurden die Präparate noch jeweils dreimal á 5 min in 1x DPBS mit 0,1 % Tween-20 gewaschen und der Waschpuffer gründlich abgeschlagen, bevor auf alle Cytospins als Sekundäntikörper jeweils 100 μl (1:500 verdünnt in 0,1 % Tween-20 in 1x DPBS) Anti-Ratte Alexa Fluor 488 gegeben wurde. Der Sekundäntikörper wurde, nachdem er im Dunkeln 1 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert worden war, wie bereits der primäre Antikörper, durch Eintauchen der Objektträger in eine mit 0,1 % Tween-20 in 1x DPBS gefüllte Färbekassette entfernt. Es folgte ein fünfminütiger Waschschrift in 1x DPBS mit 0,1 % Tween-20. Zuletzt wurden zusätzlich bei allen Cytospins die Zellnuklei mit je 1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI eine Minute gefärbt. Nach dem Färben wurden die Cytospins zweimal mit 0,1 % Tween-20 in 1x DPBS gewaschen. Dem folgte ein weiterer Waschschrift mit Reinstwasser sowie das Fixieren der gefärbten Präparate für 5 min in absolutem EtOH. Nach mindestens 20 min Trockenzeit wurden die gefärbten Zellen mit Fluoromount-G eingedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet bevor sie bis zur Auswertung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden.

2.2.19.3. Auswertung der gefärbten Cytospins

Die immunhistochemisch gefärbten Cytospins (siehe Kapitel 2.2.19.2) wurden für die Auswertungszeit bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Mit einem 40-fachen Objektiv wurden unter Zuhilfenahme von Öl am Fluoreszenzmikroskop jeweils die gesamten gefärbten Zellen auf den Objektträgern im DAPI-Kanal durchgerastert. Vorhandene Zellen bzw. Zellcluster, welche durch einen deutlich DAPI-gefärbten Zellkern erkennbar waren, wurden nacheinander in den jeweiligen Fluoreszenzkanälen für DAPI, Alexa Fluor 488 und PKH26 fotografiert und ein Bild mit der Überlagerung aller Kanäle erstellt. Anschließend wurde anhand dieser Bilder die Anzahl der Zellen mit positiver SCA-1 oder C-KIT Färbung sowie die Anzahl an PKH26-markierten EVs, die mit diesen Antigen-positiven Zellen kolokalisierten, ermittelt.

2.2.20. ImageStream Analysen

Die ImageStream Analysen dienen in dieser Arbeit der Verifizierung der Cytospin-Ergebnisse. Zusätzlich ermöglichte die Methode die Quantifizierung der Anteile an SCA1-positiven, C-KIT-positiven und doppelpositiven Zellen, die mit transplantierten PKH26-EVs kolokalisierten.

2.2.20.1. Probengenerierung für ImageStream Analysen

Insgesamt wurden drei separate Experimente durchgeführt, in denen – wie bereits bei den Cytospins – Versuchstiere (weibliche 8 bis 12 Wochen alte C57Bl/6J Ly5.1 Mäuse) letal bestrahlt und nach circa 10 bis 12 Stunden mit PKH26-markierten EVs aus jeweils 1×10^6 mMSCs in 200 μ l 1x DPBS intravenös transplantiert wurden. Für die Vergleichbarkeit der ImageStream Untersuchung mit der der Cytospins, wurden die Tiere ebenfalls zwei und vier Stunden nach der Transplantation euthanasiert sowie das Knochenmark (siehe Kapitel 2.2.4) und die darin enthaltenen mMNCs (siehe Kapitel 2.2.5; *In vivo Versuche*) isoliert. Die genaue Tieranzahl pro Zeitpunkt und Versuch ist in Tab. 36 aufgelistet.

Tab. 36: Auflistung der verwendeten Versuchstiere für die ImageStream Analysen. In der Tabelle wurden für alle drei separaten Experimente die Anzahl an verwendeten weiblichen C57Bl/6J Ly5.1 Tieren, die als Kontrollen und als Analysetiere dienen, aufgelistet. Die Analysetiere sind des Weiteren in zwei Gruppen aufgeteilt, die den Zeitpunkt der Analyse nach Transplantation (TX) angeben. Zusätzlich wurde die jeweils angewendete Behandlung in Form von Bestrahlung und Transplantation mit aufgelistet. ✓ = wurde angewendet; - = wurde nicht angewendet.

	Kompensations-kontrolle	PKH26-EVs Kompensation	Versuchs-kontrolle	2 h nach TX	4 h nach TX
Letal bestrahlt (9,5 Gy)	-	-	✓	✓	✓
i.v. transplantierte PKH26-mMSC-EVs	-	-	Nur 1x DPBS transplantiert	✓	✓
Experiment 1	1 Tier	Präparat 1	1 Tier	3 Tiere mit EV-Präparat 1	2 Tiere mit EV-Präparat 1
Experiment 2	1 Tier	Präparat 2	1 Tier	3 Tiere mit EV-Präparat 2	2 Tiere mit EV-Präparat 2
Experiment 3	1 Tier	Präparat 1	1 Tier	3 Tiere mit EV-Präparat 1	4 Tiere mit EV-Präparat 1
Färbungsansätze pro Tier	3	1	5	5	5

Zusätzlich zu den nach 2 und 4 Stunden zu analysierenden Tieren (letal bestrahlt und mit EVs transplantiert), wurde für die Analyse der Proben via ImageStream noch pro Experiment ein komplett unbehandeltes Versuchstier (Kompensations-Kontrolltier) und ein Versuchs-Kontrolltier (letal bestrahlt und mit 200 μ l 1x DPBS transplantiert anstatt EVs) benötigt. Die mMNCs des unbehandelten Tieres wurden entweder gar nicht gefärbt oder nur einer Einfachfärbung (siehe Kapitel 2.2.20.2.1) unterzogen. Diese dienen zusammen mit den PKH26-markierten EVs als Kompensationskontrollen für die jeweilige Messung. Das jeweilige Versuchs-Kontrolltier eines Experiments wurde zusammen mit den zu analysierenden Versuchstieren bestrahlt und transplantiert. Zwei Stunden nach Transplantation wurden auch hier die MNCs aus dem Knochenmark (siehe Kapitel 2.2.5 *In vivo Versuche*) isoliert und wie bei den zu analysierenden Tieren eine Dreifachfärbung (siehe 2.2.20.2.2) durchgeführt. Anschließend wurden die gefärbten Zellen zum Setzen der benötigten Gates für die ImageStream Messung verwendet.

Von allen mMNCs wurde nach deren Isolation eine 1:10 Verdünnung mit Essigsäure (3 %) hergestellt und die Zellzahl/ml ermittelt (siehe Kapitel 2.2.3), um anschließend eine definierte Menge (1×10^6 Zellen) der isolierten mMNCs für die ImageStream Analyse immunhistochemisch färben zu können. Die 1×10^6 Zellen wurden dafür in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Färbung auf Eis gehalten.

2.2.20.2. Färbung von mMNCs für die ImageStream Analyse

Pro Ansatz wurden jeweils 1×10^6 der isolierten mMNCs in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mittels Zentrifugation (Tischzentrifuge 5415C; 735 g, RT, 3 min) vor Beginn der Färbung pelletiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt.

Zusätzlich wurde eine FCS-Lösung (2 %) durch Verdünnung von hitzeinaktiviertem fötalem Rinderserum (F7524) mit 1x DPBS und eine 20 ng/ μ l Fc-Blockierungslösung aus 0,5 mg/ml Fc-Block (*Purified anti-mouse CD16/32 Antibody*) und 1x DPBS (1 μ g Fc-Block pro 1×10^6 Zellen) hergestellt.

2.2.20.2.1. Färbung von mMNCs unbehandelter Tiere als Kompensationskontrollen

Ungefärbte Zellen

Das Zellpellet wurde lediglich in 50 μ l FCS-Lösung (2 %) ohne Bläschenbildung suspendiert und bis zur Messung bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert.

Hoechst Einfachfärbung

Das Zellpellet wurde in 100 μ l FCS-Lösung (2 %) suspendiert, 1 μ g Hoechst 33258 Lösung [1 mg/ml] zum Färben des Nukleus hinzugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Färbung mit 900 μ l 2 %-iger FCS-Lösung abgestoppt, die gefärbten Zellen erneut pelletiert (Tischzentrifuge 5415C: 735 g, RT, 3 min) und dann in 50 μ l FCS-Lösung (2 %) ohne Bläschenbildung suspendiert. Die vorbereitete Probe wurde bis zur Messung bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

SCA-1 Einfachfärbung

Das Zellpellet wurde in 50 μ l Fc-Blockierungslösung [20 ng/ μ l] suspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 50 μ l FCS-Lösung (2 %) sowie 0,5 μ l SCA-1 Alexa Fluor 488 Antikörper hinzugegeben. Die Färbung wurde 20 min, im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie durch Zugabe von 900 μ l FCS-Lösung (2 %) beendet und mittels Zentrifugation (Tischzentrifuge 5415C: 735 g, RT, 3 min) die gefärbten Zellen pelletiert wurden. Das Zellpellet wurde anschließend in 50 μ l FCS-Lösung (2 %) ohne Bläschenbildung suspendiert und bis zur Messung bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert.

C-KIT Einfachfärbung

Das Zellpellet wurde in 50 μ l Fc-Blockierungslösung [20 ng/ μ l] suspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurden 50 μ l FCS-Lösung (2 %) sowie 0,5 μ l C-KIT Alexa Fluor 647 Antikörper hinzugegeben. Die Färbung wurde 20 min, im Dunkeln und bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie durch Zugabe von 900 μ l FCS-Lösung (2 %) beendet und mittels Zentrifugation (Tischzentrifuge 5415C: 735 g, RT, 3 min) die gefärbten Zellen pelletiert wurden. Das Zellpellet wurde anschließend in 50 μ l FCS-Lösung (2 %) ohne Bläschenbildung suspendiert und bis zur Messung bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

PKH26-markierte EVs (siehe Kapitel 2.2.17)

Restliche, nicht transplantierte EVs dienten als Kompensationskontrolle für die PKH26 Fluoreszenz.

2.2.20.2.2. Färbung von mMNCs der Analysetiere und Versuchs-Kontrolltiere

Die 2 oder 4 h nach EV-TX aus bestrahlten Tieren isolierten mMNCs, wurden jeweils mit SCA-1 Alexa Fluor 488, C-KIT Alexa Fluor 647 Antikörper und Hoechst gefärbt. Gleiches galt auch für die mMNCs aus Kontrolltieren (bestrahlt und 1x DPBS transplantiert). Insgesamt wurden pro Tier jeweils 5-mal je 1×10^6 Zellen dieser Dreifachfärbung unterzogen.

Für die Dreifachfärbung der Zellen wurde ein Mastermix mit SCA-1 Alexa Fluor 488 und C-KIT Alexa Fluor 647 Antikörper hergestellt, indem beide 1:100 in einer FCS-Lösung (2 %) verdünnt wurden. Bei einer Verwendung von 50 μ l dieses Mixes wurden demnach 0,25 μ g SCA-1 Alexa Fluor 488 und 0,42 μ g C-KIT Alexa Fluor 647 Antikörper pro 1×10^6 Zellen eingesetzt.

Das Zellpellet wurde in 50 μ l Fc-Blockierungslösung [20 ng/ μ l] suspendiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 50 μ l Antikörper Mastermix pro Probe vorsichtig mit den Zellen in der Blockierungslösung gemischt. Die Färbung erfolgte 15 min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde 1 μ g Hoechst 33258 Lösung [1 mg/ml] hinzugegeben und für weitere 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Färbung wurde durch Zugabe von 900 μ l FCS-Lösung (2 %) beendet und die gefärbten Zellen mittels Zentrifugation (Tischzentrifuge 5415C: 735 g, RT, 3 min) pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 50 μ l FCS-Lösung (2 %) ohne Bläschenbildung suspendiert und bis zur Messung bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

2.2.20.3. ImageStream Messung der gefärbten mMNCs

Die jeweils 5 gefärbten Proben eines jeden Versuchstiers (bestrahlt und mit EVs transplantiert) sowie die der Versuchs-Kontrolltiere wurden vollständig mittels ImageStream analysiert. Die dazu verwendeten Intensitätskonfigurationen für die Anregungslaser sind in Tab. 37 zusammengefasst. Für die Bildaufnahmen diente eine 60-fache Vergrößerung.

Tab. 37: Auflistung der für die ImageStream Analysen verwendeten Anregungslaser und deren jeweilige Intensitätskonfiguration.

Laserwellenlänge [nm]:	405	488	561	642	785
Intensität [mW]	35	60	50	150	2

Kompensation:

Für jedes Experiment wurden zuerst ungefärbte mMNCs eines unbehandelten Tieres verwendet, um das Gating grob anzupassen. Anschließend wurden in diesen Gates die Kompensationskontrollen für Hoechst, SCA-1 Alexa Fluor 488, C-KIT Alexa Fluor 647 und PKH26 (siehe Kapitel 2.2.20.2.1) eingemessen. Unter Zuhilfenahme der INSPIRE ImageStreamX System Software wurden die gemessenen Werte der einzelnen Kontrollen zur Erstellung einer Kompensationsmatrix verwendet. Die generierte Kompensationsmatrix wie beispielhalber für das Experiment 1 in Tab. 38 dargestellt, enthält die berechneten Kompensationskoeffizienten für den jeweiligen Übertrag des Fluoreszenzsignals eines bestimmten Kanals (X-Achse) in andere in dem Experiment detektierten Fluoreszenzkanäle (Y-Achse). Die Matrix wurde anschließend für die Kompensation aller weiteren Proben angewendet.

Tab. 38: INSPIRE-generierte Kompensationsmatrix mit den berechneten Kompensationskoeffizienten für die ImageStream Analysen.

	Hellfeld (Ch01)	Alexa Fluor 488 (Ch02)	PKH26 (Ch03)	Hoechst (Ch07)	Alexa Fluor 647 (Ch11)
Hellfeld (Ch01)	1	0,028	0,078	0,03	0
Alexa Fluor 488 (Ch02)	0,03	1	0,166	0,024	0
PKH26 (Ch03)	0	0,098	1	0,003	0
Hoechst (Ch07)	0,071	0,005	0	1	0,028
Alexa Fluor 647 (Ch11)	0	0	0,001	0,016	1

Hintergrundrauschen:

Um das jeweilige Hintergrundrauschen in den einzelnen zu messenden Fluoreszenzkanälen zu eliminieren, wurde für jeden Kanal eine sogenannte Maske bereits in einem Vorversuch erstellt. Die Maske legte den in der Messung zu berücksichtigenden Intensitätsbereich fest, wobei ohne Masken ein Pixel-Intensitäts-Zählbereich von 0 - 4095 vorgegeben wäre. Da ein Hintergrundrauschen üblicherweise im vorderen Bereich auftritt, wurden die Intensitätsbereiche entsprechend für die verwendeten Kanäle wie folgt angepasst. Für Alexa Fluor 488 (M02) wurde ein Bereich von 122 bis 4095, für PKH26 (M03) von 85 bis 4095, für Hoechst (M07) von 107 bis 4095 und für Alexa Fluor 647 (M11) von 64 bis 4095 gewählt. Alle Proben wurden anschließend unter Berücksichtigung dieser Werte vermessen.

Gatingstrategie:

Die mit SCA-1 Alexa Fluor 488, C-KIT Alexa Fluor 647 und Hoechst gefärbten Zellen der Kontroll- und Versuchstiere wurden zuerst im Hellfeldkanal detektiert. Es wurde die normalisierte Häufigkeit der Zellen gegen den quadratischen Mittelwert der Bildschärfe in einem Histogramm angezeigt. Mittels R1-Gate wurden die fokussierten Zellen ausgewählt, die dann in einem Streudiagramm (Abbildungsmaßstab - engl.: *aspect ratio* - gegen Fläche - engl.: *area* - der Zellen) aufgetragen und durch ein weiteres Gate (R2) aus diesen die Einzelzellen ausgewählt wurden. Die Einzelzellen wurden im Weiteren dahingehend untersucht, ob sie positiv für eins der beiden Antigene sind, indem die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes, der an das jeweilige Antigen konjugiert war (SCA-1 Alexa Fluor 488 oder C-KIT Alexa Fluor 647), gegen die Hoechst-Intensität (identifiziert kernhaltige Zellen) aufgetragen wurde. Der Anteil an positiven Einzelzellen wurden anschließend durch entsprechende Gates (R3 für SCA-1⁺-Zellen und R4 für C-KIT⁺-Zellen) ermittelt. Zusätzlich konnte durch die Auftragung der Intensitäten für Alexa Fluor 647 gegen die von Alexa Fluor 488 der Anteil doppelt positiven Einzelzellen (SCA-1⁺/C-KIT⁺-Zellen) mit Gate R7 bestimmt werden. Ausgehend von den jeweiligen einfach oder doppelt positiven Zellen wurde analysiert, ob diese in Kolokalisation mit EVs standen. Dazu wurde jeweils die Fluoreszenzintensität eines Antigens gegen die Fluoreszenzintensität des EV-Markers PKH26 aufgetragen. Bei den doppelt positiven Zellen wurde hingegen die Fluoreszenzintensität von Hoechst gegen die Intensität der PKH26-Fluoreszenz aufgetragen. Der Anteil an PKH26-markierten EVs wurde mit dem Gate R4 in der SCA-1⁺-Population, mit R6 in der C-KIT⁺-Zellpopulation und von SCA-1⁺/c-KIT⁺-Zellen mit R8 bestimmt. Die so erhaltenen Anteile an Antigen⁺-Zellen, welche mit PKH26-EVs kolokalisierten, ließen sich anschließend noch dahingehend weiter analysieren, dass mittels Spot Zählung die genaue Anzahl an PKH26-EVs pro Antigen⁺-Zelle dargestellt werden konnte (R9 = 1 EV; R10 = 2 EVs; R11 = 3 EVs; R12 = 4 EVs; R13 = 5 EVs und R14 = 6 EVs). Die graphische Darstellung des verwendeten Gatings wurde in Abb. 16 anhand einer 4 h Probe dargestellt.

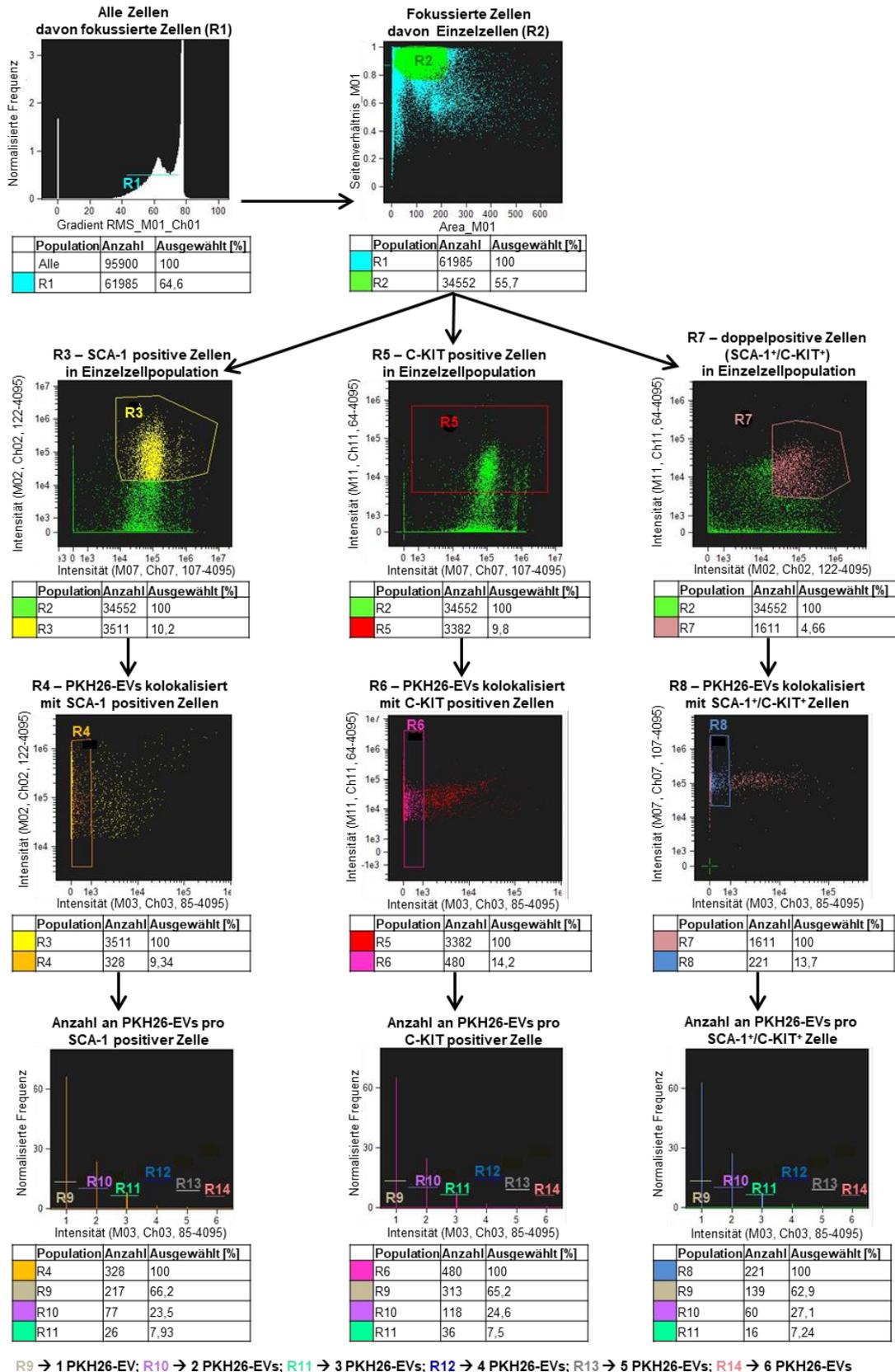


Abb. 16: Verwendetes Gating für die ImageStream Analysen. Untersucht wurden dreifach immunhistochemisch gefärbte (SCA-1 Alexa Fluor 488, C-KIT Alexa Fluor 647 und Hoechst) mMNCs 2 h und 4 h nach TX von PKH26-EVs in letal bestrahlte Tiere (8-12 Wochen alte, weibliche C57Bl/6J Ly5.1 Mäuse). Dargestellt ist beispielhalber die Messung einer 4 h nach TX entnommenen und gefärbten Probe des ersten Experiments. Für die Messung wurde folgende Kanäle (engl.: Ch = Channel) verwendet: Ch01 = Hellfeld, Ch02 = Alexa Fluor 488 konjugiert an SCA-1 Antikörper, Ch03 = PKH26-markierte EVs, Ch07 = Hoechst als Zellkernfärbung und Ch11 = Alexa Fluor 647 konjugiert an C-KIT Antikörper). Gradient RMS = quadratischer Mittelwert für Bildschärfe.

2.2.20.4. Auswertung der ImageStream Analyse

Die gemessenen Daten wurden anschließend mittels IDEAS Auswertesoftware kompensiert, die Gates nochmals angepasst und schlussendlich die Statistik über die einzelnen Populationen in den jeweils gesetzten Gates ausgelesen.

Der prozentuale Anteil der jeweils detektierten Population in einem gesetzten Gate ist dabei jeweils auf die in dem vorliegenden Streudiagramm dargestellte Population bezogen, die als 100 % angesehen wurde. Das bedeutet, dass die Einzelzellen (R2) in der weiteren Analyse von SCA1⁺ (R3), C-KIT⁺ (R5) und doppelt positiven Zellen (R7) als 100 % angesehen wurden und davon ausgehend der Anteil der jeweils Antigen⁺-Zellen berechnet wurde. Ebenso verhielt es sich mit dem prozentualen Anteil an mit PKH26-EVs kolokalisierten Antigen⁺-Zellen (jeweilige Antigen⁺-Population \equiv 100 %) und den Spot Counts (mit PKH26-EV kolokalisierte Antigen⁺-Zellen \equiv 100 %).

Für eine statistische Auswertung wurden die jeweiligen prozentualen Anteile einer Population aller 5 Proben eines Versuchstieres gemittelt, die mit PKH26-EVs kolokalysierenden Antigen⁺-Zellen auf den Anteil an Einzelzellen umgerechnet und statistisch (siehe Abschnitt 2.2.32) analysiert.

2.2.21. EV-Pelletierung

Für die Isolation der in EVs enthaltenen RNAs, wurden die geernteten und in α MEM/HEPES suspendierten mMSC-EVs (siehe Kapitel 2.2.10) erneut pelletiert. Durch die Entfernung des Suspensionsmediums sollte eine Verdünnung und somit eine eventuelle Inaktivierung des Lysepuffers vermieden werden.

Die gesamten EV-Ernten einer mMSC-Kultur (Kultur 1 = 2 EV-Ernten; Kultur 2 und 3 = jeweils 3 EV-Ernten), welche zur Transkriptomanalyse mittels *Next-Generation Sequencing* (NGS) genutzt werden sollte, wurden in einem Ultrazentrifugenröhrchen vereinigt. Im Anschluss wurden die leeren 1,5 ml Reaktionsgefäße der EV-Präparate dreimal mit jeweils 1 ml sterilem 1x DPBS gespült und ebenfalls in das entsprechende Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde das Röhrchen mit sterilem 1x DPBS bis kurz unter den Rand aufgefüllt und die EVs mittels Ultrazentrifugation (Optima LE-80K: 100.000 g, 4 °C, 70 min ohne Bremse) pelletiert. Der gesamte Überstand wurde vorsichtig von dem RNA Pellet abgesaugt und unverzüglich die RNA-Isolation (siehe Kapitel 2.2.22) angeschlossen.

Auch für den transkriptionalen Nachweis der Runterregulation von *Sod1*, *Prdx1* und *Gal1* in mMSCs durch eine lentiviral eingebrachte shRNA, wurden die von diesen Zellen produzierten EVs vor der RNA-Isolation erneut pelletiert. Dazu wurde von jeder EV-Ernte einer Behandlung (+/- shRNA; +/- Zytokine im mMSC-Kultivierungsmedium) 300 μ l des jeweiligen EV-Präparats in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 700 μ l 1x DPBS auf 1 ml Gesamtvolumen gebracht und die enthaltenen EVs mittels Ultrazentrifugation (Sorvall Discovery M120: 100.000 g, 4 °C, 90 min ohne Bremse) pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig vollständig von dem EV-Pellet abgesaugt und unverzüglich mit der RNA-Isolation (siehe Kapitel 2.2.22) begonnen.

2.2.22. RNA-Isolation

Die RNA-Isolation aus EVs und den dazugehörigen mMSCs wurde mittels RNeasy Mini Kit nach Herstellerangabe durchgeführt. Zur Vermeidung von Kontamination oder Degradation der RNAs via RNasen wurden nuklease- und nukleotidfreie Materialien und Chemikalien verwendet sowie unter einer

ausschließlich für RNA-Arbeiten genutzten Heraeus HERAsafe Sicherheitswerkbank gearbeitet. Alle Oberflächen und Geräte wurden vor Benutzung mit RNase AWAY gesäubert und alle Zentrifugationsschritte fanden bei Raumtemperatur in einer Eppendorf Tischzentrifuge (5424) statt. Vor Beginn jeder RNA-Isolation wurden jeweils frischer Lysepuffer und frische DNase-Lösung für die jeweilige Anzahl an zu isolierenden Proben im Überschuss angesetzt. Für den Lysepuffer wurde pro 1 ml RLT Puffer je 10 µl 2-Mercaptoethanol [98 %] zugegeben. Die Herstellung der DNase-Lösung wurde nach Herstellerangaben (RNase-Free DNase Set, Qiagen) angesetzt, indem pro Probe 10 µl DNase I Stocklg. mit 70 µl RDD Puffer (DNase I Mix) durch vorsichtiges Invertieren gemischt wurden. Zellpellets aus 1×10^6 mMSCs wurden auf Eis angetaut bis sich die Pellets von der Gefäßwand lösen ließen, bevor 600 µl Lysepuffer pro Pellet zugeben wurden. Anschließend wurden die Proben gründlich gevortext bis das jeweilige Pellet vollständig gelöst war. Pelletierte EVs (siehe Kapitel 2.2.21) wurden in den Ultrazentrifugenröhrchen mittels gründlichen Pipettierens in ebenfalls 600 µl Lysepuffer suspendiert. Das erhaltene Lysat aus einem mMSC- oder EV-Pellet wurde anschließend komplett auf eine QIAshredder Spinsäule geladen und bei dem Durchlaufen der Säule mittels Zentrifugation (14.680 rpm, 2 min) homogenisiert. Das Homogenisat wurde in einem im Kit enthaltenen 2 ml Gefäß aufgefangen, mit 600 µl 70 %-igem Ethanol (70 ml absolut EtOH mit 30 ml Nuklease-freiem Wasser) vorsichtig, aber gründlich, gemischt. Je 600 µl des RNA-haltigen Gemisches (Gesamtvolumen ca. 1,2 ml) wurden nacheinander auf eine RNeasy Spinsäule in einem 2 ml Auffanggefäß gegeben und 30 sec bei 9.000 g zentrifugiert, wodurch die enthaltenen RNAs auf der Säule gebunden wurden und der Durchfluss anschließend verworfen werden konnte. Die gebundenen RNAs wurden anschließend durch das Zentrifugieren (9.000 g, 30 sec) von jeweils 700 µl RW1 Puffer (Waschpuffer) durch die Säule gewaschen, bevor je 80 µl DNase I Mix direkt auf die Membran der Säule gegeben wurde, um mögliche ebenfalls gebundene DNA bei RT für 15 min zu verdauen. Der Verdau wurde durch Zugabe von 350 µl RW1 Puffer gestoppt, die Flüssigkeit in das Auffanggefäß zentrifugiert (9.000 g, 30 sec) und verworfen. Es folgten zwei weitere Waschschriffe, in denen jeweils nacheinander je 500 µl RPE Puffer pro Säule zentrifugiert (1. 9.000 g, 30 sec; 2. 9.000 g, 2 min) und der Durchfluss anschließend verworfen wurde. Jede Säule wurde danach auf ein neues 2 ml Auffanggefäß gesetzt und bei 20.238 g 1 min trocken zentrifugiert. Zum Schluss wurden die Säulen auf 1,5 ml Reaktionsgefäße (DNA LoBind) gesteckt und die gebundenen RNAs mittels Nuklease-freiem Wasser in zwei Schritten eluiert. Für die Elution der Zell-RNAs wurde pro Elutionsschritt jeweils 50 µl und für die EV-RNAs 100 µl RNase-freies Wasser auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubation von 4 bis 5 min bei Raumtemperatur wurde das Eluat ins Reaktionsgefäß zentrifugiert (9.000 g, 1 min) und der Vorgang wiederholt. Für die jeweils 100 µl RNA-Isolat aus einem mMSC-Pellet wurden anschließend der RNA-Gehalt unter Anwendung des Qubit RNA HS Assay Kit nach Herstellerangabe am Qubit ermittelt. Je 1 bis 2 µl der erhaltenen RNA-Lösung wurden dazu 1:50 mit RNase-freiem Wasser verdünnt, davon jeweils 5 µl mit 195 µl *Qubit working solution* durch vortexen vermischt und kurz anzentrifugiert. Nach 5 min Inkubationszeit wurde die RNA-Konzentration in den Isolaten fluorometrisch bestimmt.

Die isolierten EV-RNAs mussten auf Grund der geringen Konzentrationen vor der Gehaltsbestimmung zuerst noch aufkonzentriert werden (Kapitel 2.2.23).

2.2.23. RNA-Aufkonzentration

Auf Grund der geringen RNA-Ausbeute aus mMSC-EVs wurden die isolierten RNAs anschließend mittels GeneJET RNA Cleanup and Concentration Micro Kit nach Herstellerangaben aufkonzentriert. Auch dieses erfolgte unter der ausschließlich für RNA-Arbeiten genutzten Heraeus HERAsafe Sicherheitswerkbank mit dekontaminierten Oberflächen und nuklease- und nukleotidfreien Materialien sowie Chemikalien. Alle Zentrifugationsschritte fanden bei Raumtemperatur in einer Eppendorf Tischzentrifuge (5424) statt.

Da die Proben bereits bei der Isolation (Kapitel 2.2.22) in je 200 µl RNase-freiem Wasser eluiert worden waren, konnten sie für die Aufkonzentrierung gleich mit jeweils 100 µl *Binding Buffer* gemischt werden. Anschließend wurden je 300 µl absoluter EtOH mit der Lösung vermengt und dann die gesamte Mischung vollständig auf ein im Kit enthaltene Säule gegeben werden. Mittels Zentrifugation (14.000 g, 1 min) wurde die Lösung durch die Säule gedrückt, wobei die RNAs bei diesem Schritt an der Säule gebunden wurden. Der Durchfluss wurde anschließend verworfen, bevor die Säule erst mit 700 µl *Wash Buffer 1* und dann zweimal nacheinander mit je 700 µl *Wash Buffer 2* durch Zentrifugation (14.000 g, 1 min) gewaschen wurde. Nach jedem Waschschrift wurde der Durchfluss verworfen. Zum Schluss wurde die Säule trocken zentrifugiert (14.000 g, 1 min), auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäße (DNA LoBind) gesteckt und die RNAs mit je 10 µl (Nachweis der Runterregulation) oder 15 µl (Proben fürs Sequenzieren) RNase-freiem Wasser eluiert, indem eine Inkubation von ca. 3 min bei Raumtemperatur stattfand. Anschließend wurde für 1 min bei 14.000 g zentrifugiert und der Elutionsschritt danach – ohne Wechsel des Reaktionsgefäßes – wiederholt. Für die je 30 µl RNA-Isolate (NGS) wurde anschließend der RNA-Gehalt unter Anwendung des Qubit RNA HS Assay Kit nach Herstellerangabe am Qubit 2.0 ermittelt. Je 1 µl der aufkonzentrierten EV-RNA für NGS wurde 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt, davon jeweils 5 µl mit 195 µl Qubit *working solution* durch Vortexen vermischt und kurz anzentrifugiert. Nach 5 min Inkubationszeit wurde die RNA-Konzentration in den Isolaten fluorometrisch bestimmt. Der RNA-Gehalt der EV-Proben, in denen die Runterregulation der drei Zielgene nachgewiesen werden sollte, war auch nach Aufkonzentration noch so gering, dass eine Konzentrationsbestimmung mittels Qubit nicht möglich war. In diesem Fall wurden daher von diesen Proben je 1 µl spektralphotometrisch am NanoDrop vermessen und so die RNA-Konzentration in den Isolaten ermittelt.

2.2.24. Sequenzierung der nächsten Generation von RNAs aus mMSCs und mMSC-EVs

Für die Ermittlung der RNA-Zusammensetzung in mMSC-EVs wurden isolierte und aufkonzentrierte RNAs aus drei verschiedenen mMSC-EV-Präparaten einer Sequenzierung der nächsten Generation (engl.: *Next-Generation Sequencing* - NGS) unterzogen. Zusätzlich sollten neben der RNA-Zusammensetzung solche RNAs identifizieren werden, die im Vergleich der RNA-Menge zwischen den parental mMSCs und den mMSC-EVs, in den mMSC-EVs angereichert oder reduziert vorlagen. Für den Vergleich wurden daher parallel zu den EV-RNAs ebenfalls RNAs aus den parental mMSCs analysiert. Die NGS aller Proben wurde am Heinrich-Pette-Institut in Auftrag gegeben und durchgeführt. Pro RNA-Isolat wurden je 3 µl der Lösung in ein separates 1,5 ml Reaktionsgefäß (DNA LoBind) überführt. Der jeweils gesamte Rest der jeweiligen RNA-Isolation (pro mMSC-RNA-Isolat ca. 90 µl und pro EV-RNA-Isolat ca. 20 µl) enthielt anschließend noch mindestens 1 µg RNA. Beide Proben eines jeden Isolats wurden dann zur Analyse eingesetzt.

Die jeweils extra abgenommenen 3 µl dienten der Qualitätskontrolle, um das Vorliegen einer ausreichenden RNA-Integrität für eine erfolgreiche Sequenzierung zu gewährleisten. Durchgeführt wurde diese via 2100 Agilent Bioanalyzer High Sensitivity DNA. Da eine ausreichende RNA-Integrität bei allen Proben vorlag, wurde eine RNA Library mittels NEBNext Ultra RNA-Seq Kit erstellt und anschließend eine HiSeq 2500-High output Plattform für NGS mit jeweils 50 Zyklen genutzt.

Die gewonnenen Daten wurden zusätzlich vom Auftragnehmer dahingehend bioinformatisch aufgearbeitet, dass die übermittelten Daten, nur die EV-RNA-Sequenzen enthielten, welche im Vergleich zu den dazugehörigen mMSC-Präparaten in allen drei EV-Präparaten signifikant hoch- oder runterreguliert vorlagen. Ein signifikanter Unterschied war ab einem Logarithmus zur Basis 2 (\log_2) des Expressionsverhältnisses von 2 (angereichert) bzw. 0,5 (reduziert) gegeben. Dies entsprach einem Wert von 1 bzw. -1. Dieser Unterschied wurde neben dem jeweiligen zugehörigen Gennamen (wenn Zuordnung möglich) und soweit verfügbar einer kurzen Beschreibung des Gens übermittelt.

2.2.25. Komplementäre DNA Synthese

Für die Synthese von komplementärer DNA (engl.: *complementary DNA* – cDNA) anhand isolierter EV- und mMSC-RNA wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit nach Herstellerangaben verwendet. Alle Reagenzien und die RNA-Isolate wurden auf Eis aufgetaut, vor der Verwendung gut durchmischt und anschließend kurz an zentrifugiert.

Alle Arbeiten mit reinen RNA-Isolaten erfolgten auf Eis unter der ausschließlichen für RNA-Arbeiten genutzten Heraeus HERAsafe Sicherheitswerkbank mit dekontaminierten Oberflächen und nuklease- und nukleotidfreien Materialien, sowie Chemikalien.

Von den mMSC-RNAs wurden jeweils 1 µg RNA und von EV-RNAs je nach vorhandener Konzentration 80 bis 100 ng RNA in cDNA umgeschrieben. Das benötigte Volumen des jeweiligen RNA-Isolates wurde in ein Gefäß einer Reaktionsgefäßkette (0,2 ml) überführt, mit Nuclease-freiem Wasser auf 11 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und jeweils 1 µl des Random Hexamer Primer [100 µM] zugegeben. Der homogene Ansatz wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert, anschließend auf Eis abgekühlt bevor er gründlich mit 9 µl Mastermix vermengt wurde. Der verwendete Mastermix (Angabe für eine Probe) setzte sich zusammen aus 4 µl 5x Reaktionspuffer, 20 U RiboLOCK Rnase Inhibitor, 2 µl dNTP Mix [10 mM] und 200 U RevertAid Reverse Transkriptase. Für die reverse Transkription der RNAs wurde der jeweilige Ansatz für 5 min bei 25 °C und anschließend 60 min bei 42 °C in einem Thermocycler inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion bei 70 °C für 5 min abgestoppt.

Parallel wurden zusätzlich zu den Proben verschiedene Kontrollen mitgeführt, die bis auf die im Folgenden beschriebenen Veränderungen wie die eben beschriebenen cDNA-Synthese Ansätze behandelt und angesetzt wurden.

Zur Überprüfung eines erfolgreichen DNase Verdaus wurde eine DNA Kontaminations-Kontrolle (ohne Reverse Transkriptase; -RT) angesetzt. Dazu wurde jeweils ein weiteres Mikrogramm eines jeden mMSC-RNA-Isolates verwendet (bei den EV-Isolaten reichte die vorliegende RNA-Menge für eine solche Kontrolle nicht aus). Und anstatt dem Einsatz von der RevertAid Reverse Transkriptase wurde das Volumen einfach durch Nuklease-freies Wasser ersetzt. Dementsprechend wäre jedes Signal was bei dem Einsatz dieser Kontrolle in einer (q)PCR detektiert worden wäre, auf eine vorliegende DNA-Kontamination zurückzuführen. Als Negativkontrollprobe wurde Nuklease-freies Wasser anstelle

von RNA in dem Ansatz eingesetzt, so dass detektierbare Signale in einer nach der Umschreibung durchgeführten (q)PCR auf Kontaminationen in den Reagenzien hingewiesen hätten. Als Positivkontrolle dienten 100 ng der im Kit enthaltenden Gapdh RNA. Durch die parallele Umschreibung dieser konnte im Anschluss an die Reverse Transkription mittels PCR der Erfolg der cDNA-Synthese getestet werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde davon ausgegangen, dass eine vollständige Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte.

2.2.26. Polymerase Kettenreaktionen

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Polymerasen Kettenreaktionen (engl.: *polymerase chain reaction* - PCR) wurden unter einer zuvor mittels UV-Licht dekontaminierten und mit RNase Away behandelten PCR Werkbank angesetzt. Außerdem wurden ausschließlich Nuklease-freie Materialien und Reagenzien verwendet. Die benötigten Reagenzien und Verdünnungen wurden, wenn nicht benötigt, auf Eis gelagert.

2.2.26.1. Kontroll-PCR

Eine Kontroll-PCR wurde in dieser Arbeit lediglich nach der cDNA-Synthese auf alle mitgeführten Kontrollen (positiv, negativ und -RT) und alle umgeschriebenen mMSC-RNAs angewendet (siehe Kapitel 2.2.25). Amplifiziert wurde unter Verwendung der im RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit enthaltenen Primer die vorliegende Gapdh cDNA. Dies diente der Kontrolle einer erfolgreichen cDNA-Synthese und der RNA-Qualität. So konnte z.B. ermittelt werden, ob ein vollständiger DNase Verdau stattgefunden hatte und ob die verwendeten Reagenzien frei von Kontaminanten waren.

Für die PCR wurde von allen zu testenden Proben eine 1:500 Verdünnung mit Nuklease-freiem Wasser hergestellt. Dadurch betrug die cDNA-Konzentration für die mMSC-cDNA-Proben sowie deren -RT Ansätze 0,1 ng/µl, während die Positivkontrolle nach Verdünnung eine Konzentration von 10 pg/µl Gapdh cDNA aufwies. Ausgehend von den hergestellten Verdünnungen wurde ein PCR Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl 1x PCR Puffer mit 0,2 mM dNTP Mix, jeweils 0,25 µM Gapdh Primer vorwärts und rückwärts sowie 1,25 Unit Tag DNA Polymerase und 10 % verdünnter Probe in einem Gefäß einer Reaktionsgefäßkette (0,2 ml) hergestellt. Die PCR wurde in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Initiale Denaturierung für 3 min bei 95 °C, gefolgt von 35 Zyklen bestehend aus Denaturierung (30 sec, 95 °C), Primer-Hybridisierung (30 sec, 58 °C) und Amplifikation (45 sec, 72 °C). Final erfolgte eine Amplifikation von 10 min bei 72 °C. Anschließend wurden die Proben bis zur Entnahme auf 4 °C gekühlt.

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente erfolgte in 1,5 % igen (m/v) Agarosegelen. Pro Tasche wurden 20 µl des PCR Ansatzes (20 µl), welcher zuvor mit 4 µl 6x Ladepuffer versetzt wurde, aufgetragen. Als Marker für die spätere Analyse der aufgetrennten Fragmente wurden jeweils 10 µl des GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder mitgeführt. Die Elektrophorese wurde mit 120 Volt durchgeführt bis eine ausreichende Auftrennung vorlag. Anschließend wurden die aufgetrennten Proben und der Marker in einer Gel-Dokumentation unter UV-Transillumination sichtbar gemacht und mittels FireCam Kontrollsoftware auf einem Tischcomputer dokumentiert.

Alle Zwischenergebnisse aus den in dieser Arbeit durchgeführten Kontroll-PCRs sind im Anhang Kapitel 7.5 in Abb. S4 dargestellt. Alle mMSC-Proben zeigten eine erfolgreiche cDNA-Synthese sowie dass alle isolierten RNAs frei von DNA und die verwendeten Reagenzien frei von Kontaminanten waren.

2.2.26.2. Quantitative Echtzeit PCR

Für eine relative Quantifizierung der Runterregulation ausgewählter Gene (*Sod1*, *Gal1* und *Prdx1*) via lentiviral eingebrachter shRNA wurde auf die entsprechenden Proben eine quantitative Echtzeit PCR (qPCR) angewendet. Zusätzlich wurde diese Analysemethode zur Überprüfung auf eine vorliegende DNA-Kontamination in den isolierten EV-RNA-Proben angewendet. Auf Grund von zu wenig Gesamtmaterial und somit zu geringer RNA-Mengen, war es bei diesen Proben nicht möglich eine -RT Kontrolle bei der cDNA-Synthese mitzuführen und somit keine Kontroll-PCR durchführbar.

Die cDNAs der mMSCs wurden mit Nuklease-freiem Wasser auf 1 ng/µl, die der EVs und die entsprechende reine EV-RNA auf 0,2 ng/µl verdünnt. Es wurde davon ausgegangen, dass die jeweils bei der cDNA-Synthese eingesetzte RNA vollständig in cDNA umgeschrieben wurde, so dass die Konzentration von der eingesetzten RNA als gleich der entstandenen cDNA angenommen wurde. Die qPCR-Ansätze wurden mittels TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) Kit nach Herstellerangaben vorgenommen. Jeder Ansatz umfasste ein Gesamtvolumen von 20 µl, bestehend aus 1x TB Green Premix EX Taq II, jeweils 0,4 µM eines entsprechenden vorwärts und rückwärts Primers [10 µM] (siehe Kapitel 2.1.10) sowie jeweils 5 µl der verdünnten Proben in einer 96-Loch Lightcycler Platte. Die vorbereitete Platte wurde mit einer adhäsiven qPCR Folie verschlossen, für 15 bis 30 sec an zentrifugiert (Universalzentrifuge), in einen LightCycler 480 II platziert und die qPCR mit dem in Tab. 39 aufgelisteten Programm im Detektionsformat SYBR Green I (Anregungsfilter: 465 nm Emissionsfilter: 510 nm) durchgeführt.

Tab. 39: Verwendetes Messprogramm für quantitative Echtzeit PCRs im LightCycler 480 II bei Verwendung des TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) Kits.

Programmschritte	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Temperaturanstieg pro Sekunde [°C/s]	Aufnahmemodus	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	30	4,4		1
Amplifikation mit Analysemodus: Quantifizierung	95	5	4,4	Einfach	40
	60	30	2,2		
Schmelzkurve mit Analysemodus: Schmelzkurven	95	5	4,4	Kontinuierlich, Aufnahme: 5 pro °C	1
	60	60	2,2		
	95		0,11		
Kühlung	40	30	2,2		1

Nach Beendigung des qPCR-Programms wurde der *crossing point* (Cp) aller Proben mittels Abs Quant/2nd Derivative Max Methode berechnet. Dabei entspricht der Cp dem Punkt an dem die Fluoreszenz der Probe aus dem Hintergrund, welcher automatisch durch den arithmetischen Mittelwert der detektieren Fluoreszenz in den Zyklen 2 bis 6 berechnet wird, scharf ansteigt (Roche 2007). Als Berechnungsalgorithmus wurde der Modus *high Confidence* gewählt. Zusätzlich wurde für jeden Messansatz die Schmelztemperatur (Tm) mittels *Tm Calling* Methode mit der Einstellung *Sybr Green I format* und *Max Peaks* zwei oder weniger ermittelt. Da Sybr Green bzw. TB Green nur mit doppelsträngiger DNA interkaliert nimmt die Fluoreszenz beim Aufschmelzen der Stränge drastisch ab.

Der Schmelzpunkt ist definiert als die Temperatur, an dem die Hälfte der vorliegenden doppelsträngigen DNA in der Probe zu einzelsträngiger DNA aufgeschmolzen wurde (Roche 2007).

2.2.26.2.1. Auswertung der quantitativen Echtzeit PCR

Wie zuvor beschrieben wurden qPCRs angewendet, um den Nachweis einer erfolgreichen transkriptionalen Runterregulation der Zielgene (*Gal1*, *Sod1* und *Prdx1*) in den entsprechenden mit shRNAs transduzierten mMSCs und den von diesen Zellen sezernierten EVs zu erbringen. Detektiert wurde in jeweils Triplikaten die Expressionsstärke des Referenzgens *S27a* sowie die Expressionsstärken von *Gal1*, *Sod1* und *Prdx1* in 5 ng eingesetzter mMSC-cDNA oder in 1 ng eingesetzter mMSC-EV-cDNA. Die erhaltenen Cp-Werte aus den qPCRs (siehe Kapitel 2.2.26.2) wurden in Excel importiert und die Mittelwerte der technischen Replikate für weitere Berechnungen verwendet.

Durch die Werte der einzelnen Proben für das Referenzgen *S27a* wurde die relative Expression der Zielgene *Sod1*, *Gal1* und *Prdx1* mittels $\Delta\Delta C_p$ Methode quantifiziert. Bei dieser Methode wurden zuerst die ΔC_p Werte für Behandlung und Kontrolle mit folgender Formel 6 ermittelt (Pfaffl 2004):

$$\Delta C_{p_{\text{Behandlung oder Kontrolle}}} = \text{Mittelwerte } C_{p_{\text{Zielgen}}} - \text{Mittelwerte } C_{p_{\text{Referenzgen}}} \quad (\text{Formel 6})$$

Behandlung: alle cDNA-Proben von mit shRNA transduzierten mMSCs und deren EVs

Kontrolle: cDNA-Proben aus unbehandelten mMSCs und deren EVs

Referenzgen: *S27a*

Zielgene: *Gal1*, *Sod1* und *Prdx1*

Anschließend wurde der $\Delta\Delta C_p$ durch Formel 7 berechnet (Pfaffl 2004):

$$\Delta\Delta C_p = \Delta C_{p_{\text{Behandlung}}} - \Delta C_{p_{\text{Kontrolle}}} \quad (\text{Formel 7})$$

Unter Einbeziehen der PCR Effizienz (E) kann der relative Expressionsunterschied wie folgt berechnet werden (Pfaffl 2004):

$$\text{relativer Expressionsunterschied} = E^{-\Delta\Delta C_p} \quad (\text{Formel 8})$$

Da die Bestimmung der Effizienz für die in dieser Arbeit verwendeten Primer für alle ungefähr bei zwei lag, wurde für alle Berechnungen dementsprechend eine Effizienz von 2 verwendet.

2.2.26.2.2. Überprüfung auf DNA-Kontamination in isolierten EV-RNAs

Zum Ausschluss von Kontaminationen in den RNA-Isolaten aus EVs von mit shRNAs transduzierten und hoch positiven mMSCs sowie deren Kontrollen (unbehandelte mMSCs) wurde ebenso eine qPCR angewendet. Dazu wurde jeweils 1 μg reine RNA einer jeden EV-Probe in eine qPCR (siehe 2.2.26.2) eingesetzt und die Anwesenheit von *S27a*, *Gal1*, *Sod1* und *Prdx1* mit den entsprechenden Primerpaaren in jeweils Duplikat-Bestimmung untersucht. Die Ansätze zeigten, wenn überhaupt, sehr späte Cp Werte zwischen 32 und 35, wodurch auch für alle mMSC-EV-Isolate von einem Vorliegen eines DNA-freien RNA-Präparates ausgegangen werden konnte.

2.2.27. Proteinisolation

Für die Isolation von Proteinen aus mMSCs und den dazugehörigen mMSC-EVs wurde vorab der entsprechende gebrauchsfertige RIPA-Puffer für Zellpellets oder EV-Präparate auf Eis gemäß Tab. 21 (Kapitel 2.1.11) angesetzt. Pro gefrorenem mMSC-Pellet (1×10^6 Zellen) wurden 300 μ l des fertigen RIPA-Puffers für Zellpellets und zu jeweils 100 μ l gefrorenen EV-Präparat 200 μ l des entsprechenden fertigen RIPA-Puffers gegeben. Um das Pellet oder das EV-Präparat homogen in dem RIPA-Puffer zu verteilen, wurde die Probe gevortext und folgend für 30 min auf Eis mit periodischem kurzem Vortexen alle 5 min lysiert. Zur Gewährleistung einer effizienten Lyse und zusätzlichen DNA-Scherung wurden alle Proben nach der Inkubationszeit jeweils 40 sec sonifiziert (Einstellungen: Output Kontrolle 8 = 30 %; Auftragszyklus 80 %). Nach einer Ruhezeit von 10 min auf Eis wurden Zellschrott und unlöslichen Bestandteilen mittels Zentrifugation (Tischzentrifuge 5417R: 11.000 g, 4 °C, 5 min) pelletiert und so aus den Lysaten entfernt. Der gereinigte proteinhaltige Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Proteinmessung bei -20 °C gelagert.

