

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohren Heilkunde
(Prof. Dr. med. D. Beutner)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Mesenchymale Stammzellen der Kopf-
Hals-Region im Fokus der
Reprogrammierung in induzierte
pluripotente Stammzellen und des
Einflusses ionisierender Strahlung**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Mario Hambrecht

aus

Heidelberg

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer: Prof. Dr. med. M. Jakob

Ko-Betreuer: Prof. Dr. med. R. Dressel

Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. med. M. Jakob

Ko-Referent: Prof. Dr. Rüdiger Behr

Drittreferent/in: -

Datum der mündlichen Prüfung: 18.10.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Mesenchymale Stammzellen der Kopf-Hals-Region im Fokus der Reprogrammierung in induzierte pluripotente Stammzellen und des Einflusses ionisierender Strahlung" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 31.03.2022

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden in folgenden wissenschaftlichen Artikeln publiziert:

Spiegel JL*, **Hambrecht M***, Kohlbauer V, Haubner F, Ihler F, Canis M, Schilling AF, Böker KO, Dressel R, Streckfuss-Bömeke K, Jakob M (2019): Radiation-induced sensitivity of tissue-resident mesenchymal stem cells in the head and neck region. *Head Neck* 41, 2892–2903 * Die Autoren Spiegel JL und Hambrecht M trugen gleichermaßen zu der Arbeit bei.

Hübscher D, Rebs S, Haupt L, Borchert T, Guessoum CI, Treu F, Köhne S, Maus A, **Hambrecht M**, Sossalla S, Dressel R, Uy A, Jakob M, Hasenfuss G, Streckfuss-Bömeke K (2019): A high-throughput method as a diagnostic tool for HIV detection in patient-specific induced pluripotent stem cells generated by different reprogramming methods. *Stem Cells Int* 2019, 2181437

Jakob M, **Hambrecht M**, Spiegel JL, Kitz J, Canis M, Dressel R, Streckfuss-Bömeke K (2020): Pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells show comparable functionality to their autologous origin. *Cells*. 2020 Dec 28;10(1):33.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Stammzellen	1
1.1.1 Mesenchymale Stammzellen.....	2
1.1.2 Induzierte pluripotente Stammzellen	5
1.1.3 MSCs im Tumorwachstum und Tumorstammzellen	8
1.2 Tumore im Kopf-Hals-Bereich und Bestrahlung.....	9
1.2.1 Inzidenz, Risikofaktoren und pathologische Einteilung von Kopf-Hals-Tumoren.....	9
1.2.2 Therapie und Prognose des Kopf-Hals-Karzinoms	10
1.2.3 Nebenwirkungen der Bestrahlung.....	10
1.3 Grundlagen der Bestrahlung.....	12
1.4 Fragestellung	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Materialien	14
2.1.1 Laborausstattung	14
2.1.2 Verbrauchsgegenstände.....	15
2.1.3 Plasmide und Oligonukleotide	16
2.1.4 Antikörper und Farbstoffe.....	17
2.1.5 Chemikalien und Reagenzien.....	19
2.1.6 Lösungen, Puffer für molekulare und proteinbiologische Experimente.....	21
2.1.7 Chemikalien, Lösungen und Medien für Zellkultur.....	21
2.1.8 Software	23
2.1.9 Verwendete Zellen	23
2.2 Methoden.....	24
2.2.2 Herstellung des Kulturmediums der mesenchymalen Stammzellen	25
2.2.3 Isolierung von mesenchymalen Stammzellen aus der nasalen Mukosa und Parotis	25
2.2.4 Kultivierung und Expandieren der Zellen.....	26
2.2.5 Reprogrammierung der mesenchymalen Stammzellen	27
2.2.6 Zellkultur der humanen iPS-Zellen	28
2.2.7 Differenzierung von iPS-Zellen zu iP-MSCs.....	28
2.2.8 Adipogene, osteogene und chondroge Differenzierung der MSCs	28
2.2.9 Durchflusszytometrie-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorter)	29
2.2.10 Proliferationsassay (Cell doubling)	30
2.2.11 Färbungen.....	30
2.2.12 Alkalische-Phosphatase-Färbung.....	31
2.2.13 Immunfluoreszenz-Färbung.....	31
2.2.14 Spontane Differenzierung.....	32

2.2.15	RNA-Isolation	32
2.2.16	Reverse Transkription.....	33
2.2.17	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	35
2.2.18	Gelelektrophorese	35
2.2.19	Quantitative PCR	36
2.2.20	ELISA	36
2.2.21	Bestrahlung der mesenchymalen Stammzellen.....	37
2.2.22	Statistische Analyse	40
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Charakterisierung humaner mMSCs und pMSCs	41
3.1.1	Morphologie der MSCs	41
3.1.2	Zellproliferation der mMSCs und pMSCs.....	41
3.1.3	Immunphänotypische Charakterisierung der MSCs.....	42
3.1.4	Adipogene, osteogene und chondroge Differenzierung der MSCs	44
3.2	Charakterisierung iPS-Zellen	48
3.2.1	Nachweis der Pluripotenz.....	49
3.2.2	Nachweis der spontanen Differenzierung in vitro.....	50
3.3	Charakterisierung der iP-MSCs	53
3.3.1	Morphologie der iP-MSCs	53
3.3.2	Immunphänotypische Charakterisierung der iP-MSCs.....	53
3.3.3	Adipogene, osteogene und chondroge Differenzierung der iP-MSCs	54
3.4	Vergleich zwischen MSCs, iPS-Zellen und iP-MSCs.....	57
3.4.1	Vergleich der immunphänotypischen Charakterisierung.....	57
3.4.2	Vergleich der Expression von Pluripotenz-Genen.....	57
3.4.3	Vergleichende Färbung von α -SMA, OCT4 und Vimentin	58
3.5	Einfluss ionisierender Strahlung auf adulte MSCs des Kopf-Hals-Bereichs	59
3.5.1	Morphologie.....	59
3.5.2	Einfluss ionisierender fraktionierter Strahlung auf die immunphänotypische Charakterisierung von MSCs.....	60
3.5.3	Annexin-Apoptose-Assay	61
3.5.4	Expression von α -SMA	62
3.5.5	Koloniebildung von MSCs	63
3.5.6	Untersuchung der Zellmigration.....	64
4	Diskussion.....	71
4.1	Zellen lassen sich als MSCs charakterisieren	71
4.2	Einfache Reprogrammierung in iPS-Zellen	72
4.3	Differenzierung in iP-MSCs	74
4.4	Vergleich von mMSCs, iPS-Zellen und iP-MSCs	77
4.5	MSCs behalten unter Bestrahlung ihre Zelleigenschaften	79
4.6	MSCs bleiben nach Bestrahlung immunologisch aktiv	80
4.7	Therapeutische Anwendung von MSCs nach Bestrahlungsschaden	81
4.8	Ausblick	83

5	Zusammenfassung	84
6	Anhang	86
7	Literaturverzeichnis	89

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Differenzierungspotential von Stammzellen.....	2
Abb. 2: Differenzierungen von mesenchymalen Stammzellen in verschiedenen Gewebearten..	3
Abb. 3: Anwendungsbereich von iPS-Zellen.	7
Abb. 4: Bestrahlungsschema der Assays.	37
Abb. 5: Phasenkontrastaufnahme von mMSCs und pMSCs.....	41
Abb. 6: Zellverdopplungszeit.	42
Abb. 7: Expression der Oberflächenmarker bei MSCs.	43
Abb. 8: Adipogene Differenzierung von mMSCs und pMSCs.....	44
Abb. 9: Osteogene Differenzierung von mMSCs und pMSCs.	45
Abb. 10: Chondrogene Differenzierung von mMSCs und pMSCs.....	46
Abb. 11: qPCR-Analyse der adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierung.	47
Abb. 12: Morphologische Darstellung des Ablaufs der Reprogrammierung.....	48
Abb. 13: Morphologie und alkalische Phosphatase-Aktivität der iPS-Zellen.	49
Abb. 14: Immunfluoreszenzfärbung der iPS-Zellen.....	50
Abb. 15: Immunfluoreszenzfärbung der differenzierten iPS-Zellen.....	51
Abb. 16: Genexpression der differenzierten iPS-Zellen.	52
Abb. 17: Phasenkontrastaufnahme der iP-MSCs.	53
Abb. 18: Expression der Oberflächenmarker bei iP-MSCs.....	54
Abb. 19: Adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung von iP-MSCs.....	55
Abb. 20: qPCR-Analyse der adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierung.	56
Abb. 21: Vergleichende Darstellung der immunphänotypischen Expression von MSCs, iPS-Zellen und iP-MSCs.....	57
Abb. 22: Genexpressionsanalyse der MSCs, iPS-Zellen und iP-MSCs.....	58
Abb. 23: Immunfluoreszenz- und Immunhistochemie-Färbung von MSCs, iPS-Zellen und iP-MSCs.....	59
Abb. 24: Phasenkontrastaufnahmen von bis zu 10 Gy bestrahlten und unbestrahlten mMSCs und pMSCs.....	60
Abb. 25: Vergleich der Oberflächenmarker bei bestrahlten und unbestrahlten mMSCs und pMSCs.....	61
Abb. 26: Einfluss fraktionierter Bestrahlung auf die Apoptose der mMSCs und pMSCs.....	62
Abb. 27: Immunfluoreszenzfärbung von mMSCs und pMSCs nach Bestrahlung.	63
Abb. 28: Koloniebildende Einheit von mMSCs und pMSCs nach fraktionierter Bestrahlung.	64
Abb. 29: Scratch-Assay von mMSCs und pMSCs nach fraktionierter Bestrahlung.	66
Abb. 30: qPCR-Analyse der Chemokin-Rezeptoren bei mMSCs und pMSCs nach fraktionierter Bestrahlung.	68
Abb. 31: Sekretion der Zytokine IL-6 und IL-8 bei mMSCs und pMSCs nach fraktionierter Bestrahlung.	70
Abb. 32: Expression der Oberflächenmarker von iPS-Zellen.	86
Abb. 33: Verlauf der Differenzierung von iPS-Zellen in iP-MSCs.	87
Abb. 34: Annexin-PI-Apoptose-Assay.....	88

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Laborausstattung.....	14
Tab. 2: Verbrauchsgegenstände.....	15
Tab. 3: Plasmide.....	16
Tab. 4: Oligonukleotide für die Reverse-Transkriptase-PCR-Analyse.....	16
Tab. 5: Primäre Antikörper der Immunfluoreszenz-Färbung.....	17
Tab. 6: Sekundäre Antikörper der Immunfluoreszenz-Färbung.....	18
Tab. 7: Antikörper und Farbstoffe für die Immunhistochemie.....	18
Tab. 8: Antikörper und Farbstoffe der Durchflusszytometrie.....	18
Tab. 9: Molekular biologische Reagenzien.....	19
Tab. 10: Verwendete Kits.....	21
Tab. 11: Bestandteile der molekularen und proteinbiologischen Experimente.....	21
Tab. 12: Bestandteile für die Zellkultur.....	21
Tab. 13: Puffer und Lösungen für Zellkultur.....	22
Tab. 14: Medien für Zellkultur.....	23
Tab. 15: Programme für die Auswertungen.....	23
Tab. 16: Übersicht der verwendeten Zellen.....	24
Tab. 17: Übersicht der verschiedenen Verdünnungen.....	27
Tab. 18: Zusammensetzung eines RT-PCR-Ansatzes.....	34
Tab. 19: Programm für cDNA-Synthese.....	34
Tab. 20: Komponenten für eine RT-PCR-Reaktion.....	34
Tab. 21: Programmablauf der RT-PCR.....	35
Tab. 22: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes.....	35
Tab. 23: Programm für die PCR.....	35
Tab. 24: Komponenten eines qPCR-Master-Mix.....	36
Tab. 25: Programm für cDNA-Synthese.....	36

Abkürzungsverzeichnis

AFP	Alpha-1-fetoprotein
ASC	<i>Adipose-derived stem cells</i>
BM-MSCs	<i>Bone-marrow mesenchymal stem cell</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cTNT	<i>Cardiac troponin T</i>
C-MYC	<i>c-Myc myelocytomatosis avian viral oncogene homolog</i>
DAPI	<i>4,6-Diamin-2`-phenylindoldihydrochlorid</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
FABP4	<i>Fatty acid binding protein 4</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (Fetales Kälberserum)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
hPL	Humanes Plättchenlysat
IL	Interleukin
IFN- α/β	Interferon-alpha/beta Rezeptor
iPS-Zelle	Induzierte pluripotente Stammzelle
iP-MSCs	<i>Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem</i>
KLF4	<i>Krüppel-like factor 4</i>
LIN28	<i>Cell lineage abnormal 28</i>
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
MSCs	Mesenchymale Stammzellen
mMSCs	<i>Mucosa derived mesenchymal stem cells</i>
pMSCs	<i>Parotis gland derived mesenchymal stem cells</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
OCT4	<i>Octamer binding transcription factor 4</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RT	Raumtemperatur
RUNX2	<i>Run related transcriptins factor 2</i>
SA- β - Galaktosidase	Seneszenz assoziierte- β -Galaktosidase
SOX2	<i>Sex Determining Region Y-Box 2</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>

1 Einleitung

Xerostomie (Mundtrockenheit) und Mukositis sind die führenden bestrahlungsinduzierten Nebenwirkungen in der Therapie von Kopf-Hals-Tumoren, die mit erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität einhergehen (Konings et al. 2005). Durch ionisierende Bestrahlung werden neben Tumorzellen auch gesunde Speicheldrüsenzellen und strahlungssensible Stammzellen geschädigt, die für die Regeneration der Zellen und Erneuerung des Gewebes verantwortlich sind (Cooper et al. 1995). Als Therapieansatz, um die Nebenwirkungen der Bestrahlungstherapie zu verringern, wird die lokale oder systemische Applikation mesenchymaler Stammzellen (MSCs) diskutiert, die nützliche immunologische und regenerative Fähigkeiten besitzen (Lombaert et al. 2006).

1.1 Stammzellen

Stammzellen zeichnen sich durch zwei Eigenschaften aus: Selbsterneuerung und Differenzierungspotential. Die Selbsterneuerung beschreibt die langfristige Zellteilung unter Beibehaltung des undifferenzierten Zustands. Das gelingt durch asymmetrische Zellteilung; die Teilung in einer Mutterzelle, die mit der ursprünglichen Zelle identisch ist, und die Tochterzelle, die differenziert ist (Moore et al. 2011).

Das Differenzierungspotential beschreibt die Fähigkeit der Stammzellen sich in verschiedene, spezialisierte Zelltypen zu differenzieren. Dabei wird zwischen pluripotenten, multipotenten und unipotenten Stammzellen unterschieden (Longo et al. 2016).

Pluripotente Stammzellen (plus = mehr) sind die Stammzellen mit dem größten Differenzierungspotential und dienen als Grundlage für die Bildung aller Zellen des postnatalen Körpers. Sie können sich in alle drei Keimblätter (Ektoderm, Entoderm, Mesoderm) differenzieren. Diese verlieren im Rahmen der embryonalen Entwicklung ihre Pluripotenz und lassen sich somit nicht im Menschen finden (Gerke et al. 2020).

Die multipotenten (multi = viel) Stammzellen besitzen die Fähigkeit verschiedene Zelltypen eines Keimblattes zu bilden und lassen sich auch aus dem erwachsenen Körper isolieren (Krampera et al. 2007). Hierzu gehören u.a. die hämatopoetische, mesenchymale und neurale Stammzellen, aber auch Zellen des Darmepithels werden zu dieser Gruppe gezählt. Mesenchymale Stammzellen können sich zu allen Zelllinien des Mesoderms differenzieren (Adipozyten, Chondrozyten, Myozyten und Osteozyten). Multipotente Stammzellen gehören zur Gruppe der adulten Stammzellen und entwickeln sich somit in festgelegte Gewebetypen (Gerke et al. 2020).

Stammzellen, welche nur Zellen desselben Zelltyps ausdifferenzieren können, werden als unipotente (uni=eins) Stammzellen bezeichnet und besitzen das geringsten Differenzierungspotenzial (z.B.: Spermatogoniale Stammzellen) (Ilic und Polak 2011).

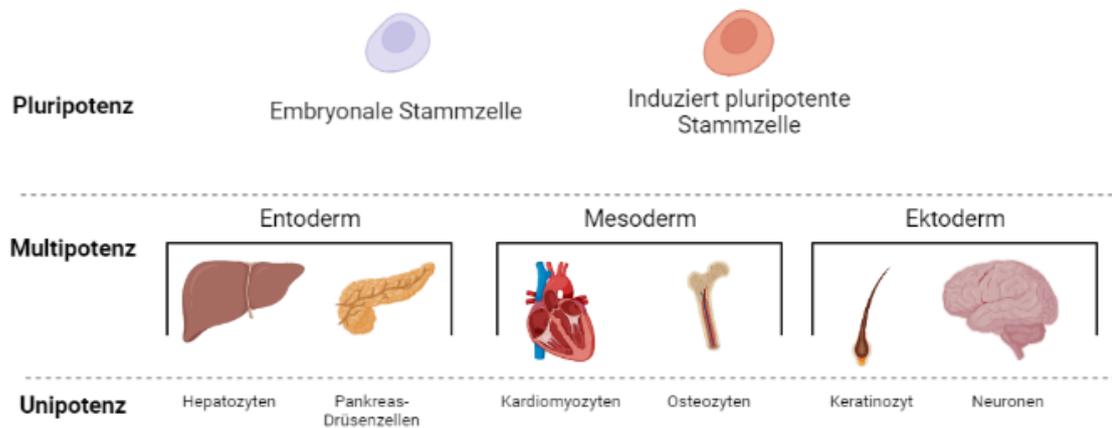


Abb. 1: Differenzierungspotenzial von Stammzellen. Embryonale Stammzellen (ESCs) und induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) lassen sich in alle Gewebe der drei Keimblätter Entoderm, Mesoderm und Ektoderm differenzieren. ESCs wird aus der Blastozyste gewonnen, während iPS-Zellen durch Reprogrammierungsfaktoren von somatischen Zellen stammen. Aus dem Entoderm entwickeln sich die Zellen des Verdauungstraktes, sowie Leber und Pankreas. Kardiomyozyten und Osteozyten haben ihren Ursprung im Mesoderm, während das Ektoderm die Grundlage für Zellen der Epidermis, des Nervensystems und der Sinnenorgane darstellt. Die Abbildung wurde mit Hilfe von bio-render.com erstellt und zur besseren Übersichtlichkeit wurde eine vereinfachte Darstellung gewählt.

1.1.1 Mesenchymale Stammzellen

In den 1970er Jahren konnte Friedenstein (1974) zum ersten Mal mesenchymale Stammzellen im Knochenmark finden. MSCs sind multipotente Stammzellen mit hohem Proliferations- und Differenzierungspotential. Sie besitzen, wie alle Stammzellen, die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und befinden sich im adulten Gewebe, um für Zellnachschub zu sorgen. Bei einem Gewebeschaden oder Zelluntergang entstehen aus einer Stammzelle durch asymmetrische Teilung zwei nicht identische Zellen: eine Stammzelle und eine Progenitorzelle, aus der sich die benötigte spezialisierte Zelle entwickelt (Caplan 1991).

In den letzten Jahrzehnten wurden aus verschiedenen Geweben wie Knochenmark (*bone-marrow-MSCs*; *BM-MSCs*), Fettgewebe (*adipose-derived stem cell, ASCs*), Muskeln und peripherem Blut MSCs isoliert (Friedenstein et al. 1987; Pittenger et al. 1999; Kuznetsov et al. 2001; Young et al. 2001; Katz et al. 2005). Auch ließen sich in der Kopf-Hals-Region wie Gingiva, Milchzahn, Speicheldrüse, Parotis und Nasenmuschel MSCs entdecken (Miura et al. 2003; Rotter et al. 2008; Zhang et al. 2009; Jakob et al. 2010).

Ein MSC-Marker fehlt bis heute, da MSCs ein breites Antigenmuster exprimieren und dadurch ein unspezifisches Expressionsprofil aufweisen (Minguell et al. 2001; Wulf et al. 2006). Daher legten Dominici et al. (2006) drei Charakteristika fest, die erfüllt werden müssen, um Zellen als MSCs zu definieren. Erstens müssen sie *in vitro* eine fibroblastenartige Morphologie mit Plastikadhärenz aufweisen. Zweitens muss eine adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierbarkeit nachgewiesen werden (Abb. 2). Als drittes Kriterium wurde die Expression von speziellen Oberflächenantigenen definiert. Diese dient sowohl der schnellen und einfachen Identifizierung von Zellpopulationen als auch dem Ausschluss möglicher anderer Zellpopulationen. So sind CD (*Cluster of Differentiation*) 34 und CD45 Marker von hämatopoetischen Vorläufer- und Endothelzellen und sollten bei MSCs negativ sein. Ebenfalls sollten CD14 und CD11b, meist auf Monozyten und Makrophagen, und die B-Zellmarker CD79 α und CD19 negativ sein. Dagegen müssen Marker für CD73 (Ecto-5'-Nucleotidase), CD90 (Thy-1) und CD105 (Endoglin) positiv sein.

ASCs und *BM-MSCs* sind die meist erforschten mesenchymalen Stammzellen. Für die Isolation von MSCs aus dem Knochenmark ist eine Knochenmarksfunktion von Nöten, während die Gewinnung von *ASCs* eine Liposuktion verlangt (Strioga et al. 2012). Die Isolation von *ASCs* ist vorteilhafter, da der Eingriff für die Patienten weniger schmerzhaft und mit weniger Komplikationen behaftet ist. Zudem kann eine bis zu 40-mal größere Menge an Zellen entnommen werden (Strem et al. 2005).

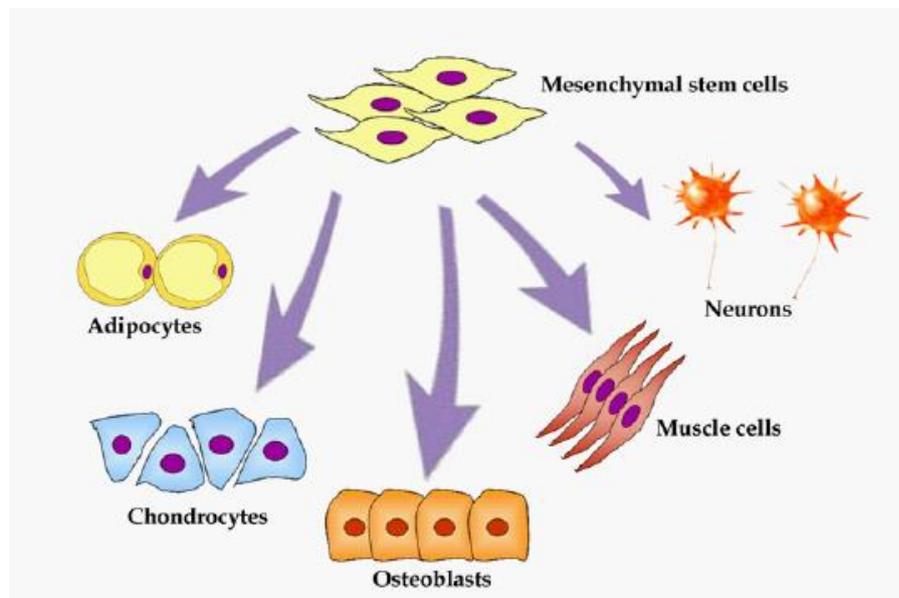


Abb. 2: Differenzierungen von mesenchymalen Stammzellen in verschiedenen Gewebearten. Durch spezifische Zellsignale wird die Stammzelle in reife Zellen für den Aufbau von Knochen, Knorpel, Muskel, Knochenmark, Bänder und Bindegewebe wie beispielsweise Adipozyten differenziert. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Autoren (Meregalli et al. 2011).

Im Jahr 2008 wurden MSCs zum ersten Mal aus der Parotis isoliert und 2010 bewiesen Jakob und Kollegen erstmals das Vorhandensein von Mukosa-MSCs in der Nasenschleimhaut (Rotter et al. 2008; Jakob et al. 2010). Im Vergleich zu BM-MSCs oder ASCs befinden sich diese Zellen an hochaktiven immunologischen Orten, da sie einer erhöhten Exposition von Krankheitserregern und Allergenen ausgesetzt sind. Neben den typischen stammzellenspezifischen Eigenschaften wurde auch gezeigt, dass pMSCs (*parotis gland derived mesenchymal stem cells*) und mMSCs (*mucosa derived mesenchymal stem cells*) in der Entzündungs- und Immunreaktion beteiligt sind. Sie sekretieren Interleukine (IL), wie IL-6 und IL-8, Zytokine (z. B. *Macrophage Migration Inhibitory Factor*, Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor und Interferone) und Wachstumsfaktoren (bspw. *Transforming Growth Factor*). Besonders nach Lipopolysaccharid-Stimulation erhöht sich deren Sekretion signifikant (Brandau et al. 2014). Lipopolysaccharide sind Bestandteile von gramnegativen Bakterien und werden bei in vitro Versuchen als Stimulantia verwendet, um den bakteriellen Kontakt zu simulieren. Auch für die bisher vermehrt untersuchten BM-MSCs wurden immunologischen und anti-inflammatorische Fähigkeiten gezeigt: Sie exprimieren und sekretieren Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), β -1 und Neutrophin-3, aber auch eine große Anzahl verschiedener Interleukine (IL1, IL6, IL8, IL9, IL10, IL12, IL13, IL17, IL18, IL27) (Lee et al. 2011; Mirabella et al. 2011; Zagoura et al. 2012; Cantinieaux et al. 2013). Vergleicht man die mMSCs mit den pMSCs, so fällt auf, dass pMSCs nach Stimulation mit bakteriellen Endotoxinen eine größere Mobilität im Gewebe aufzeigen und mMSCs nach Stimulation mehr Zytokine sekretieren (Brandau et al. 2014). Des Weiteren exprimieren mMSCs zahlreiche Toll-like Rezeptoren (TLRs). TLRs sind besonders an der Erkennung bakterieller Infektionen beteiligt und durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer*) ein wichtiger Auslöser von Entzündungsreaktionen. mMSCs reagieren besonders auf TLR3-Liganden (Dumitru et al. 2014). Dabei ist hervorzuheben, dass sie sowohl entzündungsfördernd als auch entzündungshemmend reagieren. In der Frühphase sekretieren sie pro-inflammatorischen IFN- α/β , in der Spätphase Regulierungsfaktoren wie IL-6 und TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) (Petri et al. 2017). Somit haben MSCs eine wichtige Rolle in der Geweberegeneration und im komplexen Prozess der Wundheilung, besonders nach bakterieller Stimulation (Jakob et al. 2013).

Tomchuck und Kollegen (2008) zeigten eine erhöhte Zytokin- und Chemokinsekretion von BM-MSCs, wenn diese durch TLRs aktiviert werden. Dies führt zur Migration von MSCs und zur Beschleunigung der Wundheilung (Liotta et al. 2008; Yi und Song 2012). *BM-MSCs* sezernieren zahlreiche Wachstumsfaktoren wie den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF), Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF), Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF), Makrophagen-stimulierende Faktoren (M-CSF) und den *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Salgado et al. 2010). Kim et al. (2014) beschrieben, dass die Wundheilung und die Reepithelisierung nach Zugabe von BM-MSCs beschleunigt wird. Zudem haben sie einen positiven Einfluss auf die Chemotaxis und Einwanderung von

Entzündungszellen zum Ort der Entzündung (Bianco und Robey 2001; Karp und Leng Teo 2009; Hocking und Gibran 2010).

Zusammengefasst sind mesenchymale Stammzellen aufgrund ihrer hohen Plastizität, ihrer einfachen Isolation mit großem Ertrag sezernieren zahlreiche Wachstumsfaktoren wie den Hepatozyten-Wachstumsfaktor ihrer Fähigkeit der Modulation von Entzündungen, sowie zur Anregung von Zellwachstum und Geweberegeneration durch Immunmodulation und Immunsuppression für die klinische Anwendung von großem Interesse.

1.1.2 Induzierte pluripotente Stammzellen

Im Jahr 2006 entdeckte Shinya Yamanaka, dass sich adulte somatische Zellen in pluripotente Stammzellen zurückdifferenzieren lassen. Er verwendete einen Retrovirus, belud ihn mit den vier Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 (*Krüppel-like factor 4*) sowie C-MYC (*c-Myc myelocytomatosis avian viral oncogene homolog*) und schleuste ihn in Mausfibroblasten ein. Dort wurde die Expression von Genen aktiviert, die für die Entstehung von pluripotenten Stammzellen verantwortlich sind. Er nannte diese Zellen induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) (Takahashi und Yamanaka 2006). Ein Jahr später gelang die Reprogrammierung mit humanen Zellen, und auch andere Kombinationen von Reprogrammierungsfaktoren wie OCT4, SOX2, NANOG und LIN28 (*Cell lineage abnormal 28*) wurden erfolgreich beschrieben (Takahashi et al. 2007; Yu et al. 2007). Jedoch wurde gezeigt, dass die Reprogrammierungsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und C-MYC auch mit der Entstehung von Tumoren assoziiert werden (Okita et al. 2007; Ben-Porath et al. 2008). Besonders das Protoonkogen *C-MYC* wird gehäuft mit Tumoren in Verbindung gebracht und scheint somit für die klinische Anwendung ungeeignet zu sein (Kuttler und Mai 2006).

Eine integrationsfreie Reprogrammierung mittels des einsträngigen RNA-Sendai-Virus bietet eine gute Alternative, da dieser sich nur im Zytoplasma repliziert und nicht in das Genom integriert. Obwohl die Technik teuer ist, einen höheren Sicherheitsstandard als Nicht-Virus-Methoden im Labor erfordert, und virales Material sich noch länger in der Zellkultur nachweisen lässt, ist diese Methode weit verbreitet (Fusaki et al. 2009; Schlaeger et al. 2015).

Darüber hinaus wurden erfolgreiche Reprogrammierungen mittels Plasmiden und Adenoviren gezeigt (Okita et al. 2011; Diecke et al. 2015). Okita und Kollegen (2011) entwickelten iPS-Zellen unter Verwendung von L-MYC bei gleichzeitiger p53 Suppression. Dazu verwendeten sie episomale Plasmidvektoren mit LIN28, OCT3/4, SOX2, KLF4 und L-MYC und konnten dabei auf NANOG und C-MYC verzichten.

Aus iPS-Zellen lassen sich differenziertes Gewebe und Zellen wie hämatopoetische Stammzellen, Herzmuskelzellen oder Motoneurone entwickeln. Sie sind damit in der weltweiten Forschung in zahlreichen Fachbereichen von großem Interesse. Mit der Reprogrammierung von somatischen Zellen in iPS-Zellen wurde eine unerschöpfliche Zellquelle gefunden, mit der wissenschaftliche Experimente nicht mehr abhängig von ethisch fragwürdigen embryonalen Stammzellen sind. Beide Zellarten haben zahlreiche gemeinsame Fähigkeiten und Eigenschaften: Sie besitzen große Ähnlichkeit bezüglich ihrer Morphologie, Proliferationsfähigkeit, Oberflächenmarker, Genexpression sowie Telomeraseaktivität und lassen sich *in vitro* in die drei Keimblätter Endo-, Ekto- und Mesoderm differenzieren (Takahashi et al. 2007).

Die iPS-Zellen finden Anwendung in der Simulation von Krankheiten (vor allem von genetischen Erkrankungen), in der Entwicklung von Pharmazeutika, in der Transplantationsmedizin und sowohl in der regenerativen als auch der personalisierten Medizin (Abb. 3). So konnten aus iPS-Zellen hämatopoetische Stammzellen gebildet werden, die zum Verstehen der Pathogenese der Fanconi-Anämie einen großen Beitrag leisteten (Raya et al. 2009). Im Jahr 2011 wurden erstmals iPS-Zellen in der Schizophrenie-Forschung verwendet (Brennan et al. 2011). Seit 2014 werden die ersten klinischen Versuche für die Behandlung von altersbedingter Makuladegeneration durchgeführt (Kamao et al. 2014). Darüber hinaus werden iPS-Zellen in der Erforschung neurologischer Krankheiten wie Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, amyotropher Lateralsklerose und spinaler Muskelatrophie verwendet (Xu et al. 2013).

Für die regenerative und personalisierte Medizin wie auch für die Transplantationsmedizin stellen iPS-Zellen eine interessante Alternative dar. Abstoßungsreaktionen sind theoretisch ausgeschlossen, wenn Zellen vom gleichen Patienten entnommen, moduliert und wieder eingesetzt werden (Kim 2015). Die Entstehung von Stammzellenbanken wäre möglich, in denen Zellen mit unterschiedlichen HLA (*human leukocyte antigen*) gesammelt, iPS-Zellen produziert und in die benötigte Zielzelle differenziert werden könnten (Nakajima et al. 2007). Bei Bedarf wäre man imstande, die HLA-kompatiblen Zellen mit den Empfängern zu kombinieren. Jedoch sollte vor einer klinischen Anwendung stets die Immunogenität der Zellen untersucht werden, denn eine mögliche Entstehung von Gendefekten müsste aufgrund der Art der Reprogrammierung, Entwicklung und Differenzierung der Zellen ausgeschlossen werden (Xian und Huang 2015).

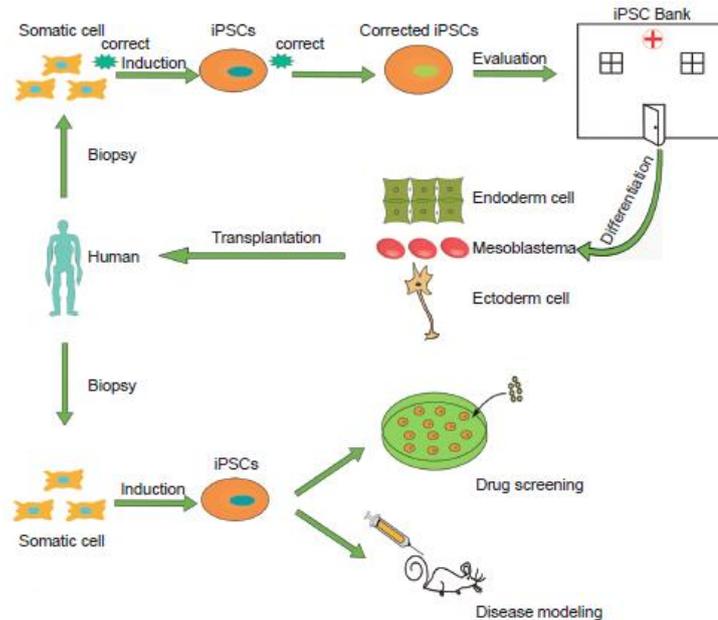


Abb. 3: Anwendungsbereich von iPS-Zellen. Die möglichen klinischen Anwendungen von iPS-Zellen gliedert sich in zwei Anwendungsbereiche: Zum einen ist die Entnahme von somatischen Zellen für die Reprogrammierung und die anschließende Speicherung von iPS-Zellen in einer iPS-Zellbank denkbar. Aus diesem großen Pool an Stammzellen könnten differenzierte Zellen für die klinische Anwendung produziert werden. Der andere, bereits existierende Anwendungsbereich stellt die klinische Untersuchung von iPS-Zellen für die Entwicklung von Pharmazeutika und die Simulation von Krankheiten dar. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Autoren (Jiang et al. 2014).

Für die Charakterisierung der iPS-Zellen sollte der Beweis von verschiedenen Pluripotenzmarkern (z. B. *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, *LIN28*, *SSEA1*, *SSEA3*, *SSEA4* und *TRA1-60*) erbracht werden. Des Weiteren wird das Differenzierungspotential in die drei Keimblätter Endo-, Meso- und Ektoderm mittels Fluoreszenzmikroskopie und PCR nachgewiesen. Darüber hinaus zeigen undifferenzierte Zellen eine alkalische Phosphataseaktivität. Die alkalische Phosphatase ist ein membranständiges Enzym. Mit dieser Färbung können undifferenzierte embryonale Stammzellen und iPS-Zellen erkannt werden (O'Connor et al. 2008). Alternativ können epigenetisch die Schlüssel-Pluripotenz-Gene wie *OCT4*, *NANOG* oder *SOX2* demethyliert oder das genetische Profil mittels der Analyse des Karyotyps bestätigt werden (Brimble et al. 2007; Schopperle und DeWolf 2007; Takahashi et al. 2007).

In einigen Protokollen wurde bereits die Differenzierung von iP-MSCs (aus induzierten pluripotenten Stammzellen entstandene mesenchymale Stammzellen) beschrieben (Diederichs und Tuan 2014; Frobel et al. 2014; Kang et al. 2015).

Sie könnten die Vorteile beider Zellarten vereinen und präsentieren somit ein sehr interessantes Forschungsgebiet. Erste klinische Versuche bei einer Steroid-resistenten akuten Graft-versus-Host Krankheit zeigen vielversprechende Ansätze (Rasko et al. 2019). Der Vorteil auf iP-MSCs aus einer iPSC-Bank zurückzugreifen liegt darin, dass die Verwendung von MSCs mit Spendervariabilität einhergeht und Zellexpansion längere Zeit beansprucht.

Die Wissenschaft ist auf der Suche nach der „perfekten Stammzelle“. Sie sollte sowohl langlebig, immunologisch weitestgehend inaktiv, aus zugänglichem Gewebe leicht isolierbar und *in vitro* möglichst leicht sowie schnell kultivierbar sein. Mit Blick auf diese Anforderungen stellt sich die Frage, ob sich aus iPS-Zellen wieder mesenchymale Stammzellen, also iP-MSCs, differenzieren lassen und welche Zelleigenschaften diese Stammzellen besitzen. Mit dieser multipotenten Stammzelle könnten die Vorteile der iPS-Zellen (endlose Proliferation und ausgezeichnete Plastizität) und der MSCs (immunmodulatorische Eigenschaften) kombiniert werden (Lian et al. 2010; Hynes et al. 2014).

1.1.3 MSCs im Tumorwachstum und Tumorstammzellen

Den MSCs werden zwar auf der einen Seite große Chancen in der Geweberegeneration zugeschrieben, auf der anderen Seite unterstützen sie aber auch das Wachstum von Tumorzellen (Clarke und Becker 2006). Diese Tumorstammzellen besitzen die Fähigkeit sowohl zur symmetrischen (Selbsterneuerung), als auch zur asymmetrischen (zur zellulärer Heterogenität führenden) Zellteilung (Clarke et al. 2006). Eine Tumorzelle ist eine entartete Zelle, die durch eine zelluläre oder genetische Fehlregulation im Rahmen der Zellproliferation unkontrolliert neues Körpergewebe bildet. Es entstehen solitäre oder multizentrische Neoplasien, die durch verschiedene Zell-Zell-Kontakte, Zellsignale und Expression sowie Sekretion verschiedener Rezeptoren, Wachstumsfaktoren und Botenstoffe wächst. So findet permanent eine dynamische Interaktion verschiedener Tumor- und auch Nicht-Tumorzellen statt. Tumorzellen haben die Tendenz, in Gewebe einzuwandern und deren Bestandteil zu werden (Longo et al. 2016). Die Tumorstammzellen sekretieren Zytokine und Wachstumsfaktoren, die den Tumor in Wachstum und Proliferation unterstützen und für ein protektives Milieu der bestrahlten Tumorzellen sorgen (Ren et al. 2012).

