

Molekulare ex-vivo und in-vitro Untersuchung des Einsatzes  
humaner mesenchymaler Stammzellen zur Regeneration  
des Harnblasenschließmuskels im xenogenen präklinischen  
Großtiermodell

Inaugural- Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Bender, Dominik Alfred

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Stenzl

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. D. Alexander-Friedrich

Tag der Disputation: 11.10.2016

# INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	<b>Harninkontinenz .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Harninkontinenz – ein mehrdimensionales Krankheitsbild somatischer Ursache mit psychosomatischen Folgen .....	1
1.1.2	Risikofaktoren für Harninkontinenz.....	2
1.1.3	Häufigkeit und gesundheitsökonomische Folgen der Harninkontinenz .....	3
1.1.4	Bau und Funktion des exkretorischen Systems .....	5
1.1.4.1	Embryonale Entwicklung und Anatomie.....	5
1.1.4.2	Physiologische Kontinenzhaltung .....	7
1.1.5	Charakterisierung verschiedener Inkontinenzformen anhand klinischer Symptome.....	8
1.1.6	Aktuelle Therapieschemata und bisher mögliche Therapieoptionen zur Behandlung der Harninkontinenz .....	9
1.2	<b>Stammzellen .....</b>	<b>12</b>
1.2.1	Allgemeine Merkmale und Eigenschaften von Stammzellen .....	12
1.2.2	Mesenchymale Stammzellen (MSCs).....	12
1.2.2.1	Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen .....	13
1.2.2.2	myogenes Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen .....	14
1.2.2.3	Immunmodulatorische Eigenschaften und parakrine Sekretion der MSCs .....	14
1.2.2.4	Bedeutung der MSC für die regenerative Medizin und stammzellbasierte Therapien.....	15
1.2.3	Vorarbeiten auf dem Gebiet der stammzellbasierten Inkontinenztherapie .....	16
2	FRAGESTELLUNG.....	17
3	MATERIAL UND METHODEN.....	18
3.1	<b>humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) .....</b>	<b>18</b>
3.1.1	Ethikvotum.....	18
3.1.2	Isolierung der hMSCs aus Blut .....	19
3.1.3	Passagieren der Zellen .....	19
3.1.4	Induktion einer myogenen Prädifferenzierung in vitro .....	20
3.1.5	Markierung der Zellen mittels PKH26-cell linker kit .....	20
3.2	<b>Minipigs .....</b>	<b>22</b>
3.2.1	Tierstamm und Zucht .....	22
3.2.2	Tierhaltung.....	22
3.2.3	Tierversuchsantrag .....	23
3.3	<b>Operative Transplantation der hMSCs .....</b>	<b>23</b>
3.3.1	Präoperative Vorbereitungen der Tiere .....	23
3.3.2	Endoskopische Applikation der hMSCs .....	24
3.4	<b>Immunsuppression mittels Ciclosporin A (CsA).....</b>	<b>26</b>
3.4.1	Pharmakologische Eigenschaften von CsA .....	26
3.4.2	Ciclosporin-A Applikation .....	26

## Inhaltsverzeichnis

---

3.4.3	Monitoring der Ciclosporin-A Plasmakonzentration sowie weitere Laborparameter	27
<b>3.5</b>	<b>Sakrifizierung und Organentnahme</b>	<b>28</b>
<b>3.6</b>	<b>Immunfluoreszenz</b>	<b>29</b>
3.6.1	Grundprinzipien der Immunfluoreszenzmikroskopie	29
3.6.2	Aufarbeitung des urethralen Gewebes	29
3.6.3	Einbettung der Gewebeproben in Tissue Tek®	30
3.6.4	Herstellung der Semidünnschnitte	30
3.6.5	Detektion der PKH26 positiven humanen Zellen	30
3.6.6	Etablierung eines Antikörpers zum spezifischen Nachweis humaner Zellkerne	31
3.6.7	Nachweis einer anatomisch korrekten Applikation und funktionellen Integration mittels myoogener Proteine	33
3.6.8	Tabellarische Übersicht der Antikörper	34
<b>3.7</b>	<b>Molekularbiologie / qPCR</b>	<b>36</b>
3.7.1	Funktionsprinzip der qPCR	36
3.7.2	Gewinnung der Gewebeproben zur RNA Isolierung korrespondierend zu PKH26 positiven Schnitten	37
3.7.3	Isolierung der RNA mit Hilfe des RNeasy Minikit	39
3.7.4	Bestimmung der RNA-Konzentration mittels Photometer	40
3.7.5	Transkription der RNA in cDNA	40
3.7.6	Nachweis -biologisch aktiver- humaner Zellen mittels GAPDH	42
<b>3.8</b>	<b>Chemikalien, Therapeutika und Isolationskits</b>	<b>43</b>
3.8.1	Puffer und Reagenzien	45
3.8.2	Primertabelle	46
<b>3.9</b>	<b>Tabellarische Übersicht Laborgeräte</b>	<b>47</b>
<b>3.10</b>	<b>Laborbedarf/sonstige Verbrauchsmittel/OP-Bedarf</b>	<b>48</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>Induktion eines Immunsuppressiven xenogenen Großtiermodelles</b>	<b>50</b>
4.1.1	Monitoring des Ciclosporin A (CsA) Plasmaspiegels	51
4.1.2	Sekundärprophylaxe drohender Infektionen unter iatrogenen Immunsuppression mittels Blutbildkontrollen	53
4.1.3	Evaluierung der Verträglichkeit von CsA anhand der Leberenzymwerte im Blut	55
4.1.4	Evaluierung der Verträglichkeit von CsA mittels Nierenretentionswerte im Blut	57
4.1.5	Ausschluss eines Harnwegsinfektes mittels Urin-Streifentest	58
<b>4.2</b>	<b>Phänotypisierung der hMSC in der porcinen Urethra mittels Immunfluoreszenzmikroskopie</b>	<b>59</b>
4.2.1	Detektion der injizierten hMSC in der porcinen Urethra durch PKH26 Fluoreszenz	60
4.2.2	Detektion der hMSC durch spezifische Bindung eines anti-nukleären Antikörpers	65
4.2.3	Nachweis einer anatomisch korrekten Injektion sowie funktionelle Integration der hMSC mittels Immunfluoreszenzmikroskopie	68
<b>4.3</b>	<b>CD45 positive Reaktion im Bereich der injizierten Zellen</b>	<b>72</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>4.4</b>	<b>Molekularbiologischer Nachweise der hMSC durch rt-PCR-Analysen .....</b>	<b>76</b>
4.4.1	RNA-Gehalt der zu untersuchenden Proben.....	77
4.4.2	Qualitativer Nachweis humaner Sequenzen in der porcinen Urethra.....	79
4.4.3	Evaluierung myogener Differenzierungsfaktoren zur Bestätigung einer Integration der hMSC.....	83
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>85</b>
<b>5.1</b>	<b>Studiendesign.....</b>	<b>85</b>
<b>5.2</b>	<b>Tiermodell.....</b>	<b>86</b>
5.2.1	Autologes versus Xenogenes Großtiermodell.....	86
5.2.2	Verwendung ausschließlich weiblicher Modelltiere .....	87
5.2.3	Einfluss des Lebensalters der Tiere.....	88
5.2.4	Harnkontinentes Modell vs. iatrogenes Inkontinenzmodell .....	89
5.2.5	Sonographische Kontrolle sowie Autopsie der Niere und des oberen Harntrakts...90	
5.2.6	Laborchemisches Monitoring der Versuchstiere .....	91
5.2.7	Operative Anlage eines zentral venösen Zuganges bei den Versuchstieren .....	92
<b>5.3</b>	<b>Transplantierte Zellen .....</b>	<b>94</b>
5.3.1	Eigenschaften von MSC in Abhängigkeit ihres Ursprungsgewebes.....	94
5.3.2	PKH26 Labeling.....	95
5.3.3	Alternativen einer PKH26 Zellmarkierung .....	96
5.3.4	prädifferentzierte MSC vs. native MSC .....	98
5.3.5	Der Einfluss einer Immunsuppression auf die Eigenschaften von MSCs.....	99
5.3.6	Immunprivileg von MSC .....	100
5.3.7	Pluripotente Stammzellen vs. MSC .....	101
<b>5.4</b>	<b>Methodik .....</b>	<b>103</b>
5.4.1	Fähigkeiten des Operators sowie Applikationstechnik.....	103
5.4.2	Orale Immunsuppression vs. i.v. Gabe.....	103
5.4.3	PCR.....	104
5.4.3.1	Verunreinigungen.....	104
5.4.3.2	Alternativen für mRNA basierte molekulargenetischer Untersuchungen .....	105
5.4.4	Immunologische Prozesse im Bereich der transplantierten hMSC .....	106
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>109</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>111</b>
<b>7.1</b>	<b>Blutwerte der Schweine in tabellarischer Übersicht.....</b>	<b>111</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>115</b>
<b>9</b>	<b>ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL.....</b>	<b>126</b>

## II Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
κ	kappa
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
5-Aza	5-Azacytidin (Vidaza®)
α-SMA	(engl.) „alpha-smooth muscle actin“
A.	(lat.) „arteria“; Arterie
Aa.	(lat.) „arteriae“; Arterien (plural)
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AMSC	(engl.): „amniotic derived mesenchymal stem cell “
ATMSC	(engl.): „adipose tissue derived mesenchymal stem cell “
BMMSC	(engl.): „bone marrow derived mesenchymal stem cell “
bp	(engl.): „base pairs“
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CD	(engl.) „Cluster of differentiation“; immunphänotypische Oberflächenproteine
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid

## Abkürzungsverzeichnis

---

CsA	Ciclosporin A (Sandimun®)
Cy2	grünfluoreszierendes Carbocyanin
DAPI	4',6 Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DFG	deutsche Forschungsgemeinschaft
Diff.	Differenzierung
DNA	(engl.) „deoxyribonucleic acid“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et. al.	(lat.) „et alii“ (und andere)
FACS®	(engl.) „fluorescence activated cell sorting“
FCS	(engl.): „fetal calf serum“ (fetales Kälberserum)
<sup>18</sup> F-FGD	<sup>18</sup> F-Fluor-Desoxyglucose
g	Masse [Gramm]
g	Erdbeschleunigung [Newton]
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
Hg	(lat.) „Hydrargyrum“ (Quecksilber)
hMSC	(engl.) „human mesenchymal stem cell“ (humane mesenchymale Stammzelle bzw. humane mesenchymale Stromazelle)
Ig	Immunglobulin
i. m.	intramuskulär
iPS	(engl.): „induced pluripotent stem cell“
i. v.	intravenös
ISCT	(engl.) „International Society for Cellular Therapy“
KFO	klinische Forschergruppe
LOT	Losnummer

## Abkürzungsverzeichnis

---

kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
M.	(lat.) Musculus
mab	(engl.) „monoclonal Antibody“
max.	Maximal
mlgG	(engl.) „mouse immunoglobulin G “
min.	Minute
mind.	Mindestens
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MP	Minipig
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	(engl.) „mesenchymal stem cell “(mesenchymale Stammzelle bzw. Stromazelle)
Myo D	(engl.) „myogenic determination factor “
nm	Nanometer
NTC	(engl.): „no template control “(Negativkontrolle)
Op	Operation
P	Anzahl der Zellpassagen
PBS	(engl.) „phosphate buffered saline “(Phosphatpuffer)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	pH-Wert
p. o.	(lat.) „per os “(orale Aufnahme)



## Abkürzungsverzeichnis

---

p. o.	(lat.) „post operationem “
PVK	peripherer Venenkatheter
RNA	(engl.) „ribonucleic acid“
RT	Raumtemperatur
rpm	(engl.) „revolutions per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
	$[1rpm = 1/min]$
tab.	Tabelle
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
UCB-MSC	(engl.) „umbilical cord blood derived mesenchymal stem cell“
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
undiff.	undifferenziert
Vol%	Volumenprozent (Einheit der Konzentration gaslöslicher Stoffe)
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1 EINLEITUNG

---

## 1.1 Harninkontinenz

### 1.1.1 Harninkontinenz – ein mehrdimensionales Krankheitsbild somatischer Ursache mit psychosomatischen Folgen

Eine Harninkontinenz - ein ungewollter Urinverlust - wird bis heute als schambesetztes Tabuthema empfunden (Abrams et al., 2002). Papanicolaou et al. beschreiben die Betroffenen als deutlich eingeschränkt in Situationen des täglichen Lebens, der sozialen Interaktion und der körperlichen Aktivität einhergehend mit einer Abnahme des Selbstvertrauens und der Selbstwahrnehmung (Papanicolaou et al., 2005). Als Ursache für den ungewollten Urinverlust wird unter anderem die altersbedingte Degeneration (Perucchini et al., 2002b) und Fibrosierung des *Rhabdosphinkters*, insbesondere im Bereich des Blasenhalses, beschrieben (Perucchini et al., 2002a), die zu einem sinkenden Blasenverschlussdruck führt (Strasser et al., 1999). Zudem beschreiben Pandit et al. eine altersabhängige Abnahme der neuronalen Innervation im Bereich der ventralen Harnröhre, was ebenfalls einen ungewollten Urinverlust begünstigt (Pandit et al., 2000).

Ogleich häufig eine degenerative, organische Ursache zugrunde liegt, darf das Symptom der Harninkontinenz somit nicht als ein isoliertes somatisches Problem, sondern mehr als eine mehrdimensionale Erkrankung mit Affektion der Psyche und sozialen Integrität angesehen werden. Es kommt bei älteren Betroffenen oft zu sozialem Rückzug aus der Gemeinschaft, Frustration und Vereinsamung bis zur reaktiven Depression. Infolge der steigenden Lebenserwartung und des demographischen Wandels ist zukünftig mit einem beträchtlichen Zuwachs dieser Bevölkerungsgruppe zu rechnen. Deshalb ist es unabdingbar die Ursache, eine funktionelle Dysbalance, wissenschaftlich zu verstehen und kausale Therapiekonzepte in der klinischen Anwendung zu etablieren.

### 1.1.2 Risikofaktoren für Harninkontinenz

Als sichere Risikofaktoren zur Entwicklung einer Harninkontinenz werden Voroperationen im Bereich des Beckens, ein höheres Lebensalter und Schwangerschaften, vorwiegend bei vaginaler Entbindung, beschrieben (Gyhagen et al., 2013). Für Männer birgt die radikale Prostatektomie mit bilateraler Resektion des Nervenbündels ein erhöhtes Risiko des Entstehens einer Harninkontinenz (Sacco et al., 2006, Stanford et al., 2000). Weiche Risikofaktoren - „Lifestyle Events“ - wie Adipositas (Khullar et al., 2013), Rauchen (Hannestad et al., 2003) oder Koffein (Davis et al., 2012) (Gleason et al., 2013) begünstigen ebenso das Auftreten von Harninkontinenz wie einige Krankheiten, die indirekt, beispielsweise durch unerwünschte Arzneimittelwirkungen zu einem Harnverlust führen (Devore et al., 2012). Bei vielen Risiken besteht aktuell jedoch noch Klärungs- bzw. Forschungsbedarf (Niederstadt et al., 2007).

### 1.1.3 Häufigkeit und gesundheitsökonomische Folgen der Harninkontinenz

Eine europaweit durchgeführte Befragung von 17 000 Frauen ergab, dass durchschnittlich 35% der Befragten unter Symptomen der Harninkontinenz leiden, wobei Symptome der Stressinkontinenz am Häufigsten beklagt werden (Hunskaar et al., 2004). Es fehlen allerdings, hauptsächlich im bundesdeutschen Raum, aufgrund weniger und lediglich eingeschränkt durchgeführter strukturierter systematischer Studien verlässliche Zahlen. Die Zahl der betroffenen Männer und Frauen kann lediglich geschätzt werden. Basierend auf Ergebnissen einer 1999 bundesweit durchgeführten repräsentativen Befragung von 2005 Bürgern geben Beutel et al. eine Häufigkeit von min. 6-8 Mio. Betroffenen an, was 12,6 % der Bevölkerung entspricht. Frauen sind deutlich häufiger betroffen (15,0%) als Männer (9,5%). Auch eine Zunahme mit steigendem Lebensalter ist zu beobachten. Bei den unter 40 jährigen sind 6,0%, in der Gruppe der 40-60 jährigen bereits 10,0 % und bei den über 60 jährigen gar 23,0% der Bevölkerung betroffen (Beutel et al., 2005).

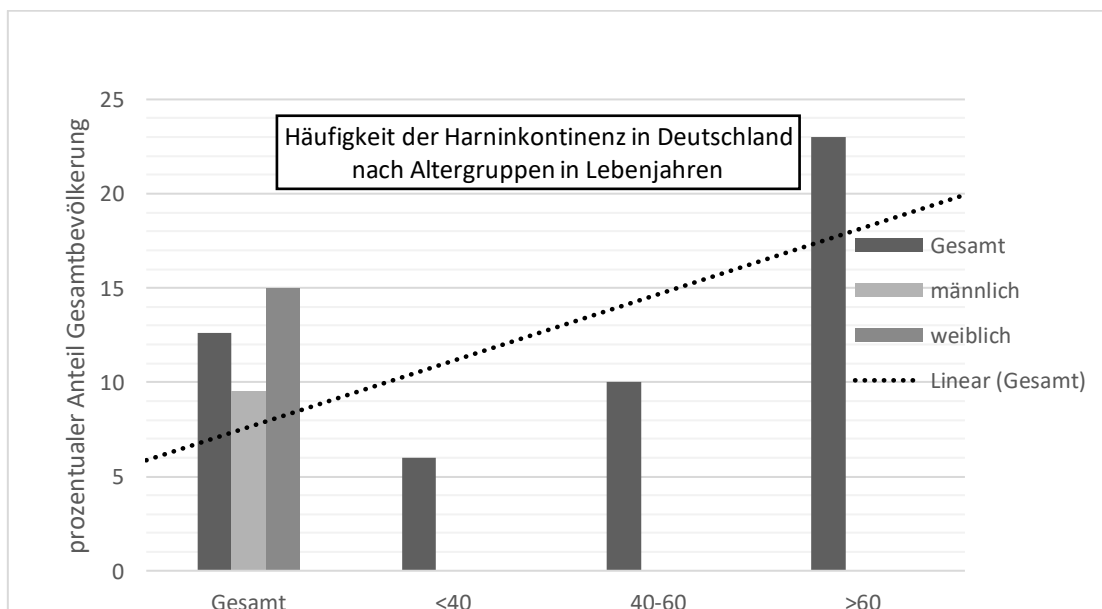


Abbildung 1-1 Graphische Darstellung der Häufigkeit der Harninkontinenz in der deutschen Bevölkerung basierend auf Beutel, M. E., Hessel, A., Schwarz, R., & Brahler (2005).

## Einleitung

---

Die Kosten für Therapie und Hilfsmittel der Harninkontinenz stellen somit eine erhebliche Belastung für das Gesundheitswesen dar. Anhand des zu erwartenden demographischen Wandels ist mit einer weiteren Zunahme Betroffener zu rechnen (Onder et al., 2012). Eine im Jahre 2005 veröffentlichte Studie beziffert die jährlich bundesweit durch Harninkontinenz verursachten Kosten auf insgesamt 3,98 Milliarden Euro; 1,76 Milliarden Euro entfallen auf öffentlichen Krankenkassen, die Pflegeversicherungen werden mit 1,8 Milliarden Euro belastet (Klotz et al., 2007). Weitere Aspekte, weder aus medizinischer noch aus gesundheitsökonomischer Sicht zu vernachlässigen, sind häufige Komplikationen der Harninkontinenz. Neben gängigen urologischen Komorbiditäten, wie rezidivierenden Harnwegsinfekten, werden vor allem dermatologische Krankheitsbilder eine bedeutende Rolle zugesprochen. Hautmarzerationen, Ulzerationen oder gar Dekubitus sind häufig mit Harninkontinenz vergesellschaftet und führen schnell zu einer Hospitalisierung oder Unterbringung im Pflegeheim (Thom et al., 1997).

Die beträchtlichen Kosten zur Behandlung der Harninkontinenz sollten durch Entwicklung einer kausalen und suffizienten Therapie deutlich verringert werden – sei es durch Einsparung von Medikamenten und medizinischen Hilfsmitteln oder durch Abnahme von Häufigkeit oder Schweregrad der Harninkontinenz.

### 1.1.4 Bau und Funktion des exkretorischen Systems

#### 1.1.4.1 Embryonale Entwicklung und Anatomie

Die Harnblase (*Vesica urinaria*) bildet ein extraperitoneal im kleinen Becken gelegenes Hohlorgan mit sowohl elastischen als auch kontraktilen Eigenschaften, welches der temporären Speicherung des Harnes dient. Sie mündet im Bereich des *Trigonum vesicae* in die Harnröhre (*Urethra*), durch die bei der Miktion die willentliche Entleerung der Harnblase erfolgt. Harnblase und Harnröhre haben ontogenetisch den gleichen Ursprung und bilden somit eine funktionelle Einheit entodermalen Ursprungs. Sie entwickeln sich aus dem *Sinus urogenitalis*, einem Teil der Kloake und besitzen den auch für gastrointestinale Hohlorgane typischen dreischichtigen Wandaufbau; der muskuläre Anteil der Harnblase wird im Allgemeinen als Detrusormuskel (*M. detrusor vesicae*) bezeichnet. Elastische Kollagenfasern zwischen den Muskelschichten sorgen, unabhängig vom Füllungsgrad, für eine gleichmäßige Wandspannung der Harnblase. Ein ausgeprägter Venenplexus im *Paracysticum*, ein lateral der Harnblase gelegener Bindegewebsraum, ermöglicht eine Volumenzunahme der Harnblase.

## Einleitung

---

Die arterielle Blutversorgung der Harnblase erfolgt über zwei viszerale Äste der *A. iliaca interna*, die *A. vesicalis superior* und die *A. vesicalis inferior*. Das venöse Blut drainiert über den *Plexus venosus vesicalis*, beim Mann zusätzlich über den *Plexus venosus prostaticus* in die *V. iliaca interna*.

Bei der Innervation von Harnblase und Harnröhre wird zwischen einem willentlich steuerbaren, somatischen Anteil und einem nicht willentlich steuerbaren, autonomen Anteil unterschieden. Die *somatische* Innervation entspringt einem Teil des *Plexus lumbosacralis* (S1-S4) und gelangt als *Nervus pudendus* (S2-S4) über den Alcock-Kanal (*Canalis pudendalis*) zu seinen Zielstrukturen. Diese umfassen hauptsächlich die motorische Innervation des quergestreiften *M. sphincter urethrae externus* sowie Teile der sensiblen Innervation der Urethra. Die autonome Innervation setzt sich aus parasymphatischen, das heißt die Miktion fördernden und sympathischen, d.h. die Miktion verhindernden Reizen zusammen. Die parasymphatischen Neurone entspringen dem 2.-4. Sakralsegment und projizieren über den *N. splanchnicus pelvinus* ins kleine Becken. Über afferente Axone dieses Nerven vermitteln in der Blasenwand gelegene Dehnungsrezeptoren den Füllungsgrad der Harnblase ans Zentralnervensystem (ZNS). Der Sympathikus reguliert über Verminderung der Wandspannung die Füllung der Harnblase. Seine Axone entspringen dem Seitenstrang des oberen Lumbalmarkes und dem unteren Thorakalmark und projizieren über die *Nn. splanchnici lumbales* sowie die *Nn. hypogastici* zur Harnblase (Fowler et al., 2008).

### 1.1.4.2 Physiologische Kontinenzhaltung

Die Harnkontinenz wird durch einen Spinkterapparat im Bereich des Übergangs der Harnblase zur Harnröhre nahe des *Trigonum vesicae* gebildet. Bei den muskulären Verschlussmechanismen unterscheidet man zudem zwischen einem autonomen, glattmuskulären Anteil (*Lissosphincter*) und einem willentlich steuerbaren, somatischen Anteil aus quergestreifter Skelettmuskulatur (*Rhabdosphincter*). Der sonst dreischichtige *M. detrusor vesicae* läuft im Bereich des *Trigonum vesicae* einschichtig aus und legt sich im Bereich des *Ostium urethrae internum* elliptisch um das Lumen der proximalen *Urethra* und bildet einen funktionellen glattmuskulären Spinkter (*M. sphincter urethrae internus*). Fasern des *M. transversus perinei profundus* bilden auf Höhe des *Diaphragma pelvis* eine Schlinge aus quergestreifter Muskulatur um die *Urethra* und bilden den *M. sphincter urethrae externus* (Benninghoff and Drenckhahn, 2008). In Ruhe sorgen diese muskulären und bindegewebigen Komponenten für die Kontinenzhaltung. Bei körperlicher Belastung spielt die passive Drucktransmission eine bedeutende Rolle (Massey et al., 1987). Durch Zunahme des abdominalen Druckes steigt, vermittelt über die bindegewebige Aufhängung von Harnröhre und Harnblase, der Druck im Bereich des Blasenhalsses und der Harnröhre und es kommt zu einer Kompression der *Urethra*. Bei der aktiven Drucktransmission, wie sie bei plötzlicher Drucksteigerung im Bauch-Beckenraum auftritt ist die reflexartige Kontraktion der Beckenbodenmuskulatur für die Kontinenzhaltung von großer Bedeutung (Thuroff et al., 1987). Ist die Kapazitätsgrenze der Harnblase, beim Erwachsenen liegt sie zwischen ca. 350 und 600 ml, erreicht, kommt es über den *N. splanchnicus pelvinus* durch spinale und supraspinale Reflexe zu einer Reizung des Miktionszentrums und dessen übergeordneter Systeme im Hirnstamm (Schmidt et al., 2011). Die folgende Miktion wird hauptsächlich über den Parasympathikus gesteuert, er bewirkt eine Kontraktion des *M. detrusor vesicae* bei gleichzeitigem Öffnen des muskulären Spinkterapparates. Geht die Fähigkeit der kontrollierten Blasenentleerung oder eines suffizienten Zurückhaltens des Harns verloren, kommt es zu ungewolltem



Harnverlust und somit gemäß Definition der International Continence Society (ICS) zur Harninkontinenz (Abrams et al., 2002).