2.2.28. Proteinmessung mittels DC Protein Assay

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Isolaten aus mMSC-EVs oder mMSCs (Kapitel 2.2.27) wurde nach Herstellerangaben mittels DC Protein Assay durchgeführt.

Vor Beginn wurde das benötigte Volumen der Arbeitslösung A´ aus Reagenz A und Reagenz S in einem Verhältnis von 50:1 frisch angesetzt. Ebenfalls jedes Mal frisch hergestellt wurde eine Standardreihe bestehend aus 8 unterschiedlichen Verdünnungen von 0 bis 1,5 mg/ml BSA. Ausgehend von einer 7,5 %-igen BSA Lösung (75 mg/ml) wurden folgende Verdünnungen (fortgesetztes Verdünnen von der höchsten zur niedrigsten Konzentration) angesetzt: 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,7 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,025 mg/ml und 0 mg/ml BSA. Zum Verdünnen wurde der jeweils zur Aufreinigung der Proteine verwendete fertige RIPA-Puffer verwendet, wobei der RIPA-Puffer der EV-Protein-Isolation zuvor 1:3 mit α MEM/HEPES [25 mM] verdünnt wurde.

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurden Proteinisolate aus mMSCs sowohl 1:5 als auch 1:2 mit fertigen RIPA-Puffer für Zellpellets verdünnt. Hingegen wurden Proteinisolate von mMSC-EVs nur 1:2 mit ihrem entsprechenden fertigen RIPA-Puffer verdünnt und zusätzlich unverdünnt vermessen. Von jeder Probe (verdünnt oder unverdünnt) sowie von jeder Konzentration der Standardreihe wurden für eine Triplikat-Bestimmung jeweils dreimal 5 μ l in eine 96-Loch ELISA Microplatte vorgelegt. Mit einer Multipipette wurden danach jedem Loch erst 25 μ l der Arbeitslösung A´, gefolgt von 200 μ l Reagenz B zugegeben. Die fertige Platte wurde in dem Mikroplattenlesegerät platziert, dort automatisch für 5 sec geschüttelt, 15 min unter Lichtausschluss inkubiert, anschließend die Absorption jedes Loches bei 750 nm gemessen und die Messergebnisse als Excel Datei ausgegeben.

2.2.29. Berechnung der Proteinkonzentration

Die Hintergrund-Absorption des DC Protein Assays wurde von den gemittelten Absorptionmesswerten (Triplikate) aller Proben durch die Subtraktion des Mittelwerts der 0 mg/ml BSA Probe (Standardreihe ebenfalls in Triplikaten) eliminiert. Um anschließend die Proteinkonzentration aus den gemittelten Absorptionswerten berechnen zu können, wurden die erhaltenen und ebenfalls gemittelten Absorptionen der Standardreihe gegen ihre jeweilige BSA Konzentration (1,5 mg/ml - 1 mg/ml -

0,7 mg/ml - 0,5 mg/ml - 0,25 mg/ml - 0,125 mg/ml - 0,025 mg/ml und 0 mg/ml) aufgetragen, die Steigungsformel ermittelt (Adsorptionswert = Steigung * Proteinkonzentration) und anhand dieser die Proteinkonzentration der jeweiligen Proben berechnet.

2.2.30. Probenvorbereitung für Western Blot Analyse

Alle Proteinisolate wurden mit dem RIPA-Basis-Puffer (siehe 2.1.11, Tab. 20) verdünnt. Zusätzlich wurden die Proben mit (nicht) reduzierendem 4x Laemmli-Puffer versetzt, so dass dieser anschließend 1x konzentriert vorlag. Murine MSC-Proteinlysate wurden auf 0,5 µg/µl Protein eingestellt und mMSC-EV-Proteinisolate wurden so vorbereitet, dass sie entweder ebenfalls eine Konzentration von 0,5 µg/µl enthielten oder 5 µg in 30 µl vorlagen.

Die verdünnten Proteinproben in 1x Laemmli-Puffer wurden gründlich gevortext, 1 min bei 20.800 g und 4 °C (Tischzentrifuge 5417R) zentrifugiert und anschließend bei 95 °C für 5 min in einem Thermomixer denaturiert. Es folgte eine Abkühlung der Proben bei 4 °C mit anschließend erneut Zentrifugation (Tischzentrifuge 5417R: 20.800 g, 4 °C, 2 min).

2.2.30.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Es wurden ausschließlich selbsthergestellte 12 %-ige Polyacrylamidgele (siehe Tab. 22, Kapitel 2.1.13.1) zur Auftrennung von isolierten Proteinen verwendet. Pro Tasche wurde eine vorbereitete Proteinprobe (auf bestimmte Konzentration eingestellt, (nicht) reduziert und denaturiert) in 1x Laemmli-Puffer geladen. Pro Gel wurde als Marker 10 µl PageRuler Plus Prestained Protein Ladder in mindestens einer Tasche mitgeführt. Die Proteine durchliefen für 15 min bei 120 V das Sammelgel zur Aufkonzentration und wurden dann anhand ihrer molekularen Größe für 70 min bei 100 V im Trenngel in einem vertikalen Gel Elektrophorese System mit 1x Elektrophoresepuffer für Proteine separiert. Im Anschluss wurde umgehend ein Western Blot angeschlossen.

2.2.30.2. Western Blot

Der elektrophoretische Transfer von den in Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteinen (siehe Kapitel 2.2.30.1) auf eine Membran wurde in dieser Arbeit mittels Nassblotverfahren durchgeführt. Als Membran wurden 9 cm x 6,5 cm PVDF Membranen (Porengröße 0,45 µm) verwendet. Direkt vor Gebrauch wurden diese für 20 sec in reinem Methanol aktiviert, dann 2 min in Reinstwasser gewaschen und anschließend für mindestens 5 min in 4 °C kalten Transferpuffer überführt. Vor dem Zusammensetzen des Blottingsystems wurden neben der Membran auch das benötigte Chromatographiepapier (9,5 cm x 6,5 cm) und die Schwämme in 4 °C kalten Transferpuffer gelagert bis sie vollständig durchtränkt waren. Der Blot-Aufbau bestand aus einem Schwamm mit drei übereinandergelegten Chromatographiepapieren, auf die das Gel gelegt wurde. Auf diesem wurde die Membran blasenfrei mit drei weiteren Chromatographiepapieren aufliegend angepresst. Das Ganze wurde mit einem weiteren Schwamm belegt und der Sandwichaufbau mit einer Plastiklochplatte umschlossen. Der Transfer fand in 1x Towbin-Puffer in einem Western Blotting Transfer System auf Eis für 1 h bei 100 V statt. Im Anschluss wurden alle freien Proteinbindungsstellen auf der Membran mittels 30 bis 50 ml 1x Roti-Block in 1x TBS-T (0,1 %) in einer Plastikschaale für mindestens 1 h auf einem Plattenschüttler gesättigt.

2.2.30.3. Immundetektion

In dieser Arbeit wurde nicht nur der Nachweis von bestimmten Proteinen erbracht (z.B. bei der EV-Charakterisierung), sondern auch teilweise wie bei dem Nachweis einer erfolgreichen Runterregulation der Zielgene (SOD1, GAL1 und PRDX1) auf Proteinebene eine semiquantitative Analyse durchgeführt. Diese wurde benötigt, um die relativen Proteinmengen nicht nur zwischen den Proben eines Blots, sondern auch mit denen von anderen Blots vergleichbar zu machen und biologische Unterschiede zu erkennen. Dafür wurde ein paralleler Nachweis mehrerer Proteine pro Probe angewendet, indem der Blot nach Blockierung der freier Bindungsstellen der Länge nach in mindestens zwei Abschnitte geschnitten wurde, sodass auf Grund der Größenunterschiede neben mindestens einem Zielprotein immer auch parallel ein Referenzprotein detektiert werden konnte. Für den Nachweis aller drei Zielproteine wurden auf Grund des geringen Größenunterschiedes von SOD1 (16 kDa) und GAL1 (15 kDa) für jede Analyse immer zwei Gele benötigt. Ein paralleler Nachweis durch Zerschneiden des Blots für diese beiden Proteine war auf Grund der nahezu identischen Laufhöhe nicht möglich. Die gesamte Membran oder die jeweiligen Abschnitte wurden über Nacht in einem 50 ml Reaktionsgefäß mit 5 ml 1x Roti-Block/1x TBS-T (0,1 %)/NaN₃ (0,1 %), indem der jeweilige 1. Antikörper in seiner benötigten Verdünnung (siehe Tab. 40) vorlag, bei 4 °C auf einem Rollschüttler inkubiert.

Tab. 40: Auflistung der in dieser Arbeit für Western Blot verwendeten Primärantikörper (1. AK) Verdünnungen und die dazugehörigen Sekundärantikörper (2. AK). Die für die Immundetektion verwendeten Verdünnungen der 1. AK wurden in 1x Roti-Block in 1x TBS-T (0,1 %) und 0,1 % NaN₃ angesetzt. Alle 2. AK waren mit HRP konjugiert und wurden in 1x Roti-Block in 1x TBS-T (0,1 %) in der aufgeführten Verdünnung angewendet.

1. AK			2. AK	
Gegen	Verdünnung	Einsatz	Gegen	Verdünnung
SOD1	1:500	Zielprotein	Ziege	1:5.000
GAL1	1:500	Zielprotein	Ziege	1:5.000
PRDX1	1:500	Zielprotein	Ziege	1:5.000
HSP 70	1:500/1:1.000	Charakterisierung von EVs	Maus	1:5.000
GAPDH	1:2.500	Referenzprotein	Kaninchen	1:5.000
FLOTELLIN	1:500/1:1.000	Referenzprotein/ Charakterisierung von EVs	Maus	1:5.000
TSG 101	1:100/1:500	Charakterisierung von EVs	Maus	1:5.000
CD9	1:100	Charakterisierung von EVs	Ratte	1:2.000/1:2.500

Nach mindesten 16 h Inkubation im 1. AK wurden die Membranabschnitte je nach Größe in eine viergeteilte Platte oder eine Schale überführt und viermal je 15 min mit 1x TBS-T (0,1 %) auf einem Plattenschüttler gewaschen. Die 1. AK-Lösung wurde bei 4 °C für weitere Anwendungen gelagert. Nach dem Waschen wurden die Membranabschnitte mit dem entsprechenden 2. Antikörper, der ebenfalls in 1x Roti-Block/1x TBS-T (0,1 %) verdünnt war (siehe Tab. 40), bedeckt und für 2 h auf einem Plattenschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Die 2. AK Lösungen wurden anschließend verworfen und die Blotabschnitte/Membran erneut viermal á 15 min mit 1x TBS-T (0,1 %) gewaschen.

Anschließend wurden die Membranabschnitte zwischen eine aufgeklappte Sichthülle in einer Röntgenkassette wieder zu einem Blot zusammengelegt. Dieser wurde dann mit 2 ml Super Signal West Pico Arbeitslösung (besteht aus: 1 ml Luminol/Enhancer Solution + 1 ml stabiler Peroxidlösung) bedeckt und 5 min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Die Sichthülle wurde zugeklappt und die restliche Lösung ausgestrichen bevor in der Dunkelkammer mittels Röntgenfilmen die Proteinbanden detektiert wurden. Die Filme wurden mit einem Curix 60 entwickelt.

2.2.30.4. Semiquantitative Auswertung der Western Blots

Für den Nachweis der jeweiligen Runterregulation der Zielgene auf Proteinebene war eine rein optische Unterscheidung nicht ausreichend. Daher wurde zusätzlich die Intensität der detektierten Proteinbanden ausgewertet. Röntgenfilme mit zur Auswertung geeigneten Proteinbanden (nicht abgesättigt und nicht mit Nachbarbande verschmolzen) wurden eingescannt und anschließend die quadratmillimeterbezogene Intensitätsdichte aller Banden sowie der des umgebenden Hintergrundes mittels der Analysesoftware Quantity One (Basic) ermittelt. Durchgeführt wurden dies, indem entsprechende Proteinbanden und der umgebende Hintergrund mit dem *Volume Rectangle Tool* markiert und - soweit möglich - für die Auswertung eines Blots immer dieselbe Größe des Tools beibehalten wurde. Die ermittelten Daten wurden anschließend für die weitere Auswertung in Excel übertragen. Für jeden Blot wurde die gemittelte Intensitätsdichte pro mm² des Hintergrundes von den Intensitätsdichten pro mm² der Proteinbanden subtrahiert. Mit diesen um den Hintergrund korrigierten Werten wurde das Intensitätsverhältnis von Zielprotein (SOD1, GAL1 und PRDX1) zu entsprechendem Referenzprotein (GAPDH oder FLOTELLIN) berechnet, welches anschließend der besseren Vergleichbarkeit wegen auf die Kontrollen (unbehandelte mMSCs und deren EVs) normalisiert wurde.

2.2.31. Nanopartikel Verfolgungsanalyse via NanoSight

Isolierte EVs liegen in einer wässrigen Lösung als suspendierte Teilchen vor, in denen sie ungerichtete Zick-Zack-Bewegungen ausführen, welche durch Zusammenstöße von den EVs mit Molekülen des umgebenden flüssigen Mediums verursacht werden. Diese zufällige Bewegung von Teilchen wird Brown'sche Molekularbewegung genannt und ist von der Viskosität und Temperatur der vorliegenden Lösung sowie von dem Radius der Partikel, abhängig. So verringert sich die Brown'sche Molekularbewegung z.B. mit zunehmender Teilchengröße und sinkender Temperatur. Nanopartikel Verfolgungsanalysen (engl.: *nanoparticle tracking analysis* - NTA) nutzen die Brown'sche Molekularbewegung, um die Konzentration und Größenverteilung in Lösung vorliegender Teilchen zu ermitteln. Um einzelne sich bewegende Teilchen sichtbar zu machen, werden diese mit einer geeigneten Lichtquelle (wie z.B. einem Laser) angestrahlt. Getroffene Teilchen streuen das Licht wodurch sie detektierbar werden. Mit dieser Methode lässt sich simultan die Brown'sche Molekularbewegung verschiedener Teilchen aufzeichnen. Anschließend wird von einer Software unter Zuhilfenahme der Stokes-Einstein-Gleichung anhand der Geschwindigkeit eines jeden Teilchens dessen individuelle Größe bestimmt. Neben einer genauen Größenverteilung der suspendierten Teilchen kann auf Grund der klar definierten Probenmesskammer zusätzlich die Konzentration der vermessenen Partikel ermittelt werden (Giebel and Helmbrecht 2015).

In dieser Arbeit wurde mittels eines NanoSight Gerätes eine NTA durchgeführt. Für die Messung wurde in der NanoSight NTA Software das *Screen Gain* auf 1 und das Kamera Level auf 16 gesetzt. Je 2 µl eines EV-Präparates wurde mit filtriertem (0,1 µm Filter) 1x DPBS 1:500 verdünnt und nach vollständiger Durchmischung mit einer 1 ml Spritze aufgezogen. Anschließend wurden ca. 300 µl der Suspension in das Gerät injiziert und der Messbereich so eingestellt, dass möglichst viele sich bewegenden EVs im Fokus lagen. Insgesamt wurde jede Probe 10-mal á 10 sec bei 23,5 °C vermessen, wobei nach jeder Messung frische Suspension injiziert wurde, so dass jedes Mal die Bewegung von

neuen Teilchen in dem gewählten Teilausschnitt detektiert wurde. Zur Prozessierung der gemessenen Daten wurde das *Screen Gain* auf 10 eingestellt und ein Detektionslimit von 6 gewählt sowie durch die Verdünnung mit 1x DPBS eine Viskosität von Wasser angenommen. Die prozessierten Daten enthielten die für eine EV-Charakterisierung benötigten Informationen über die Partikelgrößenverteilung [nm] aller detektierten Partikel mit Standardfehler und die in der Messlösung vorliegende Konzentration [Partikel/ml] mit Standardfehler. Zwischen den einzelnen Messungen wurde die Messzelle mit filtriertem (0,1 µm Filter) 1x DPBS gespült (3 - 4 ml) und nach Beendigung zusätzlich mit 1 ml Hellmanex III Lösung (2 % mit Reinstwasser verdünnt) gründlich gereinigt, mit Reinstwasser klargespült und mittels einer luftgefüllten Spritze getrocknet.

2.2.32. Statistische Auswertungen

Alle statistischen Analysen in dieser Arbeit wurden mit GraphPad Prism (Version 5 oder 9) durchgeführt.

Auswertung der ImageStream Analyse zur Ermittlung der Zielzellen von mMSCs-EVs:

Die Daten wurden als erstes auf Normalverteilung mittels D'Agostino & Pearson Test getestet. Nachdem für alle Gruppen eine Normalverteilung bestätigt worden war, wurde ein *Ordinary one-way* ANOVA mit multiplen Vergleichen (*Šídák's multiple comparisons* Test) der Mittelwerte von vorausgewählten Paaren der Gruppen durchgeführt. Dieser zeigte keine Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Messgruppen. Da jedoch der Brown-Forsythe Test (Varianzhomogenität) signifikant unterschiedliche Standardabweichungen (SD) mit $P < 0,0001$ (****) zeigte, wurde zur Bestätigung nachfolgend noch ein Brown-Forsythe und Welch ANOVA Test mit Dunnett's T3 *multiple comparisons* Test (Mittelwerte von vorausgewählten Paaren aus Spalten) angewendet. Auch dieser zeigte keine Signifikanz zwischen den verglichenen Messgruppen.

Auswertung der qPCR Analyse zum Nachweis einer erfolgreichen transkriptionalen Runterregulation:

Die Testung auf Normalverteilung wurde für die Auswertung der transkriptionalen Runterregulation in mMSCs mit dem Kolmogorov-Smirnov Test durchgeführt. Für einen D'Agostino & Pearson Test waren 5 Messergebnisse pro Behandlung nicht ausreichend. Alle Gruppen waren normal verteilt, so dass ein *Ordinary one-way* ANOVA mit Dunnett's *multiple comparisons* Test (Mittelwert einer jeden Gruppe wurde mit dem Mittelwert der Kontrollgruppe verglichen) durchgeführt wurde. Der mitgeführte Brown-Forsythe Test ergab keine signifikanten Unterschiede in den analysierten Messgruppen.

Für die Auswertung der mMSC-EV-Analysen standen pro EV-Ernte einer mMSC-Kultur (ohne Zytokine: je 3 Ernten pro Kultur; mit Zytokinen: je 2 Ernten pro Kultur) lediglich 4 Messwerte zur Verfügung, was keine statistische Auswertung zuließ. Da die Messdaten der jeweiligen Ernten einer mMSC-Kultur jedoch sehr ähnlich zueinander waren, wurden diese zusammengefasst, so dass für mMSC-EV-Proben von Kulturen ohne Zytokin-Zugabe 12 Messwerte und für mMSC-EV-Proben von Kulturen mit Zytokin-Zugabe 8 Messwerte pro Gruppe vorlagen. Anhand dieser Messwertmenge konnte für alle Gruppen eine Normalverteilung mittels D'Agostino & Pearson Test nachgewiesen werden. Demzufolge wurde die weitere Analyse mit einem *one-way* ANOVA mit Dunnett's *multiple comparisons* Test (Mittelwert einer jeden Gruppe wurde mit dem Mittelwert der Kontrollgruppe verglichen) durchgeführt.

3. Ergebnisse

Ionisierende Strahlung, die in einer hohen Dosis und kurzer Zeit den menschlichen Körper penetriert, wie z.B. bei Strahlenunfällen oder wie es auch bei der Radiotherapie der Fall sein kann, birgt viele starke Nebenwirkungen (z.B. schwere Myelosuppression) mit hohen Mortalitäts- und Morbiditätsraten. Die einzige Behandlungsmöglichkeit einer irreversiblen Myelosuppression ist bis heute die ebenfalls mit zum Teil tödlichen Nebenwirkungen einhergehende allogene Knochenmark- oder hämatopoetische Stammzelltransplantation (Leiper 1995; López and Martín 2011; Mohty and Mohty 2011). Demzufolge ist die Entwicklung einer neuen Behandlungsform, welche sicherer und mit weniger schweren Nebenwirkungen verbunden ist, wünschenswert. Auf Grund des derzeitigen Forschungsstandes haben sich für dieses Vorhaben MSC-EVs als geeignete Kandidaten qualifiziert. Mit murinen MSC-EVs konnten bereits sowohl *in vitro* als auch *in vivo* signifikant ausgeübte protektive Effekte – komplette Wiederherstellung der Hämatopoese, Langzeitüberleben – auf letal bestrahlte HSCs/HPCs detektiert werden (Lange *et al.* 2015; Wen *et al.* 2016; Schoefinius *et al.* 2017). Des Weiteren bieten sie gegenüber einer zellulären Behandlungsform mehr Sicherheit für den Patienten, da sie keine Replikationsmöglichkeit besitzen (Lener *et al.* 2015). Ziel dieser Arbeit war es dementsprechend den Mechanismus, wie mMSC-EVs letal bestrahlte HSCs/HPCs beim Überleben unterstützen, weiter zu untersuchen, um eines Tages alle beteiligten Komponenten genau benennen zu können und so die Möglichkeit zu haben, eine adäquate Therapie zu entwickeln. Der Fokus der Forschungsarbeit lag dabei in diesem Fall erst einmal auf der Beantwortung der Fragen welches die Zielzellen der mMSC-EVs *in vivo* sind, ob bestimmte vorausgewählte in EVs nachgewiesene Proteine Anteil an der detektierten Protektion besitzen und welche mRNAs durch die mMSC-EVs transportiert werden. Um die Zielzellen zu identifizieren wurden gefärbte mMSC-EVs *i.v.* in letal bestrahlte Empfängertiere transplantiert und nach bestimmten Zeitpunkten die verschiedenen Organe, insbesondere das KM, auf Anwesenheit der fluoreszierenden EVs untersucht. Da vor allem von einer direkten Protektion der HSCs ausgegangen wird, sollte zusätzlich im KM eine mögliche Kollokalisierung zwischen den transplantierten EVs und HSCs/HPCs detektiert werden. Mittels Proteomanalyse wurden bereits die in den mMSC-EVs enthaltenen Proteine identifiziert und auf Grund ihrer biologischen Funktion drei geeignete Kandidaten (SOD1, GAL1 und PRDX1), die eine Radioprotektion bewirken könnten, ausgewählt (Lange *et al.*, unveröffentlichte Daten). Diese galt es nun dahingehend zu testen, ob sie tatsächlich radioprotektiv wirken. Dazu wurden die entsprechenden Gene der Kandidaten in mMSCs via lentiviral integrierter shRNA runterreguliert und anschließend die von diesen Zellen isolierten EVs in dem gut etablierten *in vitro* Radioprotektionsassay getestet. Zusätzlich sollten mittels Transkriptomanalyse die in mMSC-EVs enthaltenen RNAs identifiziert und anschließend analog zu der Proteomanalyse anhand ihrer laut Literaturrecherche angenommenen biologischen Funktion kategorisiert werden.

3.1. Identifikation der Zielzellen von mMSC-EVs in letal bestrahlten Mäusen

3.1.1. Charakterisierung der für die EV-Produktion benötigten mMSCs

Zur Untersuchung der organspezifischen Lokalisation und Anreicherung von intravenös in letal bestrahlte Mäuse transplantierten von murinen mesenchymalen Stromazellen produzierten extrazellulären Vesikeln (mMSC-EVs) sowie zur Identifikation derer Zielzellen, wurden die dafür

benötigten mMSC-EVs mittels mMSCs *in vitro* Kultur generiert. Die zugrunde liegende mMSC-Linie wurde in der Arbeitsgruppe bereits vor einigen Jahren mit Lonza-FCS-haltigem MSC-Kultivierungsmedium etabliert. Typische mMSC-Charakteristika wie ihre Plastikadhärenz und spindelförmige Morphologie konnten in der Vergangenheit bei dieser *in vitro* Generierung festgestellt werden. Zusätzlich zu diesen Eigenschaften wurde die *in vitro* Differenzierbarkeit sowie die An- und Abwesenheit bestimmter Oberflächenmarker, zur weiteren Charakterisierung der mMSCs überprüft. Für beide Nachweise wurden kryokonservierte mMSCs der besagten Linie aufgetaut und in MSC-Kultivierungsmedium mit Lonza-FCS expandiert.

3.1.1.1. In vitro Differenzierbarkeit der mMSCs

Wie von der *International Society for Cellular Therapy (ISCT)* zur Charakterisierung von MSCs gefordert, wurde die *in vitro* Differenzierbarkeit der MSCs in Adipozyten, Osteo- und Chondroblasten untersucht (Dominici *et al.* 2006). Die Zellen wurden dafür in für diesen Zelltyp spezifischen MSC-Kultivierungsmedium (mit Lonza-FCS) expandiert, bevor sie in die jeweiligen Differenzierungsassays eingesetzt wurden.

Die in 24-Loch-Platten ausgesäten mMSCs waren bereits 24 h nach Aussaat – wie in den jeweiligen Differenzierungsprotokoll verlangt – ausreichend konfluent, um die Differenzierung in Adipozyten und Osteoblasten zu beginnen (Jaiswal *et al.*, 1997; modifiziert nach Pittenger, 1998). Parallel wurden für jede Differenzierungskultur Kontrollzellen in mMSC-Kulturmedium (mit Lonza-FCS) mitgeführt.

Die adipogene Differenzierung wurde nach 27 Tagen beendet, da nach mikroskopischer Begutachtung die Mehrheit der Zellen deutliche Fettvakuolen zeigte, welche charakteristisch für Adipozyten sind und zu einem früheren Zeitpunkt nicht festgestellt werden konnten. Zur Bestätigung der Bildung von Fetttropfen wurde eine modifizierte Ölrot-O-Färbung durchgeführt. Der in dieser Färbung verwendete lipophile Azofarbstoff reichert sich in Lipiden an und färbt sie orange-rot. Wie erwartet wurde er in den multivesikulären Zellveränderungen der differenzierten Zellen angereichert, wie die deutliche rote Färbung in Abb. 17 Bild B zeigt. In den parallel in mMSC-Kulturmedium mitgeführten Kontrollzellen lagen keine Fettansammlungen vor (siehe Abb. 17 Bild A).

Nach 20 Tagen Kultivierung in osteogene Differenzierungsmedium war bei den differenzierungsinduzierten mMSCs bereits bei optischer Betrachtung eine Plaquebildung im Zellrasen zu erkennen. Die Differenzierung wurde daher abgeschlossen und die behandelten Zellen sowie die mitgeführten Kontrollzellen einer van Kossa Färbung unterzogen. Nur mMSCs, die zu Osteoblasten differenziert sind, sezernieren Knochenmatrix, welche sich spezifisch mit der Färbung nachweisen lässt, indem das enthaltene Kalzium durch Silberionen ersetzt und diese durch UV-Licht zu kolloidalem schwarz gefärbten Silber reduziert werden. Die entsprechenden Kontrollzellen zeigten keine osteogene Differenzierung (Abb. 17 Bild C), wohingegen sezernierte Knochenmatrix von erfolgreich zu Osteoblasten differenzierten mMSCs (Abb. 17 Bild D) als schwarz angefärbte, plaqueartige Struktur im Zellrasen nachweisbar war.

Für die chondrogene Differenzierung wurden die mMSCs in Alginat eingebettet und sieben Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zell-Alginat-Kugeln zum Nachweis von Glykosaminoglykan (GAG), welches von Chondroblasten synthetisiert wird, einer Alcian Blau Färbung unterzogen. Als Kontrollen dienten in diesem Fall ebenfalls in Kugeln befindliche mMSCs, die jedoch unmittelbar nach der

Herstellung gefärbt wurden. Beim Vergleich von den in Abb. 17 E dargestellten Kontrollen und den differenzierten Zellen (Abb. 17 Bild F) ist zu erkennen, dass die Blaufärbung bei den differenzierten Zellen in Verteilung sowie auch der Farbintensität wesentlich stärker auftrat. Des Weiteren zeigt Abb. 17 Bild F nicht nur bereits die Anwesenheit von GAG nach 7 Tagen Differenzierung, sondern auch eine deutlich erhöht Zellzahl und zusätzlich vor allem in der Mitte der Zell-Alginat-Kugeln morphologisch veränderte Zellen. Diese sind um ein Vielfaches größer als die am Rand liegenden Zellen, was ebenfalls eine erfolgreiche Differenzierung bestätigt. Im Allgemeinen ist bekannt, dass MSCs sich bei ihrer Metamorphose verdichten und an Größe/Volumen zunehmen bis sie als Knorpelsubstanz synthetisierende rundliche Chondroblasten vorliegen (Götz *et al.* 2003). Bei den nicht differenzierten Kontrollzellen wurde diese Beobachtung nicht gemacht.

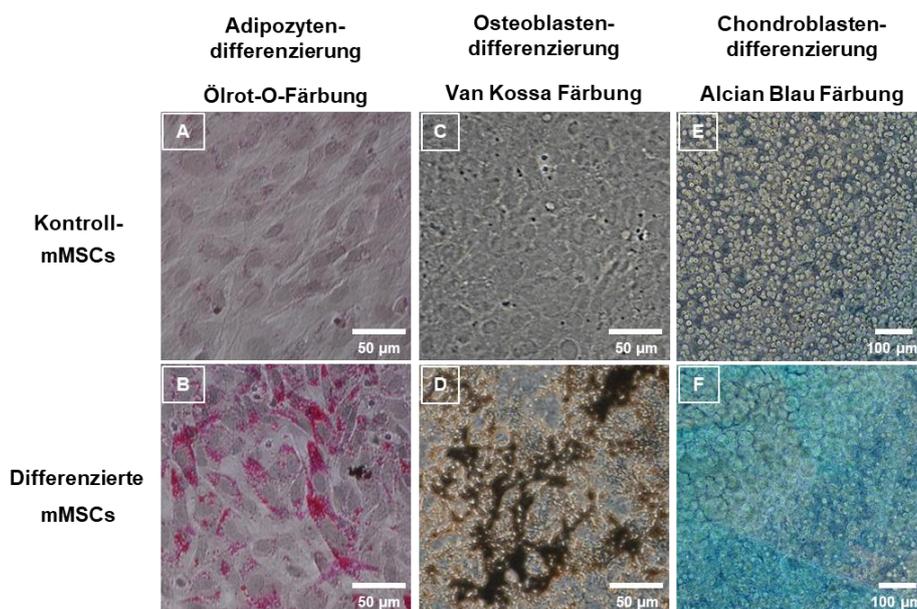


Abb. 17: Adipozyten, Osteoblasten und Chondroblasten gehen aus der *in vitro* Differenzierung von mMSCs hervor. Murine MSCs wurden 27 Tage in Adipozyten (B) differenziert, anschließend mit den entsprechenden undifferenzierten Kontrollen (A) einer Ölrot-O-Färbung unterzogen. Van Kossa gefärbt wurden nach 20 Tagen die zu Osteoblasten differenzierte Zellen (D) und deren Kontrollen (C). Für den Nachweis von Chondroblasten wurden die Zellen 7 Tage differenziert (F), bevor sie wie bereits zuvor die Kontrollen (E) mit Alcian Blau gefärbt wurden. Dokumentation aller gefärbten Differenzierungen und deren Kontrollen wurde mittels Kombination aus Inversmikroskop und digitaler Spiegelreflexkamera durchgeführt. Der entsprechende Maßstab wurde in jedem Bild unten links in der Ecke mit einem weißen Balken angeben (für Adipozyten und Osteoblasten mit 50 µm und für Chondroblasten mit 100 µm) Für jede Differenzierung und deren entsprechende Kontrolle wurde ein repräsentatives Bild gezeigt.

Folglich konnte gezeigt werden, dass die mMSC-Linie sich *in vitro* in alle drei Zelltypen differenzieren lässt. Ferner fand dies nur unter spezifischen Bedingungen zur Differenzierung statt.

3.1.1.2. Detektion charakteristischer Oberflächenantigene von mMSCs

Typische mMSC-Oberflächenantigene sowie das Fehlen von epithelialen und hämatopoetischen Markern wurden durchflusszytometrisch analysiert. Zum Ausschluss epithelialer und hämatopoetischer Oberflächenantigene, wurden CD34, CD45, CD90.2, CD117, CD11b und MHCII in die Untersuchung eingeschlossen. Als typische mMSC-Marker wurde die Expression von CD105, CD73 und SCA-1 analysiert. Für die verschiedenen Antikörperspezies und Konjugate wurden die jeweils passenden Isotypkontrollen in der Analyse verwendet. Basierend auf diesen Kontrollen wurde die Unterscheidung zwischen positiver und negativer Population vorgenommen, indem das Gating individuell so angepasst

wurde, dass höchstens ein Anteil von 0,1 % der gefärbten Zellen positiv detektiert wurde (siehe Abb. S1 A, Kapitel 7.2, Anhang). Dieses wurde anschließend isotypabhängig auf alle entsprechenden Messungen von mit Antikörper gefärbten Zellen angewendet. Zur besseren Visualisierung wurde ein Overlay der Fluoreszenzdetektion von Isotypkontrolle und Oberflächenmarker erstellt. Diese wurden in Abb. 18 mit dem jeweils ermittelten Anteil an positiven Zellen für den analysierten Marker dargestellt.

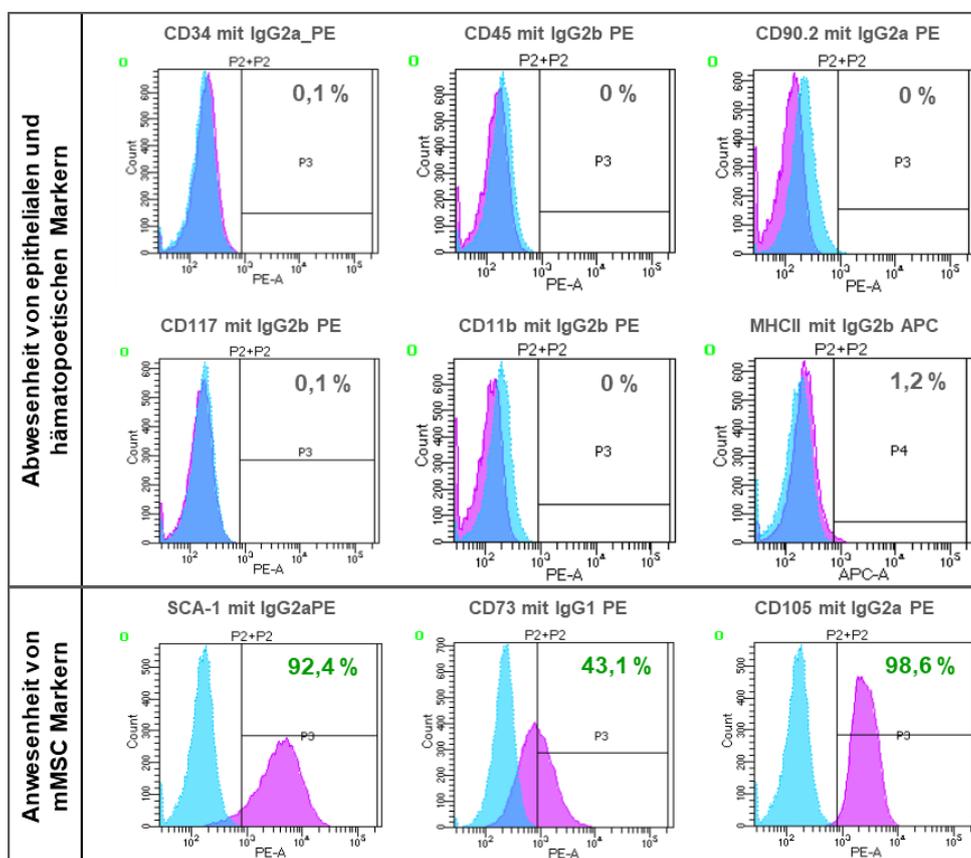


Abb. 18: Murine MSCs exprimieren ausschließlich SCA-1, CD73 und CD105 und sind negativ für CD34, CD45, CD90.2, CD117, CD11b und MHCII. Für alle Antikörperfärbungen (Kompensations-, Isotypkontrollen und zu analysierende Zellen) wurden jeweils $2,5 \cdot 10^5$ mMSCs nach Behandlung mit Fc-Block-Lösung 30 min bei 4 °C mit einem/einer entsprechenden Erstantikörper/Isotypkontrolle inkubiert. Die Isotypkontrollen dienen zur Eliminierung des Hintergrundsignal von den Antikörpern und eine 7AAD-Färbung anschließend zur Diskriminierung von lebenden und toten Zellen. Alle gefärbten Zellen wurden am BD FACS Canto II in der FACS Sorting Core Unit des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gemessen. Für die Auswertung wurde eine Überlagerung (O) der jeweiligen Messung von antikörpergefärbten Zellen (violette Fläche) mit der der entsprechenden Isotypkontrolle (hellblau Fläche) erstellt und der Anteil an positiven Zellen für den jeweils gefärbten Oberflächenmarker angegeben. Die Messergebnisse wurden als Histogramm dargestellt, indem die Anzahl der Zellen (linear) gegen die jeweilige Fluoreszenzintensität (logarithmisch) aufgetragen wurde. *Count* = Zellanzahl.

Die durchflusszytometrische Analyse der in Lonza-FCS-haltigem mMSC-Kultivierungsmedium expandierten mMSC-Zelllinie zeigt, dass keine Detektion von den epithelialen und hämatopoetischen Markern CD34, CD45, CD90.2, CD117 und CD11b erfolgte; der prozentuale Anteil an positiven Zellen betrug 0 bis 0,1. Lediglich für MHCII wurde ein vernachlässigbarer geringer Anteil von 1,2 % positiven Zellen ermittelt. Im Gegensatz dazu waren alle drei ausgewählten typischen mMSC-Oberflächenantigene nachweislich auf den Zellen exprimiert. SCA-1 (92,4 %) und CD105 (98,6 %) war fast auf allen analysierten mMSCs detektierbar, wohingegen CD73 mit einem Anteil von 43,1 % positiver Zellen auf weniger als der Hälfte der Zellen messbar war. Die Anwesenheit der mMSC-Marker und die Abwesenheit anderer nicht mMSC spezifischer Marker bestätigen, dass es sich bei den

verwendeten Zellen um eine reine mMSC-Kultur handelt, wie auch die anderen durchgeführten Charakterisierungsexperimente (z.B. die *in vitro* Differenzierbarkeit) zeigten.

3.1.2. Charakterisierung von mMSC-EVs

Die von mMSCs sezernierten und anschließend isolierten EVs wurden, bevor sie für weitere Versuche eingesetzt wurden, zunächst charakterisiert. Dazu gehörte die Ermittlung der Konzentration, der Nachweis bestimmter EV-Marker sowie wenn möglich die Größenbestimmung [nm]. Diese Parameter gaben somit die Qualität und Quantität einzelner EV-Isolate wieder und tragen zur Vergleichbarkeit der verschiedenen EV-Präparate bei.

3.1.2.1. Detektion von EV-Markern

Für die Charakterisierung der mMSC-EVs wurden - wie von der ISEV empfohlen - verschiedene EV-Marker verwendet. Zum einen wurde als Transmembranprotein das Tetraspanin CD9 gewählt und zum anderen zwei cytosolischen Proteine. TSG101 als ESCRT Protein und FLOTELLIN als assoziiertes Protein für diesen endosomalen Sortierungskomplex. Zusätzlich wurde noch das promiskuitiv in EVs zu findende Proteinen HSP70 nachgewiesen. Zum Ausschluss von Kontaminationen mit Zellbestandteilen wurde CALNEXIN als integrales Protein des endoplasmatischen Retikulums ausgewählt, welches nicht in reinen EV-Isolaten nachweisbar sein sollte (Théry *et al.* 2018).

Da durch die Transplantationen die initialen EV-Isolate verbraucht waren, wurde für die Charakterisierung eine weitere Probe herangezogen. Diese wurde analog zu den initialen Präparaten gewonnen und entstammte einer mMSC-Kultur, welche unter vergleichbaren Bedingungen mit Lonza-FCS kultiviert wurde. Aus diesen sezernierten EVs und den dazugehörigen mMSCs wurden Proteine sowohl unter reduzierenden als auch nicht reduzierenden Bedingungen isoliert. Die jeweils zusammengehörigen Proteinproben von mMSCs und EVs waren für den Nachweis von FLOTELLIN, TSG101 und HSP70 beide jeweils reduziert worden, während für CD9 Detektion nicht reduzierte Proteinlysate verwendet wurden, wie vom Hersteller angegeben.

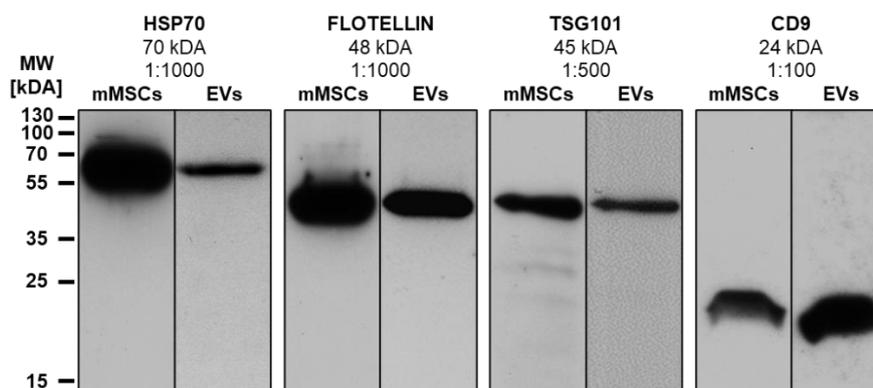


Abb. 19: Charakterisierung von mMSC-EVs anhand Immundetektion ausgewählter EV-Marker. Für den Nachweis eines jeden Markers wurden jeweils 20 µg Proteinisolat (0,5 µg/µl) aus mMSC-EVs sowie aus den dazugehörigen mMSCs untersucht. HSP70, FLOTELLIN und TSG101 wurden in reduzierten, denaturierten Isolaten und CD9 in nicht reduzierten, denaturierten Proteinisolaten nachgewiesen. Die Proben wurden elektrophoretisch in 12 %-igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und via Nassblottverfahren auf eine PVDF Membran transferiert. Die verdünnten Erstantikörper wurden über Nacht bei 4 °C und nachfolgend der entsprechende Sekundäntikörper (1:5000 für HSP70, FLOTELLIN und TSG101, 1:2500 für CD9) mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Super Signal West Pico auf Röntgenfilmen. Marker: 10 µl PageRuler Plus Stained Protein Ladder. Entnommen und verändert nach Schoefinius *et al.*, © 2017. *Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 (CC BY-NC 4.0) International Public License.*

Wie Abb. 19 zeigt, waren alle vier untersuchten EV-Marker sowohl in den parentalen mMSCs, als auch in den von ihnen sezernierten EVs detektierbar. Im Vergleich zu den mMSCs ist die Konzentration von HSP70, FLOTELLIN und TSG101 in den EVs optisch deutlich geringer während CD9 in EVs angereichert vorliegt. Zusätzlich konnte die Abwesenheit von Calnexin in den EVs bestätigt (Daten nicht gezeigt) und somit eine Kontamination des EV-Präparats mit mMSCs ausgeschlossen werden.

3.1.2.2. Partikelkonzentration der transplantierten mMSC-EVs

Die Konzentration der EV-Präparate, welche für Transplantationsversuche verwendet wurden, wurde bereits vor Beginn dieser Promotion in der Arbeitsgruppe ermittelt. Zu diesem Zeitpunkt stand noch keine NTA via NanoSight zur Verfügung, so dass die Konzentrationen mittels Durchflusszytometrie bestimmt wurden. Bei diesem Verfahren wurden die EV-Proben unter Zuhilfenahme von Zählbeads analysiert und anschließend die Gesamtpartikelmenge einer Ernte berechnet, jedoch keine zusätzliche Größenverteilung der Partikel erhalten. Die Gesamtpartikelzahlen sind in Tab. 41 aufgelistet.

Tab. 41: Gesamtanzahl an isolierten EVs pro Präparat. Die Konzentration wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Angegeben sind das Volumen eines jeden EV-Präparats, die Gesamtzellzahl (Anzahl an Zellen aller für die jeweilige Ernte verwendeten Zellkulturebenen) der mMSC-Kultur und die Anzahl an EVs pro mMSC.

mMSC-EV-Präparat für Transplantationen	1	2	3
Gesamtprobenvolumen [μ l]	150	1000	1000
Gesamtanzahl an EVs	$1,85 \cdot 10^8$	$6,38 \cdot 10^8$	$7,02 \cdot 10^8$
Gesamtzellzahl $\cdot 10^8$	1,74	1,92	2,9
EVs pro mMSC	1,1	3,3	2,4

Auf der Gesamtzellzahl der EVs basierend wurde die Anzahl an EVs pro mMSC berechnet. Wie Tab. 41 zeigt, schwankt die Anzahl an EVs pro mMSC unter den Präparaten zwischen 1,1 und 3,3, was auf Grund von Messungenauigkeiten und biologischer Varianz vertretbar war.

3.1.3. Kolokalisation von transplantierten PKH26-EVs mit Knochenmarkszellen nach letaler Bestrahlung

Ziel dieses Experimentes war es die Verteilung von transplantierten EVs im Organismus von letal bestrahlten Rezipienten zu analysieren. Insbesondere sollten die Zielzellen der EVs identifiziert werden, um eine Aussage treffen zu können, ob die durch Bestrahlung geschädigten hämatopoetische Stamm- (HSCs) und/oder Progenitorzellen (HPCs) im Knochenmark (KM) direkt oder indirekt von den EVs protektiert werden. Um die mMSC-EVs nach der Transplantation (TX) detektierbar zu machen, wurden diese vorher mittels PKH26 gefärbt. Der verwendete Farbstoff ist ein nicht spezifischer gelb-orangener Fluoreszenzfarbstoff, der sich aufgrund seiner langen aliphatischen Ketten gut in Phospholipiddoppelschichten einlagert. Um dementsprechend spezifisch nur EVs zu markieren, wurde die Färbung vor der TX *in vitro* mit den reinen EV-Präparaten durchgeführt.

Bei der anschließenden Analyse stand vor allem das KM, welches den Ort der Hämatopoese darstellt, als Hauptsitz der HSCs und HPCs im Fokus. Ab 1 Grey ionisierender Strahlung ist das KM das Leitorgan, welches die ersten ernsthaften bis hin zu lebensbedrohlichen Schädigungen zeigt.

Für die Analyse wurden die Versuchstiere in zwei Gruppen eingeteilt, von denen 2 h bzw. 4 h nach TX KM isoliert und Cytospins angefertigt wurden. Die Cytospins wurden sowohl mit SCA-1, als auch mit C-KIT gefärbt, welche typische HSC/HPC-Marker sind (Okada *et al.* 1992).

In 8 µm Sektionen von Lunge und Milz aus allen Tieren waren zu beiden Analysezeitpunkten nur sehr vereinzelte transplantierte mMSC-EVs nachweisbar (nicht gezeigt). Anders verhielt es sich dahingegen mit den Cytospins aus Knochenmarkszellen. Die SCA-1- oder C-KIT-positiven (SCA-1⁺ oder C-KIT⁺) Zellen lagen größtenteils in Clustern vor, in denen bereits 2 h nach TX PKH26-positive-EVs erkennbar waren (siehe Abb. 20). In Zellclustern, die zwar DAPI positiv, aber negativ für beide Antigene waren und somit keine HSCs oder HPCs darstellten, sondern andere Zellen des KMs, wurden fast nie EVs gefunden (nicht gezeigt). Des Weiteren wurde beobachtet, dass die mit EVs kolokalisierenden SCA-1⁺ Zellen deutlich stärker als die C-KIT⁺ Zellen gefärbt waren wie in Abb. 20 vielfach erkennbar ist. Dies deutet darauf hin, dass C-KIT auf diesen Zellen nur gering ausgebildet war. Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass in bestrahlte Rezipienten transplantierte EVs bevorzugt mit pluripotenten mHSCs kolokalisieren, welche bekannter Weise stark SCA-1⁺ und nur gering C-KIT⁺ sind (Okada *et al.* 1992).

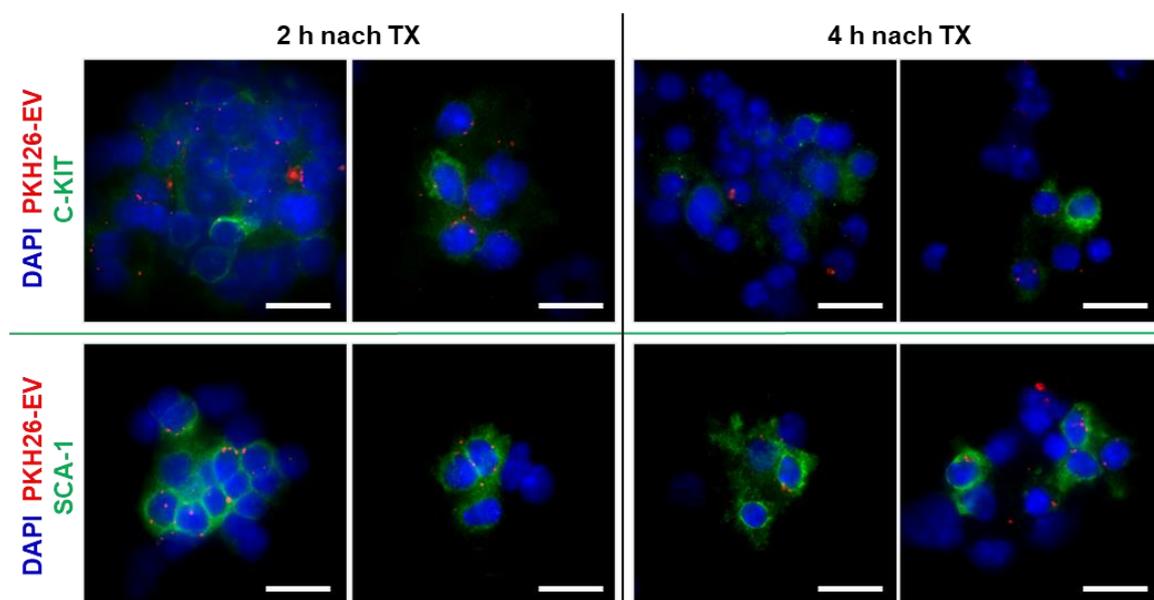


Abb. 20: Kolokalisation von Knochenmarkszellen mit transplantierten mMSC-EVs. Letal bestrahlten Rezipienten wurden intravenös jeweils PKH26 (rot) gefärbte EVs (PKH26-EV) von 1×10^6 mMSCs transplantiert und 2 h bzw. 4 h nach Transplantation (TX) analysiert. Von je 5×10^4 Knochenmarkszellen wurden Cytospins angefertigt und mit C-KIT (siehe obere Bilderserie) oder SCA-1 (siehe untere Bilderreihe) gefärbt (Sekundärantikörper anti-Ratte Alexa Fluor488 (grün)). Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) gegengefärbt. Maßstab = 20 µm. Jeweils zwei repräsentative Aufnahmen pro Färbung und Zeitpunkt sind dargestellt. Entnommen und verändert nach Schoefinius *et al.*, © 2017. *Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 (CC BY-NC 4.0) International Public License.*

Die Anwesenheit von mMSC-EVs bereits 2 h nach Transplantation spricht für eine schnelle und gezielte Einwanderung ins KM. Auch nach 4 h wurden PKH26-gefärbte EVs in den Antigen-positiven (Antigen⁺) Zellclustern detektiert. Durch eine rein optische Betrachtung war jedoch kein Unterschied in der EV-Menge zwischen den beiden Färbungen sowie den beiden Zeitpunkten möglich. Demzufolge wurden die Antigen⁺ Zellen ausgezählt, ebenso wie die PKH26-markierten EVs, welche mit diesen Zellen kolokalisiert vorlagen. Eine tabellarische Übersicht über die Ergebnisse befindet sich in Tab. S6 im Anhang (Kapitel 7.8) und die relative EV-Verteilung pro positiv gefärbter Zelle ist in Abb. 21 dargestellt.