Dazu gehört die für den Tumor vorteilhafte Angiogenese und die Migration von Apoptose inhibierenden Zellen. Außerdem können die MSCs einen den Tumor schützenden Einfluss auf eine medikamentöse Therapie nehmen (Bergfeld et al. 2014; Bonuccelli et al. 2014). Zudem wird den MSCs ein vorteilhafter Einfluss auf eine Metastasierung des Tumors zugeschrieben, und in zahlreichen Versuchen konnte die tumorunterstützende Wirkung von

MSCs auf Ovarial-CA oder den metastasierenden Colon-CA nachgewiesen werden (Shinagawa et al. 2010; Lis et al. 2012).

Auf der anderen Seite zeigten andere Studien, dass MSCs auch einen einschränkenden Einfluss auf die Proliferation von Krebszellen besitzen, wie beispielsweise beim Karposi-Sarkom, Lebertumor oder Ovar-Karzinom (Khakoo et al. 2006; Bruno et al. 2013). Diese kontroversen Daten, dass MSCs einerseits eine tumorfördernde Umgebung bilden, andererseits aber auch limitierende Einflüsse auf Tumorzellen besitzen, zeigen die Komplexität des Themas. Wichtig ist dabei die sorgfältige Differenzierung der zu untersuchenden Tumorentitäten und den verwendeten Stammzellen.

1.2 Tumore im Kopf-Hals-Bereich und Bestrahlung

1.2.1 Inzidenz, Risikofaktoren und pathologische Einteilung von Kopf-Hals-Tumoren

Der Begriff -Kopf-Hals-Tumore- stellt einen Sammelbegriff für verschiedene neoplastische Erkrankungen im Kopf-Hals-Bereich dar. Dazu zählen Mundhöhlen-, Pharynx- und Larynxkarzinome sowie maligne Entartungen des Halses, der Nasennebenhöhlen und der Speicheldrüsen. Kopf-Hals-Tumore sind in Deutschland die neunthäufigste Krebsart bei Männern und die dreizehnhäufigste bei Frauen (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2019).

Laut dem Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts erkrankten 2014 in Deutschland rund 17.000 Menschen an Kopf-Hals-Tumoren, dabei sind Männer im Verhältnis 3:1 häufiger betroffen, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei rund 64 Jahren liegt (Wienecke und Kraywinkel 2019). Die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt zwischen 48 % (Männer) und 59 % (Frauen). Es zeigt sich, dass die Raten der Tumore bei den Männern seit 1999 rückläufig sind, während bei den Frauen die Erkrankungsraten anstiegen. Oropharynx, Tonsille und Hypopharynx stellen die am häufigsten betroffenen Organe dar (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2019).

Der größte Risikofaktor in Bezug auf Kopf-Hals-Tumore ist Rauchen in Kombination mit Alkoholabusus (Andre et al. 1995). Besonders hochprozentiger Alkohol fungiert als Lösungsmittel für die kanzerogenen Stoffe des Rauchs, so dass dessen Inhaltsstoffe die Schleimhaut einfacher durchdringen können. Infektionen mit humanen Papillomviren (HPV) und Epstein-Barr-Viren (EBV) sowie der (berufliche) Umgang mit Schadstoffen wie Asbest, Lacken oder polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen sind mit einem höheren Erkrankungsrisiko assoziiert (Carton et al. 2017; Huang und O'Sullivan 2017).

1.2.2 Therapie und Prognose des Kopf-Hals-Karzinoms

Die individuelle Therapie des Kopf-Hals-Karzinoms richtet sich nach Größe, Infiltration und Metastasierung, aber auch nach Lokalisation, Ätiologie und Operabilität. Für die Einteilung dient die TNM-Klassifikation, die anhand von drei Kategorien (Tumorausdehnung, Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen und Vorhandensein von Fernmetastasen) den malignen Tumor charakterisiert (Brierley et al. 2017). Anhand des TNM-Scores wird die Therapie geplant und erlaubt krankheitsprognostische Aussagen. Je früher der Tumor entdeckt wird, desto besser sind die Behandlungsmöglichkeiten.

Wenn der operative Zugang einerseits und der Allgemeinzustand und das Einverständnis des Patienten andererseits es zulassen, wird eine onkologische „en-bloc“-Resektion angestrebt. Je nach Infiltration der Lymphgefäße und/oder Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen muss eine *neck dissection* durchgeführt werden. Teilweise findet eine *neck dissection* auch aus diagnostischen Zwecken statt. Bei diesem chirurgischen Eingriff werden die Lymphknoten aus dem Abflussgebiet der Tumorregion ausgeräumt. Nach erfolgter Operation schließt sich je nach Tumorstadium eine (kombinierte) Radiochemotherapie und/oder eine Immuntherapie an. Bei fortgeschrittenen Union Internationale Contre Le Cancer (UICC)-Stadien oder unvollständiger Resektion verbessert eine kombinierte Radiochemotherapie das Gesamtüberleben signifikant (Bernier et al. 2004).

Auch der Bestrahlungsplan richtet sich nach Lokalisation und Allgemeinzustand des Patienten. Ist der Tumor nicht operabel, wird eine kombinierte Radiochemotherapie eingeleitet. Hat der Tumor Fernmetastasen gebildet, wird in einem palliativen Setting sowohl eine lokale Bestrahlung als auch eine Chemotherapie durchgeführt (Pignon et al. 2009).

1.2.3 Nebenwirkungen der Bestrahlung

Nebenwirkungen der Bestrahlung sind insbesondere Schmerzen und Mundtrockenheit (Xerostomie), die zu bakteriellen oralen Infektionen, Mukositis und Karies, aber ebenfalls auch zu Schluck- und Sprechbeschwerden und Geschmacksverlust führen können (Cooper et al. 1995). In manchen Fällen muss die Ernährung über eine Magen- oder PEG-Sonde erfolgen (Anniko und Union of European Medical Societies 2010).

Unter der Xerostomie leiden rund 40 % der bestrahlten Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren, was eine große Einschränkung der Lebensqualität bedeutet (Chen et al. 2014). Die derzeitige Therapie ist rein symptomatisch: Medikamente wie Pilocarpin werden zur gustatorischen oder muskarinergen Stimulation der Speicheldrüsen verwendet. Jedoch ist der klinische Nutzen unklar (Vissink et al. 2004; Benderitter et al. 2014). Auch das zytoprotektive Amifostin, welches zwar seit 1999 als Medikament für die Behandlung und Prävention von

Xerostomie zugelassen ist, wird weiterhin kritisch bewertet und beeinflusst nicht das klinische Ergebnis (Brizel et al. 2000; Antonadou et al. 2002; Wasserman et al. 2005).

Bestrahlungsverfahren, wie die intensitätsmodulierte Strahlentherapie (IMRT), sparen die großen Speicheldrüsen (Gl. parotidea, Gl. submandibularis, Gl. sublingualis) aus, um Xerostomie zu reduzieren (Coppes et al. 2005; Sciubba und Goldenberg 2006; Kam et al. 2007; Spencer et al. 2014). Jedoch wird durch die IMRT die gesamte Mukosa der Mundhöhle und des Pharynx geschädigt, in der sich kleine Speicheldrüsen der Schleimhaut befinden (Scott-Brown et al. 2008). Diese Schädigung und daraus entstandene Entzündungen tragen ebenfalls zur Mundtrockenheit bei (Eisbruch et al. 2004).

In Tiermodellen konnte nachgewiesen werden, dass BM-MSCs und ASCs nach Bestrahlungsschaden in das geschädigte Gewebe migrieren und den Entzündungsprozess positiv beeinflussen (Kojima et al. 2011; Schwarz et al. 2014). Bereits 2017 wurde zum ersten Mal einem betroffenen Patienten ASCs aus autologem Lipoaspirat in die Glandulae parotidae und submandibulares appliziert (Comella und Bell 2017). Nach rund zwei Jahren wurden über keine schweren Nebenwirkungen berichtet, jedoch konnte die Studie auch keine signifikante Steigerung der Lebensqualität zeigen. Eine dänische Studiengruppe befindet sich derzeit in der Rekrutierungsphase einer Phase I/II-Studie, in der 30 Patienten nach Bestrahlung MSCs appliziert werden. Die Ergebnisse stehen noch aus (Grønhøj et al. 2017).

Pathologisch kann die Schädigung in vier Phasen unterteilt werden: Zunächst findet, bei gleichbleibender alpha-Amylase-Aktivität, ein Abfall der Speichelproduktion mit einer verminderten apikalen Wassersekretion statt (Tag 1-10). Daran anschließend gehen vermehrt Azinuszellen in Apoptose (Tag 10-60). In der dritten Phase kann eine zwischenzeitliche Regeneration stattfinden (Tag 60-120). Diese wird jedoch in der vierten Phase durch einen irreversiblen Rückgang der Speicheldrüsenfunktion zunichte gemacht (Tag 120-240) (Coppes et al. 2001; Coppes et al. 2005). Die durch Bestrahlung hervorgerufene Apoptose wird durch das mutierte Tumorsuppressorgen *p53* moduliert (Avila et al. 2009).

Allerdings besitzt die Glandula Parotis auch regenerative Fähigkeiten, denn innerhalb von zwei Jahren steigert die durch Bestrahlung geschädigte Drüse wieder ihre Sekretionsrate (Braam et al. 2005; Li Y et al. 2007). Diese Beobachtung führt unweigerlich zu der Annahme, dass in der Kopfspeicheldrüse Zellen vorhanden sind, welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Geweberegeneration besitzen, wenn diese nicht irreversibel zerstört wurden (van Luijk et al. 2015).

1.3 Grundlagen der Bestrahlung

Die Bestrahlung hat im klinischen Alltag in zahlreichen Fachrichtungen einen großen Anwendungsbereich. Sie stellt neben der interventionellen Chirurgie und Chemotherapie ein geeignetes Therapiekonzept für neoplastische Erkrankungen dar, bei denen Tumorzellen durch die Strahlung gezielt geschädigt, abgetötet und zeitgleich das umliegende, gesunde Gewebe geschont werden soll. Vor allem bei Kopf-Hals-Karzinomen gehört die Strahlungs-therapie meist zum Gesamttherapiekonzept. Dabei werden die Patienten in der Regel über einen Zeitraum von sechs Wochen mit täglich zwei Gray fraktioniert bestrahlt. Gray ist die Einheit der Strahlung, die als Joule pro Kilogramm definiert ist. Diese entspricht der Energiedosis, die durch Strahlung auf ein Kilogramm Masse anfällt (Sauer 2010). Ionisierende Strahlung bildet den Überbegriff für Gamma-, Röntgen- und Elektronenstrahlung. Diese können direkt oder indirekt mittels Wasserstoff- und Sauerstoffradikalen die DNA schädigen und zu Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen führen, deren Folge Störungen in der Replikation und Transkription, sowie Genmutationen und Chromosomenaberrationen sind (Hall 1994).

Kann der Schaden nicht durch eigene Reparaturmechanismen behoben werden, tritt Apoptose, Nekrose oder der klonogene Zelltod ein (Longo et al. 2016). Apoptose entspricht dem durch die Zelle aktiv durchgeführten, programmierten Zelltod. Für die unmittelbare Nekrose werden hohe Strahlendosen benötigt, durch welche die Zelle vollständig zerstört wird. Durch den klonogenen bzw. reproduktiven Zelltod können sich die Zellen nicht weiter teilen, sind aber physiologisch intakt. Der reproduktive Zelltod benötigt geringere Bestrahlungsdosen als die Apoptose (Ross 1999; Steel 2001). Kimler und Kollegen (1985) konnten 1985 nachweisen, dass hämatopoetische Stammzellen hoch radiosensitiv sind und Bestrahlung zu einer verminderten Proliferation sowie zu einer erhöhten Apoptoserate führt (Bertho et al. 2004). Darüber hinaus ist die Fähigkeit von Stammzellen, Klone zu bilden, durch Bestrahlung über mehrere Jahre nach der Bestrahlung eingeschränkt (Galotto et al. 1999).

1.4 Fragestellung

Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren leiden nach der Bestrahlungstherapie häufig kurz und langfristig an Xerostomie. Eine therapeutische lokale oder systemische Applikation von MSCs wird bei diesem Patientenkollektiv diskutiert, da mMSCs die Fähigkeit zur Geweberegeneration und Wundheilung bei Inflammation und strahlenbedingter Schädigung besitzen. Unklar ist jedoch, wie diese Zellen auf Bestrahlung reagieren, wie sie sich im Vergleich zu unbestrahlten Zellen verändern und welche Bestrahlungsdauer und Intensität sie tolerieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst der Einfluss von ionisierender Strahlung bei humanen MSCs der Kopf-Hals-Region untersucht werden. Adulte mMSCs und pMSCs sollten bestrahlt und hinsichtlich Morphologie, Proliferationsverhalten, Vitalität und Migrationsfähigkeit im Gewebe miteinander verglichen werden. Die Ergebnisse können für die Forschung der patientenspezifischen und personalisierten Medizin Anhaltspunkte liefern, welche Art von Stammzellen für lokale Reparaturmechanismen benötigt werden, welche Bestrahlungsintensität sie tolerieren und zu welchem Zeitpunkt diese dem Patienten appliziert werden.

Eine Limitation der MSCs stellt die begrenzte Kultivierung und Replikation der Zellen *in vitro* dar, was die Frage nach einer geeigneten Zellalternative aufwirft.

Daher sollte als weiteres Ziel dieser Arbeit die Fähigkeit der Reprogrammierung von MSCs in iPS-Zellen untersucht werden. iPS-Zellen stellen als unlimitierte Stammzellquelle eine ideale Ausgangszellen für weitere Zelldifferenzierungen dar. Nach dieser Reprogrammierung sollte als weiteres Ziel dieser Arbeit die Differenzierung der iPS-Zellen in iP-MSCs gezeigt werden. Diese neu entstandenen humanen Zellen sind bisher noch nicht untersucht und sollen mit mMSCs hinsichtlich ihrer Morphologie und stammzellenspezifischen Charaktereigenschaften verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborausstattung

Tab. 1: Laborausstattung

Gerät	Name	Hersteller
Autoklav	Sterilizator SN30	Memmert, Schwabach
Bestrahlungsgerät	RS 225 X-Ray Research System	Gulmay Medical Systems, Xstrahl Ltd, UK
Elektrophoresekammer	Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad, München
Eismaschine	Ziegra Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
ELISA-Reader	Power Wave 340	BioTek, USA
Färbeautomat	Tissie Tek Film	Sakura, Japan
Flow Cytometer	FACS Canto II	Becton Dickinson Bioscience, USA
Fluoreszenz Mikroskop	IX71	Olympus, Japan
Gefrierbehälter	Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific, USA
Gel Photoaufnahme	ChemiDoc XRS 170-8070	Bio-Rad, München
Inkubator	BBD6620	Heraeus Instruments, Hanau
Kleinschüttler	MS1 Minishaker	Laborgeräte München
Kühlschrank	4 °C Comfort/-20 °C Premium -80 °C VIP series	Liebherr, Schweiz Sanyo, Japan
Magnetrührer	KMO 2 basic	IKA, Staufen
Mikroskope	Axio Observer A1, Axio Observer Z1, Axiovert 40 C, Axiovert 25, LSM 710	Carl Zeiss, Göttingen
NanoDrop	2000C/2000c Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, USA
PCR cycler	Thermocycler 48	SensoQuest, Göttingen
pH-Messer	inoLab pH7110	WTW, Weilheim
Pipettierhelfer	Accu-jet pro	Brand, Wertheim
Pipetten	Reference/Research Plus	Eppendorf, Hamburg
RT-qPCR cycler	CFX96 Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, München
Sterile Arbeitsbank	MSC-Advantage series	Thermo Fisher Scientific, USA

Gerät	Name	Hersteller
Vortexer	Vortex-Genie2	VWR, USA
Waage	BP 121 S	Satorius, Göttingen
Wasseraufbereitungssystem	Milli-Q-Reference	Merck Millipore, Darmstadt
Wasserbad	Type 003-2702	Haake, Vreden
Zählkammer	Thoma	Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen
Zentrifugen	5810R/5415D/5415R	Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsgegenstände

Tab. 2: Verbrauchsgegenstände

Name	Typ	Bestellnummer und Hersteller
96-Well ELISA Platte	Nunc Maxi 'TS	44-2404; Thermo Fisher Scientific, USA
96-Well qPCR Platte		MLP9601; Bio-Rad, München
Chamber Slide System	1-Well/ 2-Well	154453/ 154461; Thermo-Fisher, USA
FACS-Röhrchen	5 ml	55.1579; Sarstedt, Nümbrecht
Falcon-Röhrchen	15 ml/ 50 ml	62.554.002/ 62.547.004, Sarstedt; Nümbrecht
Faltenfilter	589/2	Schleicher und Schuell, Großbritannien
Filterspitzen	10 µL/ 100 µL/ 1000 µL	S1120-3810/ S1120-1840/ S1122-1830; Starlab, Hamburg
Filtropur S	0,20 µm	831826001; Sarstedt, Nümbrecht
Glas-Objektträger	25 mm, rund	630-2122; Thermo-Scientific, USA
Kyro-Röhrchen	1 ml/ 2 ml	123263/ 122263; Greiner, Österreich
Objektträger	Mattrand	7695002, Labsolute, Renningen
Pipetten	5 ml/ 10 ml/ 25 ml	86.1253.001/ 86.1254.001/ 86.1685.001; Sarstedt, Nümbrecht
Pasteur-Pipetten		7691061; Geyer, Renningen
Spritze	20 ml	300296; Becton Dickinson, Spanien
Zellkulturflaschen	T25/ T75/ T175 Cell+, Bel. Kap.	83.3910.302/ 83.3911.302/ 83.3912.302; Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten	6-, 12-Well TC-Platte, Standard F: 6-, 12-Well TC-Platte	CC7682-7506/ CC7682-7512; CytoOne Starlab, Hamburg, 83.3920.300/ 83.3921300; Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	2-Posit. Blade 25	83.1830; Sarstedt, Nümbrecht
Zellsieb	100 µm	352360, Corning Inc., Life Sciences, USA
Zentrifugen-Röhrchen	0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg

2.1.3 Plasmide und Oligonukleotide

Tab. 3: Plasmide

Name	Addgene Nummer	Konzentration
pCXLE-hOCT3/4-shp53-F	27077	0,52 µg/µl
pCXLE-hSK	27078	0,53 µg/µl
pCXLE-hUL	27080	0,45 µg/µl

Tab. 4: Oligonukleotide für die Reverse-Transkriptase-PCR-Analyse

Name	Sequenz (5'-3')	Produkt [bp]	TA [°C]	Wiederholungen
<i>Actin</i>	For: CCT GGC ACC CAG CAC AAT Rev: GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT	154	60	40
<i>ADIPOQ</i>	For: AAC ATG CCC ATT CGC TTT ACC Rev: TAG GCA AAG TAG TAC AGC CCA	107	60	40
<i>AFP</i>	For: ACT CCA GTA AAC CCT GGT GTT G Rev: GAA ATC TGC AAT GAC AGC CTCA	255	60	33
<i>Aggreccan</i>	For: GTG CCT ATC AGG ACA AGG TCT Rev: GAT GCC TTT CAC CAC GAC TTC	167	60	40
<i>ALB</i>	For: CCT TTG GCA CAA TGA AGT GGG TAA CC Rev: CAG CAG TCA GCC ATT TCA CCA TAG	355	62	35
<i>CCR2</i>	For: GCC TTT TTC ACA TAG CTC TTG GC Rev: AGG AGT CCT TGT GTA GTC ACT TT	112	60	40
<i>CCR3</i>	For: ATA CAG GAG GCT CCG AAT TAT GA Rev: ATG CCC CCT GAC ATA GTG GAT	109	60	40
<i>CCR5</i>	For: ACC AAG CTA TGC AGG TGA CAG Rev: GCA GAA GCG TTT GGC AAT GT	137	60	40
<i>CCR6</i>	For: CTC CAG GCT ATT TGT ACC GAT TG Rev: CAC TGC CCA GAA TGG GAG AG	181	60	40
<i>CCR8</i>	For: TGC CTC CTG TTT GTA TTC AGT C Rev: CAC TTT GCA CAT TAC AGT CCC A	198	60	40
<i>Col1A1</i>	For: GAG GGC CAA GAC GAA GAC ATC Rev: CAG ATC ACG TCA TCG CAC AAC	140	60	40
<i>Col2A1</i>	For: TGG ACG CCA TGA AGG TTT TCT Rev: TGG GAG CCA GAT TGT CAT CTC	183	60	40
<i>̢TNT</i>	For: GAC AGA GCG GAA AAG TGG GA Rev: TGA AGG AGG CCA GGC TCT AT	305	56	35
<i>CXCR1</i>	For: GCA GCT CCT ACT GTT GGA CAC A Rev: CAT GTC CTC TTC AGT TTC AGC AA	75	60	40
<i>CXCR3</i>	For: ACC CAG CAG CCA GAG CAC Rev: CAT AGG AAG AGC TGA AGT TCT CCA G	109	60	40
<i>CXCR4</i>	For: TAC ACC GAG GAA ATG GGC TCA Rev: AGA TGA TGG AGT AGA TGG TGG G	112	60	40
<i>FABP4</i>	For: ACT GGG CCA GGA ATT TGA CG Rev: CTC GTG GAA GTG ACG CCT T	183	60	40

Name	Sequenz (5'-3')	Produkt [bp]	TA [°C]	Wiederholungen
<i>FOXD3</i>	For: GTG AAG CCG CCT TAC TCG TAC Rev: CCG AAG CTC TGC ATC ATG AG	353	60	38
<i>GAPDH</i>	For: AGA GGC AGG GAT GAT GTT CT Rev: TCT GCT GAT GCC CCC ATG TT	258	60	30
<i>GDF3</i>	For: TTC GCT TTC TCC CAG ACC AAG GTT TC Rev: TAC ATC CAG CAG GTT GAA GTG AAC AGC ACC	331	54	30
<i>LIN 28</i>	For: AGT AAG CTG CAC ATG GAA GG Rev: ATT GTG GCT CAA TTC TGT GC	410	52	30
<i>LPL</i>	For: TCA TTC CCG GAG TAG CAG AGT Rev: GGC CAC AAG TTT TGG CAC C	125	60	40
<i>NANOG</i>	For: AGT CCC AAA GGC AAA CAA CCC ACT TC Rev: ATC TGC TGG AGG CTG AGG TAT TTC TGT CTC	164	64	36
<i>OCN</i>	For: GGC GCT ACC TGT ATC AAT GG Rev: GTG GTC AGC CAA CTC GTC A	110	60	40
<i>OCT4</i>	For: GAC AAC AAT GAA AAT CTT CAG GAG A Rev: TTC TGG CGC CGG TTA CAG AAC CA	113	54	34
<i>RUNX2</i>	For: CCG CCT CAG TGA TTT AGG GC Rev: GGG TCT GTA ATC TGA CTC TGT CC	132	60	40
<i>Sox9</i>	For: AGC GAA CGC ACA TCA AGA C Rev: CTG TAG GCG ATC TGT TGG GG	85	60	40
<i>SYN</i>	For: TGC AGA ACA AGT ACC GAG AG Rev: CTG TCT CCT TAA ACA CGA ACC	297	57	34
<i>TH</i>	For: GCG GTT CAT TGG GCG CAG G Rev: CAA ACA CCT TCA CAG CTC G	215	60	34

ADIOPQ: Adiponectin, **AFP:** alpha-1-fetoprotein, **ALB:** Albumin, **CCR2-8** und **CXR1-4:** Chemokin-Primer **Col1A1:** Kollagen Typ 1 alpha 1, **Col2A1:** Kollagen Typ 2, alpha 1, **cTNT:** cardiac troponin T, **FABP4:** fatty acid binding protein 4, **FOXD3:** forkhead box D3, **GAPDH:** Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, **GDF3:** Growth differentiation factor 3; **LIN28:** Cell lineage abnormal 28 **LPL:** Lipoprotein lipase, **OCN:** Osteocalcin, **OCT4:** Octamer binding transcription factor 4 **RUNX2:** Run related transcriptins factor 2, **SYN:** Synaptophysin, **TH:** Tyrosin Hydroxylase

2.1.4 Antikörper und Farbstoffe

Tab. 5: Primäre Antikörper der Immunfluoreszenz-Färbung

Antigen	Wirt	Verdünnung	Bestellnummer und Hersteller
α -SMA	Maus (IgG2A)	1:3000	A2547; Sigma, USA
AFP	Kaninchen	1:100	A0008; DAKO, USA
β -3-Tubulin	Maus (IgG2A)	1:2000	MMS-435P; Covance, USA

Antigen	Wirt	Verdünnung	Bestellnummer und Hersteller
LIN28	Ziege	1:300 (+0.1 % Triton-X)	AF3757, R&D, USA
OCT4	Ziege	1:40 (+0.1 % Triton-X)	AF1759, R&D, USA
NANOG	Ziege	1:200 (+0.1 % Triton-X)	AF1997; R&D, USA
SSEA4	Maus	1:200	ab16287, Abcam, Großbritannien
SOX2	Maus	1:50 (+0.1 % Triton-X)	MAB2018, R&D, USA
TRA-1-60	Maus (IgM)	1:200	ab16288; Abcam, Großbritannien

α -SMA: *alpha Smooth Muscle Actin*, *SSEA4*: *stage-specific embryonic antigen 4*

Tab. 6: Sekundäre Antikörper der Immunfluoreszenz-Färbung

Fluorophore & Antigen	Wirt	Verdünnung	Hersteller, Bestellnummer
Alexa Fluor 488-anti-mouse	Esel (IgG)	1:1000	A21202; Thermo Fisher Scientific, USA
Alexa Fluor 555-anti-goat	Esel (IgG)	1:1000	A21432, Thermo Fisher Scientific, USA
Alex Fluor 555-anti-rabbit	Esel (IgG)	1:1000	A-31572; Thermo Fisher Scientific, USA
Cy3-anti-mouse	Ziege (IgG+IgM)	1:300	115-165-068; Jackson ImmunoResearch, USA

Tab. 7: Antikörper und Farbstoffe für die Immunhistochemie

Antigen	Wirt	Klon	Verdünnung	Bestellnummer, Hersteller
Vimentin Flex monoclonal	Maus	V9	Autostainer	IR63061-2; DAKO, USA

Tab. 8: Antikörper und Farbstoffe der Durchflusszytometrie

Art	Clone	Bestellnummer	Firma	Verdünnung
Pacific Blue anti-human CD11b	ICRF44	301315	BioLegend, Großbritannien	0.2 mg/ml
PE anti-human CD34	561	343606	BioLegend, Großbritannien	25 µg/ml
FITC anti-human CD44	BJ18	338804	BioLegend, Großbritannien	200 µg/ml
Pacific Blue anti-human CD45	H130	304022	BioLegend, Großbritannien	0.5 mg/ml
APC anti-human CD73	AD2	344006	BioLegend, Großbritannien	100 µg/ml
FITC anti-human CD90 (Thy1)	5E10	328108	BioLegend, Großbritannien	200 µg/ml

Art	Clone	Bestellnummer	Firma	Verdünnung
APC anti-human CD105	43A3	323208	BioLegend, Großbritannien	100 µg/ml
APC Mouse IgG1, k isotype Ctrl (FC)	MOPC-21	400122	BioLegend, Großbritannien	200 µg/ml
Pacific Blue Mouse IgG1 k isotype Ctrl	MOPC-21	400131	BioLegend, Großbritannien	0,5 mg/ml
PE Mouse IgG2a, k isotype Ctrl	MOPC-173	400212	BioLegend, Großbritannien	0,2 mg/ml
FTTC Mouse IgG1, k isotype Ctrl	MOPC-21	40108	BioLegend, Großbritannien	2,5 mg/µl

2.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien, Reagenzien und Enzyme für molekulare und proteinbiologische Experimente sind in der Tabelle 9 aufgelistet.

Tab. 9: Molekular biologische Reagenzien

Name	Hersteller	Bestellnummer
ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) Diammoniumsalz)	Sigma-Aldrich, USA	11112597001
Aceton	Roth, Karlsruhe	9372.5
Agarose	Peqlab, USA	35-1020
Alcianblau 1 %ig in 3 % Essigsäure	Engelbrecht, Edermünde	12696.1000
Alizarinrot	Waldeck, Münster	1F-583
Annexin V Binding Puffer	BioLegend, Großbritannien	422201
APC Annexin V	BioLegend, Großbritannien	640920
Borsäure	Sigma-Aldrich, USA	15663
Chloroform	Merck, Darmstadt	1024451000
DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochlorid)	Sigma-Aldrich, USA	D9542
dNTP mix	Bioline, Großbritannien	BIO-39029
Ethanol	CVH Chemie Vertrieb Hannover, Hannover	200-578-6
Fluoromount-G	eBioscience, USA	00-4958-02
Formalin (37 %)	Merck Millipore, Darmstadt	1039991000
Formaldehydlösung 37 %	Roth, Karlsruhe	7398.1
GelRed Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, Hayward, USA,	41001
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, USA	0321
GoTaq G2 DNA-Polymerase	Promega, USA	M7845
6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, USA	R0611
Isopropanol	Merck Millipore, Darmstadt	109634
Kernechtrot 0,1 %	Engelbrecht, Edermünde	10264.0500

Name	Hersteller	Bestellnummer
Kristallviolett	Roth, Karlsruhe	T123.2
Magnesium-Chlorid	Sigma-Aldrich, USA	M8266
Midori Green Advance	Biozym, Hessisch Oldendorf	17004
M-MLV Reverse Transcriptase	Promega, USA	M3681
MuLV reverse transcriptase (50 U/ μ l)	Thermo Fisher Scientific, USA	N808-0018
Natrium-Acetat	Roth, Karlsruhe	X891.2
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe	P028.2
Natrium-Dihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe	T879.2
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe	8551.2
Nuklease freies Wasser	Thermo Fisher Scientific, USA	AM9932
Öl Rot O	Merck, Darmstadt	C.I.26125
Oligo d(T)16 (50 μ M)	Thermo Fisher Scientific, USA	N808-0128
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, USA	158127
Propidium Iodid (PI)	BioLegend, Großbritannien	421301
Random Primer	Thermo Fisher Scientific, USA	48190011
RNase inhibitor (20 U/ μ l)	Thermo Fisher Scientific, USA	N808-0119
Primer random	Invitrogen, USA	48190-011
Rection Puffer (10x)	Thermo Fisher Scientific, USA	B43
SyBR Green SMX 500	Bio-Rad, München	1725271
Tris	Roth, Karlsruhe	5429
Triton X-100	Sigma-Aldrich, USA	3051.3
Trizol	Thermo Fisher Scientific, USA	15596026
Trypanblau	Sigma-Aldrich, USA	T8154
Tween 20	Roth, Karlsruhe	9127.1
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe	8070.2
Xylol	Süsse Labortechnik, Gudensberg	11070.02500
β -Mercaptoethanol (β -ME)	Serva Electrophoresis, Heidelberg	28625

Tab. 10: Verwendete Kits

Name	Hersteller	Bestellnummer
Alkalische Phosphatase Färbe Kit	Sigma-Aldrich, USA	86R-1KT
Amaya Human MSC Nucleofector Kit	Lonza, Schweiz	VAPE-1001
Human IL-6 ELISA MAX Standard	BioLegend, Großbritannien	430502
Human IL-8 ELISA Max Standard	BioLegend, Großbritannien	431502
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Niederlande	12162
RNA-Isolation-System	Promega, USA	Z3105

2.1.6 Lösungen, Puffer für molekulare und proteinbiologische Experimente

Tab. 11: Bestandteile der molekularen und proteinbiologischen Experimente

Lösung	Bestandteile
ABTS	40mM:110 mg/5 ml H ₂ O
Alkalische Phosphatase Fixier-Lösung	Für 20 ml Endvolumen: 5,8 ml Citrat Puffer, 13 ml Aceton, 1,2 ml Formaldehyd vermischt
Alkalische Phosphatase Färbe-Lösung	Für 13 ml Endvolumen: 300 µL FRV, 300 µL Natrium Nitrat (für 1 Minute vermischen), 13 ml destilliertes Wasser, 300 µL Naphthol
Blockierlösung (ELISA)	PBS, 10 % FCS
Coating-Puffer (ELISA)	85 ml 0,2m Na ₂ CO ₃ , (2,12g/100 ml), 40 ml 0,2m NaHCO ₃ (1,68 g/100 ml); ad 500 ml mit H ₂ O ₂
DAPI	Stammlösung: 2 mg/ml, Arbeitsverdünnung: 1:50.000 in ddH ₂ O, gelagert bei 4 °C unter Schutz vor Licht
Nucleofektor Lösung	Nucleofector solution, 18 % Zusatz
PFA (4 % w/v)	4 % PFA in DPBS, gelagert bei -20 °C
Resolving gel Puffer	1.5 M Tris, pH 8.8
Substrat-Puffer (ELISA)	0,1m Na-Acetat, 0,05m NaH ₂ PO ₄ , (pH4,0), 5 % ABTS-Lösung, 0,1 % H ₂ O ₂
TBE Puffer (5x)	54 g Tris, 27.5 g Borsäure, 20 ml 0.5 M EDTA pH 8.0, Ad 1 l ddH ₂ O
0.1 % Triton-X/BSA	10 µL Triton-X 100 verdünnt in 10 ml 1 % BSA gelöst in DPBS, gelagert at 4 °C

2.1.7 Chemikalien, Lösungen und Medien für Zellkultur

Tab. 12: Bestandteile für die Zellkultur

Bestandteil	Hersteller	Bestellnummer
Accutase	Gibco, Karlsruhe,	A11105-01
Bovine Albumin Fraction V (BSA, 7.5 %)	Thermo Fisher Scientific, USA	15260037
Collagenase II	Worthington, USA	LS004177
Collagenase IV	Worthington, USA	CLS-4
Dispase II (neutral protease, grade II)	Roche Diagnostics, Mannheim	4942078001
DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium)/F-12	Thermo Fisher Scientific, USA	31331028
DMEM (1x) Dulbecco's Modified Eagle Medium, +4,5g/L D-Glucose, L-Glutamine, +Pyruvate	Gibco, Karlsruhe	41966029
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA	D-2650

Bestandteil	Hersteller	Bestellnummer
Essential 8 (E8) medium	Thermo Fisher Scientific, USA	A1517001
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, USA	F7524
Gelatin	Sigma-Aldrich, USA	48720
Geltrex	Thermo Fisher Scientific, USA	A1413301
Heparin (5000 U/mL)	Biochrom, Berlin	L 6510
Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM)	Thermo Fisher Scientific, USA	31980022
Knockout serum replacement	Thermo Fisher Scientific, USA	10828028
L-Ascorbinsäure 2-Phosphat	Sigma-Aldrich, USA	8960
L-glutamin (200 mM, 100x)	Thermo Fisher Scientific, USA	25030024
Mesenchymal Stem Cell Adipogenic Differentiation Medium 2	PromoCell, Heidelberg	C-28016
Mesenchymal Stem Cell Chondrogenic Differentiation Medium	PromoCell, Heidelberg	C-28012
Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2	PromoCell, Heidelberg	C-28009
Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium	PromoCell, Heidelberg	C-28013
Mitomycin C	Serva Electrophoresis, Heidelberg	29805.02
Monothioglycerol (MTG)	Sigma-Aldrich, USA	M6145-25ML
Non-essential amino acids (NEAA, 100x)	Thermo Fisher Scientific, USA	11140035
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ w/o Mg ²⁺ low endotoxin, PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Biochrom GmbH, Berlin	L 1820
Penicillin-Streptomycin (P/S)	Thermo Fisher Scientific, USA	15140122
PL Solution, Cell Culture Supplement	PL BioScience GmbH, Aachen	PLS-100.01
Sodium Pyruvat	Gibco Invitrogen, Karlsruhe	11360-070
Thiazovivin (TZV)	Merck Millipore, Darmstadt	420220
Versene solution (0.48 mM EDTA)	Thermo Fisher Scientific, USA	15040066

Tab. 13: Puffer und Lösungen für Zellkultur

Substanz	Herstellung
100x β -ME	0.07 % β -ME gelöst in DPBS, steril filtriert, gelagert bei 4 °C
Collagenase IV	Stammlösung: 2000 U/ml, Arbeitslösung: 200 U/ml Gelöst in DMEM/F12, steril filtriert, gelagert bei -20 °C
Gelatine (0.1 %)	1 g Gelatine, gelöst in 1 l ddH ₂ O, autoklaviert, gelagert bei 4 °C
Geltrex	2 mg Geltrex pro 15 ml Falcon-Röhrchen, gelagert bei -20 °C
MTG	Stammlösung: 150 mM 13 μ L MTG gelöst in 1 ml IMDM, steril filtriert, frisch zubereitet
TZV (2 mM)	10 mg TZV gelöst in 6.8 ml DMSO, gelagert bei -20 °C

Tab. 14: Medien für Zellkultur

Medium	Zusammensetzung
E8 medium	500 ml E8 basal medium, 1x E8 Zusatz
E8 Einfriermedium	E8 medium, 20 % DMSO, 4 µM TZV
FL-medium	DMEM, 15 % Hitze-inaktiviertes FCS, 1x L-Glutamine
Iscove medium	IMDM, GlutaMAX, 20 % Hitze-inaktiviertes FCS, 1x NEAA, 450 µM MTG (frisch hinzugefügt)
MSCs Einfriermedium	FCS, 10 % DMSO
MSCs adipogenes/ chondrogenes/ osteogenes Differenzierungsmedium	90 ml Stammlösung, 10 ml Zusatz
MSCs Bestrahlungsmedium	DMEM, 10 % FCS, 1 % Natrium-Pyruvat, 1 % Penicillin-Streptomycin
MSCs Growth Medium	DMEM, 5 % humanes Plättchenlysat, 1 % Natrium-Pyruvat, 1 % Penicillin-Streptomycin, 2U/mL Heparin

2.1.8 Software

Tab. 15: Programme für die Auswertungen

Name	Anwendung	Firma/Autor
AxioVision	Immunfluoreszenz-Bilder	Carl Zeiss
BD FACSDiva	Aufnahme der FACS-Analyse	Becton Dickinson
FlowJo	Analyse von FACS, Annexin Apoptose Assay	FlowJo, LLC
ImageJ	Bildbearbeitung	National Institutes of Health
Image Lab	Auswertung PCT	Bio-Rad
Gen5	ELISA	BioTek Instruments
Graphpad Prism 6	Statistische Auswertung und Design	Graphpad Software, Inc.
Zen	Konfokale Bilder	Carl Zeiss

2.1.9 Verwendete Zellen

Mesenchymale Stammzellen MSCs: mesenchymale Stammzellen aus der nasalen Mukosa der Nasenmuschel (mMSCs) mesenchymale Stammzellen aus der Parotis (pMSCs), isoliert aus Gewebe gesunder Patienten aus der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der UMG.¹

Induzierte pluripotente Stammzellen: (iPS-Zellen) Reprogrammierte mMSCs.

Induzierte pluripotente mesenchymale Stammzellen: (iP-MSCs): aus differenzierten iPS-Zellen.

¹ *In dieser Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Weibliche und anderweitige Geschlechteridentitäten werden dabei ausdrücklich mitgemeint, soweit es für die Aussage erforderlich ist.