### 1.1.5 Charakterisierung verschiedener Inkontinenzformen anhand klinischer Symptome

Aus klinischer Sicht handelt es sich bei der Harninkontinenz weniger um ein exakt definiertes Krankheitsbild als vielmehr um einen Komplex verschiedener Symptome. Lange Zeit gab es keine einheitlichen Kriterien zur Unterscheidung der verschiedenen Inkontinenzformen. Erst in jüngster Zeit wurde unter Federführung der ICS eine konsensuelle Definition gefunden

Die ICS unterscheidet zwischen folgenden Formen: (Abrams et al., 2002)

- **Belastungsinkontinenz / „Stress urinary incontinence“ (SUI)**  
Bei dieser häufigsten Form der Harninkontinenz (Hunskar et al., 2004) kommt es aufgrund einer intraabdominellen Drucksteigerung wie z.B. durch Husten oder körperlicher Anstrengung zu einem ungewollten Urinabgang.
- **Dranginkontinenz / „Urge urinary incontinence“ (UUI)**  
Diese Form ist entweder begleitet von Verspüren eines Harndranges oder geht diesem unmittelbar voraus. Es kommt noch vor Erreichen der Toilette zum ungewollten Urinverlust.
- **Gemischte Inkontinenz / „Mixed urinary incontinence“ (MUI)**  
Hierbei kommt es zu unwillkürlichem Urinverlust, sowohl beim Verspüren eines Harndranges, als auch bei intraabdomineller Drucksteigerung.
- **(nächtliche) Enuresis**  
Sie bezeichnet jegliche Art ungewollten Urinverlustes. Geschieht dies während des Schlafes statt, spricht man von nächtlicher Enuresis.

- **Andere Formen:**

Ein ungewollter Urinverlust findet situationsbedingt z. B. während Lachens oder beim Geschlechtsverkehr statt. Sie können keiner der obigen Gruppen zugeordnet werden.

### **1.1.6 Aktuelle Therapieschemata und bisher mögliche Therapieoptionen zur Behandlung der Harninkontinenz**

Mangels kausaler Therapieansätze beschränken sich die aktuellen medizinischen Therapien der Harninkontinenz, seien sie verhaltenstherapeutisch, medikamentös oder invasiv, auf ein rein symptombezogenes Vorgehen in hierarchischer Therapieabfolge. Initial sollten konservative Methoden, wie Biofeedback oder eine Stärkung des *Diaphragma pelvis*, zur Anwendung kommen. Nur bei persistierenden Beschwerden sollte eine pharmakologische bzw. invasive Therapie erwogen werden (Rogers, 2008). Bei leichten Formen beschreiben sowohl Subak et al., als auch Wing et al. eine Verbesserung der Harninkontinenzsymptomatik durch eine Reduzierung des Körpergewichtes bei adipösen Patienten (Subak et al., 2005, Subak et al., 2009) (Wing et al., 2010). Knoepp et al. konnten zudem eine signifikante Reduzierung der Harninkontinenzproblematik nach bariatrischen Operationen nachweisen, was eher als indirekter Nutzen eines solchen Eingriffes anzusehen ist und nicht als primäres Operationsziel gelten sollte (Knoepp et al., 2013). Williams et al. belegen in ihrer Studie keine Unterschiede bezüglich der Wirksamkeit eines vaginalen Konus, Beckenbodentrainings und primärer Verhaltenstherapie bei gemischter,- und Stressinkontinenz (Williams et al., 2006). Bei Frauen mit Drangkontinenz konnte von Wang et al. in einer placebokontrollierten Studie die Überlegenheit der vaginalen Elektrostimulation über 12 Wochen gegenüber einer pharmakologischen Therapie mit Oxybutynin (2,5mg/d) gezeigt werden (Wang et al., 2006). Visco et al. beschreiben für orale Anticholinergikatherapien und Botoxinjektionen ähnliche gute Erfolgsraten. Beide Therapieoptionen unterscheiden sich hauptsächlich bezüglich des Nebenwirkungsprofils, der Behandlungsfrequenz und der Compliance des Patienten: orale Anticholinergika

## Einleitung

---

müssen täglich eingenommen werden. Sie vermindern oft die Speichelproduktion und führen somit zu einem trockenen Mund (Hauptabbruchkriterium der Therapie), zu gastrointestinalen und kardialen Nebenwirkungen sowie zu erheblichen kognitiven Defiziten v.a. bei älteren Patienten. Bei Botoxinjektionen in den *M. detrusor vesicae* muss wiederholt invasiv mittels Urethrozystoskopie vorgegangen werden -es kann zum Harnverhalt kommen, zu rezidivierenden Harnwegsinfekten, zur Verkürzung der Wirkintervallen und zu Abschwächung der maximal therapeutischen Wirkung infolge immunologischer Effekte (Visco et al., 2012). Seitens der minimalinvasiven Chirurgie gibt es eine breite Palette an sogenannten „fillern“ oder „bulking agents“ wie Silikon, Hyaluronsäure oder Kollagen, die im Bereich des Harnblasenschließmuskels unterspritzt werden (Dmochowski and Appell, 2000). Allen gemeinsam ist die begrenzte Wirkdauer: diese Stoffe werden resorbiert oder zirkulieren gar im Körper und müssen je nach Biokompatibilität spätestens nach ca. 9-12 Monaten „nachgespritzt“ werden (Davis et al., 2013). Bei ausgeprägter Belastungskontinenz, wie sie beispielsweise nach einer radikalen Prostatektomie auftreten kann, zeigen Unterspritzungen mit „bulking agents“ kaum Wirkung. McGuire et al. empfehlen eine chirurgische Intervention (McGuire, 2006). Hierbei werden zwei Verfahren beschrieben. Die Implantation eines artifiziellen Sphinkters oder eine Schlingen-OP. Artifizielle Sphinkter sind mittlerweile technisch ausgereift, stellen jedoch die Maximalvariante der Invasivität dar. Allerdings kann es zu Verschleiß oder Dislokationen kommen (Diokno, 2006). Bei der Schlingen-OP wird die Harnröhre im Bereich des Dammes leicht angehoben und der Beckenboden am Tiefertreten gehindert. Dem Patienten bleibt die Möglichkeit gegeben ohne vorherige Manipulation - wie beim artifiziellen Sphinkter - zu urinieren. Comiter et al. sehen die reduzierte Invasivität sowie die geringere Rate an Komplikationen und Revisionen als weiteren Vorteil einer Schlingen-OP an (Comiter, 2006). Sowohl bei Männern als auch bei Frauen hat sich hierbei der Einsatz eines künstlichen Bandes, z.B. aus Polypropylen, wegen der geringeren Komplikationsrate gegenüber einem xenogenen Biograft durchgesetzt (Rapp and Kobashi, 2008, Dikranian et al., 2004). Funk et al. konnten zeigen, dass im 9-Jahresintervall die Inzidenz an Reoperationen nach

## Einleitung

---

einer minimalinvasiven Therapie mit „bulking agents“ bei 61,2% lag. Dagegen mussten nach Kolposuspension lediglich 10,8% der Patienten in diesem Zeitraum sich einer erneuten operativen Therapie unterziehen mussten (Jonsson Funk et al., 2012).

Allen Therapien gemeinsam ist jedoch die fehlende Beseitigung der kausalen Ursache der Harninkontinenzsymptomatik. Zudem sind pharmakologische Therapien extrem von der Compliance abhängig und setzen, wie auch verhaltenstherapeutische Maßnahmen, einen hohen Grad an Eigenverantwortung des Patienten voraus. Dies ist beispielsweise bei dementen Patienten nicht gegeben. Chirurgische Interventionen stellen immer einen Eingriff in ein physiologisches Milieu dar. Das Einbringen von Fremdmaterial kann, wenn auch selten, die Gefahr einer Infektion oder Fremdkörperreaktion in sich bergen. Durch die Entwicklung einer minimalinvasiven Applikationstechnik mit autologen Stammzellen wären diese chirurgischen und immunologische Risiken auf ein Minimum zu reduzieren und es wäre somit die Möglichkeit einer kausalen Therapie gegeben – unabhängig von den kognitiven und somatischen Ressourcen des Betroffenen.

### 1.2 Stammzellen

#### 1.2.1 Allgemeine Merkmale und Eigenschaften von Stammzellen

Stammzellen sind die Grundlage eines jeden ausdifferenzierten Gewebes und werden anhand ihres ontogenetischen Alters in verschiedene Untergruppen gegliedert, welche sich bezüglich ihres Differenzierungspotentials unterscheiden.

- Totipotente Stammzellen finden sich nur in der frühen Embryonalphase bis zum 8 Zellstadium. Sie besitzen die Möglichkeit einen gesamten Organismus *und* plazentares Gewebe zu generieren (Surani and Tischler, 2012).
- Pluripotente Zellen haben einen Teil dieses Potentials verloren und können lediglich in die drei Zelllinien – Mesoderm, Entoderm, Ektoderm - der Keimblätter ausdifferenzieren, eine Differenzierung in plazentares Gewebe ist nicht mehr möglich.
- Multipotenten Stammzellen sind ontogenetisch am jüngsten und soweit prädifferentielliert, dass sie sich nur noch in verschiedene funktionelle Zellengruppen einer definierten Linie entwickeln können.

Allen gemeinsam ist jedoch die Möglichkeit der Autoreproduktion durch asymmetrische Zellteilung (Brivanlou et al., 2003). Es entsteht jeweils eine höher differenzierte Tochterzelle und eine Tochterzelle, die sich wiederum durch spezifische Stammzeleigenschaften auszeichnet (Knoblich, 2008).

#### 1.2.2 Mesenchymale Stammzellen (MSCs)

Friedenstein et al. beschrieben Ende der 60er Jahre erstmals „colony-forming fibroblast units“ bei aus dem Knochenmark und der Milz isolierten Zellen, die parallel zur Zellreihe der hämatopoetischen Zellen existieren, aber keine Blutzellen ausbilden (Friedenstein et al., 1970, Friedenstein et al., 1974, Friedenstein et al., 1968). Der Begriff mesenchymale Stammzelle selbst wurde erst Anfang der 90er Jahre von Caplan et al. geprägt (Caplan, 1991), nachdem

die Differenzierung dieser Zellen in Gewebe des Mesoderms bestätigt war (Kujawa et al., 1989). Pittenger et al. gelang der experimentelle Nachweis der Multipotenz (Pittenger et al., 1999), welche durch intrazelluläre Signale, in Abhängigkeit des Umgebungsmilieus, zu bestimmten Gewebe gelenkt werden kann (Watt and Hogan, 2000). Da MSCs aus nahezu jedem Gewebe isolierbar und identifizierbar sind (da Silva Meirelles et al., 2006), gilt es mittlerweile als gesichert, dass sie sich in vivo in einer perivaskulären Nische befinden (da Silva Meirelles et al., 2008) (Crisan et al., 2008).

### **1.2.2.1 Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen**

Auf Initiative der „International Society for Cellular Therapy“ fand 2005 eine Konsensfindung statt, um einheitliche Merkmale zur Charakterisierung der MSCs zu definieren (Horwitz et al., 2005). Bis dato wurde noch kein MSC-spezifischer Marker entdeckt (Koide et al., 2007). Wegen der äußerst heterogenen Gruppe, da aus nahezu jedem Gewebe isolierbar, wurde es zunehmend schwerer die Daten wissenschaftlicher Arbeiten, welche sich mit dem Einsatz von MSCs beschäftigen, zu vergleichen.

Neben der bereits von Friedenstein et al. verwendeten Plastikadhärenz spielen nunmehr die Expression bzw. fehlende Expression spezifischer Oberflächenmerkmale eine wichtige Rolle. Gefordert ist der positive Nachweis der Proteine CD73; CD90; CD105 und der Ausschluss einer CD45; CD34; CD14 oder CD11b; CD79a oder CD19 und HLA-DR Expression, sowie die in vitro Differenzierung in *Osteoblasten*, *Chondrozyten* und *Adipozyten* (Dominici et al., 2006).

### **1.2.2.2 myogenes Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen**

Zusätzlich zur Differenzierung in Chondrozyten, Adipozyten und Osteoblasten beschreiben Wakitani et al. ein Verfahren um MSCs in vitro in eine myogene Differenzierung zu lenken (Wakitani et al., 1995). Ein Überleben solcher prädiffenzierten Zellen im Tiermodell konnte nachgewiesen werden (Tian et al., 2010). Liechty et al. konnten jedoch in einem Großtiermodell beobachten, dass solch eine Prädiffenzierung nicht zwingend erforderlich ist, sondern dass sich native MSCs in Abhängigkeit ihres Umgebungsmilieus differenzieren und ihre Multipotenz nach der Transplantation beibehalten (Liechty et al., 2000). Es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass sich das myogene Differenzierungspotential je nach Ursprungsgewebe unterscheidet- aus Fettgewebe isolierte MSCs das beste myogene Potential besitzen (de la Garza-Rodea et al., 2012).

### **1.2.2.3 Immunmodulatorische Eigenschaften und parakrine Sekretion der MSCs**

Neben ihrer Funktion als Stammzellen wirken MSCs auch über modulierende Eigenschaften ihrer Umgebungsregion (Le Blanc and Mougiakakos, 2012). Sie verbessern die Neovaskularisation im myokardialen Infarktmodell durch paracrine Sekretion von beispielsweise VEGF (Miyahara et al., 2006) und zeigen eine anti-apoptotische Wirkung, die über Zell-Zell-Kontakte vermittelt wird (Cselenyak et al., 2010). Reinders et al. konnten in einer klinischen Phase I - Studie den positiven Effekt von MSC nach einer allogenen Nierentransplantation zeigen, es kam seltener zu einer Abstoßungsreaktion bzw. interstitiellen Fibrosierung (Reinders et al., 2013). Le Blanc et al. gelang es in einer klinischen Phase II - Studie die Wirksamkeit einer systemischen Gabe von MSCs bei der Therapie einer steroidresistenten GvHD aufzuzeigen (Le Blanc et al., 2008). Ursächlich hierfür könnte die von Sotiropoulou et. al in ex-vivo Untersuchungen gezeigte inhibitorische Wirkung der MSC auf nahezu alle Komponenten der

zellulären Immunantwort, sowie der natürlichen Killerzellen sein (Sotiropoulou et al., 2006). Genauer beschreiben Aggarwal et al. eine T-Zell supprimierende Wirkung der MSCs, welche in vivo sowohl indirekt über supprimierende Beeinflussung der antigenpräsentierenden Zellen (APC) als auch direkt über IL-10 Sekretion vermittelt wird (Krampera et al., 2003, Aggarwal and Pittenger, 2005), (Beyth et al., 2005). Diese immunsuppressiven Eigenschaften sind jedoch Interferon- $\gamma$  abhängig und setzen eine entzündliche Umgebungsreaktion im Sinne einer regenerativ intendierten Immunantwort voraus (Krampera et al., 2006).

### ***1.2.2.4 Bedeutung der MSC für die regenerative Medizin und stammzellbasierte Therapien***

Aufgrund ihrer ethischen Unbedenklichkeit, der leichten Kultivierbarkeit und ihrer Differenzierung in multiple differenzierte Gewebe in vitro (Jiang et al., 2002) und in Tierversuchen (Anjos-Afonso et al., 2004) sind MSC eine vielversprechende Option bzw. Zellquelle im Bereich des Tissue Engineering (Chen et al., 2008). Zudem zeigen kultivierte MSC auch bei Proliferation über viele Passagen keine chromosomalen Störungen (Pittenger et al., 1999). Lalu et al. beschreiben eine fehlende Teratogenität nach Transplantation. Ebenso zeigt sich kein erhöhtes Risiko für Infektionen, allergische Reaktionen oder gar letale Ausgänge nach MSC-Applikation (Lalu et al., 2012). Ein weiterer Vorteil der MSCs ist ihre in vitro durch externe Faktoren induzierte Fähigkeit der Prädifferenzierung (Spradling et al., 2001). Erste MSC-basierte Stammzelltherapien haben bereits den Weg in die klinische Erprobung gefunden (Le Blanc et al., 2008) und MSCs gelten als eine verheißungsvolle Zellquelle zur Entwicklung einer kausalen Therapie der Harninkontinenz (Aboushwareb and Atala, 2008).



### 1.2.3 Vorarbeiten auf dem Gebiet der stammzellbasierten Inkontinenztherapie

Im Bereich der stammzellbasierten Inkontinenztherapie konnten im Tiermodell bereits erste erfolgsversprechende Ergebnisse erreicht werden. Transplantierte Myoblasten zeigten bereits nach vier Tagen die Ausbildung von Myotuben (Chancellor et al., 2000); es konnte ein Überleben über 70 Tage im Kleintiermodell nachgewiesen werden (Yokoyama et al., 2001). Zudem wird bei diesen Zellen kein teratogenes Potential beschrieben. Sie wurden bereits in ersten klinischen Studien sowohl bei männlichen (Gerullis et al., 2012) als auch weiblichen Probanden erfolgreich eingesetzt (Carr et al., 2013). Es zeigte sich eine objektivierbare Verbesserung des Blasenverschlussdruckes bei elektrophysiologischen Messungen (Mitterberger et al., 2008a) und die behandelten Patienten berichten in 79% von einer kompletten Remission der Symptomatik (Mitterberger et al., 2007). Trotz dieser vielversprechender Ergebnisse besteht bei diesen Therapieansätzen das Problem der Spenderzellgewinnung fort. Autologe Myoblasten werden aus Muskelbiopsien gewonnen - ein chirurgisches Vorgehen, bei welchem die Komplikationen eines operativen Vorgehens berücksichtigt werden müssen. MSCs bieten dahingehend eine komplikationsarme Alternative, da sie beispielsweise auch aus peripherem Blut isolierbar sind (Kassis et al., 2006). In ersten Tierversuchen zeigten sie Erfolgsraten vergleichbar derer von Myozyten (Kim et al., 2011). Ein weiterer Vorteil der MSC ist ihre von Liechty et al. beschriebene Fähigkeit, sich in Abhängigkeit des Umgebungsmilieus in unterschiedliche Zelllinien wie Chondrozyten, Kardiomyozyten oder Myozyten zu differenzieren, ohne hierbei ihre Multipotenz zu verlieren (Liechty et al., 2000).

## 2 FRAGESTELLUNG

---

Ziel dieser Arbeit war es, anhand eines präklinischen, xenogenen Großtiermodelles zu prüfen, ob, mit bereits im urologisch-operativen Einsatz vorhandenen medizinisch-technischen Instrumenten, eine zielgenaue Applikation der aus Blutkonserven gewonnenen hMSCs erfolgen kann und inwiefern, nach 4 bzw. 8 Wochen, eine myogene Integration der injizierten Zellen stattgefunden hat. Für Aussagen über eine anatomisch korrekte Applikation und histologische Beziehungen der transplantierten Zellen zu dem Myozyten des Sphinkterapparats wurde dabei die Methodik der Immunfluoreszenz gewählt. Durch molekulargenetische Untersuchungen mittels rtPCR sollte weiterhin eine Aussage getroffen werden über die Anzahl der nach der jeweiligen Zeit noch vorhandenen humanen Zellen und deren mögliche myogene Differenzierung *in vivo*.

Als zusätzliche apparative Fragestellung sollte geklärt werden, ob durch orale Gabe des Immunsuppressivum Ciclosporin A beim Minipig konstante Plasmaspiegel erreicht werden können, die eine suffiziente Immunsuppression induzieren.

Die hier durchgeführten Arbeiten dienten dabei als präklinischen Pilotversuch für ein nachfolgendes, interdisziplinäres Großprojekt der DFG (KFO 273), welche sich zum Ziel gesetzt hat, eine autologe, stammzellbasierte Therapie der Harninkontinenz in der klinischen Anwendung zu etablieren.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

---

### 3.1 humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs)

Bei den zur Injektion in den *M. sphincter urethrae externus* der Mini-Pigs verwendeten Zellen handelt es sich um humane mesenchymale Stammzellen, welche aus laufenden Zellkulturen entnommen wurden. Diese wurden generiert aus Blutüberresten und Überständen aus zur Bluttransfusion verwendeten Systemen und Plastikmaterialien, welche uns freundlicherweise von unseren Kooperationspartnern der experimentellen Transfusionsmedizin zur Verfügung gestellt wurden. Die Charakterisierung der Zellen erfolgte mittels einer FACS®-Analyse gegen die von der ISCT geforderten exprimierten bzw. fehlenden Oberflächenmerkmale. Eine entsprechende Aufklärung und Einwilligung des Spenders zur Verwendung des verbleibenden Probenmaterials zu wissenschaftlichen Zwecken war vorausgegangen.

#### 3.1.1 Ethikvotum

Das Vorhaben wurde vom Regierungspräsidium Tübingen mit Nummer CU 1-07 (Aktenzeichen 35/9185.81-2) vom 20.12.2007 als genehmigt deklariert. Da es sich ausschließlich um Untersuchungen an nicht-menschlichen Geweben handelte, war das Vorliegen eines positiv beschiedenen Tierversuchsantrags hinreichende Voraussetzung für die Genehmigung des Vorhabens durch die Ethikkommission der Eberhard Karls Universität Tübingen.

### **3.1.2 Isolierung der hMSCs aus Blut**

Die Blutüberreste wurden nach Transfusion mittels steriler, physiologischer Kochsalzlösung aus dem Plastikmaterial ausgespült, abzentrifugiert, in ein Falcon geeigneter Größe überführt und mit ca. 5-facher Menge Lysepuffer zur Eliminierung der Erythrozyten versetzt. Dieser Lösungsansatz wurde für 15 min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend für 5 min. bei 400g abzentrifugiert. Das so gewonnene Pellet wurde einmalig mit HANKS-Salzlösung gewaschen und anschließend erneut zentrifugiert.

Das so entstandene Pellet enthält nun die gewünschten Zellen und wurde mit ca. 2-3 ml MSC-Medium resuspendiert und in eine 6-well-Platte transferiert.

Abschließend wurden die ausgesäten Well-Platten bei 37°C unter wassergesättigter Atmosphäre mit 10% CO<sub>2</sub> Anteil in Kultur genommen. Nach 48h erfolgt ein erster Wechsel des Mediums und die nicht adhärenen Zellen wurden zusammen mit dem Überstand verworfen. Weitere Medienwechsel fanden in Abständen von jeweils 2-3 Tagen statt.

### **3.1.3 Passagieren der Zellen**

Die erste Passage der Zellen fand nach ca. 7-10d statt, sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 90% erreicht hatten. Im weiteren Verlauf verkürzte sich diese Zeit bis zur 90%-Konfluenz auf durchschnittlich vier Tage. Das verbliebene Medium wurde abgesaugt, die Well-Platten anschließend für 5 min. bei 37°C mit einer Trypsinlösung inkubiert. Durch leichtes Beklopfen der Kulturflaschen sollten sich anschließend alle adhärenen Zellen ablösen lassen und die Zellen wurden in frischen Nährmedium resuspendiert, 1:2 gesplittet und erneut ausgesät.

### **3.1.4 Induktion einer myogenen Prädifferenzierung in vitro**

Um eine myogene Prädifferenzierung der hMSC zu erreichen, wurden die kultivierten Zellen für 24 h gegenüber einer 10  $\mu$ M 5-Azacytidin-Lösung exponiert. Zur Herstellung dieser Lösung wurde Vidaza<sup>®</sup> (Pharmion, Boulder, USA) in dem MSC-Kulturmedium mit Zusatz von 1:50 Thrombozytenkonzentrat auf die gewünschte Konzentration eingestellt, gut durchmischt und abschließend als Nährmedium der Zellkultur hinzugegeben. Bei der ersten Passagierung wurden die Zellen in einer Konzentration von  $5 \times 10^4$  Zellen/ml in ein T 75 Falcon Fläschchen überführt und für 2d bis zu einer Konfluenz von ca. 2/3 wachsen gelassen. Danach erfolgt die Zugabe der 10 $\mu$ M 5-Azacytidin-Lösung, welches nach einer 24 stündigen Inkubation im Brutschrank wieder abgesaugt wurde. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit PBS + Mg<sup>2+</sup> + Ca<sup>2+</sup> gewaschen und nach Zugabe von Standard MSC-Medium weiter in Kultur genommen.

### **3.1.5 Markierung der Zellen mittels PKH26-cell linker kit**

Die Markierung der Zellen, mit dem an die Lipidanteile der Zellmembran bindenden Fluoreszenzfarbstoff PKH26, erfolgte in Anlehnung an das Protokoll des Herstellers mittels des PKH26 Cell-Linker-Kit<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, Saint Louis USA). Nach Ablösen der Zellen aus den Kulturflaschen wurden diese in Eppendorf-Cups überführt und deren Zahl mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Nun wurde die gewünschte Menge an Zellen entnommen und 5 min. bei 250g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das gewonnene Pellet in 300  $\mu$ l Diluent (Bestandteil des Cell-linker-Kits<sup>®</sup>) durch leichtes Klopfen resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde nun zu dem in Diluent verdünnten PKH26 Farbstoff gegeben und für 7 min. unter regelmäßigem Durchmischen bei RT inkubiert. Anschließend wurde - um die Zellmarkierung zu beenden - 2ml Medium mit 20% fetal calf serum (FCS) hinzugegeben und 2 min bei RT inkubiert. Zur weiteren Kultivierung der Zellen wurden diese für 5 min. bei 250g

zentrifugiert, das gewonnene Pellet zweimalig mit je 10ml Medium (ohne FCS) gewaschen und anschließend in Medium resuspendiert und ausgesät.