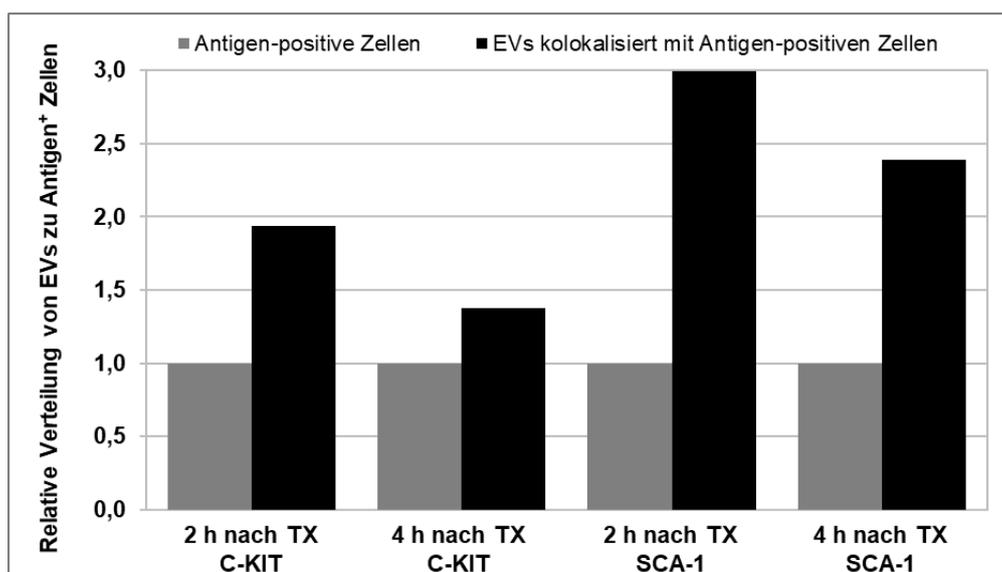


Abb. 21: Anzahl an mit SCA-1⁺ oder C-KIT⁺ Knochenmarkszellen kolokalisierten PKH26-EVs 2 h und 4 h nach Transplantation in letal bestrahlte Rezipienten. Aus mit PKH26-EVs transplantierten letal bestrahlten Rezipienten wurde 2 oder 4 h nach der Transplantation (TX) Knochenmark isoliert und aus je 5×10^4 Knochenmarkszellen Cytospins hergestellt. Bei diesen wurden SCA-1 oder C-KIT immunhistochemisch detektiert, ausgezählt und summiert (graue Balken), ebenso wie die Anzahl an PKH26-gefärbten mMSC-EVs, die sich in Kolokalisation mit diesen Zellen befanden (schwarze Balken) und daraus die relative Verteilung der EVs pro einer Antigen-positiven Zelle berechnet. Pro Gruppe wurden jeweils 8 Tiere in zwei separaten Experimenten verwendet. Entnommen und verändert nach Schoefinius *et al.*, © 2017. *Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 (CC BY-NC 4.0) International Public License.*

Für beide Antigene ist klar zu erkennen, dass, verglichen mit 2 h, 4 h nach Transplantation die Anzahl an EVs abgenommen hatte. Bei C-KIT⁺ Proben wurden nach 2 h 1,9 und nach 4 h nur noch 1,4 EVs pro Antigen⁺ Zelle gefunden. Und obwohl bei SCA-1⁺ Zellen im Vergleich zu C-KIT⁺ zu beiden Zeitpunkten deutlich mehr EVs pro Zelle detektiert wurden, nimmt die Anzahl an EVs von 2 h (3 EVs/Zelle) zu 4 h (2,4 EVs/Zelle) etwa um das gleiche Verhältnis ab.

Um die Anzahl an PKH26-gefärbten EVs pro Antigen-positiver Zelle genauer zu quantifizieren, wurde eine weitere Untersuchungen am ImageStream angeschlossen. Dafür wurden erneut aus letal bestrahlten Tieren 2 h bzw. 4 h nach TX von PKH26-gefärbten mMSC-EVs das KM isoliert. Von den dreifach gefärbten Einzelzellen (SCA-1 Alexa 488, C-KIT Alexa 647 und Hoechst) wurde der prozentuale Anteil an einfach positiven SCA-1 oder C-KIT Zellen sowie der Anteil an doppelpositiven SCA-1/C-KIT Zellen ermittelt. Von jeder dieser drei erhalten Populationen wurde im weiteren Analyseverfahren der Zellanteil ermittelt, der zusätzlich in Kolokalisation mit den transplantierten PKH26-EVs stand sowie die Anzahl an detektierten EVs pro entsprechender Antigen⁺ Zelle. Die jeweiligen Ergebnisse der Replikate wurden im Anschluss gemittelt. Da sich der prozentuale Anteil an Gesamt SCA-1⁺ oder C-KIT⁺ oder SCA-1⁺/C-KIT⁺ Zellen zwischen Proben beider Zeitpunkte nicht unterschied, wurde ein gesamter Mittelwert gebildet. Dieser wurde neben den entsprechenden gemittelten Anteilen an SCA-1⁺ oder C-KIT⁺ oder SCA-1⁺/C-KIT⁺ Zellen, die in Kolokalisation mit EVs detektiert wurden, getrennt in 2 h und 4 h nach TX in Abb. 22 dargestellt.

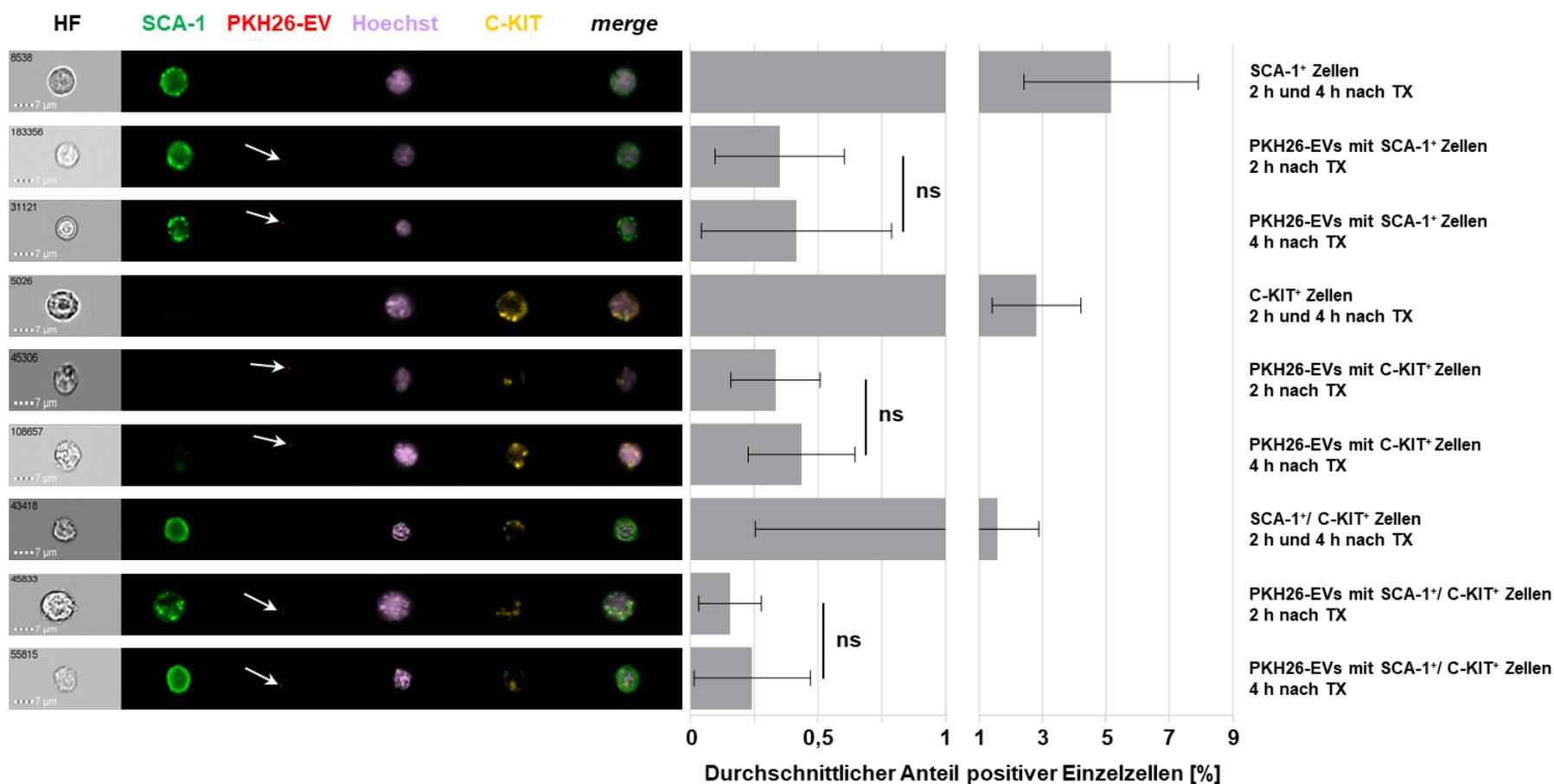


Abb. 22: Quantifizierung von mit Knochenmarkszellen kolokalisierten PKH26-EVs. Letal bestrahlten Rezipienten wurden jeweils PKH26-gefärbte EVs (PKH26-EVs) von jeweils 1×10^6 mMSCs *intravenös* transplantiert und 2 h bzw. 4 h nach Transplantation (TX) das Knochenmark isoliert. Die 2 h Gruppe umfasste 9 Tiere und die 4 h Gruppe 8 Tiere, die für beide auf 3 Experimente aufgeteilt waren. Pro Tier wurde eine fünffache Bestimmung von jeweils 1×10^6 dreifachgefärbten (SCA-1 Alexa 488, C-KIT Alexa 647 und Hoechst) isolierten mMNCs am ImageStream vollständig analysiert. Die ermittelten Anteile an Antigen-positiven Zellen (SCA-1⁺ oder C-KIT⁺ oder SCA-1⁺/C-KIT⁺) für 2 h und 4 h wurden gemittelt dargestellt. Ausgehend von diesen positiven Populationen wurde zusätzlich der Anteil ermittelt, der sowohl nach 2 h, als auch 4 h mit PKH26-EVs kolokalisierte. Statistische Analyse: Brown-Forsythe und Welch ANOVA Test (Dunnett's T3 multiple comparisons Test). ns = nicht signifikant.

Zu jeder ermittelten Gruppe wurde zusätzlich jeweils ein repräsentatives Bild abgebildet, welches SCA-1 (grün), C-KIT (gelb), PKH26-gefärbte EVs (rot) und den Zellkern mit Hoechst (violett) zeigt (Vergrößerung x60). HF = Hellfeld; merge = alle gemessenen Fluoreszenzkanäle zusammengefügt. Modifiziert nach Schoefinius et al., © 2017. *Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 (CC BY-NC 4.0) International Public License.*

Auch mit dieser Methode konnten bereits 2 h nach Transplantation PKH26-gefärbte EVs im KM detektiert werden, wobei PKH26-EVs zu diesem Zeitpunkt bereits mit allen drei Subpopulationen (SCA-1⁺, C-KIT⁺ und SCA-1⁺/C-KIT⁺) interagierten wie in Abb. 22 deutlich erkennbar ist. Dies zeigt, dass EVs gezielt diese Zellen ansteuern und die Ergebnisse der Cytospins nicht nur ein Artefakt bzw. zufälliges Zusammentreffen von EVs und mHSCs durch das Zentrifugieren auf Objektträger war. Der Vergleich der Intensität der C-KIT Färbung zwischen den unterschiedlichen Populationen zeigt, dass die Population, welche mit EVs kolokal detektiert wurde, wie bei den Cytospins, meistens eine deutlich schwächere Intensität hat. Besonders auffällig konnte dies in der doppelpositiven Population beobachtet werden, die somit wahrscheinlich potentielle rekonstitutive, pluripotente Stammzellen darstellt. Im Gegensatz zu den Cytospins erschien in der ImageStream Analyse der Anteil an Antigen⁺ Zellen, die mit EVs kolokalisierten, nach 4 h in allen drei Gruppen höher. Dies konnte durch eine statistische Auswertung jedoch nicht bestätigt werden. Auch mittels Spot Zählung (nicht gezeigt) konnte kein Unterschied in der Anzahl an EVs pro Antigen positiver Zelle zwischen den jeweiligen 2 h und 4 h Populationen detektiert werden. Dafür zeigten jedoch alle Populationen, dass die meisten Zellen tatsächlich nur mit einem (66 – 74 %) oder zwei (19 – 24 %) PKH26-EV(s) interagierten. Auch ist keine Präferenz der EVs hinsichtlich SCA-1⁺ Zellen zu beobachten, da der Anteil an SCA-1⁺ Zellen mit EVs nach 2 h 0,35 % und nach 4 h 0,42 % beträgt, was keinen Unterschied zu den Anteilen an EVs mit C-KIT⁺ Zellen (2 h: 0,33 % und 4 h: 0,44 %) darstellt. Insgesamt konnte jedoch mittels ImageStream Analyse ein Großteil der Cytospin-Ergebnisse bestätigt werden und diese außerdem um die Information ergänzen, dass die meisten Zellen nur mit einem einzelnen EV interagieren.

3.2. Analyse ausgewählter Gene auf Beteiligung an Radioprotektion von letal bestrahlten hämatopoetischen Stammzellen

Für diese Arbeit wurden drei Zielgene (*Sod1*, *Gal1* und *Prdx1*) basierend auf einer zuvor durchgeführten Proteomanalyse ausgewählt. Im Zuge der Arbeit sollten diese dahingehend untersucht werden, ob eins oder mehrere dieser Proteine an der Protektion letal bestrahlter mHSCs beteiligt ist/sind. Für dieses Vorhaben wurden mMSCs mit infektiösen lentiviralen Vektorpartikeln stabil transduziert, so dass entweder die jeweiligen Gene einzeln (shRNA_*Gal1*, shRNA_*Sod1* oder shRNA_*Prdx1*; jeweils MOI 5) oder alle drei Gene zusammen (shRNA_*Gal1*, shRNA_*Sod1* und shRNA_*Prdx1* = 3x shRNA; jeweils MOI 5, insgesamt MOI 15) runterreguliert wurden. Als Kontrolle wurde zusätzlich eine scramble shRNA (shRNA_*scr*) mitgeführt. Transduzierte, hoch positive Zellen wurden anhand ihrer Fluoreszenzproteinexpression (shRNA_*scr* = eGFP; shRNA_*Gal1* = Cerulean; shRNA_*Sod1* = mCherry, shRNA_*Prdx1* = eGFP; 3xshRNA = eGFP, Cerulean und mCherry) selektiert. Anschließend wurden von diesen hergestellten Zellen die sezernierten EVs isoliert und auf das Vorliegen radioprotektiver Eigenschaften getestet.

3.2.1. Erfolgreiche Runterregulation der Zielgene *Gal1*, *Sod1* und *Prdx1* via lentiviral eingebrachter shRNAs in mMSCs

Die nach shRNA-Transduktion hoch positiven mMSCs wurden, ebenso wie die nicht behandelten Kontroll-mMSCs, in Sigma-FCS-haltigem mMSC-Kultivierungsmedium ohne Zytokin-Zugabe kultiviert. Die aus den mMSCs und den dazugehörigen mMSC-EVs gewonnene RNA wurde in cDNA

umgeschrieben und für quantitative PCRs zur Bestimmung der Expressionsstärke des Referenzgens *S27a* sowie der Zielgene *Gal1*, *Sod1* und *Prdx1* genutzt.

Für eine statistische Beurteilung wurden die qPCR Analysen mehrfach an unterschiedlichen Tagen wiederholt. Die mMSC-cDNA-Proben wurden insgesamt fünf Mal und die cDNA von jeder der drei EV-Ernten pro mMSC-Kultur vier Mal vermessen. Für eine aussagekräftige Statistik war $n =$ vier nicht ausreichend. Da sich jedoch die Werte aller drei Ernten einer Kultur untereinander nur geringfügig unterschieden, wurden diese zusammengenommen. Die entsprechend ermittelten relativen Genexpressionen wurde in Abb. 23 dargestellt.

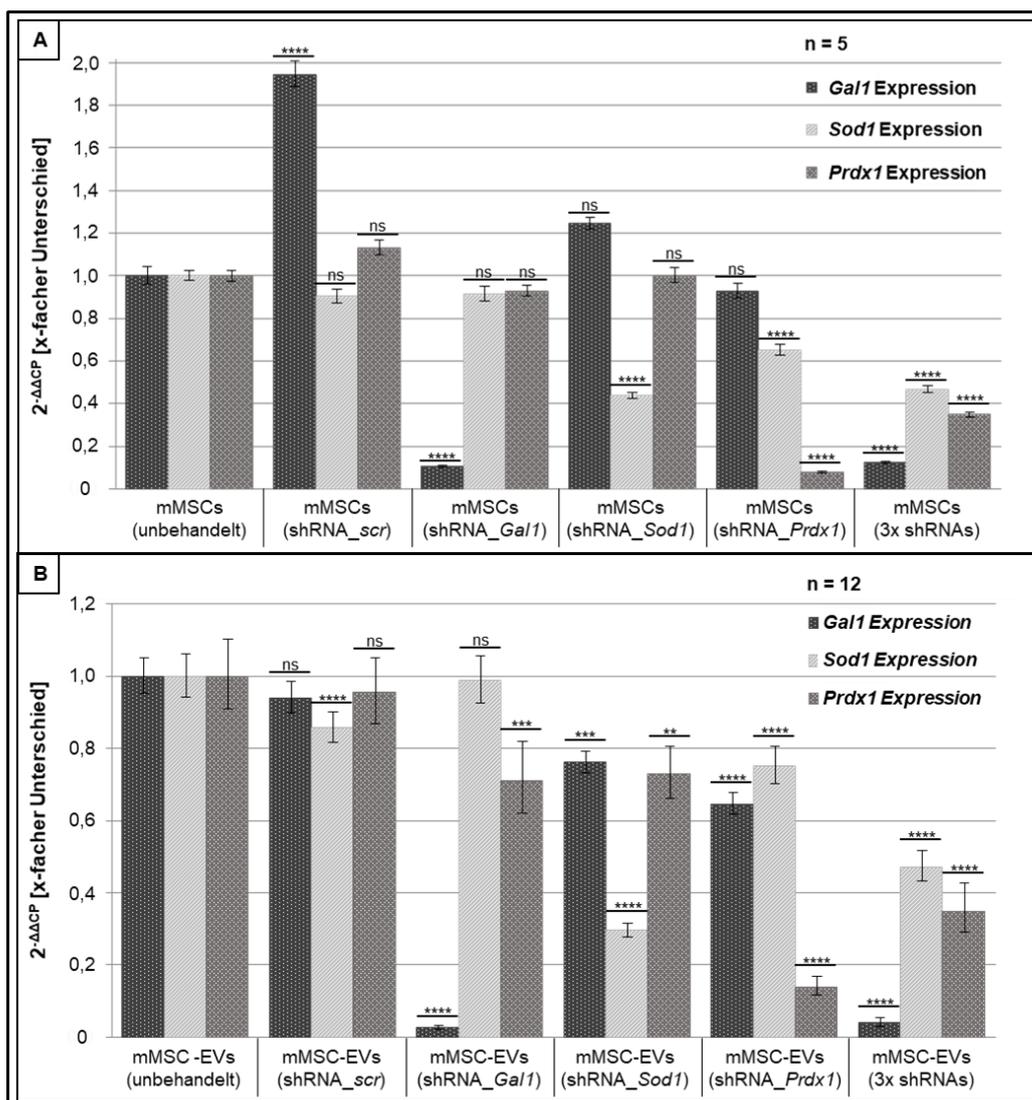


Abb. 23: Erfolgreiche transkriptionale Runterregulation der Zielgene *Gal1*, *Sod1* und *Prdx1* mittels eingebrachter shRNA. Analysiert wurden die cDNAs aus mit einem shRNA Konstrukt (shRNA_scr, shRNA_Gal1, shRNA_Sod1 oder shRNA_Prdx1) oder mit allen drei Zielgen-shRNAs (shRNA_Gal1, shRNA_Sod1 und shRNA_Prdx1 = 3x shRNA) transduzierten hoch positiven mMSCs sowie deren EVs. Als Kontrolle dienten unbehandelte mMSCs sowie die von ihnen sezernierten EVs. Die mMSC-Kultivierung im Allgemeinen sowie die für EV-Ernten fand in Sigma-FCS-haltigem Kultivierungsmedium ohne Zytokin-Zusatz statt. Alle Proben wurden auf den relativen Expressionsunterschied von *Gal1* (dunkel grau), *Sod1* (hellgrau) und *Prdx1* (grau) untersucht, indem 5 ng cDNA aus mMSCs (A) und 1 ng cDNA aus mMSC-EVs (B) pro qPCR-Ansatz eingesetzt wurden. Jede Probe wurde als technisches Triplikat vermessen. Insgesamt wurden von jeder mMSC-Probe fünf unabhängige Analysen durchgeführt (A; $n = 5$), während jede EV-Ernte (drei Ernten pro mMSC-Kultur) vier Mal analysiert und anschließend die Ergebnisse von allen drei Ernten zusammengefasst wurden (B; $n = 12$). Die statistische Auswertung wurde mittels GraphPad Prism 9 durchgeführt und ein *Ordinary one-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons* Test verwendet. $P: <0,0001 = ****$; $P: 0,0001$ bis $0,001 = ***$; $P: 0,001$ bis $0,01 = **$; $P: 0,01$ bis $0,05 = *$; $P: \geq 0,05 = ns$. ns = nicht signifikant.

Die Genexpressionsanalyse der mMSC-Proben zeigt klar, dass, wie erwartet, in den mit shRNA_*Gal1* transduzierten mMSCs nur *Gal1* signifikant (um ~90%) runterreguliert worden war. Ebenso ist in den mMSCs mit shRNA_*Sod1* nur die Expression von *Sod1* signifikant auf ~40 % gesunken (Abb. 23 A). Die Runterregulation aller drei Gene in den mMSCs mit 3x shRNA war hingegen nicht in allen Fällen so erfolgreich wie in einzeln transduzierten Zellen (Expressionsreduktion: *Gal1* um 88 %, *Sod1* um >50 % und *Prdx1* um 65 %). Da jedoch alle Gene im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich um mind. die Hälfte ihrer ursprünglichen Expression verringert sind, wird davon ausgegangen, dass dies für die weiteren Untersuchungen bei denen eine Aussage getroffen werden soll, ob diese 3 Kandidaten an den protektiven Effekten der EVs beteiligt sind, ausreichend ist. In den mMSCs mit shRNA-*Prdx1* wurde neben einer signifikanten Runterregulation von *Prdx1* (um >90 %) auch eine signifikante Runterregulation von *Sod1* detektiert, die 35 % umfasste. Ob diese Beobachtung tatsächlich einen Zusammenhang mit der Transduktion der shRNA_*Prdx1* anzeigt oder es an der Variabilität des biologischen Systems liegt, gilt es weiter zu beobachten. Eine Beeinflussung der weiteren geplanten Experimente war jedoch dadurch nicht zu erwarten. Im Vergleich zu der Kontrollprobe wiesen die mit shRNA_*scr* transduzierten mMSCs unerwarteterweise eine fast doppelt so hohe Expression von *Gal1* (Abb. 23 A) auf. Diese signifikante Auffälligkeit war jedoch interessanterweise in die dazugehörigen EVs (Abb. 23 B) nicht übertragen worden. Im Allgemeinen sind die Ergebnisse der relativen Genexpressionsanalyse der mMSC-EVs (Abb. 23 B) deutlich inhomogener als die der entsprechenden parentalen Zellen (Abb. 23 A). Dies zeigt sich darin, dass in einer Vielzahl der EV-Präparate nicht nur die Expression des Gens, welches mittels eingebrachter shRNA beeinflusst werden sollte, signifikant reduziert war, sondern im Vergleich mit den Kontroll-EVs auch die Expressionen der anderen untersuchten Gene. Allerdings führten diese signifikanten Veränderungen lediglich zu einer Expressionsreduktion von 24 % bis höchstens 35 %, wohingegen die gezielte Runterregulation wesentlich stärker ausfiel. Im Vergleich zu den Kontroll-EVs wurde in mMSC-EVs (shRNA_*Gal1*) die *Gal1* Expression fast zu 100 %, in mMSC-EVs (shRNA_*Sod1*) die *Sod1* Expression um 70 % und in mMSC-EVs (shRNA_*Prdx1*) die *Prdx1* Expression über 80 % reduziert. Auch die kombinierte Runterregulation der drei Zielgene zeigte sich in den EVs als ausreichend stark (Genexpressionsreduktion: *Gal1* um >90 %, *Sod1* um 53 % und *Prdx1* um 65 %) für ein Fortführen der Untersuchungen. Somit konnte sowohl in den mMSCs als auch in den von ihnen produzierten EV-Präparaten eine gezielte und signifikante Expressionsreduktion der jeweiligen Zielgene gezeigt werden. Da die Zielgene anhand einer Proteomanalyse ausgewählt worden waren, wurde zusätzlich untersucht, ob sich die vorliegende transkriptionale Runterregulation der Zielgene ebenfalls ausreichend stark in der Proteinexpression widerspiegelte.

Dazu wurde aus allen mMSC-EV-Präparaten sowie den dazugehörigen mMSCs, die enthaltenen Proteine unter reduzierenden Bedingungen isoliert und die Zielproteine SOD1, GAL1 und PRDX1 sowie GAPDH als Referenzprotein für die mMSCs und FLOTELLIN für die EV-Proteinlysate via Western Blot Analyse immunodetektiert.

Bereits durch die optische Auswertung der detektierten Banden konnte fast in allen Fällen sowohl für die Zellen als auch für die dazugehörigen EVs eine erfolgreiche shRNA-induzierte Runterregulation der entsprechenden Proteine nachgewiesen werden (siehe Abb. 24).

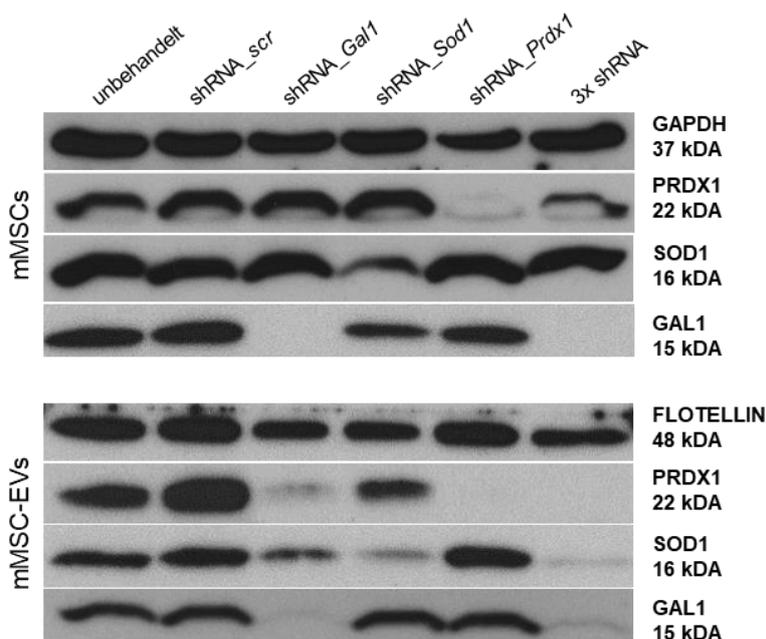


Abb. 24: Immundetektion der Runterregulation von GAL1, SOD1 und PRDX1 verschiedener mMSC-Kulturen sowie in deren sezernierten EVs. Von denaturierten und reduzierten mMSC-Proteinisolaten wurden jeweils 10 µg und von den mMSC-EV-Isolaten jeweils 5 µg Protein über ein 12 %-iges Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Marker wurden 10 µl PageRuler Plus Stained Protein Ladder mitgeführt. Anschließend erfolgte ein Transfer auf eine PVDF Membran mittels Nassblottverfahren. Um mehrere Proteine parallel auf einem Blot nachweisen zu können, wurde die Membran entsprechend der jeweiligen nachzuweisenden Proteingrößen [kDA] in Längsrichtung zerschnitten nachdem sie mit 1x ROTI-Block-Lösung inkubiert worden war. Die Membranabschnitte wurden mit verdünnten Erstantikörpern (GAPDH 1:2500, FLOTELLIN 1: 500, PRDX1 1:500, SOD1 1:500 und GAL1 1:500) über Nacht bei 4 °C und nach erfolgten Waschschritten mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (1:5000) mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Super Signal West Pico auf Röntgenfilmen.

Wie in Abb. 24 zu erkennen ist, sind trotz vorheriger Proteinmessung und daraus folgender Auftragung einer definierten gleichen Proteinmenge für alle Proben innerhalb einer Analyse, deutliche Schwankungen in der Bandenintensität der Referenzproteine (GAPDH oder FLOTELLIN) zwischen den einzelnen zu vergleichenden Proben zu erkennen. Demzufolge ist eine rein optische Auswertung der vorliegenden Ergebnisse nicht ausreichend, um den tatsächlichen Unterschied eindeutig bestimmen zu können. Es wurde daher die Intensitätsdichte der Proteinbanden pro mm² bestimmt und die Signale der Zielproteine gegen das jeweilige Referenzprotein normalisiert. Insgesamt wurden die mMSC-Proteinisolate in dieser Weise dreimal unabhängig voneinander analysiert und die Ergebnisse gemittelt in Abb. 25 A dargestellt. Pro EV-Ernte (insgesamt drei Ernten pro mMSC-Kultur) wurde hingegen jeweils nur eine Proteinanalyse durchgeführt, daher wurden anschließend auch in diesem Fall die Ergebnisse aller drei Ernten einer mMSC-Kultur gemittelt in Abb. 25 B dargestellt. Auf Grund der geringen Anzahl an Messwiederholungen pro Probe (n = 3) war eine statistische Auswertung nicht möglich.

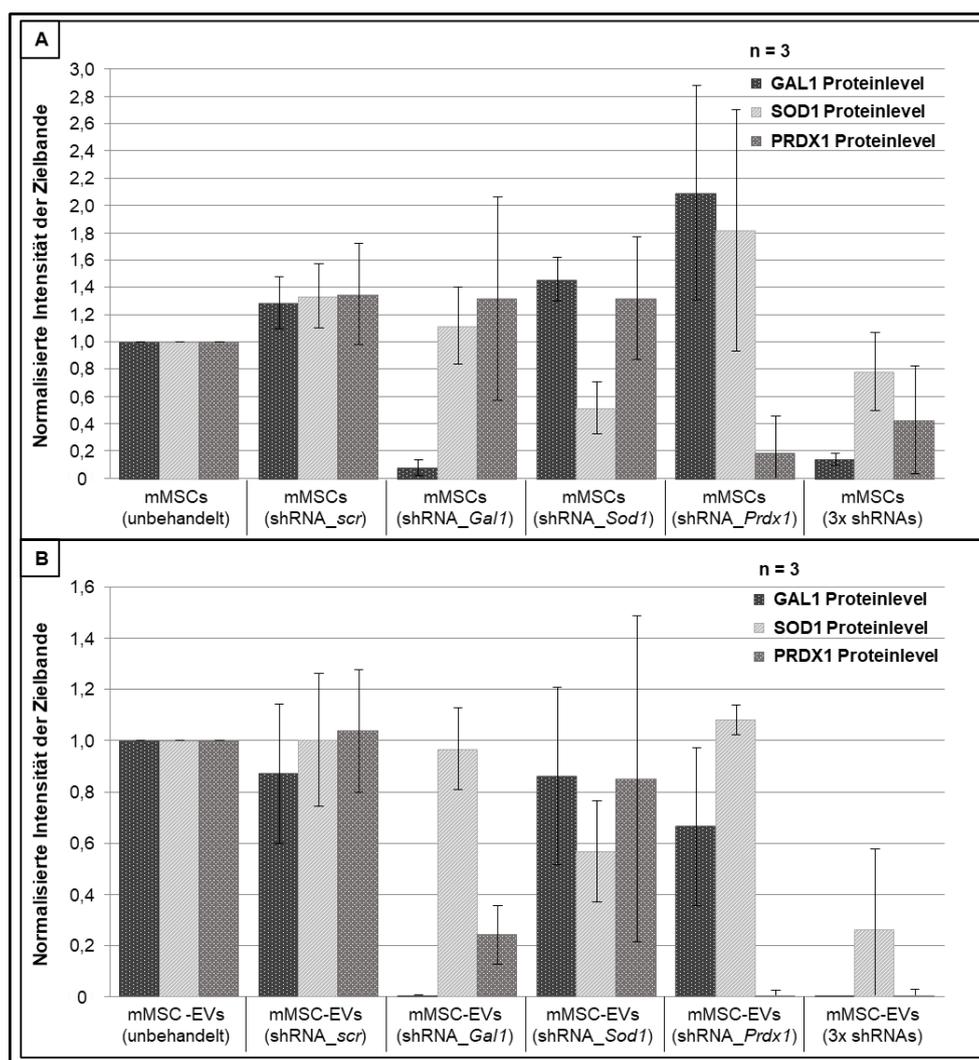


Abb. 25: Erfolgreiche Runterregulation der Zielgene *Gal1*, *Sod1* und *Prdx1* mittels eingebrachter shRNA auf Proteinebene. Analysiert wurden reduzierte und denaturierte Proteinlysate aus mit einem shRNA Konstrukt (shRNA_scr, shRNA_Gal1, shRNA_Sod1 oder shRNA_Prdx1) oder mit allen drei Zielgen-shRNAs (shRNA_Gal1, shRNA_Sod1 und shRNA_Prdx1 = 3x shRNA) transduzierten hoch positiven mMSCs sowie deren EVs. Als Kontrolle dienten unbehandelte mMSCs sowie die von ihnen sezernierten EVs. Die mMSC-Kultivierung im Allgemeinen sowie die für EV-Ernten fand in Sigma-FCS-haltigem Kultivierungsmedium ohne Zytokin-Zusatz statt. Je 10 µg mMSC-Protein (A) oder 5 µg EV-Protein (B) wurde über ein 12 %-iges Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels Nassblottverfahren auf eine PVDF Membran transferiert. Verdünnte Erstantikörper (GAPDH 1:2500, FLOTELLIN 1: 500, PRDX1 1:500, SOD1 1:500 und GAL1 1:500) wurden über Nacht bei 4 °C und nachfolgend der entsprechende Sekundäntikörper (1:5000) mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Intensitätsdichte pro mm² der mittels Super Signal West Pico ermittelten Banden der Zielproteine (GAL1, SOD1 und PRDX1) wurde gegen das jeweilige Referenzprotein (A: GAPDH für mMSCs, B: FLOTELLIN für EVs) mittels Quantity One (Basic) Software normalisiert. Insgesamt wurden von jeder mMSC-Probe drei unabhängige Analysen durchgeführt und gemittelt dargestellt (A; n = 3). Dahingegen wurde von jeder EV-Ernte (drei Ernten pro mMSC-Kultur) nur je eine Analyse durchgeführt und anschließend die Ergebnisse dieser drei Ernten zusammengefasst dargestellt (B; n = 3).

Die mMSC-Ergebnisse der Western Blot Analyse (Abb. 25 A) sind vergleichbar zu denen der Genexpressionsanalyse (Abb. 23 A). Auch auf Proteinebene ist die gezielte Runterregulation der einzelnen Zielgene mittels integrierter shRNAs deutlich zu erkennen. Die dreifach transduzierten Zellen zeigten ebenfalls ein reduziertes Proteinlevel aller drei Zielproteine, wobei hier die SOD1 Reduktion wesentlich geringer ausfiel als auf Transkriptionsebene. Im Gegensatz zu den Genexpressionsanalysen scheinen in den einfach transduzierten Proben die beiden anderen, nicht runter regulierten Proteine, stattdessen teilweise hoch reguliert worden zu sein.

Ebenso ergab die Proteinanalyse der mMSC-EVs (Abb. 25 B) für alle Proben eine erfolgreiche Reduktion des Proteinlevels der entsprechenden Zielgene. Die kombinierte Runterregulation aller drei Zielgene scheint auf Proteinlevel in den mMSC-EVs (3x shRNAs) sogar wesentlich effizienter zu sein als in den dazugehörigen mMSCs (Abb. 25 A) und ebenfalls stärker als in den entsprechenden EV-Proben und deren mMSCs auf Transkriptionsebene (Abb. 23 A – mMSCs und B – mMSC-EVs) zu wirken. Im Vergleich zu den Genexpressionsanalysen konnte lediglich in den shRNA_Gal1 EV-Proben zusätzlich zu der gezielten Runterregulation von GAL1 ein stark gesenkter PRDX1 Proteinspiegel im Vergleich zu den Kontrollen detektiert werden. Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass die eingebrachten shRNAs nicht nur gezielt eine transkriptionale Reduktion der entsprechenden Zielgene sowohl in den mMSCs als auch den dazugehörigen EVs im Vergleich zu den Kontrollen bewirken, sondern ebenfalls deutlich deren Proteinlevel verringern.

3.2.2. Charakterisierung der von verschiedenen (nicht) transduzierten mMSC-Kulturen isolierten mMSC-EVs

Auch in diesem Experiment wurden die von verschiedenen mMSC-Kulturen isolierten EVs minimalistisch charakterisiert. Die Größenverteilung [nm] sowie die Konzentrationsbestimmung [Partikel/ml] einer jeden Probe wurden mittels Nanopartikel Verfolgungsanalysen (NTA) am NanoSight bestimmt und zusätzlich 4 spezifische EV-Marker auf Proteinebene via Western Blot Analyse nachgewiesen.

Der Modalwert (Modus) der Partikelgröße [nm] sowie die entsprechende Partikelkonzentration/ml von jeder einzelnen EV-Probe (pro Testkondition je drei EV-Ernten) sind in Tab. 42 aufgelistet.

Tab. 42: Ergebnisse der Nanopartikel Verfolgungsanalyse (NTA) von aus unbehandelten und mit verschiedenen shRNAs transduzierten mMSC-Kultur isolierten EVs. Pro mMSC-Kultur lagen jeweils 3 Ernten vor. Von jeder EV-Probe wurde eine mit filtriertem (0,1 µm) 1xDPBS hergestellte 1:500 Verdünnung zehnmal jeweils 10 sec bei 23,5 °C am NanoSight vermessen. Durch anschließende Prozessierung der Messdaten wurde für jede Probe der Modalwert (Modus) der vorliegenden Partikelgröße [nm] und die in der Messlösung vorliegende Partikelanzahl/ml mit zugehöriger Standardabweichung ermittelt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung wurde schlussendlich die hier angegebene Konzentration und Standardabweichung der jeweiligen Probe erhalten. Da für jede EV-Probe das Volumen und die Anzahl an parentalen mMSCs, bekannt war, konnte zusätzlich die EV-Anzahl pro mMSC berechnet werden.

	Ernte	Modus Partikelgröße [nm]	Konzentration [$\times 10^{11}$ Partikel/ml]	Standardabweichung [$\times 10^{10}$ Partikel/ml]	Anzahl produzierter EVs pro mMSC
mMSC-EVs (unbehandelt)	1	144,7	7,35	1,51	4083
	2	129,9	5,25	1,79	2917
	3	140,2	6,35	1,30	3528
mMSC-EVs (shRNA_scr)	1	144,3	5,50	1,65	2651
	2	136,0	4,12	1,16	1983
	3	141,5	4,67	1,28	1876
mMSC-EVs (shRNA_Gal1)	1	153,6	3,21	2,49	2227
	2	151,0	2,68	6,90	1859
	3	140,3	7,50	2,09	5208
mMSC-EVs (shRNA_Sod1)	1	135,4	1,47	2,27	613
	2	133,1	3,27	1,77	1360
	3	141,1	2,95	1,10	1227
mMSC-EVs (shRNA_Prpx1)	1	145,8	4,58	2,29	2542
	2	133,9	4,76	1,38	2644
	3	144,4	6,45	1,23	3583
mMSC-EVs (3x shRNA)	1	138,7	7,80	9,80	7145
	2	150,7	2,74	1,63	2505
	3	137,0	2,50	2,20	2228

Des Weiteren war es wichtig mögliche Kontaminationen im Lösungsmittel der EVs, welche die Messergebnisse verfälschen könnten, auszuschließen, da die verwendete Messmethode jegliche Partikel unspezifisch detektiert und somit keine Unterscheidung zwischen Kontaminanten und den zu vermessenen EVs möglich wäre. Zusätzlich sollte der allgemeine Hintergrund des Lösungsmittels ermittelt werden. Für den Ausschluss von Kontaminanten wurde bei jeder Messung zusätzlich das jeweils verwendete 1x DPBS (filtriert; 1 μm) unter den gleichen Bedingungen wie die EV-Proben analysiert. Bereits die erhaltenen Messkurven für das 1x DPBS unterschieden sich in allen Fällen, wie am Beispiel einer Messung in Abb. S8 E (Kapitel 7.9, Anhang) dargestellt, deutlich zu denen der EVs (siehe beispielhaft Abb. S8 A und C in 7.9, Anhang). Der Modus der detektierten Partikel lag bei allen Messungen unter 100 nm mit einer gemittelten Konzentration von $8,8 \cdot 10^6$ Partikel/ml, so dass eine mögliche Kontamination ausgeschlossen werden konnte. Ebenfalls wurde das zum Suspendieren der EV-Pellets verwendete $\alpha\text{MEM/HEPES}$ testweise vermessen. Hier konnte lediglich eine Konzentration von $1,2 \cdot 10^7$ Partikel/ml mit einem Modus von 42,3 nm detektiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Somit liegt der Hintergrund der NTA für beide in dieser Analyse vorliegenden EV-Lösungsmittel (1xDPBS und $\alpha\text{MEM/HEPES}$) im Durchschnitt bei vernachlässigbar geringen 1,6 %, so dass dieser bei den EV-Messungen nicht weiter berücksichtigt werden musste.

Die NTAs ergaben für alle Proben sehr ähnliche Messkurven (siehe Anhang, Kapitel 7.9, Beispiel in Abb. S8) mit Modalwerten für eine Partikelgröße von 129,9 bis 153,6 nm (siehe Tab. 42), welches in Anbetracht der gewählten Isolationsmethode in einer zu erwarteten Größenordnung liegt. Dabei ist die Spanne der Größen nicht etwa darauf zurück zu führen, dass die EVs auf Grund der Transduktion eine Größenveränderung vorwiesen, sondern die unterschiedlichen Größen scheinen völlig zufällig zwischen den einzelnen Proben und sogar den jeweils drei Ernten von einer mMSC-Kultur aufzutreten. Die Partikelkonzentration/ml der Proben ist hingegen mit Konzentrationen von $1,47 \cdot 10^{11}$ bis $7,8 \cdot 10^{11}$ Partikel/ml wesentlich inhomogener. Dies wird insbesondere bei der Betrachtung der Anzahl produzierter EVs pro mMSC klar, wo die niedrigste Anzahl 613 EVs und der höchste Wert 7145 EVs pro mMSC waren. Allerdings ist auch diese Inhomogenität nicht auf bestimmte Erntepunkte oder Behandlungen der Proben zurückzuführen, so dass dem wahrscheinlich lediglich eine biologische Varianz zugrunde liegt.

Die Detektion der 4 ausgewählten verschiedenen EV-Marker wurde auf Grund des geringen Probenmaterials lediglich einmalig an den EV-Proben der jeweils ersten Ernte von unbehandelten mMSCs (Kontrollen), einfach transduzierten (*shRNA_scr*, *shRNA_Gal1*, *shRNA_Sod1* oder *shRNA_Prdx1*) und dreifach transduzierten mMSCs (3x *shRNA*) durchgeführt. Da bereits bei der Charakterisierung der EVs im Kapitel 3.1.2.1 gezeigt wurde, dass die verwendeten Antikörper die nachzuweisenden EV-Proteine spezifisch und auf der erwarteten Höhe detektieren, wurde in diesem Fall parallel der Nachweis mehrerer Proteine pro Probe auf einer Membran durchgeführt. In diesem Experiment wurde, im Gegensatz zu vorherigen, auch CD9 unter reduzierten und denaturierten Bedingungen nachgewiesen. Die entsprechend detektierten Proteinbanden sind in Abb. 26 dargestellt.

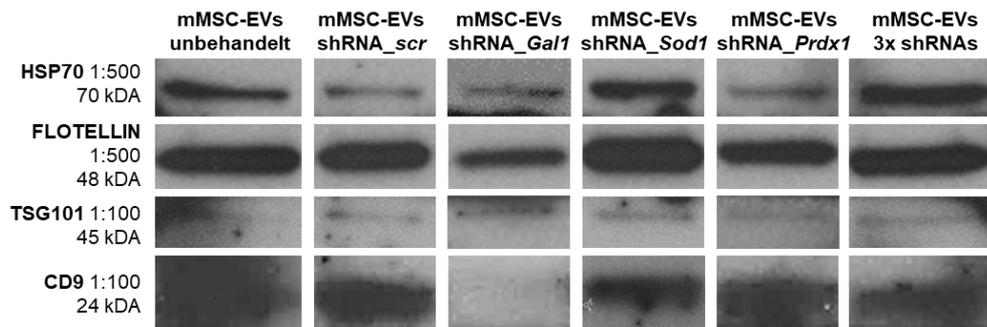


Abb. 26: Nachweis von EV-Markern in verschiedenen EV-Präparaten. Es wurden jeweils 5 µg reduziertes und denaturiertes Proteinlysate in 1x Laemmli aus der ersten EV-Ernte von unbehandelten mMSCs, transduzierten hoch positiven mMSCs für die einzelnen shRNA Konstrukte (shRNA_scr, shRNA_Gal1, shRNA_Sod1 oder shRNA_Prdx1) oder für alle drei Zielgen-shRNAs (shRNA_Gal1, shRNA_Sod1 und shRNA_Prdx1 = 3x shRNA) verwendet. Die Proben wurden elektrophoretisch in 12 %-igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und via Nassblottverfahren auf eine PVDF Membran transferiert. Inkubation mit Erstantikörpern (1:5000 für HSP70, FLOTELLIN und TSG101, 1:2000 für CD9) erfolgte über Nacht bei 4 °C und nachfolgend mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (1:5000 für HSP70, FLOTELLIN und TSG101, 1:2000 für CD9) für mindestens 2 h bei Raumtemperatur. Die Detektion erfolgte mittels Super Signal West Pico auf Röntgenfilmen. Größenreferenz: 10 µl PageRuler Plus Stained Protein Ladder. Repräsentative Abbildung.

Wie in Abb. 26 zu erkennen ist, sind alle vier gewählten EV-Marker sowohl in dem unbehandelten EV-Präparat als auch in allen aus transduzierten mMSC stammenden EV-Isolaten detektierbar. Bis auf FLOTELLIN sind alle anderen Proteine trotz erheblich längerer Detektionszeiten und teilweise sogar höheren Einsatzes des 1. AK wesentlich schwächer ausgeprägt als bei vorherigen Nachweisen. Besonders deutlich ist dieses bei dem Nachweis von CD9 in der Probe mMSC-EVs shRNA_Gal1 zu erkennen, wo kaum eine Bande detektiert werden konnte. Bei der vorherigen EV-Charakterisierung hingegen konnte sogar gezeigt werden, dass CD9 in den EVs angereichert vorlag (siehe Kapitel 3.1.2.1; Abb. 19). In Anbetracht der in diesem Experiment eingesetzten Proteinmenge ist dies jedoch als plausibel zu bewerten, da diese um ein vierfaches geringer war als bei früheren Nachweisen. Dies lag darin begründet, dass aus den zuvor in Lonza-FCS-haltigen Medium generierten EVs größere Proteinmengen isoliert und somit auch mehr Protein aufgetragen werden konnte. Auch wenn für einen vollständigen Vergleich noch der Nachweis aller Marker in den entsprechenden mMSC-Proteinlysaten aussteht, konnte doch auch so bereits klar gezeigt werden, dass bei Kultivierung der mMSCs in Sigma-FCS-haltigem Medium die produzierten EVs (unbehandelt) genauso wie zuvor bei der Verwendung von Lonza-FCS (Abb. 19) alle EV-Marker aufweisen (Abb. 26). Darüber hinaus lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass die stabile Integration von shRNAs keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der ausgewählten EV-Marker hat. Auch zeigen die Ergebnisse, dass alle Präparate EVs enthielten. Für einen endgültigen Beweis, dass diese EVs keine Kontaminanten wie Zellen aus der Kultur enthalten, müsste jedoch noch die Abwesenheit von z.B. Calnexin erbracht werden.

3.2.3. Einfluss der Runterregulation von Zielgenen in mMSC-EVs auf die Protektion letal bestrahlter mHSCs

Um zu überprüfen, ob jede einzelne Runterregulation der drei Zielgene in mMSCs (shRNA_Gal1, shRNA_Sod1 und shRNA_Prdx1) sowie die gleichzeitige Runterregulation aller drei Zielgene Einfluss auf den protektiven Effekt der jeweils von diesen mMSC-Kulturen isolierten mMSC-EVs hatte, wurde ein *in vitro* Radioprotektionsassay durchgeführt. Da frühere Ergebnisse (Schoefinius *et al.* 2017)

zeigten, dass die EVs lediglich *in vitro* die HSCs nach Bestrahlung protektieren, wurden die (nicht) bestrahlten mMNCs (enthalten mHSCs) mit und ohne mMSC-EVs zuerst in einer Vorkultur auf einem Stromalayer kultiviert. Anschließend wurden die in der Vorkultur von den überlebenden HSCs gebildeten HPCs weiter in einen Methylcelluloseassay eingesetzt, um dort schlussendlich Kolonien bestehend aus den verschiedenen Blutzellen (Erythrozyten, Granulozyten, Megakaryozyten, Monozyten/Makrophagen) zu bilden. Zum Vergleich wurden zusätzlich EVs von unbehandelten mMSCs mitgeführt, von denen eine Protektion zu erwarten war (Schoefinius *et al.* 2017) sowie von mMSCs, die mit shRNA_{scr} transduziert worden waren. Diese sollten zeigen, dass eine stabile Integration eines shRNA Vektors im Allgemeinen keinen Einfluss auf die EV Eigenschaften nimmt, sondern ausschließlich spezifische shRNAs dies ausüben. Zusätzlich wurden positive und negative Kontrollen mitgeführt, um eine Aussage treffen zu können, wie stark sich der mögliche Effekt der jeweiligen EV-Isolate auf das Überleben der HSCs auswirkt. Als Positivkontrolle wurden nicht bestrahlte mMNCs verwendet, die als Referenz dienen wie ausgeprägt die natürliche Hämatopoese der in den verwendeten 1×10^5 mMNCs enthaltenen mHSCs war. Demgegenüber wurden bestrahlte unbehandelte mMNCs als Negativkontrolle herangezogen, damit ebenfalls ein Referenzwert für natürlich überlebende Zellen nach letaler Bestrahlung ohne EV-Zugabe ermittelt werden konnte. Insgesamt wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt. In dem ersten Experiment stammten alle verwendeten Isolate aus der jeweils ersten EV-Ernte einer jeden mMSC-Kultur, wohingegen in dem zweiten Experiment die Isolate der jeweils zweiten EV-Ernte verwendet wurden.