Tab. 16: Übersicht der verwendeten Zellen

Zelltyp	Interne Bezeichnung	Spenderalter, Spendergeschlecht	Eigenschaft
mMSCs	mMSC1	57, männlich	Isoliert aus Gewebe gesunder Patienten bei einer elektiven Operation in der HNO-Klinik der UMG
	mMSC2	41, weiblich	
	mMSC3	21, männlich	
	mMSC5	39, weiblich	
	mMSC7	77, männlich	
pMSCs	pMSC1	67, weiblich	
	pMSC4	61, männlich	
	pMSC5	62, männlich	
	pMSC6	41, weiblich	
iPS-Zellen	iPS2		
	iPS3		
	iPS5		
	iPS7		
iP-MSCs	iP-MSC2		Differenziert aus den entsprechenden iPS-Zellen
	iP-MSC3		
	iP-MSC5		
	iP-MSC7		

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeines

Für die Durchführung der Versuche wurden adulte humane mesenchymale Stammzellen aus der nasalen Mukosa der Nasenschleimhaut (mMSCs) und aus der Parotis (pMSCs) verwendet. Die Zellen wurden nach etablierten Methoden über Plastikadhärenz isoliert, kultiviert und expandiert (Jakob et al. 2010). In dieser Arbeit wurden mMSCs aus gesundem humanen Gewebe im Rahmen einer Operation zur Verkleinerung der Nasenmuscheln bei Nasenatmungsbehinderung (Conchotomie) gewonnen. Das dabei anfallende Material (<1 g) würde ansonsten verworfen werden.

Gewebe (<1 cm³), welches bei der laterofazialen Parotidektomie bei Patienten mit einem gutartigen Tumor (wie beispielsweise pleomorphes Adenom oder Zystadenolymphom) anfiel, diente zur Gewinnung der pMSCs. Der gutartige Tumor wurde in der Operation mit Sicherheitsabstand entnommen und für die Isolation der Zellen wurde dieses gesunde Material verwendet. Dabei wurde kein zusätzliches Material entnommen. Die Proben stammen von Patienten, die in der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universitätsmedizin Göttingen behandelt wurden. Dabei handelte es sich um gesunde Patienten. Maligne Tumorerkrankungen waren ein Ausschlusskriterium. Die Patienten waren zwischen 19 und 67 Jahren alt. Das Durchschnittsalter betrug im Mittelwert 45,3 Jahre (Standardabweichung \pm 14,9), wobei das Material aus der nasalen Mukosa von Patienten

entstammte, welche mit 39,1 Jahren im Mittelwert (Standardabweichung $\pm 14,1$) jünger waren als die Patienten, deren Parotis zur Isolation von Stammzellen verwendet wurde (Mittelwert: 56,7 Jahre, Standardabweichung 8,4). Die Patienten wurden über die Studie aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einverständniserklärung ab. Für das Projekt liegt das positive Votum der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universitätsmedizin Göttingen vor. Die Projektnummer lautet 3/4/17.

Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5 % Kohlenstoff-Dioxid kultiviert. Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Konditionen in einer Umluft-Sterilbank durchgeführt. Für die Zellkultur wurden ausschließlich sterile und auf 37 °C erwärmte Lösungen und Materialien verwendet.

2.2.2 Herstellung des Kulturmediums der mesenchymalen Stammzellen

Für die Zellkultur und Vermehrung, im Folgenden -MSC growth Medium- genannt, wurde 93% DMEM, 5 % humanes Plättchenlysat, 1 % Natrium/Pyruvat, 1 % Penicillin/Streptomycin und 0,04 % Heparin verwendet. Für die bestrahlungsspezifische Zellkultur, im Folgenden -FCS Medium- genannt, wurde 88 % DMEM, 10 % inaktiviertes FCS, 1 % Natrium/Pyruvat, 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet. Das Medium wurde bei 4 °C gelagert und vor der Benutzung auf Raumtemperatur erwärmt.

2.2.3 Isolierung von mesenchymalen Stammzellen aus der nasalen Mukosa und Parotis

Die Isolierung von mesenchymalen Stammzellen aus der nasalen Mukosa (mMSCs) und aus der Parotis (pMSC) erfolgte aus Patientengewebe, welches bei einer Planoperation in der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universitätsmedizin Göttingen entnommen wurde. Der Operateur entnahm die Probe und lagerte das Gewebe in einem mit 0,9 % NaCl gefüllten Becher. Im Labor wurde das Gewebe mehrfach mit PBS (*Phosphate buffered saline*) gespült, um möglichst viele Erythrozyten zu entfernen und das Gewebe von Verschmutzungen zu reinigen. Zur Auflösung des Gewebekomplexes wurde sowohl Collagenase Typ 2 als auch Dispase 2 verwendet: 35,7 mg Collagenase Typ 2 wurden in 7 ml PBS und 167 mg Dispase 2 in 5 ml PBS aufgelöst und sterilfiltriert.

Mittels eines Skalpell wurde das Gewebestück in zwei bis drei mm große Stücke zerkleinert. Unter Zugabe von Collagenase Typ 2 und einem kleinen Magneten wurden die Gewebsfragmente unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer für 30 Minuten bei 37 °C gut vermischt und inkubiert. Im Folgenden wurden die Gewebsfragmente für sieben Minuten bei Raumtemperatur (RT) und 1200 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, Dispase 2 hinzugegeben und für 45 Minuten bei 37 °C unter

ständigem Rühren des Magnetrührers inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren bei RT und 1200 Umdrehungen pro Minute für sieben Minuten wurde der Überstand abgenommen und in 5 ml DMEM aufgenommen.

Die Zellen wurden durch ein 100 µm Zellsieb gefiltert und anschließend für fünf Minuten bei RT und 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen mit 1 ml -MSC growth Medium- aufgenommen und in eine mit 12 ml MSC growth medium befüllte T75-Zellkulturflasche überführt.

2.2.4 Kultivierung und Expandieren der Zellen

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen, in *chamber slides* und 6- und 12-Well Platten ausplattiert und bei 37 °C im Brutschrank mit 5 % CO₂ kultiviert.

Vor dem Mediumwechsel wurden die Zellen unter dem Durchlichtmikroskop auf Kontaminationen, morphologische Veränderungen und Zelldichte inspiziert. Der Mediumwechsel erfolgte alle drei bis vier Tage. Folgende Volumina wurden verwendet: 1,5 ml pro 12-Well, 3 ml pro 6-Well/*chamber slide*, 5 ml pro T25-, 12 ml pro T75- und 18 ml pro T175-Zellkulturflasche.

Bei einer Konfluenz von 80 % bis 90 % wurden die Zellen passagiert. Das Medium wurde abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen, Accutase hinzugegeben und für zehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension aufgenommen, sieben Minuten bei RT und 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und das Zellpellet in 3 ml DMEM aufgenommen. 30 µL Zellsuspension wurden mit 30 µL Trypanblau verdünnt, in eine Neubauer Zählkammer überführt und unter einem Lichtmikroskop gezählt. Mittels Trypanblau wurden tote Zellen von lebenden Zellen differenziert. Die gezählte Zellzahl multipliziert mit 10.000 (Faktor der Zählkammer) multipliziert mit zwei (Verdünnungsfaktor) ergab die Zellzahl pro 1 ml.

Zum Einfrieren der Zellen wurden die gezählten Zellen für sieben Minuten bei RT und 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in MSC-Einfriermedium (90 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert. Pro Kyroröhrchen wurden 2,5-3,0 x 10⁶ Zellen überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Kyroröhrchen in einem 37 °C warmen Wasserbad angetaut und anschließend die Zellen in eine mit 12 ml MSC growth medium befüllte T75-Zellkulturflasche überführt. Nach zwei Stunden wurde das Medium gewechselt.

2.2.5 Reprogrammierung der mesenchymalen Stammzellen

Für die integrationsfreie episomale Reprogrammierung von mMSCs in iPS-Zellen wurde das Human MSC Nukleofector Kit von Lonza verwendet. Es wurden die mMSCs gesunder Spender verwendet (Tab. 16). Durch die Reprogrammierung änderte sich die Nomenklatur von isolierten mesenchymalen Stammzellen aus der Mukosa (mMSCs) zu induzierte pluripotente Stammzelle (iPS-Zelle). Mittels der Nukleofektion wird die Zellmembran durch einen elektrischen Impuls kurzfristig permeabilisiert, und die Plasmide (pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL) gelangen mit den Transkriptionsfaktoren OCT3/4, shp53, SOX2, KLF4, L-MYC und LIN28 in die Zielzellen (Okita et al. 2011). Es wurden mMSCs zwischen der dritten und fünften Passage verwendet.

Sieben Tage vor der Transfektion wurden 120.0000 mMSCs in eine T75-Zellkulturflasche ausplattiert und alle drei Tage ein Mediumwechsel vollzogen. Am siebten Tag wurden die Zellen mit Accutase abgelöst, gezählt und 500.000 Zellen bei 200 g für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 100 µL Nukleofector Solution aufgenommen. Anschließend wurde jeweils 1 µg hSK, hUL und OCT-Plasmid mit der Zellsuspension gemischt, blasenfrei in eine Amaxa-Küvette überführt und mit dem Programm U23 (höheres zelluläres Überleben) und C17 (höhere Effektivität) nukleofiziert. Die Zellen wurden in 500 µL MSC growth Medium mit TZV aufgenommen und in eine 6-Well-Platte ausplattiert. Das Medium wurde täglich gewechselt, nach sieben Tagen wurden die Zellen mit Hilfe von Accutase abgelöst und in den Verdünnungen, wie Tabelle 16 beschreibt, auf mit Geltrex beschichtete-6-Well-Platten ausplattiert:

Tab. 17: Übersicht der verschiedenen Verdünnungen

iPSC2		iPSC3		iPSC5		iPSC7	
C17	U23	C17	U23	C17	U23	C17	U23
1:4	1:2	1:4	1:4	1:4	1:1	1:4	1:1
1:8	1:2	1:8	1:8	1:6		1:6	
1:12		1:12	1:12	1:8		1:8	
1:16		1:16	1:16	1:10		1:10	
1:20		1:20	1:20	1:15		1:15	
1:30		1:30	1:30	1:20		1:20	

Nach diesem Umsetzen wurde anstelle des MSC growth medium das E8-Medium verwendet und täglich gewechselt. Nach ca. 28 Tagen konnten die ersten Kolonien erkannt werden. Diese wurden unter dem Mikroskop mit angespitzten Pasteurpipetten von dem Zellrasen

getrennt, aufgenommen und in eine mit Geltrex beschichtete, mit E8-Medium gefüllte 12-Well-Platte überführt.

2.2.6 Zellkultur der humanen iPS-Zellen

Die humanen iPS-Zellen wurden auf mit Geltrex beschichteten 6-Well-Platten in E8-Medium kultiviert. Bei einer Konfluenz von 85-90 % wurden die Zellen auf eine neue 6-Well-Platte umgesetzt. Dabei wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit Versene gewaschen und anschließend mit 1 ml Versene bei Raumtemperatur für drei bis fünf Minuten inkubiert. Versene wurde danach abgenommen und die Zellen in E8-Medium plus 1:1000 TZV abgespült und in der entsprechenden Verdünnung in ein neues Well ausplattiert.

Zum Einfrieren der iPS-Zellen wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst, mit E8 abgespült, im Verhältnis 1:1 mit E8-Einfriermedium vermischt und in ein 1 ml Kryo-Röhrchen gegeben. Über Nacht wurden die Zellen bei -80 °C in einer Einfrierbox gelagert, welches ein kontrolliertes Einfrieren von -1 °C pro Minute garantiert. Zum Auftauen der iPSCs wurde das Kryo-Röhrchen in einem 37 °C erwärmten Wasserbad aufgetaut, die Zellsuspension wurde in 10 ml kaltes E8-Medium überführt und bei RT für fünf Minuten bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in E8 plus 1:1000 TZV resuspendiert und auf einem mit Geltrex-beschichteten 6-Well ausgesät.

2.2.7 Differenzierung von iPS-Zellen zu iP-MSCs

Nachdem die iPS-Zellen bis zu einer Konfluenz von rund 80 % gewachsen waren, wurde das Medium mit Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2 (C-28009, PromoCell, Heidelberg) ausgetauscht, welches anschließend alle zwei bis drei Tage gewechselt wurde. An Tag 7 und 14 wurden die Zellen auf Gelatine beschichtete 6-Well-Platten in einer Verdünnung von 1:2 passagiert. An Tag 7 wurde zum Umsetzen Versene und an Tag 14 sowie allen folgenden Passagen Accutase verwendet.

Ab Tag 14 wurden die Zellen bei einer 90 %igen Konfluenz und mit höheren Verdünnungen (1:2-1:4) passagiert. Ab ca. Tag 25 konnten die iP-MSCs in TC-Flaschen (T25/T75) umgesetzt werden.

2.2.8 Adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung der MSCs

Bei allen Differenzierungsversuchen wurde eine negative Kontrollzellpopulation mitgeführt, die in normalem Medium (MSC growth medium) inkubiert wurde.

2.2.8.1 Adipogene Differenzierung

50.000 Zellen wurden im 6-Well und *chamber slide* ausplattiert. Nachdem die Zellen zwei Tage angewachsen waren, wurde das Medium durch adipogenes Differenzierungsmedium ausgetauscht und für zwei Wochen inkubiert. Alle drei Tage wurde das Medium gewechselt. Die Differenzierung wurde mittels Öl-Rot-O-Färbung und in der PCR-Analyse nachgewiesen.

2.2.8.2 Osteogene Differenzierung

50.000 Zellen wurden im 6-Well und *chamber slide* ausplattiert. Nach zwei Tagen wurde das Medium durch osteogenes Differenzierungsmedium ausgetauscht und für zwei Wochen alle drei Tage ausgetauscht. Die Differenzierung wurde mittels Alizarinrot-Färbung und in der PCR-Analyse nachgewiesen.

2.2.8.3 Chondrogene Differenzierung

250.000 Zellen wurden in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen überführt, für sieben Minuten bei RT und 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und anschließend mit aufgelegtem Deckel im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert. Nach zwei Tagen wurde das Standardmedium durch chondrogenes Differenzierungsmedium ausgetauscht und dieses alle drei Tage gewechselt. Nach drei Wochen wurde die entstandene dreidimensionale Kugel mit PBS gewaschen und in 4 %igem PFA fixiert. Das Pellet wurde dann durch Mitarbeiter der Pathologie in einen Paraffinblock eingelegt, geschnitten, gefärbt und fotografiert.

2.2.9 Durchflusszytometrie-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorter)

Die Durchflusszytometrie stellt eine Methode dar, durch welche die Zellen aufgrund ihrer Größe, Granularität und Oberflächenstruktur charakterisiert werden. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können bestimmte Oberflächenantigene der mesenchymalen Stammzellen detektiert werden, die zum Nachweis der Zellart dienen. Der MFI-Wert (*Mean Fluorescence Intensity*) bzw. Delta-M-Wert ist ein geometrischer Mittelwert, der die Fluoreszenzintensivität der Isotype mit den gefärbten Antikörpern vergleicht. Je höher der MFI-Wert ist, desto stärker werden entsprechende Oberflächenproteine exprimiert. Entspricht der MFI der Isotyp-Kontrolle, so besitzen Isotyp und Antikörper eine ähnliche Fluoreszenzstärke, und die Zellen sind für dieses untersuchte Antigen negativ. Vor der Messung wurden die Zellen mit Antikörpern versehen, die spezifisch an die Rezeptoren binden. Dafür wurde eine Drei- und Vierfach-Färbung sowie die Isotypkontrolle durchgeführt. Zu 100 µL Zellsuspension, welche aus 1×10^5 - 1×10^6 Zellen bestand, wurden die Antikörper (Verdünnung 1:100) hinzugegeben, gevortext und bei RT für 20 Minuten im Dunklen inkubiert. Anschließend wurde die Probe gewaschen, d. h. mit 500 µL PBS + 2 % FCS versetzt, gevortext und bei RT sowie 1200 Umdrehungen pro Minute fünf Minuten

zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das gefärbte Zellpellet in 250 μL PBS + 2 % FCS resuspendiert und die Zellen mit Hilfe der BD FACSDiva Software am FACS Cantoll analysiert.

2.2.10 Proliferationsassay (Cell doubling)

Für die Untersuchung des Wachstumsverhaltens der Zellen wurden 60.000 frisch isolierte mMSCs und 80.000 pMSCs ab der ersten Passage in eine T25-Zellkulturflasche ausplattiert und bei einer Konfluenz von rund 80 % abgelöst, gezählt und erneut 60.000 bzw. 80.000 Zellen in eine neue T25-Zellkulturflasche eingesetzt. Dies wurde bis zur zwölften Passage wiederholt. Für die Berechnung wurde folgende Gleichung verwendet:

$$DT = \frac{CT}{CD} \quad DT = \frac{CT}{\frac{\ln\left(\frac{N_f}{N_i}\right)}{\ln(2)}}$$

DT = Cell doubling time, **CT** = Cell culture time, **CD** = Cell doubling number, **N_f** = Final number of cells, **N_i** = Initial number of cells

2.2.11 Färbungen

2.2.11.1 Öl-Rot-O-Färbung

Die Öl-Rot-O-Färbung dient zum Nachweis von Lipidvakuolen, die sich intensiv rot anfärben. Der Farbstoff wurde in 100 ml 60 %igem Propanol und 0,2 g Farbstoff angesetzt. Die Zellen wurden zunächst in einer mit PBS gefüllten Küvette gewaschen und dann zehn Minuten in einer feuchten Kammer in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert, anschließend erneut mit PBS gewaschen und dann 60 Minuten mit Öl-Rot-O gefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift mittels PBS erfolgte die Zellkernfärbung mit 500 μL Haematoxylin für vier Minuten. Daran anschließend wurden die Präparate in Leitungswasser gespült, in Fluormont eingedeckt, mikroskopiert und fotografiert.

2.2.11.2 Alizarinrot-Färbung

Mittels der Alizarinrot-S-Färbung werden Calciumphosphate nachgewiesen, die osteogen differenzierte Zellen exprimieren. Zur Herstellung des Farbstoffs wurden zwei g Alizarinrot-S in 100 ml destillierten Wasser unter ständigem Rühren gelöst. Vor Gebrauch der Farblösung wurde der pH mittels 10 % Ammoniumhydroxid in den Zielbereich von 4,1-4,3

eingestellt und gefiltert. Im ersten Schritt wurden die Zellen zehn Minuten in 4 %igen PFA fixiert, anschließend in destilliertem Wasser gespült und dann mit 500 µL Alizarinrot für zehn Minuten gefärbt. Daran anschließend wurden die Präparate in 100 % Aceton, in 1:1 Aceton/Xylen und in 100 % Xylen mehrmals kurz getaucht, eingedeckt, mikroskopiert und fotografiert.

2.2.11.3 Alcianblau-Färbung

Zellen, die chondrogen differenziert wurden, bilden Glykosaminoglykane, die sich durch die Alcianblau-Färbung anfärben lassen. Die Färbung wurde im Färbeautomat im Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt. Die einzelnen Schritte der Färbung sind dem Protokoll des Herstellers des Färbeautomaten zu entnehmen.

2.2.11.4 Immunhistochemische Färbung

In der Immunhistochemie werden molekulare Strukturen mit Hilfe von Antikörpern, die sich gegen die zu färbenden Zellen (Antigene) richten, sichtbar gemacht. Vimentin ist ein filamentäres Protein aus der Gruppe der Intermediärfilamente, welches zum Aufbau des Zytoskeletts dient. Die Färbung wurde im Färbeautomat im Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt. Die einzelnen Schritte der Färbung sind dem Protokoll des Herstellers des Färbeautomaten zu entnehmen.

2.2.12 Alkalische-Phosphatase-Färbung

Zum Nachweis der Pluripotenz der iPS-Linien pMSC2, pMSC3, pMSC5 und pMSC7 wurde die alkalische Phosphataseaktivität der Zellen überprüft. Für die Färbung wurde das alkalische Phosphatase Kit von Sigma verwendet. Das zu färbende Well wurde zweifach mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml pro Well alkalischer Phosphatase-Fixier-Lösung für 30 Sekunden inkubiert. Danach wurde die Lösung abgenommen, zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen, 1 ml alkalische Phosphatase-Färbelösung hinzugegeben und 20 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und nach dem Trocknen fotografiert.

2.2.13 Immunfluoreszenz-Färbung

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Analyse wurden die iPS-Linien Pluripotenz- und Differenzierungsmarker auf Proteinebene untersucht. Hierbei wurden die Zellen auf mit Geltrex beschichtete Deckgläschen ausplattiert, und bei 30-40 %iger Zelldichte mit PBS gewaschen und mit 4 %igem PFA für 20 Minuten bei RT fixiert. Hiernach wurden die Zellen drei-mal mit DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) gewaschen und mit 1 % BSA bei

4 °C geblockt. Das Deckgläschen mit den fixierten Zellen wurde dreimal mit DPBS gewaschen, mit dem primären Antikörper versetzt und in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Für die Analyse im Kern lokalisierter Marker wurde der Antikörper mit 0,1 % Triton-X-100 vermischt. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit DPBS gewaschen und der sekundäre Antikörper für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut dreimal mit DPBS gewaschen, worauf eine zehnminütige Inkubation bei RT mit DAPI (1:5.000) folgte. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit DPBS und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen, mittels Fluoromont G auf einem Objektträger ein gedeckelt und mit dem Carl Zeiss Axio Observer.Z1-Mikroskop fotografiert.

2.2.14 Spontane Differenzierung

Ein Charakteristikum von iPS-Zellen ist die spontane Differenzierung in die drei Keimblätter Mesoderm, Endoderm und Ectoderm. Für diesen Nachweis wurden die Zellen eines annähernd voll bewachsenen 6-wells mittels Versene abgelöst und auf eine mit abgestopptem feeder layer beschichtete 6-cm-Platte ausplattiert. Bei ausreichender Konfluenz wurden die Zellen mit 200 U/ml Collagenase Typ 4 behandelt, mit dem Zellschaber in Zell-Cluster aufgeteilt und für einen Tag in hESC-Medium kultiviert (Tag 0). Das Medium wurde auf Iscove medium plus MTG gewechselt und alle zwei Tage gewechselt. Während dieser Zeit bildeten die Zellen multizelluläre Komplexe, die auch Embryoid bodies (EB) genannt werden. An Tag 8 wurden die EBs auf mit Geltrex beschichtete 12-Well-Platten und auf mit Geltrex beschichtete Deckgläschen ausplattiert. Für Immunfluoreszenz-Färbungen wurden die Deckgläschen an Tag 8+5 (für AFP) sowie an Tag 8+25 für alpha SMA und beta-Tubulin fixiert. Für PCR-Analysen wurden Pellets an den Tagen 0, 8 und 8+25 genommen.

2.2.15 RNA-Isolation

2.2.15.1 RNA-Isolation mittels Promega Kit

Die RNA der iPS-Zellen für den Nachweis der Pluripotenz und der Differenzierungsverhalten wurde nach Angaben des Herstellers mit dem SV Total RNA Isolation System (Promega) isoliert. Dabei wurden alle Zentrifugationsschritte mit 12000g bei RT durchgeführt. Mittels des RNA-Lysierungspuffers, welcher β -Mercaptoethanol (200 μ L/10 ml) enthält, wurde das Zellpellet lysiert, in einem Verhältnis von 1:1 mit 95 %igem Ethanol gemischt, in das Spin Basket Assembly des Promega Kits übertragen und für eine Minute zentrifugiert. Anschließend wurden 600 μ L RNA-Waschlösung hinzugefügt und das Zellpellet erneut für eine Minute zentrifugiert. Im darauffolgenden Schritt erfolgte der Verdau genomischer DNA. Hierzu wurden 50 μ L DNase-Mix, bestehend aus

40 μL Yellow Core Puffer, 5 μL 0,09 M Mangandichlorid (MnCl_2), sowie 5 μL DNase I auf die Membran des Spin Baskets pipettiert und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurden 200 μL DNase-Stop-Lösung hinzugegeben und zentrifugiert. In zwei darauffolgenden Waschschrritten, mit jeweils 600 μL und 250 μL RNA-Waschlösung, wurde die RNA gereinigt. Um die Membran zu trocknen, wurde die Probe nach dem letzten Waschschrtritt für zwei Minuten zentrifugiert. Danach wurde die RNA in 40 μL Nuklease-freiem Wasser durch einminütiger Zentrifugation eluiert. Die RNA-Konzentration wurde bei 260 nm/ 280 nm mit einem Spektrophotometer gemessen und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.2.15.2 RNA-Isolation mittels Trizol

Für die RNA-Isolierung wurde das Pellet in 0,5 ml Trizol gelöst, für fünf Minuten inkubiert und anschließend wurden 0,1 ml Chloroform hinzugefügt. Nach 15minütigem Zentrifugieren bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ und 12000 g entstanden drei Phasen: Die untere rötliche Phenol-Chloroform-Phase, die mittlere Phase und die obere wässrige Phase, welche die RNA enthielt und in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt wurde.

Anschließend wurden 0,25 ml Isopropanol hinzugegeben, zehn Minuten inkubiert und für zehn Minuten bei 12000 g bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das RNA-Pellet in 0,5 ml 75 %igen Ethanol aufgenommen, gemischt und bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ sowie 7500 g für fünf Minuten zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur zehn Minuten luftgetrocknet. Danach wurde das Pellet in 20 μL RNase-freiem Wasser resuspendiert, die RNA-Konzentration mittels des Nanodrop bestimmt und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.2.16 Reverse Transkription

2.2.16.1 Reverse Transkription mit Promega-Kit

Die isolierte RNA wurde anschließend in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert. Die Tabelle 18 zeigt die einzelnen Bestandteile und Volumina des Ansatzes (Promega-Kit) für ein Gesamtvolumen von 20 μL .

Tab. 18: Zusammensetzung eines RT-PCR-Ansatzes

Komponenten einer 20 μ L RT-PCR-Reaktion	Volumen (Gesamtvolumen 20 μ L)
50 ng/ μ L RNA (d.h. 100 ng)	2 μ L
DEPC Wasser	8 μ L
10 x PCR Puffer II	2 μ L
25 mM MgCl ₂	4 μ L
100 mM dNTPs	1 μ L
RNAse Inhibitor (20 U/ μ l)	1 μ L
50 μ M Oligo (dT) ₁₆	1 μ L
MuLV reverse Transkriptase (50 U/ μ l)	1 μ L

Für die Herstellung der cDNA wurden die Temperaturen und Zeiten wie Tabelle 19 zeigt, eingestellt.

Tab. 19: Programm für cDNA-Synthese

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur (in °C)	22	42	95	4
Zeit (in Minuten)	10	50	10	∞

2.2.16.2 Reverse Transkription mit M-MLV-RT

Für den Nachweis der drei Differenzierungsrichtungen wurden 2000 ng der isolierten RNA in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert. Tabelle 20 zeigt die Komponenten für 35 μ l Reverse-Transkriptase-Lösung. Tabelle 21 zeigt den Programm-Ablauf:

Tab. 20: Komponenten für eine RT-PCR-Reaktion

Komponenten	Volumen (Gesamtvolumen 35 μ L)
10x reaction Puffer	6,5 μ L
100 mM dNTPs	6,5 μ L
Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (M-MLV RT)	1,3 μ L
Random Primer (10 μ M)	0,65 μ L
RNA und H ₂ O	17,55 μ L

Tab. 21: Programmablauf der RT-PCR

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur (in °C)	22	42	95	4
Zeit (in Minuten)	10	50	10	∞

2.2.17 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2 µl cDNA wurden zum Mastermix hinzugefügt, um ein Gesamtvolumen von 20 µl zu erhalten. Tabelle 22 zeigt die einzelnen Bestandteile des Mastermix. Dabei wurde das Promega-Kit verwendet.

Tab. 22: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes

Komponenten für die RT-PCR-Reaktion	Volumen (Gesamtvolumen 20 µl)
cDNA	2 µL
DEPC Wasser	14,3 µL
5x Green GoTaq® Reaktion Puffer	5 µL
10 mM dNTPs	1,6 µL
Vorwärtsprimer (10 µM)	1 µL
Rückwärtsprimer (10 µM)	1 µL
GoTaq® DNA Polymerase	0,1 µL

Tabelle 23 zeigt die Temperaturen und Zeiten der PCR.

Tab. 23: Programm für die PCR

Amplifikation	Temperatur (in °C)	Zeit
Initiale Denaturation	95	3 min
Denaturation	95	15 s
Annealing	52-65	15 s
Elongation I	72	30 s
Elongation II	72	10 min
Finale Temperatur	4	∞

Die Schritte Denaturation, Annealing und Elongation I wurden je nach Primer 28-37mal wiederholt.

2.2.18 Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden anschließend auf ein Gel aufgetragen und unter UV-Licht betrachtet. Hierfür wurde 1 g Agarose in 100 ml 1x TBE Puffer durch Erhitzen in der

Mikrowelle gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurde entsprechend der Kammergröße Midori-Green hinzugefügt und das Gel in die Kammer ausgegossen. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurden die Kämme entfernt und die PCR-Produkte aufgetragen. Die Produkte wurden bei 120 V für ca. 30 Minuten separiert. Ihre Länge wurde mittels Gene Ruler tm 100bp Plus DNA Ladder analysiert. Die Detektion der Banden erfolgte mithilfe des ChemiDoc XRS+ Systems (Biorad, CA, USA).

2.2.19 Quantitative PCR

Der Nachweis der Differenzierung wurde in der qPCR erbracht. Hierfür wurden der qPCR Master Mix (Tabelle 24) in die wells der 96-Well-qPCR-Platte vorgelegt und 1 µl (entsprechend 57 ng) cDNA hinzugefügt. Tabelle 25 zeigt den Programm-Ablauf, der 40-mal wiederholt wird. Daran anschließend folgte die Schmelzkurven-Analyse.

Tab. 24: Komponenten eines qPCR-Master-Mix

Bestandteile	Volumen (Endvolumen 19 µl)
2x SYBR Green	14 µL
RNase-freies Wasser	8 µL
Primer vorwärts (10 µM)	0,5 µL
Primer rückwärts (10 µM)	0,5 µL
57 ng cDNA	1 µL

Tab. 25: Programm für cDNA-Synthese

	Initiale Erhitzung	Denaturation	Annealing	Extension
Temperatur (in °C)	95	95	60	72
Zeit (in Sekunden)	60	15	15	15

2.2.20 ELISA

Zytokine in Überständen von bestrahlten MSC und unbestrahlten Kontroll-MSCs wurden mittels des ELISA Kits IL-6 und IL-8 (BioLegend) quantitativ analysiert, welches nach Angaben des Herstellers verwendet wurde. Die Platten wurden über Nacht bei 4 °C mit Capture-Antikörpern inkubiert. Nach dem Blockierungsschritt wurden die verdünnten Seren (für IL-6: mMSCs 1:50, pMSCs 1:200, für IL-8: mMSCs/ pMSCs 1:5) und der verdünnte Standard (2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml und Blindkontrolle) in Triplikaten auf die Platte aufgetragen und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS/ 0,05 % Tween 20 wurden die Platten mit dem 1:200 verdünnten Detektions-Antikörper für eine Stunde bei RT inkubiert.

Es folgte bei RT der 45-minütige Inkubationsschritt der 1:1000-verdünnten Avidin-HRP-Peroxidase. Zuletzt wurde die ABTS-Substratlösung hinzugegeben und die Substratumsetzung nach fünf Minuten im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch analysiert.

2.2.21 Bestrahlung der mesenchymalen Stammzellen

Für alle Bestrahlungsversuche wurde das Bestrahlungsgerät RS 225 X-Ray Research System (Gulmay Medical Systems, Xstrahl Ltd, Camberley, Surrey, UK) eingesetzt.

Dabei wurden die Zellen täglich mit einer Dosisleistung von 1 Gy/min für zwei Minuten (zwei Gray pro Tag) fraktioniert bestrahlt. Es wurde eine Spannung von 200 kV, eine Stromstärke von 15 mA und eine 0,5-mm-Kupfer-Filterung verwendet. Bei allen Versuchen wurden unbestrahlte Kontrollzellen mitgeführt. Tag 0 ist als Zeitpunkt definiert, an dem die Zellen ausplattiert wurden. Bei allen Versuchen, ausgenommen Morphologie und Colony forming unit, wurde an Tag 1 mit der fraktionierten Bestrahlung der Zellen mit der höchsten Bestrahlungsdosis begonnen. Diese Zellen wurden bis zum letzten Tag der Bestrahlungsdauer bestrahlt. Für alle Bestrahlungsversuche wurde das FCS Medium verwendet, welches alle drei Tage gewechselt wurde.

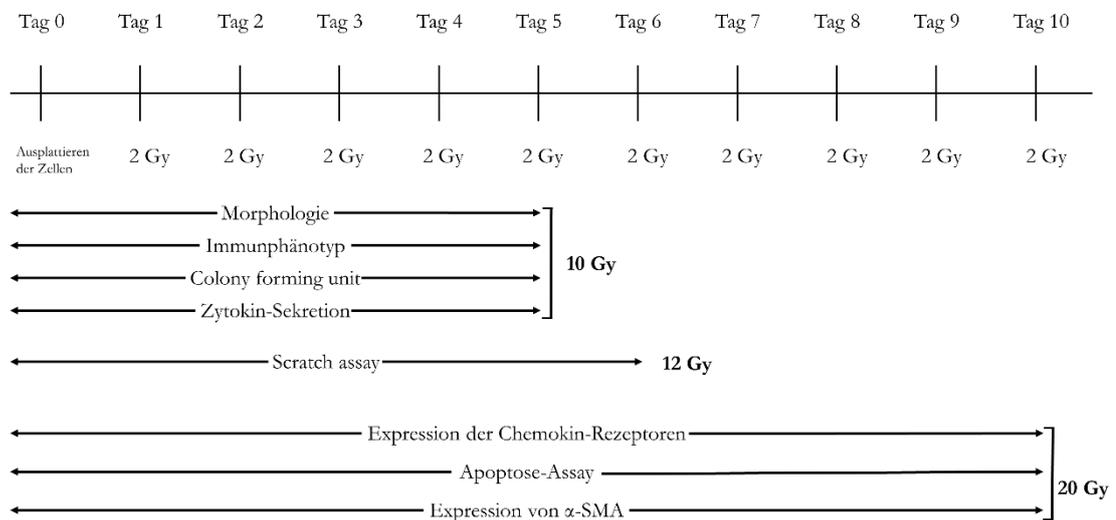


Abb. 4: Bestrahlungsschema der Assays. Einheitlich galt für alle Versuche das Ausplattieren an Tag 0 und das fraktionierte Bestrahlen von 2 Gy/Tag. Während die Versuche zur Morphologie, Immunphänotypisierung, Colony forming unit und Zytokin-Sekretion bis zu fünf Tage (10 Gy) dauerten, zog sich die Bestrahlung für das Scratch-Assay insgesamt sechs Tage (12 Gy) hin. Die Expression der Chemokin-Rezeptoren, das Apoptose-Assay und die Expression von α -SMA wurde nach maximal zehn Tagen (20 Gy) gemessen.

Differenzierung, Durchflusszytometrie-Analyse (FACS), Immunfluoreszenzfärbung alpha SMA, Chemokin-Nachweis

80.000 Zellen wurden im Dublett in T75-Zellkulturflaschen (für den Chemokin-Nachweis 20.000 Zellen im Dublett in 6-Well-Platte) ausplattiert. An Tag 1 begann die Bestrahlung für alle Zellen, die mit insgesamt 20 Gy bestrahlt wurden; ab Tag 6 wurden die Zellen mit einer Gesamtdosis von 10 Gy bestrahlt (siehe Abb. 4). Für den Differenzierungsnachweis wurden je Dosis 50.000 Zellen im Dublett in eine 6-Well-Platte ausplattiert und differenziert. Für die Antigenoberflächenanalyse mittels FACS wurden die abgelösten Zellen in PBS + 2 % FCS gewaschen und mit dem FACS-Gerät untersucht. Für die Immunfluoreszenzfärbung von alpha-SMA wurden 80.000 Zellen in eine 12-Well-Platte auf 12 mm-Deckgläschen ausplattiert, fixiert, gefärbt und fotografiert. Für den Chemokin-Nachweis wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber abgelöst, in 1 ml PBS in ein Eppendorf-Röhrchen aufgenommen, abzentrifugiert und bei -80 °C gelagert.

Apoptose Assay

50.000 Zellen wurden im Dublett in T75-Zellkulturflaschen ausplattiert. An Tag 1 begann die Bestrahlung für alle Zellen, die mit insgesamt 20 Gy bestrahlt wurden, ab Tag 3 wurden die Zellen mit einer Gesamtdosis von 16 Gy bestrahlt. Ab Tag 5 begann die Bestrahlung für alle Zellen, die mit insgesamt 12 Gy bestrahlt wurden, und ab Tag 7 befanden sich alle Zellen in Bestrahlung, die mit einer Gesamtdosis von 8 Gy bestrahlt wurden. Ab dem neunten Tag wurden die Zellen bestrahlt, die insgesamt einer Bestrahlung von 4 Gy erhielten (siehe Abb. 4). Nach der letzten Bestrahlung wurden die Zellen mit Accutase abgelöst und in PBS mit 2 % FCS zweimal gewaschen. Im Anschluss wurden vier FACS-Röhrchen (A: unbehandelt, B: nur Annexin, C: nur Propidiumiodid (PI), D: Annexin und PI) mit 500 µL Zellsuspension (2×10^6 Zellen) gefüllt. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, wurde in alle vier Röhrchen 100 µL binding Puffer hinzugegeben sowie zusätzlich in Röhrchen B 5 µL Annexin, in Röhrchen C 10 µL PI und in Röhrchen D 5 µL Annexin und 10 µL PI hinzugefügt. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT im Dunklen, wurde in alle vier Röhrchen jeweils 400 µL binding Puffer hinzugefügt und anschließend am FACS Cantoll analysiert.

Zytokine

60.000 Zellen wurden im Dublett in T75-Zellkulturflaschen ausplattiert. An Tag 1 begann die Bestrahlung für alle Zellen, die mit insgesamt 12 Gy bestrahlt wurden; ab Tag 3 wurden die Zellen mit einer Gesamtdosis von 8 Gy bestrahlt. Ab Tag 5 begann die Bestrahlung für

alle Zellen, die mit insgesamt 4 Gy bestrahlt wurden (siehe Abb. 4). Nach der letzten Bestrahlung wurden die Zellen abgelöst, gezählt und jeweils 500.000 Zellen je Dosis in eine 12-Well-Platte ausplattiert. Nach sechs Stunden wurde das Medium durch 1 ml neues Medium ersetzt und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Das Medium wurde in zwei Eppendorf-Röhrchen überführt, abzentrifugiert und bei -20 °C gelagert.