## 3.2 Minipigs

### 3.2.1 Tierstamm und Zucht

Verwendung fanden insgesamt sechs Göttinger Minipigs der Firma Ellegaard (Dalmoose, Dänemark) im Alter von ca. 9 Wochen. Die Tiere wiegen bei der Einstellung zwischen 18-23 kg. Wegen der anatomischen Verhältnisse des harnableitenden Systems wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet: im Vergleich zu den männlichen Tieren befindet sich das *Ostium urethrae externum* bei den weiblichen Tieren in Afternähe. Es ist in Bauchlage mit dem Spekulum leicht einstellbar und somit gut für das Zystoskop zugänglich. Auch findet sich bei den weiblichen Tieren kein *Präputium* was für Katheterisierung und endoskopischer Untersuchung zusätzliche Hindernisse darstellen.

### 3.2.2 Tierhaltung

Die Haltung der Tiere erfolgte in den Stallungen der Experimentellen Medizin des Universitätsklinikums der Universität Tübingen (UKT) zu je drei Tieren pro Box unter konventionellen Hygienebedingungen. Es herrschen regulierte Temperaturen und Luftfeuchte sowie personenlimitierte Zutrittskontrolle. Betreut wurden die Tiere durch einen qualifizierten Versuchstierpfleger. Regelmäßig -und bei eventuell auftretenden Auffälligkeiten im Verhalten der Tiere - fanden Kontrollen durch den zuständigen Tierarzt des UKT statt. Frisches Leitungswasser stand den Tieren jederzeit *ad libitum* in handelsüblichen Tiertränken zur Verfügung, die Fütterungen erfolgten zu regelmäßigen Zeiten mit speziellem Schweinefutter. Des Weiteren befanden sich in den Boxen vielerlei Gegenstände, wie Bälle, Kanister, Beißketten, etc., um den Tieren einen Zeitvertreib zu bieten. 24 Stunden präoperativ wurden die Tiere nüchtern gehalten, es stand ihnen lediglich frisches Leitungswasser zur Verfügung. Die tägliche orale Aufnahme des Immunsuppressivums (CsA) durch die Versuchstiere wurde von den Tierpflegern und Tierarzt sichergestellt. Die Darreichungsform mittels Tabletten wurde dazu in handelsübliche Süßigkeiten

eingemischt und direkt aus der Hand verfüttert. Um die Gesundheit der Versuchstiere fortlaufend zu dokumentieren, bei einer eventuell auftretenden Infektionskrankheit frühzeitig kurativ intervenieren zu können sowie um eine Über- oder Unterdosierung des Immunsuppressivums zu vermeiden, erfolgten regelmäßige Blutabnahmen und Laborbestimmungen von Blutbild, klinischer Chemie und CsA-Spiegel (Tabelle der fortlaufenden Laborergebnisse siehe Anhang 7.1).

### **3.2.3 Tierversuchsantrag**

Eine Genehmigung des Versuchsvorhabens durch das Regierungspräsidium Tübingen liegt vor (Aktenzeichen 35/9185.81-2 Versuchs-Nr. Cu1/07)

## **3.3 Operative Transplantation der hMSCs**

Sämtliche Eingriffe am Tier wurden von dem erfahrenen urologischen Operateur, Herr Dr. med. Markus Renninger, unter tierärztlicher Aufsicht am narkotisierten Tier durchgeführt. Als Assistenz standen sowohl qualifizierte Mitarbeiter des Labors für Tissue engineering der Universitätsklinik für Urologie als auch eigens ausgebildete Tierpfleger mit langjähriger Erfahrung im Tier-OP zur Verfügung.

### **3.3.1 Präoperative Vorbereitungen der Tiere**

An den OP-Tagen wurden die Tiere, nach 24-stündigen Nahrungskarenz, durch den zuständigen Tierarzt Herrn Tim-Oliver Greiner prämediziert. Vor dem Transport in den Tier-OP erhielten sie in ihren Stallungen Atropin (0,05mg/kg KG) bzw. Ketamin (8-14mg/kg KG) intra muskulär (i.m.) und zur Narkoseinduktion Midazolam (0,2-1,0mg/kg KG) bzw. Ketamin (8-14mg/kg KG), ebenfalls i. m. Anschließend wurde in geschlossenen und abgedunkelten Aluminiumboxen der



Transport in den Operationssaal durchgeführt. Dort erfolgte, nach vorrausgegangener Desinfektion, die Anlage eines peripheren Venenkatheters (pVK) in eine der Ohrvenen um eine Vertiefung der Anästhesie mittels Propofol (2-5 mg / kg KG) i.v. herbeizuführen und die endotracheale Intubation zu erleichtern. Im weiteren Verlauf wurde bei volumenkontrollierter Beatmung die Anästhesie durch 0.8- 1,6 Vol. % Isofluran aufrechterhalten und zur analgetischen Abdeckung Fentanyl (30-100 µg/kg KG/h) i.v. gegeben. Die Tiere wurden in Bauchlage gelagert und es wurde mit Hilfe eines Kinderspekulums ein Katheter zur Entleerung der Harnblase eingeführt. Zum Ausschluss eines Harnwegsinfektes erfolgte die Untersuchung des gewonnenen Urins mittels eines Urin-Streifentests (Combur-Test<sup>®</sup>, Roche-Diagnostics, Mannheim, Deutschland) auf das Vorhandensein typischer Zeichen eines bakteriellen Harnwegsinfektes (Leukozyten, Nitrit, pH-Wert, Erythrozyten, etc.).

### **3.3.2 Endoskopische Applikation der hMSCs**

Nach gründlicher Desinfektion der Afterregion mit einem speziellen Schleimhautantiseptikum (Braunol<sup>®</sup>, Braun, Melsungen, Deutschland) wurde dieser Bereich steril abgedeckt. Mit Hilfe eines Kinderspekulums wurde die Harnröhre aufgesucht und das Endoskop (Karl Storz, Tuttlingen, Deutschland) eingeführt. Die PKH26 markierten Zellen wurden unter endoskopischer Sicht ca. 2-3 cm distal des Blasenhalbes, im Bereich des Schließmuskels, zirkulär eingespritzt. Je Depot wurden 150µl Zellsuspension bzw. bei den sham-operierten Tieren MSC-Medium injiziert, was einer Zellzahl von  $1,2 \times 10^6$  Zellen entspricht. Bei den Pilottieren erfolgt zudem eine Markierung der Einspritzstellen mit Tusche, um diese Stelle bei der histologischen Aufarbeitung wieder ausfindig machen zu können. Wegen nicht zufriedenstellender Ergebnisse, im Sinne einer flächigen Diffusion der Tusche ins Gewebe, wurde bei den nachfolgenden Tieren jedoch darauf verzichtet.

## MATERIAL UND METHODEN

<b>Versuchstiernummer</b>	<b>transplantierte Zellen</b>	<b>Standzeiten</b>
77629 (Pilottier)	undifferenzierte MSC	4 Wochen
77539 (Pilottier)	natives Zellmedium	4 Wochen
104125	undifferenzierte MSC	8 Wochen
103963	natives Zellmedium	8 Wochen
107146	differenzierte MSC	8 Wochen
107194	differenzierte MSC	8 Wochen
107291	natives Zellmedium	8 Wochen

*Tabelle 3-1: Tabellarische Übersicht der Versuchstiere sowie Darstellung der transplantierten Zellen. Scheinoperierte Tiere erhielten lediglich das native Zellmedium injiziert. Native MSC wurden direkt ohne eine vorausgehende Induktion transplantiert, die prädifferentiierten MSC wurden für 24h gegenüber einer 5' AZA-Lösung exponiert und somit einer myogenen Praedifferenzierung zugeführt. Die oben genannten Standzeiten verstehen sich als die Zeitspanne nach Zelltransplantation bis zur erfolgten Euthanasie.*

### **3.4 Immunsuppression mittels Ciclosporin A (CsA)**

#### **3.4.1 Pharmakologische Eigenschaften von CsA**

Ciclosporin A (CsA), ein Immunsuppressivum aus der Gruppe der Calcineurininhibitoren, entfaltet seine immunsuppressive Wirkung über die indirekte Hemmung von Calcineurin. Dadurch wird die Bindung des nuclear-factor-activating-T-Zell-Rezeptor (NF-AT) im Zellplasma, die Ausschüttung von proinflammatorischen Cytokinen - wie Interleukin-2 oder Interferon- $\gamma$  - vermindert und die T-Lymphozyten werden supprimiert. Chemisch entspricht CsA einem zyklischen Peptid, welches, bei oraler Applikation, hauptsächlich hepatisch metabolisiert und über die Galle ausgeschieden wird. Nur ca. 6% der oral applizierten Menge unterliegen einer renalen Elimination. Klinische Anwendung findet CsA in der Transplantationsmedizin oder bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie *Colitis ulcerosa* (Laharie et al., 2012) oder Glomerulonephritiden. Es besitzt eine enge therapeutische Breite und erfordert ein engmaschiges Drug-Monitoring (Schiff et al., 2007). Typische Nebenwirkungen sind Ödeme, Hypertonie, Niereninsuffizienz, Leberschädigungen, sowie erhöhte Infektanfälligkeit - bei Langzeitanwendung außerdem die mögliche Entwicklung von Malignomen.

#### **3.4.2 Ciclosporin-A Applikation**

Die Gabe des Immunsuppressivum findet in Anlehnung an das von Ming et al. publizierte Therapieschema statt (Min et al., 2002). Noch während der Operation unter Vollnarkose und Überwachung der Vitalparameter erfolgt die erstmalige Verabreichung, es werden - analog zur Nierentransplantation beim Menschen - 15 mg/kg Körpergewicht (KG) i.v. verabreicht. Die weitere Medikamentengabe erfolgte jeden zweiten Tag gewichtsadaptiert p. o. in Tablettenform und beträgt ebenfalls 15 mg/kg KG. Am Anfang der Versuchsreihe - bei den beiden Pilottieren - wurden die Tabletten noch dem Futter der Tiere beigemischt im Trog verfüttert. Da hierbei jedoch die gezielte Aufnahme durch ein einzelnes Tier nur

schwer zu erreichen war, wurden den weiteren Versuchstieren die Tabletten in Süßigkeiten, wie z.B. Gummibärchen oder Marshmallows verpackt und den einzelnen Tieren gezielt zugefüttert. Als Therapieziel wurde ein Talwert-Plasmaspiegel von mindestens 100ng/ml, vergleichbar der Erhaltungsdosis nach Nierentransplantation beim Menschen, angestrebt.

### **3.4.3 Monitoring der Ciclosporin-A Plasmakonzentration sowie weitere Laborparameter**

Die Bestimmung der CsA-Plasmakonzentration erfolgte mittels eines Enzym-Immunoassay aus 1ml EDTA Blut zu definierten Zeitpunkten, in der Regel alle 7 Tage. Um eine sichere Bestimmung des Nadirs zu erlangen fanden die Laborkontrollen mind. 12h nach der letzten oralen CsA-Gabe statt. Da sich die Tiere unter einer iatrogen induzierten Immunsuppression befanden, unterlagen sie einer erhöhten Infektanfälligkeit, insbesondere im Bereich des operierten Harntraktes. Um eine Infektion frühzeitig zu erkennen und gegebenenfalls antibiotisch zu intervenieren erfolgten, neben den CsA-Bestimmungen, die regelmäßige Kontrolle der Leukozyten und zusätzlich, wegen der hepatischen und renalen Metabolisierung des CsA, die Bestimmung des Leberenzymes  $\gamma$ -GT sowie der Nierenretentionswerte. Aus tierschutzrechtlichen Gründen fanden die Blutentnahmen nicht bei allen Tieren statt, sondern lediglich repräsentativ bei vier Exemplaren. Um etwaige Beeinflussungen unabhängig von der xenogenen Zelltransplantation zu detektieren, waren dies jeweils ein transplantiertes Tier und ein scheinoperiertes Tier der 4 und 8 Wochen Gruppe. Die anschließende Analyse erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikum Tübingen.

### 3.5 Sakrifizierung und Organentnahme

Die Entnahme der *Urethra* sowie der *Vesica urinaria* erfolgte vier bzw. acht Wochen nach Applikation der hMSC bzw. des Mediums im Tier-OP des UKT. Bezüglich der perioperativen Vorbereitungen galten die in 3.3.1 genannten Maßnahmen. Die Euthanasie der Tiere wurde vom zuständigen Tierarzt durch die Gabe einer letalen Dosis Trapanal® und 1M Kaliumchlorid i. v. durchgeführt. Ebenfalls durch den zuständigen Tierarzt erfolgen die Feststellung des Todes und anschließend die Freigabe zur Organentnahme. Die Kadaver wurden in Rückenlage auf dem OP-Tisch fixiert, die Bauchhöhle mit einem Skalpell eröffnet und der Beckenboden mit einer oszillierenden Knochensäge durchtrennt. Nach Präparation der *Vesica urinaria* und der *Urethra* bis zu dem vaginalen Ende erfolgte die en-bloc-Entnahme dieser Strukturen. Auf eine Entnahme der iliacalen und lumbalen Lymphknotenpakete wurde verzichtet. Abschließend wurde der Bauch mittels Nähten wieder situationsgerecht verschlossen und der Kadaver letztendlich der fachgerechten Entsorgung zugeführt.

## **3.6 Immunfluoreszenz**

### **3.6.1 Grundprinzipien der Immunfluoreszenzmikroskopie**

Die direkte Immunfluoreszenz - wie wir sie verwenden- beruht auf der direkten Bindung eines spezifischen Antikörpers mit dem korrespondierenden Merkmal beim zu untersuchenden Gewebe. Besitzt dieser Antikörper aufgrund autofluoreszierender Eigenschaften die Fähigkeit bei Anregung durch eine Strahlenquelle definierter Wellenlänge Licht zu emittieren, handelt es sich um eine primäre Fluoreszenz. Im Gegensatz hierzu bindet bei der sekundären Fluoreszenz der primäre Antikörper die Zielstruktur ohne bei Anregung ein Signal zu emittieren. Hierfür ist der Einsatz eines sekundären Antikörpers nötig, welcher an ein Fluorochrom gekoppelt ist. Dieser bindet an den primären Antikörper und bei Anregung kann nun - indirekt - ein Signal des primären Antikörpers detektiert werden. In der Praxis ist die Methode der sekundären Immunfluoreszenz weit verbreitet, da viele eingesetzten Antikörper nicht auf autofluoreszenten Stoffen basieren. Der Sekundärantikörper muss sich immer gegen die Spezies richten, die zur Produktion des Primärantikörpers eingesetzt wurde - häufig Nager oder Paarhufer - und sollte eine möglichst geringe Affinität zur untersuchenden Spezies aufweisen, um das Hintergrundrauschen zu minimieren.

### **3.6.2 Aufarbeitung des urethralen Gewebes**

Die entnommene Urethra wurde mit Skalpell und Schere von den makroskopischen Verunreinigungen wie Fett und Bindegewebe befreit. Anschließend wurde sie in vier bis fünf max. 1 cm lange Stücke unterteilt, am proximalen (der Blase zugewandten) Ende mit einem Vicryl-Faden markiert und über Nacht (ca. 8 Stunden) bei 8°C in 18% Succrose-Lösung kryoprotectiert. Am folgenden Tag, nachdem das Gewebe vollständig auf den Boden der Lösung abgesunken war, wurde es in Tissue Tek® eingebettet.

### **3.6.3 Einbettung der Gewebeproben in Tissue Tek®**

In die zuvor beschrifteten Einbettschälchen wurde Tissue Tek® (Sakura, Leiden, Niederlande) mit ca. 2-3mm Dicke eingefüllt. Das Gewebe wurde mit einer Pinzette senkrecht mit dem proximalen Ende nach unten auf dieses Mediapolster gesetzt und das Schälchen mit Tissue Tek® aufgefüllt, bis das Gewebe vollständig mit Eindeckmedium umflossen war. Nun wurde das Schälchen mit einer großen Klemme gegriffen und unter dem Abzug langsam (ca. 1cm / Minute) in flüssigen Stickstoff eingetaucht. War die Eindeckschale vollständig von Stickstoff umspült, wurde das Gefäß noch für ca. 1 Minute im Stickstoff belassen, um ein vollständiges Durchfrieren des Gewebelockes zu garantieren.

Abschließend wurde die Eindeckschale in Aluminiumfolie eingehüllt, beschriftet und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C trocken gelagert.

### **3.6.4 Herstellung der Semidünnschnitte**

Zur Herstellung der Semidünnschnitte werden die Gewebelöcke in das Microtom (Leica, Wetzlar, Deutschland) eingespannt, bei -20°C bis -25°C in 5µm Dicke geschnitten und pro Objektträger zu je zwei Schnitten aufgezogen. Vor dem Aufziehen auf den Objektträger kann das Präparat bei Bedarf mit einem gekühlten Borstenpinsel geglättet werden.

### **3.6.5 Detektion der PKH26 positiven humanen Zellen**

Zum Wiederauffinden der transplantierten PKH26 markierten Zellen findet die Fluoreszenzmikroskopie Anwendung. Die angefertigten Schnitte werden hierfür unter einem Mikroskop (Karl Zeiss, Jena, Deutschland) mit in den Strahlengang integrierter Quecksilber-Lampe (VHW50f-2b), auf das Vorhandensein von PKH26-positiven Zellen untersucht. Der PKH26 Farbstoff besitzt dabei ein

Maximum der Lichtabsorption bei der Wellenlänge von 552nm und ein Maximum der Lichtemission bei der Wellenlänge von 567nm (Technical Bulletin, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Die so markierten Zellen zeigen bei o.g. entsprechender Anregung eine rote Fluoreszenz. Nach ihrem Auffinden wird die Lokalisation vermerkt. Anschließend werden die Schnitte lichtgeschützt über Nacht an der Luft getrocknet und schließlich trocken bei -80°C bis zur Färbung zwischengelagert.

### **3.6.6 Etablierung eines Antikörpers zum spezifischen Nachweis humaner Zellkerne**

Eine spezifische Detektion der humanen Zellen erfolgt über einen Antikörper, welcher spezifisch humane Zellkerne färbt. Zur Verfügung stehen drei verschiedene Produkte, die bezüglich ihrer Spezifität geprüft werden.

- Anti-Nuclei Antibody, clone 235-1 | MAB1281 (Merck KGaA Darmstadt, Deutschland)
- Anti-Nuclei, clone 235-1, Alexa Fluor® 488 conjugate (Merck KGaA Darmstadt, Deutschland)
- Anti-Nuclei Antibody, clone 3E1.3 | MAB4383 (Merck KGaA Darmstadt, Deutschland)



Ein Problem stellt hierbei die hohe Kreuzreaktivität zwischen humanen und porcinen Proteinen dar. Laut Hersteller ist eine Reaktion bzw. Färbung des Antikörpers von Zellkernen bei Mäusen und Ratten nachweislich ausgeschlossen, betreffend des Verhaltens in porcinem Gewebe gibt es jedoch herstellerseits bislang keine verwertbaren Angaben. Um die Eignung des Antikörpers für die vorliegende Fragestellung zu objektivieren, wird dieser auf

- humanen Skelettmuskel
- porcinen Skelettmuskel
- native porcine Urethra
- porcine Urethra mit transplantierten hMSC

gefärbt. Neben dieser Gewebespezifität werden auch verschiedene Antigendemaskierungsverfahren getestet, um eine möglichst hohe Spezifität und Sensitivität zu erreichen. Diese umfassen eine Hitzeinduktion mittels Citratlösung, Acetonvorbehandlung, Triton-X Lösungen verschiedener Konzentrationen und des Einsatzes von Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ). GleichermäÙen werden verschiedene Inkubationszeiten und Temperaturen gegeneinander verglichen.

### 3.6.7 Nachweis einer anatomisch korrekten Applikation und funktionellen Integration mittels myogener Proteine

Die Färbungen erfolgen in Anlehnung an die von den Herstellern herausgegebenen Empfehlungen, wobei die Verdünnungen angepasst werden (vgl. Tabelle 0). Zur internen Qualitätssicherung und zur Aussagekraft bezüglich bestehender Kreuzreaktionen, werden sämtliche Antikörper auf porcinem, quergestreiften Muskel (aus dem Tier-OP des UKT), menschlichem, quergestreiften Muskel (aus der Universitätsklinik für Urologie; Patientenaufklärung liegt vor) und auf nativen porcinen Harnröhren getestet. Je Objektträger sind jeweils zwei Schnitte aufgezogen: die zu untersuchende Probe und eine negativ Kontrolle.

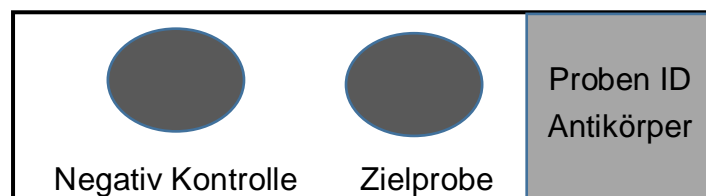


Abbildung 3-1: schematische Darstellung der Probenanordnung auf den Objektträgern

Bei den Färbeprozessen ist es wichtig, alle Schritte möglichst in einer lichtgeschützten Umgebung durchzuführen, um ein übermäßiges „Ausbleichen“ des PKH26 zu verhindern. Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Schnitte werden aufgetaut, für ca. fünf Minuten luftgetrocknet und mit einem Wachsstift umrandet. Zur besseren Haftung auf dem Objektträger werden die Proben 30 Min. bei  $40^{\circ}\text{C}$  auf der Heizplatte „angebacken“, anschließend wird sie  $2 \times 5$  min in PBS gewaschen. Zur Verminderung der unspezifischen Bindung des sekundären Antikörpers (AK) wird nun mit unverdünntem Goat-Serum für 30 min bei RT geblockt. Dies wird anschließend lediglich abgekippt und pro Präparat je  $100\mu\text{l}$  primär AK für 1h bei RT in der feuchten Kammer inkubiert. Um eine unspezifische Bindung zu minimieren, sind diese in Antibody Diluent (Dako, Glostrup, Dänemark) verdünnt.

## 3.6.8 Tabellarische Übersicht der Antikörper

Name	Zielstruktur	Hersteller	Isotyp	Verdünnung
anti CD 45	Leukozyten	Abcam, Cambridge, UK	mIgG <sub>1</sub>	1:50
anti human HLA-ABC antigen clone W6/32		Dako, Glostrup, Dänemark	MigG <sub>2a, κ</sub>	1:50
Anti nuclei antibody clone 235-1	humane Zellkerne	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	mIgG <sub>1</sub>	1:100
Anti-fast skeletal Myosin antibody [MY-32]	Skelettmuskulatur	Abcam, Cambridge, UK	mIgG <sub>1, κ</sub>	1:50
Anti-Myosin Antibody, slow muscle, clone NOQ7.5.4D	Skelettmuskulatur	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	mIgG	1:1000
Cy2-conjugated AffinePure Goat anti-mouse IgG	IgM und IgG der primär AK	Jackson Immuno-Research, Baltimore, USA	-	1:50- 1:200
DAPI Mounting Medium	DNA	Dianova, Hamburg, Deutschland	-	0,1% NaN <sub>3</sub>
monoclonal anti α-SMA clone 1A4	glattmuskuläres Actin	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA	mIgG <sub>2a</sub>	1:2000

MATERIAL UND METHODEN

Name	Zielstruktur	Hersteller	Isotyp	Verdünnung
monoclonal Mouse Anti-Human Desmin Clone D33	Glatte und quergestreifte Muskulatur	Dako, Glostrup, Dänemark	mIgG <sub>1,κ</sub>	1:100
Ms X Cytokeratin AE1/AE3	Urothel	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	mIgG <sub>1</sub>	1:100
Purified anti-human CD 105	MSC	BD Pharmigen, Heidelberg, Deutschland	mIgG <sub>1,κ</sub>	1:200
Purified anti-human CD73 Clone : AD2	MSC	BioLegend, San Diego, USA	mIgG <sub>1, κ</sub>	1:200
Purified Mouse Anti-Human CD90	MSC	BD Pharmigen, Heidelberg, Deutschland	mIgG <sub>1,κ</sub>	1:200
Purified MouseAnti-MyoD	Myosin differenzierender Zellen	BD Pharmigen, Heidelberg, Deutschland	mIgG <sub>1, κ</sub>	1:100

*Tabelle 3-2 Tabellarische Übersicht der verwendeten Antikörper. Die Verdünnung erfolgte mittels Antibody Diluent (Dako, Glostrup, Dänemark) und wurde auf oben beschriebene Konzentrationen eingestellt.*

### 3.7 Molekularbiologie / qPCR

#### 3.7.1 Funktionsprinzip der qPCR

Die Polymerase-Kettenreaktion beruht grundlegend auf der exponentiellen in vitro Amplifizierung von DNA-Polynukleotidsträngen einer im Voraus definierten Zielstruktur (Primer). Charakteristisch für diesen Prozess sind unterschiedliche Temperaturlevel, die jeweils eine spezifische Funktion erfüllen und sich in ihrer zeitlichen Dauer unterscheiden. Initial erfolgt eine Erhitzung der Reaktionslösung auf 95°C, um die beiden DNA-Doppelstränge durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen voneinander zu trennen (Denaturierung). Es folgt eine schnelle Abkühlung der Proben auf 60°C, bei der sich die *Thermus Aquaticus-Polymerase* (Taq-Polymerase) sowie die spezifischen Oligonukleotidprimer an den freiliegenden Matrizenstrang anlagern (Annealing). Es folgt der entscheidende Schritt der Amplifizierung, der in Abhängigkeit des Temperaturoptimums des verwendeten Enzymes - i.d.R. zwischen 68-72°C gelegen - gewählt wird. Die eingesetzte Taq-Polymerase bildet mittels der im Mastermix enthaltenen Energie - in Form von ATP -, Oligonukleotidprimer und den DnTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) einen komplementären Matrizenstrang. Der individuell gewählte Primer dient als Start- bzw. Ansatzpunkt der Taq-Polymerase und sichert die ausschließliche Vervielfältigung der Zielsequenz.