An Tag 6 und 7 wurden die unter dem Stromalayer liegenden Kopfsteinpflaster Areale (KPA) gezählt, wobei die Replikate anschließend gemittelt wurden. Da kein Unterschied in der Anzahl an KPA zwischen den beiden eingesetzten EV-Ernten derselben mMSC-Kultur detektiert werden konnte, wurden die Daten beider Experimente gemittelt und in Abb. 27 A dargestellt. Frühere Experimente zeigten, dass eine mögliche Protektion der letal bestrahlten mHSCs durch das jeweilige EV-Präparat bereits vorlag, wenn die Anzahl an großen Kolonien (frühere Definition: ab 200 Zellen/Areal) in einem Ansatz mit EVs vergleichbar zu der der Positivkontrolle war (Schoefinius *et al.* 2017). Basierend auf den Daten früherer Analysen wären für die Ansätze mit mMSC-EVs (unbehandelt) eine annähernd gleiche Anzahl an großen/riesigen Kolonien wie in der Positivkontrolle oder zumindest eine erheblich größere als in der Negativkontrolle zu erwarten gewesen. In diesem Experiment wurden jedoch in den Versuchsgruppen keine Areale mit ≥ 200 Zellen gesichtet – ausgenommen die Positivkontrolle. Die ursprüngliche Kategorisierung musste daher angepasst werden. Areale mit mehr als 200 Zellen wurden nun als neu eingeführte Kategorie "riesige Kolonien" bezeichnet, während Kolonien bereits ab 50 Zellen/Areal als große Kolonien eingestuft wurden. Daraus ergab sich die Hypothese, dass bereits große/riesige Kolonien ab 50 Zellen/Areal in den EV-behandelten Kulturen ausreichen könnten, um eine Prognose bezüglich ihrer möglichen Protektion geben zu können. Ausgehend von dieser Kategorisierung wurden in den Positivkontrollen (unbehandelte mMNCs) insgesamt durchschnittlich 185 KPA gezählt, von denen ca. 22 % große/riesige Kolonien waren. Die Negativkontrolle (\nrightarrow mMNCs) umfasste hingegen lediglich 11 KPA, von denen nur 6 % groß waren. Alle bestrahlten mit den unterschiedlichen EV-Präparaten behandelten mMNCs waren mit der Negativkontrolle vergleichbar, sowohl in der Gesamtanzahl an KPA, als auch in der Anzahl an großen/riesigen Arealen (Abb. 27 Bild A). Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass mit keinem EV-Präparat – auch nicht mit den von unbehandelten

mMSCs – eine Protektion der bestrahlten HSCs stattgefunden hat. Um das Ergebnis zu verifizieren wurde der Protektionsassay fortgeführt. An Tag 8 wurden die von den jeweils vorhandenen KPA produzierten mHPCs aus dem Überstand eines jeden Ansatzes isoliert und in einen Methylcelluloseassay eingesetzt. Die in diesem Assay gebildeten Kolonien wurden am dreizehnten und vierzehnten Tag ausgezählt, wobei in beiden Experimenten bereits auffiel, dass ausschließlich in den Positivkontrollen große Kolonien (≥ 50 Zellen/Kolonie) vorlagen. Bei den Negativkontrollen und allen EV-Behandlungen konnten nur sehr selten einzelne große Kolonien gefunden werden. Den Hauptanteil in diesen Ansätzen machten mickrige bis kleine Kolonien (5 bis 25 Zellen) aus. Die gemittelte Anzahl der Kolonien pro Loch eines Ansatzes beider Assays sind in Abb. 27 Bild B als Anzahl an Kolonie-formenden Zellen dargestellt.

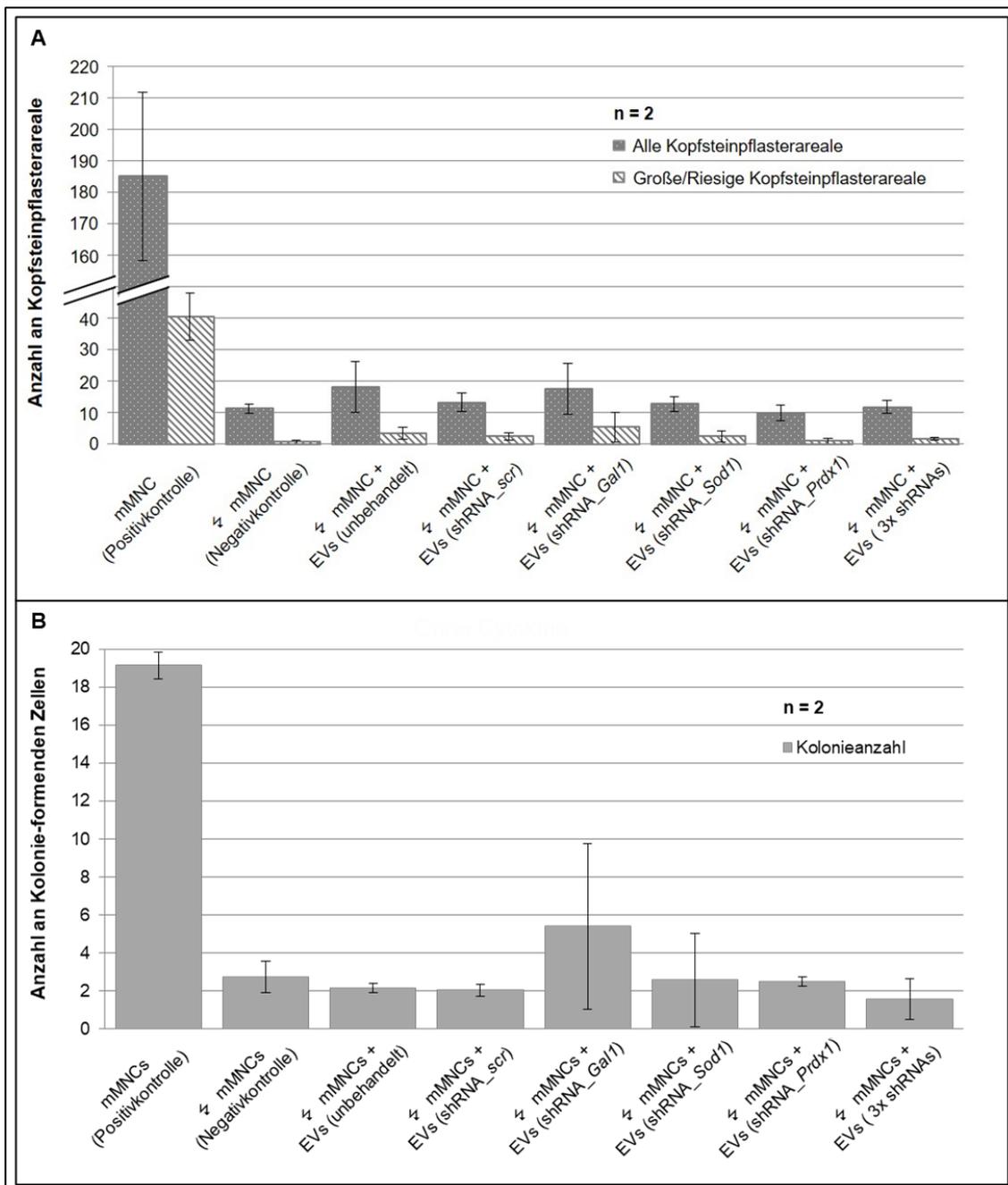


Abb. 27: EV-Behandlung hat keinen nachweisbaren Effekt auf das Überleben letal bestrahlter mHSCs. Mit dem verwendeten Radioprotektionsassay wurde untersucht, ob die einfache sowie gemeinsame Runterregulation der Zielgene Gal1, Sod1 und Prdx1 via shRNAs in mMNCs die protektiven Eigenschaften der aus diesen Zellen resultierenden EVs beeinflusst. Zusätzlich wurden EVs von unbehandelten mMNCs sowie von mit shRNA_scr transduzierten mMNCs mitgeführt. Die mMNCs wurden aus Knochenmark weiblicher C57BL/6 Ly5.1 Tiere (8 bis 12 Wochen alt) isoliert und diese auf das Überleben der darin enthaltenen mHSCs ohne weitere Behandlung (mMNCs), nach letaler Bestrahlung mit 4 Gy (↯ mMNCs) sowie nach Bestrahlung und Zugabe von jeweils einem der 6 verschiedenen EV Präparate (↯ mMNCs + EVs) untersucht. Pro Ansatz wurden jeweils $1 \cdot 10^5$ mMNCs verwendet. Von jedem Präparat wurden pro mMNC EVs eingesetzt, die von 40 mMNCs produziert wurden. Insgesamt wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt, welche sich immer aus einer Vorkultur und anschließendem Methylcelluloseassay zusammensetzten.

A: Vorkultur aller Ansätze in Duplikaten auf wachstumsinhibierten (mit 30 Gy bestrahlt) höchstens 80 – 90 % konfluenten MS5 Stromalayer in T25 Zellkulturflaschen. An Tag 6 und Tag 7 wurden die gebildeten Kopfsteinpflasterareale (KPA) unter dem MS5 Zellrasen ausgezählt und die gemittelte Anzahl aller KPA sowie zusätzlich noch einzeln dazu die der großen/riesigen Areale (ab 50 /ab 200 Zellen pro Areal) jeder Versuchsgruppe nebeneinander dargestellt. Riesige Areale wurden ausschließlich in Positivkontrollen gefunden.

B: Die von den KPA stammenden HPCs wurden aus jedem Überstand isoliert, in Methylcelluloseassays eingesetzt (jede T25 auf drei Löcher einer 24-Loch-Zellkulturplatte á 300 µl aufgeteilt) und nach 13 bis spätestens 14 Tagen die in dem Assay gebildeten Kolonien ausgezählt. Aus den Mittelwerten der technischen Replikate (6) wurden über die Einzelexperimente Mittelwerte gebildet und mit ihrer Standardabweichung dargestellt.

Die ermittelten Anzahlen an Kolonien (Abb. 27 B) der Versuchsgruppen mit EV-Behandlung zeigen klar, dass in keinem der Ansätze die letal bestrahlten mHSCs protektiert worden sind. Dies bestätigt somit die bereits nach der KPA Auswertung getroffene Vermutung, dass durch keine der unterschiedlichen EV-Zugaben, selbst nicht durch die EVs aus unbehandelten mMSCs, eine Protektion der bestrahlten HSCs stattgefunden hat. Diese Vermutung war begründet auf die bereits geringen Anzahlen an KPA in diesen Gruppen und insbesondere auf das Fehlen von ausreichend großen bzw. dem Ausbleiben an riesigen Kolonien, wie sie in den Positivkontrollen zu finden waren. Die Negativkontrolle zeigte durchschnittlich drei Kolonien, was 15,8 % an überlebenden Zellen im Vergleich zu der Positivkontrolle (19 Kolonien) ausmacht. Dies liegt somit sogar über der für den Assay gesetzten Untergrenze von 10 % an überlebenden Zellen nach Bestrahlung für die Negativkontrolle. Dieser Wert wurde angestrebt, um einerseits eine Verfälschung der Ergebnisse durch Überbestrahlung (nicht mehr zu retten) zu vermeiden und andererseits einen potenziell positiven Effekt noch nachweisen zu können. Somit kann angenommen werden, dass die Bestrahlung von 4 Gy nicht zu hoch gewählt und somit nicht Ursache dafür war, dass alle Ansätze mit den verschiedenen EV-Präparaten - bis auf den Ansatz mit mMSC-EVs (shRNA_Ga1) - sogar noch unter der Anzahl an gebildeten Kolonien im Vergleich zur Negativkontrolle lagen. Mit mMSC-EVs (shRNA_Ga1) konnten bereits in der Vorkultur (Abb. 27 A) mehr große/riesige KPA (5,5) als in den anderen Ansätzen (1 - 3,5) und der Negativkontrolle (0,75) detektiert werden. Diese Tendenz zeigt sich nun auch in der Auswertung des Methylcelluloseassays, bei dem durchschnittlich 5,4 Kolonien in den mit mMSC-EVs (shRNA_Ga1) behandelten Proben ermittelt wurden und damit die Anzahl von 2,8 Kolonien der Negativkontrolle überstieg. Im Vergleich mit der Positivkontrolle (19,2 Kolonien) bedeutet dies jedoch nur ein Überleben von 26 %. Laut aufgestellter Hypothese sollte eine Runterregulation der Zielgene jedoch im Vergleich mit den EVs unbehandelter mMSCs bei Beteiligung an der Protektion weniger Kolonien aufweisen. Bei einer nicht Beteiligung hingegen sollten sie zumindest gleich viele Kolonien wie die unbehandelten mMSC-EVs aufweisen, nicht jedoch wie in diesem Fall mehr, was bedeuten würde, dass die Abwesenheit von GAL1 ein Überleben der letal bestrahlten HSCs begünstigt. In diesem Zusammenhang gilt es jedoch zu berücksichtigen, dass in früheren Experimenten mit Präparaten von unbehandelte mMSC-EVs ein Überleben von fast 80 % gezeigt werden konnte (Schoefinius *et al.* 2017). In diesem Experiment wiesen diese jedoch ebenfalls keine Protektion auf, da die ermittelte Kolonienanzahl mit 2 Kolonien sogar unter der Negativkontrolle (3 Kolonien) lag. Eine Bewertung des vermeintlichen Anstieges an überlebenden HSCs durch eine mMSC-EVs (shRNA_Ga1) Behandlung ist somit unter den gegebenen Umständen nicht möglich, da der Verdacht bestand, dass der Assay fehlerhaft war. Im weiteren Verlauf der Arbeit stand daher zunächst eine Ursachenforschung betreffend die ausbleibende Protektion der mMSC-EVs im Vordergrund. Nach dem Eliminieren möglicher zugrundeliegender Fehler, wurden die Analysen wiederholt, um den Einfluss der Runterregulationen spezieller Zielgene in mMSCs auf die Funktion der von diesen Zellen isolierten EVs zu klären.

3.2.4. Wiederholung der Radioprotektionsassays unter optimierten Parametern zur Detektion der protektiven Effekte von mMSC-EVs auf letal bestrahlte mHSCs

Für eine optimierte Wiederholung der Radioprotektionsassays wurden zunächst mMSCs für eine erneute EV-Isolation, kultiviert. Dazu wurden die bereits generierten hoch positiven mMSCs, in welche

entweder eine einzelne shRNA (shRNA_ *scr*, shRNA_ *Gal1*, shRNA_ *Sod1* und shRNA_ *Prdx1*) oder alle drei zur Runterregulation der Zielgene benötigten shRNAs bereits integriert waren (3x shRNAs), verwendet. Diese wurden nach dem Auftauen direkt mit mMSC-Kultivierungsmedium (Sigma-FCS), welches dieses Mal zusätzlich 40 pg/ml rmEGF und 4 ng/ml rmPDGF_BB enthielt, kultiviert und in diesem anschließend expandiert. Unter diesen neuen Bedingungen wurde dann ebenfalls von jeder Kultur sowie unbehandelten mMSCs (Kontrollen) jeweils zweimal EVs im Abstand von 48 h geerntet. Nachdem alle Ernten abgeschlossen waren, wurde wie in dem vorherigen Experiment ohne Zytokin-Zugabe die Runterregulation der Zielgene auf Transkriptions- und Proteinebene, sowohl in mMSCs als auch den dazugehörigen EVs nachgewiesen. Die Nachweise wurden in gleicher Art und Weise wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben durchgeführt. Der einzige Unterschied bestand in der Anzahl an durchgeführten Wiederholungen der jeweiligen Messung, da in diesem Fall pro mMSC-Kultur nur je zwei EV-Ernten zur Verfügung standen. Demzufolge wurde die statistische Auswertung für alle mMSC-EVs mit $n = 8$ anstatt mit $n = 12$ durchgeführt. Die Analysen ergaben, dass die Zugabe der beiden Zytokine keinen Einfluss auf die Runterregulation ausübte (siehe Anhang: Transkriptionsebene Abb. S5 in Kapitel 7.6 und Proteinebene Abb. S6 und S7 in Kapitel 7.7). Die Ergebnisse der Analysen von RNA und Proteinen aus mMSCs und deren EVs, welche unter Zugabe von Zytokinen gewonnen wurden, bestätigten die bereits gezeigte erfolgreiche Reduktion der entsprechenden Expressions-/Proteinlevel der jeweiligen Zielgene in den transduzierten hoch positiven mMSCs und deren EVs ohne Zytokin-Zugabe (siehe Kapitel 3.2.1 Abb. 23 und 25).

Für eine Vergleichbarkeit der verschiedenen mMSC-EVs (mit oder ohne Zytokin-Zugabe produziert) wurden von allen neu generierten EV-Präparaten (mit Zytokinen) eine NTA durchgeführt und die Ergebnisse in Tab. S7 (Kapitel 7.9, Anhang) darstellt. Die Analysen ergaben eine Partikelgrößenspanne (Modalwerte) von 130,5 bis 154,8 nm, was ebenfalls keinen Unterscheid zu den Ergebnissen der mMSC-EVs ohne Zytokine (Partikelgröße von 129,9 bis 153,6 nm) darstellt. Ebenso wenig wie die ermittelten sehr inhomogenen Partikelkonzentrationen, welche bei den mMSC-EVs mit Zytokinen von $1,53 \cdot 10^{11}$ bis $7,1 \cdot 10^{11}$ Partikel/ml und bei denen ohne Zytokine von $1,47 \cdot 10^{11}$ bis $7,8 \cdot 10^{11}$ Partikel/ml streuten. Bei Betrachtung der EV-Anzahl pro produzierender mMSC von 697 bis 2740 wird sogar deutlich, dass in diesem Fall die Werte konsistenter sind als sie es bei den mMSC-EVs ohne Zytokine (613 bis 7145 EVs pro mMSC) waren. Auf Grund dieser bis dahin gezeigten Übereinstimmungen der EV-Charakteristika zwischen EVs aus mMSCs ohne Zytokine und denen aus mMSCs mit Zytokin-Zugabe wurde auf die weitere Charakterisierung (Nachweis der Anwesenheit verschiedener EV-Marker mittels WB) verzichtet.

Die Wiederholungen der Radioprotektionsassays wurden mit ebenfalls einigen veränderten Parametern durchgeführt. Für die Analyse aller EV-Isolate wurden in der Wiederholung Triplikate anstatt Duplikate verwendet, die mMNCs anstatt mit 4 Gy nur noch mit 3 Gy bestrahlt und zusätzlich das Verhältnis der eingesetzten EVs von 1:40 zu 1:120 verändert. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt, in denen ausschließlich die verschiedenen EV-Isolate aus der jeweils ersten EV-Ernte eingesetzt wurden. Die Kultivierung der verschieden behandelten mMNCs (unbehandelte, bestrahlt oder bestrahlt + EVs) fand anschließend wie zuvor auf wachstumsinhibierten MS5 Stromalayer in einer T25 für 7 Tage statt, bevor die Kopfsteinpflasterareale (KPA) ausgezählt wurden. Aus den KPA-

Mittelwerten der technischen Replikate (9) wurde über die Einzelexperimente der jeweilige Mittelwert für jede Versuchsgruppe gebildet und mit seiner Standardabweichung dargestellt (Abb. 28 A). Analog zu den vorherigen Versuchen ohne Zytokine wurde zusätzlich zu den ermittelten Gesamtzahlen an KPA daneben die Anzahl an großen/riesigen KPA für jede Versuchsgruppe aufgetragen.

Die ermittelten gesamten KPA sowie nur die großen/riesigen KPA in vitro Radioprotektionsassays mit verschiedenen mMSC-EVs (ohne Zytokine) (Kapitel 3.2.3, Abb. 27 A), zeigen im Vergleich zu denen der mMSC-EVs (mit Zytokinen) in Abb. 28 A dargestellten Analysen, die mit Zytokinen produziert wurden, nur wenige deutliche Unterschiede. So wie zum Beispiel, dass in den Positivkontrollen (mMNCs) der Experimente mit Zytokin-Zugabe durchschnittlich über 60 KPA weniger gezählt wurden als in denen ohne Zytokin-Zugabe. Interessanterweise hat die Anzahl an großen/riesigen KPA dementsprechend nicht ebenfalls abgenommen, sondern ist im Gegenteil dazu deutlich gestiegen, was dazu führte dass die großen/riesigen KPA anstatt nur ca. 22 % nun 44 % der gesamten KPA in den Positivkontrollen ausmachen. Darüber hinaus wurden unter den neuen Parametern des Radioprotektionsassays in der Negativkontrolle sowie allen Ansätzen mit den verschiedenen EV-Behandlungen, mehr KPA insgesamt sowie große/riesige KPA verzeichnet als im Vergleich zu den alten Parametern. Dennoch ist auch in diesem Experiment weiterhin kein Hinweis auf eine vorliegende Protektion zu erkennen, da erneut alle Versuchsgruppen mit EVs eine hohe Ähnlichkeit in der Anzahl der gesamten und der großen/riesigen KPA mit der Negativkontrolle (↔ mMNCs) aufweisen anstatt mit der Positivkontrolle.

Zur Vervollständigung wurden auch hier die Assays weitergeführt, indem an Tag 8 die von den jeweils vorhandenen KPA produzierten mHPCs aus dem Überstand eines jeden Ansatzes isoliert und in ein Methylcelluloseassay eingesetzt wurden. Die Auszählung der gebildeten Kolonien wurde an Tag 13 begonnen und an Tag 14 beendet. Im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten (ohne Zytokin-Zugabe) wurden nun nicht nur in der Positivkontrolle mehrere große Kolonien (ab 50 Zellen) gefunden. Allerdings stellte der Hauptanteil in der Negativkontrolle und den EV-Behandlungen weiterhin die kleinen-mickrigen Kolonien (25 bis 5 Zellen) darstellten. Die gemittelte Anzahl der Kolonien pro Loch eines Ansatzes beider Assays sind in Abb. 28 B als Anzahl an Kolonie-formenden Zellen mit ihren Standardabweichungen dargestellt. Bereits auf den ersten Blick lässt sich anhand der dargestellten Ergebnisse in Abb. 28 B erkennen, dass – wie bereits die KPA Ergebnisse vermuten ließen – in keinem der Ansätze die letal bestrahlten mHSCs von den jeweils zugegebenen EVs protektiert wurden. In allen Fällen entsprach die Anzahl an ermittelten Kolonien, eher der Negativkontrolle (↔ MSCs) mit 3,7 Kolonien, ebenso wie bereits die Anzahl an Gesamt KPA und großen/riesigen KPA. Und obwohl die Strahlendosis auf 3 Gy herabgesetzt wurde, ist der Anteil an überlebenden Zellen in der Negativkontrolle mit 16,2 % mit den 15,8 % gleichzusetzen, welche zuvor mit 4 Gy erzielt wurden.

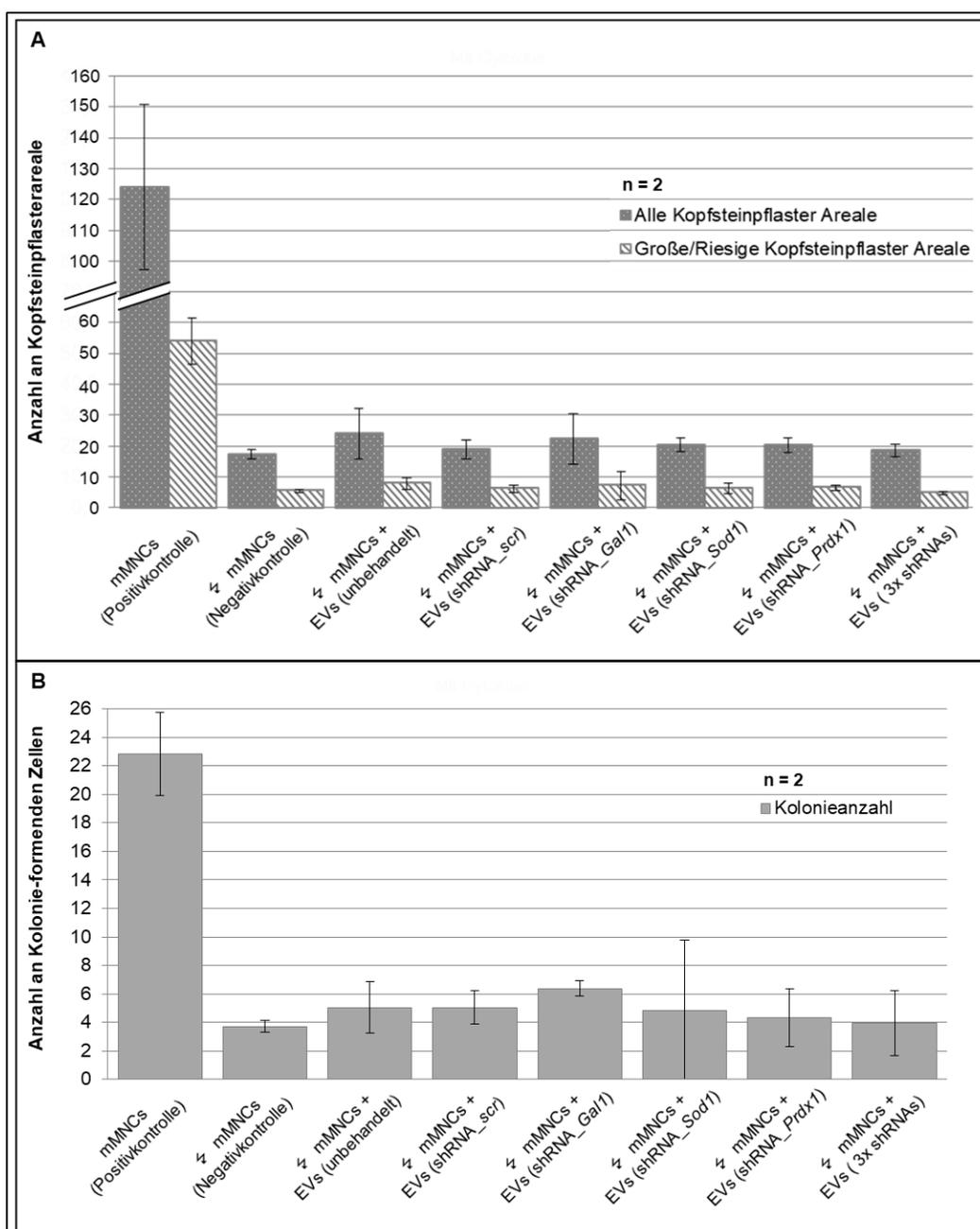


Abb. 28: Auch Zytokin-Zugabe bewirkt kein Überleben letal bestrahlter mHSCs nach EV-Behandlung.

Wiederholung der Radioprotektionsassays zur Untersuchung des Einflusses einer Runterregulation der Zielgene im Einzelnen (*Gal1*, *Sod1* und *Prdx1*) oder in Kombination auf die protektive Eigenschaft von EVs. Die jeweilige Runterregulation wurde in mMSCs via entsprechender lentiviral integrierter shRNAs durchgeführt und anschließend von diesen Zellen EVs unter Zugabe von 40 pg/ml rmEGF und 2 ng/ml rmPDGF-BB produziert sowie isoliert. Zusätzlich wurden EVs von unbehandelten mMNCs unter Zytokin-Zugabe sowie von mit shRNA_scr transduzierten mMNCs unter Zytokin-Zugabe mitgeführt. Die mMNCs wurden aus Knochenmark weiblicher C57BL/6 Ly5.1 Tiere (8 bis 12 Wochen alt) isoliert und auf das Überleben der darin enthaltenen mHSCs ohne weitere Behandlung (mMNCs), nach letaler Bestrahlung mit 3 Gy (↯ mMNCs) sowie nach Bestrahlung und Zugabe von jeweils einem der 6 verschiedenen EV Präparate (↯ mMNCs + EVs) untersucht. Pro Ansatz wurden jeweils $1 \cdot 10^5$ mMNCs verwendet und von jedem Präparat pro mMNC jeweils EVs, produziert von 120 mMSCs, eingesetzt. Insgesamt wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt, bestehend aus einer Vorkultur und anschließendem Methylcelluloseassay.

A: Vorkultur aller Ansätze in Duplikaten auf wachstumsinhibierten (mit 30 Gy bestrahlt) höchstens 80 – 90 % konfluenten MS5 Stromalayer in T25. Ab Tag 6 bis Tag 7 wurden die gebildeten Kopfsteinpflaster Areale (KPA) unter dem MS5 Zellrasen ausgezählt und die gemittelte Anzahl aller KPA sowie die der großen/riesigen Areale (ab 50/ab 200 Zellen pro Areal) jeder Versuchsgruppe nebeneinander dargestellt.

B: Die von den KPA stammenden HPCs wurden aus jedem Überstand isoliert, in Methylcelluloseassays eingesetzt (jede T25 auf drei Löcher einer 24-Loch-Zellkulturplatte á 300 µl aufgeteilt) und nach 13 bis spätestens 14 Tagen die in dem Assay gebildeten Kolonien ausgezählt. Aus den Mittelwerten der technischen Replikate (6) wurde über die Einzelexperimente der Mittelwert gebildet und mit Standardabweichung dargestellt.

3.2.5. Überprüfung der mMSC-Charakteristika bei Kultivierung in Sigma-FCS-haltigem Medium mit und ohne Zytokin-Zugabe

Die in dieser Arbeit verwendeten mMSCs, in denen die ausgewählten Zielgene *Gal1*, *Sod* und *Prdx1* mittels stabiler lentiviraler Integration entsprechender shRNAs runterreguliert wurden, stammen aus einer zuvor neu etablierten mMSC-Linie. Diese wurde mit dem bereits seit Jahren erfolgreichen und ohne Auffälligkeiten in der Arbeitsgruppe angewendeten Isolationsprotokoll generiert. Die Zellen der neuen mMSC-Linie wurden ab ihrer Isolation aus den Spendertieren (männliche 8 Wochen alte C57BL/6 Ly5.2 Tiere) in Sigma-FCS-haltigem mMSC-Kultivierungsmedium gehalten. Dies war die erste Linie, die mit dem neuen FCS generiert wurde. Da die Zellen, wie auch zuvor mit dem Lonza-FCS, neben einer guten Plastikadhärenz die typische spindelförmige mMSC-Morphologie zeigten, wurde zunächst auf weitere Charakterisierungen verzichtet.

Auf Grund des nun jedoch gezeigten Verlustes der Protektion, der sich für die aus diesen mMSCs isolierten EVs auf letal bestrahlte mHSCs darstellte, wurde eine weiterführende Charakterisierung in Form des Nachweises der *in vitro* Differenzierbarkeit sowie der Überprüfung von An- und Abwesenheit bestimmter Oberflächenmarker als sinnvoll erachtet. Zusätzlich sollte in einem parallelen Ansatz analysiert werden, ob die Zugabe der beiden im Wiederholungsexperiment eingesetzten Zytokine (40 pg/ml rmEGF und 2 ng/ml rmpDGFB-BB) im mMSC-Kultivierungsmedium einen Einfluss auf die Charakteristika der mMSCs haben. Für beide Nachweise wurden kryokonservierte Aliquots der entsprechenden mMSCs (bereits vor Kryokonservierung mit oder ohne Zytokine kultiviert) aufgetaut und in dem entsprechenden Sigma-FCS-haltigen mMSC-Kultivierungsmedium mit oder ohne Zytokin-Zugabe expandiert.

3.2.5.1. *In vitro* Differenzierbarkeit von mMSCs in Sigma-FCS Medium mit und ohne Zytokine

Die aufgetauten mMSCs wurden entweder in Sigma-FCS-haltigem MSC-Kultivierungsmedium mit oder ohne Zytokine für etwa 72 h kultiviert bevor die *in vitro* Differenzierungen in Adipozyten, Osteo- und Chondroblasten gestartet wurden.

Die in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesäten mMSCs ($1 \cdot 10^4$ mMSCs pro Loch) waren unter beiden Bedingungen (+/- Zytokine) nach 24 h noch nicht ausreichend konfluent für den Beginn der Differenzierung in Adipozyten und Osteoblasten, so dass die Zellen für ungefähr weitere 48 Stunden kultiviert wurden, bevor die Differenzierungen gestartet wurden.

Bei der adipogene Differenzierung waren bereits 3 Tage nach dem Start der Differenzierung in allen Ansätzen (mit und ohne Zytokine) deutlich die ersten Zellveränderungen in Form von klaren vakuolären Strukturen in einzelnen Zellen zu erkennen, anders als bei der Differenzierung mit Lonza-FCS, wo die Differenzierung deutlich später einsetzte. Der Anteil an bereits differenzierten Zellen war zu diesem Zeitpunkt außerdem in dem Ansatz mit Zytokinen merklich höher als in dem ohne. Nach 25 Tagen zeigte die mikroskopische Untersuchung, dass fast alle mMSCs unter beiden Bedingungen differenziert waren, während die mitgeführten Kontrollen für +/- Zytokin-Zugabe weiterhin als reine, undifferenzierte mMSC-Kultur erschienen. Die Differenzierung wurde daher ab diesem Zeitpunkt beendet und zur Bestätigung, dass es sich bei den Zellveränderungen tatsächlich um für zu Adipozyten differenzierte

Zellen typische Fetttröpfchen handelt, eine modifizierte Ölrot-O-Färbung (siehe Abschnitt 2.2.8.2.2; 90 min mit Sudan Rot B) durchgeführt.

Unter beiden Bedingungen konnte in den Differenzierungsansätzen eine Anreicherung des lipophilen Azofarbstoffes Sudan Rot B in den gebildeten Fettvakuolen gezeigt werden (ohne Zytokine Abb. 29 B und mit Zytokinen Abb. 29 H). Im Gegensatz dazu sind in den jeweiligen Kontrollansätzen reine mMSC-Kulturen ohne vorhandene Fetttröpfchen zu erkennen (Abb. 29 A und H). Folglich konnte eine Adipozytendifferenzierung der mMSCs unter Verwendung von Sigma-FCS, sowohl mit als auch ohne Zytokin-Zugabe wie zuvor unter Verwendung des Lonza-FCS nachgewiesen werden. Allerdings setzte die Differenzierung unter Verwendung des Sigma-FCSs mit 3 Tagen deutlich früher ein als mit dem Lonza-FCS. Die mit Sigma-FCS-haltigem Kulturmedium gebildeten Fettzellen unterschieden sich außerdem in ihrer Zell- und Fettvakuolenmorphologie deutlich von denen mit Lonza-FCS differenzierten Zellen. Unter Lonza-FCS zeigten die Adipozyten eine spindelförmige Morphologie mit diffus verteilten multivesikulären Zellveränderungen, wohingegen die mit Sigma-FCS (+/- Zytokine) differenzierten Zellen nicht in Spindelform, sondern zusammengezogen bis hin zu abgerundeten Formen vorlagen. Dies führte dazu, dass einige benachbarte Zellen sich überlagerten und nicht mehr klar voneinander unterschieden werden konnten. Ein weiterer Unterschied dieser mit Sigma-FCS (+/- Zytokine) differenzierten Zellen war, dass sie immer eine prägnante große Vakuole enthielten, um die sich meistens noch weitere kleine Vakuolen gebildet hatten.

Die osteogene Differenzierung wurde nach 24 Tagen Kultivierung beendet, da bereits bei optischer Betrachtung eine Plaquebildung im Zellrasen unter beiden Bedingungen (+/- Zytokine) zu erkennen war. Die Differenzierungs-induzierten Zellen wurden zusammen mit den jeweils mitgeführten Kontrollzellen für beide Bedingungen einer van Kossa-Färbung (Silbernitratnachweis) unterzogen. Sollten die Zellen zu Osteoblasten differenziert sein und Knochenmatrix gebildet haben, wird bei dieser Färbung das Kalzium aus der Matrix gegen Silberionen ausgetauscht. Die eigentliche Färbung erfolgt durch anschließende UV-Bestrahlung, durch die eine Reduktion zu kolloidalem schwarzem Silber stattfindet. Die Ansätze mit den Differenzierungs-induzierten Zellen zeigten unter beiden Bedingungen deutlich geschwärzte Knochenmatrix (Abb. 29 D ohne Zytokine und J mit Zytokinen). Dies zeigte, dass die Zellen erfolgreich zu Osteoblasten differenziert wurden, wohingegen die Kontrollansätze keine Differenzierung zeigten, da sowohl mMSCs ohne als auch mit Zytokin-Zugabe (Abb. 29 C und I) keine Färbungen aufwiesen. Im Vergleich zu der durchgeführten osteogenen Differenzierung der mit Lonza-FCS kultivierten mMSCs konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Die Differenzierung der mMSCs in Chondroblasten erfolgte eingebettet in Alginat diesmal anstatt für sieben, vierzehn Tage lang. Die Längere Differenzierungszeit wurde auf Grund früherer Experimente gewählt, bei denen zwar nach 7 Tagen eine Differenzierung detektiert werden konnte, diese aber noch nicht vollständig ausgeprägt war. Durch eine Verlängerung der Kultivierungszeit könnte diese evtl. verbessert werden, um die Differenzierung der Zellen noch deutlicher darstellen zu können. Anschließend wurden die Zell-Alginat-Kugeln zum Nachweis von gebildeten GAG einer Alcian Blau Färbung unterzogen. Als Kontrollen dienten ebenfalls in Kugeln eingebettet mMSCs, die jedoch bereits gleich nach der Herstellung ohne weitere Kultivierung gefärbt wurden. Es wurden jeweils für beide Bedingungen mindestens 5 Kontrollen nach Herstellung entnommen und gefärbt. Die Kontrollen beider mMSC-Kulturen (Abb. 29 E ohne Zytokine und K mit Zytokinen) zeigten wie auch bereits die Lonza-FCS

mMSCs (Kapitel 3.1.1.1 Abb. 17 E) kleine abgerundete Zellen und entweder keine oder nur eine sehr schwache blaue Färbung der Alginatmatrix. Dies zeigt klar, dass es sich bei den Zellen weiterhin um mMSCs handelt und keine Differenzierung stattgefunden hatte. Im Gegensatz dazu sind beide Differenzierungs-induzierten Ansätze (Abb. 29 F ohne Zytokine und L mit Zytokinen) vollständig und sehr intensiv gefärbt, wobei sich die Färbung nicht nur auf die äußere Alginatschicht beschränkt, sondern auch bei einigen Zellen die direkte Zellumrandung/-umgebung deutlich gefärbt ist. Die Intensität der Blaufärbung bei den differenzierten Zellen erscheint sogar noch intensiver als bei den mit Lonza-FCS differenzierten mMSCs (siehe Kapitel 3.1.1.1, Abb. 17 F), was vermutlich mit der längeren Differenzierungszeit von 14 Tagen einhergeht. In diesem Zusammenhang ist die Zellzahl ebenfalls in beiden differenzierten Kulturen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen merklich angestiegen, so dass eine Fokussierung auf einzelne Zellen unter dem Mikroskop nur an Randbereichen vereinzelt möglich war. Des Weiteren sind bei beiden Sigma-FCS Differenzierungen, verglichen mit den mMSCs in den Kontrollen, deutlich Zellen mit unterschiedlich stark vergrößertem Volumen zu erkennen. Im Unterschied zu der Chondroblastendifferenzierung der Lonza-FCS mMSCs liegen diese nicht zentriert in den Alginatkugeln, sondern sind über die gesamte Kugelfläche verteilt. So liegt eine besonders große Zelle z.B. direkt mittig am rechten Bildrand in Abb. 29 B. Bei diesen großlumigen Zellen handelt es sich entweder schon um Chondroblasten oder zumindest um eine Vorstufe, wodurch ein Vorliegen dieser Zellen ebenfalls eine erfolgreiche Differenzierung der mMSCs in Chondroblasten signalisiert. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass sich in Sigma-FCS-haltigem Medium (+/- Zytokin-Zugabe) kultivierte mMSCs wie zuvor auch die mMSCs mit dem verwendeten Lonza-FCS *in vitro* in alle drei Zelltypen differenzieren lassen und dies lediglich unter spezifischen Differenzierung-induzierenden Kulturbedingungen erfolgte.

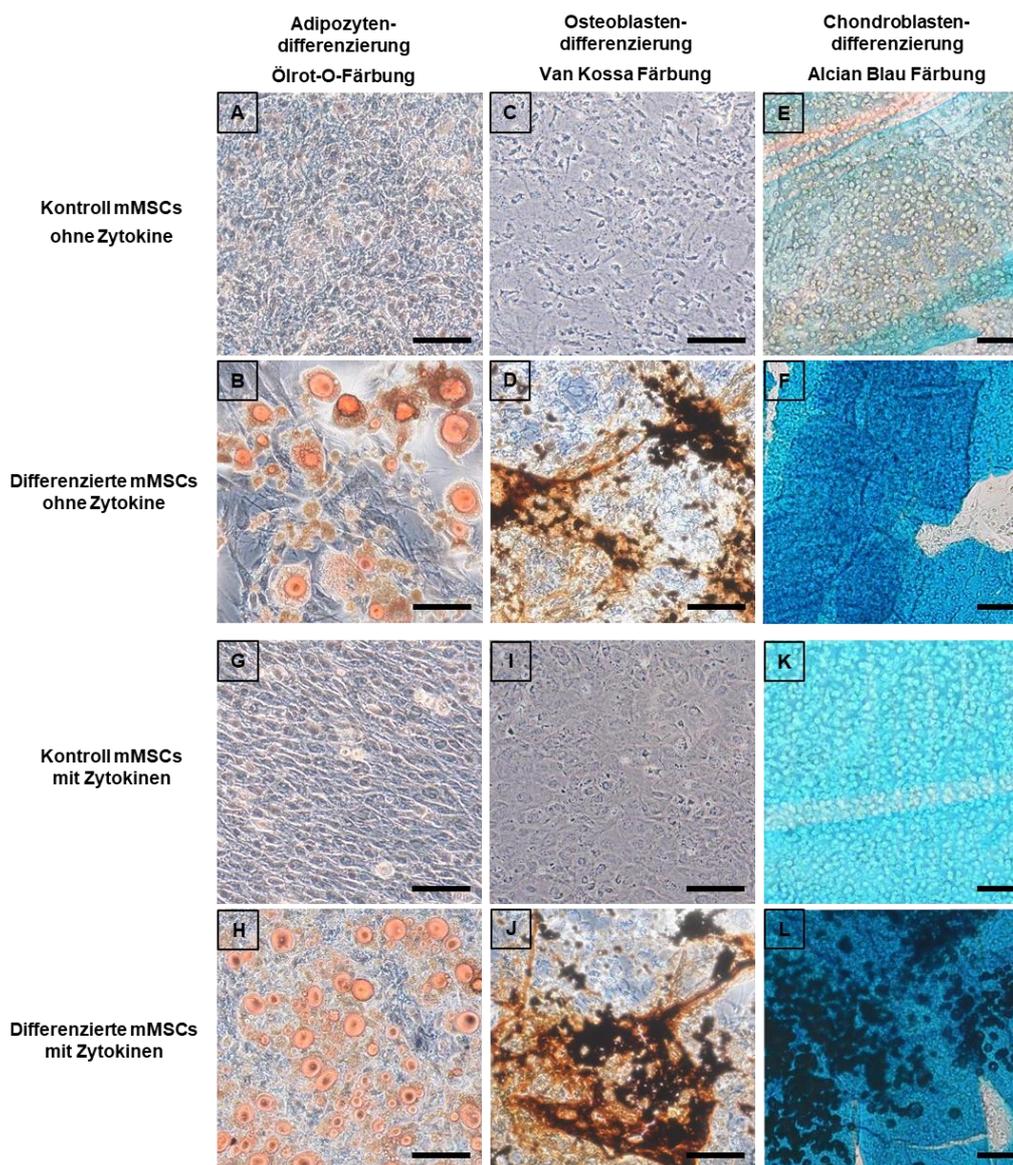


Abb. 29: Zu Chondroblasten, Osteoblasten und Adipozyten *in vitro* differenzierte mMSCs (+/- Zytokin-Zugabe). Für jede Differenzierung sowie die jeweiligen Kontrollen einer Kultivierungsbedingung (Sigma-FCS-haltiges Medium mit (+) 40 pg/ml rmEGF und 2 ng/ml rmPDGF-BB oder ohne (-)) wird ein repräsentatives Bild gezeigt. Jeder der drei Differenzierungsansätze und der entsprechenden anschließenden Färbungen wurde für beiden Kultivierungsbedingungen (+/- Zytokin-Zugabe) immer parallel durchgeführt. Murine MSCs wurden 25 Tage in Adipozyten (- Zytokine: B; + Zytokinen: H) differenziert, anschließend mit den entsprechenden undifferenzierten Kontrollen (- Zytokine: A; + Zytokinen: G) einer Ölrot-O-Färbung unterzogen. Van Kossa gefärbt wurden nach 20 Tagen die zu Osteoblasten differenzierten mMSCs (- Zytokine: D; + Zytokinen: J) und deren Kontrollen (- Zytokine: C; + Zytokinen: I). Für den Nachweis von Chondroblasten wurden die Zellen 14 Tage in Alginatkugeln differenziert (- Zytokine: F; + Zytokinen: L), bevor sie wie bereits zuvor die Kontrollen (- Zytokine: E; + Zytokinen: K) mit Alcian Blau gefärbt wurden. Die Dokumentation aller gefärbten Differenzierungen und deren Kontrollen wurde mittels Kombination aus Inversmikroskop und digitaler Spiegelreflexkamera durchgeführt. Der entsprechende Maßstab wurde in jedem Bild unten links in der Ecke mit einem schwarzen Balken angegeben. Maßstab = 100 µm.

3.2.5.2. Nachweis von charakteristischen mMSC-Oberflächenmarkern nach Kultivierung in Sigma-FCS-haltigem Medium mit und ohne Zytokin-Zugabe

Der Nachweis von typischen mMSC-Oberflächenantigenen und der Abwesenheit von epithelialen und hämatopoetischen Markern wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse der mMSCs erbracht. Die mMSCs wurden für diese Analyse ebenfalls in ihrem entsprechenden Sigma-FCS-haltigem Kultivierungsmedium (+/- Zytokine) expandiert.

Zur Einstellung der Messparameter und des Gatings am BD Canto II wurden ungefärbte Zellen verwendet. Vorversuche ergaben, dass es hinreichend war, lediglich von einer der beiden Bedingungen Kompensationskontrollen herzustellen. In diesem Fall wurden mMSCs (mit Zytokinen) zur Kompensation eingesetzt. Zum Ausschluss epithelialer und hämatopoetischer Oberflächenantigene wurden Antikörper gegen CD34, CD45, CD90.2, CD117, CD11b und MHCII genutzt. Zum Nachweis typischer mMSC-Oberflächenantigene wurden – wie bereits in den früheren Experimenten mit Lonza-FCS – CD105, CD73 und SCA-1 verwendet. Auf Grund von nicht eindeutigen Ergebnissen bei Anwendung des PE-konjugierten CD105-Antikörpers in Vorversuchen mit den in Sigma-FCS (+/- Zytokine) kultivierten mMSCs, wurde zusätzlich noch ein weiterer Antikörper gegen CD105, der stattdessen mit PE/Cy7 konjugiert war, in die Analyse miteinbezogen. Zusätzlich wurde das Panel noch um CD44 als typisches Oberflächenantigen erweitert. Für alle, außer CD44_APC/Cy7, verwendeten Antikörper standen entsprechende Isotypkontrollen zur Verfügung, die mit in die Analyse eingeschlossen wurden. Die Auswertung erfolgte wie bereits in früheren Versuchen, indem für jede dieser Isotypkontrollen ein individuelles Gating (Anteil an positiven Zellen $\leq 0,1$ %) vorgenommen wurde (siehe Abb. S1 B, Abschnitt 7.2, Anhang). Das entsprechende Gating wurde anschließend isotyp- und bedingungsabhängig auf alle passenden Messungen von mit vollständig gefärbten Zellen angewendet. Die entsprechenden Overlays der Fluoreszenzdetektion von Isotypkontrollen und Antigen-Färbung für die mMSCs (+ Zytokinen) wurden in Abb. 30 mit dem jeweils ermittelten Anteil an positiven Zellen für den analysierten Marker dargestellt. Die Ergebnisse der mMSCs (- Zytokine) ergaben für die Overlays ein vergleichbares Bild, weswegen die entsprechend ermittelten Anteile positiver Zellen lediglich in Tab. 43 zusammengefasst wurden.

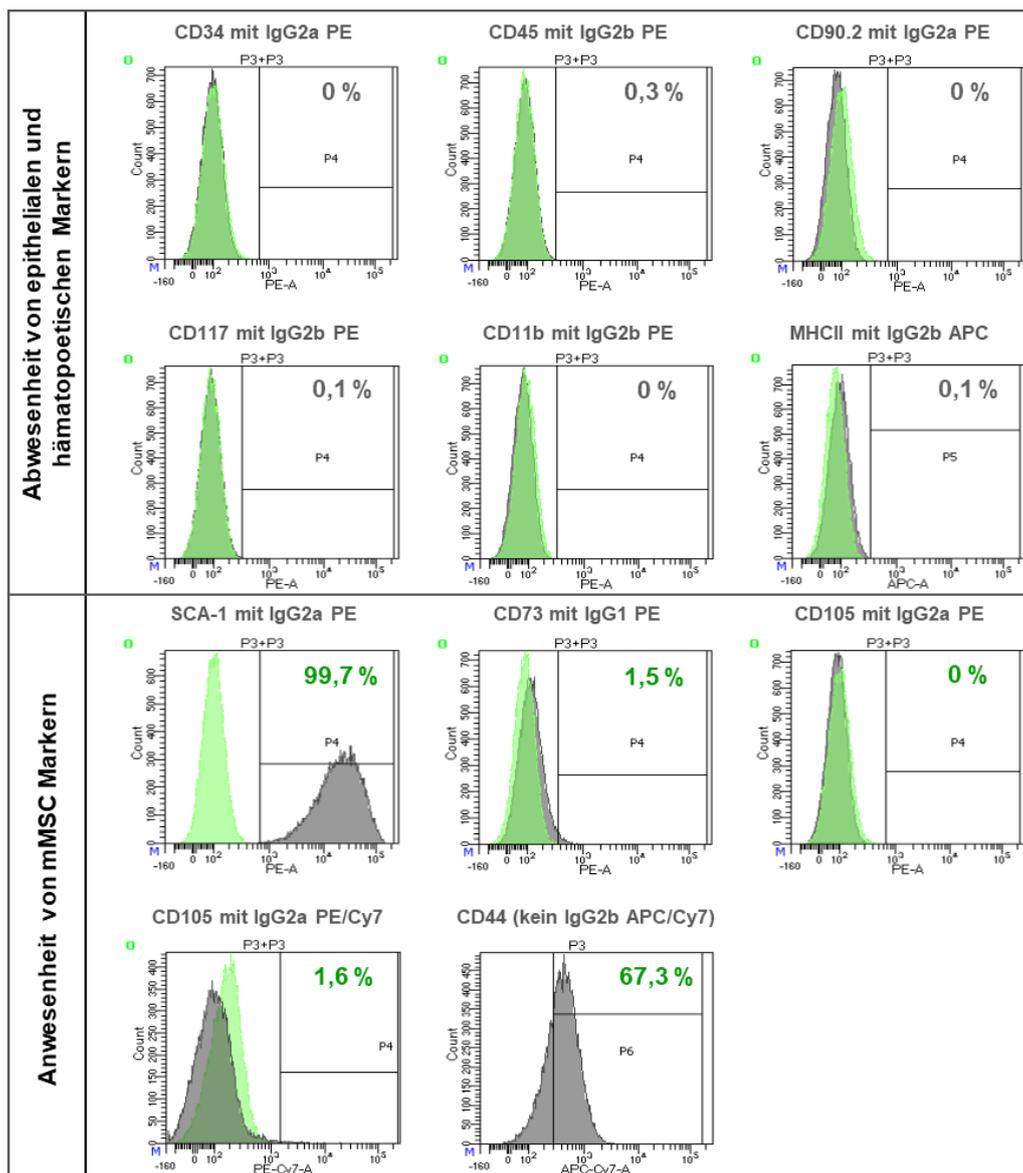


Abb. 30: Murine MSCs exprimieren in Sigma-FCS-haltigem Medium mit Zytokin-Zugabe SCA-1 und CD44, aber kein CD73 und CD105. Sie sind jedoch weiterhin negativ für CD34, CD45, CD90.2, CD11b und MHCII. Für jede Antikörperfärbung (Kompensations-, Isotypkontrollen und zu analysierende Zellen) wurden jeweils $2 \cdot 10^5$ mMSCs verwendet. Nach dem Blockieren unspezifischer Antikörperbindungen mit Fc-Block, wurden die Zellen über Nacht bei 4 °C mit jeweils einem/einer entsprechenden Erstantikörper/Isotypkontrolle inkubiert. Die mitgeführten Isotypkontrollen dienten zur Eliminierung des Hintergrundsignals der Antikörper. Für die Diskriminierung von lebenden Zellen wurde anschließend noch jede Probe mit 7AAD gefärbt. Alle gefärbten Zellen wurden am BD FACS Canto II in der FACS Sorting Core Unit des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf analysiert. Für die Auswertung wurde eine Überlagerung (O) der jeweiligen Messung von antikörpergefärbten Zellen (graue Fläche) mit der der entsprechenden Isotypkontrolle (hellgrüne Fläche) erstellt und der Anteil an lebenden positiven Zellen für den jeweils gefärbten Oberflächenmarker angegeben. Die Messergebnisse wurden als Histogramm dargestellt, indem die Anzahl der Zellen (linear) gegen die jeweilige Fluoreszenzintensität (logarithmisch) aufgetragen wurde. *Count* = Zellanzahl.