Scratch assay

80.000 Zellen wurden im Dublett in T75-Zellkulturflaschen ausplattiert. Die Zellen wurden fraktioniert bis zu einer Gesamtbestrahlungsdosis von 12 Gy bzw. 8 Gy und 4 Gy bestrahlt. Das bedeutet, dass an Tag 1 die Bestrahlung für alle Zellen begann, die mit insgesamt 12 Gy bestrahlt wurden. Ab Tag 3 wurden die Zellen mit einer Gesamtdosis von 8 Gy bestrahlt. Ab Tag 5 begann die Bestrahlung für alle Zellen, die mit insgesamt 4 Gy bestrahlt wurden (siehe Abb. 4). Nach der letzten Bestrahlung wurden die Zellen abgelöst, gezählt und je Dosis in eine 12-Well-Platte mit je 120.000 Zellen pro Well ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und mit einer sterilen Pipettenspitze wurde durch den konfluenten Zellrasen ein ca. ein mm breiter Defekt zugefügt und dann in einem live-image Mikroskop 24 Stunden alle acht Stunden fotografiert.

Koloniebildung

1000 mMSCs und 2000 pMSCs wurden an Tag 0 im Dublett in T25-Zellkulturflaschen ausplattiert. Am folgenden Tag wurden alle Zellen mit 2 Gy bestrahlt. An Tag zwei wurden die Zellen mit einer Gesamtstrahlendosis von vier, sechs, acht und 10 Gy bestrahlt; an Tag drei wurden die Zellen mit einer Gesamtstrahlendosis von sechs, acht und 10 Gy bestrahlt. An Tag vier wurden alle Zellen, mit einer Gesamtstrahlendosis von 8 und 10 Gy bestrahlt und an Tag fünf nur die Zellen mit einer Gesamtstrahlendosis von 10 Gy. Zehn Tage nach dem Ausplattieren wurden die Zellen mittels Kristallviolett-Färbung gefärbt. Dafür wurden die Zellen für 20 Minuten in 70 %igem Ethanol fixiert. Am Folgetag erfolgte die Färbung mit 5 ml Kristallviolett-Lösung für 20 Minuten. Für die Herstellung des Farbstoffes wurde 0,1 g Kristallviolett in 40 ml 95 % Ethanol gelöst und mit 160 ml destilliertem Wasser hinzugefügt. Zellansammlungen größer als 75 Zellen wurden als Kolonie definiert.

Morphologie

20.000 Zellen pro Well wurden im Dublett an Tag 0 in zwei 6-Well-Platten (Bestrahlungsplatte, unbestrahlte Kontrollplatte) ausplattiert. An den fünf Folgetagen wurde die Bestrahlungsplatte mit jeweils 2 Gy bestrahlt und sechs Stunden später fotografiert. So erreichten die Zellen nach fünf Tagen eine Gesamtdosis von 10 Gy und konnten morphologisch mit den unbestrahlten Kontrollzellen verglichen werden.

2.2.22 Statistische Analyse

Für die Berechnung der statistischen Signifikanzen wurde eine one-way-ANOVA mit Bonferroni-korrigierter multipler post-hoc-Analyse durchgeführt. Als signifikant wurden Unterschiede bei einem p-Wert kleiner als 0,01 definiert, dabei entspricht *p < 0,01, **p < 0,001; ***p < 0,0001; ****p < 0,00001.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung humaner mMSCs und pMSCs

3.1.1 Morphologie der MSCs

Die isolierten mMSCs besaßen ein fibroblastenartiges Aussehen mit einer spindelförmigen, bipolaren Zellmorphologie (Abb. 5). Die Zellen waren plastikadhärent. Sie verloren mit zunehmender Kultivierungsdauer ihre spindelförmige Gestalt und nahmen in der Größe zu. Wie Abbildung 5 B zeigt, präsentierten die pMSCs in ihrer Morphologie ein ähnliches Bild, jedoch war ihr Zellkörper etwas größer als die der mMSCs.

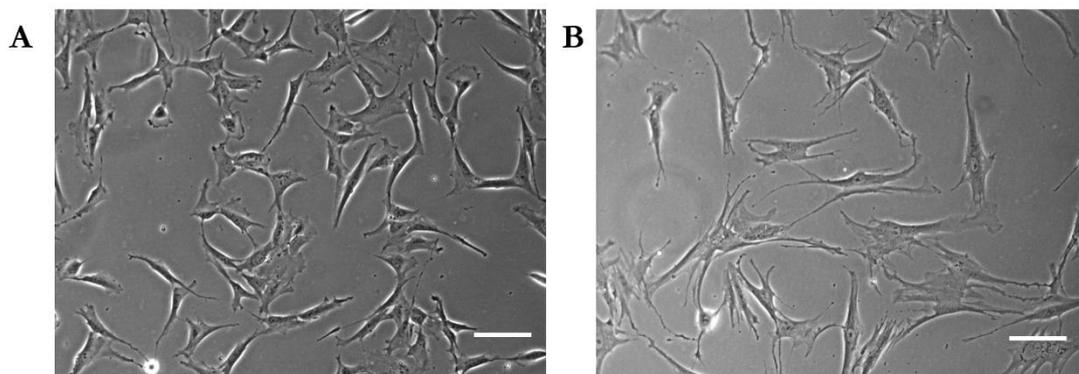


Abb. 5: Phasenkontrastaufnahme von mMSCs und pMSCs. Repräsentative Darstellung von mMSCs (A) und pMSCs (B) in vierter Passage. Skalierung: 100 μm .

3.1.2 Zellproliferation der mMSCs und pMSCs

Mit dem cell-doubling-Assay wurde die Zellproliferation und Zellverdopplungsrate der MSCs gemessen (Abb. 6). Wie zu erwarten, nahm mit zunehmender Kultivierungsdauer die Proliferationskapazität bei beiden Zellpopulationen ab. Für die mMSCs wurde beobachtet, dass bis einschließlich Passage 7 annähernd keine Veränderung der Zellteilungsrate zu beobachten war (Abb. 6 A). Die durchschnittliche Zellverdopplungszeit (DT) bis Passage sieben lag bei 1,2 mit einer Standardabweichung von $\pm 0,37$. Nach dem siebten Passagieren wurde festgestellt, dass die Zellen zunehmend langsamer wuchsen und sich die Zellverdopplungszeit bis Passage zehn annähernd verdreifachte. Über alle Passagen lag die durchschnittliche DT bei 1,61, bei einer Standardabweichung von $\pm 1,48$.

Die pMSCs zeigten im Vergleich zu den mMSCs ein leicht anderes Proliferationsverhalten, da die Zellen allgemein langsamer proliferierten (Abb. 6 B). Jedoch war auch hier deutlich zu erkennen, dass sich mit zunehmender Dauer in der Zellkultur die Proliferationsrate verlangsamt. In den ersten acht Passagen wurde annähernd keine Veränderung beobachtet

(Mittelwert bis einschließlich Passage acht: 2,75, Standardabweichung $\pm 1,97$). Ab dieser Passage verlangsamte sich das Zellwachstumsverhalten, sodass ein Mittelwert über alle zehn Passagen von 5,74 mit einer Standardabweichung von $\pm 11,47$ berechnet wurde. Für beide Zellarten fiel auf, dass die höhere Standardabweichung in späteren Passagen für eine größere Streuung der Messwerte zwischen den einzelnen Proben spricht.

Bei der vergleichenden Betrachtung der beiden Zellpopulationen bis Passage sieben zeigt sich, dass die pMSCs fast halb so langsam proliferierten wie die mMSCs und anschließend die Verdopplungsdauer beider Zellarten deutlich anstieg.

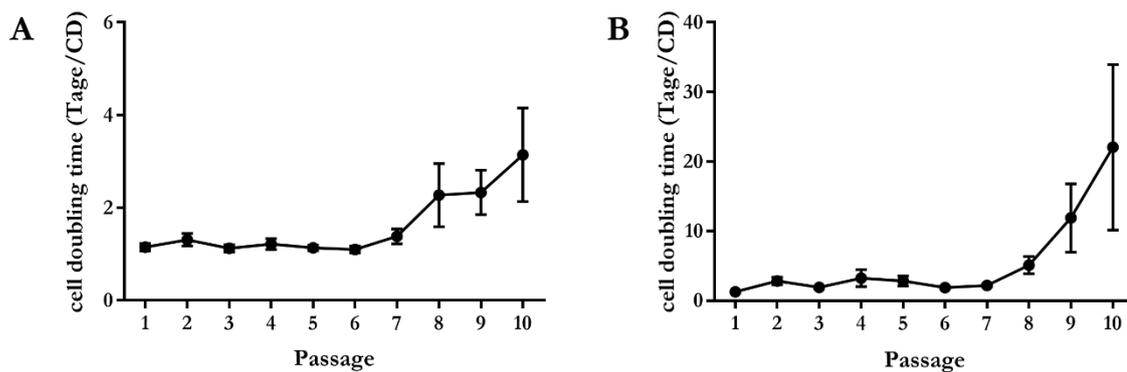


Abb. 6: Zellverdopplungszeit. **A:** mMSCs, **B:** pMSCs. Darstellung von mMSCs ($n = 4$) und pMSCs ($n = 3$). Dargestellt ist der Mittelwert mit \pm SEM.

3.1.3 Immunphänotypische Charakterisierung der MSCs

Für die weitere Charakterisierung der Zellen wurde eine Oberflächenantigen-Analyse (Flow-Analyse) durchgeführt. Dazu wurden mMSCs ($n = 4$) und pMSCs ($n = 4$) mit den oben dargestellten FACS-Antikörper-Panel untersucht (Abb. 7).

In der Darstellung als Histo-Blots wurde die Antikörperfluoreszenz und die Isotyp-Kontrolle einander gegenübergestellt. Wie in Abbildung 7 zu erkennen ist, waren alle untersuchten mMSCs und pMSCs positiv für CD44, CD73, CD90 und CD105 und negativ für CD11b, CD34 und CD45. Die isolierten MSCs wiesen das typische Oberflächenantigenprofil für adulte humane MSCs auf.

In der Betrachtung der Delta-M-Werte zeigte sich, dass für die mMSCs die Antigene CD44, CD73, CD90 und CD105 einen deutlichen medianen Anstieg der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Isotype aufwiesen (CD 44: $\Delta M = 21999$, CD73: $\Delta M = 35358$, CD90: $\Delta M = 30071$, CD105: $\Delta M = 1303$). Die drei Antigene CD11b, CD34 und CD45 zeigten eine nahezu identische Intensität mit der Isotype an und wurden somit weder quantitativ noch qualitativ exprimiert.

Wie zu erwarten, zeigte die Berechnung der Delta-M-Werte der pMSCs ähnliche Ergebnisse: CD44 ($\Delta M = 16367$), CD73 ($\Delta M = 11589$), CD90 ($\Delta M = 13247$) und CD105 ($\Delta M = 1515$) hatten ebenfalls einen deutlichen medianen Anstieg der Fluoreszenzintensität und waren als positiv zu werten. CD11b, CD34 besaßen einen Delta-M-Wert von 0, während für CD45 ein $\Delta M = 19$ berechnet wurde und somit als negativ zu werten war. Diese Antigene wurden quantitativ nicht exprimiert.

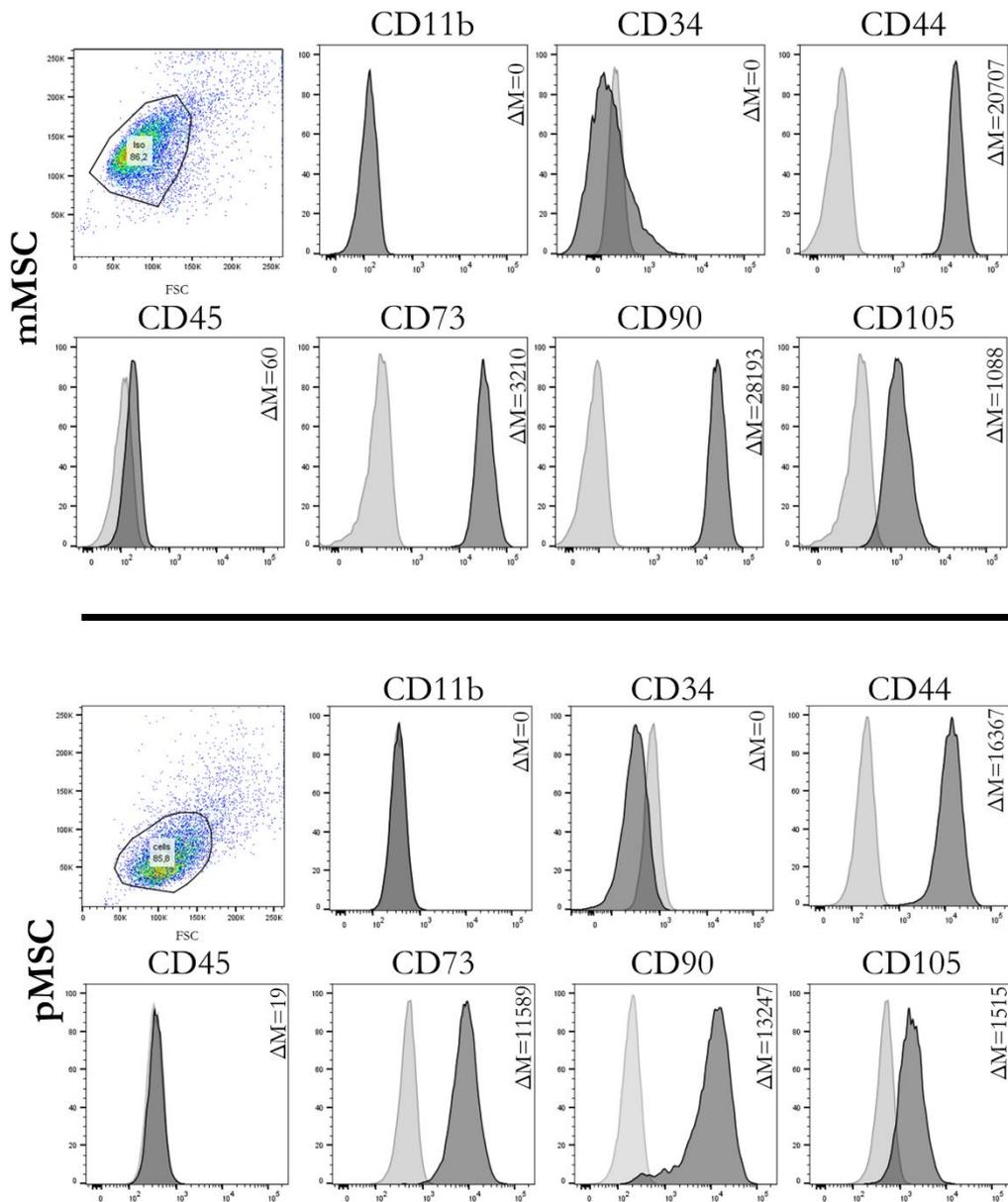


Abb. 7: Expression der Oberflächenmarker bei MSCs. Schwarz: Antikörperfluoreszenz, Grau: Isotyp-Kontrolle. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD11b, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90 und CD105 markiert. Zellen zwischen Passage drei und fünf. Es werden repräsentative Ergebnisse von einem aus vier unabhängigen Patienten ($n = 4$) pro Zellpopulation dargestellt.

3.1.4 Adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung der MSCs

Als drittes MSC-typisches Charakteristikum wurde die Differenzierbarkeit in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten untersucht. Für beide Zellpopulationen wurde sowohl qualitativ mittels histologischer Färbung als auch quantitativ mit Hilfe der qPCR die Differenzierung gezeigt.

Die adipogen-differenzierten Zellen, die für 14 Tage in Differenzierungsmedium kultiviert wurden, ließen sich mit der Öl-Rot-O-Färbung färben (Abb. 8). Die differenzierten mMSCs zeigten rundliche, karminrote Fettvakuolen, die sich radiär um den mattblauen Nukleolus der Zellen anordneten (Abb. 8 A). In der Differenzierung der pMSCs zu Adipozyten zeigten sich rote, runde und großflächige Fettvakuolen, welche die Morphologie dominierten (Abb. 8 C). Die bläulichen Nukleoli sind nur schwach zu erkennen. In der Negativkontrolle zeigten sich zudem einige spontan differenzierte Fettzellen; bei pMSCs waren mehr davon zu erkennen als bei mMSCs (Abb. 8 B und D).

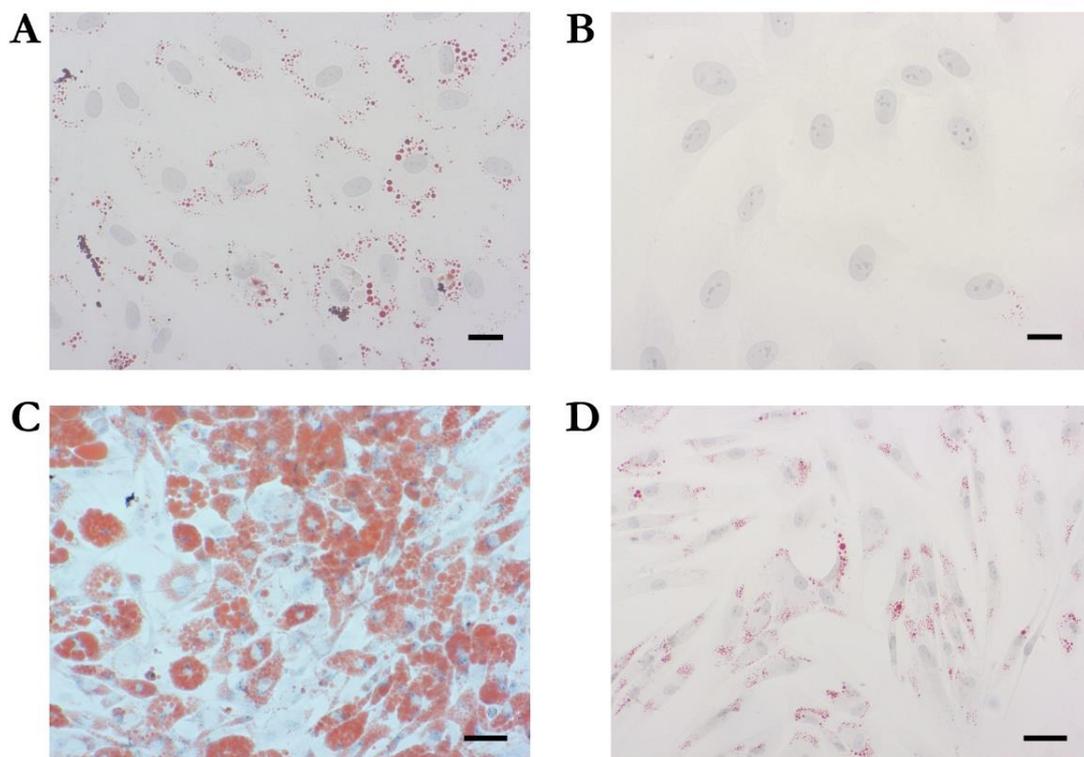


Abb. 8: Adipogene Differenzierung von mMSCs und pMSCs. Öl-Rot-O-Färbung; Phasenkontrastmikroskopie nach 14 Tagen Kultivierung **A:** adipogen differenzierte mMSCs, **B:** undifferenzierte mit einzeln spontan adipogen differenzierten mMSCs, **C:** adipogen differenzierte pMSCs, **D:** undifferenzierte mit einzeln spontan adipogen differenzierten pMSCs. Skalierung: 50 μ m.

Die Überprüfung der Differenzierung in Osteozyten wurde mit der Alizarinrot-Färbung nachgewiesen. Diese Zellen wurden ebenfalls für 14 Tage in Differenzierungsmedium inkubiert und anschließend gefärbt. Abbildung 9 zeigt Aufnahmen von Zellen eines Patienten, die repräsentativ für drei Patienten pro Zellpopulation stehen.

Die mMSCs und pMSCs zeigten in der osteogenen Differenzierung eine Anlagerung zu *bone nodules*. Die gebildeten Calciumphosphate bildeten mit dem Alizarinrot einen Chelatkomplex, der in der Hellfeldmikroskopie stark rot erkennbar wurde. Bei beiden Zellpopulationen sind osteogen kalzifizierte Bereiche anhand der Alizarinrot-Färbung erkennbar (Abb. 9 A und C). In der Negativkontrolle beider Zellpopulationen zeigte sich das gleiche fibroblastenartige Aussehen, wie es auch bei undifferenzierten Zellen zu beobachten war (Abb. 9 B und D).

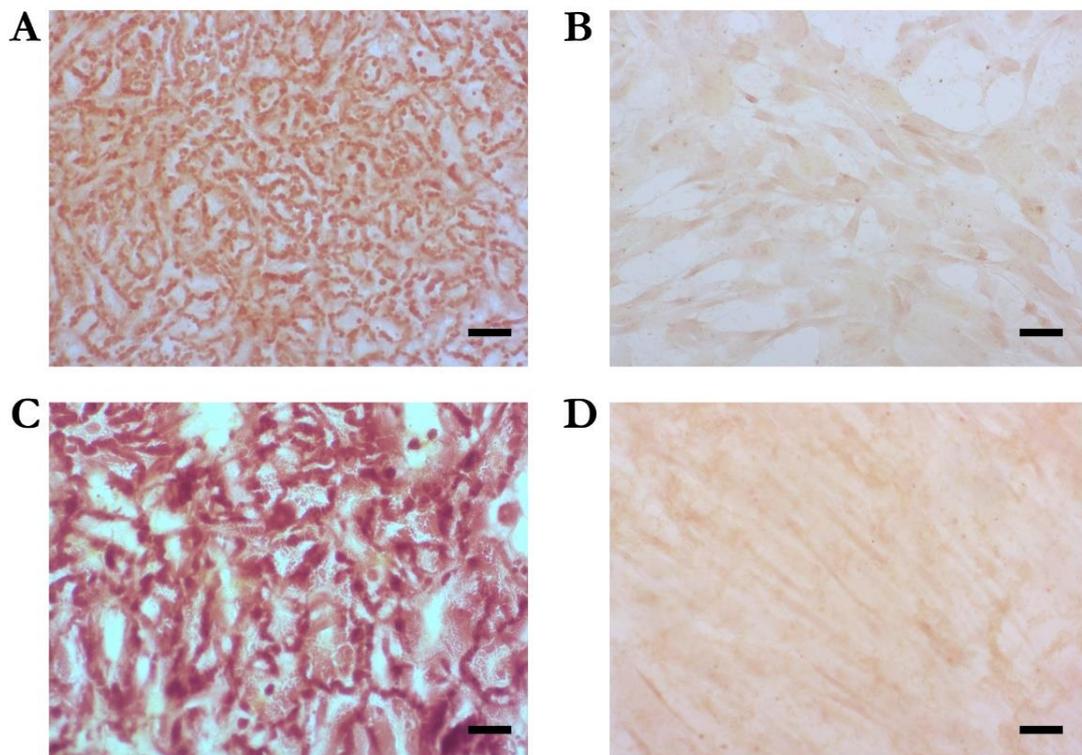


Abb. 9: Osteogene Differenzierung von mMSCs und pMSCs. Alizarinrot-Färbung; Phasenkontrastmikroskopie nach 14 Tagen Kultivierung **A:** osteogen differenzierte mMSCs, **B:** undifferenzierte mit einzeln spontan osteogen differenzierten mMSCs, **C:** osteogen differenzierte pMSCs, **D:** undifferenzierte mit einzeln spontan osteogen differenzierten pMSCs. Skalierung: 50 µm.

In Abbildung 10 ist die chondrogene Differenzierung in der Alcianblau-Färbung nachgewiesen. Die Alcianblau-Färbung färbt Strukturen der extrazellulären Matrix wie Glykosaminoglykane (Mukopolysaccharide) an. Das chondrogene Gewebe, welches sich besonders in den Randbereichen befand, färbte sich hellblau bzw. himmelblau an. Besonders die mMSCs zeigten nach der Differenzierung viel extrazelluläre Matrix, in der die typische Morphologie mit runden, kleinen Chondrozyten und Lakunen und nur wenigen Zellkernen erkennbar war (Abb. 10 A). Im Zentrum der Pellets befanden sich deutlich mehr Zellkerne. Im entstandenen Pellet der pMSCs war der periphere Zellverband loser und es waren im Vergleich zu den mMSCs weniger zentrale Zellen vorhanden (Abb. 10 C).

Das differenzierte Pellet war rundlich und regelmäßig, während die undifferenzierten Zellen makroskopisch kleiner und instabiler waren. Zudem besaßen die undifferenzierten Negativkontrollen eine ovale Pelletmorphologie (Abb. 10 B und D). Die typisch himmelblaue Färbung fehlte und die Zellstruktur war nicht so kompakt sowie deutlich fragiler als das differenzierte Sphäroid.

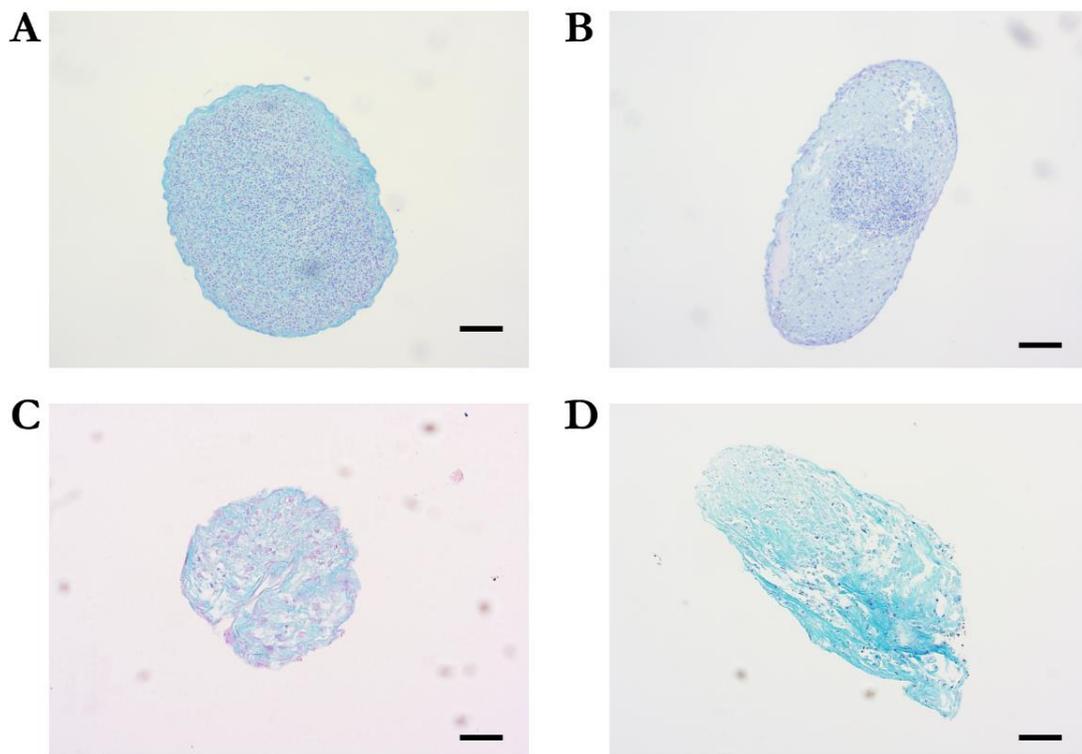


Abb. 10: Chondrogene Differenzierung von mMSCs und pMSCs. Alcianblau-Färbung, Phasenkontrastmikroskopie nach 21 Tagen Kultivierung **A:** chondrogen differenzierte mMSCs, **B:** undifferenzierte mit einzeln spontan chondrogen differenzierten mMSCs, **C:** chondrogen differenzierte pMSCs, **D:** undifferenzierte mit einzeln spontan chondrogen differenzierten pMSCs. Skalierung: 50 μ m.

In der vorliegenden Studie wurde mittels histochemischer Färbung der qualitative Nachweis der Differenzierung erbracht. Um den morphologischen Nachweis zu erhärten und die Differenzierung zu sichern, wurde eine qPCR durchgeführt (Abb. 11). Dazu wurde für die adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung jeweils ein Gen untersucht. Das *FABP4* (*Fatty acid binding protein 4*) als Marker für adipogene Differenzierung und das chondrogene Gen *Aggrecan* waren bei beiden Zellpopulationen zur negativen Kontrollzelle signifikant positiv. Die osteogene Differenzierung konnte in der PCR-Untersuchung mittels *Runx2* (*Run related transcriptins factor 2*) als Marker nicht bestätigt werden, wengleich das morphologische Bild darauf Hinweise gab.

Beim Vergleich der beiden Zellpopulationen war zu erkennen, dass mMSCs bei allen drei Differenzierungsversuchen besser differenzierten als pMSCs.

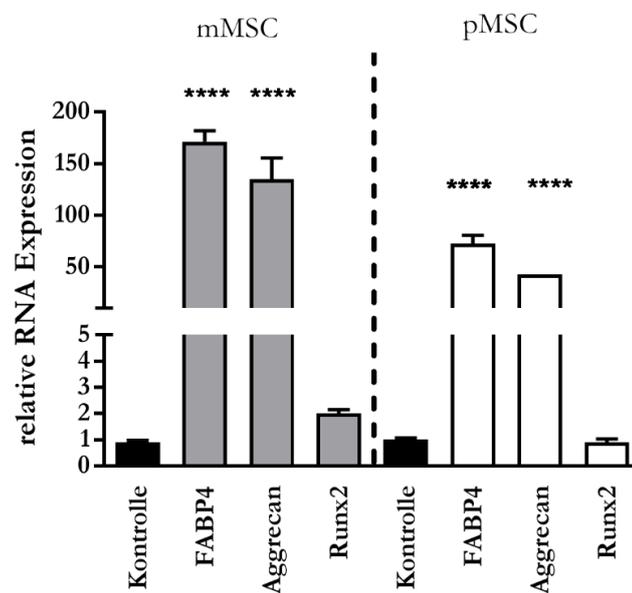


Abb. 11: qPCR-Analyse der adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierung. qPCR-Analyse von *FABP4*, *Aggrecan* und *Runx2*, von drei gepoolten Patienten. **** $p < 0,00001$, Mittelwert mit \pm SEM.

3.2 Charakterisierung iPS-Zellen

Die isolierten mesenchymalen Stammzellen aus der nasalen Mukosa wurden von vier Patienten mit nicht integrativen Plasmiden transfiziert (Okita et al. 2011). An Tag minus 2 (-2) wurden die MSCs ausplattiert, sodass an Tag 0 eine ausreichende Zellanzahl (Konfluenz ca. 80 %) vorhanden war (Abb. 12). An diesem Tag wurden die Zellen mittels Elektroporation mit den beschriebenen Plasmiden transfiziert. Die Morphologie begann sich zu ändern: Die Zellen wurden kleiner, hatten keine fibroblastigenartige Ausläufer und lagerten sich näher aneinander, sodass ein kontinuierlicher Zellrasen entstand. Auf diesem wuchsen runde Kolonien, welche mechanisch vom Zellrasen getrennt und anschließend in neuen Zellkulturschalen kultiviert wurden. Die iPSC-Zellen vermehrten sich als runde, scharf abgegrenzte und erhabene Kolonien. Nach weiteren vier bis sechs Wochen ließen sich pro Patient zwei unabhängige, pluripotente Zelllinien etablieren.

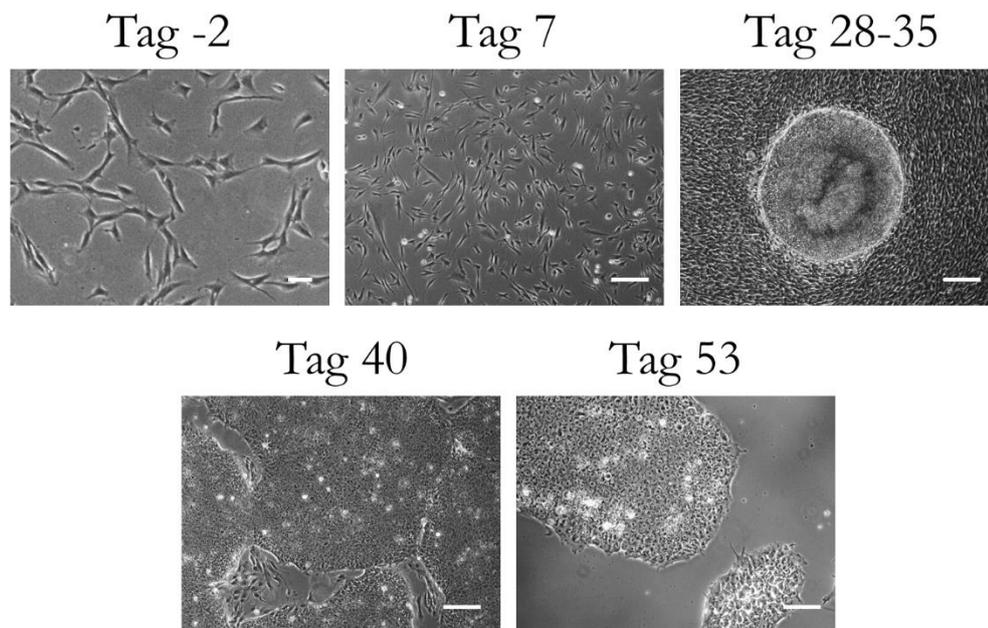


Abb. 12: Morphologische Darstellung des Ablaufs der Reprogrammierung. Die Übersicht zeigt von einem repräsentativen Spender in fünf Schritten den Verlauf der Reprogrammierung. Skalierung: 100 µm.

3.2.1 Nachweis der Pluripotenz

Die vier Zelllinien iPSC2, iPSC3, iPSC5, iPSC7 zeigten in der Morphologie eine runde bis ovale kompakte Zellkoloniestruktur mit einem gut erkennbaren hellen Randsaum (Abb. 13 A). Die Zellen wurden mittels alkalischer Phosphatase gefärbt und zeigten starke Aktivität der membranständigen alkalischen Phosphatase, welche ein allgemeiner Marker für Stammzellen darstellt (Abb. 13 B). Die Zellkolonien färbten sich regelmäßig an.

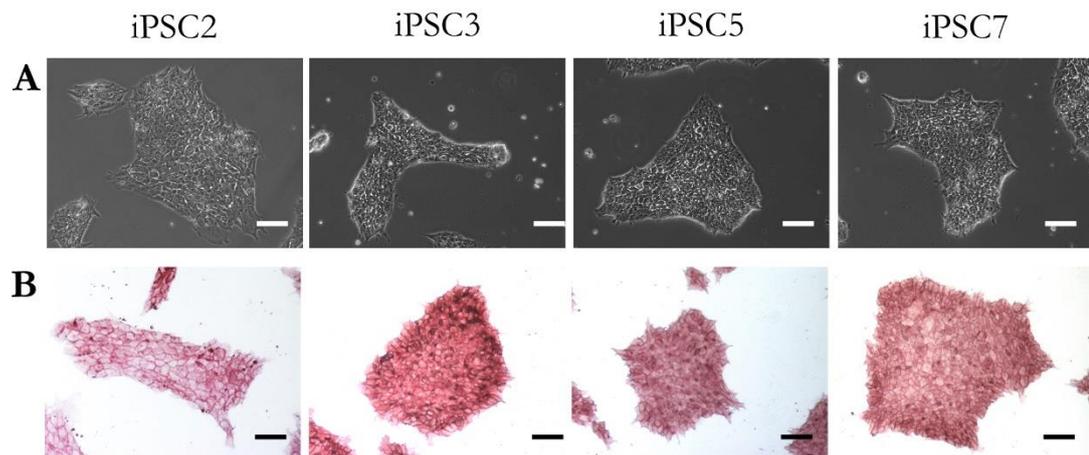


Abb. 13: Morphologie und alkalische Phosphatase-Aktivität der iPS-Zellen. Phasenkontrastaufnahme einer repräsentativen Zelllinie eines Patienten. Morphologie **A**: alkalischer Phosphatase, **B**: Skalierung: 100 μm .

Mithilfe der Immunfluoreszenz wurde die Expression der Stammzellmarker NANOG, OCT4, SOX2, TRA-1-60, SSEA4 und LIN28 auf Proteinebene nachgewiesen (Abb. 14). Alle vier Zelllinien wiesen bei den intranuklearen Markern NANOG, OCT4 und SOX2 starke positive Signale auf. SSEA4 und TRA-1-60, als Oberflächenmarker auf der Zellmembran, und der zytoplasmatische Marker LIN28 konnten ebenfalls in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Zur besseren Detektion wurde für SSEA4 ebenfalls die rein zytoplasmatische Färbung dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Es konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen iPS-Zelllinien in der Proteinexpression von Pluripotenzgenen erkannt werden.

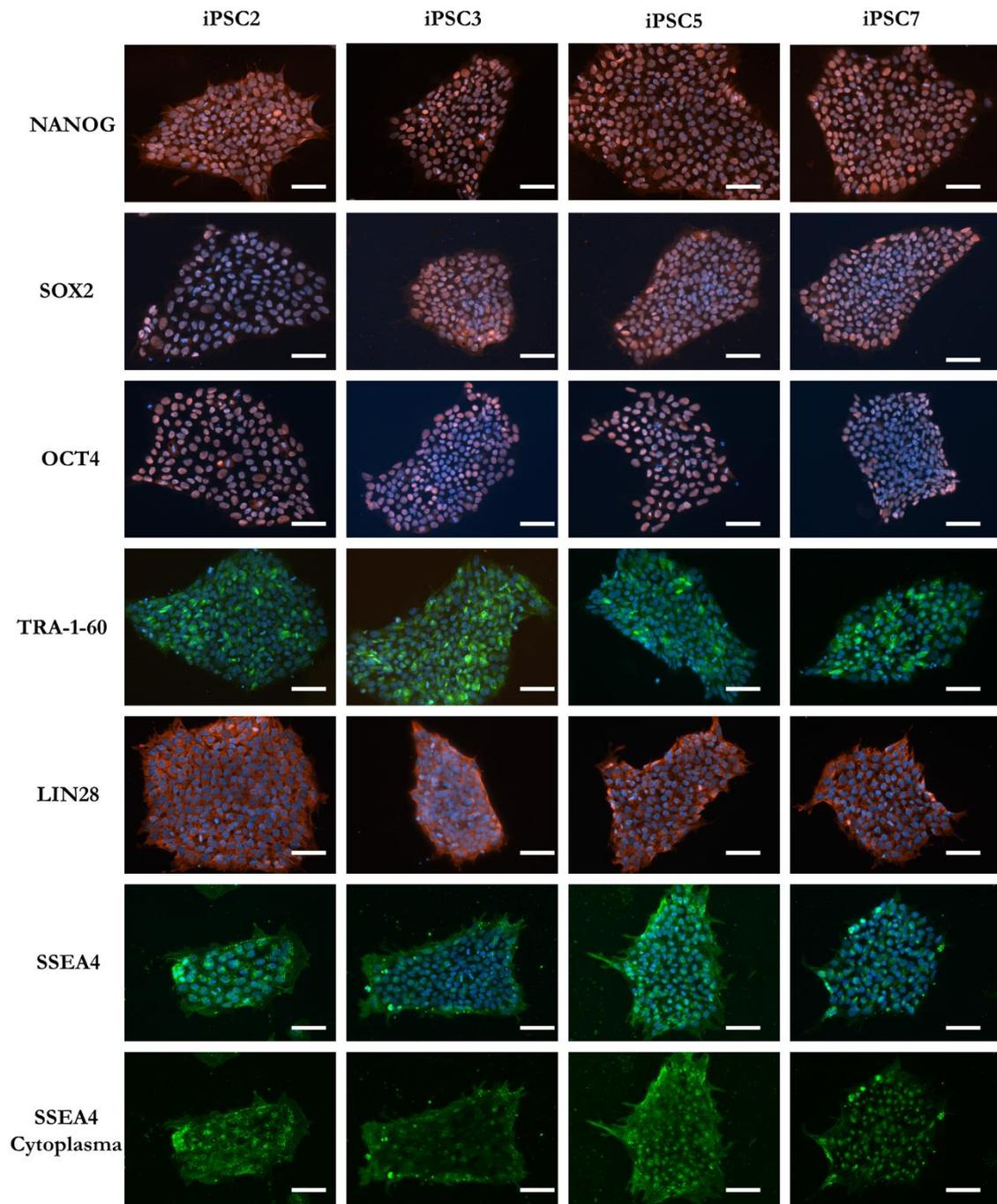


Abb. 14: Immunfluoreszenzfärbung der iPSC-Zellen. Färbung von NANOG, SOX2, OCT4, TRA-1-60, LIN28, SSEA4 und SSEA4 (Oberflächenfärbung); Zellkerne mit DAPI gefärbt. Skalierung: 100 μm .