Die in dieser Untersuchung eingesetzte q-PCR ermöglicht im Unterschied zur klassischen PCR zudem eine quantifizierte Messung der Zielsequenz, Verwendung fand das TaqMan<sup>®</sup>Gen Expression Assay SM-System (Applied Biosystems, Foster City, USA). Diese TaqMan<sup>®</sup>-Primer besitzen an ihrem 5'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff und an ihrem 3'-Ende einen Quencher, welcher das Fluoreszenzsignal - durch Fluoreszenz-Energietransfer - jedoch unterdrückt. Lagert sich der Primer nun an seinen korrespondierenden Strang an, kommt es durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der eingesetzten Taq-Polymerase zur Abspaltung des Quencher und das Fluoreszenzsignal wird messbar. Nach jedem Zyklus wird nun die Fluoreszenz gemessen. In der exponentiellen Phase der PCR korreliert die zunehmende Intensität des Fluoreszenzsignales direkt mit der

Zunahme des Zielproduktes. Der CT-Wert gibt den Zyklus an, ab dem das Fluoreszenzsignal deutlich aus dem Hintergrundrauschen hervortritt. Durch Verwendung einer Standardverdünnungsreihe können Aussagen zum Mengenverhältnis Zielsequenz - Gesamt-cDNA getroffen werden.

### **3.7.2 Gewinnung der Gewebeproben zur RNA Isolierung korrespondierend zu PKH26 positiven Schnitten**

Am Beginn der Untersuchung wird eine rein qualitative Screening-PCR auf das Vorhandensein humaner GAPDH-Sequenzen durchgeführt. Das Molekül GAPDH wird im Folgenden auch als house-keeping Gen verwendet, d.h. ein Molekül, welches bei den unterschiedlichen Stoffwechsellagen einer Zellart konstant exprimiert wird und auf welches alle anderen der zu bestimmenden Gene (genes of interest) normalisiert werden. Je Versuchstier wird eine Probe aus dem Bereich des *M. sphincter urethrae internus* - dem Bereich der hMSC Injektion - sowie eine Probe aus dem Bereich der distalen/vaginalen Urethra entnommen. Um sicher zu gehen, dass die Proben aus dem Bereich der transplantierten hMSC stammen, wird mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops nach PKH26 positiven Arealen in den Schnitten proximal der Probenentnahme, sowie distal der Probenentnahme gesucht. Es werden nur Proben verwendet, welche innerhalb dieser fluoreszierender Areale liegen. Bei der Probengewinnung ist zwingend darauf zu achten eine Kontamination des porcinen Gewebes mit humanen Zellen zu vermeiden. Sämtliche Arbeitsflächen werden hierfür vor Arbeitsbeginn einer gründlichen biologischen Desinfektion mit 70% Alkohollösung für min. 15 min unterzogen um etwaige Ribonukleasen (RNAsen) sowie DNA-Verunreinigungen zu eliminieren. Bei allen Arbeitsschritten werden Nitril Handschuhe getragen. Vor jedem Wechsel auf einen anderen Gewebestück wird das Messer des Kryotoms gewechselt. Eine erneute ausgiebige Desinfektion der Kühlkammer und des Streckertisches mit 70% Alkohollösung schließen sich an. Ebenso werden die Kanülen und Handschuhe erneuert.

Vorbereitet wird je Probe ein 1,5 ml autoklaviertes, beschriftetes Eppendorf Cup, welches mit 350µl RLT-Puffer (RNeasy-Set, Qiagen, Hilden, Deutschland) und 3,5µl β-Mercaptoethanol (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) befüllt wird. Als Ausgangsmaterial der RNA-Isolation dienen 3-4 Semidünnschnitte die mit Hilfe einer sterilen, bei -20°C vorgekühlten, Kanüle auf dem Streckertisch des Kryotoms von den Resten des Einbettmediums (Tissue Teck<sup>®</sup>) befreit und anschließend in das vorbereitete Eppendorf Cup gegeben werden. Es ist unabdingbar, dass nur Gewebe vom desinfizierten Streckertisch direkt verwendet wird, da bei den Schnittresten aus dem Auffangbehälter die Kontaminationsgefahr mit humanen Zellen zu groß ist. Mit der Kanüle wird das Gewebe nun durch leichtes Rühren in Lösung gebracht - es bildet sich eine leicht schleimige Proteinlösung. Auf eine weitere Homogenisierung des Gewebes kann verzichtet werden, da der Gewebeverbund aufgrund der geringen Schnittdicken von 5 µm bereits ausreichend gelöst ist. Die so gewonnene Lösung wird nun über Nacht bei -80°C gelagert, am folgenden Tag findet die Isolierung der RNA statt.

Da sich in der initialen Screening-PCR kein humanes GAPDH nachweisen ließ, wurde eine finale PCR mit der verbleibende Gewebeprobe - aus dem Bereich des *M. sphinkter urethrae internus* - von Versuchstier 107146 (4 Wochen Standzeit + prädifferentierte hMSC) durchgeführt. Der Gewebekblock hatte ein Gesamtgewicht von 0,52g, wurde mit einem sterilen Skalpell in drei etwa gleich große Stücke zerteilt und zweimal in eiskaltem, sterilen und DNA/RNA freiem PBS gewaschen, um das noch anhaftende Tissue-Tek<sup>®</sup> möglichst vollständig zu entfernen. Anschließend wird jeder Gewebeprobe in ein autoklaviertes, mit 1000µl RLT-Puffer (Bestandteil des RNeasy-Set) und 10µl β-Mercaptoethanol (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) befülltes, Eppendorf-Cup gegeben und mit dem TissueRuptor<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden, Deutschland) homogenisiert. Vom entstandenen Lysat werden 350µl entnommen und nach dem oben beschriebenen Protokoll die RNA extrahiert. Das verbliebene Lysat wird bei -80°C trocken gelagert.

### 3.7.3 Isolierung der RNA mit Hilfe des RNeasy Minikit

Die Isolierung der RNA erfolgt in Anlehnung an das vom Hersteller angegebene Protokoll, alle Arbeitsschritte finden unter dem Abzug statt. Die am Vortag gewonnenen Gewebelysate werden aufgetaut und pro Eppendorf Cup wird jeweils 300µl 70% Ethanol hinzugegeben. Mit der Pipette werden die Lösungen homogenisiert und anschließend auf die Sammelsäule (rosa) des RNeasy Sets gegeben, wobei weder die Membran, noch die Ränder der Säule berührt werden dürfen um eine Beschädigung dieser zu vermeiden. Um eine Trennung der flüssigen Phase und der Proteine zu erreichen wird für 15 sec bei 10 000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss anschließend verworfen. Nun gibt man 350µl des Waschpuffers (RW1) auf die Säule, um etwaige Verunreinigungen zu entfernen. Die Sammelsäule wird erneut für 15 sec bei 10000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss, welcher die Verunreinigungen enthält, verworfen. Eine selektive Isolation der RNA wird durch den Verdau der noch vorhandene DNA mittels des RNase free DNase Sets (Qiagen, Hilden, Deutschland) erreicht. Hierzu wird 80µl der DNase-Lösung auf die Säule gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Danach erfolgt erneut ein Waschschrift mit 350µl RW1 Puffer und anschließende Abzentrifugation. Das Eppendorf Cup wird mitsamt Inhalt verworfen und die Säule in ein frisches Eppendorf Cup gestellt. Zur Reinigung der membrangebundenen RNA erfolgen abschließend zwei Waschungen mit je 500µl RPE-Puffer. Bei dem ersten Durchgang wird für 15 sec. bei 10 000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss anschließend verworfen. Nach Zugabe der zweiten Dosis RPE-Puffer wird die Säule für 2 min zentrifugiert, der Durchfluss erneut verworfen und die Säule nochmals für 15 sec trocken geschleudert. Die Membran der Säule hält nun die reine RNA gebunden. Zum Herauslösen dieser wird die Säule in ein neues, steriles Eppendorf Cup gestellt und es werden 40µl RNA freies Wasser auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 min bei RT wird für 1 min bei 10 000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss enthält nun die reine RNA.



#### **3.7.4 Bestimmung der RNA-Konzentration mittels Photometer**

Die Bestimmung der RNA Konzentration erfolgt gleich im Anschluss an die RNA-Isolation durch eine photometrische Messung mit Hilfe des Nanodrop 1000 Spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, USA) Messsystems. Als Softwareeinstellungen dient die RNA 40-Konfigurationen. Die Messvorrichtung wird mit Aqua dest. und staubfreien Tüchern gereinigt. Die Initialisierung des Gerätes erfolgt mit 1,3µl Aqua dest., danach wird die Messapparatur erneut gereinigt und die „Blank“- Messung mit 1,3µl RNase free water durchgeführt. Nun kann die RNA Konzentration der Proben bestimmt werden. Es werden je 1,3 µl Probe auf die zuvor mit Aqua dest. und staubfreien Tüchern gereinigte Messplattform gegeben, durch „measure“ wird der Messvorgang gestartet. Abschließend werden je 5 Aliquots à 6 µl pipettiert, der Rest in dem vorhandenen Eppendorf Cup belassen und bei -80°C trocken gelagert.

#### **3.7.5 Transkription der RNA in cDNA**

Die Transkription der isolierten RNA in cDNA findet erst unmittelbar vor der durchzuführenden PCR-Analyse statt, da Haltbarkeit und Lagerung von cDNA sehr beschränkt sind. Der Umschrieb erfolgt um das Temperaturoptimum der Enzyme, welche Bestandteil des „Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit“ (RocheDiagnostics, Mannheim, Deutschland) sind, zu sichern. Die Untersuchungen erfolgen im Step one plus<sup>®</sup> Thermocycler (life technologies, Carlsbad, USA) unter Anwendung des in Anlehnung an das vom Hersteller empfohlene Protokoll. Aufgrund der Instabilität der Enzyme wird zudem auf ein Vortexen verzichtet, die Homogenisierung wird lediglich mittels der verwendeten Pipetten durchgeführt.

Analog der Umzuschreibenden RNA-Probenanzahl wird ein Master Mix vorbereitet, dieser enthält je Probe 5 µl, die sich wie folgt zusammensetzen:

0,25 µl reverse Transkriptase

2 µl 5x Puffer

0,25 µl RNase Inhibitor

1 µl dNTPs (deoxynucleotid mix)

1 µl random Primer

0,5 µl ultra pure H<sub>2</sub>O

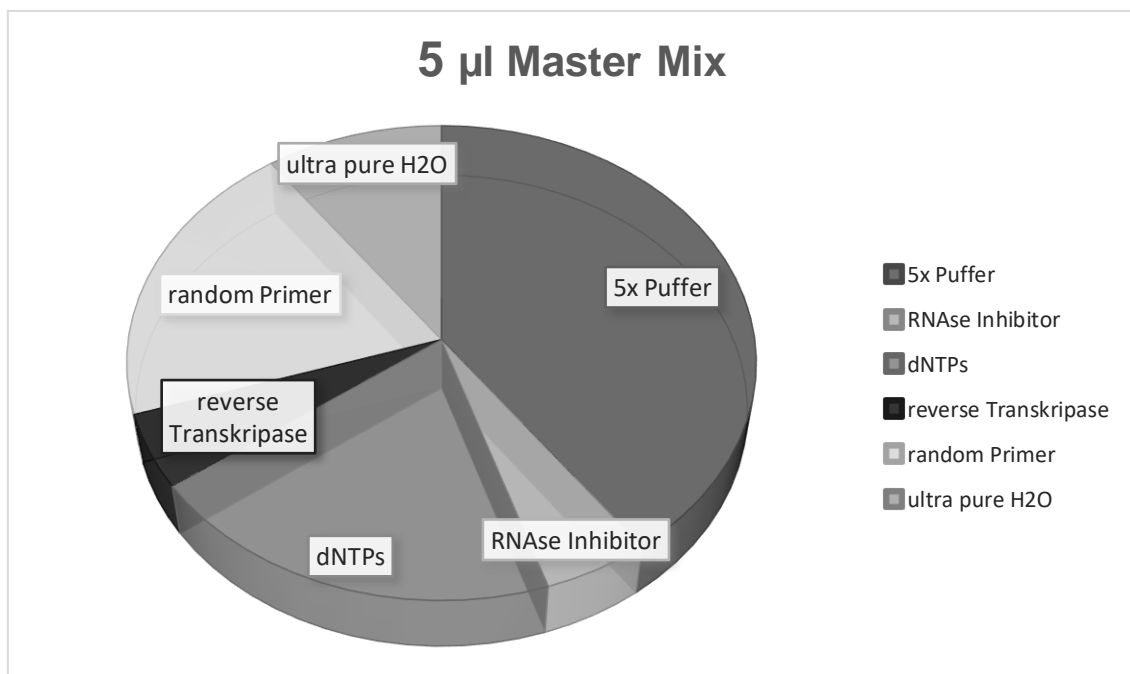


Abbildung 3-2: Graphische Darstellung der Zusammensetzung des verwendeten Master Mix

Je Cup werden 5µl Master Mix mit der Multipipette vorgelegt und anschließend 5 µl der isolierten RNA hinzugegeben. Nun werden die Cups mit Hilfe eines geeigneten Handknaufs auf einer harten Unterlage fest verschlossen, um ein Verdampfen zu vermeiden. Anschließend werden sie in den Thermocycler überführt. Nach Ablauf des Programmes wird die cDNA 1:1 mit 10 µl ultra pure water verdünnt und kann nun für die PCR Analyse verwendet werden.

### 3.7.6 Nachweis -biologisch aktiver- humaner Zellen mittels GAPDH

Der Nachweis biologisch aktiver humaner Zellen wird über das Vorhandensein humaner GAPDH in den Proben geführt. Dieses zytoplasmatische Enzym kommt ubiquitär in allen humanen Zellen vor und findet häufig als house-keeping-Gen Verwendung und wurde bereits auf Muskelgewebe validiert (Thomas et al., 2014). In vorausgehenden Messungen wird nachgewiesen, dass die verwendeten Primer hochspezifisch auf humane Sequenzen binden und sich keinerlei Kreuzreaktionen mit porcinen Genabschnitten finden. Als Etablierungs- sowie Kontrollgewebe dienen hMSC, humaner Skelettmuskel als positiv Kontrolle, porciner Skelettmuskel und porcine native Urethra als negative Kontrolle. Als Standardreihe der durchzuführenden qPCR dient aus humanem Skelettmuskel und hMSC umgeschriebene cDNA, welche in einer 1:10 Verdünnungsreihe aufgetragen wird. Je Probe werden drei PCR-Tubes à 15µl gemessen, inklusive NTC, Standardreihe und Positiv- Negativkontrolle ergeben sich somit eine Gesamtzahl von 54 zu bestimmenden Proben in der Screening-PCR. Mit der Multipipette Plus (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) wird je Reaktionswell 10µl Mastermix (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, RocheDiagnostics, Mannheim, Deutschland), 5 µl ultra pure H<sub>2</sub>O (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) und 1 µl des jeweiligen Primers vorgelegt. Zuletzt wird 4 µl der verdünnten cDNA hinzugegeben und die 8er-Tubes mit den zugehörigen Stripes versiegelt. Die nun folgenden qPCR-Messungen finden mittels des Step One plus Thermocycler statt.

### 3.8 Chemikalien, Therapeutika und Isolationskits

Name	Zielstruktur	Hersteller	Konzentration
PKH 26	Zellmembran	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA	-
Atropin	Anticholinergika	B. Braun, Melsungen, Deutschland	0,05mg/kg KG
Azacytidin (Vidaza®)	myogene Diff. MSC	Pharmion, Boulder, USA	10µm
Ciclosporin A (Sandimun®)	Calcineurin	Novartis Pharma, Nürnberg, Deutschland	gewichtsadaptiert
Fentanyl	µ-Opioidrezeptor	B. Braun, Melsungen, Deutschland	30-100µg/kg KG/h
<i>Goat serum</i>	-	Dako, Glostrup, Dänemark	-
Isofluran	nicht abschließend geklärt	-Baxter, Deerfield, USA	0,8-1,6 Vol.%
Kaliumchlorid	kardiale K <sup>+</sup> -Kanäle	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland	gewichtsadaptiert
Ketamin	NMDA-Rezeptor	B. Braun, Melsungen, Deutschland	8-14mg/kg KG

MATERIAL UND METHODEN

Name	Zielstruktur	Hersteller	Konzentration
Midazolam	GABA <sub>A</sub> -Rezeptor	B. Braun, Melsungen, Deutschland Melsungen, Deutschland	0,2-1,0mg/kg KG
Propofol	nicht abschließend geklärt	B. Braun, Melsungen, Deutschland	2-5 mg / kg KG
RNeasy Minikit	-	Qiagen, Hilden, Deutschland	-
Thiopental (Trapanal®)	GABA <sub>A</sub> -Rezeptor Agonist	Nycomed GmbH, Konstanz, Deutschland	-
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit	-	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland	-

Tabelle 3-3 : Übersicht der verwendeten Chemikalien und Therapeutika sowie der Analyse-Kits

## 3.8.1 Puffer und Reagenzien

Name	Hersteller	Konzentration
Antibody Diluent with Background Reducing Components	Dako, Glostrup, Dänemark	-
Aqua Dest (Ampuwa®)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland	-
Ethanol	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA	70 %
NaCl 0,9	Braun, Melsungen, Deutschland	0,90%
PBS	BioMérieux, Nürtingen, Deutschland	1M
RNase free water	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA	
Succrose	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA	18,00%
Tissue Tek	Sakura, Leiden, Niederlande	-
Ultrapure water	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	-
β- Mercapthoethanol	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA	-

Tabelle 3-4 Puffer und Reagenzien

3.8.2 Primertabelle

Gene Symbol	Gene Name	Assay Nr.	RefSeq	Exon	bp
GAPDH		Hs99999905_m1	NM_002046	3-3	122
18S		Hs99999901_s1	X03205		187
T	brachyury	Hs00610080_m1	NM_003181	8-9	132
Pax3		Hs00992437_m1	NM_181457	7-8	66
			NM_181458	7-8	66
			NM_181459	7-8	66
			NM_001127366	7-8	66
Pax7		Hs00242962_m1	NM_001135254	4-5	73
			NM_013945	4-5	73
			NM_002584	4-5	73
Myf5		Hs00271574_m1	NM_005593	1-2	59
MyoD1		Hs00159528_m1	NM_002478	2-3	67
Myf6 (MRF4)		Hs00231165_m1	NM_002469	1-2	58
Myogenin		Hs01072232_m1	NM_002479	2-3	76
Myosin	myosin, heavy chain 14	Hs00226855_m1	NM_024729	38- 39	88

Tabelle 3-5 : verwendete Primer

### 3.9 Tabellarische Übersicht Laborgeräte

Typ/Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank HERAcell 240i CO2	Heraeus, Hanau, Deutschland
Eppendorf Multipipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Fluoreszenzlampe VHW50f-2b	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Grobwaage 10002MP9	Sartorius, Göttinge, Deutschland
Heizplatte MR 82	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Kamera Coolpix 4500	Nikon, Tokio, Japan
Kryotom CM 1900	Leica, Wetzlar, Deutschland
MDF-U53V -80°C Gefrierschrank	Sanyo, Moriguchi, Japan
Mikroskop Axioskop	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskopkamera Axio Cam HRC	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mikrowelle MW 7800	Severin, Sundern, Deutschland
PH-Meter pH Level1	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipette Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Step One plus thermocycler	Applied biosystems, Carlsbad, USA
StepOne Plus	Nanodrop, Wilmington, USA
Sterilbank Lamina Air Flow Velocity	Faster, Cornaredo, Italien
Sterilbank S-2010 1.2	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
TissueRuptor Gewebehomogenisierer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Vortexer MS1	Janke&Kunkel, Staufen, Deutschland
Vortexer VM-300	Gemmy Industrial Corp., Taipeh, Taiwan
Zentrifuge Multifuge 3SR+	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Tabelle 3-6: Übersicht der eingesetzten Laborgeräte



**3.10 Laborbedarf/sonstige Verbrauchsmittel/OP-Bedarf**

Name/ Funktion	Hersteller
8-Cap Stripes	Applied Biosystems, Foster City, USA
8-Cap Tubes	Applied Biosystems, Foster City, USA
Abdecktücher	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Braunol <sup>®</sup> -Desinfektion	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Combur-Test <sup>®</sup> - Urin-Streifentest	Roche diagnostics, Mannheim, Deutschland
Deckgläser (24x50mm ; 24x60mm)	R.Langensbrinck, Emmendingen, Deutschland
Einmalspritzen Injekt <sup>®</sup>	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Einmalspritzen Omnifix <sup>®</sup> 100	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Eppendorf 0,2ml PCR-Tube	Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Harnröhrenkatheter	UroMed, Oststeinbek, Deutschland
Octenisept <sup>®</sup> -Schleimhautantiseptikum	Schülke & May, Norderstedt, Deutschland
Pipettenspitzen steril	Nerbe Plus, Winsen/Luhe, Deutschland
Purple Nitril Gloves	Kimberly-Clark, Roswell, USA
Safe-Lock Tubes	Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
SMP Mini-Pig Schweinefutter	Special Diets Service, Essex, UK
Sterican <sup>®</sup> - Kanülen	B. Braun, Melsungen, Deutschland

## MATERIAL UND METHODEN

Name/ Funktion		Hersteller
SuperFrost®Plus (25x75x1mm)	Objekträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
TissueRuptor Disposable Tubes		Qiagen, Hilden, Deutschland
Vasofix® Venenverweilkanüle	20Gx11¼"	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Vicryl® 4/0 Nahtmaterial		Ethicon, Norderstedt, Deutschland

*Tabelle 3-7 : Übersicht der Laborartikel sowie sonstiges Verbrauchsmaterial*

## 4 ERGEBNISSE

---

### 4.1 Induktion eines Immunsuppressiven xenogenen Großtiermodelles

Unter der iatrogen herbeigeführten Immunsuppression mittels Ciclosporin A (CsA) wurden bei den Versuchstieren keinerlei Verhaltensänderungen beobachtet, die Tiere zeigten sich unverändert in ihrer sozialen Interaktion. Die Fressgewohnheiten blieben stabil, es kam bei keinem der Tiere zu einer Gewichtsabnahme und bei allen Exemplaren war eine Gewichtszunahme von mind. 4kg innerhalb von vier Wochen zu verzeichnen. Ebenso wies keines der Versuchstiere eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen weder bakterieller noch viraler Genese auf. Alle Tiere konnten bis zum Ablauf der geplanten Standzeiten über 4 bzw. 8 Wochen in den Stallungen verbleiben. Es erfolgte keine vorzeitige Euthanasie wegen unvorhergesehener Ereignisse. Somit konnten wir zeigen, dass die von uns verwendeten CsA-Dosen keine klinisch imponierenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) bei den Versuchstieren hervorrufen und von den Tieren somit gut vertragen werden. Des Weiteren konnte nachwiesen werden, dass auch über einen längeren Zeitraum von acht Wochen die orale Gabe eines Immunsuppressivum im Großtierversuch möglich ist, ohne dass sich Beeinträchtigungen für die Versuchstiere ergaben oder sich mittelfristig klinisch manifeste kumulativ toxischen Effekte zeigten.

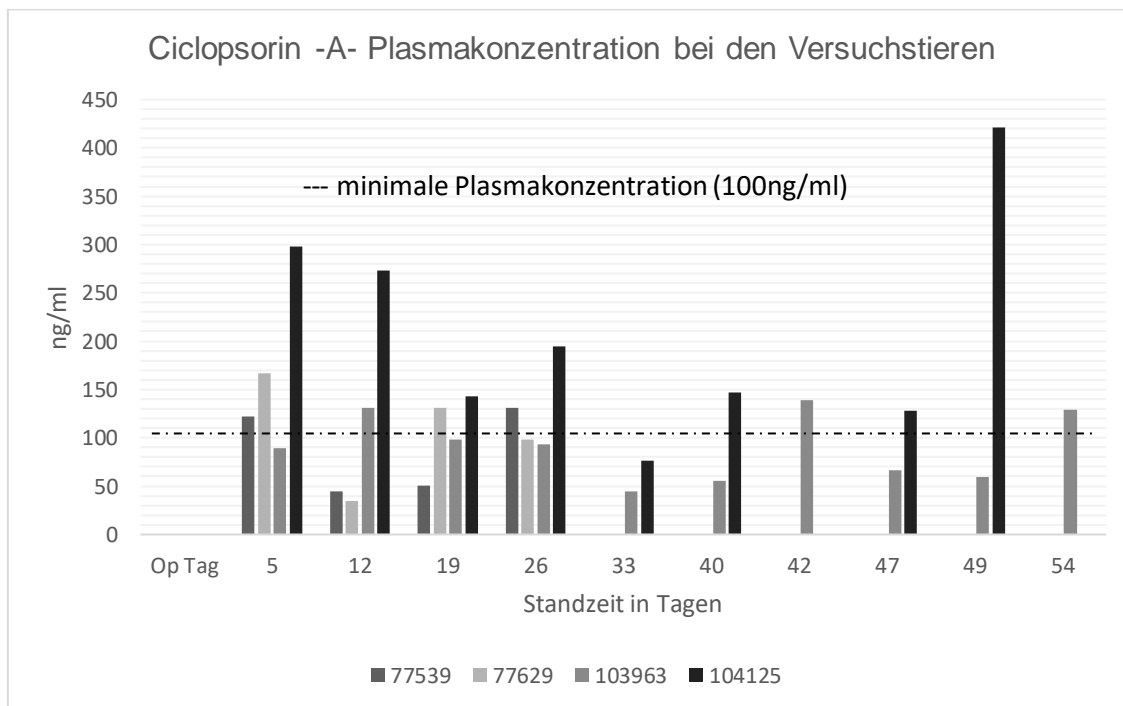
Aufgrund der geringen Expertise, ersichtlich in der nur in unzureichendem Maße zur Verfügung stehender Literatur, hinsichtlich Referenzwerten der Laborwerte beim Minipig fanden die öffentlich zugänglichen Referenzwerte der Merck & Co. Inc. (Whitehouse Station, N.J. U.S.A) Verwendung. Diese stimmen mit den Referenzwerten des mit den Blutuntersuchungen beauftragten Labors überein.