Tab. 43: Zur Charakterisierung der mMSCs, kultiviert ohne Zytokin-Zugabe, wurden spezifische Oberflächenantigene gefärbt. Für den Nachweis wurden für jede Antikörperfärbung (Kompensations-, Isotypkontrollen und zu analysierende Zellen) jeweils 2×10^5 mMSCs verwendet. Nach dem Blocken unspezifischer Antikörperbindungen mit Fc-Block, wurden die Zellen über Nacht bei 4 °C mit jeweils einem/einer entsprechenden Erstantikörper/Isotypkontrolle inkubiert. Die mitgeführten Isotypkontrollen dienten zur Eliminierung des Hintergrundsignals der Antikörper. Für die Diskriminierung von lebenden Zellen wurde anschließend noch jede Probe mit 7AAD gefärbt. Alle gefärbten Zellen wurden am BD FACS Canto II in der FACS Sorting Core Unit des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf analysiert. Für die Auswertung wurde eine Überlagerung der jeweiligen Messung von antikörpergefärbten Zellen mit der der entsprechenden Isotypkontrolle erstellt und der Anteil an lebenden positiven Zellen für den jeweils gefärbten Oberflächenmarker in dieser Tabelle angegeben.

Antikörper	Epitheliale und hämatopoetische Marker						mMSC-Oberflächenantigene				
	CD34 PE	CD45 PE	CD90.2 PE	CD117 PE	CD11b PE	MHCII APC	Sca-1 PE	CD73 PE	CD105 PE	CD105 PE/Cy7	CD44 APC/Cy7
Isotyp- kontrolle Typ IgG	2a PE	2b PE	2a PE	2b PE	2b PE	2b APC	2a PE	1 PE	2a PE	2a PE/Cy7	-
Antigen positiver Anteil [%]	0,2	0,2	0,1	0	0	2,9	100	0,4	0,1	3,8	54,2

Die durchflusszytometrische Analyse der mit Sigma-FCS-haltigem Medium mit (Abb. 30) und ohne (Tab. 43) Zytokin-Zugabe kultivierten mMSCs zeigte für die ausgewählten epithelialen und hämatopoetischen Marker CD34, CD45, CD90.2, CD117 und CD11b eine klare Abwesenheit auf den mMSCs. Ähnlich wie bereits bei mMSCs in Lonza-FCS-haltigem Medium lag der prozentuale Anteil an positiven Zellen für die genannten Marker zwischen 0,0 und 0,3 %. Lediglich der Anteil an MHCII-positiven Zellen betrug bei den mMSCs (ohne Zytokine) 2,9 %, was mehr als doppelt so viele Zellen wie bei den Lonza-FCS mMSCs (1,2 %) waren. Dahingegen wurden bei mMSCs (mit Zytokinen) nur 0,1 % MHCII-positive Zellen detektiert. Weitere nicht gezeigte Analysen der mMSCs (ohne Zytokine) ergaben ebenfalls nur einen Anteil von 0,1 bis 0,3 % MHCII-positiven mMSCs, sodass bei den oben genannten 2,9 % von einer biologisch vernachlässigbaren Varianz ausgegangen wird. Bei dem Nachweis der spezifischen mMSC-Oberflächenantigene hingegen waren die Ergebnisse für beide Bedingungen (+/- Zytokin-Zugabe) nicht wie erwartet. Die mMSCs waren unter beiden Kulturbedingungen bis zu 100 % SCA-1 positiv, jedoch konnten weder CD105 noch CD73 auf den mMSCs (+/- Zytokine) nachgewiesen werden – auch nicht bei weiteren Messungen (Daten nicht gezeigt). Dementgegen waren Lonza-FCS kultivierte mMSCs fast alle für CD105 und 43 % der Zellen für CD73 positiv. Auch ein Wechsel des CD105-Antikörpers (anstatt PE mit PE/Cy7 konjugiert) zeigte bei den mMSCs ohne Zytokine nur einen positiven Anteil von 3,8 % und bei mMSCs ohne Zytokine waren sogar nur noch 1,6 % CD105 positive Zellen detektierbar. Demnach ist ein Defekt des ersten verwendeten CD105-Antikörpers als Ursache für den fehlenden Nachweis von CD105 ausgeschlossen. Stattdessen musste davon ausgegangen werden, dass die vorliegenden mMSCs aus Sigma-FCS-haltigen Kulturen mit und ohne Zytokine die Oberflächenantigene CD105 und auch CD73 tatsächlich nicht exprimierten. Aus diesem Grund wurde zusätzlich CD44 mit in die Analyse integriert, da CD44 laut Literatur (Caroti *et al.* 2017) ebenfalls als Oberflächenantigen zur Charakterisierung von mMSCs verwendet wird. Für diesen Marker konnte tatsächlich ein positiver Anteil von 67 % (+ Zytokine) bzw. 54 % (- Zytokine) detektiert werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen, vor allem auch auf Grund der Abwesenheit von allen gewählten epithelialen und hämatopoetischen Markern, konnte geschlossen werden, dass es sich auch bei den beiden Sigma-FCS mMSC-Kulturen (+/- Zytokin-Zugabe) um reine mMSC-Kulturen handelte. Diese unterscheiden sich zwar hinsichtlich einiger Charakteristika, wie der Anwesenheit von den

speziellen Oberflächenmarkern CD105 und CD73 sowie einer deutlich schnelleren Differenzierbarkeit in Adipozyten, von den früheren mMSC-Kulturen (Lonza-FCS). Allerdings konnte kein Unterschied in den vorliegenden Charakteristika der mMSCs durch Zugabe von den beiden Zytokinen rmEGF und rmPDGF-BB ermittelt werden. Folglich konnte die *in vitro* Differenzierbarkeit der mMSCs in Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten, ebenso wie die Abwesenheit von epithelialen und hämatopoetischen Markern sowie die Anwesenheit von typischen mMSC-Oberflächenantigenen unabhängig von der Zytokin-Zugabe unter Verwendung von Sigma-FCS gezeigt werden.

3.3. Transkriptomanalyse von mMSC-EVs und deren parentalen mMSCs

Es wurden unbehandelte mMSCs in Lonza-FCS-haltigem mMSC-Kultivierungsmedium in unabhängigen Triplikaten expandiert und die aus diesen Kulturen gewonnen EVs sowie die parentalen Zellen für NGS verwendet. Sowohl von den EV-Präparaten als auch von den parentalen mMSCs wurde die aufbereitete RNA von der Forschungsgruppe Virus Genomik, welche die Technologieplattform „Hochdurchsatzsequenzierung“ (NGS, Next Generation Sequencing) am Heinrich-Pette-Institut leitet, auf ihre Integrität hin überprüft bevor sie anschließend die NGS durchführten. Dabei wurde ausgehend von den gewonnen Sequenzen ermittelt, welche Gene in allen drei EV- und allen drei mMSC-Proben exprimiert vorlagen. Nur diese wurden im weiteren Verlauf berücksichtigt, in dem untersucht wurde, ob die Expression der detektierten Gene in den mMSC-EVs verstärkt oder vermindert vorlag. Als Referenz für diese Analyse dienten die Ergebnisse der mMSCs. Insgesamt wurden 2461 Ergebnisse für eine signifikante Anreicherung (hochregulierte Gene \equiv angereicherte RNAs) und 2410 verschiedene Gene mit einer vorliegenden signifikanten Expressionsreduktion (runterregulierte Gene \equiv reduzierte RNAs) in den mMSC-EVs detektiert. Auf Grund der Datenmenge wurde erst ab einem \log_2 Expressionsverhältnis mit dem Wert von ± 2 begonnen für die detektierten Gene anhand der bereits übermittelten Daten sowie einer ausgedehnten Literaturrecherche, die bekannte Hauptfunktion im Organismus zu ermitteln. Dies traf auf 1015 hochregulierte und 1170 runterregulierte Gene/Sequenzen zu. Bei 1007/1015 dieser in EVs hochregulierten und bei allen 1170 runterregulierten Gene konnte jedes Gen auf Grund seiner hauptsächlich biologischen Funktion in eine der folgenden 12 übergeordneten Gruppen eingeordnet werden: Zellbeweglichkeit, Stressmanagement, Genomstabilität, Transkriptionsregulation, Zellintegrität, Energieversorgung, Proteinsynthese, Zytoprotektion, Morphogenese, Zellzykluskontrolle (ausschließlich in Kombination mit Proliferation bei RNAs, die reduziert in EVs vorliegen), Differenzierung (ausschließlich in Kombination mit Proliferation bei RNAs, die angereichert in EVs vorliegen) und unbekannte Funktion. Der Übersicht halber wurde nach der jeweiligen Zuordnung zu den jeweiligen Gruppen sowohl für die in EVs angereicherten, als auch für die in EVs reduzierten RNAs, ein Kreisdiagramm (siehe Abb. 31) erstellt. Dort wird für jede Gruppe anteilig dargestellt, wie viele der detektierten Gene dort zugeordnet wurden.

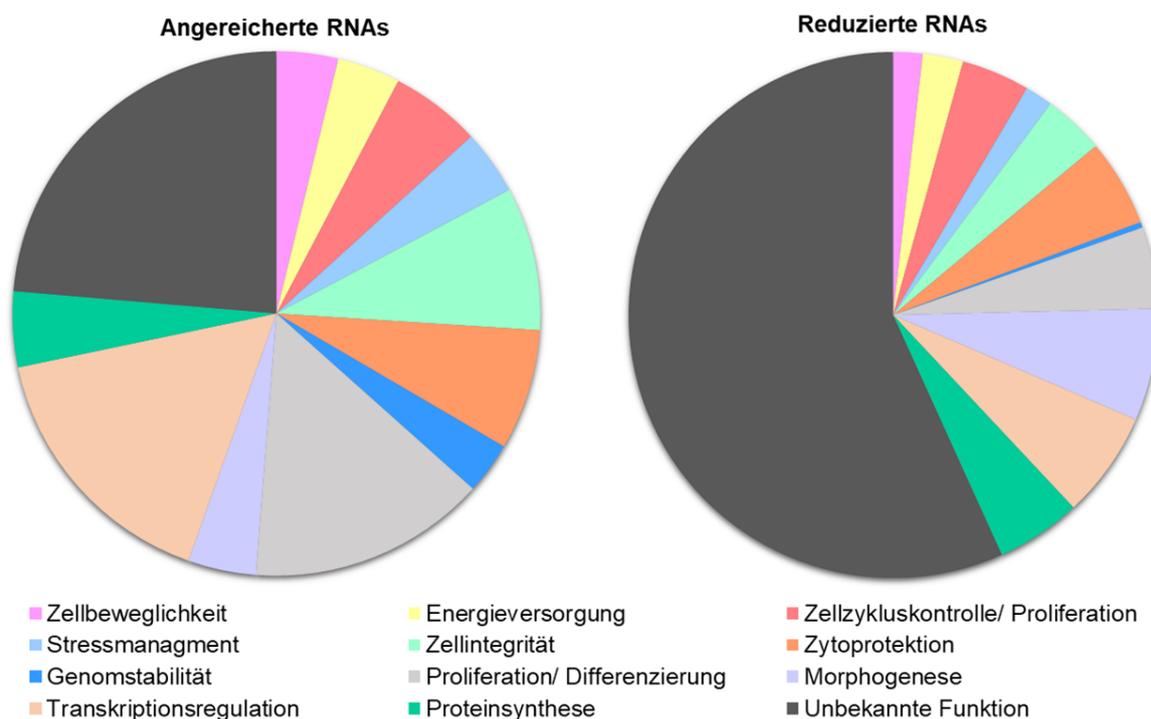


Abb. 31: Funktionale Gruppierung der in mMSC-EVs angereicherten oder reduzierten RNAs. Murine MSCs aus drei verschiedenen Kulturen sowie die von diesen Kulturen isolierten EVs wurden einer Sequenzierung der nächsten Generation unterzogen. Nur in allen 6 Proben (3x EVs und 3x mMSCs) detektierte Sequenzen wurden für die weitere bioinformatische Auswertung berücksichtigt. Bei dieser Auswertung dienten die Ergebnisse der mMSCs als Referenz, so dass ermittelt werden konnte, welche exprimierten Gene in den EVs angereichert (linkes Bild) oder reduziert (rechtes Bild) vorlagen. Ab dem signifikanten Unterschied von ± 2 des \log_2 Expressionsverhältnisses, wurden die detektierten Gene anhand ihrer hauptsächlichsten biologischen Funktion im Organismus einer der 12 gezeigten Gruppen zugeordnet. Bei der Gruppe „Differenzierung“, sind ausschließlich die angereicherten RNAs, welche eine Proliferationsfunktion besitzen, mit einbezogen, wohingegen die reduzierten RNAs mit Proliferationsfunktion in die Gruppe Zellzykluskontrolle integriert wurden. Insgesamt konnten im Vergleich zu den parentalen mMSCs in EVs für 1007 verschiedene hochregulierte Gene (linkes Bild) und für 1170 runterregulierte Gene (rechtes Bild) eine Funktion zugeordnet werden.

Bei der funktionellen Einordnung der in EVs angereicherte oder reduziert vorliegende RNAs fiel auf, dass die Funktion der in EVs hochreguliert vorliegenden Gene meist einen gegenteiligen Effekt zu den runterregulierten aufwiesen. Als bestes Beispiel dafür kann die Zytoprotektionsgruppe genannt werden. Die Funktion der angereicherten RNAs waren hier anti-apoptotischer und anti-inflammatorischer Natur, während bei den reduzierten RNAs vor allem eine apoptotische und inflammatorische Beteiligung aufgedeckt werden konnte. Analog liegt dies in der Stressmanagement-Gruppe vor, wo die reduziert vorliegende Genexpression eher im Zusammenhang mit oxidativem Stress und Toxifikation steht, wohingegen die angereicherten RNAs in dieser Gruppe eben diesen Stress verringern/eliminieren. Ebenso wie die gefundenen reduziert vorliegenden RNAs an der Herabsetzung der Zellintegrität und Energieversorgung, Störung der Genomstabilität, dem Blockieren von Proteinsynthese und Transkriptionsregulation beteiligt zu sein scheinen.

Verglichen mit der damals durchgeführten Proteomanalyse der EVs, wurde bei der in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptomanalyse wesentlich umfangreichere Daten erhalten. Wo diesmal weit über 1000 verschiedene Sequenzen für angereicherte und reduziert vorliegende RNAs in den EVs detektiert werden konnten, wurden zuvor insgesamt nur 236 Proteine in EVs gefunden. Auch war die Gruppeneinteilung für die detektierten Proteine damals etwas anders gewählt worden als nun bei den RNAs. Es gab z.B. eine zusätzliche Detoxifikations-Gruppe, die bei der RNA-Einordnung mit in die

Gruppe Stressmanagement integriert wurde. Ebenso wurde aus den beiden einzelnen Gruppen für Anti-Apoptose und Anti-Entzündung eine gemeinsame Gruppe unter der Bezeichnung Zytoschutz gebildet. Für die Gruppe zur Nischenintaktheit gab es bei der Transkriptomanalyse keine Zuordnungen, wodurch diese Gruppe entfiel. Im Gegenzug dazu wurden jedoch noch weitere Gruppen wie Proteinsynthese, Transkriptionsregulation, Morphogenese, Proliferation/Differenzierung und unbekannte Funktion, die auch Pseudogene umfassten, für die funktionelle Einordnung aller detektierten RNAs benötigt. Die Gruppe der unbekannt Funktion umfasst sowohl bei angereicherten als auch bei reduziert vorliegenden RNAs die meisten Zuordnungen, wobei sie bei den reduziert vorliegenden RNAs sogar weit mehr als die Hälfte ausmacht. Diese Kategorie „unbekannte Funktion“ ist besonders für die weitere Erforschung, welche der in EVs geladenen Moleküle an der Protektion von letal bestrahlten HSCs beteiligt sein könnten, interessant. Es ist vorstellbar, dass sich unter den vielen funktionell unbekannt RNAs noch mindestens ein geeigneter Kandidat befindet, der protektive Eigenschaften aufweist. Auch besteht die Möglichkeit, dass diese RNAs für andere regenerative oder immunmodulierende Eigenschaften der EVs verantwortlich sind, wodurch eine genauere Betrachtung dieser RNAs und die Aufklärung ihrer Funktionen allgemein einen Fortschritt in der EV-Forschung darstellen könnte. Basierend auf den umfangreichen Sequenzergebnissen ist dies ein Projekt, welches die Zusammenarbeit und Kompetenzen verschiedener Arbeitsgruppen benötigt und sicherlich die nächsten Jahre andauern würde. Insgesamt wurde durch die NGS bereits eine große Anzahl RNAs entschlüsselt, die in EVs signifikant hoch- oder runterreguliert waren und womöglich einige davon an der Protektion der HSCs beteiligt sind. Eine nähere Auswahl oder Eingrenzung fand im Rahmen dieser Arbeit jedoch noch nicht statt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte, sowohl durch Cytospins als auch mittels ImageStream, nachgewiesen werden, dass in letal bestrahlte murine Empfängertiere *i.v.* applizierte MSC-EVs direkt pluripotente HSCs im KM ansteuern. Dies zeigt, dass die Wiederherstellung der Hämatopoese, welche bereits zuvor nach EV-Gabe festgestellt wurde (Schoefinius *et al.* 2017), durch direkte Interaktion der EVs mit HSCs erfolgt. Diese gezielte Interaktion kann bereits 2 h nach TX detektiert werden, ebenso wie nach 4 h ohne signifikante Unterschiede. Die durchschnittliche Anzahl an EVs pro Zelle variiert jedoch je nach Experiment.

Des Weiteren wurden die drei, ausgehend von der Proteomanalyse ausgewählten Kandidaten (SOD1, PRDX1 und GAL1) auf ihre Fähigkeit bestrahlte HSCs zu protektieren hin untersucht. Es wurden dazu alle drei Kandidaten alleine sowie in Kombination nachweislich erfolgreich mittels shRNA in mMSCs runterreguliert. Ebenso waren diese spezifischen Runterregulationen in den jeweils aus den verschiedenen mMSC-Kulturen erhaltenen EVs detektierbar. Die anschließende Testung der entsprechenden EVs in *in vitro* Radioprotektionsassays brachte jedoch keine abschließenden Ergebnisse bzgl. der Beteiligung an der Protektion hervor. Dies liegt darin begründet, dass auch die mitgeführten EV-Kontrollen (EVs aus unbehandelten mMSCs) ebenfalls keine Protektion mehr aufwiesen, die jedoch in früheren Experimenten, sowohl reproduzierbar als auch signifikant nachweisbar war. Demzufolge sind die durchgeführten Assays selbst unter verschiedenen Parametern (+/- Zytokin-Zugabe bei Kultivierung, Anpassung der Strahlendosis etc.) nicht aussagekräftig. In diesem Zusammenhang wurden bei der Charakterisierung der mit und ohne Zytokin-Zugabe kultivierten

mMSCs (Sigma-FCS) einige Unterschiede zu früheren mMSC-Linien (Lonza-FCS) entdeckt. Diese bestanden vor allem darin, dass mit Sigma-FCS die Zellen wesentlich schneller und vermehrt in Adipozyten differenzieren. Des Weiteren wurde auch eine Veränderung in den typischen mMSC-Oberflächenmarkern detektiert. So exprimieren die in dieser Arbeit verwendeten mMSCs (Sigma-FCS) nicht mehr CD105 und CD73. Ob diese Veränderung Einfluss auf die protektiven Eigenschaften der EVs hat oder andere noch nicht getestete Parameter den Protektionsassay stören/blockieren bleibt offen und bedarf weiteren Untersuchungen.

Zu guter Letzt wurden mittels NGS die signifikant reduzierten und angereicherten RNAs in mMSC-EVs im Vergleich zu den parentalen mMSCs ermittelt. Für beide Gruppen (angereichert, reduziert) wurden die detektierten RNAs entsprechend ihrer hauptsächlichen biologischen Funktion in verschiedene Gruppen eingeteilt. Eine weitere Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich ihres Nutzens steht noch aus.

4. Diskussion

Bei einer Exposition des menschlichen Körpers mit ionisierender Strahlung (TBI) von einer Strahlendosis größer als 1 Gy in einem kurzen Zeitraum kommt es auf Grund der zellschädigenden Wirkung zu einem akuten Strahlensyndrom. Als erstes ist vor allem das strahlensensitive hämatopoetische System betroffen, was sich unter anderem in einer Myelosuppression zeigt. Diese lässt sich bei geringen Strahlendosen (< 3,5 Gy) durch medizinische Versorgung noch effektiv revertieren. Darüber hinaus kommt es jedoch auf Grund der myeloablativen Wirkung zur anhaltenden Form, welche ohne Knochenmark- (KM) oder Stammzelltransplantation (HSC-TX) zum Tode führt (Dainiak 2002; Shao *et al.* 2014). Beide Transplantationen bringen eine Vielzahl an Komplikationen und Nebenwirkungen mit, welche im schlimmsten Fall ebenfalls den Tod zur Folge haben können. Allerdings sind sie bis heute die einzigen zugelassenen Behandlungsformen. Demzufolge wird weiterhin an adäquaten Alternativen geforscht, welche eine effiziente Behandlung mit möglichst wenigen Nebenwirkungen bieten. Bei diesen Bestrebungen zeigte sich im Tiermodell, dass eine MSC-TX ohne zusätzliche HSC-TX nach letaler TBI (9,5 Gy) zu einer vollständigen Wiederherstellung der Hämatopoese in den Empfängertieren führte (Lange *et al.* 2011; Yang *et al.* 2012; Lange *et al.* 2015). Anschließend konnte ebenfalls *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden, dass die regenerativen Effekte der MSCs auf die von ihnen sezernierten EVs zurückzuführen sind. Die dafür durchgeführten Untersuchungen belegten, dass bereits die Verabreichung von ausschließlich MSC-EVs ohne zusätzliche MSC-TX oder HSC-TX nach letaler TBI (9,5 Gy) ausreicht, um das Überleben der Empfängertiere zu gewährleisten und die Hämatopoese wieder herzustellen (Wen *et al.* 2016; Schoefinius *et al.* 2017).

Ausgehend von diesem Wissensstand sollte im Rahmen dieser Arbeit die Frage beantwortet werden, ob die transplantierten mMSC-EVs unmittelbar die durch die Bestrahlung beschädigten Stamm-/Progenitorzellen im KM ansteuern und so zu einer direkten Protektion führen, oder ob es sich um einen indirekten Support handelt, bei dem noch andere bis dato unbekannte Zellen beteiligt sind. Für die Untersuchung dieser Fragestellung wurden letal bestrahlten Empfängertieren PKH26-gefärbte mMSC-EVs transplantiert.

Nachdem so die Zielzellen der mMSC-EVs im KM identifiziert worden waren, stellte sich die Frage, wie die Protektion auf molekularer/biochemischer Ebene ausgeübt wird. Demzufolge war es ebenso Teil dieser Arbeit die biologischen Moleküle (RNAs und Proteine), welche von den mMSC-EVs transportiert werden, zu identifizieren. Aus diesen Daten sollten im weiteren Verlauf geeignete Kandidaten, die auf Grund ihrer bekannten Funktionalität womöglich ebenfalls maßgeblich an den beobachteten radioprotektiven Effekten auf bestrahlte HSCs beteiligt sein könnten, ausgewählt und dahingehend getestet werden. Als Grundlage, welche biologischen Funktionen auch für eine Radioprotektion eine Rolle spielen könnten, dienten Genexpressionsdaten nach TBI und anschließender mMSC-EV-TX. Diese zeigten im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren, dass z.B. die Expression von Genen, die an Stressmanagement, Detoxifikation, Anti-Apoptose, Anti-Inflammation und Überleben beteiligt sind, signifikant hochreguliert vorlagen und somit Anteil an den protektiven Effekten haben könnten. Im Gegensatz dazu wurde eine starke Suppression von Genen, die z.B. eine Rolle für Toxifikation,

Apoptose und Inflammation spielen, detektiert, welche folglich in diesem Fall keine protektiven Eigenschaften aufweisen sollten (Lange *et al.* 2011).

Eine Proteomanalyse von den mMSC-EVs war bereits vor Beginn dieser Arbeit durchgeführt und aus den gewonnenen Daten drei vielversprechende Kandidaten (GAL1, SOD1, PRDX1) ausgewählt worden. Sowohl die Kupfer/Zink Superoxid Dismutase 1 (SOD1), als auch das Peroxiredoxin-1 (PRDX1) dienen in der Zelle der Eliminierung von oxidativem Stress, welcher unter anderem auch durch ionisierende Strahlung entsteht, indem sie die auftretenden zellschädigenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) reduzieren (Klein *et al.* 2017; Sharapov and Gudkov 2020; Xu *et al.* 2022). Galectin-1 (GAL1) hingegen wirkt immunmodulierend, wobei es hauptanteilig eine anti-inflammatorische Wirkung aufweist (Cutine *et al.* 2021). Zusätzlich scheint GAL1 an dem DNA-Reparatur-Mechanismus nach Bestrahlung beteiligt zu sein (E.Y. Huang *et al.* 2012). Zur Überprüfung der vermuteten protektiven Eigenschaft nach letaler Bestrahlung, wurden alle drei Kandidaten einzeln sowie zusammen mittels lentiviral stabil integrierter shRNAs in mMSC runterreguliert. Anschließend wurden von allen diesen neu generierten mMSC-Linien EVs geerntet. Diese EVs wurden schlussendlich zusammen mit Kontroll-EVs (unbehandelte mMSCs und mit scr_shRNA transduzierte mMSCs) in einem *in vitro* Radioprotektionsassay analysiert.

Zusätzlich gelang es zu den schon bereits vorliegenden Proteomdaten, die in den mMSC-EVs enthaltenen RNAs zu identifizieren. Bei der dafür durchgeführten Transkriptomanalyse wurden im Gegensatz zu der Proteomanalyse die parentalen Zellen zusätzlich zu den aus ihnen generierten EVs analysiert. Dies ermöglichte aus den gewonnenen Daten diejenigen RNAs herauszufiltern, welche im Vergleich zu den parentalen Zellen in den mMSC-EVs angereichert oder reduziert vorlagen. Die identifizierten RNAs wurden dann wiederum auf Grund ihrer bekannten hauptsächlichen biologischen Funktion eingruppiert, um anschließend weitere mögliche Kandidaten für die Radioprotektion auswählen und testen zu können. Die dabei festgelegten Gruppen entsprachen dabei teilweise denen, die auch bereits in der Proteomanalyse entdeckt wurden, wie Zellbeweglichkeit, Energieversorgung, Zellzykluskontrolle, Stressmanagement und Zellintegrität. Einige Gruppen wurden zu einer neuen Gruppe zusammengefasst. So enthält die Gruppe Zytoprotektion z.B. alle RNAs, die (anti-)apoptotisch oder (anti-)inflammatorisch wirken. Andere Gruppen, wie die Stammzellnischenintegrität, entfielen, da keine RNAs gefunden wurden, die diesen Gruppen hätten zugeordnet werden können. Im Gegensatz dazu wurden jedoch RNAs gefunden für die es bisweilen noch keine passende Gruppenbeschreibung gab. Daher wurden die weiteren Gruppen Proteinsynthese, Transkriptionsregulation, Morphogenese, Proliferation/Differenzierung und unbekannte Funktion, die auch Pseudogene umfassten, angelegt.

4.1. Identifikation der mMSC-EVs Zielzellen im Knochenmark letal bestrahlter Rezipienten

4.1.1. Bei den für die EV-Produktion verwendeten Zellen handelte es sich um eine reine mMSC-Linie

Für die Identifizierungsversuche der Zielzellen von transplantierten mMSC-EVs nach letaler Bestrahlung wurden die EVs *in vitro* von einer unbehandelten mMSC-Linie generiert. Die verwendete Zelllinie wurde unter den entsprechenden verwendeten Kultivierungsbedingungen (Lonza-FCS ohne zusätzliche Zytokine) ausführlich charakterisiert, um zu gewährleisten, dass es sich bei der Zelllinie um eine reine mMSC-Kultur handelte. Die Zellen zeigten unter Verwendung von Lonza-FCS-haltigem

MSC-Kultivierungsmedium eine typische Plastikadhärenz mit einer vorwiegend spindelförmigen Morphologie sowie eine *in vitro* Differenzierbarkeit in Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten, die ausschließlich nach jeweiliger Induktion stattfand. Des Weiteren besaßen die meisten Zellen in einer Kultur die typischen MSC-Oberflächenmarker SCA-1 (92,4 %), CD73 (43,1 %) und CD105 (98,6 %), und waren darüber hinaus generell frei von epithelialen und hämatopoetischen Markern (Baddoo *et al.* 2003; Da Silva Meirelles and Nardi 2003; Lindner *et al.* 2010). Dass nicht alle mMSCs CD73 exprimierten, ist nicht ungewöhnlich, da aus mehreren Tieren alle im KM ansässigen MSCs isoliert wurden, so dass schlussendlich eine heterogene Zellpopulation gewonnen wurde. Diese entspricht am besten den im KM vorliegenden physiologischen Bedingungen. Es ist bekannt, dass die verschiedenen Subpopulationen sich hinsichtlich der Expression von Oberflächenmarkern unterscheiden. So wurden von Tan *et al.* für humane aus verschiedenen Geweben isolierte MSCs auch unterschiedliche Zusammensetzungen an CD73 hoch positiven und CD73 niedrig positiven Zellen gefunden (Tan *et al.* 2019). Da in dieser Arbeit der Anteil positiver Zellen für die Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie unter Zuhilfenahme von Isotypkontrollen detektiert wurde, ist ein Unterscheiden zwischen CD73 negativen oder CD73 gering positiven Zellen nicht möglich. Demzufolge ist es gut möglich, dass nicht 66,9 % der mMSC negativ für CD73 sind, sondern anteilig eine sehr geringe Expression aufweisen. Da dies jedoch bis dato nicht relevant für die von uns durchgeführten Versuche war, wurden keine weiterführenden Untersuchungen dazu durchgeführt. Basierend auf den ermittelten Ergebnissen wurde die analysierte mMSC-Linie als reine Zelllinie eingestuft.

4.1.2. Ausgehend von der mMSC-Linie konnten reine EV-Präparate isoliert werden

Die von der reinen mMSC-Linie produzierten EVs konnten ebenfalls durch die Detektion der typischen EV-Marker HSP70, FLOTELLIN, TGS101 und CD9 via Western Blot Analyse sowie der Abwesenheit von Calnexin als zellulären Kontaminationsmarker als reine EV-Präparate charakterisiert werden (Théry *et al.* 2018). Zu der Zeit, in der die EV-Proben generiert wurden, wurden diese anschließend lediglich durchflusszytometrisch vermessen, um die ungefähre Partikelkonzentration zu erhalten. Nachdem jedoch die Möglichkeit bestand die isolierten EVs mittels einer Nanopartikel Verfolgungsanalyse (engl.: *nanoparticle tracking analysis* - NTA) zu charakterisieren und somit neben der Partikelkonzentration zusätzlich auch gleich noch eine Größenverteilung der vorliegenden Partikel als weiteres Charakteristikum zu erhalten, wurden bereits vorhandene EV-Proben, deren Konzentration zuvor mittels Durchflusszytometrie ermittelt wurde, einer NTA unterzogen. Der direkte Vergleich zwischen beiden Verfahren zeigte klar, dass die Partikelkonzentration, welche mittels Durchflusszytometrie erhalten wurde, wie erwartet auf Grund der bekannten *swarm detection* (van der Pol *et al.* 2014) im Durchschnitt um den Faktor 500 niedriger war als die mittels NTA ermittelte Partikelkonzentration. Zusätzlich zeigten die EVs in der NTA eine homogene Population mit einem durchschnittlichen Modalwert von 145 nm. Demzufolge waren die Präparate frei von sehr großen Vesikeln, bei denen es sich zum einem um ungewollte apoptotische Körperchen handeln könnte oder zum anderen um besonders große Mikrovesikel. Dieser Verlust wiederum war zwar nicht gewollt gewesen, jedoch auf Grund einer fehlenden Unterscheidungsmöglichkeit beider Partikel mittels der gewählten seit Jahren gut etablierten Aufreinigungsmethode (differentielle Zentrifugation mit anschließender Ultrazentrifugation) unvermeidlich. Ursache dafür ist die Größenüberlappung beider Partikel. Die kleinsten apoptotischen

Körperchen verzeichnen eine Größe von 500 nm, während die größten Mikrovesikel 1.000 nm erreichen (Théry *et al.* 2009; Reiners *et al.* 2017). Insgesamt kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Präparate aus einer Mischung von verschiedenen Partikeln mit unterschiedlichen Größen zwischen ca. 50 - 500 nm bestanden und somit physiologische Bedingungen widerspiegeln anstatt sich auf eine Subpopulation zu beschränken.

4.1.3. Murine MSC-EVs kolokalisieren im Knochenmark nach letaler Bestrahlung vordringlich mit pluripotenten Stammzellen

Nach *i.v.* TX von PKH26-markierten mMSC-EVs in letal bestrahlte (9,5 Gy) Empfängertiere wurde, wie bereits in der Literatur beschrieben, eine schnelle Verteilung und Aufnahme der EVs aus dem Blut in das Gewebe erwartet (O'Dea *et al.* 2020). Und tatsächlich konnte in den Cytospins des Knochenmarks der Versuchstiere bereits 2 h nach TX eine Kolokalisation der transplantierten EVs mit bevorzugt Sca-1 hoch positiven (SCA-1^{hoch+}), aber auch mit C-KIT gering positiven (C-KIT^{gering+}) Zellen detektiert werden. Vier Stunden nach TX waren weiterhin noch Interaktionen zu erkennen, jedoch wurden pro Antigen-positiver Zelle weniger EVs detektiert. Interessanterweise wurden keine mMSC-EVs in der Lunge oder der Milz gefunden, wie es bei den TX von reinen mMSCs der Fall war (Lange *et al.* 2011). Die Wiederholung der Transplantation von gefärbten mMSC-EVs in letal bestrahlte Empfängertiere und die anschließende Analyse einer Kolokalisation der PKH26-gefärbten EVs mit SCA-1/C-KIT doppelt gefärbten Knochenmarkszellen mittels ImageStream bestätigte die Resultate der Cytospins. Erneut waren bereits 2 h nach TX die EVs zusammen mit den Antigen-positiven Zellen detektierbar. Auch in diesem Fall waren die Zellen, welche von den EVs angesteuert wurden, SCA-1^{hoch+} und C-Kit^{gering+}, was insbesondere bei den doppelpositiven Zellen auffiel. Diese SCA-1^{hoch+}/C-KIT^{gering+} Zellen stellen in Mäusen potentielle rekonstitutive, pluripotente Stammzellen dar, welche für die Rekonstitution der Hämatopoese verantwortlich sind (Okada *et al.* 1992; Doi *et al.* 1997). Zusätzlich konnten EVs kolokalisiert mit Zellen gefunden werden, die nur für eines der beiden Antigene positiv waren (SCA-1^{hoch+} oder C-KIT^{gering+}). Ob es sich bei diesen beiden Zellpopulationen um weitere Subtypen der HSCs oder bereits um Progenitoren handelt, ist unter diesen Umständen nicht zu sagen. Für eine genaue Zuordnung wären eine umfassendere Charakterisierung unter Verwendung weiterer typischer muriner HSC/HPC Marker wie z.B. CD150 und CD34 notwendig (Challen *et al.* 2009). Basierend auf den daraus resultierenden Erkenntnissen, könnte auch deren Mitwirken an der Rekonstitution der Hämatopoese nach letaler Bestrahlung erörtert werden.

Lediglich bei der Anzahl an EVs pro jeweiliger Antigen-positiver Zelle unterscheiden sich die beiden Analysen. Die Auswertung der Cytospins ergab, dass die transplantierten EVs deutlich SCA-1⁺ Zellen präferieren, da nach zwei Stunden pro Zelle durchschnittlich 3 EVs detektiert wurden und auch nach vier Stunden noch mehr als 2 EVs/Zelle vorlagen. Eine signifikante Abnahme an EVs pro Zelle zwischen beiden Zeitpunkten war jedoch nicht gegeben. Dahingegen wurde in der C-KIT⁺ Zellpopulation durchschnittlich zu beiden Zeitpunkten weniger als 2 EVs gefunden. Die ImageStream Analyse ergab hingegen, dass in allen Populationen 66-74 % der einfach- und doppelpositiven Zellen nur mit einem einzigen EV und nur noch 19-24 % mit zwei EVs interagiert haben. Auch konnte im Gegensatz zu den Cytospins keine besondere Präferenz der EVs gegenüber SCA-1⁺ Zellen im Vergleich zu C-KIT⁺ Zellen abgeleitet werden. Die Varianz zwischen den Cytospins und der ImageStream Analyse könnte mit den

unterschiedlichen Aufarbeitungsmethoden der Zellen erklärt werden. Für die Cytospins wurde das KM vorsichtig aus dem Knochen gespült, die Zellen ebenso vorsichtig vereinzelt und anschließend sofort ohne weitere Manipulationen auf die Objektträger zentrifugiert. Somit lagen die Zellen mit den EVs bereits fixiert vor, bevor die Färbungen stattfanden. Für die ImageStream Analyse hingegen wurden die vorsichtig vereinzelt Knochenmarkszellen noch dem Stress einer Hämolyse unterzogen, bevor sie unfixiert gefärbt wurden. Dies umfasst eine Reihe an Pipettier- und Waschschritten, welche zwar so vorsichtig wie möglich durchgeführt wurden, dies jedoch zusätzliche Manipulation der Zellen bedeutete. Schlussendlich wurden die gefärbten Einzelzellen mittels durchflusszytometrischem Verfahren vermessen, was ebenfalls die Interaktion zwischen EV und Zelle durch auftretende Scherkräfte und Longitudinalbeschleunigungen beeinflussen könnte. Es ist daher denkbar, dass diese Prozesse dazu geführt haben, dass EVs, die noch nicht fest genug an der jeweiligen Zielzelle angeheftet waren, verloren gegangen sind und somit ein geringeres EV/Zell-Verhältnis mittels ImageStream im Vergleich zu den Cytospins ermittelt wurde.

Insgesamt konnte durch diese Experimente deutlich gezeigt werden, dass in letal bestrahlten Empfängertieren transplantierte mMSC-EVs direkt im KM vorzugsweise pluripotente HSCs als Zielzellen wählen. Die fast ausschließliche Einwanderung der EVs ins KM und der dortigen ebenfalls gezielten Auswahl von Zielzellen lässt vermuten, dass die detektierte Kolo-kalisation zu einer direkten Radioprotektion der geschädigten HSCs führt. Diese Annahme wird außerdem durch die vorliegenden *in vitro* Daten aus Radioprotektionsassays gestützt, da diese bereits eine direkte Radioprotektion von mHSCs gezeigt haben (Wen *et al.* 2016; Schoefinius *et al.* 2017). Demzufolge wäre weiterführend, insbesondere mit dem Fokus auf der direkten Protektion, interessant zu analysieren, was diese Kolo-kalisation zwischen EVs und Zielzellen bewirkt. Bereits durchgeführte dreidimensionale konfokale Laser-Scanning Mikroskopie Untersuchungen der Cytospins weisen darauf hin, dass die EVs womöglich als vollständige Vesikel in die Zellen aufgenommen werden (Schoefinius *et al.* 2017). Jedoch ist unklar, ob nicht vorher bereits eine Rezeptorbindung bestimmte Signalwege – die mit dem regenerativen Effekt im Zusammenhang stehen könnten – in der Zelle aktiviert, über welchen Weg sie dann tatsächlich aufgenommen werden sowie was in der Zelle vorgeht. Eine ebenfalls noch unbeantwortete, aber wissenschaftlich hoch interessante Frage ist, was dazu führt, dass es keine gleichmäßige Verteilung der transplantierten EVs im gesamten Organismus gibt, sondern sie gezielt direkt ins Knochenmark zu den HSCs gelotst werden.

4.2. Analyse ausgewählter Gene auf Beteiligung an Radioprotektion von letal bestrahlten hämatopoetischen Stammzellen

Um die drei aus den Ergebnissen der Proteomanalyse ausgewählten Kandidaten (SOD1, PRDX1 und GAL1) auf ihre Beteiligung hinsichtlich der Protektion von letal bestrahlten HSCs zu untersuchen, sollten die entsprechenden Gene einzeln sowie auch alle drei zusammen in mMSCs runterreguliert werden. Bei einer vorliegenden Beteiligung an der Protektion wurde angenommen, dass eine Runterregulation den allgemeinen bereits nachgewiesenen protektiven Effekt (Schoefinius *et al.* 2017) der EVs in einem *in vitro* Radioprotektionsassay mindert. Für eine stabile Runterregulation wurde eine entsprechende shRNA für das jeweilige Zielgen stabil mittels lentiviraler Transduktion in mMSCs integriert. Als Kontrollen wurden unbehandelte mMSCs (Kontrollzellen) und *scr*_shRNA transduzierte mMSCs

mitgeführt. Nachdem von allen transduzierten Zellen, mittels dem neben der jeweiligen shRNA integrierten Fluoreszenzprotein, die hoch positiven Zellen selektiert worden waren, wurden sowohl diese hoch positiven shRNA-transduzierten mMSCs als auch die von ihnen sezernierten EVs auf eine adäquate Runterregulation der entsprechenden einzelnen Kandidaten bzw. die Kombination aller Kandidaten überprüft, bevor Radioprotektionsassays durchgeführt wurden.

4.2.1. Nachweislich reine EV-Isolation von verschiedenen transduzierten mMSCs möglich

Alle aus den hoch positiven shRNA-transduzierten mMSC-Kulturen (shRNA_*Gal1*, shRNA_*Sod1*, shRNA_*Prdx1*, 3x shRNAs oder *scr*_shRNA) sowie aus den Kontroll-Kulturen (unbehandelte mMSCs) isolierten EVs wurden erfolgreich als solche charakterisiert. Dabei war es egal, ob die EV-Präparate von in Sigma-FCS-haltigen Kultivierungsmedium ohne oder mit Zytokinen (40 pg/ml rmEGF und 4 ng/ml rmPDGF_BB) kultivierten mMSCs produziert wurden. Mittels Western Blot Analyse konnte für alle ersten Ernten der mMSC-Kulturen (- Zytokine) beispielhaft gezeigt werden, dass alle verschiedenen EV-Präparate weiterhin die typischen EV-Marker HSP70, FLOTELLIN, TGS101 und CD9 besaßen und somit tatsächlich EVs darstellten (Théry *et al.* 2018). Auf Grund des geringen Materialgehaltes konnte die Abwesenheit von Calnexin (Marker für eine vorliegende Zellkontamination) in den Proben nicht noch zusätzlich erbracht werden. Da jedoch bereits zuvor mehrfach, wie auch in dieser Arbeit (siehe Kapitel 4.1.2) gezeigt wurde, dass mittels der verwendeten gut etablierten Ernte- und Aufreinigungsmethode reine EV-Präparate erhalten wurden, wurde dies für die hier verwendeten EV-Präparate ebenfalls vorausgesetzt.

Die weitere Charakterisierung mittels einer Nanopartikel Verfolgungsanalyse (NTA) der aus verschiedenen mMSC-Kulturen (Kontrollen, transduziert, mit und ohne Zytokin-Zugabe) isolierten EV-Präparate zeigte, dass die EVs eine durchschnittliche Partikelgröße (Modalwert) zwischen 129,9 und 154,8 nm aufwiesen. Diese Größenordnung entspricht der Literatur und basierend auf zuvor generierten Daten auch unseren Erwartungen (Hao *et al.* 2019; Perets *et al.* 2020). Die Partikelkonzentration/ml zwischen $1,47 \cdot 10^{11}$ und $7,80 \cdot 10^{11}$ (Durchschnitt $4,27 \cdot 10^{11}$ Partikel/ml) unterliegt einer deutlich größeren Schwankungsbreite. Dies trat jedoch auch schon zuvor in vergleichbarer Weise bei der Konzentrationsbestimmung mittels Durchflusszytometrie zwischen verschiedenen Präparaten auf. Da es keine Anhaltspunkte dafür gibt, dass eine der beiden Kulturbedingungen (mit oder ohne Zytokin-Zugabe) oder eine bestimmte mMSC-Kultur (transduziert mit verschiedenen shRNAs oder Kontrolle) zu mehr oder weniger EVs führen, sondern die Schwankung zufällig zwischen den einzelnen EV-Präparaten auftraten, wird dies auf die biologische Varianz zurückgeführt.

4.2.2. Erfolgreiche Runterregulation von ausgewählten Zielgenen mittels shRNA

Sowohl die in Sigma-FCS-haltigem mMSC-Kultivierungsmedium ohne Zytokine, als auch die unter Zytokin-Zugabe kultivierten mMSCs, zeigten eine erfolgreiche Runterregulation in den jeweiligen mMSCs von jedem einzelnen Zielgen bzw. aller drei Kandidaten gemeinsam im Vergleich zu den Kontrollen (unbehandelte mMSCs und mMSCs mit shRNA_*scr*). Die Runterregulation wurde sowohl molekularbiologisch auf Transkriptomebene, als auch auf Proteinebene bestätigt. Gleiches konnte für die aus diesen generierten mMSC-Linien isolierten EVs gezeigt werden. Es gilt in diesem

Zusammenhang jedoch zu erwähnen, dass mit keiner der verwendeten shRNAs eine vollständige Stilllegung des entsprechenden Gens erreicht wurde. Dies ist jedoch bei Verwendung einer einzelnen shRNA gegen ein Zielgen nicht ungewöhnlich. Der biologische Prozess der RNA-Interferenz, welcher mittels künstlich erzeugter und in die Zellen stabil integrierter shRNA induziert wird, führt in den meisten Fällen nur zu einer Reduktion der Genexpression anstelle von einer vollständigen Stilllegung des Zielgens (Taxman *et al.* 2006; Chumakov *et al.* 2010). Darüber hinaus ist bekannt, dass sich die Effizienzen verschiedener shRNAs teilweise stark voneinander unterscheiden können. Es existieren zwar für die Entwicklung einer effizienten shRNA eine Vielzahl an Algorithmen, jedoch zeigt sich erst unter experimentellen Bedingungen, ob die entwickelte shRNA für eine erfolgreiche Runterregulation des Zielgens sorgt. So kann z.B. die von der shRNA angesteuerte Zielsequenz der mRNA unter bestimmten physiologischen Bedingungen von regulatorischen Proteinen o.ä. gebunden sein, wodurch keine effiziente Bindung der shRNA mehr möglich ist und es somit nur zu einer sehr geringen Reduktion der entsprechenden Genexpression kommt (Taxman *et al.* 2006; Moore *et al.* 2010; O'Keefe 2013).

Obwohl nur eine partielle Stilllegung der drei Zielgene stattgefunden hatte, spiegelte sich diese jeweils in den parental mMSCs detektierte prozentuale Reduktion sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene, zu fast gleichen Anteilen in den jeweils isolierten EVs wider; unabhängig wie stark oder schwach die jeweilige Reduktion ausfiel. Insbesondere bei der Verwendung der shRNA_ *Sod1* war dies aufgefallen, da mit dieser die geringste Reduktion mit lediglich ca. 50 % (ohne Zytokine) bzw. ca. 30 % (mit Zytokinen) in den jeweiligen mMSCs und den entsprechenden generierten mMSC-EVs erhalten werden konnte. Aus dieser Beobachtung lässt sich vermuten, dass es keinen Mechanismus zu geben scheint, der dazu führt, dass weder die RNA noch die dazugehörige Proteinform der drei ausgewählten Kandidaten bevorzugt in die EVs verpackt werden, anstatt in der Zelle zu verbleiben. Wäre dies der Fall sollte die Reduktion in den EVs geringer ausfallen als in den parental Zellen, was hier nicht der Fall war. Für die weitere Analyse wurde angenommen, dass die erreichten Reduktionen auf Transkriptom- und Proteinebene ausreichen würden, um bei vorliegender Beteiligung an der Protektion von HSCs eine Veränderung hinsichtlich dieser Eigenschaft von den mMSC-EVs in einem *in vitro* Radioprotektionsassay zu messen. Insbesondere da bereits in anderen shRNA Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass selbst eine Expressionsreduktion von knappen 50 % – wie sie ebenfalls mit shRNA_ *Sod1* (ohne Zytokine) erreicht wurde – ausreicht, um einen wirksamen biologischen Effekt zu erzielen (Hossain *et al.* 2013). Somit war nur die Runterregulation von *Sod1* in den mit Zytokinen kultivierten mMSCs und deren EVs noch geringer, wohingegen die Runterregulation von *Gal1* und *Prdx1* mit mind. 80 % in mMSCs und den von ihnen produzierten EVs wesentlich effizienter ausfiel.

Wäre demzufolge bei der Testung der mMSC-EVs (shRNA_ *Sod1*) ein nicht klares Ergebnis im Vergleich zu den beiden anderen Kandidaten aufgetreten, hätte die Transduktion für *Sod1* wiederholt werden können. Durch dieses Vorgehen hätte unter Umständen eine bessere Reduktion zu erzielt werden können, so dass eine deutlichere Aussage in der weiteren Analyse möglich gewesen wäre. Des Weiteren bestünde die Möglichkeit eine weitere shRNA, die gegen einen anderen Sequenzabschnitt des *Sod1* gerichtet ist, zu verwenden, um eine stärkere Runterregulation zu erlangen. Prinzipiell könnte man für alle Kandidaten auch eine Kombination mehrerer verschiedener shRNAs für das jeweilige Zielgen einsetzen, um im Idealfall so eine vollständige Stilllegung zu erwirken.

Neben dem spezifischen Nachweis einer erfolgreichen Runterregulation des jeweiligen Zielgens auf Transkriptom- und Proteinebene in den mMSC-Kultur (mit und ohne Zytokin-Zugabe) sowie in den dazugehörigen mMSC-EVs, wurden der Vollständigkeit halber immer auch die Expression und das Proteinlevel der beiden anderen Kandidaten untersucht. Dementsprechend wurden auch aller drei Kandidaten in den Kontrollen (unbehandelte und mit shRNA_scr transduzierte mMSCs sowie deren EVs) analysiert. Dabei zeigten die Ergebnisse der Genexpressions- und Western Blot Analyse, dass die jeweils eingebrachte shRNA teilweise die anderen Gene (nicht Zielgene) ebenfalls signifikant beeinflusste. Auf Transkriptionsebene ist in diesem Zusammenhang bei den analysierten mMSCs mit und ohne Zytokin-Zugabe besonders auffällig, dass bereits die shRNA_scr Proben signifikante Unterschiede zu den unbehandelten mMSC-Kontrollen zeigten. Insbesondere war in diesen Proben die *Prdx1* Expression sehr stark hochreguliert, vor allem in den mMSCs ohne Zytokine (fast doppelt so starke Expression wie in der Kontrolle). Interessanterweise ist diese starke Überexpression nicht in den entsprechenden EVs wiederzufinden, wohingegen bei der geringeren *Prdx1* Überexpression von ungefähr 10 % Erhöhung bei den mMSCs mit Zytokinen, die dazugehörigen EVs eine deutlich stärkere Hochregulation (fast 40 %) zeigten. Bei allen mit jeweils einer Zielgen-spezifischen shRNA transduzierten mMSCs (+/- Zytokin-Zugabe) hingegen, wurde neben dem Zielgen auch teilweise entweder beide, im Beispiel von shRNA_Prdx1 also *Gal1* und *Sod1*, oder nur eins der beiden anderen Gene (nicht Zielgene) ebenfalls signifikant supprimiert. Ein genaues Muster ist jedoch nicht erkennbar. Es lässt sich lediglich sagen, dass in den jeweils von diesen Zellen isolierten EVs die Beeinflussung wesentlich stärker ins Gewicht fiel und bei den mMSC-EVs mit Zytokinen auch wieder teilweise Überexpressionen auftraten. So ist in den mMSCs (shRNA_Gal1) mit Zytokinen keine Veränderung von *Sod1* und *Prdx1* im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-mMSCs detektiert worden, bei den EVs hingegen liegt *Sod1* signifikant überexprimiert und *Prdx1* hingegen supprimiert vor. Aktuelle Literaturrecherchen liefern keine Hinweise, die Rückschlüsse für diese Ergebnisse liefern. In erster Linie wird in der Literatur der Effekt einer gezielten Runterregulation des entsprechenden Zielgens beschrieben. Weitere Gene, für die kein Effekt erwartet wurde, werden üblicherweise dabei nicht parallel analysiert, wodurch keine vergleichbaren Erkenntnisse vorliegen (Morrison *et al.* 2012; Tang *et al.* 2015; Kozlova *et al.* 2020).