3.2.2 Nachweis der spontanen Differenzierung in vitro

Das Differenzierungspotential in die drei Keimblätter der iPSC-Zellen wurde in vitro sowohl auf Proteinebene (Immunfluoreszenz-Färbung), als auch auf DNA-Ebene (reverse-Transkriptase-PCR) dargestellt. In Abbildung 15 sind die Immunfluoreszenz-Färbung dargestellt. An Tag 8 + 5 wurde AFP (α -Fetoprotein) als früher endodermaler Marker

untersucht. Es konnte eine erfolgreiche endodermale Differenzierung nachgewiesen werden. Die Expression von α -SMA (*a smooth muscle antigen*) bestätigte die mesodermale Differenzierung, während Beta-Tubulin mittels seiner Expression eine neuroektodermale Differenzierung nachweist. Für diese beiden Marker wurden Zellen an Tag 8 + 25 fixiert und gefärbt. Der Nachweis von α -SMA zeigte sich in der grün-gestreiften Zellstruktur von Kardiomyozyten. Bei der Färbung mit Beta-Tubulin wurden die differenzierten Neuronen und Zellfortsätze sichtbar.

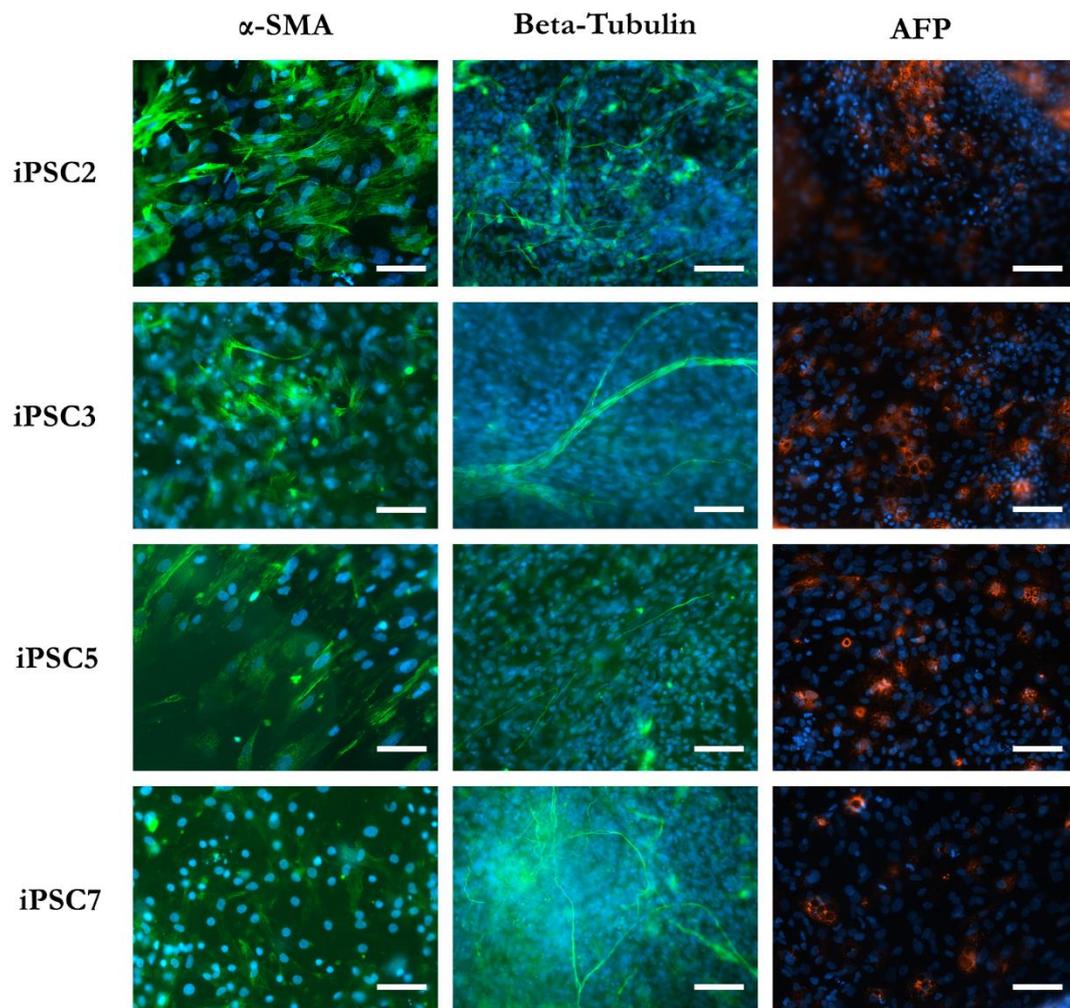


Abb. 15: Immunfluoreszenzfärbung der differenzierten iPSC-Zellen. Darstellung von AFP (α -Fetoprotein), α -SMA (*a smooth muscle antigen*) und Beta-Tubulin. Die Abbildungen sind repräsentativ für zwei Zelllinien. Alle Zellkerne sind mit DAPI gefärbt. Skalierung: 100 μ m.

Für die Untersuchung der Gen-Expression wurden Zell-Proben an Tag 0, 8 und 8+25 genommen und die mRNA isoliert. Bei allen Differenzierungsversuchen ließ sich eine erhöhte mRNA-Expression der Keimblätter-spezifischen Marker nachweisen, jedoch zeigten sich patientenspezifische Unterschiede (Abb.16). Allgemein war zu beobachten, dass das frühe endodermale Marker-Gen *AFP* bei allen Patienten an Tag 8 seine höchste

Expression hatte und zu Tag 8 + 25 abnahm. Das mesodermale Marker-Gen *cTNT* (kardiales Troponin T) ließ sich zu allen Zeitpunkten bei allen Patienten wiederfinden, jedoch war die Bande an Tag 8 und an Tag 8 + 25 stärker. *iPSC7* zeigte sowohl für *AFP* als auch *cTNT* eine schwächere Expression als die anderen Patienten. *TH* (Thyrosin-Hydroxylase), ein ektodermales Marker-Gen, wurde während der gesamten Zeit der Differenzierung exprimiert, aber auch hier ist die Expression an späteren Zeitpunkten stärker. *GAPDH* wurde bei jedem Patienten zu jedem Zeitpunkt exprimiert und diente als Housekeeping Gen. *MEF* (*Mouse embryonic fibroblasts*) wurden als Negativ-Kontrollzellen verwendet.

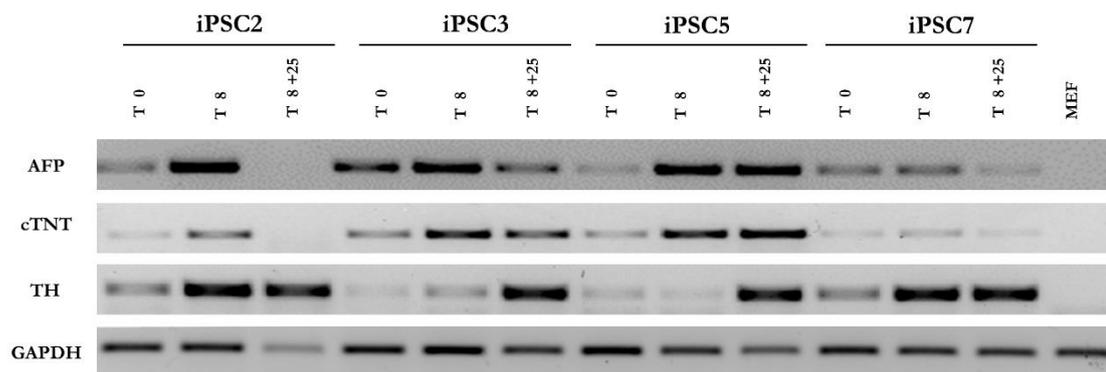


Abb. 16: Genexpression der differenzierten iPS-Zellen. Von allen vier Patienten wurde mRNA der spontan differenzierten Zellen an Tag 0, 8 und 8 + 25 genommen. Für jedes Keimblatt wurde ein Gen untersucht. *AFP*: alpha-Fetoprotein (endodermal), *cTNT*: kardinales Troponin T (mesodermal), *TH*: Thyrosin-Hydroxylase (ektodermal), *GAPDH*: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (housekeeping-Gen), *MEF*: (*Mouse embryonic fibroblasts*).

3.3 Charakterisierung der iP-MSCs

Die reprogrammierten iP-S-Zellen wurden durch Mediumwechsel und Expandieren zu iP-MSCs (aus induzierten pluripotenten Stammzellen entstandene mesenchymale Stammzellen) differenziert. In den ersten Tagen besaßen die Zellen noch die typische Koloniemorphologie der iP-S-Zellen. Da die Zellen erst nach sieben Tagen umgesetzt wurden, entstand ein konfluenter Zellrasen, bei dem keine eindeutige zelltypische Morphologie zu erkennen war. Erst nach dem Umsetzen der Zellen nach sieben bzw. vierzehn Tagen ließ sich eine spindelförmige, bipolare Zellmorphologie erkennen.

Um diese Zellen als MSC-ähnliche Zellen zu definieren, müssen sie die festgelegten Kriterien für MSCs aufweisen. Neben der entsprechenden Morphologie sowie der charakteristischen Oberflächenantigen-Expression muss zudem die Differenzierung in Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten nachgewiesen werden.

3.3.1 Morphologie der iP-MSCs

Die differenzierten iP-MSCs zeigten ein plastikadhärentes und fibroblastenartiges Aussehen, mit langen, spindelförmigen bipolaren Zellausläufern (Abb. 17). In ihrem Zellwachstum und ihrer Morphologie war die Ähnlichkeit zu den isolierten mMSCs und pMSCs zu erkennen.

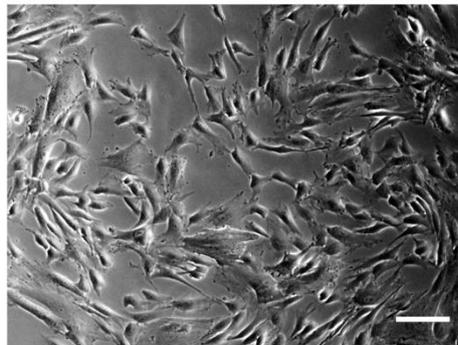


Abb. 17: Phasenkontrastaufnahme der iP-MSCs. iP-MSC5 in Passage 4. Skalierung: 100 μ m.

3.3.2 Immunphänotypische Charakterisierung der iP-MSCs

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden die Oberflächenmarker der Zellen betrachtet. Dabei wurde CD11b, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90 und CD105 untersucht. Die MSC-typischen Anforderungen wurden erfüllt. Wie Abbildung 18 zeigt, waren die positiven Marker CD44, CD73, CD 90 und CD105 wie auch die negativen Marker CD11b, CD34 und CD45 in der Darstellung als Histo-Blots gut analysierbar.

Bei der Berechnung der Delta-M-Werte ließ sich für CD44 ($\Delta M = 44054$), CD73 ($\Delta M = 15894$), CD90 ($\Delta M = 24548$) und CD105 ($\Delta M = 3971$) ein hoher medianer Anstieg der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Isotype aufweisen. Für CD11b, CD34 und CD45 lag der Delta-M-Wert für die Antigen-Marker bei null und waren somit als negativ zu werten.

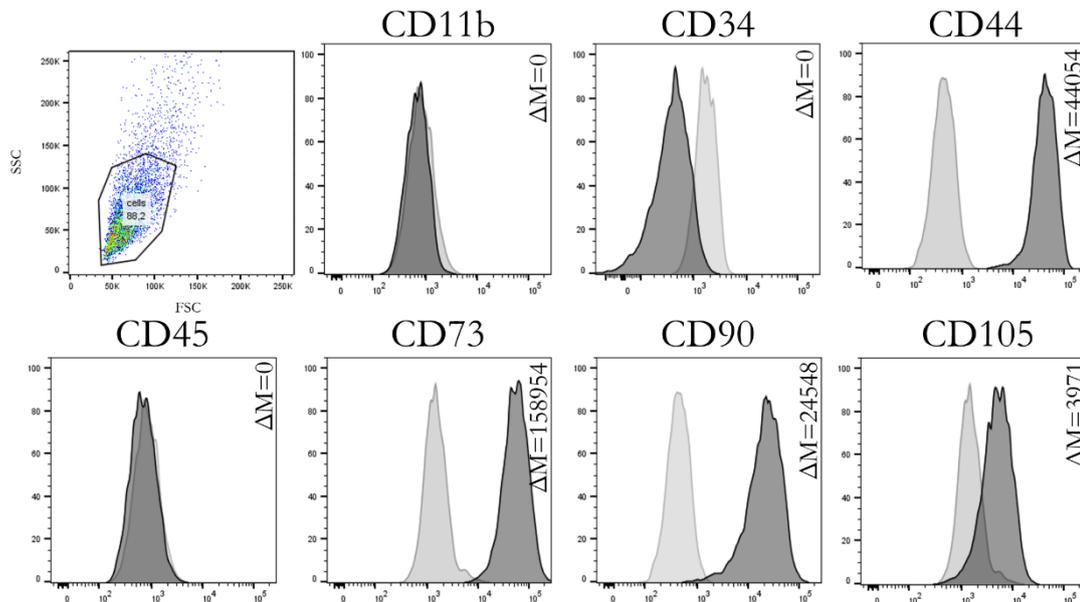


Abb. 18: Expression der Oberflächenmarker bei iP-MSCs. Darstellung der einzelnen Antigene als Histogramme. Schwarz: Antikörperfluoreszenz, Grau: Isotyp-Kontrolle. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD11b, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90 und CD105 markiert. Zellen in Passage 5. Es werden repräsentative Ergebnisse von einem aus vier unabhängigen Zelllinien ($n = 4$) pro Zellpopulation dargestellt.

3.3.3 Adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung der iP-MSCs

Für die vollständige Charakterisierung der iP-MSCs wurde die adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung überprüft. Dazu wurde neben der morphologischen Betrachtung auch die Differenzierung für gewebetypische Gene in der qPCR untersucht. Der Morphologie der adipogenen Differenzierung zeigte rundliche, rote Fettvakuolen in verschiedenen Größen (Abb. 19 A). Die Nukleoli färbten sich dunkel-blau. Die Zellen in der Negativkontrolle zeigten die MSC-typische Morphologie und ebenfalls kleine, spontan differenzierte Fettzellen (Abb. 19 B).

Die Differenzierung in Osteozyten konnte durch die Alizarinrot-S-Färbung nachgewiesen werden. Die durch die Differenzierung entstandenen Calciumphosphate wurden stark rot angefärbt (Abb. 19 C). Die undifferenzierten Negativkontrollen zeigten das typische fibroblastenartige Aussehen (Abb. 19 D).

Der Nachweis der Fähigkeit, dass sich iP-MSCs chondrogen differenzieren lassen, wurde in der dreidimensionalen Zellkultur erbracht. Die differenzierte Probe besaß eine regelmäßige, feste Struktur (Abb. 19 E). Die extrazelluläre Matrix mit den kleinen Chondrozyten in den Randbereichen des Sphäroids wurde dabei himmelblau/hellblau angefärbt. Im Zentrum war deutlich weniger EZM sehen. Die undifferenzierte Negativkontrolle zeigten nicht diese Struktur und das Zellpellet war deutlich weicher (Abb. 19 F).

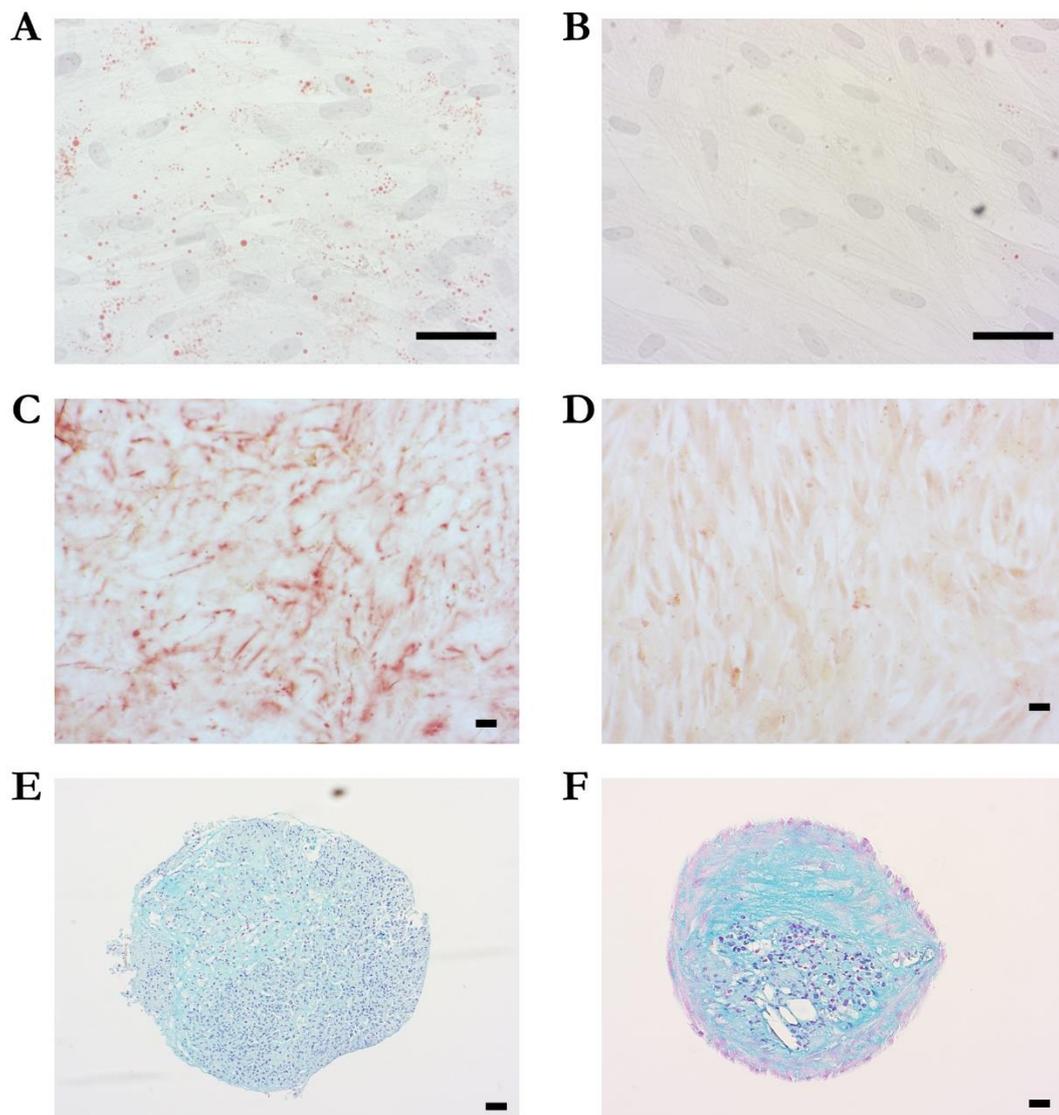


Abb. 19: Adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung von iP-MSCs.

Phasenkontrastmikroskopie nach 14 bzw. 21 Tagen Kultivierung **A**: adipogen differenzierte iP-MSCs, **B**: undifferenzierte mit einzeln spontan adipogenen differenzierten iP-MSCs (Öl-Rot-O-Färbung), **C**: osteogen differenzierte iP-MSCs, **D**: undifferenzierte mit einzeln spontan osteogen differenzierten iP-MSCs (Alizarinrot-Färbung), **E**: chondrogen differenzierte iP-MSCs, **F**: undifferenzierte mit einzeln spontan chondrogen differenzierten iP-MSCs (Alcianblau-Färbung). Skalierung: 100 μ m.

Neben dem histologischen Nachweis wurde ebenfalls die Differenzierbarkeit in der qPCR nachgewiesen (Abb. 20). Für das Fettgewebe wurde *FABP4*, für das Knochengewebe *Runx2* und für das Knorpelgewebe *Aggrecan* verwendet. *FABP4* und *Aggrecan* waren dabei relativ zur undifferenzierten Kontrollzelle signifikant exprimiert, während für *Runx2* eine sehr schwache Expression zu erkennen war (Mittelwert 1,5). Daher konnte die osteogene Differenzierung auf RNA-Ebene nicht gesichert werden.

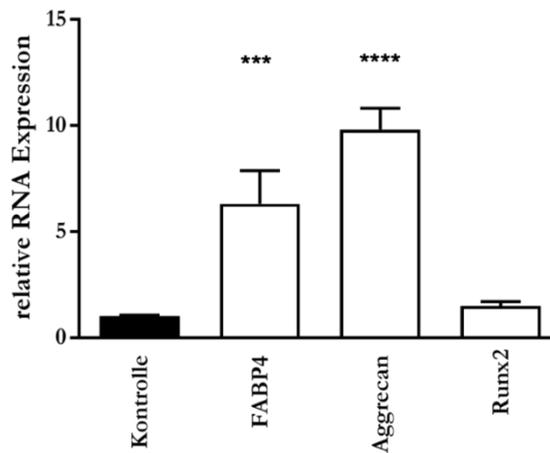


Abb. 20: qPCR-Analyse der adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierung. qPCR-Analyse der iP-MSCs von *FABP4*, *Aggrecan* und *Runx2*, von drei gepoolten Patienten. *** $p < 0,0001$; **** $p < 0,00001$, Mittelwert mit \pm SEM.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die differenzierten iP-MSCs aufgrund ihrer Morphologie, Oberflächenantigen-Expression und Differenzierbarkeit alle MSC-typischen Kriterien erfüllen.

3.4 Vergleich zwischen MSCs, iPS-Zellen und iP-MSCs

Die drei verschiedenen Stammzelltypen wurden mit Hilfe der Expression der Oberflächenantigene, der Expression der Pluripotenz-assoziierten Gene sowie verschiedener Färbungen (α -SMA, OCT4 und Vimentin) miteinander verglichen.

3.4.1 Vergleich der immunphänotypischen Charakterisierung

Die immunphänotypische Untersuchung der MSCs und der iP-MSCs wurde bereits in Kapitel 3.1.3 und 3.3.2 genauer beschrieben. Die Abbildung 21 zeigt vergleichend als Histo-Blots die Expression der Oberflächenantigene der MSCs, iPS-Zellen und iP-MSCs. Es war zu erkennen, dass bei der Betrachtung der Antigen-Profile keine qualitativen Unterschiede zwischen MSCs und iP-MSCs vorhanden waren. Für die iPS-Zellen waren die Antigene CD11b, CD34, CD44, CD45, CD73 und CD105 negativ, während CD90 positiv war. Somit lässt sich zusammenfassen, dass für alle drei Stammzelltypen CD11b, CD34 und CD45 negativ und CD90 positiv war.

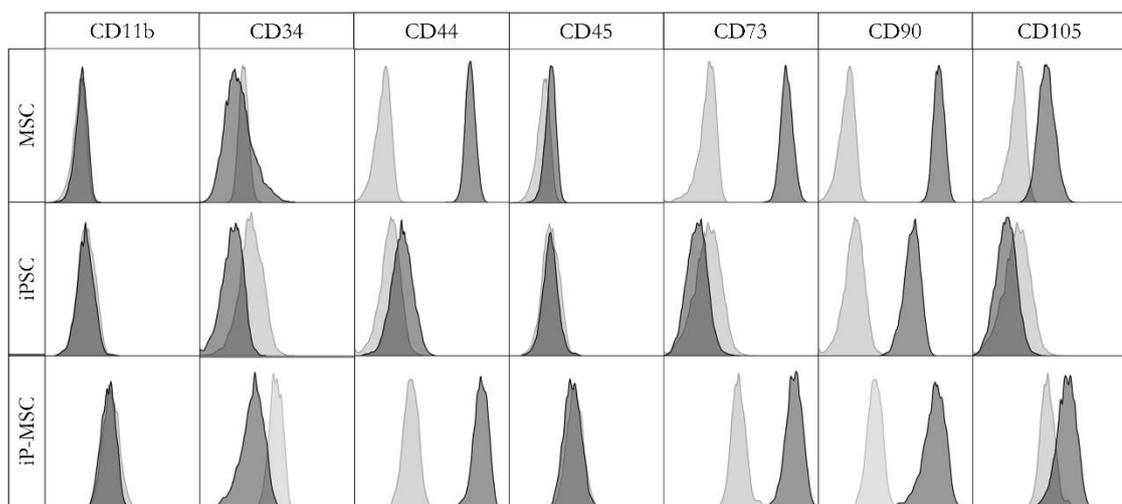


Abb. 21: Vergleichende Darstellung der immunphänotypischen Expression von MSCs, iPS-Zellen und iP-MSCs. Schwarz: Antikörperfluoreszenz, Grau: Isotyp-Kontrolle. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD11b, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90 und CD105 markiert.

3.4.2 Vergleich der Expression von Pluripotenz-Genen

Zur Charakterisierung und zum Vergleich der drei Stammzellarten wurde eine semiquantitative RT-PCR mit Pluripotenzgenen durchgeführt (Abb. 22). Hierbei zeigte sich bei allen iPS-Zelllinien ein positives Expressionslevel für alle untersuchten Gene. *GDF3* wurde bei allen Zelllinien der iPS-Zellen vermindert exprimiert. Für die Mehrzahl der MSCs konnte in der qualitativen Analyse keine Expression der Gene gezeigt werden, jedoch war zu beobachten, dass zwei Zelllinien der MSCs drei Gene schwach exprimierten (MSC2: schwache Expression von *OCT4* und *NANOG*; MSC3: schwache Expression von

NANOG, *LIN28* und *FOXD3*). Bei der Betrachtung der RT-PCR-Ergebnisse der iP-MSCs fiel auf, dass überwiegend keine Pluripotenzgene exprimiert wurden. Jedoch ließ sich, wie auch bei den isolierte MSCs, eine schwache Expression von *SOX2* bei iP-MSC3 und iP-MSC7 erkennen. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl mMSCs als auch iP-MSCs keine Expression von Pluripotenzmarkern auf mRNA Ebene aufwiesen und sich damit zu den iP-S-Zellen unterscheiden.

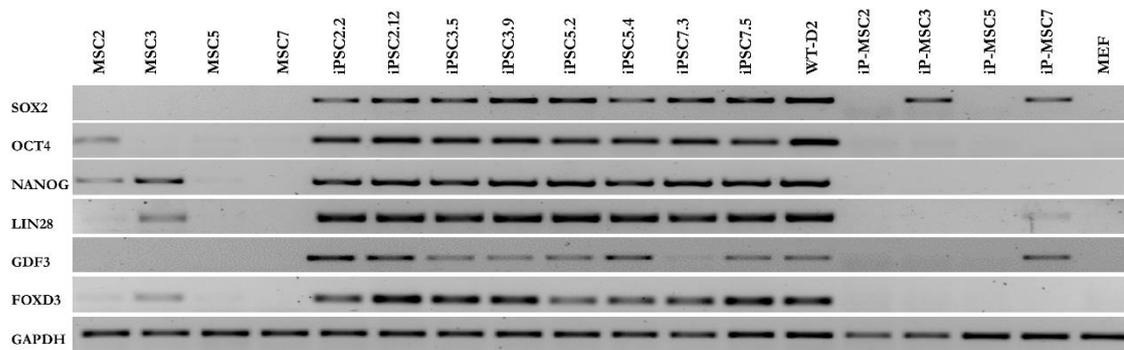


Abb. 22: Genexpressionsanalyse der MSCs, iP-S-Zellen und iP-MSCs. Darstellung *SOX2*, *OCT4*, *NANOG*, *LIN28*, *GDF3* und *FOXD3*. **WT-D2**: Positivkontrolle. **MEF**: Negativkontrolle. **GAPDH**: housekeeping Gen.

3.4.3 Vergleichende Färbung von α -SMA, OCT4 und Vimentin

Die Färbungen in Abbildung 23 mit α -SMA, OCT4 und Vimentin zeigten zwischen den drei Zelltypen folgende Unterschiede: α -SMA ließ sowohl bei MSCs als auch iP-MSCs regelmäßig im Zytoplasma aufweisen. Die iP-S-Kolonien exprimierten in den äußeren, am Rand stehenden Zellen α -SMA. Auch bei OCT4 zeigten die MSCs und die iP-MSCs ähnliche Eigenschaften: Die Expression des Stammzellmarkers war schwach im Zytoplasma zu erkennen, aber zudem punktuell stärker im Zellkern nachweisbar. Parallel dazu wiesen die iP-S-Kolonien eine regelmäßige Färbung auf. MSCs und iP-MSCs zeigten in der immunhistochemischen Färbung Vimentin ein ähnliches Bild. Auch hier war eine regelmäßige positiv-Färbung zu erkennen, die sich in allen Zellen darstellen ließ. Die iP-S-Zellen zeigten größtenteils ein Vimentin-negatives Bild, wenngleich vereinzelt Vimentin-positive Anteile zu sehen waren.

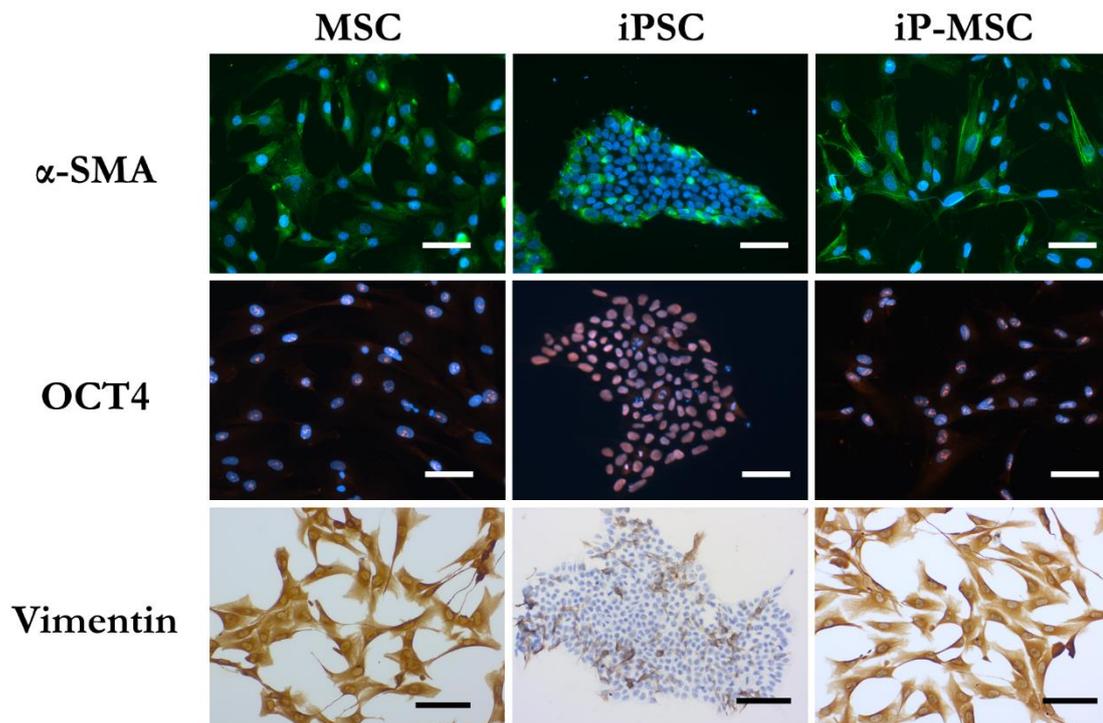


Abb. 23: Immunfluoreszenz- und Immunhistochemie-Färbung von MSCs, iPSC-Zellen und iP-MSCs. Darstellung repräsentativer Aufnahmen der drei Zellarten MSCs, iPSC und iP-MSCs für α -SMA, OCT4 und Vimentin. Skalierung: 100 μ m.

3.5 Einfluss ionisierender Strahlung auf adulte MSCs des Kopf-Hals-Bereichs

3.5.1 Morphologie

Zunächst wurde der Einfluss von fraktionierter ionisierender Bestrahlung auf die Zellmorphologie geprüft. Fraktionierte Bestrahlung findet typischerweise Anwendung bei der Behandlung von Kopf-Hals-Karzinomen.

Wie der Abbildung 24 zu entnehmen ist, wurden MSCs fraktioniert bis zu einer Gesamtbestrahlungsdosis von 10 Gy bestrahlt, um morphologische Unterschiede zu unbestrahlten Zellen zu untersuchen.

Bis Tag drei bzw. bei 6 Gy Bestrahlung konnten keine Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten MSCs beobachtet werden. Ab Tag vier bzw. ab 8 Gy Bestrahlung ließ sich erkennen, dass sich das Zellwachstum der bestrahlten mMSCs verlangsamt und sie ihr spindelförmiges und bipolares Aussehen verloren. Des Weiteren verringerte sich das Wachstum der Kultur der Zellen.

Im Vergleich zur den mMSCs zeigten die pMSCs einen geringeren morphologischen Unterschied zwischen Bestrahlung und keiner Bestrahlung. So war sowohl das Wachstum als auch die Zellmorphologie zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Zellen über alle Bestrahlungstage ähnlich.

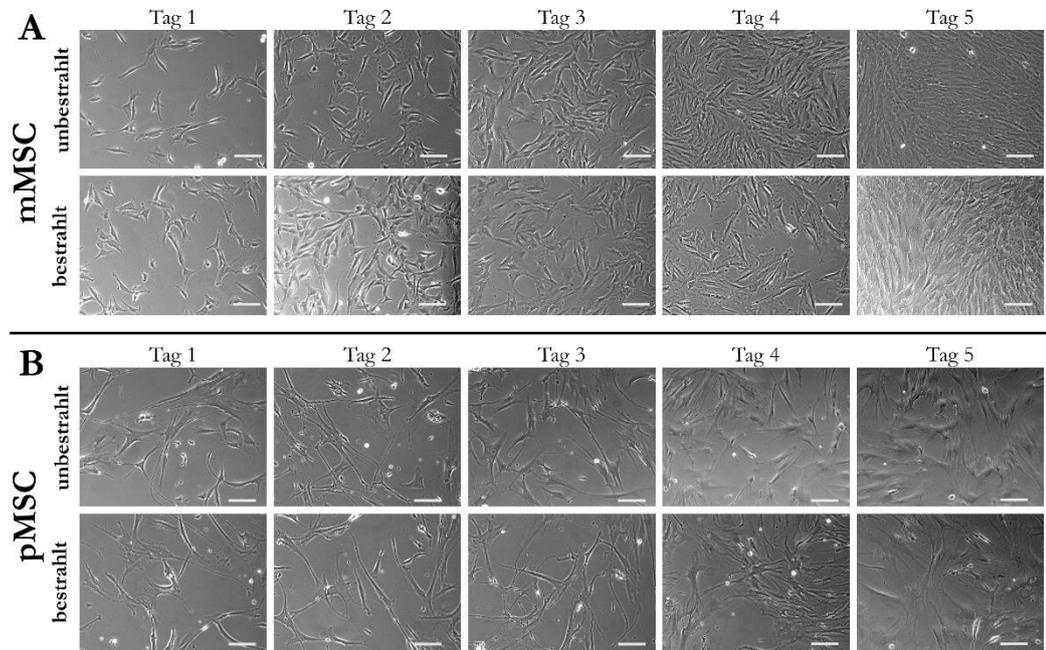


Abb. 24: Phasenkontrastaufnahmen von bis zu 10 Gy bestrahlten und unbestrahlten mMSCs und pMSCs. Phasenkontrastaufnahme für drei repräsentative Patienten. Skalierung: 100 μm .

3.5.2 Einfluss ionisierender fraktionierter Strahlung auf die immunphänotypische Charakterisierung von MSCs

Das Antigen-Oberflächenprofil gehört zu den wichtigen Kriterien, um MSCs als solche zu definieren. Somit wurde der Einfluss fraktionierter Bestrahlung auf das Oberflächenprofil der Zellen anhand der typischer MSC-Antigenen mit unbestrahlten Zellen verglichen. In der vorliegenden Studie hatte eine fraktionierte Bestrahlung bis 10 Gy (2 Gy pro Tag) keinen signifikanten Einfluss auf die Antigenexpression der pMSCs und mMSCs. Die MSC-typischen Antigene CD44, CD73, CD90 und CD105 blieben in der quantitativen Analyse positiv, während CD11b, CD34 und CD45 weiter negativ waren. Damit lässt sich festhalten, dass Bestrahlung keinen Einfluss auf das Antigen-Oberflächenprofil nimmt und die stammzelldefinierenden Charakteristika der MSCs nicht beeinflusst.

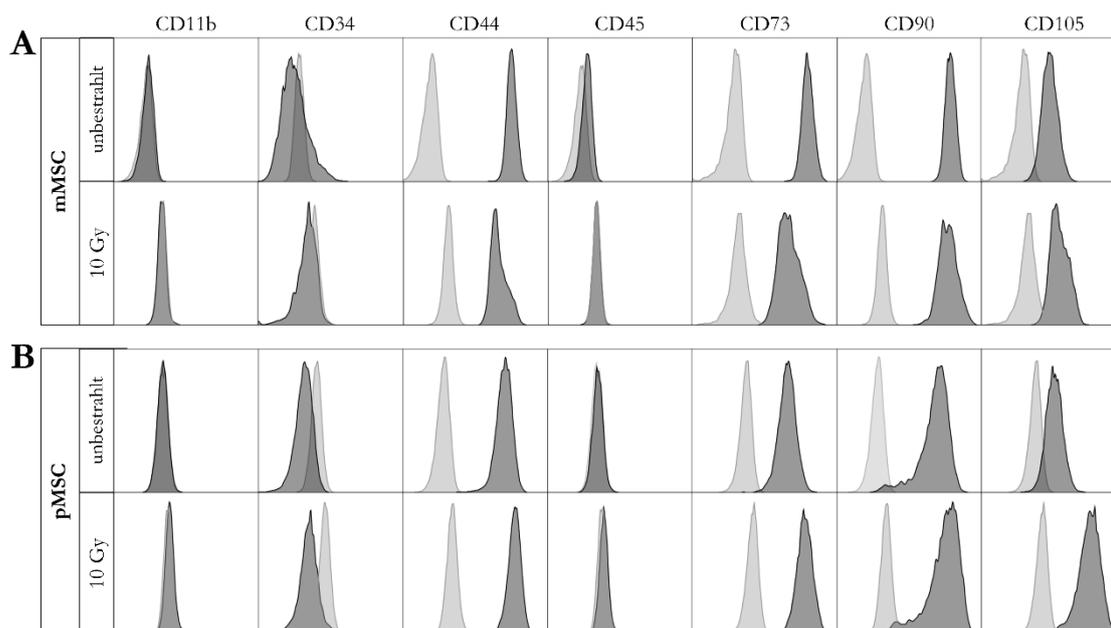


Abb. 25: Vergleich der Oberflächenmarker bei bestrahlten und unbestrahlten mMSCs und pMSCs.