#### 4.1.1 Monitoring des Ciclosporin A (CsA) Plasmaspiegels

Der Ciclosporin A Plasmaspiegel ließ sich durch die orale Applikation des Präparates Sandimun® auf kein zuverlässig stabiles Niveau einstellen. Im Beobachtungszeitraum unterlag er sowohl zeitlichen Schwankungen, mit bis zu 345 ng/dl Differenz (Versuchstier-Nr. 104125 zwischen Tag 33 und Tag 49), als auch großer interindividueller Abweichung seitens der einzelnen Tiere. Die nach xenogener Zelltransplantation angestrebte CsA-Erhaltungsdosis mit einem Nadir von mind. 100 ng/ml, entsprechend einer CsA-Dosis von 15 mg/kg Körpergewicht, ließ sich zwar nicht über den gesamten Aufstallungszeitraum im Sinne eines „steady states“ herbeiführen, die Größenordnung von 100 ng/ml aber konnte in den ersten 26 Tagen in 13 von 16 Fällen erreicht oder überschritten werden. Lediglich ein Versuchstier (77539) zeigte in der ersten Hälfte der Aufstallung einen längerfristig niedrigeren Verlauf von 7 Tagen von nur circa der Hälfte des angestrebten Plasmawertes von CsA. In der zweiten Hälfte der Aufstallung hat Versuchstier 103963 den angestrebten CsA-Spiegel in vier von sechs Messzeitpunkten unterschritten, meist konnte jedoch noch etwa die Hälfte des Spiegels aufrechterhalten werden, während Versuchstier 104125 bis auf eine Ausnahme den CsA-Spiegel nach wie vor deutlich überschritt. Bei den gemessenen Plasmakonzentrationen zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den jeweiligen Individuen. Zu- bzw. Abnahme der CsA-Plasmakonzentration erfolgten meist individuell und unabhängig voneinander (vgl. Tier 77629 vs. Tier 104125 an Tag 12,19 und 26) mit einer Tendenz zu geringeren Werten in der zweiten Hälfte des Aufstallungszeitraumes. Die höchste CsA-Plasmakonzentration wurde bei Versuchstier 104124 am Tag 49 post operationem (p. o.) gemessen und betrug 421ng/ml, die niedrigste Plasmakonzentration wies Versuchstier 77629 am 12 Tag p. o. auf, sie betrug lediglich 35ng/ml. Ausgenommen Versuchstier 104125 lagen die Messungen bei allen Tieren in mehr als 50% der CsA-Bestimmungen knapp unterhalb des zuvor definierten und angestrebten minimalen Grenzwertes von 100ng/ml. Leider konnten die Laborproben des Operationstages nicht analysiert werden, da sämtliche Proben vom untersuchenden Labor wegen abgelaufener Hämolyse

## ERGEBNISSE

nicht auswertbar waren. Weiterhin konnte die Laborprobe von *Versuchstier* 104125 am 42 und 54 Tag p. o. ebenfalls wegen aufgrund Hämolyse vom beauftragten Labor nicht ausgewertet werden.

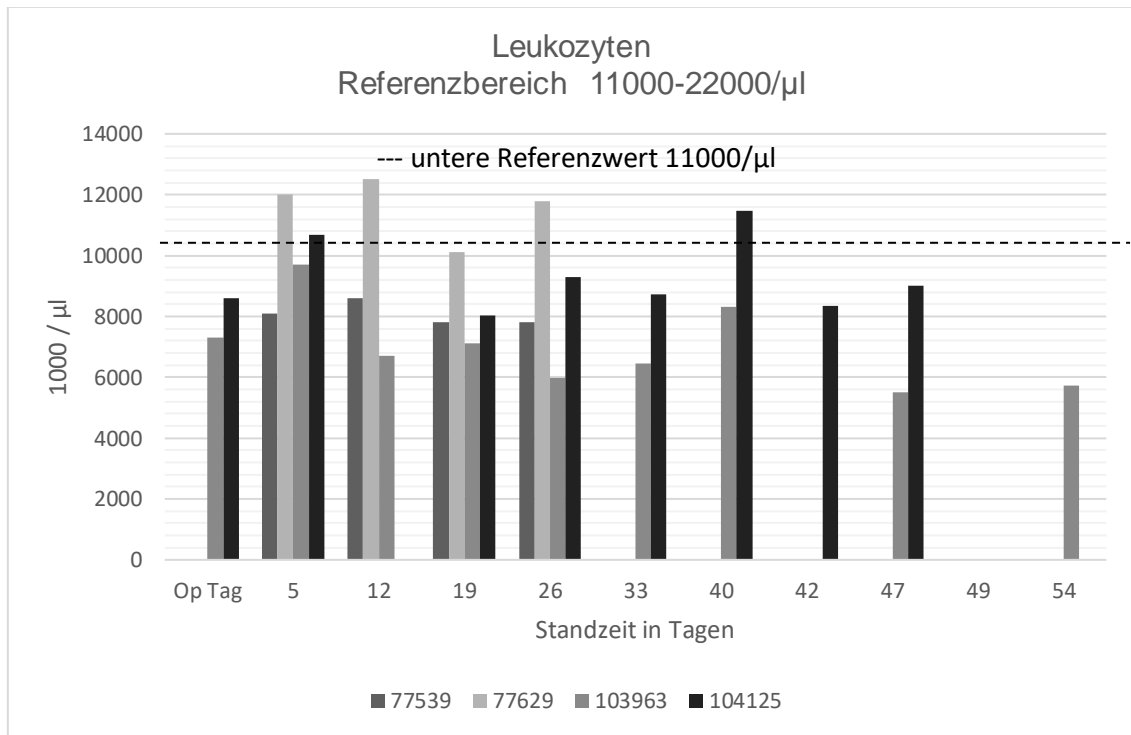


*Diagramm 4-1:* Cyclosporin-A-Plasmakonzentration (ng/ml) repräsentativ ausgewählter Versuchstiere in wöchentlichen Laborkontrollen über den Zeitraum von 4 bzw. 8 Wochen. Der angestrebte Minimalwert der CsA-Plasmakonzentration entsprechend 100ng/ml ist als graphisch dargestellt. Ausgenommen von Versuchstier 104125 lagen die laborchemisch bestimmten CsA-Plasmakonzentrationen in mehr als 50% der Messungen unterhalb des angestrebten Grenzwertes von 100 ng/ml.

#### **4.1.2 Sekundärprophylaxe drohender Infektionen unter iatrogener Immunsuppression mittels Blutbildkontrollen**

Zur Prävention eines klinisch signifikanten bakteriellen Infektes sowohl unter der iatrogenen herbeigeführten Immunsuppression als auch nach Manipulation im unteren Harntrakt wurden die Leukozyten im Blutbild bestimmt. Bei keinem der untersuchten Tiere wurde eine Leukozytose im Sinne einer unspezifischen Entzündungsreaktion nachgewiesen. Stattdessen imponierte bei allen Tieren eine klinisch silente Leukopenie diskreter Ausprägung. Diese zeigt sich jedoch unabhängig von der Dauer der CsA-Therapie und in unterschiedlich starker Ausprägung seitens der einzelnen Tiere. Die größte Varianz hinsichtlich der bestimmten Leukozytenzahl wies Versuchstier 103963 auf. Bei diesem Tier betrug die maximal gemessene Differenz 4200 Leukozyten/ $\mu$ l. Die geringste Differenz mit einer Schwankung um 800 Leukozyten/ $\mu$ l über den Zeitraum der Messungen fand sich bei Versuchstier 77539. Eine wöchentliche Bestimmung der Lymphozyten zum Ausschluss einer viralen Infektion wurde routinemäßig nur bei den beiden Pilottieren vorgenommen (vgl. Anhang Diagramm 7-1). Bei den verbleibenden Versuchstieren war eine Bestimmung der Lymphozyten nur bei begründetem Verdacht einer viralen Infektion vorgesehen. Keines der Tiere zeigte Symptome einer Infektion, somit konnte hierauf verzichtet werden. Wegen Hämolyse einzelner Blutproben konnten Leukozytenzahlen von dem beauftragten Labor nicht ausgewertet werden – sie fehlen in der folgenden Graphik (Diagramm 4-2).

## ERGEBNISSE



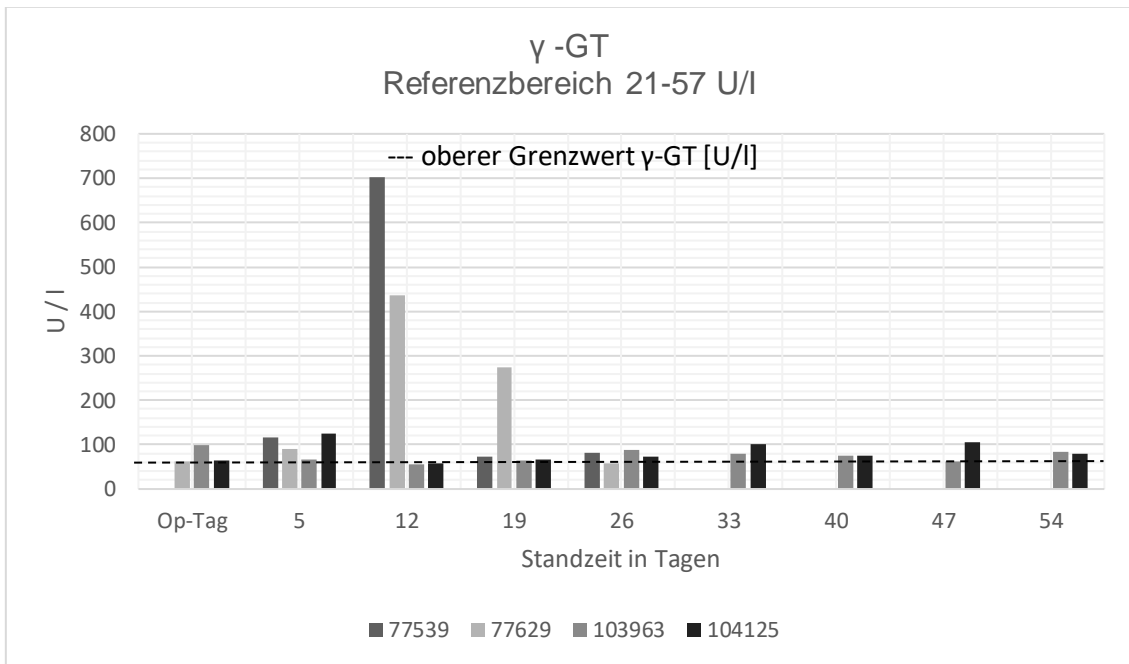
*Diagramm 4-2:* prozentualer Anteil der Leukozyten im Differentialblutbild bei repräsentativ ausgewählten Versuchstieren zwecks sekundärer Prävention einer bakteriellen Infektion bei iatrogenen Immunsuppression sowie nach Manipulation im Bereich der Urethra. Bei keinem der Versuchstiere zeigte sich eine ausgeprägte Leukozytose im Sinne eines Entzündungszeichens, stattdessen liegen die gemessenen Leukozytenzahlen unterhalb des Grenzwertes, die Tiere wiesen allesamt eine diskrete Leukopenie auf, welche klinisch jedoch unauffällig verlief. In obigen Schaubild fehlende Leukozyten-Werte konnten von dem beauftragten Labor nicht bestimmt werden und wurden als hämolytisch beschrieben.

### **4.1.3 Evaluierung der Verträglichkeit von CsA anhand der Leberenzymwerte im Blut**

Oral appliziertes CsA unterliegt zum größten Teils einer hepatischen und nur zu geringen Teilen einer renalen Elimination. Beim durchgeführten laborchemischen Monitoring der repräsentativ ausgewählten Versuchstiere wies das scheinoperierte Pilottier 77539 am zwölften Tag p. o. eine akute Erhöhung des  $\gamma$ -GT Wertes auf 702 U/l auf. Klinisch zeigte sich das betroffene Tier unauffällig, wies keinerlei Symptome einer Infektion auf und zeigte sich in Verhalten, sowie sozialer Interaktion nicht alteriert. Ebenfalls am zwölften Tag p. o. zeigte das zelltransplantierte Pilottier 77629 eine Erhöhung des  $\gamma$ -GT Wertes auf 402 U/l - klinisch ebenfalls ohne entsprechendes Korrelat. Der Leberenzymwert des scheinoperierten Versuchstieres 77539 fiel innerhalb sieben Tagen von 702 U/l kommend auf Normalwerte, vergleichbar derer der anderen Versuchstiere, ab. Das zelltransplantierte Versuchstier 77629 zeigte ebenfalls regredierende Werte. Nach sieben Tagen war die  $\gamma$ -GT noch auf 273 U/l, im weiteren Verlauf lagen die Werte nach 14 Tagen wieder innerhalb des Referenzbereiches. Bei beiden Tieren handelte es sich um eine einmalige Episode einer Leberenzymhöhung, die laborchemisch bestimmten Werte zeigten sich im weiteren Verlauf stabil.

Bei den Versuchstieren, welche acht Wochen aufgestellt wurden, waren beständig leicht erhöhte Werte der  $\gamma$ -GT gemessen, die sich auf einem stabilen Niveau befinden, keine Progredienz aufweisen und maximalen Schwankungen von 66 U/l, bei einem Maximalwert von 124 U/l, unterworfen sind. Zusammenfassend beobachtet man bei allen Tieren eine diskrete Erhöhung der  $\gamma$ -GT-Werte bei stabilen Mittelwerten und klinischer Beschwerdefreiheit.





**Diagramm 4-3:** repräsentative Darstellung der  $\gamma$ -GT Leberenzymwerte zur Beurteilung der Verträglichkeit von CsA durch die Versuchstiere. Pilotier 77539 und 77629 wiesen am 12 Tag p. o. akut eine Erhöhung der  $\gamma$ -GT auf, die sich im weiteren Verlauf regredient zeigte und auf Werte vergleichbar derer der anderen Versuchstiere abfiel. Beide Tiere zeigten sich klinisch asymptotisch und es kam zu keinem erneuten Anstieg der Leberenzyme bei den laborchemischen Bestimmungen. Bei den beiden Tieren handelte es sich sowohl um ein scheinoperiertes Tier (77539), als auch um ein hMSC transplantiertes Tier (77629). In obigen Schaubild fehlende Blutwerte konnten von dem beauftragten Labor wegen Hämolyse nicht bestimmt werden.

#### 4.1.4 Evaluierung der Verträglichkeit von CsA mittels Nierenretentionswerte im Blut

Manipulationen im Bereich der proximalen Urethra sowie Zelltransplantationen können ein postrenales Nierenversagen verursachen. Bei CsA kann als UAW ein renales Nierenversagen resultieren. Laborchemisch zeigen sich unter anderem Erhöhungen des Serumkreatininwertes. Die untersuchten Pilottiere zeigten über den Zeitraum der Messungen Serumkreatininwerte zwischen 0,6-1,1 mg/dl und lagen somit innerhalb des vorgegebenen Referenzbereiches. Bei den Acht-Wochentieren zeigten sich im Vergleich zu den Pilottieren generell eine leicht erhöhte Konzentration des Serumkreatinins mit undulierenden Werten zwischen 0,8-1,3 mg/dl. Eine Progredienz im Zeitraum der Messungen war nicht zu verzeichnen.

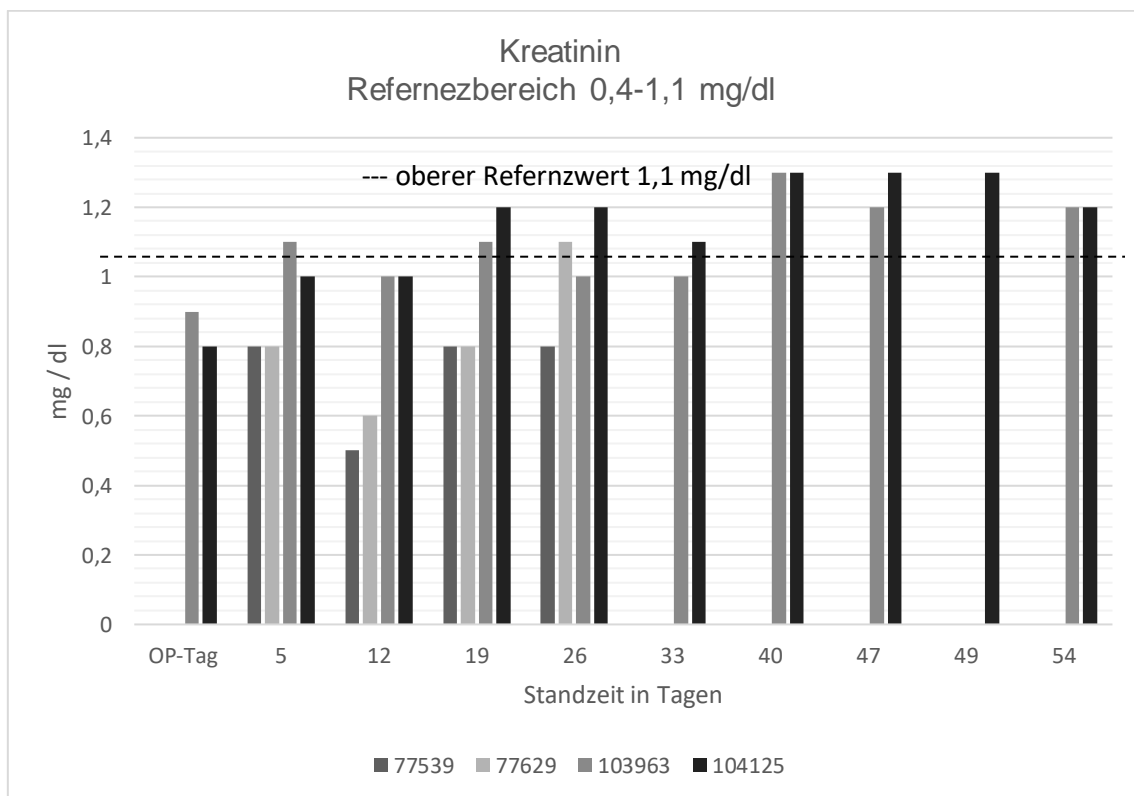


Diagramm 4-4: Serumkreatininwerte (mg/dl) der repräsentativ untersuchten Versuchstiere über vier bzw. acht Wochen. Keines der Tiere wies eine übermäßige Erhöhung des Serumkreatinins auf, bei den Acht-Wochentieren zeigten sich leicht erhöhte Werte mit undulierenden Konzentrationen zwischen 0,8-1,3 mg/dl ohne eine sich abzeichnende Progredienz. In obigen Schaubild fehlende Blutwerte konnten von dem beauftragten Labor wegen Hämolyse nicht bestimmt werden.

#### **4.1.5 Ausschluss eines Harnwegsinfektes mittels Urin-Streifentest**

Die durchgeführten Urin-Streifentest Untersuchungen (Combur Test<sup>®</sup>, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) erfolgten jeweils zum Zeitpunkt der Operationen bzw. direkt nach Sakrifizierung. Sie lieferten keinerlei Hinweise auf das Vorliegen eines Harnwegsinfektes. Die pH-Werte bewegten sich bei allen Tieren zwischen pH sieben bis acht, keine Glucosurie. Nitrit, Leukozyten, Eiweiß, Ketone sowie Bilirubin waren jeweils negativ. Einzelne Tieren reagierten nach Anlage des Blasenkatheters mit einer 1x bis 2x positiven Reaktion des Detektionsfeldes für Blut, entsprechend 5-25 Erythrozyten/ $\mu$ l Urin.

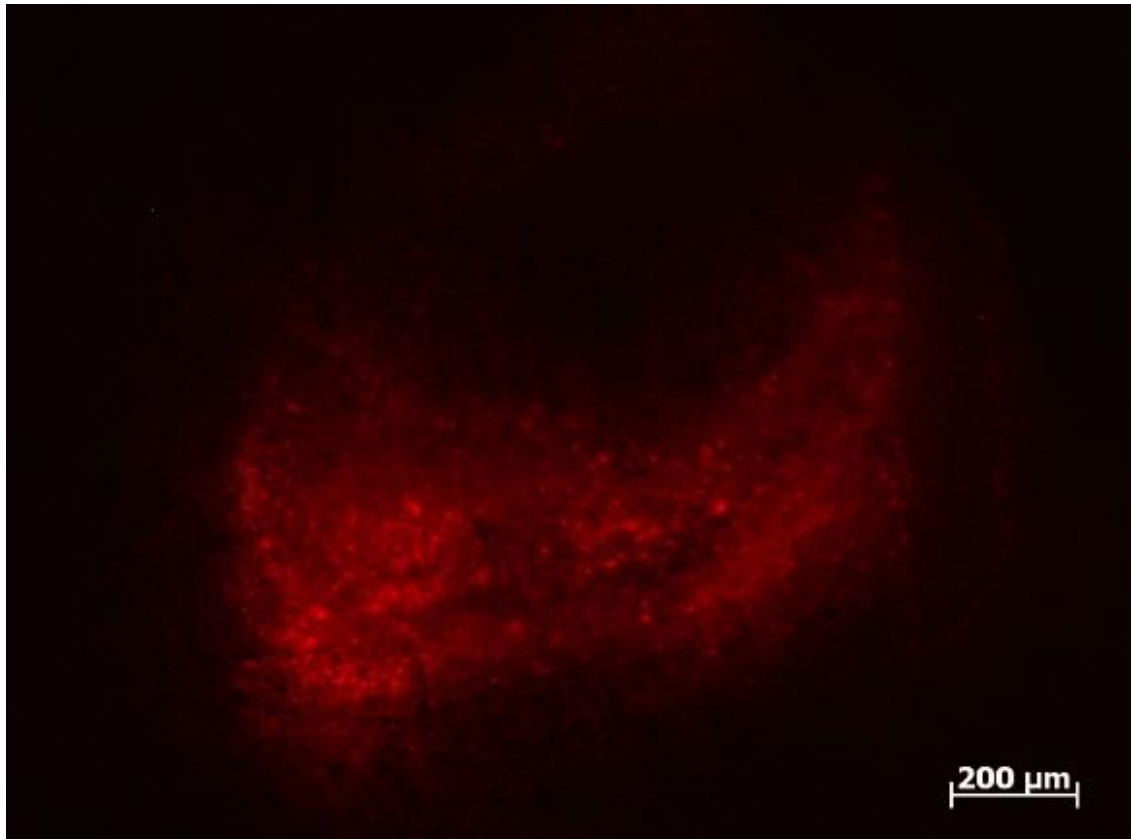
## **4.2 Phänotypisierung der hMSC in der porcinen Urethra mittels Immunfluoreszenzmikroskopie**

Makroskopisch imponierten bei den zelltransplantierten Versuchstieren distal des Harnblasenschließmuskels rundlich bis elliptische Strukturen von ca. 4-5mm Durchmesser und lehmgelber Färbung. Diese lagen unterhalb des Urothels (suburothelial) und reichten bis in die charakteristischen Ringmuskelschichten der Urethra. In den mikroskopischen Untersuchungen (Axioskop, Carl Zeiss, Jena) mit einer in den Strahlengang integrierten Quecksilberlampe (VHW50f-2b, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) wiesen neben dem eingesetzten PKH26 Farbstoff auch die verwendeten Vicrylfäden bzw. deren Reste eine rote Fluoreszenz auf. Diese waren jedoch anhand der Morphologie leicht gegen die Zellen abgrenzen bei unklarem Befund ließ sich mit dem Axioskop-Systems (Axiovert 200M, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) eine eindeutige Aussage treffen. Der Vicryl-Faden wies unter sämtlichen Lichtfiltern eine Autofluoreszenz auf wohingegen die PKH26-markierten Strukturen nur unter dem Rotfilter zu detektieren waren und allenfalls unter dem Goldfilter noch eine gelbliche Fluoreszenz aufwiesen.