Ähnliche Beeinflussungen der anderen beiden Gene (nicht Zielgene) durch die jeweils eingebrachte Zielgen-shRNA wurde ebenfalls auf der Proteinebene beobachtet. In diesem Fall handelte es sich jedoch in den transduzierten mMSCs mit und ohne Zytokin-Zugabe tendenziell eher um eine Überexpression und nicht wie auf Transkriptionsebene um eine Suppression der anderen beiden Gene. Dies spiegelt sich jedoch nicht in den dazugehörigen EVs wider, in denen eher reduzierte Proteinlevel detektiert wurden. Ob diese auf Proteinebene gemachten Beobachtungen tatsächlich signifikant sind, kann nicht gesagt werden, da zum einen die Standardabweichungen groß sind und zum anderen auf Grund geringer Datenbasis (n = 2 oder 3) keine statistische Auswertung möglich war.

Jedoch war keine der Veränderungen, weder auf Transkriptom- noch auf Proteinebene, in den jeweiligen beiden anderen Genen (nicht Zielgene) so gravierend, dass diese eine weitere Analyse der EVs bzgl. der Radioprotektion beeinflusst oder sogar verhindert hätte.

Eine generelle gegenseitige Beeinflussung der einzelnen Kandidaten nach deren Suppression wird jedoch ausgeschlossen, da bereits signifikante Veränderungen in der Genexpression auf

Transkriptionsebene in den Proben, die eine *scrambled* shRNA enthielten, auftraten. Vielmehr ist die Vermutung naheliegend, dass es sich bei den beobachteten Veränderungen um biologische Varianz handelt, wie die Studie von Li *et al.* (2011) zeigt. In dieser Studie wurden Unterschiede in Expression und Proteingehalt zwischen den unbehandelten und *scrambled* shRNA Kontrollen jedoch nicht näher erläutert (Li *et al.* 2011).

Um diese Annahme zu verifizieren, müssten die Analysen wiederholt werden. In diesem Zusammenhang sollten von den unbehandelten mMSCs nicht nur eine neue Probe bestehend aus mMSCs und den dazugehörigen mMSC-EVs, sondern mehrere unabhängig voneinander kultivierte Proben generiert werden. Somit könnten biologische Schwankungen in der Genexpression besser ausgeglichen werden, da die Bewertung aller anderen Proben auf diesen unbehandelten Kontrollen beruht. Auf Grund von Zeit, Materialkosten und im Falle der EVs auch der Probenlimitierung wurden von jeder Probe (mMSCs oder EVs) in dieser Arbeit nur jeweils einmal RNA und einmal Proteine isoliert, von denen dann jeweils unabhängig mehrfache Analysen stattgefunden hatten. Eine weitere RNA- und Proteinisolation aus den bereits vorhandenen Proben wäre demnach eine Möglichkeit, um zu schauen, ob auch bei diesen eine Beeinflussung der anderen beiden Kandidaten-Gene vorliegt. Am besten wäre jedoch weitere mMSC- und mMSC-EV-Proben von erneut angelegten Kulturen zu generieren. Dies wäre zwar die kosten- und zeitintensivste Variante, jedoch ließen sich somit auch Kultivierungsprobleme ausschließen, die evtl. bei den in dieser Arbeit analysierten Proben die starken Schwankungen in der Expression ausgelöst haben könnten. Wie bereits erwähnt, ist besonders auffällig, dass bereits die *shRNA_scr* laut der gewonnenen Ergebnisse einen starken Einfluss auf die Genexpression, insbesondere auf *Prdx1*, hatte. Da es sich bei allen analysierten mMSCs nicht um eine monoklonale, sondern um eine polyklonale Zelllinie gehandelt hatte, kann ausgeschlossen werden, dass eine ungünstige Insertionsmutagenese vorliegt, die spezifisch auf *Prdx1* Einfluss nimmt. Viel eher könnten nicht gewollte und unbemerkte Störungen im Kultivierungsablauf (siehe Kapitel 4.2.3.4) die Zellen dahingehend beeinträchtigt haben, dass eine Expressionsänderung eingetreten ist. Es ist bereits bekannt, dass die bei der MSC-Kultivierung vorliegende Sauerstoff- sowie Serumkonzentration einen signifikanten Effekt auf die Genexpression und das daraus resultierende Proteinlevel der Zellen besitzt (Yuan *et al.* 2016)

4.2.3. Radioprotektionsassays zeigen keine detektierbare Radioprotektion mit allen untersuchten EV-Präparaten

Nachdem die jeweils angestrebte Reduktion der Expression ausgewählter Zielgene in den mit einer oder mehreren shRNAs stabil transduzierten mMSCs und deren produzierten EVs erfolgreich nachgewiesen wurde, wurde die Beteiligung der Kandidaten an der Protektion letal bestrahlter HSCs untersucht. Dazu wurden die verschiedenen mMSC-EVs (von mit *shRNA_scr*, *shRNA_Gal1*, *shRNA_Sod1*, *shRNA_Prdx1* oder 3x shRNAs transduzierten mMSCs) zusammen mit den entsprechenden Kontroll-EVs (von unbehandelten mMSCs) und einer entsprechenden Positiv- und Negativkontrolle in dem gut etablierten und reproduzierbaren *in vitro* Radioprotektionsassay eingesetzt. Dabei ergab sich unerwarteterweise, dass alle EVs – insbesondere die in früheren Experimenten reproduzierbar signifikant protektiv wirkenden EVs aus unbehandelten mMSCs – keine Protektion mehr

zeigten. Somit bleibt die Frage hinsichtlich der Beteiligung der drei Kandidaten an der Wiederherstellung der Hämatopoese nach letaler Bestrahlung weiterhin offen.

Bei der Suche nach der Ursache für das Ausbleiben einer Protektion letal bestrahlter mHSCs durch die mMSC-EVs, wurde als erstes betrachtet, was sich im Vergleich zu den früheren Versuchen – in denen deutliche Protektionseigenschaften nachgewiesen werden konnten – im gesamten Prozess geändert hatte. Die offensichtlichste Änderung in allen Kultivierungsprozessen der mMSCs war die Verwendung eines neuen FCS von Sigma-Aldrich (Sigma-FCS), da das vorherige FCS von BioWhittaker-Lonza (Lonza-FCS) aufgebraucht und die Lot-Nummer nicht zum weiteren Erwerb verfügbar war. Das neue FCS wurde selbstverständlich vor Anschaffung im Vergleich zum vorherigen auf seine Tauglichkeit für die mMSC-Kultivierung getestet. Die Testung bestätigte die Eignung des Serums, die Zellen proliferierten im Vergleich zu dem alten Lonza-FCS jedoch deutlich langsamer (nicht gezeigt). Mangels geeigneter Alternativen wurde das Sigma-FCS dennoch angeschafft. Ein weiterer Versuch nach einigen Jahren nochmal ein effizienteres FCS für die mMSC-Kultivierung zu erhalten ergab, dass weiterhin alle dabei getesteten FCSs deutlich schlechter geeignet waren als das bereits erworbene Sigma-FCS. Um das Wachstum der mMSCs mit dem vorrätigen Sigma-FCS zu unterstützen, wurden stattdessen, wie in der Literatur beschrieben, verschiedene Kombinationen und Konzentrationen an Zytokinen mit und ohne Zugabe von 0,1 % DMSO auf ihre Wirksamkeit getestet (Gharibi and Hughes, 2012; Y. L. Huang *et al.*, 2012; Ng *et al.*, 2008; Tamama *et al.*, 2010; online Referenz 18). Die Vorversuche ergaben, dass die besten Ergebnisse für die von uns verwendeten mMSCs mit Sigma-FCS haltigen mMSC-Kultivierungsmedium unter Zugabe von 40 pg/ml rmEGF und 4 ng/ml rmPDGF_BB ohne DMSO erhalten wurden. Die Zellen zeigten weiterhin, wie bereits ohne Zytokine, eine Plastikadhärenz sowie eine typische spindelförmige Morphologie (siehe Abb. 32), wohingegen die Proliferationsrate der Zellen unter Zytokin-Zugabe deutlich zugenommen hatte.

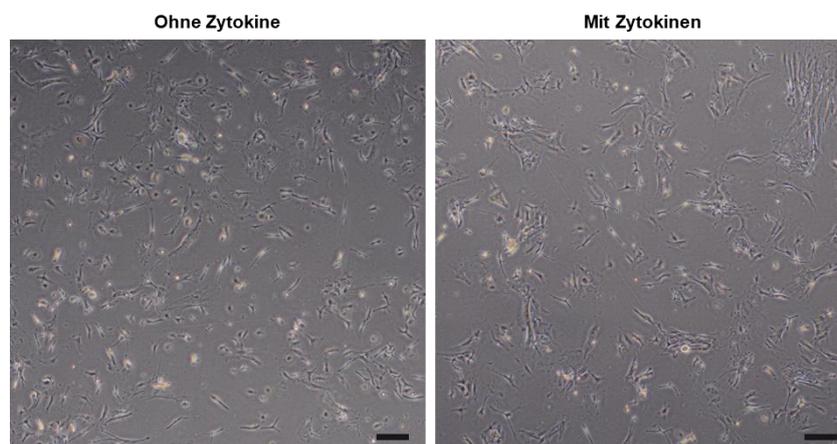


Abb. 32: Morphologie der mMSCs unter Kultivierung mit Sigma-FCS. Die Zellen zeigten sowohl ohne Zytokin-Zugabe im Kulturmedium (linkes Bild), als auch unter Zugabe von 40 pg/ml rmEGF und 4 ng/ml rmPDGF_BB (rechtes Bild) die mMSC-typische spindelförmige Morphologie. Maßstab = 200 µm.

Dennoch zeigten auch die unter Zytokin-Zugabe produzierten mMSC-EVs keine protektiven Eigenschaften in dem Radioprotektionsassay. Demzufolge stellt sich die Frage, ob evtl. bestimmte andere, bis jetzt unbekannte Faktoren in dem Lonza-FCS enthalten waren, die essentiell für die Generierung protektiver EVs waren, und in dem Sigma-FCS fehlen. Sollte dies der Fall sein, würde es wahrscheinlich unmöglich sein, diese Faktoren zu bestimmen, um sie separat zu dem Kultivierungsmedium hinzuzufügen. Alternativ könnte das FCS lediglich Einfluss auf das Wachstum der

mMSCs haben ohne die EV-Qualität zu beeinflussen. Eine solche Beurteilung ist jedoch auf Grund der Komplexität der Probengewinnung und des anschließenden Assays nur schwer abzuschätzen. Daher wurde der Fokus vorerst auf die Betrachtung aller in Frage kommenden Faktoren bzgl. des Radioprotektionsverlustes gelegt und nicht nur eine Möglichkeit herausgenommen.

4.2.3.1. Zu hohe Strahlendosis könnte Zellen irreversibel schädigen und somit den Protektionsverlust erklären

Zusätzlich zu dem Versuch die Protektion mittels verbesserter Zellkulturbedingungen (Zugabe von Zytokinen zum Kultivierungsmedium) wiederherzustellen, wurde auch die für die letale Bestrahlung der mMNCs verwendete Strahlendosis erneut titriert, um zu verifizieren, ob diese auch unter heutigen Voraussetzungen noch geeignet ist.

Für die Radioprotektionsassays wurde bereits vor mehr als 10 Jahren eine Titration von Frau PD Dr. Lange durchgeführt, bei der eine Gesamtstrahlendosis von 4 Gy (1 Gy/min) als adäquat für die Bestrahlung der mMNCs festgelegt und demnach auch anfänglich in dieser Arbeit verwendet wurde. Damals wurde mit dieser Strahlendosis ein restliches Überleben von ca. 10 % an mHSCs im Vergleich zu den nicht bestrahlten Kontrollen (Positivkontrolle) im Radioprotektionsassay erzielt. Mit diesen Versuchsbedingungen war – wie bereits mehrfach gezeigt wurde – ein Revertieren der mHSC-Schädigung möglich und bereits geringe protektive Effekte konnten reproduzierbar detektiert werden. Ob dies jedoch auch nach den aufgetretenen Veränderungen einiger wesentlicher Parameter, wie die Intensitätsabnahme der Strahlenquelle und die Erneuerung der Inzuchtmauskolonie, noch der Fall ist, galt es durch eine erneute Titration zu verifizieren.

4.2.3.1.1. Abnahme der Intensität der Strahlenquelle über die Zeit

Über die Zeit hat die Intensität der Strahlenquelle, welche für die Bestrahlung der MS5 und MNCs im Rahmen der *in vitro* Radioprotektionsassays verwendet wurde, durch den Zerfall des Cs-137 abgenommen. Dieser Vorgang ist nicht unbekannt, weswegen eine jährliche Wartung des Gerätes erfolgte, um die Abnahme der Strahlenintensität zu ermitteln. Im Anschluss daran wurde jedes Mal die Tabelle für die verwendeten Parameter, wie Tischabstand und Bestrahlungszeiten, angepasst, so dass zu jeder Zeit mit einer definierten Strahlendosis gearbeitet werden konnte.

Um dementsprechend eine Bestrahlung von 4 Gy (1 Gy/min) für die mMNCs zu gewährleisten, wurde der Tischabstand im Laufe der Jahre immer wieder angepasst, indem er näher an die Strahlenquelle gesetzt wurde. Theoretisch sollte dies keinen Einfluss auf die Strahlenwirkung haben und eine Vergleichbarkeit weiterhin gegeben sein, da sowohl die Bestrahlungszeit und die totale Strahlendosis weiterhin gleichgeblieben sind. Um dies jedoch vollständig als Ursache für den Protektionsverlust auszuschließen wurde eine erneute Titration angestrebt.

4.2.3.1.2. Austausch der Inzuchtmauskolonie und damit veränderter genetischer Hintergrund

Als weiterer Grund für eine erneute Titration der Strahlendosis für die im Radioprotektionsassay benötigten mMNCs war, dass diese Zellen für jedes Experiment frisch aus weiblichen C57BL/6 Ly5.1 Spendertieren entnommen wurden.

Wie üblich wurde auch bei dieser Inzuchtmauslinie im Laufe der Jahre regelmäßig eine neue Zuchtkolonie eingesetzt, um die genetische Stabilität zu gewährleisten. Trotz Verwendung eines Inzuchtstammes ist der genetische Pool nicht vollständig stabil, da spontane Genmutationen auftreten und sich in einer Zuchtkolonie anhäufen können. Um diesen unerwünschten Effekt möglichst gering zu halten, werden die Kolonien regelmäßig (nach ca. 10 Generationen was in etwa 6-8 Jahren entspricht) durch eine neue Kolonie ersetzt. Die Mauskolonie aus welcher die in dieser Arbeit verwendeten Tiere stammten wurde 2010 und 2018 ausgetauscht. Allerdings reicht auch dieses Erneuern der Zuchtkolonien nicht aus, um eine 100 %-ige Genstabilität zu erhalten. Trotz langer Inzucht von 60 oder sogar noch mehr Generationen sind die Tiere nicht isogen, sondern weisen weiterhin eine Residualheterozygotie auf (Zimmermann *et al.* 2000; Chebib *et al.* 2020). Demzufolge kann davon ausgegangen werden, dass ein genetischer Unterschied zwischen den Mäusen ab 2010 und denen ab 2018 bestand. Dieser könnte möglicherweise zu einer Steigerung in der Radiosensitivität geführt haben. Bei einer Zunahme der Radiosensitivität würden bei gleichbleibender Strahlendosis die Zellen viel stärker geschädigt werden und womöglich in einen irreversiblen Zustand gelangen, der auch bei Anwesenheit von EVs nur noch den Zelltod zulassen würde. Dies würde erklären, warum die Behandlung von bestrahlten HSCs mit unbehandelten mMSC-EVs in den Radioprotektionsassays keine Protektion mehr zeigte. Unterstützt wird diese Theorie durch Literaturrecherche, die zeigt, dass die bei der Strahlentitration von McCulloch and Till mit Knochenmarkszellen aus C57BL/HA Tieren 10 % Überlebensrate mit einer Strahlendosis von ca. 3,3 Gy erreicht wurde und mit 4 Gy nur noch ca. 5,5 % der ursprünglichen Zellen überlebensfähig waren (Till and McCulloch 1961; McCulloch and Till 1962). Dies weist deutlich darauf hin, dass es starke Schwankungen in der Strahlensensibilität zwischen den gleichen Zellen aus verschiedenen Zuchtkolonien gibt, die es zu berücksichtigen gilt und somit eine erneute Titration nach Populationswechsel erfordern.

4.2.3.1.3. Erneute Titration zeigte 3 Gy als optimale Strahlendosis für die im Radioprotektionsassay benötigten mMNCs

Die neu durchgeführten Titrationsversuche ergaben, dass durch das Verringern der Strahlendosis von 4 auf 3 Gy weiterhin im Vergleich mit der entsprechenden Positivkontrolle (unbestrahlte mMNCs) ein gleicher Anteil an überlebenden mHSCs (~16 % bzw. ~5 %) detektiert werden konnte. Die Schwankung hinsichtlich des Anteils an überlebenden Zellen sind für dieses biologische System nicht unbekannt und mitteln sich insgesamt auf die erwünschte Überlebensrate von 10 % für bestrahlte, unbehandelte mHSCs. Die gleichbleibende Überlebensrate bei 4 und 3 Gy war allerdings nicht erwartet, da laut Literatur von einer weiteren kontinuierlichen Abnahme an überlebenden Zellen mit steigender Strahlendosis ausgegangen wurde (Till and McCulloch 1961; McCulloch and Till 1962). Womöglich ist auf Grund der Schwankungen und geringen Wiederholungen in diesem Fall die Abnahme nicht zu erkennen. Nichtsdestotrotz deutet die erneute Titration sehr wohl auf eine höhere Radiosensitivität der HSCs hin, da auch mit 3 Gy die erforderliche Überlebensrate von durchschnittlich 10 % erzielt werden konnte.

Jedoch konnte auch mittels einer Verringerung der Strahlendosis von 4 auf 3 Gy in Kombination mit weiteren Optimierungen (Zytokin-Zugabe, Einsatz von 1:120 EVs) keine Protektion der letal bestrahlten (3 Gy) mHSCs durch unbehandelte mMSC-EVs detektiert werden. Demzufolge ist eine weitere

Ursachenforschung angebracht. Auf Grund der Komplexität und des multifaktoriellen Aufbaues des Assays gibt es zwar noch eine Vielzahl an weiteren Möglichkeiten, die Ursache für die ausbleibende Protektion sein könnten, dennoch sollte die Titration zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig als Ursache ausgeschlossen werden. Zumindest weitere voneinander unabhängig durchgeführte Wiederholungen der Titration mit mehreren Messpunkten (geringeren Abständen zwischen den Strahlendosen wie z.B. 0,5 Gy) in mindestens technischen Triplikaten wäre angebracht, um ein wesentlich aussagekräftigeres Ergebnis zu erzeugen. Dies könnte dann entweder die Annahme bestätigt, dass 3 Gy die optimale Strahlendosis darstellt, oder zeigen, dass diese Strahlendosis noch zu hoch und somit nicht geeignet für den Assay ist.

4.2.3.2. Verdreifachung der EV-Menge im Radioprotektionsassay bewirkte auch keine detektierbare Radioprotektion

Bei der Etablierung des ursprünglichen Radioprotektionsassays wurde eine EV-Menge von 1:40 (pro MNC wurden EVs produziert von 40 mMSCs verwendet) als effektivste Konzentration ermittelt und seitdem erfolgreich für den Nachweis der Radioprotektion von mMSC-EVs eingesetzt (Schoefinius *et al.* 2017). Nachdem jedoch der Nachweis der zuvor reproduzierbar aufgetretenen Protektion verloren gegangen war, wurde versucht diese durch eine Erhöhung der EV-Menge von 1:40 auf 1:120 wiederherzustellen. Vorversuche mit dem Einsatz von 1:120 unbehandelter mMSC-EVs zeigten bereits bei mit 4 Gy bestrahlten mHSCs einen deutlichen Anstieg in der Koloniezahl in dem Methylcelluloseassay. Aus diesem Grund wurde zusätzlich zu der verringerten Strahlendosis von 3 Gy (letale Bestrahlung der mMNCs) und der Verwendung von Zytokin-supplementiertem mMSC-Kultivierungsmedium, die EV-Menge von 1:120 für die Wiederholungen der Radioprotektionsassays verwendet. Obwohl alle drei Optimierungen bereits im Einzelnen vielversprechende Daten geliefert haben, brachten sie in Kombination in der Wiederholung leider keine Verbesserung hinsichtlich protektiver Effekte von EVs auf die bestrahlten mMNCs. Die erhaltenen Ergebnisse ähnelten sogar denen aus dem vorherigen Versuch mit den ursprünglichen Kultur- und Bestrahlungsbedingungen, so dass nicht mal eine leichte Verbesserung der Protektion zu erkennen war und somit auch nach diesem Experiment keine Aussage hinsichtlich der möglichen Beteiligung der drei Zielgene (*Gal1*, *Sod1* und *Prdx1*) an der Protektion getroffen werden konnte. Demzufolge ist es weiterhin von höchster Wichtigkeit, die Ursache für den Protektionsverlust in dem *in vitro* Assay zu finden und zu beheben, um anschließend die Bedeutung einzelner EV-Bestandteile – wie die drei ausgewählten Kandidaten – für die protektiven Eigenschaften bewerten zu können.

4.2.3.3. Einfluss der veränderten mMSC-Charakteristika auf den Protektionsverlust der EVs

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt zwei unabhängig voneinander etablierte mMSC-Linien für die EV-Isolation verwendet und charakterisiert. Die erste Linie wurde 2012 durchgängig mit Lonza-FCS-haltigem Medium generiert und kultiviert. Deren sezernierte EVs wurden zur Identifikation ihrer Zielzellen *in vivo* nach letaler Bestrahlung verwendet. Auch die spätere Charakterisierung der Zellen fand in Lonza-FCS-haltigem Medium statt. Die mMSCs der zweiten Linie wurden 2016 unter Verwendung des neuen Sigma-FCS isoliert. Diese Zelllinie wurde für die Überprüfung der Beteiligung der drei – aus der vor 2016 durchgeführten Proteomanalyse – ausgewählten Kandidaten (*Gal1*, *Sod1*

und *Prdx1*) an der HSC-Protektion verwendet. Dafür wurden diese Gene gezielt einzeln und auch kombiniert in den Sigma-FCS mMSCs durch entsprechende zuvor stabil integrierte shRNAs runterreguliert. Die Charakterisierung fand anschließend mit und ohne Zytokin-Zugabe statt, um zu überprüfen, ob der Einsatz von 40 pg/ml rMEGF und 4 ng/ml rPDGF_BB im Sigma-FCS-haltigem Kultivierungsmedium einen Einfluss auf die Charakteristika der mMSCs hat. Sowohl bei der *in vitro* Differenzierung der mMSCs in Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten, als auch bei der Detektion spezifischer mMSC-Oberflächenantigene wurden keine Unterschiede zwischen den mMSCs mit und ohne Zytokin-Zugabe detektiert. Anders verhielt es sich jedoch bei dem Vergleich der detektierten Charakteristika von mit Lonza-FCS gegenüber mit Sigma-FCS +/- Zytokin-Zugabe kultivierten mMSCs.

Bei der adipogenen *in vitro* Differenzierung wurden in allen Sigma-FCS mMSCs bereits 3 Tage nach Induktion bei der mikroskopischen Bewertung die ersten deutlichen morphologischen Veränderungen wahrgenommen, die darauf schlossen ließen, dass die Zellen bereits in Adipozyten differenziert waren. Bei den mit Lonza-FCS kultivierten mMSCs hingegen zeigten sich die ersten morphologischen Veränderungen diesbezüglich erst nach ca. 20 Tagen. Noch stärker unterschied sich der durchflusszytometrische Nachweis charakteristischer mMSC-Oberflächenantigene zwischen den Lonza-FCS kultivierten mMSCs und denen, die in Sigma-FCS-haltigem Medium (+/- Zytokin-Zugabe) expandiert wurden. Als typische mMSC-Oberflächenantigene wurden nach ausgiebigen Literaturrecherchen und Vorversuchen SCA-1, CD73 und CD105 ausgewählt (siehe Abb. 33). Die Analyse der mit Lonza-FCS kultivierten mMSCs zeigte, dass insbesondere SCA-1 und CD105 auf fast allen Zellen exprimiert vorlagen, wohingegen für CD73 nicht mal die Hälfte (43,1 %) der Zellen positiv war. Wie bereits in Kapitel 4.1. ausführlich erläutert, ist dies nicht ungewöhnlich, da bekannt ist, dass mMSCs aus mehreren Subpopulationen bestehen. Diese sind im Fall von CD73 entweder stark positiv wie die detektierten 43,1 %, oder schwach positiv, wie wahrscheinlich zum größten Teil der Rest der Zellen vorliegt. Eine Unterscheidung zwischen schwach positiv und negativ war jedoch mit der verwendeten Methode nicht möglich. Anfänglich wurde mit demselben Antikörperpanel auch die Charakterisierung der Sigma-FCS mMSC (+/- Zytokin-Zugabe) durchgeführt. Dabei stellte sich jedoch heraus, dass bei diesen mMSCs nicht mal bei einem geringen Anteil der Zellen eine CD73 oder CD105 Expression nachgewiesen werden konnte, wohingegen weiterhin alle Zellen als SCA-1 positiv detektiert wurden. Nach weiterer Literaturrecherche wurde CD44, welcher ebenfalls als typischer mMSC-Oberflächenmarker beschrieben ist, in die Analyse der Sigma-FCS mMSCs (+/- Zytokin-Zugabe) miteingeschlossen (Valorani *et al.* 2010). Dieser wurde von zumindest mehr als 50 % der mMSCs exprimiert (siehe Abb. 33).

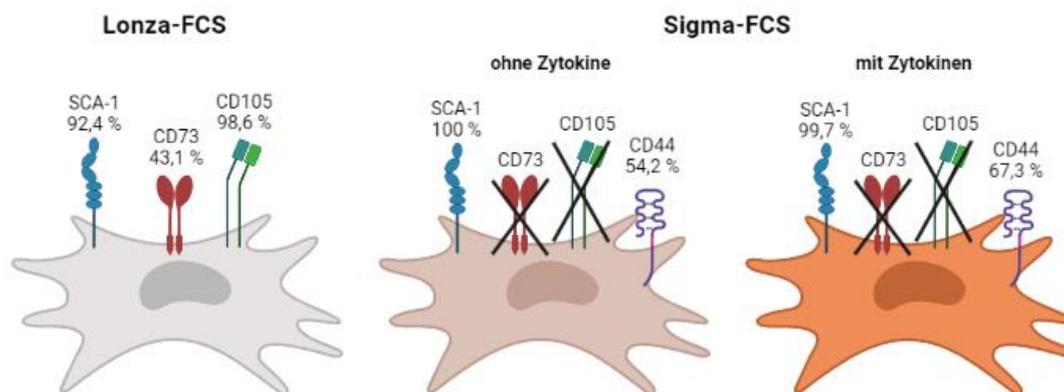


Abb. 33: Expression ausgewählter mMSC-Oberflächenantigene bei Verwendung verschiedener FCS. Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurde gezeigt, dass die in Lonza-FCS-haltigem Medium kultivierte mMSC-Linie positiv für die typischen mMSC-Oberflächenantigene SCA-1, CD73 und CD105 ist. Die mMSC-Linie, die jedoch in Sigma-FCS-haltigem Medium etabliert wurde, exprimiert sowohl mit als auch ohne weitere Zytokin-Zugabe nur SCA-1 und CD44. CD73 und CD105 konnten in keiner Weise auf diesen mMSCs detektiert werden. Erstellt mit BioRender.com.

Bei der Charakterisierung der mit Lonza-FCS kultivierten mMSCs war noch kein CD44 in dem Nachweispanel der mMSC-Oberflächenantigene mit einbezogen. Daher ist es leider nicht möglich zu beurteilen, in wie weit dieser Marker auf den Zellen exprimiert gewesen ist. Allerdings lässt die Arbeit von Wen *et al.* vermuten, dass CD44 als typischer mMSC-Oberflächenmarker nichts mit dem Radioprotektionsverlust der aus Sigma-FCS mMSCs isolierten EVs zu tun hat. Grund für diese Annahme ist, dass die Gruppe gezeigt hat, dass die für die Versuche verwendeten mMSCs positiv für CD44, CD29, CD105 und SCA-1 waren. Die von diesen Zellen gewonnen EVs wiederum zeigten eine regenerative Wirkung in Form von Radioprotektion auf bestrahlte HSCs/HPCs (Wen *et al.* 2016). Demzufolge würde man bei mMSCs, die CD44 exprimieren – selbst wenn es wie in dem vorliegenden Fall nur die Hälfte der Zellen sind – davon ausgehen, dass die von ihnen sezernierten EVs eine nachweisbare protektive Wirkung besitzen. Dies trifft jedoch nicht auf die Sigma-FCS mMSC-EVs zu. Anders verhält es sich anscheinend mit dem Oberflächenantigen CD105, welches laut Wen *et al.* ebenfalls auf deren mMSCs detektiert werden konnte. Auch waren die mit Lonza-FCS kultivierten mMSCs, deren EVs in früheren Experimenten eine deutliche HSC-Protektion nach Bestrahlung zeigten, fast zu 100 % positiv für CD105 (Schoefinius *et al.* 2017). Demzufolge liegt die Vermutung nahe, dass die Abwesenheit von CD105 auf den Sigma-FCS mMSCs (+/- Zytokin-Zugabe) möglicherweise für den Protektionsverlust der aus diesen Zellen erhaltenen EVs verantwortlich ist. Gegen diese Folgerung sprechen jedoch die Ergebnisse von Lange *et al.* (2011). Im Zuge der Forschungsarbeit hinsichtlich der protektiven Eigenschaften der mMSCs und deren EVs, wurden mMSCs stabil mit GFP transduziert, um die Zellen nachverfolgbar zu machen. Ausgehend von diesen Zellen wurden neben einer großen Zellmenge (engl.: *bulk*) auch einzelne Klone näher betrachtet. Dabei zeigte ein Klon nach TX in letal bestrahlte Empfängertiere ganz besonders gute Erfolge hinsichtlich der Überlebensrate. Die Charakterisierung des Klones hingegen überraschte, da die Zellen im Gegensatz zu allen anderen Klonen und der *bulk* Kultur als einzige keine CD105 Expression aufwiesen, dafür aber einige Zellen CD34 positiv (9,8 %) und CD45 positiv (4,1 %) waren. Alle anderen Charakteristika sprachen jedoch auch weiterhin für eine reine mMSC-Kultur. Schlussendlich wurde auf Grund der Ergebnisse vermutet, dass die Abwesenheit von CD105 auf den mMSCs deren anti-inflammatorisches Potential verstärkt und insgesamt das Überleben der Empfängertiere durch seltener auftretende Lungenembolien verbessert

(Lange *et al.* 2011). Es wurden zwar in diesem Fall nur die radioprotektiven Eigenschaften der mMSCs betrachtet, jedoch wurde dort schon vermutet, dass die gesehenen Effekte auf parakrin wirkende bioaktive Moleküle bzw. auf sezernierten EVs zurückzuführen sind, was später auch bestätigt wurde (Lange *et al.* 2016). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die verbesserte Radioprotektion des mMSC-Klones durch seine sezernierten EVs ausgeführt wurde und das obwohl die mMSCs kein CD105 exprimierten. Somit müssten die in dieser Arbeit mit Sigma-FCS kultivierten mMSCs eigentlich auf Grund der Abwesenheit von CD105 eine gesteigerte Protektion zeigen und nicht wie vorliegend einen Protektionsverlust. Demzufolge scheint die Veränderung in der CD105 Expression im Vergleich von Lonza-FCS mMSCs zu Sigma-FCS mMSCs ebenfalls nicht die Ursache für das Ausbleiben der HSC-Protektion in den *in vitro* Assays zu sein.

Bliebe als letzte Möglichkeit noch CD73 übrig, welches ebenfalls eine unterschiedliche Expression aufwies. Unter Verwendung des Lonza-FCS konnten 43,1 % CD73-positive Zellen detektiert werden, während bei den mMSC-Kulturen mit Sigma-FCS (+/- Zytokin-Zugabe) alle Zellen negativ für diesen Marker waren. Auf die heterogene Expression des CD73, welche zu mindestens zwei Subpopulationen (hoch positiv und gering positiv) innerhalb von mMSC-Linien führt, ist bereits mehrfach eingegangen worden (Tan *et al.* 2019). Diese beiden Subpopulationen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer regenerativen Eigenschaften. Dies wurde entdeckt als CD73 hoch positive und CD73 gering positive mMSCs getrennt voneinander nach einem Myokardinfarkt in das Mäuseherz injiziert wurden. Nur in den Tieren, die die hoch positiven Zellen erhalten hatten, zeigte sich eine Regeneration des Herzens und es konnten zusätzlich anti-inflammatorisch wirkende immunmodulierende Effekte registriert werden (Tan *et al.* 2019). Bezogen auf die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse würde dies bedeuten, dass nicht alle von Lonza-FCS mMSCs sezernierten EVs regenerative Eigenschaften besaßen, sondern nur die 43,1 % CD73 positiven. Dieser Anteil scheint jedoch nach Datenlage ausreichend zu sein, um eine effiziente Radioprotektion zu gewährleisten. Da bei den Sigma-FCS mMSCs (+/- Zytokin-Zugabe) keine CD73 positiven Zellen mehr detektiert werden konnten, würde dies auch den kompletten Verlust der HSC-Protektion erklären. Ob diese Theorie tatsächlich zutrifft, müsste in weiteren Versuchen verifiziert werden. Eine Möglichkeit dazu wäre die beiden CD73 Subpopulationen der Lonza-FCS mMSCs zu separieren, anschließend von beiden Populationen EVs zu ernten und diese im Radioprotektionsassay auf regenerative Effekte hin zu überprüfen. Würde die Theorie stimmen, müssten nur die EVs der hoch positiven CD73 mMSCs in der Lage sein letal bestrahlte HSCs zu retten, während die EVs der gering positiven oder negativen mMSCs im Methylcelluloseassay lediglich so viele Kolonien wie die Bestrahlungskontrolle (Negativkontrolle) hervorbringen sollten. Da jedoch das Lonza-FCS aufgebraucht und nicht mehr verfügbar ist, ist die Durchführung des eben beschriebenen Experiments nur unter Verwendung eines anderen FCS (wie dem Sigma-FCS) machbar. Bei einer Kultivierung der in Lonza-FCS etablierte mMSCs-Linie in Sigma-FCS-haltigem Medium muss jedoch weiterhin der bestehende Verdacht, dass das jeweils verwendete FCS Einfluss auf die protektiven Eigenschaften haben könnte, berücksichtigt werden. Sollte diese Vermutung zutreffen, dann würden die zuvor CD73 positiven Zellen nun in dem Sigma-FCS-haltigen Medium kein CD73 mehr exprimieren und im Idealfall auch keine Protektion mehr zeigen. Dieses Ergebnis würde somit die Theorie bestärken, dass die Abwesenheit von CD73 Ursache für den Protektionsverlust ist und zusätzlich auch eine Erklärung liefern, warum die mMSCs kein CD73 – und auch kein CD105 – mehr exprimieren. Darüber lässt sich

bis dato leider auch nur spekulieren, ebenso ob die veränderte Expression der Oberflächenantigene, insbesondere von CD73, tatsächlich im Zusammenhang mit dem Ausbleiben der EV-Protektion stehen. Auf Grund der Tatsache, dass bei einem Wechsel des FCS, sowohl der Verlust der CD73 Expression als auch der Protektion aufgetreten ist, wird vermutet, dass das jeweils verwendet FCS die Expression der Oberflächenmarker beeinflusst und diese wiederum die regenerativen Effekte.

Schlussendlich gilt es auch hier wieder darauf hinzuweisen, dass auf Grund der Komplexität des Versuchssystems wahrscheinlicher ist, dass nicht nur ein einzelner Faktor für den Verlust der Radioprotektion verantwortlich ist. Vielmehr wird davon ausgegangen, dass der eigentlich gut etablierte Radioprotektionsassay auf Grund eines ungünstigen Zusammenspieles mehrerer Faktoren nicht mehr funktionsfähig ist.

4.2.3.4. Einfluss der Zellkulturbedingungen auf die Radioprotektion

In Bezug auf die Zellkulturbedingungen wurden die unterschiedlichen Charakteristika, welche auf Grund des FCS-Wechsels auftraten (siehe Kapitel 4.2.3.3) und deren möglicher Einfluss auf die Radioprotektion (siehe Kapitel 4.2.3 und 4.2.3.3) bereits hinreichend diskutiert. In diesem Abschnitt soll daher nur noch die nicht gewährleistete konstante CO₂-Begasung während der Zellkultivierung als weiterer wichtiger Unterschied zwischen den aktuellen Versuchsbedingungen und den früheren Versuchen, bei denen eine von mMSC-EVs ausgehende Radioprotektion detektierbar war, erörtert werden. Insbesondere da es nicht unwahrscheinlich ist, dass diese Begasungsstörungen sowohl Ursache für den Produktionsverlust, als auch für die nicht erwarteten Ergebnisse bzgl. Expressions- und Proteinlevel (Suppression oder Überexpression von nicht gezielt runterregulierten Genen; siehe Kapitel 4.2.2) sein könnten.

Die CO₂-Ausfälle traten unter anderem bei der Expansion der verschiedenen mMSCs und den anschließenden EV- und Zell-Ernten auf sowie bei der Durchführung der Radioprotektionsassays. Mindestens fünf solcher Ausfälle traten zeitlich günstig und deutlich genug auf, um erkannt zu werden. Bei weiteren war eine vollständige Nachvollziehbarkeit nicht gegeben und zusätzlich ist es nicht ausgeschlossen, dass einige CO₂-Ausfälle vollständig unentdeckt geblieben sind. Bei den Nachvollziehbaren zeigte sich, dass die Brutschränke mind. 1 bis max. 20 Std ohne den eigentlich vorgegeben CO₂-Partialdruck von 5 % auskommen mussten und somit keine stabilen Kultivierungsbedingungen gegeben waren.

Zusätzlich wurde bei einer nachträglichen Wartung des verwendeten Brutschrankes entdeckt, dass der CO₂-Sensor falsch kalibriert war. Demzufolge wurden die Zellen bereits über einen längeren Zeitraum ohne Kenntnisnahme mit einem wesentlich höheren CO₂-Gehalt (ca. 7 %) als die idealen Kulturbedingungen mit 5 % vorsehen, kultiviert. Wann dies begann ist unklar, ebenso, ob der Anstieg sprunghaft oder schleichend kam. Dies betraf jedoch den gesamten Zeitraum der Probengenerierung. Somit lässt sich für die EV-Produktion mutmaßen, dass die CO₂-Ausfälle sowie der dauerhaft falsche CO₂-Gehalt Stress in den Zellen ausgelöst haben und so anteilig dazu beigetragen haben könnten, dass die generierten EVs ihre protektiven Eigenschaften verloren haben. Es ist bekannt, dass Zellstress verschiedene Signalwege aktivieren kann, die je nach Art und Stärke des Stresses entweder das Überleben der Zelle garantieren sollen oder den Zelltod bewirken. Grundlage dieser Stressantworten ist eine schnelle Anpassung der Expression an die Situation, wodurch sich der RNA- und Proteingehalt der

Zelle drastisch im Vergleich zur Homöostase verändert (Fulda *et al.* 2010; Pizzinga *et al.* 2020). Dies könnte somit auch zu einer neuen Zusammensetzung der EV-Inhalte führen. Wie bereits erwähnt ist bis heute unbekannt wann, welche und warum Moleküle von der Zelle in EVs verpackt werden. Es ist jedoch klar, dass nur solche RNAs und/oder Proteine verpackt werden können, die zuvor von der Zelle produziert wurden. Demnach könnte sich so ein Verlust der sonst unter stressfreien Bedingungen gegeben Protektion erklären.

Zur Verifizierung der Vermutung, dass die veränderten CO₂-Bedingungen zu dem Verlust der Protektion beigetragen haben, müssten alle Expansionen unter diesmal stabilen Kulturbedingungen (37°C mit 5 % CO₂-Atmosphäre und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit) wiederholt werden. In erster Linie sollte jedoch erst einmal die der unbehandelten mMSCs, da von diesen auf jeden Fall eine Protektion erwartet wird, mit anschließenden EV-Ernten durchgeführt werden. Da jedoch die CO₂-Versorgung von extern reguliert wird und keiner Überwachung, geschweige denn schnellen Notfallmaßnahmen, unterliegt, ist dies leider nicht einfach zu bewerkstelligen. Gleiches gilt für die Radioprotektionsassays, die teilweise ebenfalls von den Ausfällen betroffen waren. Sollte es durch die immer wiederkehrenden CO₂-Ausfälle zu einem Zellsterben gekommen sein, würde dies ebenfalls die erhaltenen Ergebnisse erklären. In diesem Fall wären die protektiven Eigenschaften der EVs nicht vermindert oder verloren, sondern die HSC-Protektion würde nicht detektiert werden. Auf Grund der instabilen Kulturbedingungen wäre es denkbar, dass in den Vorkulturen weniger oder keine HPCs gebildet wurden oder die Koloniebildung in dem Methylcelluloseassay verhindert wurde. Demzufolge wäre auch hier eine Verifizierung der Theorie durch Wiederholung des gesamten Assay unter stabilen und optimalen Kulturbedingungen wünschenswert.

Insgesamt konnte im Rahmen dieser Arbeit leider nicht festgestellt werden, wodurch der Protektionsverlust ausgelöst wurde und somit auch nicht die zuvor nachgewiesene Protektion bestrahlter mHSCs durch mMSC-EVs wieder hergestellt werden. Allerdings kann festgehalten werden, dass schon bei den Kultivierungsbedingungen bereits zwei wichtige Faktoren (FCS und CO₂) beleuchtet wurden, die an dem Protektionsverlust Anteil haben könnten. Wieviele weitere der hier bereits diskutierten Faktoren sowie zusätzliche bis jetzt noch unerkannte weitere Faktoren eine Rolle spielen könnten ist auf Grund der Komplexität des Versuchsaufbaus jedoch nicht vorhersagbar.

4.3. Von Transkriptomanalyse hin zur Therapie

Durch die Analyse des Transkriptoms sowohl in mMSC-EVs als auch in den dazugehörigen parentalen mMSCs, war es möglich die RNAs zu bestimmen, die nicht nur in allen drei unabhängigen Präparaten vorkommen, sondern durch den Vergleich mit den detektierten RNA-Mengen in den parentalen mMSCs diejenigen RNAs gezielt hervorzuheben, die in den EVs signifikant angereichert oder reduziert vorliegen. Durch eine anschließende ausgiebige Literaturrecherche konnten 1007 der angereicherten und 1170 der reduzierte RNAs in den EVs auf Grund ihrer hauptsächlichen biologischen Funktion einer der 12 festgelegten Gruppen zugeordnet werden. Eine Auswahl weiterer Testkandidaten für die Radioprotektion, wie es nach der Proteomanalyse geschehen ist, fand bisweilen noch nicht statt. Durch die im Vergleich zu der Proteomanalyse enorme Datenanzahl wäre es diesmal ratsam, die Daten, bevor die nähere Betrachtung hinsichtlich möglicher radioprotektiver Eigenschaften geschieht, weiter einzugrenzen. Eine Möglichkeit dies durchzuführen wäre EVs von NIH/3T3, die nachweislich nicht dazu

befähigt sind bestrahlte HSCs zu retten (Schoefinius *et al.* 2017), zusammen mit deren parentalen Zellen einer NGS zu unterziehen. Analog zu den Ergebnissen des NGS der mMSCs und deren EVs, würden ebenfalls die RNAs ermittelt werden, welche im Vergleich zu den Zellen in den EVs angereichert oder reduziert vorliegen. Anschließend müssten die jeweiligen Ergebnisse für die hoch- oder runterregulierten RNAs der NIH/3T3-EVs mit denen der mMSC-EVs verglichen werden. Solche RNAs, die in beiden EV-Spezies sowohl gleich stark angereichert oder reduziert vorliegen würden, könnten für die weitere Untersuchung ausgeschlossen werden, da es unwahrscheinlich ist, dass sie an der Protektion beteiligt sind. Somit sollten schlussendlich nur noch solche RNAs übrigbleiben, die entweder überhaupt nicht in den NIH/3T3-EVs detektiert werden oder nicht signifikant angereichert oder reduziert sind. Ausgehend von den verbleibenden RNAs könnten anschließend neue vielversprechende Kandidaten gewählt und diese *in vitro* auf ihre Beteiligung an der Protektion getestet werden. Dies könnte in gleicher Weise wie die Analyse der drei Proteomkandidaten (Gal1, Sod1 und Prdx1) durchgeführt werden, indem von den gewählten Kandidaten die entsprechende Genexpression in mMSCs mittels spezifisch eingebrachter shRNA supprimiert wird, nachfolgend aus den genetisch veränderten Zellen EVs isoliert und diese dann in einem funktionsfähigen Radioprotektionsassay eingesetzt werden. Würden durch diese Analyse mehrere Kandidaten gefunden werden, die tatsächlich an dem Support letal bestrahlter HSCs beteiligt sind, sollten diese anschließend gezielt in mMSCs überexprimiert werden. Auch hierfür böte sich eine stabile Integration der entsprechenden Gene mittels lentiviraler Vektoren in die mMSCs an. Nach anschließender Überprüfung einer erfolgreichen Überexpression, die sich ebenfalls in den EVs widerspiegeln sollte, könnte ein erneuter Einsatz der EVs in einem funktionsfähigen Radioprotektionsassay zeigen, ob eine Überexpression die protektiven Eigenschaften noch verstärkt. Ebenso sollte analysiert werden, ob bestimmte Kombinationen mehrerer Kandidaten eine stärkere und zuverlässigere Protektion bewirken. In diesem Zusammenhang könnte auch darüber nachgedacht werden die Proteomanalyse zu wiederholen. Mit dem heutigen Stand der Technik wäre es sehr wahrscheinlich dadurch die Anzahl an detektierten Proteinen deutlich zu erhöhen. Zusätzlich könnten auch in dieser Analyse parallel die parentalen Zellen miteingeschlossen werden, um nur noch die speziell in den EVs angereicherten oder reduzierten Proteine zu erhalten. Durch diese erneute und umfangreichere Proteomanalyse würde nicht nur eine bessere Aufklärung hinsichtlich der in den mMSC-EVs enthaltenen Proteine gegeben werden, sondern es könnten auch noch weitere vielversprechende Kandidaten entdeckt werden.

Nach Extraktion aller radioprotektiv-wirkenden Kandidaten aus Transkriptom und Proteom, sollten diese ebenfalls kombiniert miteinander getestet werden. Aus der besten Kombination an Proteinen/RNAs könnte schlussendlich eine vielversprechende Therapie für Strahlenopfer und Krebspatienten, die auf Grund ihrer Strahlen-/Chemotherapie an einer ernsten Myelosuppression leiden, entwickelt werden. Wie diese aussehen würde, müsste durch gezielte Untersuchungen ermittelt werden. Vorstellbar wäre z.B. eine synthetische (RNAs)/rekombinante (Proteine) Herstellung der benötigten Bestandteile, die anschließend in entsprechender Kombination einfach dem Patienten injiziert oder vor der Verabreichung in eine geeignete Transportform wie Liposomen eingebracht werden. Auch der Einsatz von zuvor unter kontrollierten Bedingungen genetisch optimierten EVs wäre denkbar, wenn die Protektion durch eine Überexpression von Molekülen wie Proteinen und RNAs bewirkt werden sollte. Dieser Ansatz würde die beste Therapieform darstellen, da EVs nicht nur die protektiven Moleküle vor

einem Abbau schützen, sondern auch stabil gegenüber Einfrier- und Auftauprozessen sind und auf Grund fehlender Reproduktionsfähigkeit eine sichere Anwendung im Patienten erlauben (Lener et al. 2015). Hinzu kommt, dass die Kultivierung von humanen MSCs in großen Maßstäben zur Gewinnung ausreichender EVs für eine therapeutische Anwendung bereits erfolgreich durchgeführt wird (Börger et al. 2017; Allan et al. 2020). Ebenso wurde bereits gezeigt, dass sich auch humane MSCs erfolgreich mittels lentiviraler Vektoren stabil transduzieren lassen und somit eine MSC-Linie generiert werden könnte, die die entsprechenden Proteine/RNAs dauerhaft überexprimiert (Fischer et al. 2016). Ein weiterer Vorteil bei der Anwendung von EVs ist, dass sie *i.v.* verabreicht nach letaler Bestrahlung fast ausschließlich die geschädigten HSCs im KM ansteuern, wie in dieser Arbeit und der dazugehörigen Publikation (Schoefinius et al. 2017) eindeutig belegt werden konnte. Somit wäre bereits ein gezielter Transfer der Therapeutika hin zum Ort des Geschehens gewährleistet.