Darstellung der einzelnen Antigene als Histogramme. **A:** mMSCs, **B:** pMSCs. Schwarz:

Antikörperfluoreszenz, Grau: Isotyp-Kontrolle. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD11b, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90 und CD105 markiert. Zellen zwischen Passage 3 und 5. Es werden repräsentative Ergebnisse von einem aus drei unabhängigen Patienten ($n = 3$) pro Zellpopulation dargestellt.

3.5.3 Annexin-Apoptose-Assay

Der Einfluss fraktionierter ionisierender Bestrahlung auf die Zellvitalität und Apoptoseverhalten wurde mit Hilfe des Annexin-Apoptose-Assays untersucht. Wie der Abbildung 26 zu entnehmen ist, waren ohne Bestrahlung 4,1 % der mMSCs apoptotisch. Wie zu erwarten stieg der Anteil apoptotischer Zellen mit zunehmender Bestrahlungsintensität an und erreichte bei 20 Gy den höchsten Wert (15,4 %). Der Abbildung 26 ist weiter zu entnehmen, dass bei 8 Gy Bestrahlung die Apoptoserate leicht unter den Ausgangswert sinkt (3,4 %), um anschließend auf 15,4 % zu steigen.

Im Vergleich dazu lag die Apoptoserate bei den pMSCs in einem deutlich geringeren Bereich. Ohne Bestrahlung waren 1,2 % apoptotisch. Auch dieser Wert stieg mit steigender Bestrahlung annähernd kontinuierlich bis auf 4,1 % bei 20 Gy an.

Die Ergebnisse zeigen für mMSCs und pMSCs, dass Bestrahlung erwartungsgemäß einen negativen Einfluss auf die Zellproliferation und Vitalität hat.

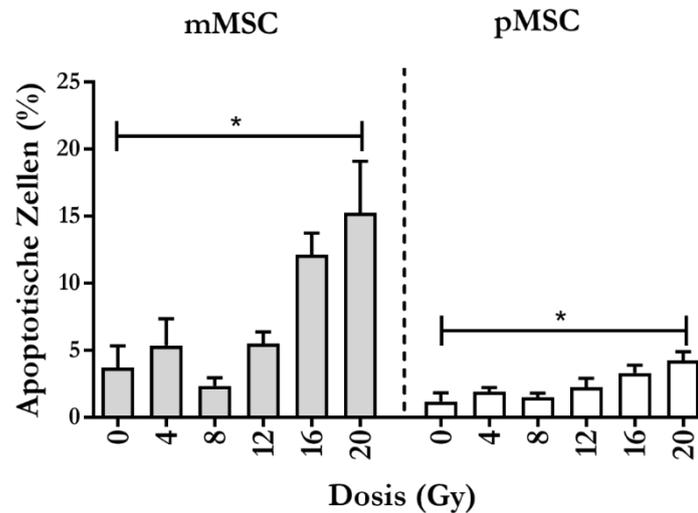


Abb. 26: Einfluss fraktionierter Bestrahlung auf die Apoptose der mMSCs und pMSCs. Die apoptotische Zellpopulation der mMSCs ($n = 3$) und pMSCs ($n = 3$) wurde mittels Annexin V und Propidiumiodid untersucht. Die Messungen fanden bei fraktionierter Bestrahlung von null, vier, acht, zwölf, 16 und 20 Gy statt. * $p < 0,01$. Mittelwert mit \pm SEM.

3.5.4 Expression von α -SMA

Durch die Anfärbung mit α -SMA wurde geprüft, ob es Unterschiede im Zytoskelett zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellen gibt. Hierzu wurden die Zellen fraktioniert mit zehn und 20 Gy bestrahlt und diese mit unbestrahlten Zellen verglichen.

Hier zeigte, sich wie aus Abbildung 27 zu entnehmen ist, dass bei einer Bestrahlung bei sowohl 10 Gy als auch bei 20 Gy kein Unterschied zu den unbestrahlten Zellen zu erkennen war. Bei einer Strahlendosis von 20 Gy wurde weniger Zytoplasma angefärbt.

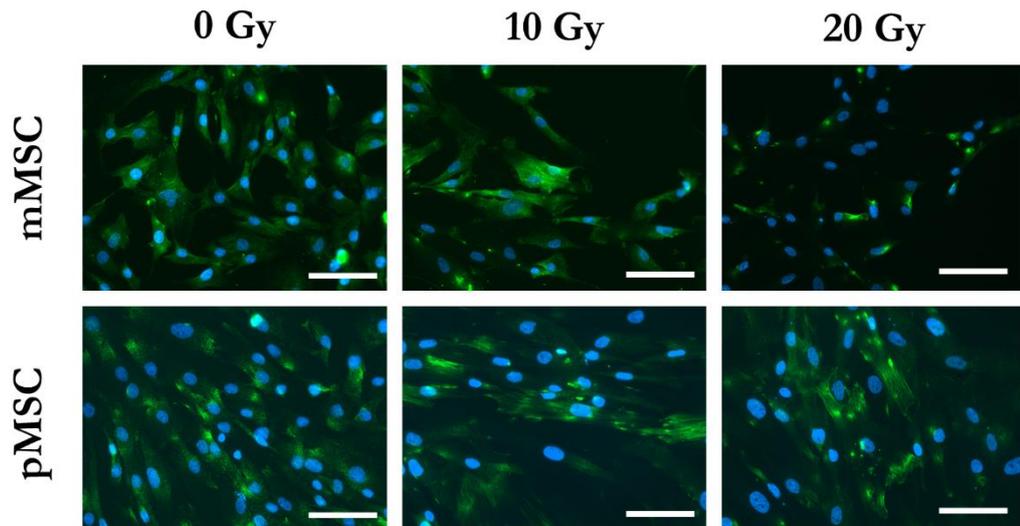


Abb. 27: Immunfluoreszenzfärbung von mMSCs und pMSCs nach Bestrahlung. In dieser für drei Patienten repräsentativen Abbildung wurde die Expression von α -SMA bei mMSCs (oben) und pMSCs (unten) bei einer fraktionierten Bestrahlung von zehn und 20 Gy im Vergleich zu unbestrahlten Zellen dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Skalierung: 100 μ m.

3.5.5 Koloniebildung von MSCs

Ein weiteres MSC-typisches Merkmal ist die Fähigkeit, Kolonien zu bilden. Um die Fähigkeiten der adulten MSCs zur Koloniebildung nach Bestrahlung zu prüfen, wurden pMSCs und mMSCs in unterschiedlichen Dosen fraktioniert bestrahlt (Abb. 28). Hier zeigte sich für beide Zellarten, dass mit zunehmender Bestrahlung vermindert Kolonien gebildet wurden. Die Abnahme der Kolonienanzahl korreliert mit der steigenden Bestrahlungsdosis. Bei genauerer Betrachtung zeigte sich für mMSCs, dass bei zunehmender Bestrahlungsdosis weniger Kolonien gebildet wurden und sich bei der Höchstdosis von 10 Gy die Anzahl der Kolonien um mehr als die Hälfte reduzierte hatte (von 88,6 auf 33 Kolonien). Wie der Abbildung 28 zudem zu entnehmen ist, sind die Werte in Bezug auf die unbestrahlten Kontrollzellen stets signifikant (** $p < 0,001$).

Bei der Betrachtung der pMSCs zeigte sich, dass im Vergleich zu den mMSCs im unbestrahlten Zustand deutlich weniger Kolonien gebildet wurden (88,6 bei mMSCs und 23,8 bei pMSCs). Des Weiteren ist erkennbar, dass sich die Anzahl der Kolonien bis 6 Gy auf 1,7 Kolonien reduzierte, und bei höheren Bestrahlungsdosen (8 Gy, 10 Gy) keine Kolonien mehr gebildet wurden. Somit lässt sich schlussfolgern, dass unter höherer Bestrahlungsintensität die Zellen die Fähigkeit vollständig verlieren, Kolonien zu bilden.

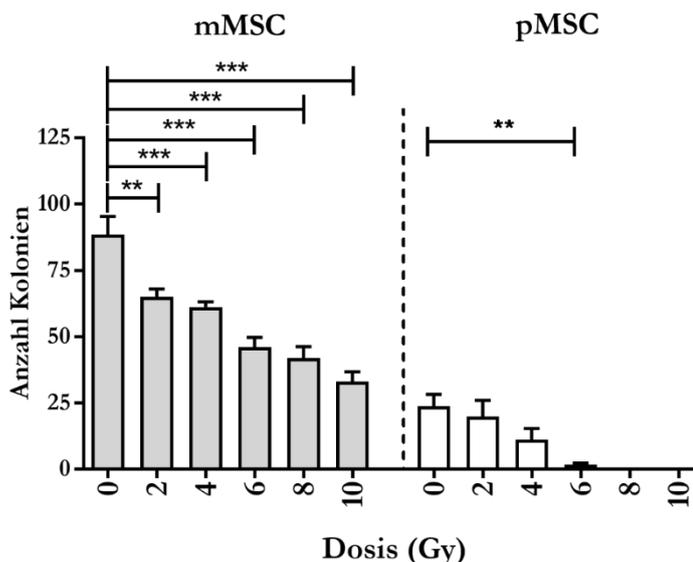


Abb. 28: Koloniebildende Einheit von mMSCs und pMSCs nach fraktionierter Bestrahlung. Die Messungen fanden für mMSCs ($n = 3$) und pMSCs ($n = 3$) bei fraktionierter Bestrahlung von null, zwei, vier, acht und zehn Gy statt. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$. Mittelwert mit \pm SEM.

3.5.6 Untersuchung der Zellmigration

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Bestrahlung auf die Zellmigration untersucht. Im Rahmen der Chemotaxis werden Zellen durch die Bildung eines Stoffkonzentrationsgradienten von Botenstoffe (Chemokine), Aktivierung von Rezeptoren und Zell-Zell-Kontakten angelockt und können im Gewebe wandern. Das Wanderungsverhalten der Zellen wird durch verschiedene Einflüsse (bspw. Entzündung, Bestrahlung etc.) beeinflusst. Dabei stehen vielfältige Techniken zur Verfügung, um die chemotaktische Aktivität zu messen. Bei der Therapie von Kopf-Hals-Tumoren entstehen als Folge der Bestrahlung lokale Entzündungen, sodass zahlreiche Reparaturmechanismen und chemotaktische Abläufe aktiv sind.

Da MSCs als immunologisch aktive Zellen in diesen Prozess involviert sind, wurde in dieser Studie mit Hilfe von drei verschiedenen Versuchen der Einfluss fraktionierter ionisierender Bestrahlung auf das Wanderungsverhalten humaner MSCs *in vitro* untersucht. Dabei fand das Scratch-Assay, die Expression der Chemokinrezeptoren und die Sekretion von Zytokinen Anwendung.

Zunächst wurde in einem *in vitro* Modell das Scratch-Assay durchgeführt, um das Wanderungsverhalten der Zellen nach verschiedenen Bestrahlungsdosen nach 24 Stunden zu untersuchen.

Erstaunlicherweise wurden mMSCs in ihrer Migration zunächst nicht gehemmt, sondern aktiviert. Wie der Abbildung 29 zu entnehmen ist, besaßen mMSCs mit zunehmender

Bestrahlungsdosis eine erhöhte Migrationsrate. Vor allem nach 16 bzw. 24 Stunden wuchsen die bestrahlten Zellen etwas schneller zusammen.

Dagegen zeigte sich bei den pMSCs ein anderes Bild: Die Zellmigration wurde durch höhere Strahlungen nicht beschleunigt, sondern blieb im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen ähnlich.

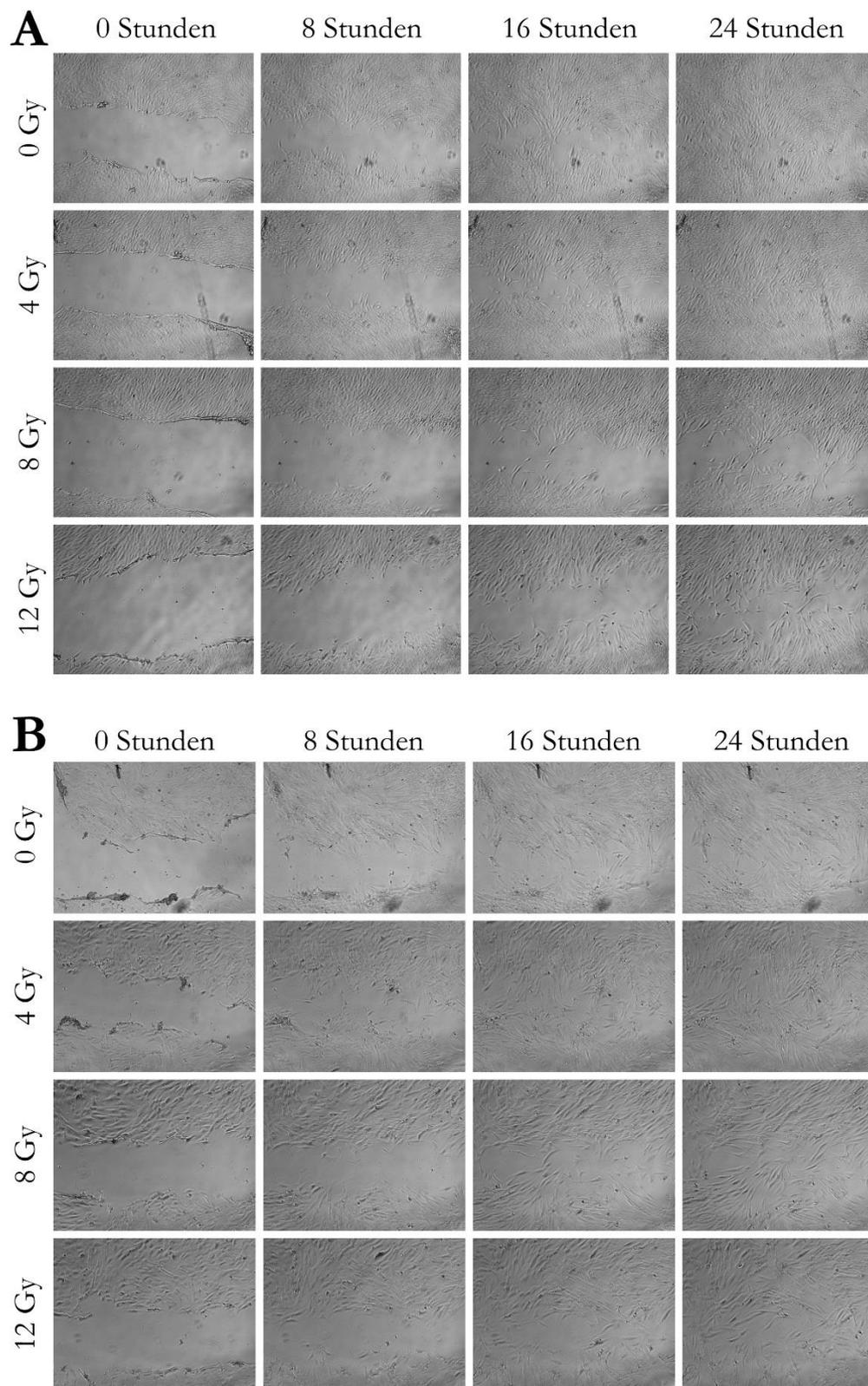


Abb. 29: Scratch-Assay von mMSCs und pMSCs nach fraktionierter Bestrahlung. Diese repräsentative Abbildung zeigt Aufnahmen von drei Patienten nach fraktionierter Bestrahlung von 0, 4, 8 und 12 Gy.

A: mMSCs, **B:** pMSCs.

An zweiter Stelle wurde die Expression der Chemokinrezeptoren der MSC nach Bestrahlung untersucht. Chemokinrezeptoren sind Proteine auf der Membran von Zellen, die eine zentrale Rolle bei der Wanderung von Zellen innehaben. Nach einer Aktivierung können sie die Zellmigration zum erkrankten Gewebe gezielt steuern. Mittels qPCR wurde die Expression verschiedener Chemokin-Rezeptoren in vitro untersucht, um Rückschlüsse auf den Einfluss von Bestrahlung zu ziehen.

Interessanterweise konnte für mMSCs gezeigt werden, dass die Bestrahlung einen positiven Effekt auf die Expression der Chemokin-Rezeptoren hat (Abb. 30). Die Expression wurde durch ionisierende Bestrahlung, teils signifikant erhöht. Im Vergleich von 10 Gy- und 20 Gy-Bestrahlung zeigte sich, dass alle untersuchten Gene eine höhere Expression bei 10 Gy- als bei 20 Gy-Bestrahlung besitzen.

Wie auch bei der Scratch-Assay ergab sich bei den pMSCs ein anderes Bild: Die Expression der Chemokin-Rezeptoren wurde, bis auf *CXCR3*, durch Bestrahlung nicht signifikant gesteigert. Als Tendenz war zu erkennen, dass die 20 Gy-bestrahlten Zellen etwas mehr exprimieren als die 10 Gy-bestrahlten Zellen.

Zusammenfassend zeigte sich eine erhöhte Expression der Chemokin-Rezeptoren bei mMSCs, die bei 10 Gy-Bestrahlung am größten ist. pMSCs werden in ihrer Expression durch Bestrahlung weitestgehend nicht stimuliert. mMSCs werden in vitro durch Bestrahlung immunologisch aktiver.

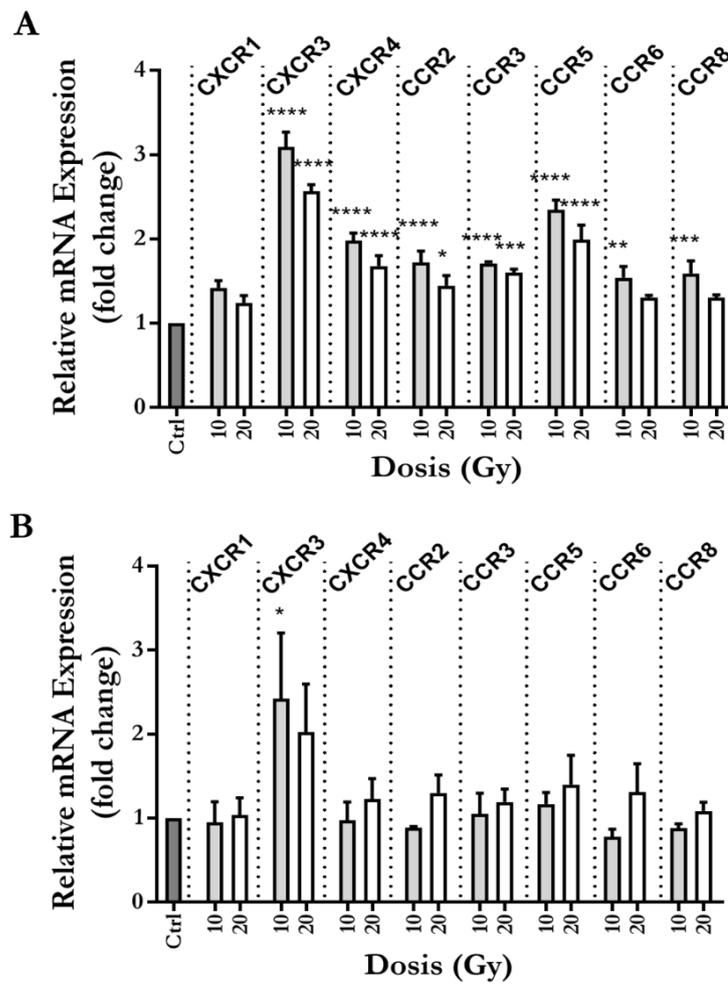


Abb. 30: qPCR-Analyse der Chemokin-Rezeptoren bei mMSCs und pMSCs nach fraktionierter Bestrahlung. Gepoolte Proben von drei Patienten nach fraktionierter Bestrahlung mit 10 und 20 Gy. **A:** mMSCs, **B:** pMSCs. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, **** $p < 0,00001$. Mittelwert mit \pm SEM.

Als drittes wurde der Einfluss fraktionierter Bestrahlung auf die Zytokin-Sekretion untersucht. Zytokine sind Proteine, die im Prozess der Proliferation und Differenzierung von Zellen regulatorische Funktionen einnehmen. Eine Untergruppe stellen Interleukine dar, welche u. a. an die Interaktion von Entzündungszellen beteiligt sind und von adulten MSCs, vor allem nach einer Stimulation mit Entzündungsmediatoren, sekretiert werden.

Um Rückschlüsse auf die Zytokin-Sekretion bei einer bestrahlungsinduzierten Mukositis zu ziehen, wurde mittels ELISA die Sekretion von Interleukinen gemessen.

Die Abbildung 31 zeigt die Sekretion von IL-6 aus mMSC bei unbestrahlten Zellen von 18,9 ng/ml. Dieser Wert nahm bis 4 Gy ab (12,6 ng/ml), stieg wieder bis 10 Gy auf 21,1 ng/ml an. Die Sekretion der pMSCs für IL-6 hatte initial bei unbestrahlten Zellen einen höheren Ausgangswert von 44,9 ng/ml als die mMSCs. Im Verlauf sank sie bei 2 Gy leicht ab (36,8 ng/ml), um anschließend bis 8 Gy auf einen Wert von 106 ng/ml anzusteigen. Anschließend sank die Sekretion bei 10 Gy erneut auf 64,3 ng/ml ab.

Die Sekretion von IL-8 war bei beiden Zellpopulationen deutlich höher. Bei mMSCs wurde für die unbestrahlten Kontrollzellen ein Wert von 867,2 ng/ml gemessen, der bis 6 Gy annähernd gleich blieb (826,2 ng/ml) und anschließend bis auf 1311,3 ng/ml bei 10 Gy stieg. Ein sehr ähnliches Bild lieferten die pMSCs. 869,3 ng/ml IL-8 sekretierten die unbestrahlten Kontrollzellen. Abgesehen von der Sekretion bei 2 Gy blieb die Höhe der Sekretion bis einschließlich 6 Gy ähnlich und stieg dann weiter bis 1082,9 ng/ml IL-8 bei 10 Gy an.

Hiermit konnten wir zeigen, dass eine fraktionierte Bestrahlung in kleinen Dosen bis sechs Gray die Sekretion von wichtigen inflammatorischen Zytokinen nicht steigert, wohin gehend bei höheren Bestrahlungsdosen eine Aktivierung der Sekretion zu beobachten war.

Das lässt den Rückschluss zu, dass in-vivo bei Patienten unter Bestrahlung im Bereich der Mukosa vermehrt Entzündungsmediatoren in Form von IL-6 und IL-8 freigesetzt werden.

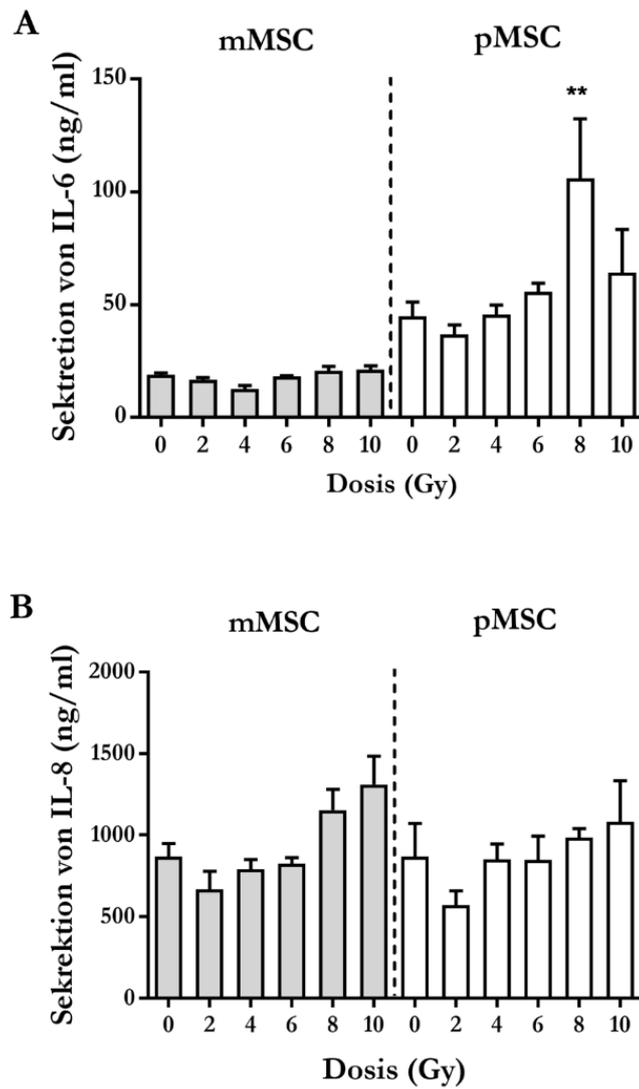


Abb. 31: Sekretion der Zytokine IL-6 und IL-8 bei mMSCs und pMSCs nach fraktionierter Bestrahlung. Gepoolte Proben von drei Patienten nach fraktionierter Bestrahlung mit 0, 2, 4, 6, 8 und 10 Gy. **A:** Sekretion von IL-6, **B:** Sekretion von IL-8. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$. Mittelwert mit \pm SEM.

4 Diskussion

4.1 Zellen lassen sich als MSCs charakterisieren

Die Erforschung von Stammzellen weckt große Hoffnungen in der regenerativen und personalisierten Medizin. So werden mesenchymale Stammzellen aufgrund ihrer relativ einfachen Isolation aus dem Ursprungsgewebe, Kultivierung und Expansion in der Zellkultur bereits in der Behandlung bei zahlreichen Inflammations- und Autoimmunerkrankungen eingesetzt (Weiss et al. 2013; Song et al. 2018). In dieser Arbeit bestand der erste Schritt darin, Stammzellen aus dem Kopf-Hals-Bereich als MSCs zu definieren. Dabei macht man sich die MSC-typische Fähigkeit der Plastikadhärenz zu Nutze (Katz et al. 2005). Die Morphologie der bipolaren, spindelförmigen mMSCs und pMSCs entsprach dem Bild aus den Vorarbeiten von Rotter et al. (2008) und Jakob et al. (2010), die erstmalig die Existenz der MSCs aus der Parotis und nasalen Mukosa bewiesen.

Die Kultivierung der MSCs erfolgte problemlos bis Passage zehn. Ab dieser Passage nahm die Proliferationsrate patientenunabhängig *in vitro* ab. Dieses Zellkulturverhalten wurde auch in Vorarbeiten für mMSCs und pMSCs beschrieben (Jakob et al. 2010; Rotter et al. 2010). Das Wachstumsverhalten und die Abnahme der Proliferation sind typisch für MSCs. Als Gründe werden sowohl ein höheres Alter der Spender als auch Seneszenz der Zellen diskutiert (Boink et al. 2016).

Bezüglich des Alters wurde in dieser Studie bei der Untersuchung der Proliferationsrate kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit vom Alter der Patienten festgestellt. Dies widerspricht der Studie von Chen, die einen altersabhängigen Unterschied der Proliferationsrate bei Gingiva-MSCs beschreiben (Chen et al. 2019).

Mit Seneszenz wird die physiologische Begrenzung der Teilungsfähigkeit und der Übergang in den nicht-proliferativen Zustand von Zellen *in vitro* bezeichnet. Erstmal erkannte Hayflick und Moorhead (1961) dieses Phänomen, welches seitdem als *Hayflick Limit* bekannt ist. Dabei spielt die Telomerase eine wichtige Rolle, die das Verkürzen der Chromosomen aufhält und in sich kontinuierlich teilenden Zellen (Keimbahnzellen, embryonale Stammzellen, Tumorzellen) aktiv ist (Bonab et al. 2006). Darin grenzen sie sich von somatischen (adulten) Zellen ab, die keine Telomeraseaktivität zeigen und daher eine reduzierte Proliferationskapazität aufweisen (Harley 1991). In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass BM-MSCs keine Telomeraseaktivität besitzen (Simonsen et al. 2002; Zimmermann et al. 2004). Das hat zur Folge, dass Gene inaktiviert werden und dies zur Apoptose der Zelle führt (Kolquist et al. 1998; Zimmermann et al. 2003). Mit Hilfe des TRAP Assay (Telomeric Repeat Amplification Protocol) könnte in Zukunft die Aktivität des Telomeraseenzym der mMSCs untersucht werden. Des Weiteren wäre eine Messung der SA- β -Galaktosidase-Expression ein hilfreiches Werkzeug zur Messung der Telomerverkürzung (Lee et al. 2006).

Wie in dieser Studie erfolgreich gezeigt wurde, dient auch die Reprogrammierung ins iPS-Zellen die zelluläre Seneszenz zu verhindern.

Für die Erkennung von MSCs dient die immunphänotypische Untersuchung als wichtiges Diagnostikum, da es kein spezifisches Markerprotein oder Markergen für mesenchymale Stammzellen gibt (Dominici et al. 2006). Die untersuchten mMSCs und pMSCs zeigten das stammzelltypische Oberflächenprofil. Entgegen den Vorarbeiten von Mareschi und Kollegen (2006), konnten wir keine altersspezifischen Unterschiede im Oberflächenprofil erkennen. Mareschi (2006) beobachteten, dass jüngere BM-MSCs Spender mehr Oberflächenantigene exprimieren als ältere Spender. Rojewski und Kollegen (2008) zeigten, dass CD45 bei MSCs in der ersten Passage im Vergleich zur Messung nach Passage zehn signifikant erhöht war.

Als weiteres Kriterium, die isolierten Zellen als MSCs zu definieren, gilt der Nachweis einer Differenzierung in Zellen mit Knorpel-, Fett- und Knocheneigenschaften. Der Beweis erfolgte mittels immunhistochemischer Färbungen und PCR-Analysen, was die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen replizierte (Rotter et al. 2008; Jakob et al. 2010). In dieser Studie konnten für beide MSC-Populationen alle drei klassischen Differenzierungslinien bestätigt werden. In der adipogenen Differenzierung zeigte sich, dass mehr pMSCs als mMSCs differenzierten. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Parotis überwiegend aus Fettgewebe besteht, und somit die aus ihr gewonnenen Stammzellen eine höhere Affinität zu Adipozyten besitzen.

Somit wurde gezeigt, dass sich die bereits beschriebene Methodik zur Definition von MSCs für beide Zellarten erneut bewährt hat.

4.2 Einfache Reprogrammierung in iPS-Zellen

In der Stammzellforschung eröffnete sich durch die Möglichkeit der Reprogrammierung von differenzierten somatischen Zellen in iPS-Zellen ein großes Forschungsfeld, beispielsweise bei der Modellierung genetischer Krankheiten, in der pharmakologischen Forschung und personalisierten Stammzelltransplantation (Biel et al. 2015; Borchert et al. 2017).

Um eine erfolgreiche Reprogrammierung in iPS-Zellen zu bestätigen, mussten einige Nachweise erbracht werden. Erstens stellt die Färbung der Zellen unter Verwendung der alkalische Phosphataseaktivität (AP) ein frühes Zeichen für eine erfolgreiche Reprogrammierung dar. Bei der Betrachtung der Färbung fällt auf, dass sich die Zellen innerhalb der Kolonie heterogen anfärben. Dieses Färbemuster wurde bereits beschrieben (O'Connor et al. 2008). Grund dafür könnte einerseits eine variable Expressionsstärke der AP sein. Andererseits wäre denkbar, dass die erhöhte Farbintensität einzelner Zellen ein

Anzeichen auf eine beginnende spontane Differenzierung darstellt, denn die AP lässt sich auch in differenzierten Osteoblasten nachweisen (Rawadi et al. 2003).

Zweitens wurden zahlreiche Transkriptionsfaktoren sowohl auf Gen- als auch Proteinebene untersucht und deren Expression belegt, um so die Pluripotenz der Zellen zu bestätigen. Die in dieser Arbeit dargestellten PCR-Ergebnisse zeigen sehr eindrücklich, dass die für die Pluripotenz verantwortlichen Transkriptionsfaktoren in den isolierten MSCs nur sehr schwach und in den iPS-Zellen stark exprimiert wurden (Hübscher et al. 2019). Dies stellt ein zentrales Unterscheidungsmerkmal zwischen MSCs und iPS-Zellen dar. Man schreibt den Transkriptionsfaktoren OCT4, NANOG und SOX2 Schlüsselrollen im Rahmen der Erhaltung der Pluripotenz zu. OCT4 ist ein Transkriptionsfaktor, der essenziell für die Reprogrammierung von Zellen ist. Er gilt als geeigneter Marker für undifferenzierte Zellen, da bei einer zu geringen Expression die Pluripotenz schwindet und die Zellen differenzieren (Niwa et al. 2000). Des Weiteren ist OCT4 neben SOX2, KLF4 und C-MYC Bestandteil der „Yamanaka Faktoren“, also jener Transkriptionsfaktoren, mit denen sich erstmals somatische Zellen in iPS-Zellen reprogrammieren ließen. NANOG lässt sich in embryonalen und iPS-Zellen wiederfinden und besitzt zusammen mit OCT4 und SOX2 eine Regulierungsfunktion zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz und der Fähigkeit der Selbsterneuerung. SOX2 und OCT4 wirken auf den Transkriptionsfaktor NANOG ein, welcher wiederum OCT4, SOX2 und sich selbst reguliert. Diese Interaktion zwischen den drei Faktoren ist Voraussetzung für den Erhalt der Pluripotenz (Chambers et al. 2003; Boyer et al. 2005). Ist NANOG in Zellen überexprimiert, wird die Zelldifferenzierung verhindert; fehlt NANOG dagegen in den Zellen oder wird es zu wenig exprimiert, tendieren die Zellen zur spontanen Differenzierung (Mitsui et al. 2003). NANOG spielt somit eine zentrale Rolle. In dieser Studie konnte die Expression von NANOG auf Gen- und Proteinebene für alle iPS-Zelllinien bestätigt werden. Der Transkriptionsfaktor SOX2 ist ebenfalls ein sehr wichtiger Faktor zur Aufrechterhaltung der Selbsterneuerungsfähigkeit, Pluripotenz und Undifferenziertheit. Er interagiert in diesem Zusammenhang entscheidend mit OCT3/4 (Avilion et al. 2003; Masui et al. 2007). LIN28, auch bekannt als *cell lineage abnormal 28*, ist ein RNA-Bindeprotein und Entwicklungsgen, welches in embryonalen Stammzellen exprimiert wird (Richards et al. 2004).

Als große Limitation der erfassten RT-PCR Daten sind unzureichende Negativkontrollen zu nennen, da einerseits „-RT“ Kontrollen fehlen und andererseits die technische Negativkontrolle mit Fibroblasten der Maus und nicht mit humanen Zellen durchgeführt wurde. Humane Fibroblasten hätten die identische Nukleotidsequenz wie die analysierten menschlichen iPS-Zellen.

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung konnte auf Proteinebene die Pluripotenz der Zellen bestätigt werden. In dieser Arbeit wurde jedoch nicht nachgewiesen, dass die iPS-Zellen frei von Reprogrammierungsfaktoren waren und somit möglicherweise falsch-positive Signale aufzeigten.

Diese Einschränkung gilt besonders für die Faktoren, die durch das Plasmid in die Zellen gelangen (LIN28, SOX2, OCT4), jedoch nicht für NANOG, TRA-1-60 und SSEA4, welche erst in der Zelle exprimiert wurden. In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass OCT4 des Plasmids nach Passage 25 nicht mehr nachweisbar war und korreliert somit mit den Daten aus dieser Arbeit (Hübscher et al. 2020).

Zusammenfassend zeigte vor allem die Expression von *OCT4*, *NANOG* und *SOX2* die Undifferenziertheit und Pluripotenz der iPS-Zellen auf und konnte erstmalig die erfolgreiche Reprogrammierung aus humanen mMSCs bestätigen.

Drittens diente der Nachweis des Differenzierungspotentials in die Keimblätter Mesoderm, Endoderm und Ektoderm als weitere Bestätigung der Pluripotenz (Itskovitz-Eldor et al. 2000). Doetschman et al. (1985) und Thomson et al. (1998) erkannten 1985 bzw. 1998, dass sich embryonale Stammzellen nach gewisser Zeit und unter günstigen in vitro Bedingungen in die drei Keimblätter-Gewebe differenzieren. Der Nachweis gelang in dieser Arbeit sowohl mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung als auch in der PCR-Analyse. Dabei fiel auf, dass der Hepatozyten-spezifische Marker *AFP* in der Frühphase (Tag 8) stärker exprimiert wurde als zum späteren Zeitpunkt der Differenzierung. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien (Mallanna und Duncan 2013; Asumda et al. 2018). Im Kontrast dazu steht die Expression der Thyrosin-Hydroxylase (*TH*), welche bei allen vier Patienten zu einem späteren Zeitpunkt (Tag 8 + 25) detektierbar wurde.

Damit lässt sich zusammenfassen, dass die bei anderen Geweben bereits eingesetzte Methodik auch bei der Reprogrammierung von MSCs aus dem Kopf-Hals-Bereich erfolgreich anwendbar ist. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass in der Zukunft auch Zellen anderer Lokalität aus dem Kopf-Hals-Bereich mit den hier verwendeten Methoden reprogrammiert werden können.

4.3 Differenzierung in iP-MSCs

Der nächste Arbeitsschritt der Studie beinhaltete die Differenzierung der reprogrammierten iPS-Zellen zu iP-MSCs. Die von uns erstmalig etablierte Methode für humane mMSCs als Ausgangszelle konnte für Zellen anderen Ursprungsgewebes bereits beschrieben werden (Lian et al. 2010; Mahmood et al. 2010). In dieser Studie wurde eine erfolgreiche Differenzierung beobachtet, wenn die Zellen im passenden Verhältnis, zum richtigen Zeitpunkt und mit dem geeigneten Medium auf beschichtete Zellkulturplatten ausplattiert wurden. Vergleichend dazu ließen sich methodische Gemeinsamkeiten zu anderen Arbeitsgruppen finden (Karlsson et al. 2009; Frobel et al. 2014; Hynes et al. 2014). Der Vorteil dieser Differenzierungsmethode besteht in dem einfachen und kostengünstigen Versuchsaufbau. Dagegen beschreiben Chen und Kollegen (2012), dass sich iP-MSCs durch

die Unterdrückung des *transforming growth factor beta (TGF-β)/activin signaling pathway* mit SB-431542 differenzieren ließen. Der TGF-β-Signalweg zeichnet sich darin aus, dass embryonale Stammzellen den Status der Pluripotenz aufrechterhalten. Wird dieser Signalweg inhibiert, zeigt sich eine Heraufregulierung mesodermaler Gene (*MSX2, NCAM, HOXA 2*) sowie eine Herunterregulierung von Pluripotenzgenen (*OCT4, LEFTY1/2*) und die Zellen differenzieren zu iP-MSCs (Inman et al. 2002; Chen et al. 2012). Alternativ erfolgte die Differenzierung mit dem Zwischenschritt über *embroid bodies* (Teramura et al. 2010). Die Umwandlung in *embroid bodies* wird häufig zur Differenzierung von iPS-Zellen in anderes Gewebe verwendet, jedoch scheint die resultierende Zellpopulation heterogen zu sein und das Differenzierungsergebnis nicht immer vorhersehbar (Khoo et al. 2005). Im Gegensatz dazu verzichteten Nejadnik et al. (2015) auf EBs und argumentierten, dass dadurch die Differenzierung effektiver sei. Auch eine Kombination mit Bildung von *embroid bodies* und der Unterdrückung des TGF-β-Signalweg wurde beschrieben (Whitworth et al. 2014). Die Frage, welche Hauptsignale oder (Wachstums-)Faktoren die Differenzierung lenken, könnte Inhalt weiterer Forschung sein.