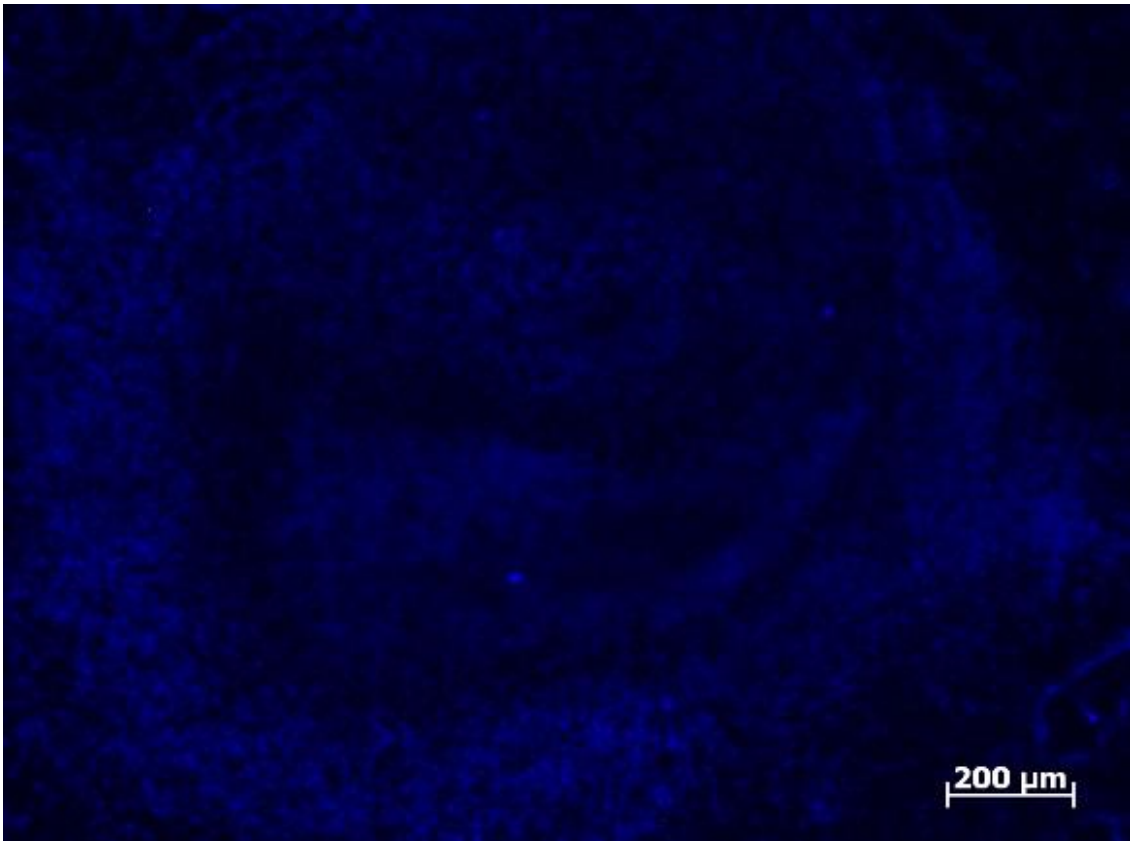
#### 4.2.1 Detektion der injizierten hMSC in der porcinen Urethra durch PKH26 Fluoreszenz

Der injizierte Fluoreszenzfarbstoff PKH26 ließ sich bei allen untersuchten Tieren in den histologischen Schnitten nach vier bzw. acht Wochen nachweisen. Seine Fluoreszenzeigenschaften waren äußerst stabil und er konnte beispielsweise auch nach thermischen Antigendemaskierungsverfahren in nahezu unveränderter Intensität detektiert werden. Es kam zu keiner Auswaschung des Farbstoffes. Das stärkste Fluoreszenzsignal zeigte sich jeweils im Bereich des Blasenhals, dem Abschnitt der transplantierten hMSC bzw. des injizierten Mediums. Im weiteren Verlauf der Urethra nach distal, also in Richtung des *Ostium urethrae externum*, nahm diese Intensität beständig ab und ca. 3-4cm distal des Blasenhalses ließ sich nur noch gelegentlich eine diffuse Fluoreszenz, v. a. im Bereich der *Adventitia*, nachweisen. Der PKH26 Farbstoff befand sich hierbei im Interstitium gelegen und ließ sich keiner definierten histologischen Struktur, respektive einer intrazellulären Matrix einer Zellart zuordnen.

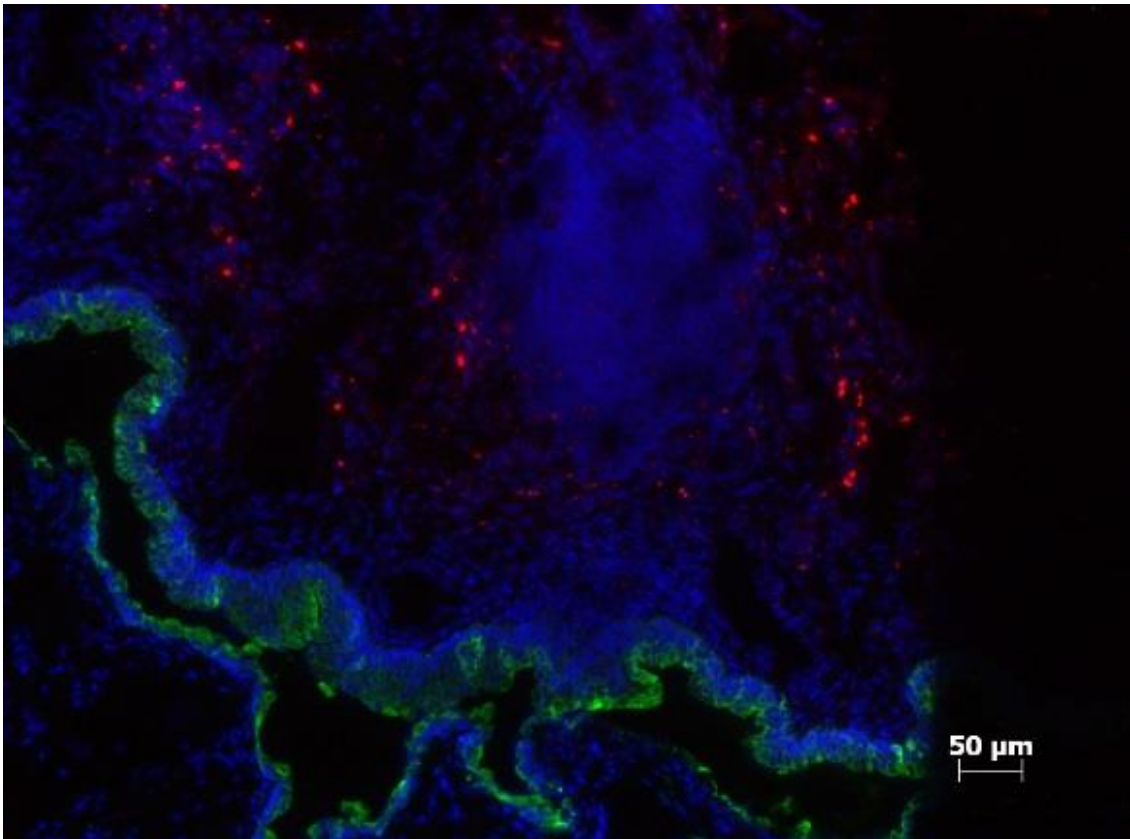
Die makroskopisch sichtbaren follikelartigen Strukturen im Bereich des Harnblasenschließmuskels präsentierten sich bei den Vier-Wochentieren unter dem Fluoreszenzmikroskop als signalintensive Areale von rundlicher Morphologie. Der PKH 26 Farbstoff war im Sinne einer Zellkondensation zentral gelegen (Bild 4-1), was durch korrespondierenden DAPI Färbungen - unspezifische Färbungen gegen sämtliche Zellkerne - bestätigt wurde. Hierbei zeigte sich zudem das Bild eines die zentrale Zellkondensation umgebenden wallartigen Randsaumes (Bild 4-2).



*Bild 4-1 Versuchstier 77629 mit vorausgegangener hMSC Transplantation nach vier Wochen Standzeit. Gezeigt ist ein Gewebeschnitt aus dem Bereich des Harnblasenschließmuskels in 5-facher Vergrößerung unter Verwendung des Rotfilters in der Nativaufnahme. Hierbei trat eine rötliche Fluoreszenz des eingesetzten PKH26 auf, welche sich als elliptische Struktur präsentierte*



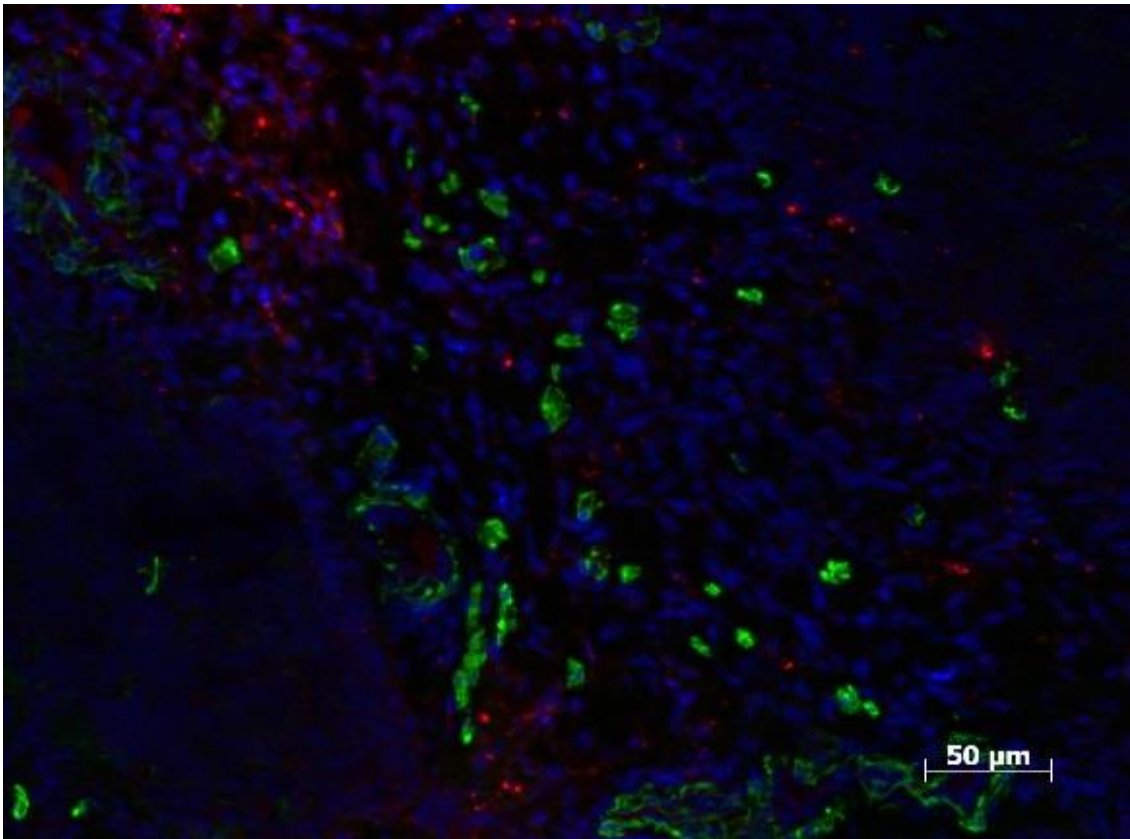
*Bild 4-2 korrespondierende Aufnahme zu Bild 4-1. Gezeigt ist der identische Schnitt nach Anfärbung der Zellkerne mittels DAPI unter dem Blaufilter. Hier zeigte sich deutlich eine zentrale Zellkondensation mit einem sie umgebenden wallartigen Randsaum.*



*Bild 4-3 Versuchstier 107194 mit vorausgegangener hMSC Transplantation nach acht Wochen Standzeit. Gezeigt ist ein Schnitt aus dem Bereich des Harnblasenschließmuskels nach Färbung gegen AE1/AE3 (grün) sowie Anfärbung der Zellkerne (blau) mittels DAPI unter 10,-facher Vergrößerung. Die PKH26 Signale(rot) befanden sich nun nicht mehr im Zentrum der umschriebenen Zellkondensation, sondern lagen diffus in deren Randbereich und weisen -verglichen mit den Aufnahmen nach vier Wochen Standzeit- eine deutlich geringere Intensität auf.*

Bei den 8-Wochen-Tieren ließen sich ebenfalls derartige Zellansammlungen nachweisen, jedoch verglichen mit der 4-Wochen-Intensität deutlich regredient in ihrer Fluoreszenz. In den korrespondierenden DAPI-Färbungen zeigten sich keine wallartigen Randsäume mehr, lediglich die Zellkondensationen blieben bestehen (Bild 4-3). Zudem befand sich der PKH26 Farbstoff nicht mehr im Zentrum dieser follikelartigen Zellkondensation, sondern war diffus bis in die Randbereiche lokalisiert und reichte auch nach distal der ursprünglichen Injektionsstelle (Bild 4-4).



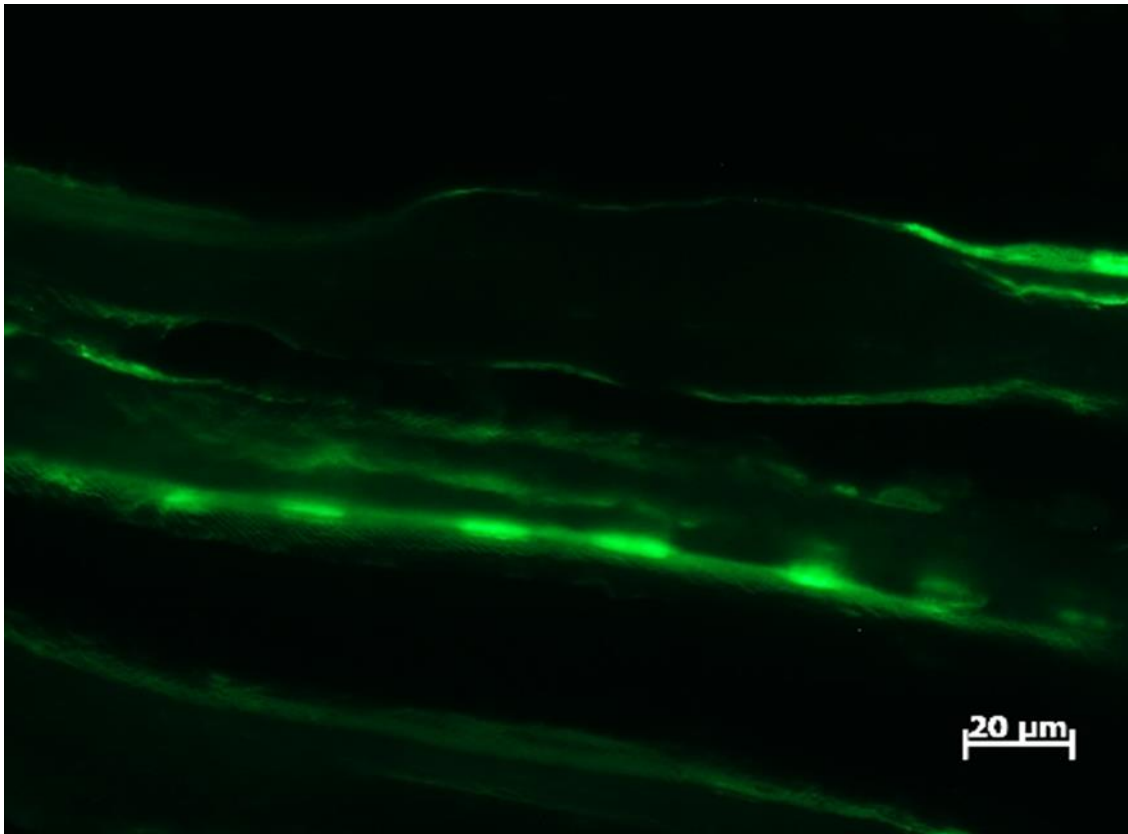


*Bild 4-4 Versuchstier 107146 mit vorausgegangener hMSC Transplantation nach acht Wochen Standzeit. Dargestellt ist ein Schnitt aus dem Bereich des Harnblasenschließmuskels nach Färbung gegen Desmin (grün) sowie Anfärbung der Zellkerne mittels DAPI (blau) unter 20,-facher Vergrößerung. Die PKH26 Signale (rot) befinden sich nicht mehr zentral in der Zellkondensation (linker Bildrand) sondern sind diffus randständig gelegen und wiesen – im Vergleich mit der PKH26 Intensität nach vier Wochen – ein deutlich reduziertes Signal auf.*

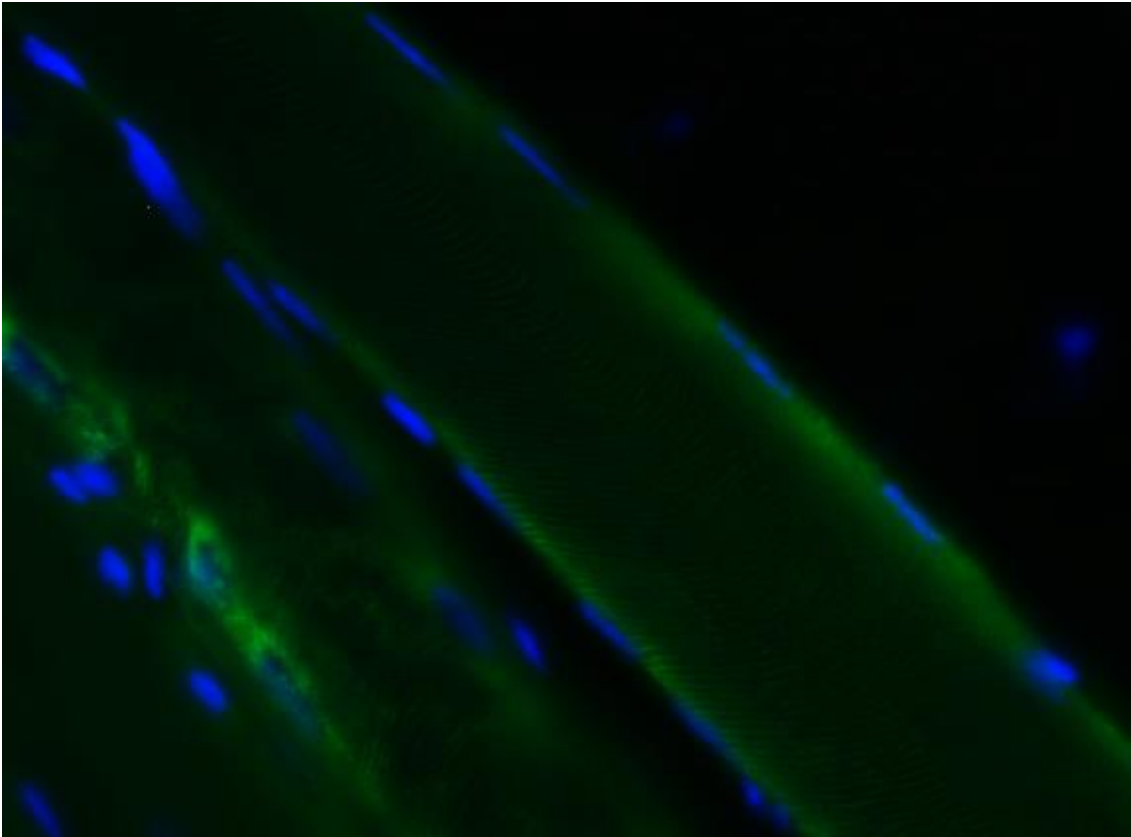
Zusammenfassend waren bei allen Tieren eindeutige Floreszenzen im Bereich der transplantierten Zellen zu detektieren, welche sich als rundliche Zellkondensationen präsentierten. Diese waren innerhalb der acht wöchentlichen Dauer größenregredient, die Intensität des detektierten PKH26 nahm ab.

#### **4.2.2 Detektion der hMSC durch spezifische Bindung eines anti-nukleären Antikörpers**

Nach Färbungen der zur Verfügung stehenden Antikörper gegen humane Zellkerne konnte lediglich mit dem Anti-Nuclei, clone 235-1, Alexa Fluor® 488 conjugate (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) Antikörper eine positive Fluoreszenz auf humanem Skelettmuskel gemessen werden. Es kam, wie von dem Hersteller beschrieben, zu einer diffusen Färbung einiger Zellkerne (Bild 4-5) bei deutlichem Hintergrundrauschen. Die Zellkerne befanden sich in der für Skelettmuskelfasern typischen peripheren Lokalisation dicht unter dem Sarkolemm und ermöglichten somit eine eindeutige Identifizierung als kernhaltige Struktur. Diese Fluoreszenz war jedoch nur in einer hohen Vergrößerung (mind. 40x) eindeutig als ein Signal der Zellkerne zu detektieren, bei kleineren Vergrößerungen verschwamm es mit dem Hintergrundrauschen. Zudem kam es nach Gegenfärbung mit DAPI zu einer deutlichen Reduktion der grünen Fluoreszenz. Auf porcinem Skelettmuskel, sowie auf nativen porcinen Harnröhren kam es zu keiner spezifischen Bindung des Antikörpers. Somit konnte, kongruent zu den Herstellerangaben, und nach Modifikation des Färbeprotokoll eine hochspezifische Anfärbung humaner Zellkerne nachgewiesen werden. Die systematischen immunfluoreszenzhistologischen Untersuchungen der Blasenschließmuskulatur der zelltransplantierten Versuchstiere erfolgte unter 40x Vergrößerung in einer Dunkelkammer, es ergaben sich bei keinem der Schnitte Hinweise auf das Vorhandensein humaner Zellkerne.



*Bild 4-5 humaner Skelettmuskel, Anti-Nuclei, clone 235-1, Alexa Fluor® 488 conjugate, 40-fache Vergrößerung. Die Zellkerne (grün) liegen in der für Skelettmuskulatur typischen peripheren Lokalisation dicht unter dem Sarkolemm und sind aufgrund der Morphologie als kernhaltige Strukturen zu identifizieren.*



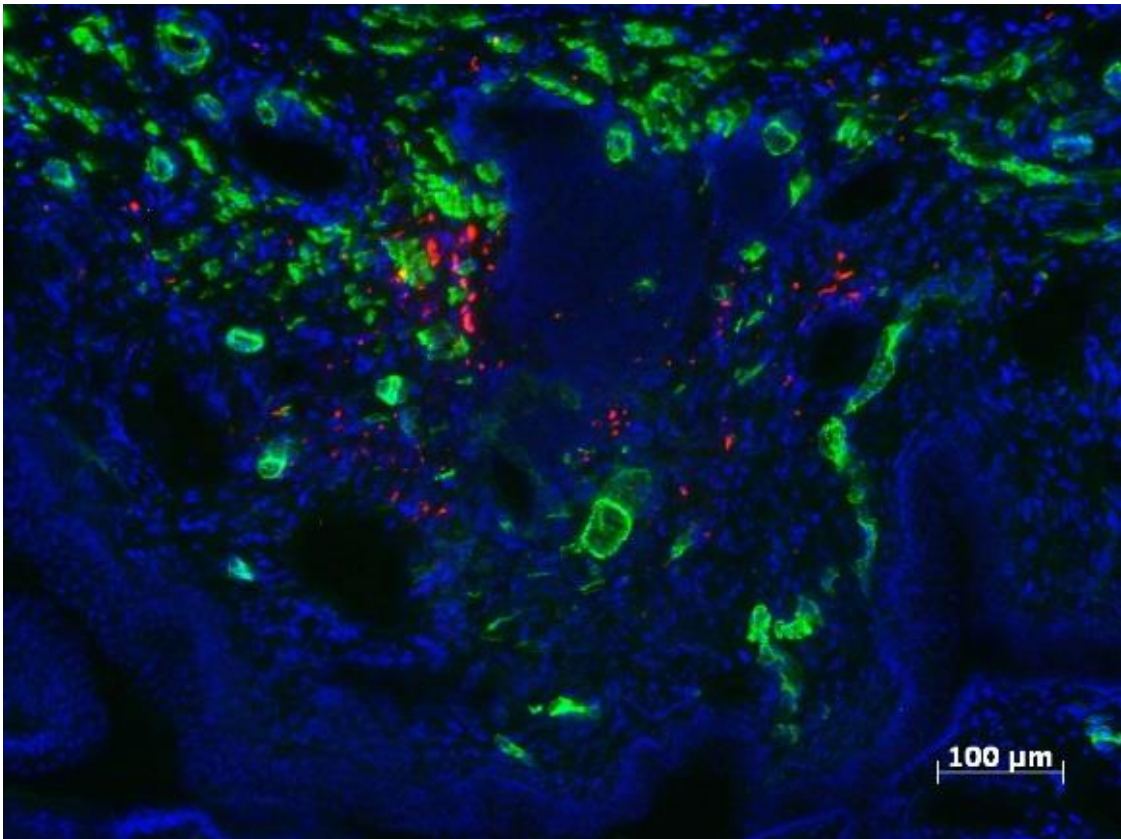
*Bild 4-6 humaner Skelettmuskel, DAPI, 40-fache Vergrößerung. Korrespondierende Aufnahme zu Bild 4-4a nach Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Hier zeigte sich ebenfalls die typische periphere Lokalisation der Zellkerne dicht unter dem Sarkolemm.*

### **4.2.3 Nachweis einer anatomisch korrekten Injektion sowie funktionelle Integration der hMSC mittels Immunfluoreszenzmikroskopie**

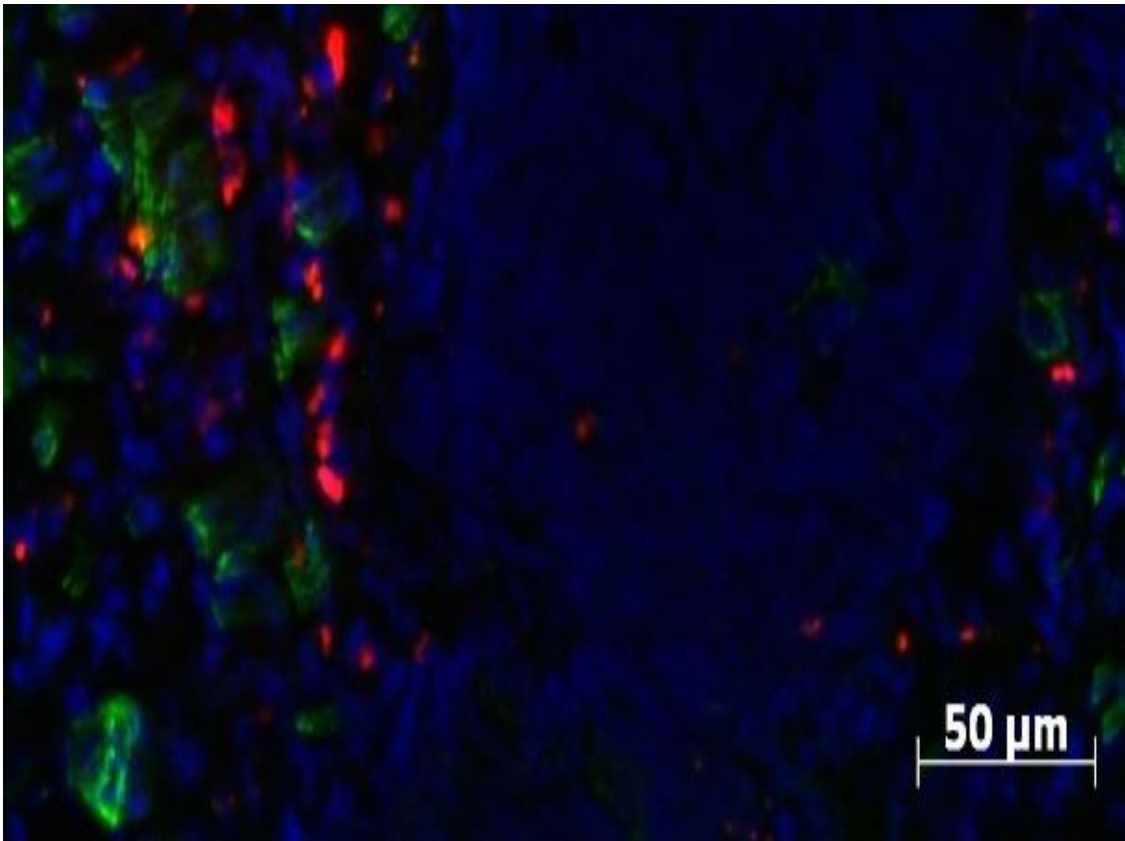
Nachweis einer anatomisch korrekten Injektion sowie die funktionelle Integration der hMSC erfolgten über immunhistochemische Färbungen gegen muskelspezifische Enzyme.