5. Online Referenzen

- 1 Bundesamt für Strahlenschutz (BfS); https://www.bfs.de/DE/themen/ion/einfuehrung/einfuehrung_node.html (04.05.2021, 18:38)
- 2 Bundesamt für Strahlenschutz (BfS); <https://www.bfs.de/DE/themen/ion/umwelt/naturliche-strahlenbelastung/naturliche-strahlenbelastung.html> (04.05.2021, 18:42)
- 3 Bundesamt für Strahlenschutz (BfS); <https://www.bfs.de/DE/themen/ion/wirkung/einfuehrung/einfuehrung.html> (04.05.2021, 18:43)
- 4 Radiation Dosimetry; Was ist Stochastischer Effekt – Ionisierende Strahlung – Definition; Dezember 27, 2019 von Nick Connor; <https://www.radiation-dosimetry.org/de/was-ist-stochastischer-effekt-ionisierende-strahlung-definition/#:~:text=Strahlendosimetrie-,Stochastische%20Wirkungen%20ionisierender%20Strahlung%20treten%20auf%20im%20Allgemeinen%20ohne%20einen%20Dosis-schwellenwert.&text=Das%20Krebsrisiko%20wird%20%20als,auch%20Erbkrankheiten%20sind%20stochastische%20Effekte.> (07.05.2021;15:15)
- 5 Radiation Dosimetry; Was ist deterministische Wirkung – ionisierende Strahlung – Definition; Dezember 27, 2019 von Nick Connor; [https://www.radiation-dosimetry.org/de/was-ist-deterministische-wirkung-ionisierende-strahlung-definition/.](https://www.radiation-dosimetry.org/de/was-ist-deterministische-wirkung-ionisierende-strahlung-definition/) (06.07.2021; 11:30)
- 6 MSD MANUAL - Ausgabe für medizinische Fachkreise; Strahlenbelastung und Kontamination; Juli 2019 von Jerrold T. Bushberg; <https://www.msmanuals.com/de-de/profi/verletzungen,-vergiftungen/strahlenbelastung-und-kontamination/strahlenbelastung-und-kontamination?query=strahlenkrankheit%20aus%20sen#> (07.07.2021; 19:00)
- 7 Bundesamt für Strahlenschutz (BfS); https://www.bfs.de/DE/themen/ion/wirkung/strahlenunfall-folge/strahlenunfall-folge_node.html (01.02.2022; 10:22)
- 8 Thieme via medici; <https://m.thieme.de/viamedici/klinik-faecher-innere-1535/a/entstehung-und-behandlung-der-strahlenkrankheit-4329.htm#:~:text=Bei%204%20Sievert%20stirbt%20die,Betroffenen%20innerhalb%20von%20zwei%20Wochen.> (22.02.2022; 19:39)
- 9 CDC – Center for Disease Control and Prevention; <https://www.cdc.gov/nceh/radiation/emergencies/arsphysicianfactsheet.htm> (22.02.2022; 19:45)
- 10 Bundesamt für Strahlenschutz (BfS); <https://www.bfs.de/DE/themen/ion/anwendung-medizin/strahlentherapie/einfuehrung/einfuehrung.html> (01.02.2022, 12:42 Uhr)
- 11 Deutsche Krebshilfegesellschaft – ONKO Internetportal; <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/therapieformen/strahlentherapie-bei-krebs.html> (28.02.2022, 16:02)
- 12 Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. – onkopedia; Stand November 2020; <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/konditionierung/@@guideline/html/index.html> (28.02.2022, 16:40)
- 13 MediLexi.de: Stand 11.11.2021; <https://medlexi.de/Myelosuppression> (02.03.2022, 10:13)
- 14 UniProt - <https://www.uniprot.org/uniprot/Q06830> (01.04.2022, 19:32)
- 15 UniProt- <https://www.uniprot.org/uniprot/P00441> (04.04.2022, 9:13)
- 16 Radiation Dosimetry; Was ist Strahlung –Definition; Dezember 16, 2019 von Nick Connor; [https://www.radiation-dosimetry.org/de/was-ist-strahlung-definition/.](https://www.radiation-dosimetry.org/de/was-ist-strahlung-definition/) (13.07.2022, 12:10)

17 Homepage of the Lentiviral Gene Ontology Vectors – 2015 von Kristoffer Riecken;
<http://www.lentigo-vectors.de/protocols.htm> (28.03.2017, 9:25)

18 STEMCELL Technologies; <https://www.stemcell.com/products/mesencult-expansion-kit-mouse.html>
(01.09.2022, 12:24)

6. Referenzen

- Adak S, Mukherjee S, Sen D. 2017. Mesenchymal Stem Cell as a Potential Therapeutic for Inflammatory Bowel Disease- Myth or Reality? *Curr Stem Cell Res Ther.* 12(8):644–657. doi:10.2174/1574888X12666170914113633. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28914206/>.
- Aggarwal R, Lu J, J. Pompili V, Das H. 2012. Hematopoietic Stem Cells: Transcriptional Regulation, Ex Vivo Expansion and Clinical Application. *Curr Mol Med.* 12(1):34. doi:10.2174/156652412798376125. </pmc/articles/PMC3286491/>.
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nat* 2000 4046774. 404(6774):193–197. doi:10.1038/35004599. <https://www.nature.com/articles/35004599>.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2007. *Molecular Biology of the Cell.* doi:10.1201/9780203833445. <http://dx.doi.org/10.1201/9780203833445>.
- Alfadda AA, Sallam RM. 2012. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol.* 2012. doi:10.1155/2012/936486. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22927725/>.
- Allan D, Tieu A, Lalu M, Burger D. 2020. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles for regenerative therapy and immune modulation: Progress and challenges toward clinical application. *Stem Cells Transl Med.* 9(1):39. doi:10.1002/SCTM.19-0114. </pmc/articles/PMC6954691/>.
- Anderson HC. 1969. VESICLES ASSOCIATED WITH CALCIFICATION IN THE MATRIX OF EPIPHYSEAL CARTILAGE. *J Cell Biol.* 41(1):59. doi:10.1083/JCB.41.1.59.. </pmc/articles/PMC2107736/?report=abstract>.
- Anthony BA, Link DC. 2014. Regulation of Hematopoietic Stem Cells by Bone Marrow Stromal Cells. *Trends Immunol.* 35(1):32. doi:10.1016/J.IT.2013.10.002. [accessed 2022 Mar 8]. </pmc/articles/PMC3947365/>.
- Asada N, Takeishi S, Frenette PS. 2017. Complexity of bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Int J Hematol.* 106(1):45. doi:10.1007/S12185-017-2262-9. </pmc/articles/PMC8808638/>.
- Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC, Phinney DG. 2003. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem.* 89(6):1235–1249. doi:10.1002/jcb.10594.
- Barnett GC, West CML, Dunning AM, Elliott RM, Coles CE, Pharoah PDP, Burnet NG. 2009. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat Rev Cancer* 2009 92. 9(2):134–142. doi:10.1038/nrc2587. <https://www.nature.com/articles/nrc2587>.
- Barondes SH, Castronovo V, Cooper DNW, Cummings RD, Drickamer K, Felzi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K ichi, et al. 1994. Galectins: A family of animal β -galactoside-binding lectins. *Cell.* 76(4):597–598. doi:10.1016/0092-8674(94)90498-7.
- Barrass SV., Butcher SJ. 2019. Advances in high-throughput methods for the identification of virus receptors. *Med Microbiol Immunol* 2019 2093. 209(3):309–323. doi:10.1007/S00430-019-00653-2.. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00430-019-00653-2>.
- Barton-Burke M, Dwinell DM, Kafkas L, Lavalley C, Sands H, Proctor C, Johnson E. 2008. Graft-versus-host disease: a complex long-term side effect of hematopoietic stem cell transplant. *Oncology (Williston Park).* 22(11 Suppl Nurse Ed):31–45.
- Barton MB, Jacob S, Shafiq J, Wong K, Thompson SR, Hanna TP, Delaney GP. 2014. Estimating the demand for radiotherapy from the evidence: A review of changes from 2003 to 2012. *Radiother Oncol.* 112(1):140–144. doi:10.1016/J.RADONC.2014.03.024. <http://www.thegreenjournal.com/article/S0167814014001698/fulltext>.
- Baskar Rajamanickam, Lee KA, Yeo R, Yeoh K-W, Baskar R, Phil M. 2012. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *Int J Med Sci.* 9(3):193–199. doi:10.7150/ijms.3635. [accessed 2022 Feb 10]. <http://www.medsci.org/193>.

- Bellantuono I. 2004. Haemopoietic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 36(4):607–620. doi:10.1016/J.BIOCEL.2003.10.008.
- Bentzen SM. 2006. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: Radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer.* 6(9):702–713. doi:10.1038/nrc1950. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16929324/>.
- Berckmans RJ, Sturk A, Van Tienen LM, Schaap MCL, Nieuwland R. 2011. Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva. *Blood.* 117(11):3172–3180. doi:10.1182/BLOOD-2010-06-290460. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21248061/>.
- Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, et al. 2008. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 371(9624):1579–1586. doi:10.1016/S0140-6736(08)60690-X.
- Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. 2003. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.* 31(10):890–896. doi:10.1016/S0301-472X(03)00110-3. <http://www.exphem.org/article/S0301472X03001103/fulltext>.
- Bohlius J, Hallek M. 2010. 15.3 Tumoranämie und therapieinduzierte Myelosuppression. In: Szeimies R-M, Hauschild A, Garbe C, Kaufmann R, Landthaler M, editors. *Tumoren der Haut.* 2010th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. p. 717–719. <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/b-0034-39254>.
- Börger V, Bremer M, Ferrer-Tur R, Gockeln L, Stambouli O, Becic A, Giebel B. 2017. Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles and Their Potential as Novel Immunomodulatory Therapeutic Agents. *Int J Mol Sci.* 18(7). doi:10.3390/IJMS18071450. </pmc/articles/PMC5535941/>.
- Bruno S, Grange C, Collino F, Deregibus MC, Cantaluppi V, Biancone L, Tetta C, Camussi G. 2012. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury. *PLoS One.* 7(3). doi:10.1371/journal.pone.0033115.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, et al. 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 55(4):611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
- Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. 2006. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology.* 16(11). doi:10.1093/GLYCOB/CWL025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16840800/>.
- Caplan AI. 1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 9(5):641–650. doi:10.1002/JOR.1100090504. [accessed 2022 Apr 6]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1870029/>.
- Caplan AI. 2007. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 213(2):341–347. doi:10.1002/JCP.21200. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.21200>.
- Caroti CM, Ahn H, Salazar HF, Joseph G, Sankar SB, Willett NJ, Wood LB, Taylor WR, Lyle AN. 2017. A novel technique for accelerated culture of murine mesenchymal stem cells that allows for sustained multipotency. *Sci Rep.* 7(1):1–14. doi:10.1038/s41598-017-13477-y. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-13477-y>.
- Catlin SN, Busque L, Gale RE, Gutter P, Abkowitz JL. 2011. The replication rate of human hematopoietic stem cells in vivo. *Blood.* 117(17):4460–4466. doi:10.1182/BLOOD-2010-08-303537. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21343613/>.
- Celso C Lo, Scadden DT. 2011. The haematopoietic stem cell niche at a glance. *J Cell Sci.* 124(21):3529–3535. doi:10.1242/JCS.074112/-/DC2. </pmc/articles/PMC3215569/>.
- Challen GA, Boles N, Lin KKY, Goodell MA. 2009. Mouse Hematopoietic Stem Cell Identification And Analysis. *Cytometry A.* 75(1):14. doi:10.1002/CYTO.A.20674. </pmc/articles/PMC2640229/>.

- Chebib J, Jackson BC, López-Cortegano E, Tautz D, Keightley PD. 2020. Inbred lab mice are not isogenic: genetic variation within inbred strains used to infer the mutation rate per nucleotide site. *Hered* 2020 1261. 126(1):107–116. doi:10.1038/s41437-020-00361-1. <https://www.nature.com/articles/s41437-020-00361-1>.
- Chotinantakul K, Leeanansaksiri W. 2012. Hematopoietic stem cell development, niches, and signaling pathways. *Bone Marrow Res.* 2012:1–16. doi:10.1155/2012/270425. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22900188/>.
- Chumakov SP, Kravchenko JE, Prassolov VS, Frolova EI, Chumakov PM. 2010. Efficient downregulation of multiple mRNA targets with a single shRNA-expressing lentiviral vector. *Plasmid.* 63(3):143–149. doi:10.1016/J.PLASMID.2009.12.003.
- Colombo M, Raposo G, Théry C. 2014. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 30(1):255–289. doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
- Crawford N. 1971. The Presence of Contractile Proteins in Platelet Microparticles Isolated from Human and Animal Platelet-free Plasma. *Br J Haematol.* 21(1):53–69. doi:10.1111/J.1365-2141.1971.TB03416.X. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2141.1971.tb03416.x>.
- Crippa S, Bernardo ME. 2018. Mesenchymal Stromal Cells: Role in the BM Niche and in the Support of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *HemaSphere.* 2(6). doi:10.1097/HS9.000000000000151. </pmc/articles/PMC6745957/>.
- Cronin J, Zhang X-Y, Reiser J. 2005. Altering the Tropism of Lentiviral Vectors through Pseudotyping. *Curr Gene Ther.* 5(4):387–398. doi:10.2174/1566523054546224.
- Culotta VC, Luk E. 2004 Jan 1. Chaperones for Metalloproteins. *Encycl Biol Chem.*:383–386. doi:10.1016/B0-12-443710-9/00101-0.
- Cunha FF, Martins L, Martin PKM, Stilhano RS, Han SW. 2013. A comparison of the reparative and angiogenic properties of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow of BALB/c and C57/BL6 mice in a model of limb ischemia. *Stem Cell Res Ther.* 4(4):86. doi:10.1186/SCRT245. </pmc/articles/PMC3856613/>.
- Cutine AM, Bach CA, Veigas F, Merlo JP, Laporte L, Manselle Cocco MN, Massaro M, Sarbia N, Perrotta RM, Mahmoud YD, et al. 2021. Tissue-specific control of galectin-1-driven circuits during inflammatory responses. *Glycobiology.* 31(8):891–907. doi:10.1093/GLYCOB/CWAB007. [<https://academic.oup.com/glycob/article/31/8/891/6106260>].
- Dainiak N. 2002. Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation. *Exp Hematol.* 30:513–528.
- Dainiak N. 2010. Rationale and recommendations for treatment of radiation injury with cytokines. *Health Phys.* 98(6):838–842. doi:10.1097/HP.0B013E3181B3FCE5. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20445391/>.
- Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Ch MBB, Barton M. 2005. The Role of Radiotherapy in Cancer Treatment Estimating Optimal Utilization from a Review of Evidence-Based Clinical Guidelines. doi:10.1002/cncr.21324. www.interscience.wiley.com.
- Doepfner TR, Herz J, Görgens A, Schlechter J, Ludwig A-K, Radtke S, de Miroschedji K, Horn PA, Giebel B, Hermann DM. 2015. Extracellular Vesicles Improve Post-Stroke Neuroregeneration and Prevent Postischemic Immunosuppression. *Stem Cells Transl Med.* 4(10):1131–1143. doi:10.5966/SCTM.2015-0078/-/DC1. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26339036/>.
- Doi H, Inaba M, Yamamoto Y, Taketani S, Mori SI, Sugihara A, Ogata H, Toki J, Hisha H, Inaba K, et al. 1997. Pluripotent hemopoietic stem cells are c-kit^{low}. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(6):2513–2517. doi:10.1073/PNAS.94.6.2513/ASSET/85585C61-968A-4A48-9ACB-5915DF09F107/ASSETS/GRAPHIC/PQ0673886004.JPEG. www.pnas.org.

- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8(4):315–317. doi:10.1080/14653240600855905. <http://dx.doi.org/10.1080/14653240600855905>.
- Dörr H, Meineke V. 2011. Acute radiation syndrome caused by accidental radiation exposure-therapeutic principles. <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/9/126>.
- Dropulić B. 2011. Lentiviral vectors: Their molecular design, safety, and use in laboratory and preclinical research. *Hum Gene Ther*. 22(6):649–657. doi:10.1089/HUM.2011.058.
- Dufait I, Liechtenstein T, Lanna A, Bricogne C, Laranga R, Padella A, Breckpot K, Escors D. 2012. Retroviral and Lentiviral Vectors for the Induction of Immunological Tolerance. *Scientifica (Cairo)*. 2012:1–14. doi:10.6064/2012/694137.
- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. 1998. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*. 72(11):8463–8471. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9765382>.
- Džopalić T, Kostić Miloš, Kostić Milena, Marjanović G, Guzina J, Jurišić V, Božić Nedeljković B. 2020. Effects of galectin-1 on immunomodulatory properties of human monocyte-derived dendritic cells. *Growth Factors*. 38(5–6):235–246. doi:10.1080/08977194.2021.1947267. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34223785/>.
- Elchuri S, Oberley TD, Qi W, Eisenstein RS, Roberts LJ, Van Remmen H, Epstein CJ, Huang TT. 2005. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene*. 24(3):367–380. doi:10.1038/SJ.ONC.1208207. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15531919/>.
- Escors D, Kochan G, Stephenson H, Breckpot K. 2012. Development of Retroviral and Lentiviral Vectors. *SpringerBriefs Biochem Mol Biol*:11–28. doi:10.1007/978-3-0348-0402-8_2. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-0348-0402-8_2.
- Farrell RE. 2010 Jan 1. RNAi: Take a RISC – Role the Dicer. *RNA Methodol*:539–560. doi:10.1016/B978-0-12-374727-3.00023-1.
- Fehse B, Kustikova OS, Bubenheim M, Baum C. 2004. Pois(s)on – It's a Question of Dose.... *Gene Ther*. 11(11):879–881. doi:10.1038/sj.gt.3302270. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3302270>.
- Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. 2009. Graft-versus-Host Disease. *Lancet*. 373(9674):1550. doi:10.1016/S0140-6736(09)60237-3. [accessed 2022 Apr 13]. [/pmc/articles/PMC2735047/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1947267/).
- Fischer S, Cornils K, Speiseder T, Badbaran A, Reimer R, Indenbirken D, Grundhoff A, Brunswig-Spickenheier B, Alawi M, Lange C. 2016. Indication of Horizontal DNA Gene Transfer by Extracellular Vesicles. *PLoS One*. 11(9). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0163665. [/pmc/articles/PMC5042424/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2735047/).
- Fliedner TM, Friesecke I, Beyrer K. 2001. Medical Management of Radiation Accidents: Management of the Acute Radiation Syndrome. www.birjournals.org.
- Frenette PS, Pinho S, Lucas D, Scheiermann C. 2013. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu Rev Immunol*. 31:285–316. doi:10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-032712-095919. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23298209/>.
- Friedenstein AJ, Heersche J, Kanis J. 1990. Osteogenic stem cells in bone marrow. *J Bone Miner Res*. 7:243–272.
- Fukuda K. 2001. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif Organs*. 25(3):187–193. doi:10.1046/J.1525-1594.2001.025003187.X. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11284885/>.
- Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. 2010. Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. *Int J Cell Biol*. 2010. doi:10.1155/2010/214074. [/pmc/articles/PMC2825543/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/214074/).

- Gallay P, Swingler S, Song J, Bushman F, Trono D. 1995. HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell*. 83(4):569–576. doi:10.1016/0092-8674(95)90097-7. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90097-7](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(95)90097-7).
- Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A, Cantaluppi V, Tetta C, Camussi G. 2011. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. 26(5):1474–1483. doi:10.1093/NDT/GFR015. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21324974/>.
- Gharibi B, Hughes FJ. 2012. Effects of Medium Supplements on Proliferation, Differentiation Potential, and In Vitro Expansion of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Transl Med*. 1(11):771–782. doi:10.5966/SCTM.2010-0031. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.5966/sctm.2010-0031>.
- Giebel B, Helmbrecht C. 2015. 6. Mikrovesikel, Exosomen und andere extrazelluläre Vesikel. In: Sack U, editor. *Zelluläre Diagnostik und Therapie*. Berlin, Boston: De Gruyter. p. 100–124.
- Giebel B, Helmbrecht C. 2017. Methods to analyze EVs. In: *Methods in Molecular Biology*. Vol. 1545. Humana Press Inc. p. 1–20. https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-6728-5_1.
- Giebel B, Punzel M. 2008. Lineage development of hematopoietic stem and progenitor cells. *Biol Chem*. 389(7):813–824. doi:10.1515/BC.2008.092/MACHINEREADABLECITATION/RIS. <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/BC.2008.092/html>.
- Gordon MS. 2001. Myelosuppression. In: *Current Cancer Therapeutics*. London: Current Medicine Group. p. 374–381. http://link.springer.com/10.1007/978-1-4613-1099-0_25.
- Götz W, Baumhoer D, Steinbrück I. 2003. 4.6 Korpelgewebe. In: *Histologie: Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog ; [neuer GK]*. 2. Urban und Fischer. p. 59–60.
- Gould SJ, Raposo G. 2013. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell vesicles*. 2:3–5. doi:10.3402/jev.v2i0.20389. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3760635&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Haddad N El. 2011. Mesenchymal Stem Cells: Immunology and Therapeutic Benefits. In: Gholamrezanezhad A, editor. *Stem Cells in Clinic and Research*. IntechOpen. <https://www.intechopen.com/chapters/18219>.
- Hall EJ, Giaccia AJ. 2006. *Radiobiology for the Radiologist*. 6.te. Lippincott Williams & Wilkins. https://books.google.de/books?id=6HhjwRyqBzgC&pg=PA52&hl=de&source=gbs_selected_pages&cad=3#v=onepage&q&f=false.
- Hao Q, Gudapati V, Monsel A, Park JH, Hu S, Kato H, Lee JH, Zhou L, He H, Lee JW. 2019. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Decrease Lung Injury in Mice. *J Immunol*. 203(7):1961–1972. doi:10.4049/JIMMUNOL.1801534/-/DCSUPPLEMENTAL. [accessed 2022 Aug 30]. <https://www.jimmunol.org/content/203/7/1961>.
- Harding C, Heuser J, Stahl P. 1983. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol*. 97(2):329–339. doi:10.1083/JCB.97.2.329. [accessed 2022 Apr 22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6309857/>.
- Hartjes TA, Mytnyk S, Jenster GW, van Steijn V, van Royen ME. 2019. Extracellular vesicle quantification and characterization: Common methods and emerging approaches. *Bioengineering*. 6(1). doi:10.3390/bioengineering6010007.
- Henrich D, Verboket R, Schaible A, Konradowitz K, Oppermann E, Brune JC, Nau C, Meier S, Bonig H, Marzi I, et al. 2015. Characterization of bone marrow mononuclear cells on biomaterials for bone tissue engineering in vitro. *Biomed Res Int*. 2015. doi:10.1155/2015/762407.
- Hérodin F, Drouet M. 2005. Cytokine-based treatment of accidentally irradiated victims and new approaches. *Exp Hematol*. 33(10):1071–1080. doi:10.1016/J.EXPHEM.2005.04.007. [accessed 2022 Apr 14]. <http://www.exphem.org/article/S0301472X05002055/fulltext>.
- Hoggatt J, Pelus LM. 2013 Jan 1. Hematopoiesis. *Brenner's Encycl Genet Second Ed*:418–421. doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.00686-0.

- 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. doi:10.1080/14653240500319234.
- Hossain MM, Banik NL, Ray SK. 2013. N-Myc knockdown and apigenin treatment controlled growth of malignant neuroblastoma cells having N-Myc amplification. *Gene*. 529(1):27–36. doi:10.1016/J.GENE.2013.07.094.
- Hu KX, Sun QY, Guo M, Ai HS. 2010. The radiation protection and therapy effects of mesenchymal stem cells in mice with acute radiation injury. *Br J Radiol*. 83(985):52. doi:10.1259/BJR/61042310. /pmc/articles/PMC3487250/.
- Huang EY, Chen YF, Chen YM, Lin IH, Wang CC, Su WH, Chuang PC, Yang KD. 2012. A novel radioresistant mechanism of galectin-1 mediated by H-Ras-dependent pathways in cervical cancer cells. *Cell Death Dis* 2012 31. 3(1):e251–e251. doi:10.1038/cddis.2011.120.. <https://www.nature.com/articles/cddis2011120>.
- Huang Y, Qiu R, Mai W, Kuang J, Cai X, Dong Y, Hu Y, Song Y, Cai A, Jiang Z. 2012. Effects of insulin-like growth factor-1 on the properties of mesenchymal stem cells in vitro. *J Zhejiang Univ Sci B*. 13(1):20. doi:10.1631/JZUS.B1100117. /pmc/articles/PMC3251748/.
- Itoh K, Tezuka H, Sakoda H, Konno M, Nagata K, Uchiyama T, Uchino H, Mori KJ. 1989. Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow. *Exp Hematol*. 17(2):145–153.
- Jackson SP, Bartek J. 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. doi:10.1038/nature08467.
- Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*. 64(2):295–312. doi:10.1002/(SICI)1097-4644(199702)64:2<295::AID-JCB12>3.0.CO;2-I. <https://europepmc.org/article/med/9027589>.
- Jankovičová J, Sečová P, Michalková K, Antálíková J. 2020. Tetraspanins, More than Markers of Extracellular Vesicles in Reproduction. *Int J Mol Sci*. 21(20):1–30. doi:10.3390/IJMS21207568. /pmc/articles/PMC7589920/.
- Jenkins NA, Copeland NG, Taylor BA, Lee BK. 1982. Organization, distribution, and stability of endogenous ecotropic murine leukemia virus DNA sequences in chromosomes of *Mus musculus*. *J Virol*. 43(1):26–36. doi:10.1128/JVI.43.1.26-36.1982. <https://journals.asm.org/journal/jvi>.
- Justiz Vaillant AA, Modi P, Mohammadi O. 2022 May 1. Graft Versus Host Disease. *StatPearls* [Internet]. doi:10.1016/B978-0-323-54945-5.00023-0. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538235/>.
- Kalani A, Tyagi A, Tyagi N. 2013. Exosomes: Mediators of Neurodegeneration, Neuroprotection and Therapeutics. *Mol Neurobiol* 2013 491. 49(1):590–600. doi:10.1007/S12035-013-8544-1. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-013-8544-1>.
- Katsuda T, Tsuchiya R, Kosaka N, Yoshioka Y, Takagaki K, Oki K, Takeshita F, Sakai Y, Kuroda M, Ochiya T. 2013. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. *Sci Rep*. 3. doi:10.1038/SREP01197. /pmc/articles/PMC3561625/.
- Kelly K, Rasko JEJ. 2021. Mesenchymal Stromal Cells for the Treatment of Graft Versus Host Disease. *Front Immunol*. 12:4457. doi:10.3389/FIMMU.2021.761616/BIBTEX.
- Kfoury Y, Scadden DT. 2015. Mesenchymal Cell Contributions to the Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell*. 16(3):239–253. doi:10.1016/J.STEM.2015.02.019. <http://www.cell.com/article/S1934590915000752/fulltext>.
- Kiel MJ, Morrison SJ. 2006. Maintaining Hematopoietic Stem Cells in the Vascular Niche. *Immunity*. 25(6):862–864. doi:10.1016/J.IMMUNI.2006.11.005.
- Kiel MJ, Morrison SJ. 2008. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*. 8(4):290–301. doi:10.1038/NRI2279. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18323850/>.

- Kiel MJ, Yilmaz ÖH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. 2005. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 121(7):1109–1121. doi:10.1016/J.CELL.2005.05.026. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15989959/>.
- Kim DH, Rossi JJ. 2007. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet*. 8(3):173–184. doi:10.1038/NRG2006. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17304245/>.
- Kim SW, Zhang HZ, Kim CE, An HS, Kim JM, Kim MH. 2012. Amniotic mesenchymal stem cells have robust angiogenic properties and are effective in treating hindlimb ischaemia. *Cardiovasc Res*. 93(3):525–534. doi:10.1093/CVR/CVR328. <https://academic.oup.com/cardiovasres/article/93/3/525/496419>.
- Klein D, Steens J, Wiesemann A, Schulz F, Kaschani F, Röck K, Yamaguchi M, Wirsdörfer F, Kaiser M, Fischer JW, et al. 2017. Mesenchymal Stem Cell Therapy Protects Lungs from Radiation-Induced Endothelial Cell Loss by Restoring Superoxide Dismutase 1 Expression. *Antioxid Redox Signal*. 26(11):563. doi:10.1089/ARS.2016.6748. [/pmc/articles/PMC5393411/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28111111/).
- Koç ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM. 2000. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol*. 18(2):307–316. doi:10.1200/JCO.2000.18.2.307. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10637244/>.
- Kondo M, Weissman IL, Akashi K. 1997. Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow. *Cell*. 91(5):661–672. doi:10.1016/S0092-8674(00)80453-5. <http://www.cell.com/article/S0092867400804535/fulltext>.
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. 1999. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(19):10711–10716. doi:10.1073/PNAS.96.19.10711. www.pnas.org.
- Kordelas L, Rebmann V, Ludwig A, Radtke S, Ruesing J, Doepfner TR, Epple M, Horn PA, Beelen DW, Giebel B. 2014. MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. doi:10.1038/leu.2014.41. <http://www.nature.com/leu>.
- Kozlova NI, Morozevich GE, Gevorgian NM, Berman AE. 2020. Implication of integrins $\alpha 3 \beta 1$ and $\alpha 5 \beta 1$ in invasion and anoikis of SK-Mel-147 human melanoma cells: non-canonical functions of protein kinase Akt. *Aging (Albany NY)*. 12(23):24345–24356. doi:10.18632/AGING.202243. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33260159/>.
- Kurreck J, Schubert S, Erdmann VA. 2008 Apr 4. Antisense-, Ribozym- und RNA-Interferenz-Strategien: Methoden des posttranskriptionellen Gene Silencing in der Molekularen Medizin. *Grundlagen der Mol Medizin*.:410–424. doi:10.1007/978-3-540-69414-4_18. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-69414-4_18.
- Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NSK, Choo A, Chen TS, Salto-Tellez M, Timmers L, Lee CN, El Oakley RM, et al. 2010. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res*. 4(3):214–222. doi:10.1016/J.SCR.2009.12.003. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20138817/>.
- Laiosa C V., Stadtfeld M, Graf T. 2006. DETERMINANTS OF LYMPHOID-MYELOID LINEAGE DIVERSIFICATION. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090742>. 24:705–738. doi:10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.24.021605.090742. <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090742>.
- Landau NR, Warton M, Littman DR. 1988. The envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus binds to the immunoglobulin-like domain of CD4. *Nat* 1988 3346178. 334(6178):159–162. doi:10.1038/334159a0. <https://www.nature.com/articles/334159a0>.
- Lange C. *et al.* Nicht veröffentlichte Daten.
- Lange C, Brunswig-Spickenheier B, Cappallo-Obermann H, Eggert K, Gehling UM, Rudolph C, Schlegelberger B, Cornils K, Zustin J, Spiess AN, et al. 2011. Radiation rescue: Mesenchymal stromal cells protect from lethal irradiation. *PLoS One*. 6(1). doi:10.1371/journal.pone.0014486.

- Lange C, Reimer R, Zustin J, Bärbel BS. 2015. Treatment of acute radiation syndromes with transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. In: Mishra KP, editor. *Biological Responses, Monitoring and Protection from Radiation Exposure*. 1st. Nova Science Publishers, Inc. p. 149–164.
- Lange C, Reimer R, Zustin J, Brunswig-Spickenheier B. 2016. Mesenchymal stromal cells protect from consequences of HSCT-transplantation preparatory irradiation: Insights into possible mechanisms. *Cell Ther Transplant*. 5(2):50–58. doi:10.18620/1866-8836-2016-5-2-50-59.
- Lee Y, El Andaloussi S, Wood MJA. 2012. Exosomes and microvesicles: Extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum Mol Genet*. 21(R1):125–134. doi:10.1093/hmg/dd317.
- Lee YM, He W, Liou YC. 2021. The redox language in neurodegenerative diseases: oxidative post-translational modifications by hydrogen peroxide. *Cell Death Dis* 2021 121. 12(1):1–13. doi:10.1038/s41419-020-03355-3. <https://www.nature.com/articles/s41419-020-03355-3>.
- Leiper AD. 1995. Late effects of total body irradiation. *Arch Dis Child*. 72(5):382. doi:10.1136/ADC.72.5.382. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1511084/>.
- Lener T, Gimona M, Aigner L, Börger V, Buzas E, Camussi G, Chaput N, Chatterjee D, Court FA, del Portillo HA, et al. 2015. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper. *J Extracell vesicles*. 4(1). doi:10.3402/JEV.V4.30087. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26725829/>.
- Li C, Xiao P, Gray SJ, Weinberg MS, Samulski RJ. 2011. Combination therapy utilizing shRNA knockdown and an optimized resistant transgene for rescue of diseases caused by misfolded proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(34):14258–14263. doi:10.1073/PNAS.1109522108/SUPPL_FILE/PNAS.201109522SI.PDF. <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1109522108>.
- Li W, Zhang Q, Wang M, Wu H, Mao F, Zhang B, Ji R, Gao S, Sun Z, Zhu W, et al. 2013. Macrophages are involved in the protective role of human umbilical cord-derived stromal cells in renal ischemia–reperfusion injury. *Stem Cell Res*. 10(3):405–416. doi:10.1016/J.SCR.2013.01.005.
- Liew LC, Katsuda T, Gailhouse L, Nakagama H, Ochiya T. 2017. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: A glimmer of hope in treating Alzheimer's disease. *Int Immunol*. 29(1):11–19. doi:10.1093/intimm/dxx002.
- Lindner U, Kramer J, Rohwedel J, Schlenke P. 2010. Mesenchymal Stem or Stromal Cells: Toward a Better Understanding of Their Biology? *Transfus Med Hemother*. 37:75–83. doi:10.1159/000290897. www.karger.com/tmh.
- Liu J, Carmell MA, Rivas F V., Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*. 305(5689):1437–1441. doi:10.1126/SCIENCE.1102513. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15284456/>.
- Lobrich M, Rydberg B, Cooper PK. 1995. Repair of x-ray-induced DNA double-strand breaks in specific Not I restriction fragments in human fibroblasts: Joining of correct and incorrect ends. *Biochemistry*. 92:12050–12054.
- López M, Martín M. 2011. Medical management of the acute radiation syndrome. *Reports Pract Oncol Radiother*. 16(4):138. doi:10.1016/J.RPOR.2011.05.001. [/pmc/articles/PMC3863169/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21111111/).
- Lord BI, Testa NG, Hendry JH. 1975. The Relative Spatial Distributions of CFUs and CFUc in the Normal Mouse Femur. *Blood*. 46(1):65–72. doi:10.1182/BLOOD.V46.1.65.65.
- Lorimore SA, Coates PJ, Scobie GE, Milne G, Wright EG. 2001. Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: A mechanism for radiation-induced bystander effects? *Oncogene*. 20(48):7085–7095. doi:10.1038/sj.onc.1204903. www.nature.com/onc.
- Ludwig A-K, Giebel B. 2012. Exosomes: Small vesicles participating in intercellular communication. *Int J Biochem Cell Biol*. 44:11–15. doi:10.1016/j.biocel.2011.10.005. <http://exocarta.org/index.html#>.

- Macià i Garau M, Lucas Calduch A, López EC. 2011. Radiobiology of the acute radiation syndrome. *Reports Pract Oncol Radiother.* 16(4):123. doi:10.1016/J.RPOR.2011.06.001. /pmc/articles/PMC3863296/.
- MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. 2001. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity.* 15(5):825–835. doi:10.1016/S1074-7613(01)00229-1. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11728343/>.
- Majeed H, Gupta V. 2021 Nov 20. Adverse Effects Of Radiation Therapy. *StatPearls.* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563259/>.
- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, et al. 1999. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest.* 103(5):697–705. doi:10.1172/JCI5298. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10074487/>.
- Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. 2001. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood.* 97(11):3333–3341. doi:10.1182/BLOOD.V97.11.3333.
- Maragakis NJ, Rothstein JD. 2007. Motor Neuron Disease: Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mol Neurol.*:307–319. doi:10.1016/B978-012369509-3.50022-6.
- Mauch P, Constine L, Greenberger J, Knospe W, Sullivan J, Liesveld JL, Deeg HJ. 1995. Hematopoietic stem cell compartment: acute and late effects of radiation therapy and chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 31(5):1319–1339. doi:10.1016/0360-3016(94)00430-S. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7713791/>.
- Maxwell MB, Maher KE. 1992. Chemotherapy-induced myelosuppression. *Semin Oncol Nurs.* 8(2):113–123. doi:10.1016/0749-2081(92)90027-Z.
- Mcbride WH, Schae D. 2020. Radiation-induced tissue damage and response. doi:10.1002/path.5389. www.thejournalofpathology.com.
- McCulloch EA, Till JE. 1962. The sensitivity of cells from normal mouse bone marrow to gamma radiation in vitro and in vivo. *Radiat Res.* 16:822–832. doi:10.2307/3571281.
- Melief SM, Geutskens SB, Fibbe WE, Roelofs H. 2013. Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory interleukin-10-producing phenotype by production of interleukin-6. *Haematologica.* 98(6):888–895. doi:10.3324/HAEMATOL.2012.078055. <https://haematologica.org/article/view/6689>.
- Méndez-Ferrer S, Michurina T V., Ferraro F, Mazloom AR, MacArthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS. 2010. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature.* 466(7308):829. doi:10.1038/NATURE09262. /pmc/articles/PMC3146551/.
- Mezey É, Chandross KJ. 2000. Bone marrow: a possible alternative source of cells in the adult nervous system. *Eur J Pharmacol.* 405(1–3):297–302. doi:10.1016/S0014-2999(00)00561-6.
- Miest T, Saenz D, Meehan A, Llano M, Poeschla EM. 2009. Intensive RNAi with lentiviral vectors in mammalian cells. *Methods.* 47(4):298–303. doi:10.1016/J.YMETH.2008.11.001.
- Mittal V. 2004. Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nat Rev Genet.* 5(5):355–365. doi:10.1038/NRG1323. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15143318/>.
- Modlich U, Navarro S, Zychlinski D, Maetzig T, Knoess S, Brugman MH, Schambach A, Charrier S, Galy A, Thrasher AJ, et al. 2009. Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors. *Mol Ther.* 17(11):1919–1928. doi:10.1038/mt.2009.179. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19672245/>.
- Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. 2010. Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom und doppelsträngiger DNA als Zwischenprodukt. *Mol Virol.*:409–459. doi:10.1007/978-3-8274-2241-5_18. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-8274-2241-5_18.
- Mohty B, Mohty M. 2011. Long-term complications and side effects after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: an update. *Blood Cancer J* 2011 14. 1(4):e16–e16. doi:10.1038/bcj.2011.14. <https://www.nature.com/articles/bcj201114>.

- Pan BT, Johnstone RM. 1983. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. 33(3):967–978. doi:10.1016/0092-8674(83)90040-5. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6307529/>.
- Parolin C, Dorfman T, Palu G, Goytlinger H, Sodroski J. 1994. Analysis in human immunodeficiency virus type 1 vectors of cis-acting sequences that affect gene transfer into human lymphocytes. *J Virol*. 68(6):3888–3895. doi:10.1128/JVI.68.6.3888-3895.1994. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.68.6.3888-3895.1994>.
- Passegué E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman IL. 2003. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2034201100.
- Patchen ML, Macvittie TJ, Solberg BD, Souza LM, Macvittie IJ. 1990. Therapeutic administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor accelerates hemopoietic regeneration and enhances survival in a murine model of radiation-induced myelosuppression. <https://academic.oup.com/stmcls/article/8/2/107/6386541>.
- Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D. 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(18):8392–8396. doi:10.1073/pnas.90.18.8392. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7690960>.
- Pearlman R, Hanna R, Burmeister J, Abrams J, Dominello M. 2021. Adverse Effects of Total Body Irradiation: A Two-Decade, Single Institution Analysis. *Adv Radiat Oncol*. 6(4):100723. doi:10.1016/J.ADRO.2021.100723. <http://www.advancesradonc.org/article/S2452109421000816/fulltext>.
- Perets N, Oron O, Herman S, Elliott E, Offen D. 2020. Exosomes derived from mesenchymal stem cells improved core symptoms of genetically modified mouse model of autism Shank3B. *Mol Autism*. 11(1):1–13. doi:10.1186/S13229-020-00366-X/FIGURES/5. <https://molecularautism.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13229-020-00366-x>.
- Pfaffl MW. 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*. 1/04:92–95. www.wzw.tum.de/gene-.
- Pilo F, Angelucci E. 2018. A storm in the niche: Iron, oxidative stress and haemopoiesis. *Blood Rev*. 32(1):29–35. doi:10.1016/J.BLRE.2017.08.005. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28847531/>.
- Pittenger MF. 1998. ADIPOGENIC DIFFERENTIATION OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS-U.S. Patent 5,827,740. 740(19):827-.
- Pizzinga M, Harvey RF, Garland GD, Mordue R, Dezi V, Ramakrishna M, Sfakianos A, Monti M, Mulrone TE, Poyry T, et al. 2020. The cell stress response: extreme times call for post-transcriptional measures. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 11(3). doi:10.1002/WRNA.1578. [accessed 2023 Jun 13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31755249/>.
- Pizzirani C, Ferrari D, Chiozzi P, Adinolfi E, Sandonà D, Savaglio E, Di Virgilio F. 2007. Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1beta-loaded microvesicles from human dendritic cells. *Blood*. 109(9):3856–3864. doi:10.1182/BLOOD-2005-06-031377. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17192399/>.
- Pluta K, Kacprzak MM. 2009. Use of HIV as a gene transfer vector. *Acta Biochim Pol*. 56(4):531–595. doi:10.18388/ABP.2009_2490. <https://ojs.ptbioch.edu.pl/index.php/abp/article/view/2490>.
- van der Pol E, Coumans FAW, Grootemaat AE, Gardiner C, Sargent IL, Harrison P, Sturk A, van Leeuwen TG, Nieuwland R. 2014. Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *J Thromb Haemost*. 12(7):1182–1192. doi:10.1111/jth.12602.
- Poznansky M, Lever A, Bergeron L, Haseltine W, Sodroski J. 1991. Gene Transfer into Human Lymphocytes by a Defective Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vector. *J Virol*.:532–536.
- Prise KM, Schettino G, Folkard M, Held KD. 2005. New insights on cell death from radiation exposure. *Lancet Oncol*. 6(7):520–528. doi:10.1016/S1470-2045(05)70246-1. <http://www.thelancet.com/article/S1470204505702461/fulltext>.

- Ramachandran S, Palanisamy V. 2012. Horizontal transfer of RNAs: exosomes as mediators of intercellular communication. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 3(2):286–293. doi:10.1002/WRNA.115. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22012863/>.
- Rana S, Yue S, Stadel D, Zöller M. 2012. Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int J Biochem Cell Biol*. 44(9):1574–1584. doi:10.1016/J.BIOCEL.2012.06.018. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22728313/>.
- Raposo G, Stoorvogel W. 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 200(4):373–383. doi:10.1083/jcb.201211138.
- Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek a, Ratajczak MZ. 2006. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK*. 20(9):1487–95. doi:10.1038/sj.leu.2404296. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16791265>.
- Reiners KS, Dassler-Plenker J, Coch C, Hartmann G. 2017. Funktion von extrazellulären Vesikeln und Bedeutung für die labormedizinische Diagnostik. *LaboratoriumsMedizin*. 41(6):299–308. doi:10.1515/LABMED-2017-0078/ASSET/GRAPHIC/J_LABMED-2017-0078_FIG_002.JPG. <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/labmed-2017-0078/html>.
- Reis M, Mavin E, Nicholson L, Green K, Dickinson AM, Wang XN. 2018. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles attenuate dendritic cell maturation and function. *Front Immunol*. 9(NOV):2538. doi:10.3389/FIMMU.2018.02538/FULL. [/pmc/articles/PMC6237916/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/306237916/).
- Rhee SG, Chae HZ, Kanghwa K. 2005. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med*. 38(12):1543–1552. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2005.02.026.
- Riecken K. 2015. Lentiviral Gene Ontology Vectors. <http://www.lentigo-vectors.de/vectors.htm>.
- Ringborg U, Bergqvist D, Brorsson B, Cavallin-Ståhl E, Ceberg J, Einhorn N, Frödin J-E, Järhult J, Lamnevik G, Lindholm C, et al. 2003. The Swedish Council on Technology Assessment in Health Care (SBU) Systematic Overview of Radiotherapy for Cancer including a Prospective Survey of Radiotherapy Practice in Sweden 2001-Summary and Conclusions. *Acta Oncol (Madr)*. 42:357–365. doi:10.1080/02841860310010826. <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ionc20>.
- Robbins PD, Morelli AE. 2014. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. doi:10.1038/nri3622. www.nature.com/reviews/immunol.
- Roche. 2007. LightCycler® 480 Instrument Operator's Manual. :1–395. [papers://5092023b-8c0d-418f-8230-d544faae6526/Paper/p888](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15092023b-8c0d-418f-8230-d544faae6526/Paper/p888).
- Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski A V, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Zhang M, Ihrig MM, McManus MT, et al. 2003. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet*. 33(3):401–406. doi:10.1038/ng1117. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1117>.
- Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. 2012. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J*. 443(3):603–618. doi:10.1042/bj20120146. <http://dx.doi.org/10.1042/bj20120146>.
- Sauer R. 2010. *Strahlentherapie und Onkologie*. 5.te. Elsevier, Urban & Fischer.
- Schoefinius J-S, Brunswig-Spickenheier B, Speiseder T, Krebs S, Just U, Lange C. 2017. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Provide Long-Term Survival After Total Body Irradiation Without Additional Hematopoietic Stem Cell Support. *Stem Cells*. 35(12):2379–2389. doi:10.1002/stem.2716. <http://doi.wiley.com/10.1002/stem.2716>.
- Shahbazi-Gahrouei D, Setayandeh S, Gholami M. 2013. A review on natural background radiation. *Adv Biomed Res*. 2(1):65. doi:10.4103/2277-9175.115821. [/pmc/articles/PMC3814895/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23814895/).
- Shakibaei M, De Souza P. 1997. Differentiation of mesenchymal limb bud cells to chondrocytes in alginate beads. *Cell Biol Int*. 21(2):75–86. doi:10.1006/cbir.1996.0119.
- Shao L, Luo Y, Zhou D. 2014. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation. *Antioxidants Redox Signal*. 20(9):1447–1462. doi:10.1089/ars.2013.5635.

- Sharapov MG, Gudkov S V. 2020. Peroxiredoxin 1 - Multifunctional antioxidant enzyme, protects from oxidative damages and increases the survival rate of mice exposed to total body irradiation. *Arch Biochem Biophys.* 697:108671. doi:10.1016/J.ABB.2020.108671.
- Da Silva Meirelles L, Nardi NB. 2003. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol.* 123(4):702–711. doi:10.1046/J.1365-2141.2003.04669.X. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2141.2003.04669.x>.
- Simon-Loriere E, Holmes EC. 2011. Why do RNA viruses recombine? *Nat Rev Microbiol* 2011 98. 9(8):617–626. doi:10.1038/nrmicro2614. <https://www.nature.com/articles/nrmicro2614>.
- Sirven A, Pflumio F, Zennou V, Titeux M, Vainchenker W, Couiombel L, Dubart-Kupperschmitt A, Chameau P. 2000. The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood.* 96(13):4103–4110. doi:10.1182/BLOOD.V96.13.4103.
- Song CW, Kim TH, Khan FM, Kersey JH, Levitt SH. 1981. Radiobiological basis of total body irradiation with different dose rate and fractionation: Repair capacity of hemopoietic cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 7(12):1695–1701. doi:10.1016/0360-3016(81)90195-4.
- Srinivasakumar N. 2001. HIV-1 vector systems. *Somat Cell Mol Genet.* 26(1–6):51–81. doi:10.1023/A:1021074613196.
- Straub JM, New J, Hamilton CD, Lominska C, Shnayder Y, Thomas SM. 2015. Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 141(11):1985–1994. doi:10.1007/s00432-015-1974-6. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00432-015-1974-6>.
- Tainer JA, Getzoff ED, Beem KM, Richardson JS, Richardson DC. 1982. Determination and analysis of the 2 Å structure of copper, zinc superoxide dismutase. *J Mol Biol.* 160(2):181–217. doi:10.1016/0022-2836(82)90174-7.
- Tamama K, Kawasaki H, Wells A. 2010. Epidermal Growth Factor (EGF) treatment on Multipotential Stromal Cells (MSCs). Possible enhancement of therapeutic potential of MSC. *J Biomed Biotechnol.* 2010. doi:10.1155/2010/795385.
- Tan K, Zhu H, Zhang J, Ouyang W, Tang J, Zhang Y, Qiu L, Liu X, Ding Z, Deng X. 2019. CD73 Expression on Mesenchymal Stem Cells Dictates the Reparative Properties via Its Anti-Inflammatory Activity. doi:10.1155/2019/8717694. <https://doi.org/10.1155/2019/8717694>.
- Tang Y, Geng Y, Luo J, Shen W, Zhu W, Meng C, Li M, Zhou X, Zhang S, Cao J. 2015. Downregulation of ubiquitin inhibits the proliferation and radioresistance of non-small cell lung cancer cells in vitro and in vivo. *Sci Rep.* 5. doi:10.1038/SREP09476. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25820571/>.
- Taxman DJ, Livingstone LR, Zhang J, Conti BJ, Iocca HA, Williams KL, Lich JD, Ting JPY, Reed W. 2006. Criteria for effective design, construction, and gene knockdown by shRNA vectors. *BMC Biotechnol.* 6(1):1–16. doi:10.1186/1472-6750-6-7/TABLES/5. <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-6-7>.
- Teng F, Fussenegger M. 2021. Shedding Light on Extracellular Vesicle Biogenesis and Bioengineering. *Adv Sci.* 8(1). doi:10.1002/adv.202003505. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33437589/>.
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. 2002. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature.* 416(6880):542–545. doi:10.1038/NATURE730. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11932747/>.
- Théry C. 2011. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol Rep.* 3(July):15. doi:10.3410/B3-15. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3155154&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. 2006. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr Protoc Cell Biol.* 30(1):3.22.1-3.22.29. doi:10.1002/0471143030.cb0322s30.

- Théry C, Ostrowski M, Segura E. 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 9(8):581–93. doi:10.1038/nri2567. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19498381>.
- Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, et al. 2018. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 7(1). doi:10.1080/20013078.2018.1535750.
- Thiemann S, Baum LG. 2016. Galectins and Immune Responses—Just How Do They Do Those Things They Do? <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055402>. 34:243–264. doi:10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-041015-055402. <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-immunol-041015-055402>.
- Thomas O, Mahé MA, Champion L, Bourdin S, Milpied N, Brunet G, Lisbona A, Le Mevel A, Moreau P, Harousseau JL, et al. 2001. Long-term complications of total body irradiation in adults. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 49(1):125–131. doi:10.1016/S0360-3016(00)01373-0. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11163505/>.
- Till JE, McCulloch EA. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* 14:213–222. doi:10.2307/3570892.
- Todaró GJ, Green H. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol.* 17:299–313. doi:10.1083/jcb.17.2.299.
- Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. 2003. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation.* 75(3):389–397. doi:10.1097/01.TP.0000045055.63901.A9. https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/2003/02150/Suppression_of_allogeneic_T_cell_proliferation_by.26.aspx.
- Turturici G, Tinnirello R, Sconzo G, Geraci F. 2014. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *Am J Physiol Physiol.* 306(7):C621–C633. doi:10.1152/ajpcell.00228.2013. <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00228.2013>.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007 9(6):654–659. doi:10.1038/ncb1596. <https://www.nature.com/articles/ncb1596>.
- Valorani MG, Germani A, Otto WR, Harper L, Biddle A, Khoo CP, Lin WR, Hawa MI, Tropel P, Patrizi MP, et al. 2010. Hypoxia increases Sca-1/CD44 co-expression in murine mesenchymal stem cells and enhances their adipogenic differentiation potential. *Cell Tissue Res.* 341(1):111–120. doi:10.1007/S00441-010-0982-8/FIGURES/7. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-010-0982-8>.
- Vas V, Fajkaboja R, Ion G, Dudics V, Monostori É, Uher F, Fajka-Boja R. 2005. Biphasic Effect of Recombinant Galectin-1 on the Growth and Death of Early Hematopoietic Cells. *Stem Cells.* 23(2):279–287. doi:10.1634/STEMCELLS.2004-0084. <https://academic.oup.com/stmcls/article/23/2/279/6400208>.
- Wagner W, Ho AD. 2007. Mesenchymal stem cell preparations-comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev.* 3(4):239–248. doi:10.1007/S12015-007-9001-1.
- Wang M, Yuan Q, Xie L. 2018. Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application. doi:10.1155/2018/3057624. <https://doi.org/10.1155/2018/3057624>.
- Wang Y, Probin V, Zhou D. 2006. Cancer therapy-induced residual bone marrow injury-Mechanisms of induction and implication for therapy. *Curr Cancer Ther Rev.* 2(3):271–279.
- Ward JF. 1998. Nature of Lesions Formed by Ionizing Radiation. In: J.A. N, M.F. H, editors. *DNA Damage and Repair*. Humana Press, Totowa, NJ. p. 65–84.