Wie erwartet änderte sich nach einem Zeitraum von rund vier Wochen die Morphologie der Zellen. Die Zellen entwickelten ein fibroblastenartiges Aussehen mit einem zentralen Zellkörper und vielen Zellausläufern. Das morphologische Bild der iP-MSCs glich nun der Morphologie der humanen mMSCs (Spiegel et al. 2019). Als zweiten Beweis, dass es sich um MSC-ähnliche Zellen handelt, wurde das Vorhandensein des MSC-typische Oberflächenprofil gezeigt; dies deckt sich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Chen et al. 2012; Guzzo et al. 2013). Die erfolgreiche Differenzierung in Zellen mit Knorpel-, Fett- und Knocheneigenschaften stellte den dritten Nachweis dar. Die adipogene Differenzierung zeigte morphologisch das gleiche Bild wie bei isolierten, differenzierten MSCs. Bei der Untersuchung des Gens *FABP4* zeigte sich eine deutlich höhere relative Expression in mMSCs als in iP-MSCs. Die Beobachtungen, dass isolierte mMSCs besser adipogen differenzieren als iP-MSCs, stimmten mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein (Frobel et al. 2014).

Mit diesen Ergebnissen erfüllten auch die neu differenzierten iP-MSCs alle Kriterien der MSCs (Dominici et al. 2006).

Eine Erklärung, warum sich zahlreiche Gemeinsamkeiten zwischen den isolierten MSCs und den differenzierten iP-MSCs finden lassen, könnte im epigenetischen Gedächtnis liegen. In der Literatur wird diskutiert, ob iPS-Zellen ein epigenetisches Gedächtnis für den Ursprung ihres Gewebes besitzen und dadurch eine höhere Neigung für eine Differenzierung in das ursprüngliche Gewebe aufweisen und die *in vitro* Differenzierung beeinflussen (Kim et al. 2010). Bar-Nur und Kollegen (2011) beschrieben, dass iPS-Zellen, welche aus Beta-Zellen des Pankreas reprogrammiert wurden, eine höhere Fähigkeit besaßen, sich in Insulinproduzierende Zellen zu differenzieren als nicht-Beta-iPS-Zellen. Weiter zeigte die Studie den prädisponierenden Einfluss der Ursprungszellen auf die Differenzierung. Entgegen den

Erwartungen hatte das Expandieren der Zellen über einen längeren Zeitraum keinen Einfluss auf das epigenetische Gedächtnis (Kim et al. 2011). Falls auch die verwendeten Zellen ein epigenetisches Gedächtnis besitzen, könnte dieses genutzt werden, um spezifische Zellen aus den iPS-Zellen zu akquirieren.

Es wird ein klinischer Ansatz diskutiert, bei dem die MSCs isoliert, in iPS-Zellen reprogrammiert, anschließend in iP-MSCs differenziert und dem Patienten appliziert werden (Lian et al. 2010). Die Möglichkeit der patientenbezogenen Medizin könnte in der Therapie von nebenwirkungsbedingter Xerostomie oder therapierefraktärer Mukositis Anwendung finden. Geschädigte Schleimhäute der Kopf-Hals-Region könnten von der Gabe von MSCs profitieren. Erforderlich dafür ist eine gute Erreichbarkeit und einfache, komplikationsarme Entnahme der Ursprungszellen. Der Vorteil dieser personalisierten Therapie liegt in der autologen Transplantation, die frei von Abstoßungsreaktionen und GvHD ist. Gleichzeitig profitiert der Patient von den immunmodulatorischen und entzündungsunterstützenden Eigenschaften der Zellen (Jakob et al. 2020). Man könnte besser auf die individuellen Bedürfnisse des Patienten eingehen. Bei der Bewertung dieser therapeutischen Option sollten neben dem finanziellen auch der zeitliche Aufwand berücksichtigt werden: Die Gesamtdauer beträgt rund fünf bis sechs Monate (4-6 Wochen für die Isolation und das Passagieren, 12-14 Wochen für die Reprogrammierung und 4-6 Wochen für die Differenzierung).

Da iPS-Zellen je nach Reprogrammierungsmethode Teratomwachstum förderten, stellt sich die Frage, ob auch iP-MSCs diese Eigenschaft besitzen. Chen und Kollegen (2012) beobachteten im Mausmodell keine Tumorzunahme durch iP-MSCs, während bei zwei von drei Mäusen Tumorstadium durch undifferenzierte iPS-Zellen zu beobachten war. Dies würde, falls die Ergebnisse auf humane Zellen übertragbar sind, ein großes klinisches Risiko für die Patientensicherheit darstellen und die Auswahl einer sicheren Reprogrammierungsmethode müsste sorgfältig vorgenommen werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass iP-MSCs eine vielversprechende Erweiterung für die patientenspezifische und personalisierte Stammzelltherapie darstellen können. Diese Zellen besitzen eine große Bandbreite an möglichen Einsatzmöglichkeiten, jedoch sind vor der Applikation breit angelegte Untersuchungen über mögliche Nebenwirkungen, Interaktionen und ihren Nutzen durchzuführen. Die in dieser Studie etablierte Methode der Differenzierung könnte auch bei anderen Ursprungszellen Anwendung finden.

4.4 Vergleich von mMSCs, iPS-Zellen und iP-MSCs

In vergleichenden Versuchen wurden Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Stammzellen herausgearbeitet. Dabei stehen vor allem die Vergleiche der mMSCs und iP-MSCs im Vordergrund, weil beide Zellpopulationen für den therapeutischen Einsatz diskutiert werden und sich auf den ersten Blick sehr ähneln. Wie beschrieben, erfüllen MSCs und iP-MSCs aufgrund ihres Oberflächenprofils die Kriterien der „Society for cell therapy for classification of MSCs“, während die iPS-Zellen nur für CD90 ein positives Signal zeigten. CD90 (Thy-1-Membran-Glykoprotein) ist ein Oberflächenprotein, welches u. a. auf T-Lymphozyten, mesenchymalen und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird (Kumar et al. 2016). 2007 wurden 59 humane embryonale Stammzellen von der internationale Stammzellinitiative charakterisiert. Dabei fiel auf, dass CD90 bei allen untersuchten Zelllinien exprimiert wurde (International Stem Cell Initiative et al. 2007). CD90 wird als Zelltypmarker für hämatopoetische Stammzellen verwendet und ist mit Pluripotenz assoziiert. Das erklärt, warum dieser Marker auch auf iPS-Zellen exprimiert wird (Abujarour et al. 2013).

Des Weiteren war zu beobachten, dass iP-MSCs im Vergleich zu mMSCs vermehrt Oberflächenproteine exprimieren. Der Grund für die unterschiedlichen Werte zwischen den Zellpopulationen wurde von Ho und Kollegen (2008) diskutiert. Sie beschrieben, dass iP-MSCs nach der Differenzierung homogener sind und eine höhere Reinheit besitzen als isolierte MSCs aus dem Ursprungsgewebe. Somit kann angenommen werden, dass hohe Delta-M-Werte für eine homogener Zellpopulation sprechen.

Beim Vergleich der Expression verschiedener Pluripotenzgene zeigte sich, dass einige MSCs in Relation schwächere Expressionslevel für OCT4, NANOG und LIN28 aufwiesen. Diese Ergebnisse könnten falsch-positive Signale sein, da methodisch Fehler nicht auszuschließen sind und keine Negativkontrollen mitgeführt wurden. Zur Bestätigung der Daten wären humane Fibroblasten als Negativkontrolle passend gewesen. Insbesondere bei SOX2 muss beachtet werden, dass es sich hierbei um ein Intron-freies Gen handelt und daher die Größe der PCR-Produkte von cDNA und genomischer DNA identisch sind. Daher sind hier Negativkontrollen zur Vermeidung von falsch-positiven Ergebnissen von essenzieller Bedeutung.

Dass es sich um falsch-positive Ergebnisse handeln könnte, wird durch Daten von Lengner und Kollegen nahegelegt, die zeigten, dass OCT4 in MSCs keine Rolle spielt (Lengner et al. 2007; Lengner et al. 2008). Allerdings konnte für NANOG bei frisch isolierten MSCs aus Knochenmark und Fettgewebe eine Expression dargestellt werden (Pierantozzi et al. 2011). Derartige Unklarheiten sollten in zukünftigen Experimenten durch eine breitere methodische Absicherung vermieden werden.

Ein Zusammenhang zwischen der Expression der Gene in MSCs und iP-MSCs und der unterschiedlichen Differenzierung oder Proliferation konnte nicht festgestellt werden.

Bei der Betrachtung der Färbungen konnten für Vimentin Ergebnisse von Chen und Kollegen repliziert werden: Vimentin, welches als Typ 3-Intermediärfilament ein wichtiger Bestandteil des Zytoskelett der mesenchymalen Zellen ist, konnte in unserer Studie bei mMSCs und iP-MSCs nachgewiesen werden (Chen et al. 2012). Erwartungsgemäß zeigten die iP-PS-Zellen ein Vimentin-negatives Bild. Wie bereits für ASCs beschrieben, zeigen MSCs auch eine OCT4-Expression auf, welche jedoch im Vergleich zu iP-PS-Zellen geringer ist (Sachs et al. 2012). Unsere Färbungen von MSCs und iP-MSCs bestätigen diese Beobachtungen, da sich der Nukleolus von mMSCs und iP-MSCs anfärben ließ, während die iP-PS-Zellen in der gesamten Zelle OCT-4 exprimieren. Somit könnte geschlossen werden, dass MSCs stammzelltypische Eigenschaften wie Selbsterneuerung und Differenzierbarkeit besitzen.

Jedoch ist an dieser Stelle zu betonen, dass keine Spezifität der Antikörper nachgewiesen und daher unter Umständen eine falsch-positive OCT4-Proteinexpression dargestellt wurde. Der Nachweis der Spezifität wäre jedoch wichtig, da in der Vergangenheit gezeigt werden konnte, dass sich auch in nachgewiesenermaßen OCT4-negativen Zellen positive Signale darstellen lassen (Warthemann et al. 2012).

Bei dem Vergleich der verschiedenen Stammzellpopulationen sollte auch deren Vitalität und Proliferationsfähigkeit betrachtet werden. 2010 zeigten Lian und Kollegen (2010), dass die iP-MSCs eine zehnfach höhere Telomeraseaktivität besitzen als isolierte MSCs aus dem Knochenmark. Gleichzeitig zeigte die Arbeitsgruppe Koch (2013), dass iP-PS-Zellen keine Seneszenz haben. Wie auch in der vorliegenden Studie beobachtet wurde, lassen sich iP-PS-Zellen über zahlreiche Passagen expandieren, ohne dass eine Reduzierung der Proliferation oder eine Veränderung des Differenzierungspotentials festzustellen war. Die Hypothese, dass differenzierte iP-MSCs eine Telomeraseaktivität beibehalten und somit im Vergleich zu mMSCs eine größere Zellproliferationsfähigkeit haben, wurde von der Arbeitsgruppe Fernandez-Rebollo (2020) widerlegt. Es wurde beobachtet, dass iP-MSCs Seneszenz-assoziierte Veränderungen wie den Verlust des Differenzierungspotenzials, die Erhöhung des Seneszenzmarkers SA- β -Gal und Wachstumsstillstand auftreten. Diese Ergebnisse sind von Relevanz bei der Planung und Umsetzung weiterer klinischer Studien.

Des Weiteren weisen MSCs zahlreiche immunmodulatorische Fähigkeiten auf, die bei Entzündungen oder Geweberegeneration eine große Rolle spielen (Munir et al. 2018). Erste vergleichende Versuche zwischen isolierten ASCs und iP-MSCs im Mausmodell wiesen ähnliche Fähigkeiten nach (Soontararak et al. 2018). Ein Vergleich zwischen ortsständigen MSCs aus dem Kopf-Hals-Bereich und iP-MSCs bezüglich der Telomeraseaktivität und den immunmodulatorischen Fähigkeiten könnte Inhalt weiterer Studien sein.

Aus unseren vergleichenden Studien lässt sich das Fazit ziehen, dass sich MSCs und iP-MSCs stark ähneln, wenngleich einige Ungleichheiten und Unklarheiten bestehen. Die iP-PS-Zellen stellen eine ideale, ethisch konforme Stammzellquelle dar. Ob eine genaue Übertragbarkeit

der Daten von anderen Zellpopulationen auf MSCs der Kopf-Hals-Region möglich ist, sollte Inhalt weiterer Forschung sein.

4.5 MSCs behalten unter Bestrahlung ihre Zelleigenschaften

In dieser Arbeit wurde erstmalig der Einfluss der Bestrahlung auf humane mMSCs thematisiert und untersucht, wie sich deren Wachstumsverhalten und immunologische Funktionalität verändern.

Bestrahlungsinduzierte Xerostomie gehört zu den häufigsten Nebenwirkungen in der Therapie von Kopf-Hals-Tumoren. Ein diskutierter Therapieansatz ist die Verwendung von MSCs, die dank ihrer regenerativen und immunologischen Fähigkeiten für die Geweberegeneration und Wundheilung einsetzbar wären. MSCs aus dem Knochenmark, Fettgewebe und der Nabelschnur wurden hinsichtlich ihres Verhaltens auf Bestrahlung bereits in einigen Studien untersucht (Li J et al. 2007; Jeong et al. 2013; Maria et al. 2016), während nun erstmals MSCs aus dem Kopf-Hals-Bereich zu dieser Fragestellung in der vorliegenden Studie untersucht wurden. Darüber hinaus wurden die Zellen in den vergleichbaren Studien nur bis zu einer maximalen Bestrahlungsdosis von 12 Gy erforscht, während unsere Arbeitsgruppe die MSCs fraktioniert bis zu 20 Gy bestrahlen konnte, was einen deutlich repräsentativeren Einblick in das Bestrahlungsverhalten der Zellen erlaubt.

MSCs-definierende Merkmale wie ihre spindelartige Morphologie und die Expression von MSC-spezifischen Zelloberflächenmarkern blieben auch nach Bestrahlung erhalten. Die Ergebnisse decken sich mit denen anderer untersuchten MSCs (Pittenger et al. 1999; Takemitsu et al. 2012). Rühle et al. (2018) bestrahlten BM-MSCs und ASCs bis 8 Gy, und auch hierbei zeigten sich weder Veränderungen des morphologischen Erscheinungsbildes noch signifikante Unterschiede in der Expression positiver Zelloberflächenmarker. Die Apoptoserate der bestrahlten MSCs stieg mit zunehmender Bestrahlungsdosis leicht an. Zeitgleich nahm die Koloniebildungsfähigkeit unter Bestrahlung signifikant ab. Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen von BM-MSCs und ASCs, die unter Bestrahlung eine reduzierte Fähigkeit der Koloniebildung aufwiesen. Nicolay und Kollegen (2015) beobachteten signifikant verminderte CFU-Werte bei einer Bestrahlung von 10 Gy. In unserer Studie konnte außerdem ein Unterschied zwischen den Zellpopulationen beobachtet werden: Die Abnahme der Koloniebildungsfähigkeit der pMSCs war stärker ausgeprägt als bei mMSCs. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass pMSCs strahlensensibler sind als mMSCs. Ein Grund dafür könnte eine höhere intrinsische Bestrahlungsempfindlichkeit der pMSCs sein (Kotenko et al. 2012; Jakob et al. 2013). Das hat zur Folge, dass durch die verminderte Bildung von Kolonien auch die Anzahl an verfügbaren Stammzellen verringert ist, was zu einer Beeinträchtigung der Regenerations-

und Wundheilungskapazität führen kann. Eng verwandt zur Apoptoserate und Koloniebildungsfähigkeit stellt die Proliferationsfähigkeit eine weitere Methode zur Untersuchung der Zellvitalität dar. Die Arbeitsgruppe Jeong (2016) bestrahlten Mäuse und isolierten anschließend ASCs. Sie konnten eine verminderte Proliferation der bestrahlten Mäuse-ASCs zeigen. Da wir in unserer Studie eine erhöhte Apoptoserate und eine verminderte Koloniebildungsfähigkeit bei Bestrahlung beobachten konnten, liegt die Vermutung nahe, dass unter ionisierender Bestrahlung die Proliferationsrate der MSCs abnimmt.

Zusammenfassend lassen sich die in unserer Studie erhobene Befunde mit den Vorarbeiten zu MSCs von anderem Ursprungsgewebe in Einklang bringen. Zum einen werden die charakteristischen MSC-Eigenschaften durch Bestrahlung beibehalten, zum anderen sinkt die Proliferations- und steigt die Apoptoserate.

4.6 MSCs bleiben nach Bestrahlung immunologisch aktiv

MSCs besitzen zahlreiche immunmodulatorische Eigenschaften, die bereits bei unbestrahlten Zellen nachgewiesen wurden. Dazu gehört die Fähigkeit der Zellmigration, die den Zellen erlaubt, zum Ort der Schädigung zu wandern und dort Entzündungsreaktionen auszulösen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die Bestrahlung für beide Zellpopulationen keinen Einfluss auf die Migration hatte. Da Bestrahlung eine wichtige Säule im Therapiekonzept der Kopf-Hals-Tumoren darstellt, lassen die Daten darauf schließen, dass die ortsansässige MSCs in der Mukosa auch nach Bestrahlung den Entzündungsprozess unterstützen. Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen überein, die BM-MSCs und ASCs bestrahlten (Nicolay et al. 2013; Rühle et al. 2018).

Neben der Migration wurde auch die Expression der Chemokine nach Bestrahlung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung einen positiven Effekt auf die Expression der Chemokin-Rezeptoren bei mMSCs hatte. Chemokine spielen im Wundheilungsprozess bekanntlich eine wichtige Rolle: Sie modulieren die Leukozyten-Migration (vor allem Neutrophile und Monozyten) und die Leukozyten-Aktivierung im entzündeten Gewebe und regulieren die Angiogenese - besonders die CXC-Familie (Keane und Strieter 1999; Fernandez und Lolis 2002). Das in dieser Studie untersuchte Interleukin IL-6 reguliert Angiogenese, Kollagenanhäufung und Leukozyteninfiltration und ist gleichzeitig an der Zellproliferation, Apoptose und Differenzierung beteiligt (Kishimoto et al. 1995; Lin et al. 2003). IL-8 fördert die Zellmigration und Chemotaxis von Keratinozyten sowie die Ablagerung von Fibronectin und Kollagen während des Wundheilungsprozesses (Feugate et al. 2002; Jones 2005; Pricola et al. 2009). Die durch IL-8 vermittelte CXCL8-CXCR1-Interaktion induziert die Exozytose von Granula und erleichtert die neutrophile

Immunfunktion (Jones et al. 1996; Charo und Ransohoff 2006). Die hier untersuchten mMSCs und pMSCs sekretieren auch nach Bestrahlung große Mengen an IL-6 und IL-8. Bei steigenden Bestrahlungsdosen zeigte sich eine leichte Tendenz zu einer vermehrten Interleukinsekretion. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Wundheilungseigenschaften der mMSCs, die durch IL-6 und IL-8 gefördert werden, durch die Bestrahlung nicht negativ beeinflusst werden und die Kommunikation mit den Immunzellen erhalten bleibt. Die gemessenen Werte der Interleukin-Sekretion sind vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die ASC mit 12 Gy bestrahlten und ebenfalls keine verminderte Interleukin-Sekretion zeigten (Haubner et al. 2013). Des Weiteren konnte bereits für mMSCs nachgewiesen werden, dass die Sekretion von IL-6 und IL-8 nach Exposition mit dem bakteriellen Endotoxin LPS steigt (Jakob et al. 2013; Brandau et al. 2014). Da Strahlung bekanntermaßen als Nebenwirkung Mukositis verursacht, wäre somit eine erhöhte Zytokin-Sekretion zu erwarten. Daraus ist zu schlussfolgern, dass Bestrahlung keinen negativen Einfluss auf die Entzündungsmediatoren hat, sondern der Wundheilungsprozess durch hohe Interleukin-Sekretion weiterhin unterstützt wird und mMSCs modulierende Fähigkeiten in Wundheilungsprozessen innehaben. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass humane MSCs aus dem Kopf-Hals-Bereich die Genexpression der Chemokinrezeptoren nach Bestrahlung nicht signifikant herunterregulieren, was die Wundheilung unterstützt.

Als Resümee lässt sich festhalten, dass in dieser Studie erstmalig die Aufrechterhaltung der Immunfunktionen von MSCs aus der Kopf-Hals-Bereich nach Bestrahlung bestätigt werden konnte. Im Vergleich zu vielen anderen Studien, wurden dabei die Zellen bis zu einer Bestrahlungsdosis von 20 Gy untersucht, was einem Drittel der therapeutischen Bestrahlung entspricht.

4.7 Therapeutische Anwendung von MSCs nach Bestrahlungsschaden

Die Erfolgsrate des therapeutischen Einsatzes von MSCs zur Unterstützung der Geweberegeneration nach Tumorsektion und Bestrahlung hängt weitgehend von ihrer Fähigkeit ab, ihr immunmodulatorisches Potenzial auch während und nach der Strahlentherapie zu erhalten. In diesem Zusammenhang stellen sich Fragen bezüglich Wanderung zum Entzündungsort, Patientensicherheit und Zeitpunkt der Applikation.

Das durch Bestrahlung geschädigte inflammatorische Gewebe sekretiert zahlreiche Mediatoren wie Zytokine und Wachstumsfaktoren, die Entzündungszellen anlocken (Curi et al. 2016). Außerdem wurde beschrieben, dass gewebeansässige MSCs nach einer Stimulation von Lipopolysacchariden vermehrt Zytokine sekretieren (Jakob et al. 2013). Das könnte genutzt werden, um die Zellen zum Ort des Geschehens zu lenken. Lombaert und Kollegen

(2006) zeigten, dass BM-MSCs durch zusätzlich applizierten G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) in die durch Bestrahlung verletzte Speicheldrüse einwandern. Somit wäre denkbar, dem Patienten MSCs aus dem Kopf-Hals-Bereich gemeinsam mit Entzündungsmediatoren per Transfusion zu applizieren, um damit die Zellen an den richtigen Ort zu lenken.

Allerdings sollte die Interaktion zwischen Stammzellen und dem zu behandelnden Tumor nicht vernachlässigt werden. Da MSCs Zytokine und Wachstumsfaktoren sekretieren, könnten sie sogar den Tumor in seinem Wachstum und seiner Angiogenese unterstützen (Melzer et al. 2018). Ein Vorteil bei der Applikation von MSCs ist deren Hypo-Immunogenität. Sie können sicher bei allogenen Transplantationen verwendet werden, da sie selten Abstoßungsreaktionen hervorrufen. Darüber hinaus zeigen sie entzündungshemmende und modulatorische Wirkungen, die vor allem durch die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 gefördert werden (Chen et al. 2009; Deak et al. 2010; Shin et al. 2017).

MSCs besitzen die Funktion und Fähigkeit der Geweberegeneration. In unserer Studie konnten wir zeigen, dass trotz ionisierender Bestrahlung und einhergehender Schädigung der Zellen die Fähigkeit der Geweberegeneration nicht abnahm. Dazu veröffentlichten Kim und Kollegen (2019) eine Studie, in der sie Mäusen humane ASCs injizierten und sie anschließend bestrahlten. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche keine ASCs erhielten und nur bestrahlt wurden, konnte eine Geweberegeneration (Erhöhung des endothelialen Markers CD31, mehr muzinhaltige Azini) und eine Steigerung der Amylase-Sekretion beobachtet werden. Die Studiengruppe um Guo et al. (2018) bestrahlte Spitzmäuse und fand heraus, dass sie eine erhöhte Überlebensrate nach Gabe von humanem Nabelschnur-MSCs aufwies. Kotenko und Kollegen (2012) untersuchten die Anwendung von menschlichen MSCs bei der Regeneration lokaler Strahlenschäden sowohl bei Ratten als auch bei zwei Menschen und zeigten eine vollständige Heilung der Läsionen nach der Stammzellapplikation. Daher ist eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus denkbar.

Hinsichtlich des Zeitpunkts der Applikation wäre eine Option, MSCs vor der Bestrahlung zu entnehmen und erst im Anschluss an die Strahlenbehandlung zu applizieren. Der Vorteil würde darin liegen, dass die Zellen von der Bestrahlung verschont würden.

Wir beobachteten, dass durch Bestrahlung die Proliferationsfähigkeit der MSCs abnahm und die Apoptoserate anstieg, während sie gleichzeitig ihre immunologischen Fähigkeiten beibehielten. Auf der einen Seite könnten die gewebeansässigen MSCs, die während der Bestrahlung im Gewebe verbleiben, vom Zusammenspiel mit diesen Zellen bezüglich ihrer Vitalität profitieren. Auf der anderen Seite könnten sie als Zielzellen für die applizierten unbestrahlten MSCs fungieren, da sie wegen ihrer Bestrahlungsschädigung Entzündungsmediatoren freisetzen. Eine in-vivo-Untersuchung im Mausmodell mit

bestrahlten und unbestrahlten Stammzellen wäre ein vielversprechender Forschungsansatz, um die Verknüpfung der verschiedenen Zellpopulationen zu untersuchen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit erneut die zahlreichen klinischen Anwendungsmöglichkeiten von MSCs aus der Kopf-Hals-Region. Da sie ihr migratorisches Potential und die Interaktionsfähigkeit mit anderen Immunzellen über Zytokine und Chemokine während der ersten zwei Wochen der Strahlenbehandlung beibehalten, könnten die hier untersuchten Zellen ein hohes therapeutisches Potenzial haben, welches weiter untersucht werden muss. Jedoch verlieren sie ihr Replikationspotenzial, wodurch es zur Erschöpfung des lokalen MSC-Pools nach der Bestrahlung kommen könnte. Um die Heilung des therapierten Gewebes zu unterstützen, ist die Gabe weiterer MSCs nach Bestrahlung denkbar.

4.8 Ausblick

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lassen sich weitere Fragestellungen formulieren. So wäre es interessant zu untersuchen, ob es einen idealen Zeitpunkt der Reprogrammierung gibt, um die vitalsten und aktivsten Ausgangszellen zu verwenden. Dazu gehört neben der Prüfung der Proliferationsfähigkeit die Messung der Seneszenz durch SA- β -Galaktosidase. Außerdem bestärkt der in einem neuen Kontext erfolgreiche Einsatz etablierter Verfahren zur Differenzierung von iP-MSCs zu weiteren vergleichenden Untersuchungen, wie beispielsweise im Hinblick auf immunologische Fähigkeiten, zwischen mMSCs und iP-MSCs.

Da MSCs aus der Kopf-Hals-Region verhältnismäßig einfach isoliert werden können, Geweberegeneration und Immunmodulation betreiben, keine Assoziation mit unkontrollierter Differenzierung teratogener Entartung besitzen und frei von immunogenen Abstoßungsreaktionen sind, könnten sie eine neue therapeutische Option bei Xerostomie darstellen. Ob dies auch für iP-MSCs zutrifft oder sie sogar geeigneter für die Anwendung sind, sollte in vergleichenden Studien weiter untersucht werden.

Zu welchem Zeitpunkt die therapeutische Anwendung erfolgen sollte und ob die intravenöse einer intraglanduläre Injektion von Stammzellen vorzuziehen ist, sollte künftig in Tierversuchsmodellen geklärt werden. In diesem Kontext sollte auch das Zusammenspiel bestrahlter und unbestrahlter MSCs im Organismus untersucht werden.

Die in unserer Studie erhobenen *in vitro* Befunde geben zahlreiche Ansätze und Ideen zum therapeutischen Einsatz am Menschen. Daher sollte die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das Mausmodell und den Menschen angestrebt werden.

5 Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit wurden erfolgreich mesenchymale Stammzellen (MSCs) aus der humanen nasalen Mukosa (mMSC) und der Glandula Parotis (pMSC) isoliert. Die mMSCs und pMSCs wiesen alle MSC-typische Charakteristika wie Plastikadhärenz, fibroblastenartige Morphologie, reges Proliferationsverhalten, typische Oberflächenantigen-Expression und adipogenes, osteogenes und chondrogenes Differenzierungspotenzial auf.

Anschließend wurden mMSCs von vier gesunden Spendern induziert pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) reprogrammiert. Pro Patient wurden zwei Zelllinien etabliert und charakterisiert. Sowohl das morphologische Bild der Kolonien pluripotenter Zellen als auch die Färbung für die aktive alkalische Phosphataseaktivität gaben Hinweise auf das Vorhandensein von Pluripotenz. Eine weitere Bestätigung erfolgte durch die Expression der entsprechenden Pluripotenzgene (u. a. *NANOG*, *OCT4* und *SOX2*). Die Differenzierung in die drei Keimblätter Mesoderm, Endoderm und Ektoderm bestätigte die Pluripotenz und die Selbsterneuerungsfähigkeit der Zellen.

Aus den iPS-Zellen wurden im nächsten Schritt induzierte pluripotente abhängige mesenchymale Stammzellen (iP-MSCs) differenziert. Diese MSC-ähnlichen Zellen wiesen ebenfalls die stammzellspezifischen Charakteristika auf: Die Morphologie der Zellen stimmte mit dem morphologischen Bild der mMSCs überein, die Oberflächenantigen-Expression der iP-MSCs glich den mMSCs und die iP-MSCs wiesen ein adipogenes, osteogenes und chondrogenes Differenzierungspotenzial auf.

Das Proliferationsverhalten von mMSCs *in vitro* nimmt mit zunehmender Kultivierungsdauer ab, während iPS-Zellen eine annähernd unendliche Zellquelle darstellen. Somit stellen iP-MSCs eine vielversprechende Alternative dar. Erstmals wurden in dieser Studie iP-MSCs aus humanen mMSCs differenziert und morphologische und genetische Gemeinsamkeiten zwischen den isolierten mMSCs und den differenzierten iP-MSCs gefunden. Basierend auf den in dieser Studie erzielten Ergebnissen müssen weitere vergleichende Studien hinsichtlich Proliferationsverhalten, immunologischen Fähigkeiten und Einsatzmöglichkeiten durchgeführt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Verhalten von MSCs aus der Kopf-Hals-Region auf ionisierende Bestrahlung untersucht. Wie Patienten, die eine Bestrahlungstherapie erhalten, wurden die isolierten pMSCs und mMSCs fraktioniert bestrahlt.

Sowohl morphologisch als auch durchflusszytometrisch konnten bis zu einer Dosis von zehn Gray keine Unterschiede zu unbestrahlten Kontrollzellen erkannt werden. Die Fähigkeit, Kolonien zu bilden, nahm mit steigender Bestrahlung ab, während die Apoptoserate mit zunehmender Bestrahlungsdosis zunahm. Des Weiteren wurde in der Arbeit festgestellt, dass ionisierende Bestrahlung weder Einfluss auf das Migrationsverhalten der Zellen noch auf die Interaktion mit anderen Immunzellen mittels Zytokinen und

Chemokinen hatte, sondern dass diese Fähigkeiten auch nach Bestrahlung beibehalten wurde.

Mesenchymale Stammzellen nehmen Einfluss auf das Regenerationsverhalten und den Wundheilungsprozess und stellen einen therapeutischen Ansatz für die Behandlung strahleninduzierter Xerostomie und Mukositis dar. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten geben erstmalig Einblicke, wie MSCs aus der Kopf-Hals-Region auf Bestrahlung reagieren. Gegenstand weiterer Forschung sollten beispielsweise In-vivo-Experimente oder eine Erweiterung durch iP-MSCs sein.

6 Anhang

Immunphänotypische Charakterisierung der iPS-Zellen

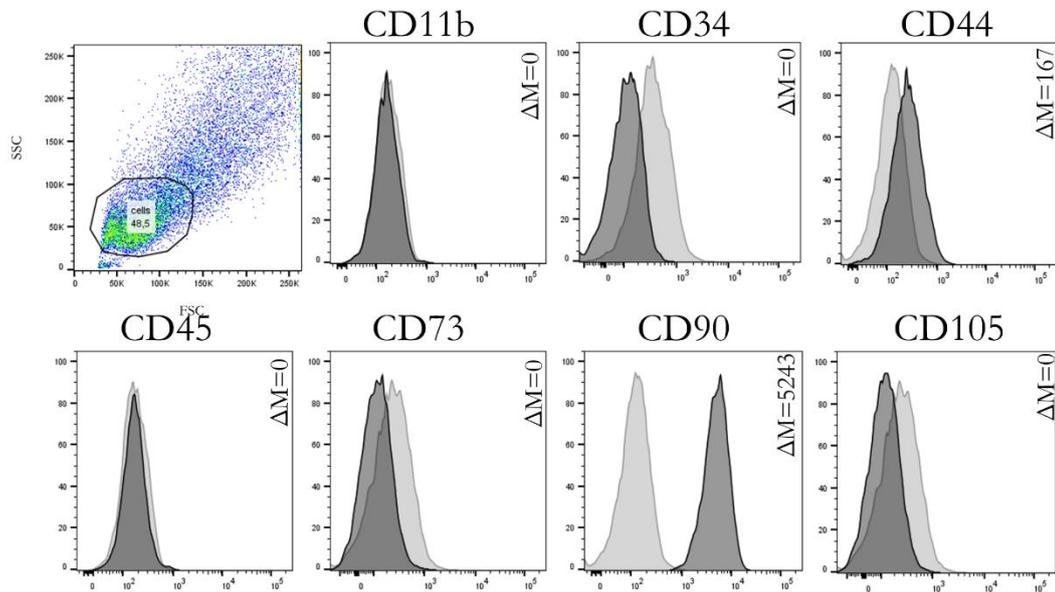


Abb. 32: Expression der Oberflächenmarker von iPS-Zellen. In der FACS-Analyse wurden CD11b, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90 und CD105 untersucht. Dabei war nur CD90 positiv. Schwarz: Antikörperfluoreszenz, Grau: Isotyp-Kontrolle. Die Abbildung zeigt repräsentative Ergebnisse von einem aus drei unabhängigen Patienten.

Ablauf der Differenzierung zu iP-MSCs

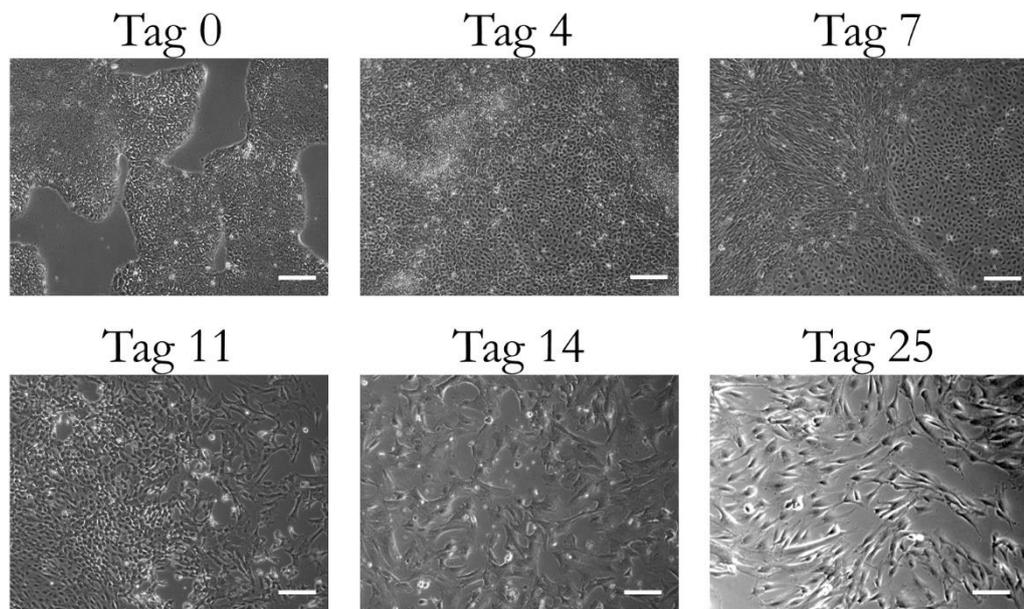


Abb. 33: Verlauf der Differenzierung von iPSC-Zellen in iP-MSCs. Die Differenzierung der iPSC-Zellen zu iP-MSCs dauerte ca. vier Wochen. In der Abbildung wird repräsentativ an einem Patienten deutlich, wie sich die iPSC-Zellen langsam zu fibroblastenartigen Zellen differenzieren. Skalierung: 100 μm .

Annexin Apoptose Assay

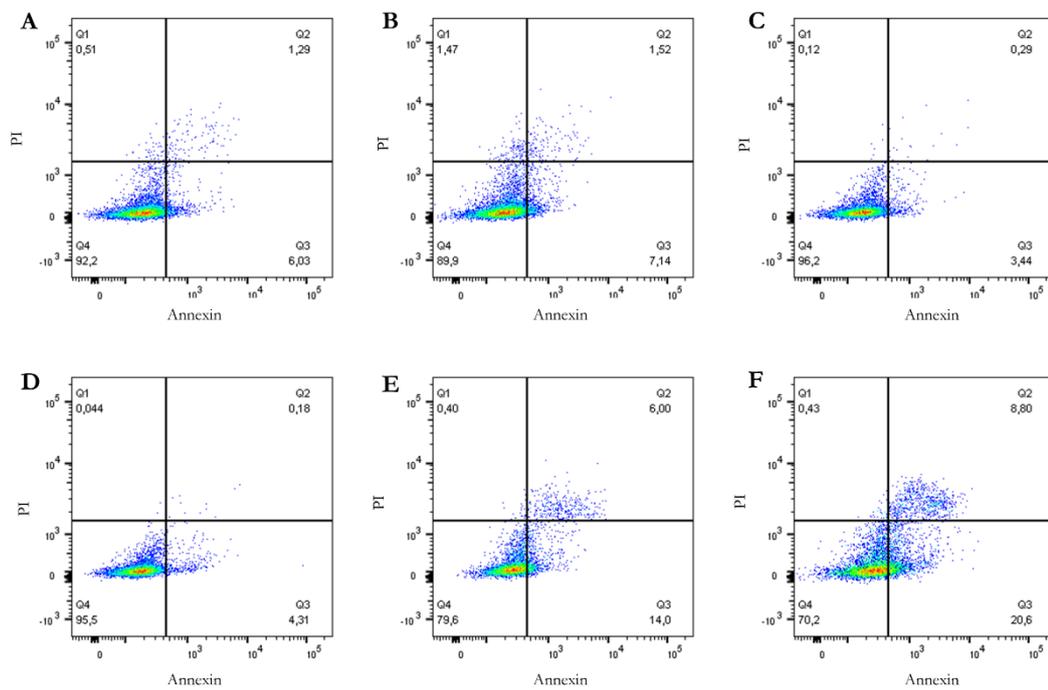


Abb. 34: Annexin-PI-Apoptose-Assay. Repräsentative Abbildung von mMSC1 des Annexin-PI-Apoptose Assay. **A:** unbestrahlte Kontrollzellen, **B:** Zellen nach 4 Gy Bestrahlung, **C:** Zellen nach 8 Gy Bestrahlung, **D:** Zellen nach 12 Gy Bestrahlung, **E:** Zellen nach 16 Gy Bestrahlung, **F:** Zellen nach 20 Gy Bestrahlung. Mit Hilfe der Annexin- und PI-Färbung können die Zellen in lebende (Q4), apoptotische (Q3) und nekrotische (Q2) Zellen unterschieden werden.