Die verwendeten Antikörper - alle wurden zuvor im Sinne einer internen Qualitätskontrolle auf humanem sowie porcinem Muskelgewebe getestet - wiesen eine hohe Kreuzreaktivität zwischen humanen und porcinen Gewebe auf (Bilder nicht gezeigt) und erlaubten somit keine Differenzierung beider Spezies. Eine Aussage bezüglich der Herkunft der Zellen ist somit nicht möglich.

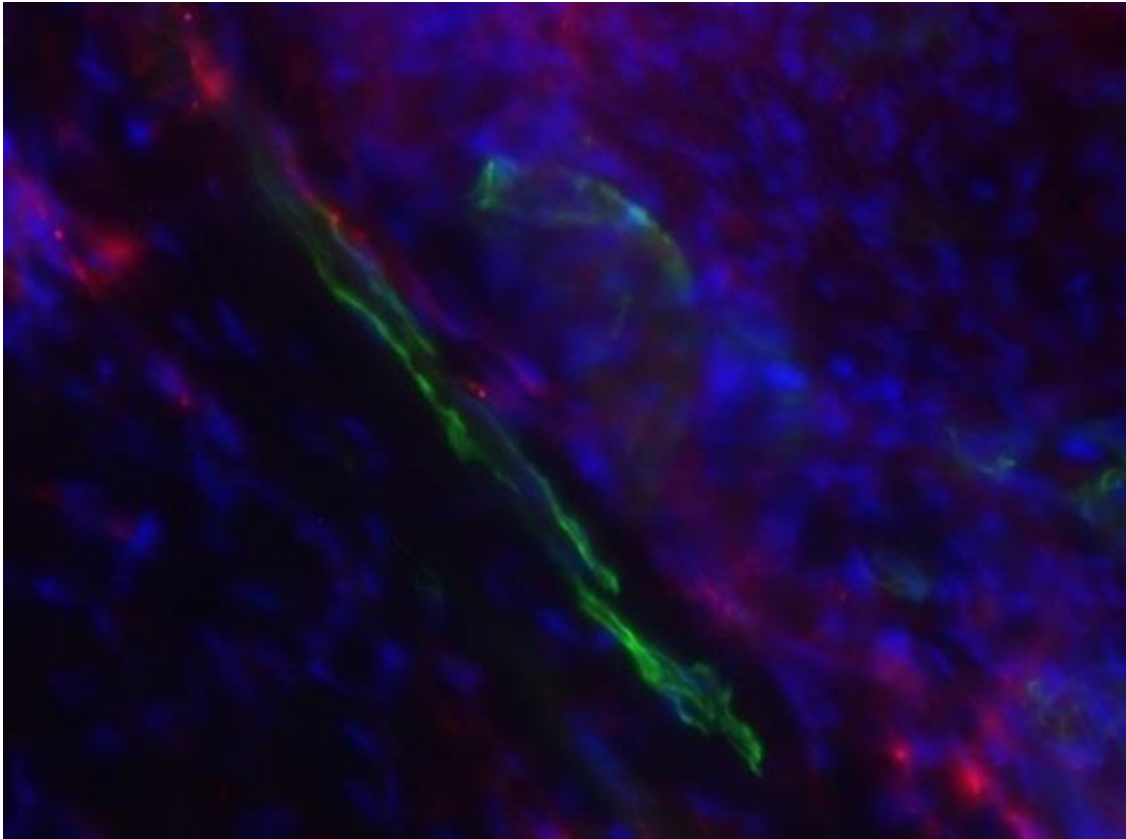
Nachgewiesen werden konnte die anatomisch korrekte Applikation der hMSC in den Bereich der Harnröhren Ringmuskulatur (Bild 4-7). Die PKH26 positiven Strukturen konnten zwischen Desmin positiven Fibrillen sowie  $\alpha$ -SMA positiven Strukturen dargestellt werden. Des Weiteren fanden sich PKH26 positive Strukturen in unmittelbarer Nachbarschaft zu Zellen, die myogene Marker exprimieren. Vereinzelt kam es zu einer Anlagerung des PKH26 an solche Zellen und zur Überlappung der PKH26-Fluoreszenz mit dem Signal des myogenen Proteins - beispielsweise des anti  $\alpha$ -SMA Antikörpers - Sichtbar als eine gelbe Fluoreszenz (Bild 4-8). Die PKH26 positiven Strukturen lagen bei allen untersuchten Tieren *in loco typico* zwischen den Ringmuskelschichten. Somit wurde bei der invasiven Zellapplikation die Urethra nicht perforiert und es kam während der gesamten Zeit der Aufstallung der Versuchstiere zu keiner Migration des transplantierten Zellmaterials durch die Urethra.



*Bild 4-7 Versuchstier 107194 mit vorausgegangener hMSC Transplantation nach acht Wochen Standzeit. Gezeigt ist ein Schnitt aus dem Bereich des Harnblasenschließmuskels nach Färbung gegen  $\alpha$ -SMA (grün) sowie eine Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) unter 5,-facher Vergrößerung. Die PKH26 Signale (rot) liegen diffus im Bereich der glattmuskulären Schichten. Stellenweise kommt es zu einer Anlagerung des PKH26 Farbstoffes an  $\alpha$ -SMA positive Strukturen, sichtbar als gelbe Fluoreszenz. Ebenfalls deutlich zu sehen die Zellkondensation in der oberen Bildmitte.*



*Bild 4-8 20-fache Vergrößerung des Bildausschnittes obenstehenden Bildes 4-7. Im Bereich der  $\alpha$ -SMA positiven Fibrillen kommt es zu einer Überlagerung mit PKH26, welches in einer gelblichen Fluoreszenz resultiert.*



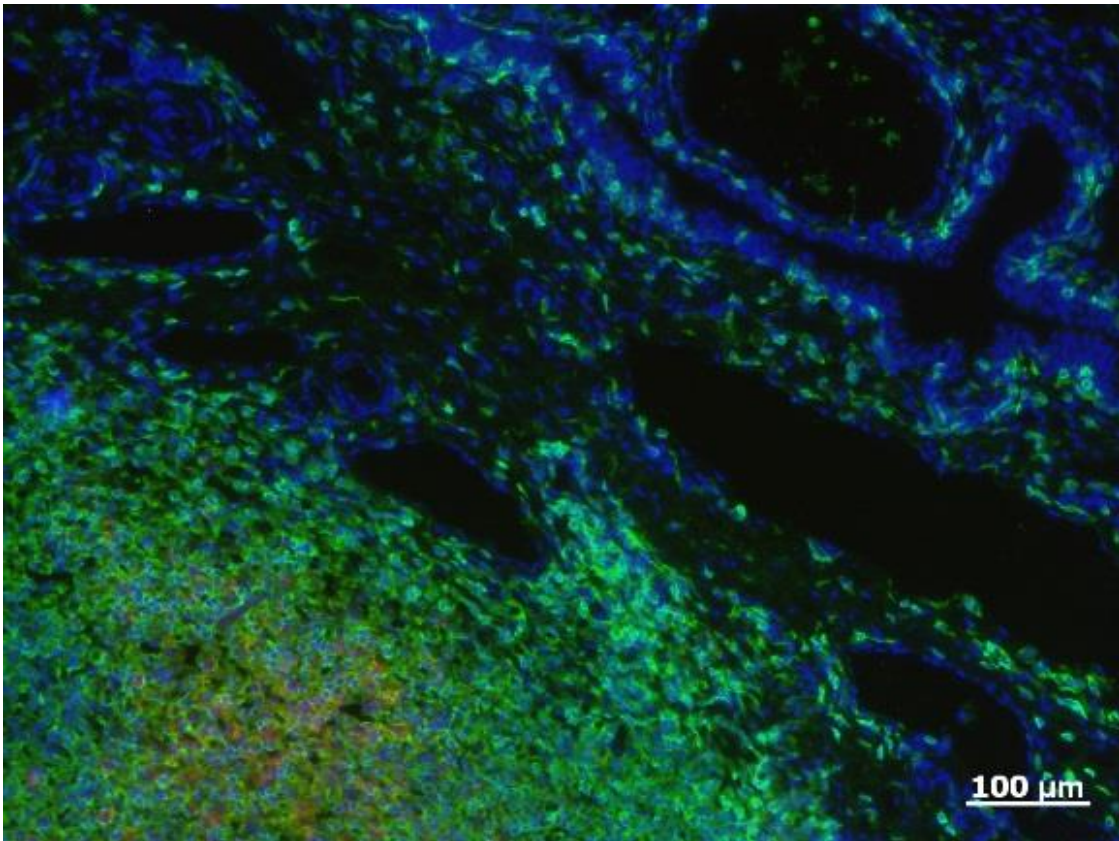
*Bild 4-9 Versuchstier 77629 mit vorausgegangener hMSC Transplantation nach 4 Wochen Standzeit. Gezeigt ist ein Schnitt aus dem Bereich des Harnblasenschließmuskels nach Färbung gegen Desmin (grün) sowie Anfärbung der Zellekerne mittels DAPI (blau) unter 40-fache Vergrößerung. Hierbei zeigt sich eine Anlagerung des PKH26 an Desmin positive Strukturen.*



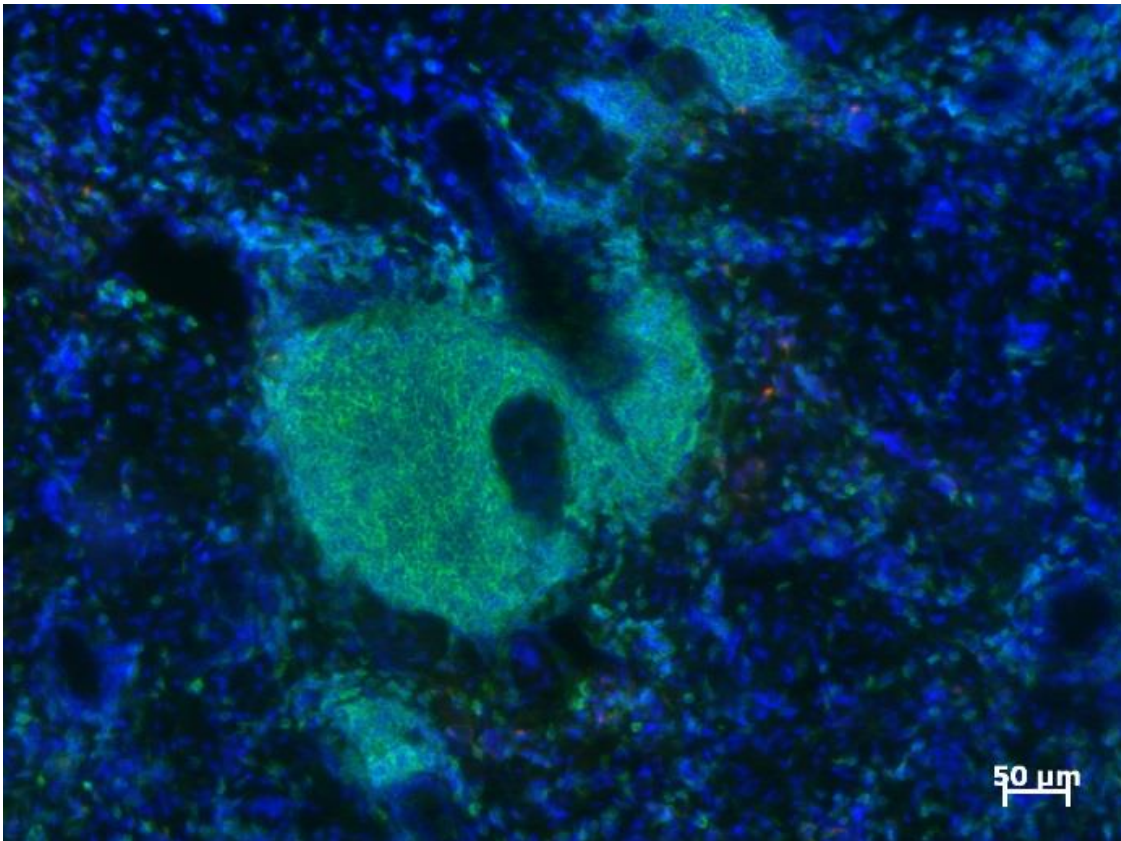
### 4.3 CD45 positive Reaktion im Bereich der injizierten Zellen

Oben beschriebene PKH26-positive follikelartige Strukturen mit Zeichen einer zentralen Zellkondensation sowie randständigem Zellwall ließen die Vermutung einer stattfindenden immunologischen Reaktion zu – entweder im Sinne einer Reorganisation des Gewebes oder im Sinne einer Abstoßungsreaktion der transplantierten xenogenen Zellen. Diese Hypothese wurde durch eine Färbung gegen die porcine Oberflächenstruktur CD45, eine Tyrosinphosphatase, welche membranständig exprimiert wird und typisch für Zellen des lymphoiden Systems ist, erhärtet. MSCs und Myozyten exprimieren per definitionem kein CD45. Die interne Überprüfung hinsichtlich der Spezifität des eingesetzten anti-porcine CD45 Antikörpers ergab keine Bindung auf humanem Skelettmuskel und humanen MSCs oder auf porciner Urethra und porciner Skelettmuskulatur. Färbungen porciner Blutausrichthe, welche aus peripherem EDTA-Blut gewonnen wurden, zeigten eine selektive Anfärbung einiger kernhaltiger Blutzellen. Diese wiesen in der Gegenfärbung mit DAPI einen relativ großen kreisrunden Zellkern mit halbmondförmigen Plasmasaum auf und zeigten somit die lymphozytentypische Zellmorphologie.

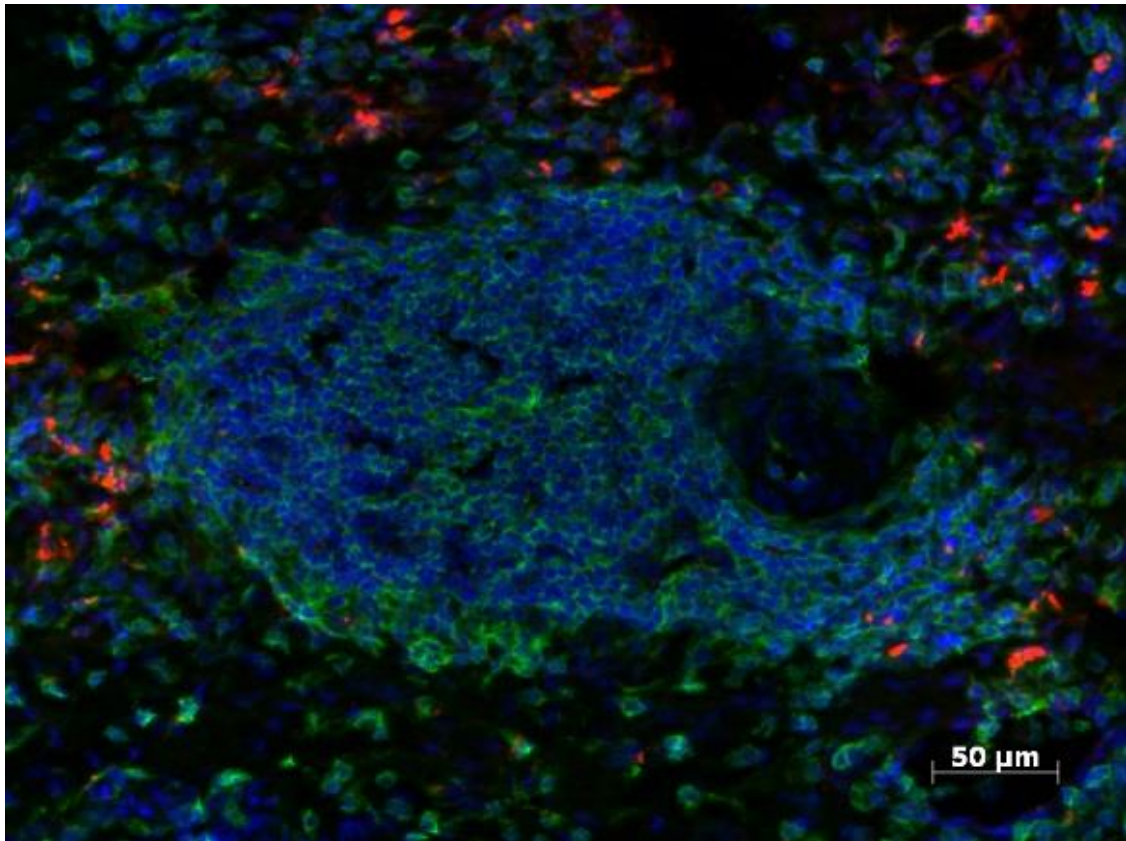
Innerhalb des gesamten Urethraverlaufs konnten mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops CD45-positive Strukturen nachwiesen werden. Im Bereich des *Muskulus sphincter urethrae internus*, dem Ort der xenogenen Zellapplikation, war die Intensität des anti-CD45 Antikörpers, dargestellt als grüne Fluoreszenz, am deutlichsten. Es zeigten sich CD45-positive Zellinfiltrate, in deren Zentren PKH26-positive Areale gelegen sind, und welche von einem Wall CD45-positiver Zellen gesäumt sind (Bild 4-10). Weiterhin war das Signal bei den Vier-Wochentieren intensiver und weniger scharf abgrenzbar. Dagegen fand sich bei den Acht-Wochentieren eine schwächere Fluoreszenz und die CD45-positiven Strukturen erschienen klarer abgrenzbar sowie deutlich reduziert in Ausdehnung und Dichte. Das Maximum befand sich im Zentrum der follikelartigen Zellkondensation und nicht mehr im Randsaum. Auch der PKH26 Farbstoff war nicht mehr zentral lokalisiert, sondern diffus im Randbereich gelegen (vgl. 4.2.1) (Bild 4-11; 4-12).



*Bild 4-10 Versuchstier 77629 nach vorausgegangener hMSC Transplantation nach vier Wochen Standzeit. Gezeigt ist ein Schnitt aus dem Bereich des Harnblasenschließmuskels nach Färbung gegen porcine CD45 (grün) sowie Anfärbung der Zellkerne mittels DAPI (blau) unter 10,-facher Vergrößerung. Im Bereich der PKH26 positiven Strukturen (rot) zeigt sich eine Kondensation CD45 exprimierender Zellen.*



*Bild 4-11 Versuchstier 107194 mit vorausgegangener hMSC Transplantation nach acht Wochen Standzeit. Gezeigt ist ein Schnitt aus dem Bereich des Harnblasenschließmuskels nach Färbung gegen porcine CD45 (grün) sowie eine Anfärbung der Zellekerne mit DAPI (blau) unter zehnfacher Vergrößerung. Auch nach acht Wochen zeigen sich im Bereich der Zellkondensationen ausgeprägte CD45 positive Reaktionen – verglichen mit der Intensität nach vier Wochen jedoch deutlich regredient und ohne zentrale PKH26 positive Areale.*



*Bild 4-12 Versuchstier 107194 mit vorausgegangener hMSC Transplantation nach acht Wochen Standzeit. Gezeigt ist ein Schnitt aus dem Bereich des Harnblasenschließmuskels nach Färbung gegen porcine CD45 (grün) sowie eine Anfärbung der Zellekerne mit DAPI (blau) unter zwanzigfacher Vergrößerung. Im Bereich der Zellkondensation zeigt sich eine CD45 positive Reaktion, das PKH26 befindet sich jedoch nicht mehr zentral lokalisiert, sondern diffus im Randbereich.*

#### **4.4 Molekularbiologischer Nachweise der hMSC durch rt-PCR-Analysen**

Li et. al (Li et al., 2013) konnten nachweisen, dass es durch den Einsatz von PKH26 zu einer nichtselektiven Anfärbung des Empfängerorganismus nach Zelltransplantation kommen kann. Die immunfluoreszenzhistologischen Untersuchungen lieferten somit keinen verlässlichen Nachweis der transplantierten humanen Zellen, da im fluoreszenzmikroskopischen Nachweis lediglich das Signal des PKH26 Farbstoffes alleine wiedergegeben wird. Der fehlende Nachweis humaner Zellkerne sowie die CD45 positiven Reaktionen im Bereich der transplantierten Zellen legten vielmehr die Vermutung eines immunologischen Prozesses im Bereich der Injektionsstelle nahe. Deshalb wurde über eine rtPCR-Analyse und den Einsatz spezifischer Taqman-Sonden der rein qualitative Nachweis humaner Sequenzen geführt. Als Grundlage dieser Untersuchung diente isolierte RNA aus dem Zielgewebe, welche nur in biologisch aktiven Zellen exprimiert wird. Entsprechend lässt sich aus den Untersuchungen eine Aussage hinsichtlich der Vitalität der transplantierten humanen Zellen treffen. Als Zielsequenz diente das humane Housekeeping-Gen GAPDH, welche mittels kommerziell zu erwerbenden Taqman-Sonden (Assay-Nummer Hs99999905\_m1, Reference Sequence NM\_002046, Exon 3-3, bp 122; Applied Biosystems) amplifiziert wurde.

#### 4.4.1 RNA-Gehalt der zu untersuchenden Proben

Die Isolation der RNA erfolgte mittels des RNeasy-Kits (Qiagen), die abschließende Überprüfung des RNA-Gehaltes durch die photometrische Bestimmung mit Hilfe des Nano Drop Systems. Je Versuchstier wurde eine Probe aus dem Bereich der Harnblasenschließmuskulatur - sowie aus der distalen Urethra gewonnen (Screening-PCR).

Probennummer	RNA-Gehalt ng/μl	260/280 Ratio
humaner Skelettmuskel	2,03	1,79
humane MSC	6,6	3,18
porciner Skelettmuskel	9,03	1,94
77539/2	1,3	2,08
77539/7	20,06	2,06
77629/1	2,65	3,34
77629/3b	2,72	6,29
103963/1	1,6	1,93
103963/4	2,57	2,41
104125/1	1,88	1,40
104125/5	5,57	2,13
107146/1	2,08	4,21
107146/4	2,71	1,55
107194/1	2,59	1,85
107194/6	1,71	3,57

Tabelle 4-1 RNA-Gehalt der bei der Screening-PCR eingesetzten Probenisolate.

Wegen negativ ausgefallener Screening-PCR wurde der gesamte verbleibende Gewebekblock des Harnblasenschließmuskels des Versuchstieres 107146 mit insgesamt 0,52g Gewicht lysiert und aus ihm RNA isoliert.

<b>Probennummer</b>	<b>RNA-Gehalt ng/µl</b>	<b>260/280 Ratio</b>
107146 sektion 1/1	5,74	2,16
107146 sektion 1/2	11,11	2,87
107146 sektion 1/3	19,04	2,02

Tabelle 4-2 RNA-Gehalt nach Lysierung des verbleibenden Gewebekblockes von Versuchstier 107146 aus dem Bereich der Harnblasenschließmuskulatur

#### 4.4.2 Qualitativer Nachweis humaner Sequenzen in der porcinen Urethra

In der Etablierungsphase des Primers wurde eine Kreuzreaktion zwischen humaner Zielsequenz und porcinen DNA-Polynucleotidsträngen ausgeschlossen. Humaner Skelettmuskel und hMSC dienten als Positivkontrolle. Sie zeigten ab Zyklus 20 einen deutlichen Signalanstieg (Daten nicht gezeigt), wohingegen bei der Negativkontrolle (porciner Skelettmuskel und porcine, native Urethra) im Verlauf der gesamten Messung über 40 Zyklen kein Signalanstieg verzeichnet wurde (Daten nicht gezeigt). Diese vier Gewebeproben wurden bei allen weiteren Messungen als interne positiv bzw. negativ Qualitätskontrolle jeweils mitbestimmt, um etwaige Verunreinigungen zu detektieren. Als Quelle der nativen porcinen Urethra dienten die RNA-Proben der beiden scheinoperierten Tiere, welchen - anstelle der hMSC - lediglich steriles Zellmedium injiziert wurde.