- Waselenko JK, MacVittie TJ, Blakely WF, Pesik N, Wiley AL, Dickerson WE, Tsu H, Confer DL, Coleman CN, Seed T, et al. 2004. Medical management of the acute radiation syndrome: Recommendations of the Strategic National Stockpile Radiation Working Group. *Ann Intern Med.* 140(12). doi:10.7326/0003-4819-140-12-200406150-00015.
- Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B. 2008. A Multicolor Panel of Novel Lentiviral “Gene Ontology” (LeGO) Vectors for Functional Gene Analysis. *Mol Ther.* 16(4):698–706. doi:10.1038/mt.2008.6. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2008.6>.
- Wei Q, Frenette PS. 2018. Niches for hematopoietic stem cells and their progeny. *Immunity.* 48(4):632. doi:10.1016/J.IMMUNI.2018.03.024. [/pmc/articles/PMC6103525/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30111111/).
- Weiss RA. 2000. Getting to know HIV. *Trop Med Int Heal.* 5(7):A10–A15. doi:10.1046/j.1365-3156.2000.00591.x. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3156.2000.00591.x>.
- Wen S, Dooner M, Cheng Y, Papa E, Del Tatto M, Pereira M, Deng Y, Goldberg L, Aliotta J, Chatterjee D, et al. 2016. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles rescue radiation damage to murine marrow hematopoietic cells. *Leukemia.* 30(11):2221–2231. doi:10.1038/leu.2016.107. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2016.107>.
- Westin JR, Saliba RM, De Lima M, Alousi A, Hosing C, Qazilbash MH, Khouri IF, Shpall EJ, Anderlini P, Rondon G, et al. 2011. Steroid-Refractory Acute GVHD: Predictors and Outcomes. *Adv Hematol.* 2011. doi:10.1155/2011/601953. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22110505/>.
- Weydert CJ, Cullen JJ. 2009. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc* 2010 51. 5(1):51–66. doi:10.1038/nprot.2009.197. <https://www.nature.com/articles/nprot.2009.197>.
- Wilson RC, Doudna JA. 2013. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys.* 42(1):217. doi:10.1146/ANNUREV-BIOPHYS-083012-130404. [/pmc/articles/PMC5895182/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23963371/).
- Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, Nolte-’t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, et al. 2013. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles.* 2(1):1–25. doi:10.3402/jev.v2i0.20360.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. 2000. Adult Rat and Human Bone Marrow Stromal Cells Differentiate Into Neurons. doi:10.1002/1097-4547.
- Woodruff RC, Phillips JP, Hilliker AJ. 2011. Increased spontaneous DNA damage in Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) deficient *Drosophila*. <https://doi.org/10.1139/g04-083>. 47(6):1029–1035. doi:10.1139/G04-083. <https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.1139/g04-083>.
- Wu X, Jiang J, Gu Z, Zhang J, Chen Y, Liu X. 2020. Mesenchymal stromal cell therapies: Immunomodulatory properties and clinical progress. *Stem Cell Res Ther.* 11(1):1–16. doi:10.1186/S13287-020-01855-9/FIGURES/3. <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-020-01855-9>.
- Xin H, Li Y, Cui Y, Yang JJ, Zhang ZG, Chopp M. 2013. Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 33(11):1711–1715. doi:10.1038/JCBFM.2013.152. [accessed 2022 May 2]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23963371/>.
- Xin H, Li Y, Liu Z, Wang X, Shang X, Cui Y, Zhang ZG, Chopp M. 2013. MiR-133b promotes neural plasticity and functional recovery after treatment of stroke with multipotent mesenchymal stromal cells in rats via transfer of exosome-enriched extracellular particles. *Stem Cells.* 31(12):2737–2746. doi:10.1002/STEM.1409. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23630198/>.
- Xu J, Su X, Burley SK, Zheng XFS. 2022. Nuclear SOD1 in Growth Control, Oxidative Stress Response, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Cancer. *Antioxidants* 2022, Vol 11, Page 427. 11(2):427. doi:10.3390/ANTIOX11020427. <https://www.mdpi.com/2076-3921/11/2/427/htm>.
- Yang X, Balakrishnan I, Torok-Storb B, Pillai MM. 2012. Marrow stromal cell infusion rescues hematopoiesis in lethally irradiated mice despite rapid clearance after infusion. *Adv Hematol.* 2012. doi:10.1155/2012/142530.

- Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Matsuoka S, Miyamoto K, et al. 2007. Thrombopoietin/MPL Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Interaction with the Osteoblastic Niche. *Cell Stem Cell*. 1(6):685–697. doi:10.1016/J.STEM.2007.10.020.
- Yuan T, Zhuo Y, Su C, Li X, Duan D, Ge L, Wu P, Wang H, Deng Y, Lu M. 2016. Hypoxic and ischemic effects on gene and protein expression levels of paracrine factors by human olfactory mucosa mesenchymal-like stem cells. *J Neurorestoratology*.:4–85. doi:10.2147/JN.S118538. <http://dx.doi.org/10.2147/JN.S118538>.
- Yun CW, Lee SH. 2019. Enhancement of Functionality and Therapeutic Efficacy of Cell-Based Therapy Using Mesenchymal Stem Cells for Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci* 2019, Vol 20, Page 982. 20(4):982. doi:10.3390/IJMS20040982. <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/4/982/htm>.
- Zakariya N, Kahn M-T. 2014. Review Article Benefits and Biological Effects of Ionizing Radiation. *Sch Acad J Biosci*. 2(9):583–591. www.sasublisher.com.
- Zhang XM, Zhang YJ, Wang W, Wei YQ, Deng HX. 2017. Mesenchymal Stem Cells to Treat Crohn's Disease with Fistula. *Hum Gene Ther*. 28(7):534–540. doi:10.1089/HUM.2016.095. <https://www.liebertpub.com/doi/full/10.1089/hum.2016.095>.
- Zimmermann F, Weiss J, Reifenberg K. 2000 Jan 1. Breeding and Assisted Reproduction Techniques. *Lab Rat*.:177–198. doi:10.1016/B978-012426400-7.50049-2.
- Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ. 1999. Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element Enhances Expression of Transgenes Delivered by Retroviral Vectors. *J Virol*. 73(4):2886–2892. doi:10.1128/jvi.73.4.2886-2892.1999. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.73.4.2886-2892.1999>.
- Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. 1997. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol*. 15(9):871–875. doi:10.1038/nbt0997-871. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0997-871>.

7. Anhang

7.1. Nukleotidsequenzen

Tab. S1: Nukleotidsequenzen der verwendeten shRNAs. Die aufgelisteten shRNAs wurden in entsprechende LeGO-Vektoren kloniert, um anschließend gezielt die Zielgene in mMSCs runter zu regulieren.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz
shRNA_scr	CCGGGCTTCCAGTTCAGTTCGACAACTCGAGTTTGTGTCAGTGAAGCTTTTGG
shRNA_Gal1	CCGGAGACGGACATGAATTCAAGTTCTCGAGAACTTGAATTCATGTCCGTCTTTTTT
shRNA_Sod1	CCGGGCAAAGGTGAAATGAAGAACTCGAGTTTCTTCATTTCCACCTTTGCTTTTTG
shRNA_Prdx1	CCGGGCTTCCAGTTCAGTTCGACAACTCGAGTTTGTGTCAGTGAAGCTTTTGG

7.2. Isotypkontroll-Gating für Charakterisierung der mMSCs

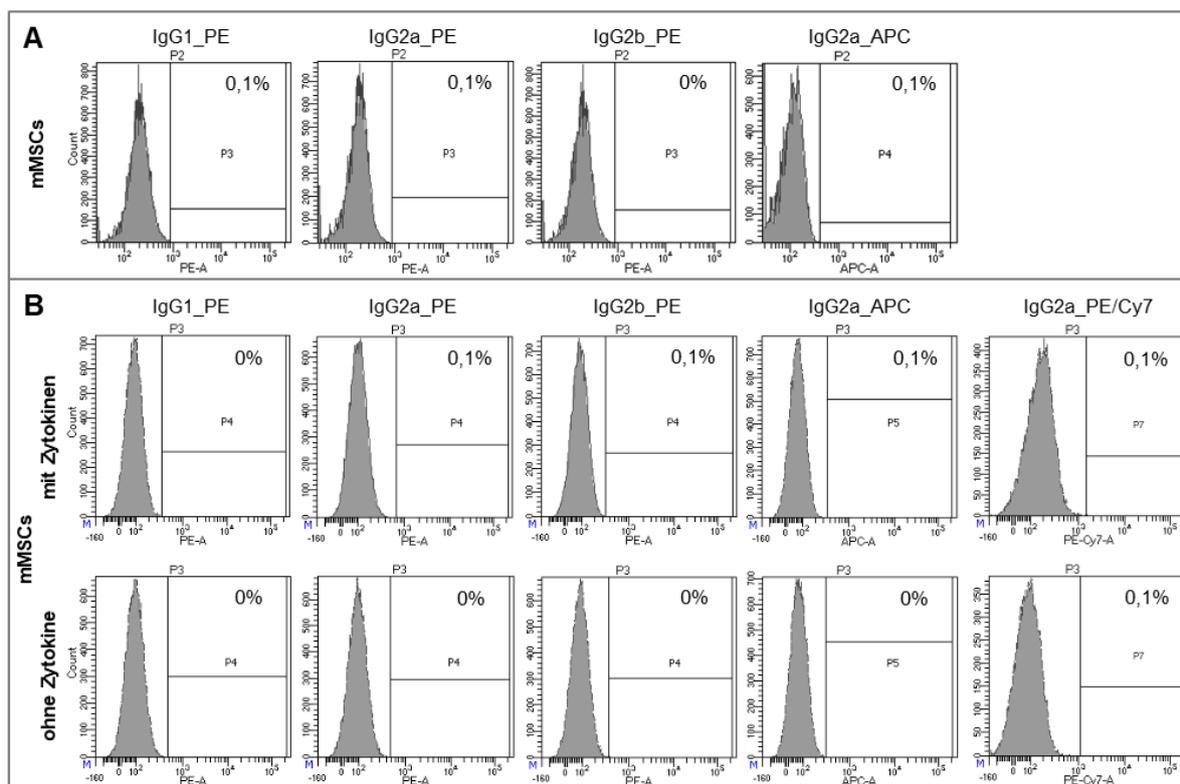


Abb. S1: Individuelles Gating der Isotypkontrollen. Mit je einer Isotypkontrolle [0,25 μ g/ $1 \cdot 10^6$ Zellen] und 7AAD [0,25 μ g/ $1 \cdot 10^6$ Zellen] gefärbte mMSCs wurden durchflusszytometrisch analysiert. Die Messergebnisse wurden als Histogramm dargestellt, indem die Anzahl der Zellen (linear) gegen die jeweilige Fluoreszenzintensität (logarithmisch) aufgetragen wurde.

A – $2,5 \cdot 10^5$ mMSCs kultiviert in mMSC-Kultivierungsmedium (Lonza-FCS). Detektion der jeweiligen Fluoreszenz von mit Isotypkontrollen gefärbten lebendigen mMSCs.

B – $2 \cdot 10^5$ mMSCs kultiviert in mMSC-Kultivierungsmedium (Sigma-FCS; mit und ohne 40 pg/ml rMEGF und 4 ng/ml rPDGF_BB). Detektion der jeweiligen Fluoreszenz von mit Isotypkontrollen gefärbten lebendigen einzelnen mMSCs.

Das Gating aller Messungen wurde anschließend so gewählt, dass der prozentuale Anteil an positiven Zellen 0,1 % nicht überschreitet.

7.3. Titration

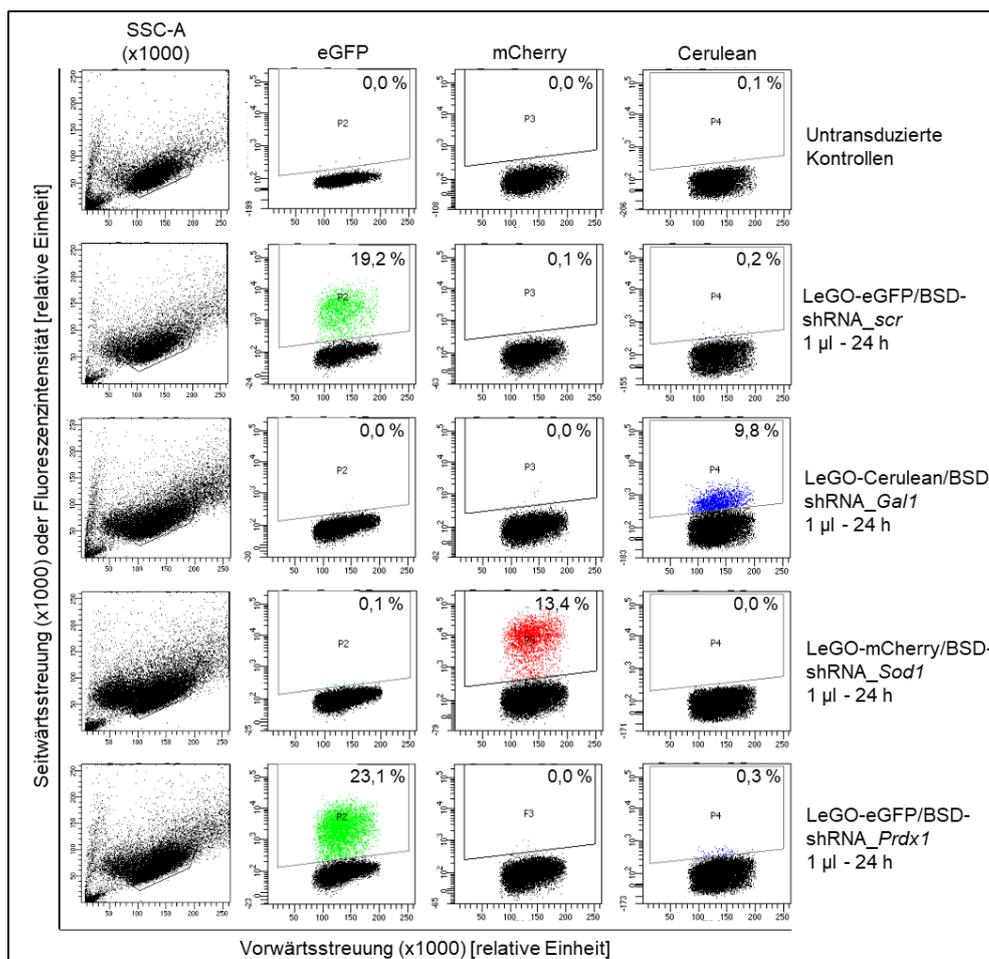


Abb. S2: Titration der lentiviralen Vektoren. Repräsentative Darstellung einer Probenmessung von mit 1 μ l Viruslösung (geerntet nach 24 h) transduzierten $5 \cdot 10^4$ NIH/3T3. Die Messung wurde an einem BD LSR Fortessa Durchflusszytometer in der FACS Sorting Core Unit des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Ausgehend von der in P1 ausgewählten mMSC-Population (erste Spalte) wurde der Anteil an positiven Zellen [%] für die Fluoreszenzen eGFP (P2), mCherry (P3) und Cerulean (P4) ermittelt und im entsprechenden Gate angegeben.

Der Achsenauftrag von Vorwärts- und Seitwärtsstreuung erfolgte linear, wohingegen die Fluoreszenzintensität immer logarithmisch dargestellt wurde.

Tab. S2: Auflistung der ermittelten Titer der produzierten infektiösen lentiviralen Partikel. Die Titration erfolgte mittels NIH/3T3. Diese wurden mit je drei unterschiedlichen Virusvolumina (1 μ l, 5 μ l und 50 μ l) von jedem der drei Virus-Erntezeitpunkte (12 h, 24 h und 36 h) in jeweils Triplikaten transduziert. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte 3 Tage nach Transduktion. Von jedem Zeitpunkt wurde nur das Virusvolumen zur Titerberechnung verwendet und dargestellt, bei dem der Anteil an positiven Zellen möglichst zwischen 5 und 20 % (Mittelwert der jeweiligen Triplikate) lag. Unterstrichene und fettgeschriebene Werte zu jedem der vier infektiösen lentiviralen Partikel entspricht der Ernte und dem dazu ermitteltem Titer, welcher für weitere Experimente in dieser Arbeit verwendet wurde.

Infektiöse lentivirale Partikel:	Erntezeit [h]	Titrationvolumen [μ l]	Prozentualer Anteil an Fluoreszenz-positiven Zellen [%]	Titer [$\cdot 10^6$ infektiöse Partikel/ml]
LeGO-eGFP/BSD-shRNA_scr	12	5	23,20	2,32
	<u>24</u>	<u>1</u>	<u>21,27</u>	<u>10,63</u>
	36	1	24,53	12,27
LeGO-Cerulean/BSD-shRNA_Gal1	12	5	14,20	1,42
	<u>24</u>	<u>1</u>	<u>10,83</u>	<u>5,42</u>
	36	1	10,87	5,43
LeGO-mCherry/BSD-shRNA_Sod1	12	1	5,40	2,70
	<u>24</u>	<u>1</u>	<u>13,20</u>	<u>6,60</u>
	36	1	15,15	7,58
LeGO-eGFP/BSD-shRNA_Prdx1	12	5	20,05	2,01
	<u>24</u>	<u>1</u>	<u>22,50</u>	<u>11,25</u>
	36	1	20,90	10,45

7.4. Sortierung auf hoch positive mMSCs nach Transduktion

Tab. S3: Einstellungsparameter des BD Aria Fusion in der FACS Sorting Core Unit des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für die Sortierung von transduzierten mMSCs.

Kanal	Eingestellte Spannung [V]
Vorwärtsstreuung (FSC)	90
Seitwärtsstreuung (SSC)	253
eGFP Fluoreszenzintensität	270
mCherry Fluoreszenzintensität	320
Cerulean Fluoreszenzintensität	230

Tab. S4: Kompensationsmatrix für die Sortierung transduzierter mMSCs am BD Aria Fusion in der FACS Sorting Core Unit des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Kompensation	Wert [%]
mCherry - eGFP	0
Cerulean - eGFP	0
eGFP - mCherry	2,8
Cerulean - mCherry	0
eGFP - Cerulean	0
mCherry - Cerulean	0

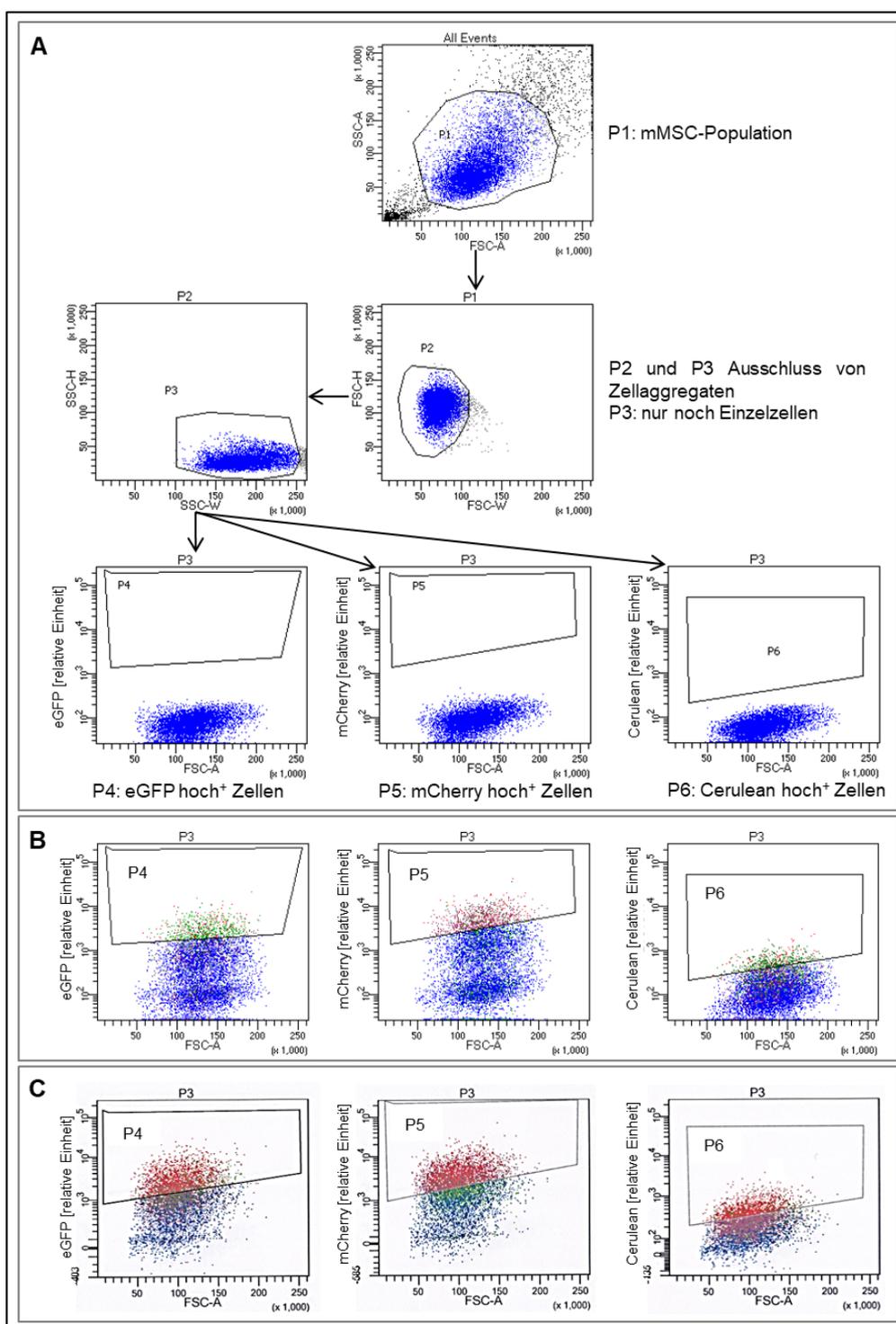


Abb. S3: Sortierung hoch positiver mMSCs nach Transduktion.

A: Repräsentative Darstellung der verwendeten Gatingstrategie anhand unbehandelter mMSC-Kontrollen. Aus der fokussierten mMSC-Population (Gate P1) wurden mit den Gates P2 und P3 Zellaggregate ausgeschlossen. Die Einzelzellen wurden dann auf Anwesenheit der Fluoreszenzen (eGFP: Gate P4, mCherry: Gate P5 und Cerulean: Gate P6) analysiert, wobei die Gates soweit über der negativen Population gesetzt wurden, dass lediglich Zellen mit hoher Fluoreszenzintensität (hoch positive) aus der Population sortiert wurden.

B: Darstellung der ersten Sortierung auf hoch positive Zellen anhand transduzierter (3x shRNAs) mMSCs.

C: Darstellung der zweiten Sortierung auf hoch positive Zellen anhand transduzierter (3x shRNAs) mMSCs.

Der Achsenauftrag von Vorwärts- und Seitwärtsstreuung erfolgte linear, wohingegen die Fluoreszenzintensität immer logarithmisch dargestellt wurde

FSC-A: Fläche der Vorwärtsstreuung; FCS-W: Weite der Vorwärtsstreuung; FCS-H: Höhe der Vorwärtsstreuung; SSC-A: Fläche der Seitwärtsstreuung; SSC-W: Weite der Seitwärtsstreuung; SSC-H: Höhe der Seitwärtsstreuung.

Tab. S5: Auflistung der Werte zur Analyse transduzierter mMSCs auf hoch positive Zellen. Murine MSCs wurden entweder mit einem shRNA enthaltenen lentiviralen Vektoren oder einer Kombination diesen transduziert. Nach 6 Tagen wurden bei allen Populationen die hoch positiven Zellen am BD Aria Fusion Durchflusszytometrie in der FACS Sorting Core Unit des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf sortiert. Die Konfluenz der Zellen vor der Sortierung sowie die Anzahl an hoch positiven Zellen und deren Anteil an der Gesamtzellzahl wurden in der Tabelle aufgelistet. Die hoch positiven Zellen wurden anschließend noch ein weiteres Mal sortiert, wofür diesmal zusätzlich zu Konfluenz, die Anzahl an hoch positiven Zellen und deren Anteil an der Gesamtzellzahl sowie die Tage von Sortierung 1 zu Sortierung 2 mit aufgelistet wurden. Außerdem ist in der Tabelle die Anzahl der Kultivierungstage ausgehend von der zweiten Sortierung bis hin zur Kryokonservierung sowie die dabei vorliegende Konfluenz und Zellzahl enthalten.

mMSC transduziert mit: (MOI 5 mit nach 24 h geernteten infektiösen lentiviralen Partikeln)	Sortierung 1			Sortierung 2			Kryokonservierung			
	Konfluenz	hoch positive Zellen [%]	Anzahl hoch positiver Zellen	Tage bis zur 2.Sortierung	Konfluenz	hoch positive Zellen [%]	Anzahl hoch positiver Zellen	Tage bis zur Kryokonservierung	Konfluenz	Zellzahl pro T175
LeGO-eGFP/BSD-shRNA_scr	~ 95 %	23,4	428560	7	~ 65 %	53,8	1325423	6	~ 95 %	4,2*10 ⁶
LeGO-Cerulean/BSD-shRNA_Gal1	~ 90 %	13,4	280605	4	~ 50 %	15,7	91972	11	~ 92 %	4,65*10 ⁶
LeGO-mCherry/BSD-shRNA_Sod1	~ 95 %	19,8	367272	4	~ 50 %	33,5	104401	10	~ 95 %	4,2*10 ⁶
LeGO-eGFP/BSD-shRNA_Prdx1	~ 98 %	19,6	481903	4	~ 70 %	33,3	203955	7	~ 95 %	5*10 ⁶
LeGO-Cerulean/BSD-shRNA_Gal1 LeGO-mCherry/BSD-shRNA_Sod1 LeGO-eGFP/BSD-shRNA_Prdx1	~ 90 %	1,2	30568	11	~ 60 %	14,9	274688	9	~ 95 %	3,73*10 ⁶

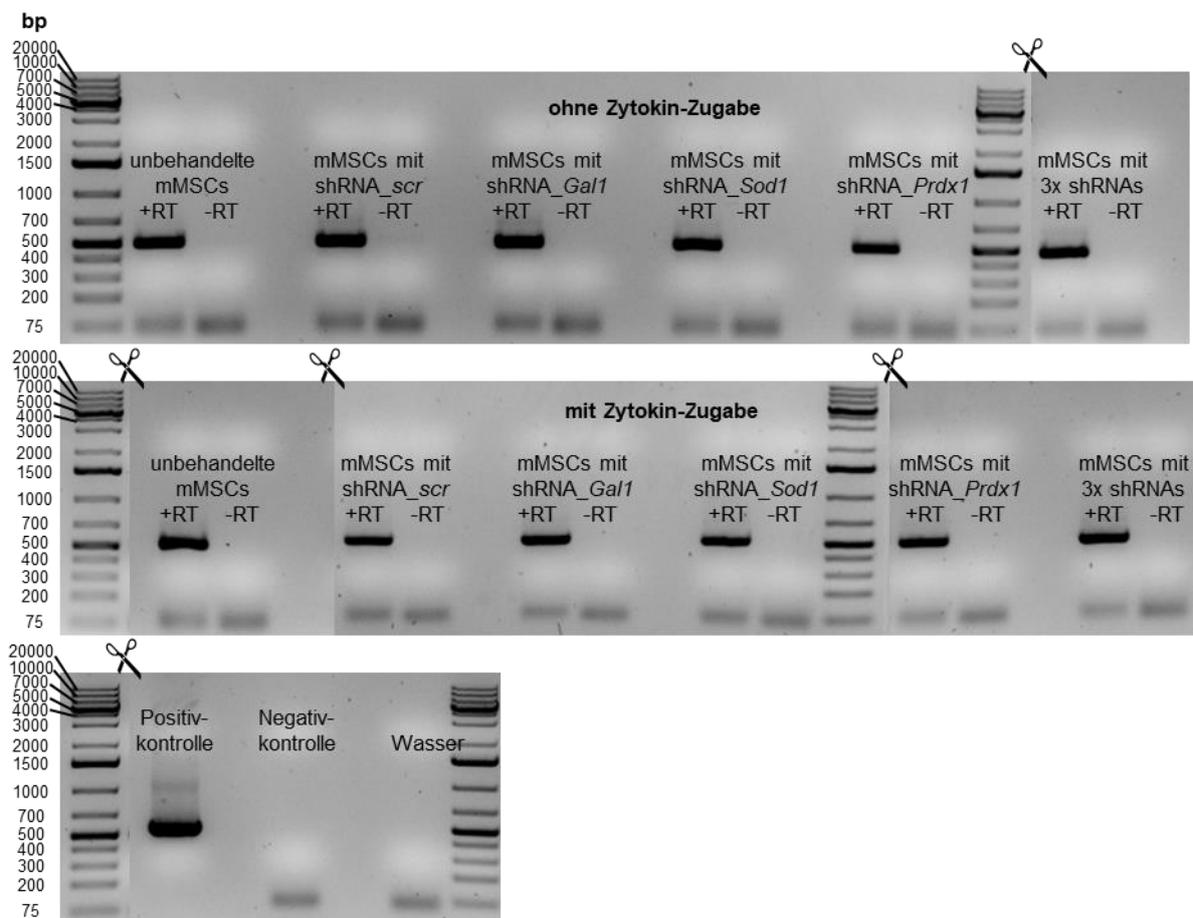
7.5. Agarosegele

Abb. S4: Elektrophoretisch aufgetrennte Kontroll-PCRs zur Verifizierung einer erfolgreichen cDNA-Synthese von transduzierten mMSC-Proben auf Agarosegelen (1,5 %). Isolierte RNAs aus mMSCs, die mit oder ohne Zytokin-Zugabe kultiviert wurden, wurden in cDNA umgeschrieben (+RT). Zusätzlich wurden Kontaminations-Kontrollen, die zwar RNA beinhalten, jedoch nicht das Enzym Reverse Transkriptase (-RT) sowie eine Positivkontrolle mit *Gapdh* RNA und eine Negativkontrolle mit Nuklease-freiem Wasser als Template mitgeführt. Anschließend wurden alle Proben (0,1 ng/μl von +/- RT Proben, 10 pg/μl Positivkontrolle, Negativkontrolle 1:500 verdünnt) sowie eine zusätzliche Wasserkontrolle einer Kontroll-PCR unterzogen, die auf Grund der verwendeten spezifischen Primer eine Teilsequenz von *Gapdh* amplifizierte. Die erwartete Bandengröße umfasste 496 bp. Als Marker wurden ein GENERULER 1kB Plus DNA Ladder mitgeführt. Die Auftrennung der Kontroll-PCR-Proben fand auf zwei separaten Gelen (A = 1. Reihe und B = 2. und 3. Reihe) statt. Für eine Effiziente Nutzung der Gele wurden jeweils zwei untereinander gesteckte 16er Kämmen verwendet. Die Darstellung wurde anschließend, um diejenigen Proben bereinigt, welche in der weiteren Analyse nicht berücksichtigt wurden (überzähliger Verwurf). Die Schnittstellen wurden als Schere dargestellt.

7.6. Nachweis der Runterregulation auf Transkriptionsebene bei Zytokin-Zugabe

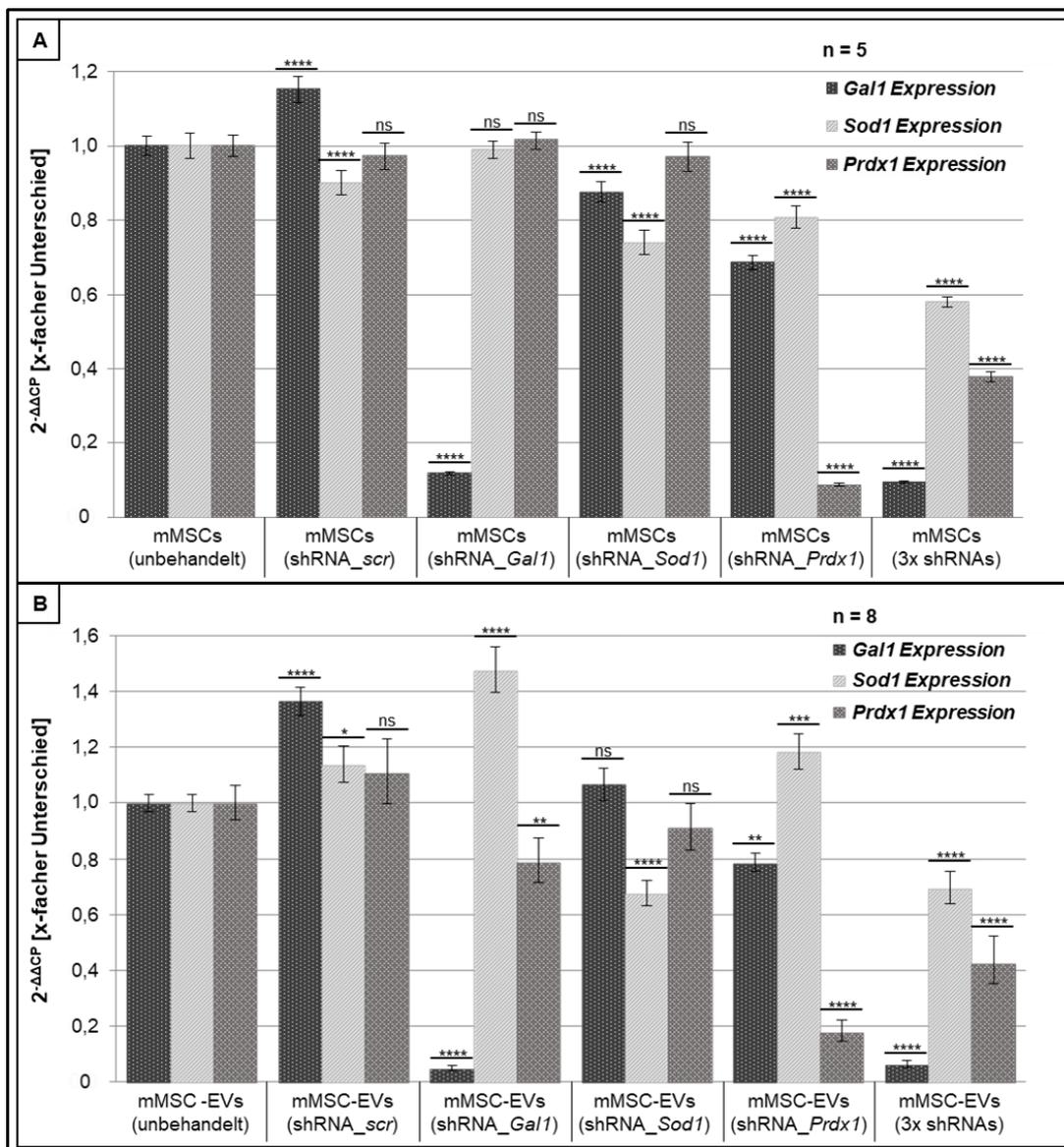


Abb. S5: Zytokin-Zugabe beeinflusst nicht die erfolgreiche transkriptionale Runterregulation der Zielgene *Gal1*, *Sod1* und *Prdx1* mittels eingebrachter shRNA. Analysiert wurde die cDNA aus mit einem shRNA Konstrukt (shRNA_scr, shRNA_Gal1, shRNA_Sod1 oder shRNA_Prdx1) oder mit allen drei Zielgen-shRNAs (shRNA_Gal1, shRNA_Sod1 und shRNA_Prdx1 = 3x shRNA) transduzierten hoch positiven mMSCs sowie deren EVs. Als Kontrolle dienten unbehandelte mMSCs sowie die von ihnen sezernierten EVs. Die mMSC-Kultivierung im Allgemeinen sowie die für EV-Ernten in Sigma-FCS-haltigem Kultivierungsmedium mit Zytokin-Zusatz (rmEGF [40pg/ml] + rmPDGF-BB [4ng/μl]) statt. Alle Proben wurden auf den relativen Expressionsunterschied von *Gal1* (dunkel grau), *Sod1* (hell grau) und *Prdx1* (grau) untersucht, indem 5 μg cDNA aus mMSCs (A) und 1 μg cDNA aus mMSC-EVs (B) pro qPCR Ansatz eingesetzt wurden. Jede Probe wurde immer als technisches Triplikat vermessen. Insgesamt wurden von jeder mMSC-Probe 5 unabhängige Analysen durchgeführt (A; n = 5), während jede EV-Ernte (zwei Ernten pro mMSC-Kultur) vier Mal analysiert und anschließend alle Ergebnisse von beiden Ernten zusammengefasst wurden (B; n = 8). Die statistische Auswertung wurde mittels GraphPad Prism 9 durchgeführt und ein *Ordinary one-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons* Test verwendet. P: < 0,0001 = ****; P: 0.0001 bis 0.001 = ***; P: 0.001 bis 0.01 = **; P: 0.01 bis 0.05 = *; P: ≥ 0.05 = ns. ns = nicht signifikant.

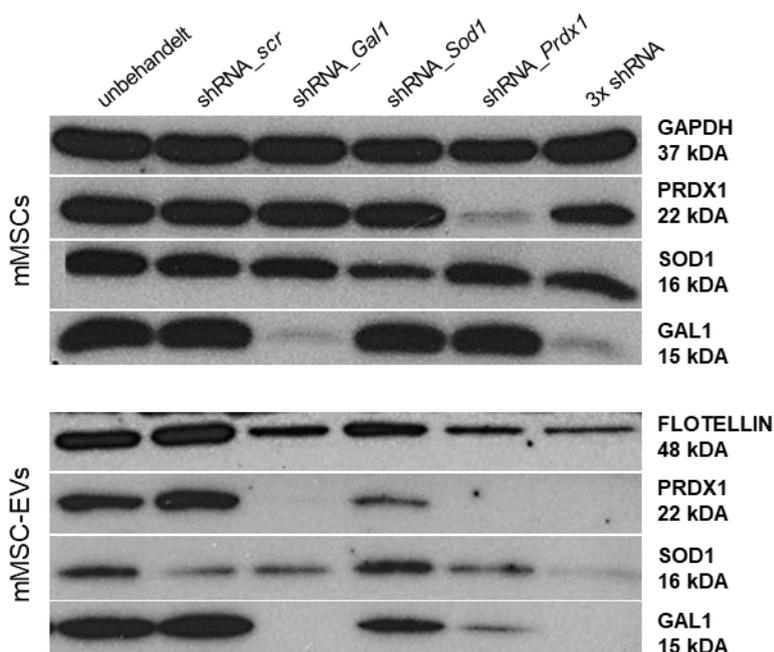
7.7. Nachweis der Runterregulation auf Proteinebene bei Zytokin-Zugabe

Abb. S6: Immundetektion der Runterregulation von GAL1, SOD1 und PRDX1 in Anwesenheit von Zytokinen in verschiedenen mMSC-Kulturen sowie in deren sezernierten EVs. Von denaturierten und reduzierten Proteinisolaten der mMSCs wurden jeweils 10 μ g und von den mMSC-EVs jeweils 5 μ g über ein 12 %-iges Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Marker wurden 10 μ l PageRuler Plus Stained Protein Ladder mitgeführt. Der anschließende Transfer auf eine PVDF Membran erfolgte mittels Nassblottverfahren. Um mehrere Proteine parallel auf einem Blot nachweisen zu können, wurde die Membran entsprechend der jeweiligen nachzuweisenden Proteingrößen [kDA] in Längsrichtung zerschnitten nachdem sie mit 1x ROTI-Block-Lösung inkubiert worden war. Die Membranabschnitte wurden mit verdünnten Erstantikörpern (GAPDH 1:2500, FLOTELLIN 1: 500, PRDX1 1:500, SOD1 1:500 und GAL1 1:500) über Nacht bei 4 °C und nach erfolgten Waschschritten mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (1:5000) mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Super Signal West Pico auf Röntgenfilmen.

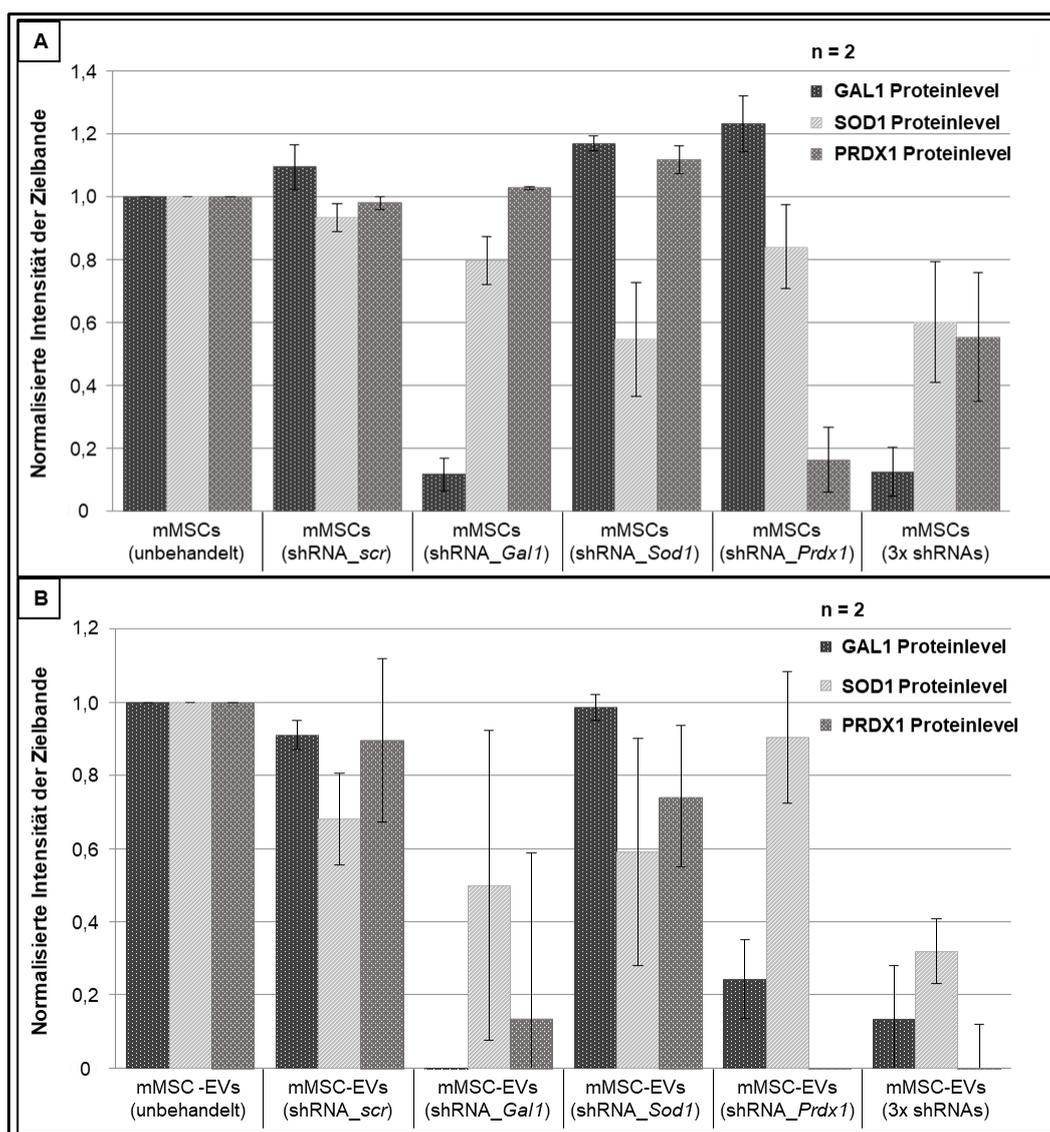


Abb. S7: Zytokin-Zusatz beeinflusst nicht die erfolgreiche Runterregulation der Zielgene *Gal1*, *Sod1* und *Prdx1* mittels eingebrachter shRNA auf Proteinebene. Analysiert wurden reduzierte und denaturierte Proteinlysate aus mit einem shRNA Konstrukt (*shRNA_scr*, *shRNA_Gal1*, *shRNA_Sod1* oder *shRNA_Prdx1*) oder mit allen drei Zielgen-shRNAs (*shRNA_Gal1*, *shRNA_Sod1* und *shRNA_Prdx1* = 3x shRNA) transduzierten hoch positiven mMSCs sowie deren EVs. Als Kontrolle dienten unbehandelte mMSCs sowie die von ihnen sezernierten EVs. Die mMSC-Kultivierung im Allgemeinen sowie die für EV-Ernten, fand in Sigma-FCS-haltigem Kultivierungsmedium mit Zytokin-Zusatz (rmEGF [40pg/ml] + rmPDGF-BB [4ng/ μ l]) statt. Je 10 μ g mMSC-Protein (A) oder 5 μ g EV-Protein (B) wurde über ein 12 %-iges Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und dann mittels Nassblottverfahren auf eine PVDF Membran transferiert. Verdünnter Erstantikörper (GAPDH 1:2500, FLOTELLIN 1: 500, PRDX1 1:500, SOD1 1:500 und GAL1 1:500) wurde über Nacht bei 4 °C und nach erfolgten Waschschritten der entsprechende Sekundärantikörper (1:5000) mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Intensitätsdichte pro mm^2 der mittels Super Signal West Pico ermittelten Banden der Zielproteine (GAL1, SOD1 und PRDX1) wurde gegen das jeweilige Referenzprotein (A: GAPDH für mMSCs, B: FLOTELLIN für EVs) mittels Quantity One (Basic) Software normalisiert. Insgesamt wurden von jeder mMSC-Probe zwei unabhängige Analysen durchgeführt und gemittelt dargestellt (A; n = 2). Dahingegen wurde von jeder EV-Ernte (zwei Ernten pro mMSC-Kultur) nur je eine Analyse durchgeführt und anschließend die Ergebnisse dieser beiden Ernten zusammengefasst dargestellt (B; n = 2).

7.8. Cytospin Versuche

Tab. S6: Auflistung der Anzahl an SCA-1- oder C-KIT-positiven Zellen sowie die Anzahl an PKH26-markierten mMSC-EVs in Kolokalisation mit diesen Zellen 2 oder 4 h nach Transplantation. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die ermittelten absoluten Werte in relative umgerechnet und diese ebenfalls in der Tabelle als Anzahl an EVs pro Antigen-positiver Zelle aufgelistet. TX = Transplantation.

Antikörper Färbung	Stunden nach TX	Anzahl an mit Antigen-positiven Zellen kolokalisierenden EVs	Anzahl an Antigen-positiven Zellen	Anzahl an EVs pro Antigen-positiver Zelle
SCA-1	2 h	1102	368	3,0
SCA-1	4 h	141	59	2,4
C-KIT	2 h	215	111	1,9
C-KIT	4 h	11	8	1,4

7.9. NanoSight Messungen

Tab. S7: Ergebnisse der Nanopartikel Verfolgungsanalyse (NTA) von EVs isoliert aus unter Anwesenheit von Zytokinen kultivierten unbehandelten oder mit verschiedenen shRNAs transduzierten mMSCs. Pro mMSC-Kultur lagen jeweils 2 Ernten vor. Von jeder EV-Probe wurde eine mit filtriertem (0,1 µm) 1xDPBS hergestellte 1:500 Verdünnung zehnmal jeweils 10 sec bei 23,5 °C am NanoSight vermessen. Durch anschließende Prozessierung der Messdaten wurde für jede Probe der Modalwert (Modus) der vorliegenden Partikelgröße [nm] und die in der Messlösung vorliegende Partikelanzahl/ml mit zugehöriger Standardabweichung ermittelt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung wurde schlussendlich die hier angegebene Konzentration und Standardabweichung der jeweiligen Probe erhalten. Da für jede EV-Probe das Volumen und die Anzahl an mMSCs, von welchen sie produziert wurden, bekannt war, konnte zusätzlich die EV-Anzahl pro mMSC berechnet werden.

	Ernte	Modus Partikelgröße [nm]	Konzentration [$\cdot 10^{11}$ Partikel/ml]	Standardabweichung [$\cdot 10^{10}$ Partikel/ml]	Anzahl produzierter EVs pro mMSC
mMSC-EVs (unbehandelt)	1	142,8	7,10	1,96	2679
	2	139,5	5,70	1,83	2151
mMSC-EVs (shRNA_scr)	1	140,3	5,25	2,19	2500
	2	152,7	3,81	1,03	1812
mMSC-EVs (shRNA_Gal1)	1	151,3	4,28	1,14	2740
	2	154,8	1,90	1,44	1215
mMSC-EVs (shRNA_Sod1)	1	147,3	3,78	1,87	1700
	2	143,5	2,66	9,45	1198
mMSC-EVs (shRNA_Prdx1)	1	130,5	3,44	1,89	1620
	2	139,3	1,58	1,15	745
mMSC-EVs (3x shRNAs)	1	138,3	3,92	3,78	1764
	2	131,8	1,53	2,30	687

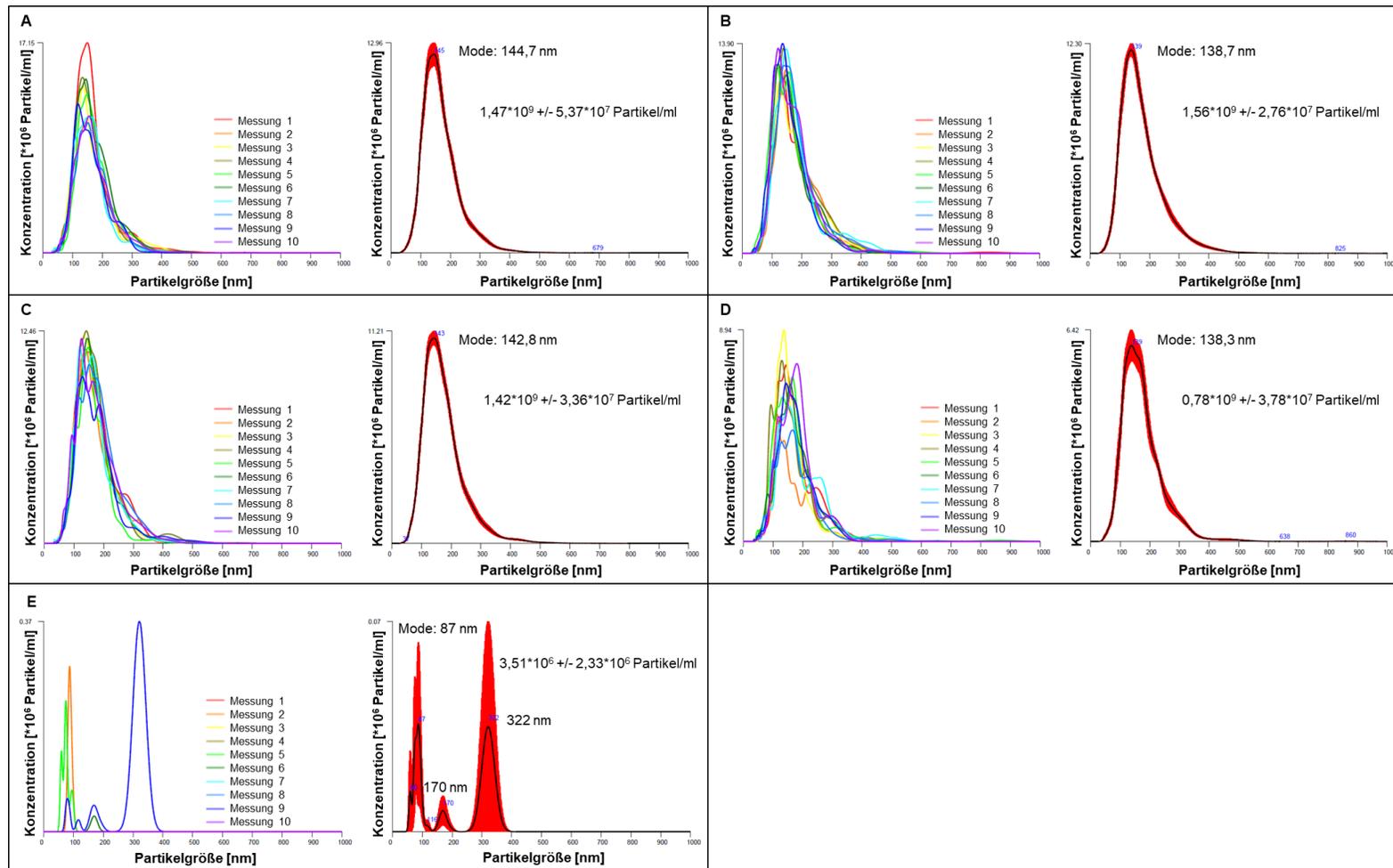


Abb. S8: Messkurven von Nanopartikel Verfolgungsanalysen (NTA). Repräsentative Abbildungen von Messungen vier verschiedener mMSC-EV-Präparate (A-D) sowie einer Messung von filtriertem (0,1 μ m) 1xDPBS als Kontrolle (E). Auf der linken Seite eines jeden Bildes sind die jeweils 10 individuellen Messwiederholungen \dot{a} 10 sec bei 23,5 $^{\circ}$ C dargestellt. Nach der Prozessierung wurde für jede Messlösung eine einzelne Kurve (rechte Seite) erhalten, aus der die relative Partikelmenge/ml, und die gemittelte modale Partikelgröße [nm] erhalten wurden. Beide sind in die jeweilige Abbildung aufgenommen worden. Alle EV-Präparate wurden vor der Messung mit 1xDPBS (0,1 μ m Filter) 1:500 verdünnt.

EVs von unbehandelten mMSCs kultiviert ohne (A) und mit Zytokinen (C), EVs von mit 3x shRNAs transduzierten mMSCs kultiviert ohne (B) und mit Zytokinen (D).

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Obersteinbeck-Recke, den 20.07.2023

Jill-Sandra Schoefinius