7 Literaturverzeichnis

- Abujarour R, Valamehr B, Robinson M, Rezner B, Vranceanu F, Flynn P (2013): Optimized surface markers for the prospective isolation of high-quality hiPSCs using flow cytometry selection. *Sci Rep* **3**, 1179
- Andre K, Schraub S, Mercier M, Bontemps P (1995): Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: a case-control study in the Doubs region of France. *Eur J Cancer B Oral Oncol* **31B**, 301–309
- Anniko M, Union of European Medical Societies (Hrsg.): Otorhinolaryngology, head and neck surgery (European manual of medicine). Springer, Heidelberg 2010
- Antonadou D, Pepelassi M, Synodinou M, Puglisi M, Throuvalas N (2002): Prophylactic use of amifostine to prevent radiochemotherapy-induced mucositis and xerostomia in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **52**, 739–747
- Asumda FZ, Hatzistergos KE, Dykxhoorn DM, Jakubski S, Edwards J, Thomas E, Schiff ER (2018): Differentiation of hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells using small molecules. *Differ Res Biol Divers* **101**, 16–24
- Avila JL, Grundmann O, Burd R, Limesand KH (2009): Radiation-Induced salivary gland dysfunction results from p53-dependent apoptosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **73**, 523–529
- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R (2003): Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* **17**, 126–140
- Bar-Nur O, Russ HA, Efrat S, Benvenisty N (2011): Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell Stem Cell* **9**, 17–23
- Benderitter M, Caviggioli F, Chapel A, Coppes RP, Guha C, Klinger M, Malard O, Stewart F, Tamarat R, van Luijk P, et al. (2014): Stem cell therapies for the treatment of radiation-induced normal tissue side effects. *Antioxid Redox Signal* **21**, 338–355
- Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA (2008): An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* **40**, 499–507
- Bergfeld SA, Blavier L, DeClerck YA (2014): Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote survival and drug resistance in tumor cells. *Mol Cancer Ther* **13**, 962–975
- Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefèbvre JL, Greiner RH, Giralt J, Maingon P, Rolland F, Bolla M et. al (2004): Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med* **350**, 1945–1952
- Bertho JM, Mathieu E, Lauby A, Frick J, Demarquay C, Gourmelon P, Gorin NC, Thierry D (2004): Feasibility and limits of bone marrow mononuclear cell expansion following irradiation. *Int J Radiat Biol* **80**, 73–81
- Bianco P, Robey PG (2001): Stem cells in tissue engineering. *Nature* **414**, 118–121
- Biel NM, Santostefano KE, DiVita BB, El Roubi N, Carrasquilla SD, Simmons C, Nakanishi M, Cooper DeHoff RM, Johnson JA, Terada N (2015): Vascular smooth muscle cells from hypertensive patient-Derived induced pluripotent stem cells to advance hypertension pharmacogenomics. *Stem Cells Transl Med* **4**, 1380–1390

- Boink MA, van den Broek LJ, Roffel S, Nazmi K, Bolscher JGM, Gefen A, Veerman ECI, Gibbs S (2016): Different wound healing properties of dermis, adipose, and gingiva mesenchymal stromal cells. *Wound Repair Regen* 24, 100–109
- Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B (2006): Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol* 7, 14
- Bonuccelli G, Avnet S, Grisendi G, Salerno M, Granchi D, Dominici M, Kusuzaki K, Baldini N (2014): Role of mesenchymal stem cells in osteosarcoma and metabolic reprogramming of tumor cells. *Oncotarget* 5, 7575–7588
- Borchert T, Hübscher D, Guessoum CI, Lam TDD, Ghadri JR, Schellinger IN, Tiburcy M, Liaw NY, Li Y, Haas J, et al. (2017): Catecholamine-Dependent β -Adrenergic Signaling in a Pluripotent Stem Cell Model of Takotsubo Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 70, 975–991
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, et al. (2005): Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947–956
- Braam PM, Roesink JM, Moerland MA, Raaijmakers CPJ, Schipper M, Terhaard CHJ (2005): Long-term parotid gland function after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62, 659–664
- Brandau S, Jakob M, Bruderek K, Bootz F, Giebel B, Radtke S, Mauel K, Jäger M, Flohé SB, Lang S (2014): Mesenchymal stem cells augment the anti-bacterial activity of neutrophil granulocytes. *PLoS ONE* 9, e106903
- Brennan KJ, Simone A, Jou J, Gelboin-Burkhardt C, Tran N, Sangar S, Li Y, Mu Y, Chen G, Yu D, et al. (2011): Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* 473, 221–225
- Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C (Hrsg.): *TNM classification of malignant tumours*. 8. Auflage; John Wiley & Sons, Inc, Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ 2017
- Brimble SN, Sherrer ES, Uhl EW, Wang E, Kelly S, Merrill AH, Robins AJ, Schulz TC (2007): The cell surface glycosphingolipids SSEA-3 and SSEA-4 are not essential for human ESC pluripotency. *Stem Cells Dayt Ohio* 25, 54–62
- Brizel DM, Wasserman TH, Henke M, Strnad V, Rudat V, Monnier A, Eschwege F, Zhang J, Russell L, Oster W, Sauer R (2000): Phase III randomized trial of amifostine as a radioprotector in head and neck cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 18, 3339–3345
- Bruno S, Collino F, Deregibus MC, Grange C, Tetta C, Camussi G (2013): Microvesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells inhibit tumor growth. *Stem Cells Dev* 22, 758–771
- Cantinieux D, Quertainmont R, Blacher S, Rossi L, Wanet T, Noël A, Brook G, Schoenen J, Franzen R (2013): Conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves recovery after spinal cord injury in rats: an original strategy to avoid cell transplantation. *PLoS One* 8, e69515
- Caplan AI (1991): Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9, 641–650
- Carton M, Barul C, Menvielle G, Cyr D, Sanchez M, Pilorget C, Trétarre B, Stücker I, Luce D (2017): Occupational exposure to solvents and risk of head and neck cancer in women: a population-based case-control study in France. *BMJ Open* 7, e012833

- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A (2003): Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643–655
- Charo IF, Ransohoff RM (2006): The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354, 610–621
- Chen AM, Daly ME, Farwell DG, Vazquez E, Courquin J, Lau DH, Purdy JA (2014): Quality of life among long-term survivors of head and neck cancer treated by intensity-modulated radiotherapy. *JAMA Otolaryngol- Head Neck Surg* 140, 129–133
- Chen L, Tredget EE, Liu C, Wu Y (2009): Analysis of allogenicity of mesenchymal stem cells in engraftment and wound healing in mice. *PloS One* 4, e7119
- Chen X, Chen Y, Hou Y, Song P, Zhou M, Nie M, Liu X (2019): Modulation of proliferation and differentiation of gingiva-derived mesenchymal stem cells by concentrated growth factors: Potential implications in tissue engineering for dental regeneration and repair. *Int J Mol Med* 44, 37–46
- Chen YS, Pelekanos RA, Ellis RL, Horne R, Wolvetang EJ, Fisk NM (2012): Small molecule mesengenic induction of human induced pluripotent stem cells to generate mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cells Transl Med* 1, 83–95
- Clarke MF, Becker MW (2006): Stem cells: the real culprits in cancer? *Sci Am* 295, 52–59
- Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM (2006): Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66, 9339–9344
- Comella K, Bell W (2017): First-in-man intraglandular implantation of stromal vascular fraction and adipose-derived stem cells plus platelet-rich plasma in irradiation-induced gland damage: a case study. *Int Med Case Rep J* 10, 295–299
- Cooper JS, Fu K, Marks J, Silverman S (1995): Late effects of radiation therapy in the head and neck region. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31, 1141–1164
- Coppes RP, Zeilstra LJ, Kampinga HH, Konings AW (2001): Early to late sparing of radiation damage to the parotid gland by adrenergic and muscarinic receptor agonists. *Br J Cancer* 85, 1055–1063
- Coppes RP, Meter A, Latumalea SP, Roffel AF, Kampinga HH (2005): Defects in muscarinic receptor-coupled signal transduction in isolated parotid gland cells after in vivo irradiation: evidence for a non-DNA target of radiation. *Br J Cancer* 92, 539–546
- Curi MM, Cardoso CL, de Lima HG, Kowalski LP, Martins MD (2016): Histopathologic and histomorphometric analysis of irradiation injury in bone and the surrounding soft tissues of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg* 74, 190–199
- Deak E, Seifried E, Henschler R (2010): Homing pathways of mesenchymal stromal cells (MSCs) and their role in clinical applications. *Int Rev Immunol* 29, 514–529
- Diecke S, Lu J, Lee J, Termglinchan V, Kooreman NG, Burrige PW, Ebert AD, Churko JM, Sharma A, Kay MA, Wu JC (2015): Novel codon-optimized mini-intronic plasmid for efficient, inexpensive, and xeno-free induction of pluripotency. *Sci Rep* 5, 8081

- Diederichs S, Tuan RS (2014): Functional comparison of human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal cells and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from the same donor. *Stem Cells Dev* 23, 1594–1610
- Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R (1985): The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87, 27–45
- 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, 315–317
- Dumitru CA, Hemedda H, Jakob M, Lang S, Brandau S (2014): Stimulation of mesenchymal stromal cells (MSCs) via TLR3 reveals a novel mechanism of autocrine priming. *FASEB J* 28, 3856–3866
- Eisbruch A, Schwartz M, Rasch C, Vineberg K, Damen E, Van As CJ, Marsh R, Pameijer FA, Balm AJM (2004): Dysphagia and aspiration after chemoradiotherapy for head-and-neck cancer: which anatomic structures are affected and can they be spared by IMRT? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 60, 1425–1439
- Fernandez EJ, Lolis E (2002): Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 469–499
- Fernandez-Rebollo E, Franzen J, Goetzke R, Hollmann J, Ostrowska A, Oliverio M, Sieben T, Rath B, Kornfeld JW, Wagner W (2020): Senescence-Associated Metabolomic Phenotype in Primary and iPSC-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Rep* 14, 201–209
- Feugate JE, Wong L, Li QJ, Martins-Green M (2002): The CXC chemokine cCAF stimulates precocious deposition of ECM molecules by wound fibroblasts, accelerating development of granulation tissue. *BMC Cell Biol* 3, 13
- Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Ruadkova IA (1974): Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 2, 83–92
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV (1987): Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 20, 263–272
- Frobel J, Hemedda H, Lenz M, Abagnale G, Jousen S, Denecke B, Šarić T, Zenke M, Wagner W (2014): Epigenetic rejuvenation of mesenchymal stromal cells derived from induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep* 3, 414–422
- Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Sasaki K, Hasegawa M (2009): Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85, 348–362
- Galotto M, Berisso G, Delfino L, Podesta M, Ottaggio L, Dallorso S, Dufour C, Ferrara GB, Abbondandolo A, Dini G, et al. (1999): Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp Hematol* 27, 1460–1466
- Gerke S, Taupitz J, Wiesemann C, Kopetzki C, Zimmermann H (Hrsg.): Die klinische Anwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen: ein Stakeholder-Sammelband (Veröffentlichungen des Instituts für Deutsches, Europäisches und Internationales Medizinrecht, Gesundheitsrecht und Bioethik der Universitäten Heidelberg und Mannheim Band 48). Springer, Berlin 2020

- Grønhøj C, Jensen DH, Glovinski PV, Jensen SB, Bardow A, Oliveri RS, Specht L, Thomsen C, Darkner S, Kiss K, et al. (2017): First-in-man mesenchymal stem cells for radiation-induced xerostomia (MESRIX): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* **18**, 108
- Guo DB, Zhu XQ, Li QQ, Liu G-M-Y, Ruan GP, Pang RQ, Chen YH, Wang Q, Wang JX, Liu JF, et al. (2018): Efficacy and mechanisms underlying the effects of allogeneic umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation on acute radiation injury in tree shrews. *Cytotechnology* **70**, 1447–1468
- Guzzo RM, Gibson J, Xu RH, Lee FY, Drissi H (2013): Efficient differentiation of human iPSC-derived mesenchymal stem cells to chondroprogenitor cells. *J Cell Biochem* **114**, 480–490
- Hall EJ: *Radiobiology for the Radiologist*. 4. Auflage; Lippincott, Philadelphia 1994
- Harley CB (1991): Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* **256**, 271–282
- Haubner F, Leyh M, Ohmann E, Pohl F, Prantl L, Gassner HG (2013): Effects of external radiation in a co-culture model of endothelial cells and adipose-derived stem cells. *Radiat Oncol Lond Engl* **8**, 66
- Hayflick L, Moorhead PS (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**, 585–621
- Ho AD, Wagner W, Franke W (2008): Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. *Cytotherapy* **10**, 320–330
- Hocking AM, Gibran NS (2010): Mesenchymal stem cells: Paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res* **316**, 2213–2219
- Huang SH, O’Sullivan B (2017): Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol* **18**, 40
- Hübscher D, Rebs S, Haupt L, Borchert T, Guessoum CI, Treu F, Köhne S, Maus A, Hambrecht M, Sossalla S, et al. (2019): A high-throughput method as a diagnostic tool for HIV detection in patient-specific induced pluripotent stem cells generated by different reprogramming methods. *Stem Cells Int* **2019**, 2181437
- Hübscher D, Rebs S, Maurer W, Ghadri JR, Dressel R, Templin C, Streckfuss-Bömeke K (2020): Generation of iPSC-lines from two independent Takotsubo syndrome patients with recurrent Takotsubo events. *Stem Cell Res* **44**, 101746
- Hynes K, Menicanin D, Mrozik K, Gronthos S, Bartold PM (2014): Generation of functional mesenchymal stem cells from different induced pluripotent stem cell lines. *Stem Cells Dev* **23**, 1084–1096
- Ilic D, Polak JM (2011): Stem cells in regenerative medicine: introduction. *Br Med Bull* **98**, 117–126
- Inman GJ, Nicolás FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, Laping NJ, Hill CS (2002): SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* **62**, 65–74
- International Stem Cell Initiative, Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, Amit M, Andrews PW, Beighton G, Bello PA, Benvenisty N, Berry LS, et al. (2007): Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* **25**, 803–816

- Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H, Benvenisty N (2000): Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 6, 88–95
- Jakob M, Hameda H, Janeschik S, Bootz F, Rotter N, Lang S, Brandau S (2010): Human nasal mucosa contains tissue-resident Immunologically responsive mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Dev* 19, 635–644
- Jakob M, Hameda H, Bruderek K, Gerstner AO, Bootz F, Lang S, Brandau S (2013): Comparative functional cell biological analysis of mesenchymal stem cells of the head and neck region: Potential impact on wound healing, trauma, and infection: Mesenchymal stem cells of the head and neck region. *Head Neck* 35, 1621–1629
- Jakob M, Hambrecht M, Spiegel JL, Kitz J, Canis M, Dressel R, Streckfuss-Bömeke K (2020): Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells Show Comparable Functionality to Their Autologous Origin. *Cells* 10
- Jeong J, Baek H, Kim YJ, Choi Y, Lee H, Lee E, Kim ES, Hah JH, Kwon TK, Choi IJ, Kwon H (2013): Human salivary gland stem cells ameliorate hyposalivation of radiation-damaged rat salivary glands. *Exp Mol Med* 45, e58–e58
- Jeong W, Yang X, Lee J, Ryoo Y, Kim J, Oh Y, Kwon S, Liu D, Son D (2016): Serial changes in the proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells after ionizing radiation. *Stem Cell Res Ther* 7, 117
- Jiang Z, Han Y, Cao X (2014): Induced pluripotent stem cell (iPSCs) and their application in immunotherapy. *Cell Mol Immunol* 11, 17–24
- Jones SA (2005): Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol Baltim Md 1950* 175, 3463–3468
- Jones SA, Wolf M, Qin S, Mackay CR, Baggiolini M (1996): Different functions for the interleukin 8 receptors (IL-8R) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through IL-8R1 but not IL-8R2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6682–6686
- Kam MKM, Leung SF, Zee B, Chau RMC, Suen JJS, Mo F, Lai M, Ho R, Cheung KY, Yu BKH, et al. (2007): Prospective randomized study of intensity-modulated radiotherapy on salivary gland function in early-stage nasopharyngeal carcinoma patients. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 25, 4873–4879
- Kamao H, Mandai M, Okamoto S, Sakai N, Suga A, Sugita S, Kiryu J, Takahashi M (2014): Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application. *Stem Cell Rep* 2, 205–218
- Kang R, Zhou Y, Tan S, Zhou G, Aagaard L, Xie L, Bünger C, Bolund L, Luo Y (2015): Mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells retain adequate osteogenicity and chondrogenicity but less adipogenicity. *Stem Cell Res Ther* 6, 144
- Karlsson C, Emanuelsson K, Wessberg F, Kajic K, Axell MZ, Eriksson PS, Lindahl A, Hyllner J, Strehl R (2009): Human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors-Potential in regenerative medicine. *Stem Cell Res* 3, 39–50
- Karp JM, Leng Teo GS (2009): Mesenchymal stem cell homing: The devil Is in the details. *Cell Stem Cell* 4, 206–216

- Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC (2005): Cell Surface and Transcriptional Characterization of Human Adipose-Derived Adherent Stromal (hADAS) Cells. *STEM CELLS* 23, 412–423
- Keane MP, Strieter RM (1999): The role of CXC chemokines in the regulation of angiogenesis. *Chem Immunol* 72, 86–101
- Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, Rovira II, Nguyen AT, Malide D, Combs CA, Hall G, et al. (2006): Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* 203, 1235–1247
- Khoo MLM, McQuade LR, Smith MSR, Lees JG, Sidhu KS, Tuch BE (2005): Growth and differentiation of embryoid bodies derived from human embryonic stem cells: effect of glucose and basic fibroblast growth factor. *Biol Reprod* 73, 1147–1156
- Kim C (2015): iPSC technology-Powerful hand for disease modeling and therapeutic screen. *BMB Rep* 48, 256–265
- Kim J, Lee JH, Yeo SM, Chung HM, Chae JI (2014): Stem cell recruitment factors secreted from cord blood-derived stem cells that are not secreted from mature endothelial cells enhance wound healing. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 50, 146–154
- Kim JW, Kim JM, Choi ME, Kim SK, Kim YM, Choi JS (2019): Adipose-derived mesenchymal stem cells regenerate radioiodine-induced salivary gland damage in a murine model. *Sci Rep* 9, 15752
- Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, Kim J, Aryee MJ, Ji H, Ehrlich LIR, et al. (2010): Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467, 285–290
- Kim K, Zhao R, Doi A, Ng K, Unternaehrer J, Cahan P, Huo H, Loh YH, Aryee MJ, Lensch MW, et al. (2011): Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29, 1117–1119
- Kimler BF, Park CH, Yakar D, Mies RM (1985): Radiation response of human normal and leukemic hemopoietic cells assayed by in vitro colony formation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 11, 809–816
- Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T (1995): Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86, 1243–1254
- Koch CM, Reck K, Shao K, Lin Q, Jousen S, Ziegler P, Walenda G, Drescher W, Opalka B, May T, et al. (2013): Pluripotent stem cells escape from senescence-associated DNA methylation changes. *Genome Res* 23, 248–259
- Kojima T, Kanemaru SI, Hirano S, Tateya I, Ohno S, Nakamura T, Ito J (2011): Regeneration of radiation damaged salivary glands with adipose-derived stromal cells. *The Laryngoscope* 121, 1864–1869
- Kolquist KA, Ellisen LW, Counter CM, Meyerson M, Tan LK, Weinberg RA, Haber DA, Gerald WL (1998): Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues. *Nat Genet* 19, 182–186
- Konings AWT, Coppes RP, Vissink A (2005): On the mechanism of salivary gland radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62, 1187–1194
- Kotenko K, Moroz B, Nadezhina N, Galstyan I, Eremin I, Deshevoy J, Lebedev V, Slobodina T, Grinakovskaya D, Zhgutov Y, Bushmanov A (2012): Successful treatment of localised

- radiation lesions in rats and humans by mesenchymal stem cell transplantation. *Radiat Prot Dosimetry* 151, 661–665
- Krampera M, Franchini M, Pizzolo G, Aprili G (2007): Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. *Blood Transfus*
- Kumar A, Bhanja A, Bhattacharyya J, Jaganathan BG (2016): Multiple roles of CD90 in cancer. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 37, 11611–11622
- Kuttler F, Mai S (2006): c-Myc, genomic instability and disease. *Genome Dis* 1, 171–190
- Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG (2001): Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 153, 1133–1140
- Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES (2006): Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* 5, 187–195
- Lee MJ, Kim J, Lee KI, Shin JM, Chae JI, Chung HM (2011): Enhancement of wound healing by secretory factors of endothelial precursor cells derived from human embryonic stem cells. *Cytotherapy* 13, 165–178
- Lengner CJ, Camargo FD, Hochedlinger K, Welstead GG, Zaidi S, Gokhale S, Scholer HR, Tomilin A, Jaenisch R (2007): Oct4 Expression Is Not Required for Mouse Somatic Stem Cell Self-Renewal. *Cell Stem Cell* 1, 403–415
- Lengner CJ, Welstead GG, Jaenisch R (2008): The pluripotency regulator Oct4: A role in somatic stem cells? *Cell Cycle* 7, 725–728
- Li J, Kwong DLW, Chan GCF (2007): The effects of various irradiation doses on the growth and differentiation of marrow-derived human mesenchymal stromal cells. *Pediatr Transplant* 11, 379–387
- Li Y, Taylor JMG, Ten Haken RK, Eisbruch A (2007): The impact of dose on parotid salivary recovery in head and neck cancer patients treated with radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 67, 660–669
- Lian Q, Zhang Y, Zhang J, Zhang HK, Wu X, Zhang Y, Lam FFY, Kang S, Xia JC, Lai WH, et al. (2010): Functional mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells attenuate limb ischemia in mice. *Circulation* 121, 1113–1123
- Lin ZQ, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T, Mukaida N (2003): Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol* 73, 713–721
- Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Fili L, Manuelli C, Frosali F, Mazzinghi B, Maggi L, Pasini A, Lisi V, et al. (2008): Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem Cells Dayt Ohio* 26, 279–289
- Lis R, Touboul C, Raynaud CM, Malek JA, Suhre K, Mirshahi M, Rafii A (2012): Mesenchymal cell interaction with ovarian cancer cells triggers pro-metastatic properties. *PloS One* 7, e38340
- Lombaert IMA, Wierenga PK, Kok T, Kampinga HH, deHaan G, Coppes RP (2006): Mobilization of bone marrow stem cells by granulocyte colony-stimulating factor ameliorates radiation-induced damage to salivary glands. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 12, 1804–1812

- Longo DL, Dietel M, Keilholz U, Pezzutto A, Riess H, Sehoul J, Harrison TR, Humboldt-Universität zu Berlin (Hrsg.): *Harrisons Hämatologie und Onkologie*. Deutsche Ausgabe in Zusammenarbeit mit der Charité; ABW Wissenschaftsverlag, Berlin 2016
- Mahmood A, Harkness L, Schröder HD, Abdallah BM, Kassem M (2010): Enhanced differentiation of human embryonic stem cells to mesenchymal progenitors by inhibition of TGF-beta/activin/nodal signaling using SB-431542. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 25, 1216–1233
- Mallanna SK, Duncan SA (2013): Differentiation of hepatocytes from pluripotent stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 26, 1G.4.1-1G.4.13
- Mareschi K, Ferrero I, Rustichelli D, Aschero S, Gammaitoni L, Aglietta M, Madon E, Fagioli F (2006): Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *J Cell Biochem* 97, 744–754
- Maria OM, Kumala S, Heravi M, Syme A, Eliopoulos N, Muanza T (2016): Adipose mesenchymal stromal cells response to ionizing radiation. *Cytotherapy* 18, 384–401
- Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA, et al. (2007): Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 9, 625–635
- Melzer C, von der Ohe J, Hass R (2018): MSC stimulate ovarian tumor growth during intercellular communication but reduce tumorigenicity after fusion with ovarian cancer cells. *Cell Commun Signal CCS* 16, 67
- Meregalli M, Farini A, Torrente Y (2011): Mesenchymal stem cells as muscle reservoir. *J Stem Cell Res Ther* 1, 1–9
- Minguell JJ, Erices A, Conget P (2001): Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med Maywood NJ* 226, 507–520
- Mirabella T, Teodelinda M, Cilli M, Michele C, Carlone S, Sebastiano C, Cancedda R, Ranieri C, Gentili C, Chiara G (2011): Amniotic liquid derived stem cells as reservoir of secreted angiogenic factors capable of stimulating neo-arteriogenesis in an ischemic model. *Biomaterials* 32, 3689–3699
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S (2003): The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631–642
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S (2003): SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5807–5812
- Moore KL, Persaud TVN, Viebahn C, Moore KL: *Embryologie: Entwicklungsstadien, Frühentwicklung, Organogenese, Klinik*. 5. Aufl., [Nachdr.]; Elsevier, Urban & Fischer, München 2011
- Munir H, Ward LSC, McGettrick HM (2018): Mesenchymal Stem Cells as Endogenous Regulators of Inflammation. *Adv Exp Med Biol* 1060, 73–98
- Nakajima F, Tokunaga K, Nakatsuji N (2007): Human leukocyte antigen matching estimations in a hypothetical bank of human embryonic stem cell lines in the Japanese population for use in cell transplantation therapy. *Stem Cells Dayt Ohio* 25, 983–985

- Nejadnik H, Diecke S, Lenkov OD, Chapelin F, Donig J, Tong X, Derugin N, Chan RCF, Gaur A, Yang F, et al. (2015): Improved Approach for Chondrogenic Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev* 11, 242–253
- Nicolay NH, Sommer E, Lopez R, Wirkner U, Trinh T, Sisombath S, Debus J, Ho AD, Saffrich R, Huber PE (2013): Mesenchymal stem cells retain their defining stem cell characteristics after exposure to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 87, 1171–1178
- Nicolay NH, Liang Y, Lopez Perez R, Bostel T, Trinh T, Sisombath S, Weber KJ, Ho AD, Debus J, Saffrich R, Huber PE (2015): Mesenchymal stem cells are resistant to carbon ion radiotherapy. *Oncotarget* 6, 2076–2087
- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG (2000): Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24, 372–376
- O'Connor MD, Kardel MD, Iosfina I, Youssef D, Lu M, Li MM, Vercauteren S, Nagy A, Eaves CJ (2008): Alkaline Phosphatase-Positive Colony Formation Is a Sensitive, Specific, and Quantitative Indicator of Undifferentiated Human Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS* 26, 1109–1116
- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S (2007): Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313–317
- Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, Hong H, Nakagawa M, Tanabe K, Tezuka K, et al. (2011): A more efficient method to generate integration-free human iPSC cells. *Nat Methods* 8, 409–412
- Petri RM, Hackel A, Hahnel K, Dumitru CA, Bruderek K, Flohe SB, Paschen A, Lang S, Brandau S (2017): Activated tissue-resident mesenchymal stromal cells regulate natural killer cell immune and tissue-regenerative function. *Stem Cell Rep* 2, 985–998
- Pierantozzi E, Gava B, Manini I, Roviello F, Marotta G, Chiavarelli M, Sorrentino V (2011): Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2. *Stem Cells Dev* 20, 915–923
- Pignon JP, le Maître A, Maillard E, Bourhis J, MACH-NC Collaborative Group (2009): Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol* 92, 4–14
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147
- Pricola KL, Kuhn NZ, Haleem-Smith H, Song Y, Tuan RS (2009): Interleukin-6 maintains bone marrow-derived mesenchymal stem cell stemness by an ERK1/2-dependent mechanism. *J Cell Biochem* 108, 577–588
- Rasko JEJ, Patel A, Griffin JE, Gilleece MH, Radia R, Yeung DT, Slukvin I, Kelly K, Bloor AJ (2019): Results of the First Completed Clinical Trial of an iPSC-Derived Product: CYP-001 in Steroid-Resistant Acute GvHD. *Biol Blood Marrow Transplant* 25, S255–S256
- Rawadi G, Vayssière B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S (2003): BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 18, 1842–1853

- Raya Á, Rodríguez-Pizà I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, Consiglio A, Castellà M, Río P, Sleep E, et al. (2009): Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* **460**, 53–59
- Ren G, Zhao X, Wang Y, Zhang X, Chen X, Xu C, Yuan Z, Roberts AI, Zhang L, Zheng B, et al. (2012): CCR2-dependent recruitment of macrophages by tumor-educated mesenchymal stromal cells promotes tumor development and is mimicked by TNF α . *Cell Stem Cell* **11**, 812–824
- Richards M, Tan SP, Tan JH, Chan WK, Bongso A (2004): The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells Dayt Ohio* **22**, 51–64
- Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.) (2019): Krebs in Deutschland für 2015/2016.
- Rojewski MT, Weber BM, Schrezenmeier H (2008): Phenotypic characterization of mesenchymal stem cells from various tissues. *Transfus Med Hemotherapy* **35**, 168–184
- Ross GM (1999): Induction of cell death by radiotherapy. *Endocr Relat Cancer* **6**, 41–44
- Rotter N, Oder J, Schlenke P, Lindner U, Böhrnsen F, Kramer J, Rohwedel J, Huss R, Brandau S, Wollenberg B, Lang S (2008): Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands. *Stem Cells Dev* **17**, 509–518
- Rotter N, Schwarz S, Jakob M, Brandau S, Wollenberg B, Lang S (2010): Salivary gland stem cells: Can they restore radiation-induced salivary gland dysfunction? *HNO* **58**, 556–563
- Rühle A, Xia O, Perez RL, Trinh T, Richter W, Sarnowska A, Wuchter P, Debus J, Saffrich R, Huber PE, Nicolay NH (2018): The radiation resistance of human multipotent mesenchymal stromal cells is independent of their tissue of origin. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **100**, 1259–1269
- Sachs PC, Francis MP, Zhao M, Brumelle J, Rao RR, Elmore LW, Holt SE (2012): Defining essential stem cell characteristics in adipose-derived stromal cells extracted from distinct anatomical sites. *Cell Tissue Res* **349**, 505–515
- Salgado AJBOG, Reis RLG, Sousa NJC, Gimble JM (2010): Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* **5**, 103–110
- Sauer R: Strahlentherapie und Onkologie. 5. Auflage; Elsevier, Urban & Fischer, München 2010
- Schlaeger TM, Daheron L, Brickler TR, Entwisle S, Chan K, Cianci A, DeVine A, Ettenger A, Fitzgerald K, Godfrey M, et al. (2015): A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nat Biotechnol* **33**, 58–63
- Schopperle WM, DeWolf WC (2007): The TRA-1-60 and TRA-1-81 human pluripotent stem cell markers are expressed on podocalyxin in embryonal carcinoma. *Stem Cells Dayt Ohio* **25**, 723–730
- Schwarz S, Huss R, Schulz-Siegmund M, Vogel B, Brandau S, Lang S, Rotter N (2014): Bone marrow-derived mesenchymal stem cells migrate to healthy and damaged salivary glands following stem cell infusion. *Int J Oral Sci* **6**, 154–161
- Sciubba JJ, Goldenberg D (2006): Oral complications of radiotherapy. *Lancet Oncol* **7**, 175–183

- Scott-Brown WG, Gleeson M, Browning GG (Hrsg.): Scott-Brown's otolaryngology, head and neck surgery. 7. Auflage; Hodder Arnold, London 2008
- Shin TH, Kim HS, Choi SW, Kang KS (2017): Mesenchymal stem cell therapy for inflammatory skin diseases: clinical potential and mode of action. *Int J Mol Sci* 18, 244
- Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higashi Y, Tanaka S, Yasui W, Chayama K (2010): Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer* 127, 2323–2333
- Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen J, Stenderup K, Rattan SIS, Jensen TG, Kassem M (2002): Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol* 20, 592–596
- Song Y, Du H, Dai C, Zhang L, Li S, Hunter DJ, Lu L, Bao C (2018): Human adipose-derived mesenchymal stem cells for osteoarthritis: a pilot study with long-term follow-up and repeated injections. *Regen Med* 13, 295–307
- Soontarak S, Chow L, Johnson V, Coy J, Wheat W, Regan D, Dow S (2018): Mesenchymal stem cells (MSC) Derived from induced pluripotent stem cells (iPSC) equivalent to adipose-derived MSC in promoting intestinal healing and microbiome normalization in mouse inflammatory bowel disease model. *Stem Cells Transl Med* 7, 456–467
- Spencer CR, Gay HA, Haughey BH, Nussenbaum B, Adkins DR, Wildes TM, DeWees TA, Lewis JS, Thorstad WL (2014): Eliminating radiotherapy to the contralateral retropharyngeal and high level II lymph nodes in head and neck squamous cell carcinoma is safe and improves quality of life. *Cancer* 120, 3994–4002
- Spiegel JL, Hambrecht M, Kohlbauer V, Haubner F, Ihler F, Canis M, Schilling AF, Böker KO, Dressel R, Streckfuss-Bömeke K, Jakob M (2019): Radiation-induced sensitivity of tissue-resident mesenchymal stem cells in the head and neck region. *Head Neck* 41, 2892–2903
- Steel GG (2001): The case against apoptosis. *Acta Oncol Stockh Swed* 40, 968–975
- Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH (2005): Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 54, 132–141
- Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J (2012): Same or not the same? comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev* 21, 2724–2752
- Takahashi K, Yamanaka S (2006): Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007): Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872
- Takemitsu H, Zhao D, Yamamoto I, Harada Y, Michishita M, Arai T (2012): Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BMC Vet Res* 8, 150
- Teramura T, Onodera Y, Mihara T, Hosoi Y, Hamanishi C, Fukuda K (2010): Induction of mesenchymal progenitor cells with chondrogenic property from mouse-induced pluripotent stem cells. *Cell Reprogramming* 12, 249–261
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147

- Tomchuck SL, Zvezdaryk KJ, Coffelt SB, Waterman RS, Danko ES, Scandurro AB (2008): Toll-Like Receptors on Human Mesenchymal Stem Cells Drive Their Migration and Immunomodulating Responses. *Stem Cells* 26, 99–107
- van Luijk P, Pringle S, Deasy JO, Moiseenko VV, Faber H, Hovan A, Baanstra M, van der Laan HP, Kierkels RGJ, van der Schaaf A, et al. (2015): Sparing the region of the salivary gland containing stem cells preserves saliva production after radiotherapy for head and neck cancer. *Sci Transl Med* 7, 305ra147
- Vissink A, Burlage FR, Spijkervet FKL, Veerman ECI, Nieuw Amerongen AV (2004): Prevention and treatment of salivary gland hypofunction related to head and neck radiation therapy and chemotherapy. *Support Cancer Ther* 1, 111–118
- Warthemann R, Eildermann K, Debowski K, Behr R (2012): False-positive antibody signals for the pluripotency factor OCT4A (POU5F1) in testis-derived cells may lead to erroneous data and misinterpretations. *Mol Hum Reprod* 18, 605–612
- Wasserman TH, Brizel DM, Henke M, Monnier A, Eschwege F, Sauer R, Strnad V (2005): Influence of intravenous amifostine on xerostomia, tumor control, and survival after radiotherapy for head-and-neck cancer: 2-year follow-up of a prospective, randomized, phase III trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 63, 985–990
- Weiss DJ, Casaburi R, Flannery R, LeRoux-Williams M, Tashkin DP (2013): A placebo-controlled, randomized trial of mesenchymal stem cells in COPD. *Chest* 143, 1590–1598
- Whitworth DJ, Frith JE, Frith TJR, Ovchinnikov DA, Cooper-White JJ, Wolvetang EJ (2014): Derivation of mesenchymal stromal cells from canine induced pluripotent stem cells by inhibition of the TGF β /Activin signaling pathway. *Stem Cells Dev* 23, 3021–3033
- Wienecke A, Kraywinkel K (2019): Epidemiologie von Kopf-Hals-Tumoren in Deutschland. *Onkol* 25, 190–200
- Wulf GG, Chapuy B, Trümper L (2006): Mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks. *Med Klin* 101, 408–413
- Xian B, Huang B (2015): The immune response of stem cells in subretinal transplantation. *Stem Cell Res Ther* 6, 161
- Xu L, Tan YY, Wu L, Wang LL, Li H, Ding JQ, Chen SD (2013): Road to future: iPSC clinical application in Parkinson's disease treatment. *Curr Mol Med* 13, 1412–1418
- Yi T, Song SU (2012): Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res* 35, 213–221
- Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, et al. (2001): Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec* 264, 51–62
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, et al. (2007): Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *science* 318, 1917–1920
- Zagoura DS, Roubelakis MG, Bitsika V, Trohatou O, Pappa KI, Kapelouzou A, Antsaklis A, Anagnostou NP (2012): Therapeutic potential of a distinct population of human amniotic fluid mesenchymal stem cells and their secreted molecules in mice with acute hepatic failure. *Gut* 61, 894–906

- Zhang Q, Shi Shihong, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi Songtao, Le AD (2009): Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol Baltim Md 1950* 183, 7787–7798
- Zimmermann S, Voss M, Kaiser S, Kapp U, Waller CF, Martens UM (2003): Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia* 17, 1146–1149
- Zimmermann S, Glaser S, Ketteler R, Waller CF, Klingmüller U, Martens UM (2004): Effects of telomerase modulation in human hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells Dayt Ohio* 22, 741–749

Danksagung

Mein Dank geht an erster Stelle an Herrn Prof. Dr. med. Mark Jakob, der das Projekt initiierte, intensiv verfolgte und mich unterstützte. Dank Ihnen erhielt ich Einblicke in Welt der Forschung und durfte an Veröffentlichungen mitarbeiten. Trotz Ihres Wechsels an die Ludwig-Maximilians-Universität München konnten wir gemeinsam das Projekt abschließen. Daran anschließend möchte ich der Arbeitsgruppe mit Alexandra Bitter, Juliane Kasten-Krapp und Sarah Manz und auch den Münchnern Kolleginnen Dr. rer. nat. Vera Kohlbauer und Dr. med. Jennifer Spiegel danken.

Zudem gilt mein Dank Frau PD Dr. rer. nat. Katrin Streckfuß-Bömeke und ihrem Labor, das mich während meiner praktischen Arbeit großartig unterstützte. Besonderer Dank geht an Johanna Heine und Thomas Borchert.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ralf Dressel und Leslie Elsner aus dem Institut für zelluläre und molekulare Immunologie bedanken, die beide an der erfolgreichen Umsetzung des Projekts beteiligt waren.

Weiter bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit mit der Unfallchirurgie, insbesondere bei Dr. rer. nat. Kai Böker und Prof. Dr. med. Arndt Schilling.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Dr. med. Julia Kitz, Dr. rer. nat. Stefan Küffer, PD Dr. Markus Schirmer, Ulrike Ehbrecht und Sabrina Becker.

Zuletzt bedanke ich mich bei Sabine Hanno, Martin Hambrecht und Bitu Massih für das Korrekturlesen.