Die *Screening PCR* auf humane GAPDH-Sequenzen enthielt jeweils eine DNA-Probe aus dem Bereich des *Musculus sphincter urethrae internus* und eine DNA-Probe aus dem vaginalen Endstück der Urethra eines jeden Versuchstieres. Ab Zyklus 22 entwickelte sich ein regelrechter Signalanstieg der Positivkontrollen, welche sich exponentiell darstellten. Ab Zyklus 36 kam es bei einigen Proben zusätzlich zu einem Signalanstieg. Hierbei handelte es sich einerseits um Proben aus dem Harnblasenschließmuskel andererseits auch um NTC-Proben, die per definitionem keinen Signalanstieg aufweisen dürfen und auf ein unspezifisches Signal durch eine unspezifische Amplifizierung auf der Basis von z.B. Primerdimeren in den Proben schließen ließen (Figure 1).



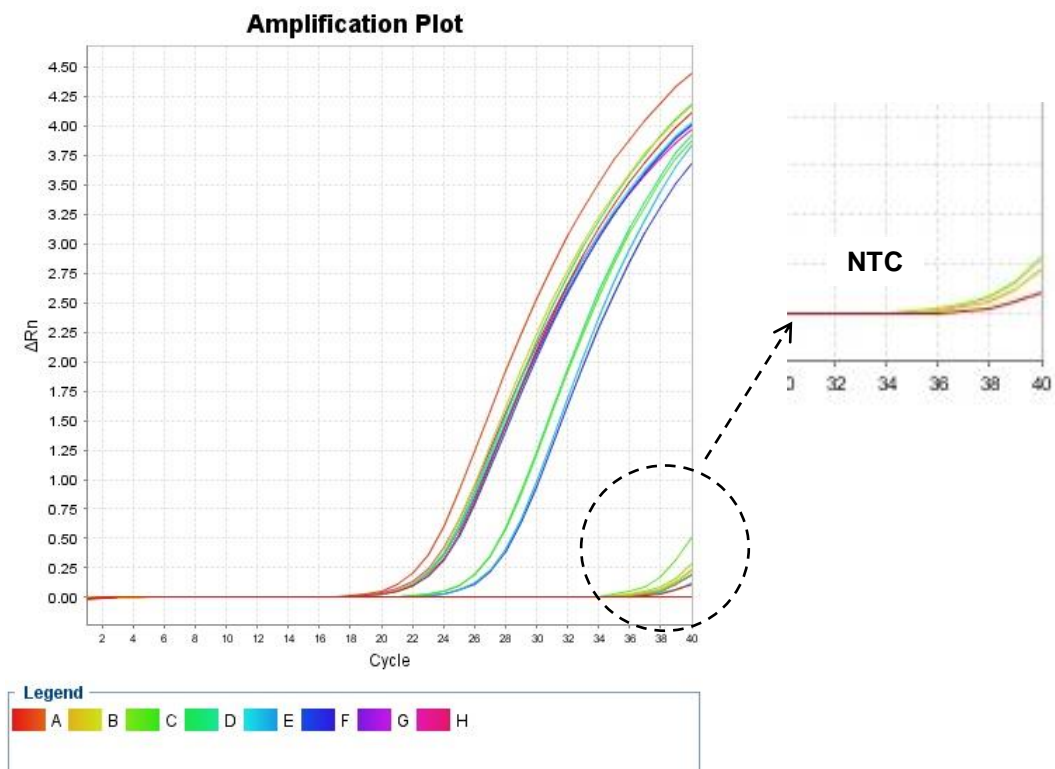


Figure 1: Ergebnis der durchgeführten Screening-PCR. Ab Zyklus 20 entsteht ein regelrechter Anstieg der Positivkontrollen, ebenso im weiteren Verlauf der Standardverdünnungsreihe. Ab Zyklus 36 zeigt sich neben dem eingesetzten Standard ein zusätzlicher Signalanstieg in einigen Proben - auch der NTC (vgl. vergrößerter Bildausschnitt rechts). Somit ist dieser Messzyklus aufgrund einer nicht auszuschließenden Verunreinigung der Proben nicht verwertbar.

Wegen dieser Hinweise auf Verunreinigungen wurde eine erneute molekulargenetische Untersuchung dieser Proben über 45 Zyklen durchgeführt. Hierbei zeigte sich nun ein regelrechtes Bild mit einem Signalzuwachs in Positivkontrollen sowie der Standardverdünnungsreihe (Figure 2). Die zu untersuchenden Proben wiesen allesamt kein Signalanstieg auf, auch die NTC nicht. Bei den beiden Ergebniskurven, welche ab Zyklus 39 einen Signalanstieg zeigten, handelte es sich um die Proben der Standardverdünnungsreihe, die wegen eines Pipettierfehlers in zu hoher Verdünnung eingesetzt worden waren.

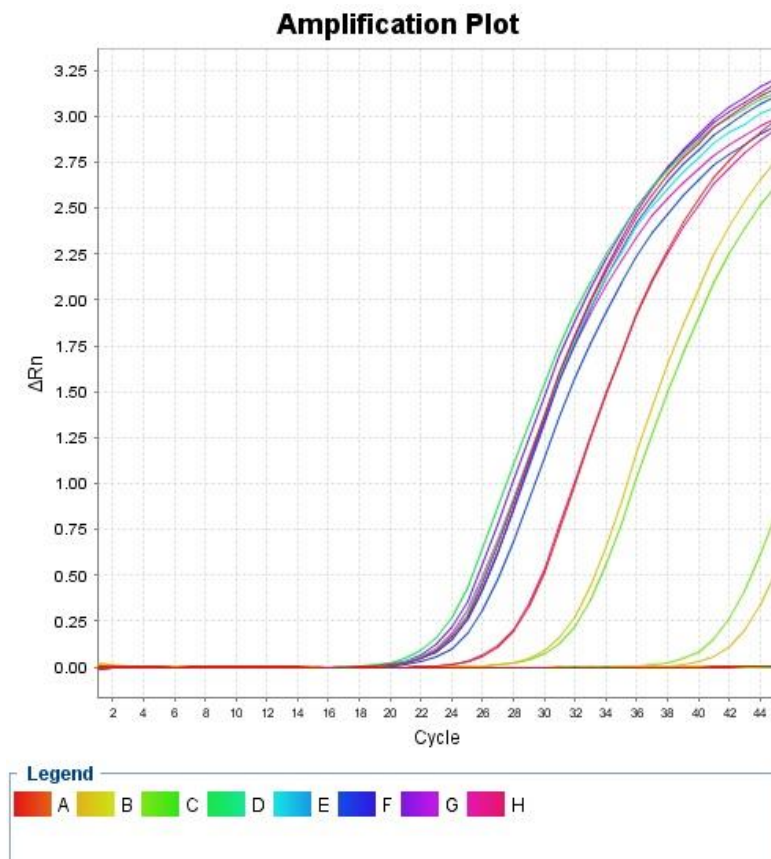
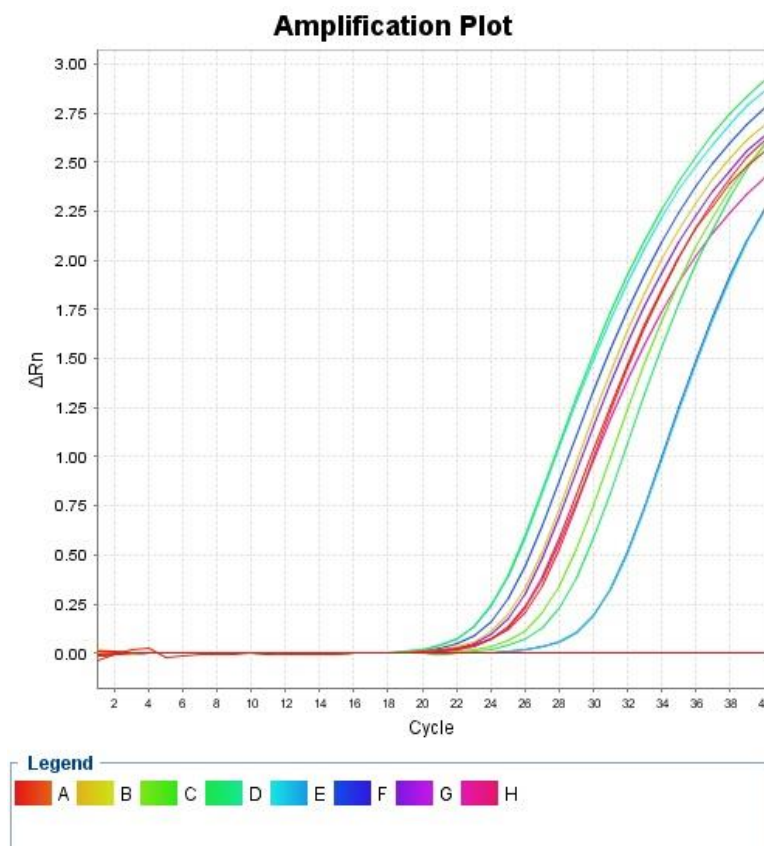


Figure 2: Ergebnis der Kontroll-PCR nach Probenverunreinigungen bei der Screening-PCR. Es kommt zu einem regelrechten Signalanstieg der Positivkontrollen sowie der Standardverdünnungsreihe; nach 45 Zyklen zeigt sich kein positives Signal bei den zu untersuchenden Proben. Bei den beiden Kurven ab Zyklus 38 handelt es sich jeweils im Proben der Standardverdünnungsreihen, welche aufgrund eines Pipettierfehlers in einer zu hohen Verdünnung angesetzt worden waren.

Die abschließende molekulargenetische Untersuchung des restlichen Harnblasenschließmuskels von Versuchstier 107146 lieferte ebenfalls keinen Hinweis auf das Vorhandensein humaner Zellen. Ab Zyklus 20 kam es zu einem regelrechten Anstieg der Positivkontrollen sowie der Standardreihe. Die zu untersuchenden Proben des hMSC-transplantierten Tieres wiesen über den gesamten Verlauf der Messungen keine Zunahme der Signalintensität auf (Figure 3).



*Figure 3: Ergebnis der abschließenden PCR. Der gesamte verbliebene Gewebekblock aus dem Bereich des Harnblasenschließmuskels von Versuchstier 107146 wurde lysiert und auf das Vorhandensein humaner GAPDH untersucht. Es zeigt sich ein regelrechter Anstieg der positiv Kontrollen sowie der Standardverdünnungsreihe, die zu untersuchenden Proben zeigen allesamt keine Signalsteigerung auf und sind somit als GAPDH negativ anzusehen.*

#### **4.4.3 Evaluierung myogener Differenzierungsfaktoren zur Bestätigung einer Integration der hMSC**

Die durchgeführten rtPCR-Analysen ergaben keinen Hinweis auf die Existenz noch vitaler humaner Zellen vier und acht Wochen nach Transplantation im hier vorhandenen xenogenen Großtiermodell. Weitere molekulargenetische Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen und nach Transplantation einsetzenden myogenen Differenzierung konnten ebenfalls nicht weiter erarbeitet werden und mussten daher eingestellt werden. Vorbereitet für weitere Untersuchungen zur myogenen Transdifferenzierung transplanteder hMSCs in vivo wurden rtPCR Assays folgender Moleküle getestet: T, Pax3, Pax7, Myf5, MyoD1, MRF4, Myogenin und Myosin. Zur weiteren Etablierung wurden ihre Assays auf Positivität in humaner Muskulatur und ihrer Kreuzreaktivität im porcinen quergestreiften Muskel sowie Muskulatur von procinem Harnröhrengewebe getestet. Ein Überblick über diese Ergebnisse zeigt Tabelle 4-3. Selektivität bedeutet, dass der jeweilige Assay nach Herstellerangaben korrekt und ausschließlich humane Sequenzen in der quantitativen rt-PCR stabil amplifiziert und damit sicher detektiert; die Angabe „Kreuzreaktion“ mit Minipig (MP) bedeutet dabei, dass trotz bestmöglichem Design der Assays ein Annealing mit der procinen RNA stattfindet und somit keine selektive Amplifizierung humaner Sequenzen möglich war. Die Anwendung der in Tabelle 4-3 gekennzeichneten Assays ist z.B. zur weiteren Charakterisierung myogener in-vitro Differenzierungsversuche humaner Zellen geeignet – nicht aber zur sicheren Charakterisierung myogen differenzierter humaner Zellen im xenogenen Großtiermodell.

ERGEBNISSE

Gene Symbol	Gene Name	Assay Nr.	RefSeq	Exon	bp	MP
GAPDH		Hs99999905_m1	NM_002046	3-3	12 2	selektiv
18S		Hs99999901_s1	X03205		18 7	Kreuzreaktion mit MP
T	brachyury	Hs00610080_m1	NM_003181	8-9	13 2	selektiv
Pax3		Hs00992437_m1	NM_181457	7-8	66	Kreuzreaktion mit MP
			NM_181458	7-8	66	
			NM_181459	7-8	66	
			NM_001127 366	7-8	66	
Pax7		Hs00242962_m1	NM_001135 254	4-5	73	selektiv
			NM_013945	4-5	73	
			NM_002584	4-5	73	
Myf5		Hs00271574_m1	NM_005593	1-2	59	Kreuzreaktion mit MP
MyoD1		Hs00159528_m1	NM_002478	2-3	67	selektiv
Myf6 (MRF4)		Hs00231165_m1	NM_002469	1-2	58	Kreuzreaktion mit MP
Myogenin		Hs01072232_m1	NM_002479	2-3	76	Kreuzreaktion mit MP
Myosin	myosin, heavy chain 14	Hs00226855_m1	NM_024729	38-39	88	Kreuzreaktion mit MP

Tabelle 4-3 : Spezifität kommerziell erwerbbarer rtPCR Primer zur Untersuchung der myogenen Differenzierung humaner Zellen im Minipig.

## 5 DISKUSSION

---

### 5.1 Studiendesign

Die hier vorgestellten Ergebnisse wurden im Rahmen einer Pilotstudie generiert. Auf Basis dieses Studiendesignes zeigen sie allerdings nur eine niedrige statistische Aussagekraft. Das primäre Versuchsziel ist gelungen, den Einschränkungen des restriktiven Großtierversuchsantrag als erstmalig so wissenschaftlich zu implementierendes, xenogenes Großtiermodell im Sinne einer Pilotstudie nachzukommen, dabei die bestmögliche Sicherheit für die Versuchstiere bei Operation sowie Aufstallung unter Immunsuppression zu gewährleisten und die operative Machbarkeit des Ansatzes unter Einsatz in der klinischen Humanmedizin üblichen technischen Instrumentierung zu zeigen. Die Grundlagen wurden hierbei erfolgreich erarbeitet, um im Rahmen eines großangelegten wissenschaftlichen Projektes der KFO-273 eine größere, statistisch zu evaluierende Anzahl von Versuchstieren in einem Großtierversuchsantrag zu beantragen. Dieser konnte für die Umsetzung dieses Nachfolgeprojektes entsprechend genehmigt werden. Es wurden essentielle Grundsteine für weitergehende Studien gelegt, und der präklinische Modellorganismus Minipig konnte wesentlich erweitert werden. Anhand der gewonnenen Erkenntnisse konnte bereits während der laufenden Studie erste Modifikationen erarbeitet werden und das Großtiermodell wurde weitestgehend in unserem Labor etabliert. Obgleich es gelang, die prinzipielle Eignung des Modellorganismus zur Entwicklung einer stammzellbasierten Therapie der Harninkontinenz aufzuzeigen, wurden auch methodische Schwächen deutlich, die bei nachfolgenden Projekten vermieden werden können und im Folgenden diskutiert werden.

## 5.2 Tiermodell

In vitro und im Kleintiermodell werden Eignung humaner mesenchymaler Stammzellen zur Regeneration geschädigter Muskulatur im Allgemeinen (Dezawa et al., 2005) als auch als spezieller Therapieansatz bei bestehender Harninkontinenz beschrieben (Gunetti et al., 2012) (Watanabe et al., 2011). Verglichen mit den vorhandenen Kleintier- oder Nagermodellen zeigen sich beim Minipig sowohl bei den anatomischen Gegebenheiten als auch beim zum Gebrauch kommenden medizinischen Instrumentariums viele Gemeinsamkeiten mit der Humanmedizin (Joller et al., 2012). Zur Transplantation der hMSCs beispielsweise wurden allgemein übliche Zystoskope der Firma Storz (Karl Storz, Tuttlingen, Deutschland) - wie sie auch im klinischen Alltag an der Universitätsklinik für Urologie eingesetzt werden - Verwendung. Wegen des experimentellen Charakters der durchgeführten Arbeit, ist aus ethischen Gründen eine Versuchsdurchführung am Menschen nicht statthaft. Als geeignetes Tiermodell wurde deshalb das Minipig gewählt.

### 5.2.1 Autologes versus Xenogenes Großtiermodell

Das durchgeführte Projekt ist als präklinische Pilotstudie einer stammzellbasierten Therapie in der Humanmedizin zu sehen. Bewusst wurde der Einsatz humaner Zellen im Sinne eines xenogenen Modells beschlossen. Wohl wäre auch der Einsatz porciner mesenchymaler Stammzellen (MSC) möglich gewesen. Ringe et al. beschreiben ein Verfahren zur Isolation und Kultivierung porciner MSCs (Ringe et al., 2002) und zeigen -vergleichbar Noort et. al- eine große Ähnlichkeit porciner und humaner MSC bezüglich ihrer Differenzierungseigenschaften auf (Noort et al., 2012). Im Labor für Tissue-Engineering der Klinik für Urologie in Tübingen ist die Kultivierung und Differenzierung humaner MSCs etabliert. Humanes Probenmaterial zur Zellgewinnung steht in ausreichendem Maße - verglichen mit nicht vorhandenen Spendertieren - zur Verfügung.

Eine autologe Zelltransplantation erfordert zur Zellgewinnung einen zusätzlichen operativen Eingriff am Versuchstier, einhergehend mit verlängerten Standzeiten während der Kultivierungsphase der porcinen MSC. Neben tierschutzrechtlichen Gründen kommt es zudem zu einer beachtlichen Steigerung der externen Kosten für Tierhaltung, tierärztliche Betreuung, etc.

Die Wahl eines xenogenen präklinischen Modelles erfordert die Immunsuppression, einhergehend mit vielerlei möglicher Beeinflussungen sowohl des Empfängerorganismus als auch der transplantierten Zellen (vgl. 5.3.5). Bei der Wahl eines autologen Modelles wären diese obsolet. Mit der von uns durchgeführten Pilotstudie ist es gelungen, Ansätze ausfindig zu machen, welche die Immunsuppression beim Minipig besser steuerbar und somit sicherer machen. Aufbauend auf diese Ergebnisse sollte es möglich sein, bei weiteren Großtierprojekten die Versuchstiere einer suffizienten Immunsuppression mit stabilen „steady state“ zuzuführen.

### **5.2.2 Verwendung ausschließlich weiblicher Modelltiere**

Verwendung fanden bei den von uns durchgeführten Arbeiten ausschließlich weibliche Minipigs, da sich infolge der anatomischen Gegebenheiten der Zugang zum harnableitenden System technisch einfacher gestaltet. Zudem konnten Zini et. al. mittels 3D Rekonstruktion das Vorhandsein eines definierten quergestreiften Harnblasenschließmuskel im proximalen Drittel der Urethra ausschließlich bei weiblichen Schweinen nachweisen (Zini et al., 2006). Wegen der anatomischen Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Schweinen muss die Beurteilung des harnableitenden Systems differenziert erfolgen. Bei den weiblichen Tieren befindet sich das *Ostium urethrae externum* im *Introitum vaginae* auf Höhe des Afters nahezu in einer Ebene mit der Harnblase. Somit liegt die Vermutung nahe, dass bei weiblichen Tieren in Ruhe nur ein geringer hydrostatischer Druck auf dem Blasenhalss lastet. Bei männlichen Tieren dagegen herrscht wegen der Lokalisation des *Ostium urethrae externum* in der Bauchdecke eine höhere statische Druckbelastung. Im Vergleich mit dem



harnableitenden System des Menschen ergeben sich somit hypothetisch deutlich mehr Parallelen hinsichtlich der wirkenden Kraftvektoren und der statischen Druckbelastungen mit männlichen Versuchstieren als mit den verwendeten weiblichen Minipigs. Bei der aktuellen Recherche wissenschaftlicher Artikel finden sich jedoch keine urodynamischen Messungen, die sich mit diesen geschlechtsspezifischen Unterschieden bei Schweinen befassen. Folglich sollte zukünftig zur weiteren Modifikation des Großtiermodelles mittels urodynamischer Messungen objektiviert werden, wie sich Spinkterapparat, respektive die Verschlussdrücke, beider Geschlechter beim Minipig unterscheiden. Anhand dieser Messungen ließe sich auch klären, ob das harnableitende System weiblicher Minipigs das menschliche System suffizient abbildet oder ob für zukünftige Versuche männliche Versuchstiere - verbunden mit einem erhöhtem operativen Aufwand - möglicherweise geeigneter sind und somit zu den weiteren Studien herangezogen werden sollten.

### **5.2.3 Einfluss des Lebensalters der Tiere**

In der Literatur gelten erhöhtes Lebensalter (Hunskaar et al., 2004), einhergehend mit einer progredienten Fibrosierung des Schließmuskels (Perucchini et al., 2002b) genauso wie vaginale Entbindungen (Gyhagen et al., 2013) und Operationen im Bereich des Beckens als gesicherte Risikofaktoren für die Entwicklung einer Harninkontinenz. Wir untersuchten und transplantierten jedoch ausschließlich gesunde Jungtiere mit einem maximalen Alter von 20 Wochen. Hierbei ist weder mit einer Schwäche des Beckenbodens durch vorausgegangener Schwangerschaften (Nullipara-Tiere) noch mit einer beginnenden Fibrosierung der Muskulatur zu rechnen. Nach Brack et al. ist dies ursächlich auf das geänderte systemische Milieu des Empfängerstromas bei alternden Individuen zurückzuführen (Brack et al., 2007). Folglich ist bei Jungtieren von einer stärker potenten Wundheilung und regenerativen Potenz auszugehen (Conboy et al., 2005), auch weil sich die Anzahl der intrinsischen myogenen Stammzellen im Laufe des Lebens deutlich verringert (Conboy et al.,

2003) und diese von MSC -über paracrine Sekretion des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF)- stimuliert und zur Ausdifferenzierung angeregt werden (Sassoli et al., 2012). Es soll Aufgabe weitere Untersuchungen sein zu klären, ob durch den Einsatz junger Minipigs das Krankheitsbild der Harninkontinenz des Menschen (Betroffene überwiegend der Altersgruppe 60plus) überhaupt suffizient abbilden lässt. Hierfür wäre es für weitere Untersuchungen methodisch sinnvoll, Versuchstiere unterschiedlicher Altersgruppen mit identischen operativen Therapie zuzuführen und diese Tiere sowohl urodynamisch als auch histologische (Zellmorphologie, Zellzahlen, etc.) gegeneinander zu vergleichen.

#### **5.2.4 Harnkontinentes Modell vs. iatrogenes Inkontinenzmodell**

Die durchgeführte Pilotstudie untersuchte anhand eines nativen, harnkontinenten Großtiermodells den experimentellen Einsatz humaner MSC auf deren myogener Differenzierungseigenschaften in vivo. Die iatrogene Induktion der Harninkontinenz beispielsweise mittels Durchtrennung des Schließmuskels (Eberli et al., 2009), der korrespondierenden Nerven (Peng et al., 2006) oder mittels Ballondilatation (Burdzinska et al., 2012) wurde nicht durchgeführt. Kontrovers ist sicherlich zu diskutieren, ob das untersuchte Modell somit die reale Situation bei harnkontinenten Patienten tatsächlich darstellt. Bei den Versuchstieren werden die Zellen in ein myogen und neuronal intaktes Milieu gespritzt und könnten sich, wie von Mackenzie et al. beschrieben, in Abhängigkeit der Umgebungsmediatoren ausdifferenzieren (Mackenzie and Flake, 2001). Es liegt weder eine degenerative Fibrosierung des Empfängergewebes (Strasser et al., 1999) noch eine Atrophie der Muskultur, wie beispielsweise nach iatrogenen Denervierung vor, welche das regenerative Potential ebenfalls mindert (Kwon et al., 2006) und als Risikofaktor für eine Harninkontinenz gilt (Sacco et al., 2006). Als Folge einer bestehenden Harninkontinenzsymptomatik kommt es zudem gehäuft zum Auftreten rezidivierender Harnwegsinfekte (Raz et al., 2000), welche ebenfalls eine Schädigung des urethralen Gewebes bedingen und die Regenerationsfähigkeit vermindern. Im vorliegenden Tiermodell lässt sich somit

nur anhand urodynamischer Messungen, histologischen Schnitten und eventuell quantitativer molekulargenetischer Untersuchungen die Wirksamkeit einer stammzellbasierten Therapie evaluieren. Der direkte objektiverbare Vergleich zwischen einer vorbestehenden Harninkontinenz und einer durch die Stammzelltherapie eingetretenen Besserung der Symptomatik ist bei unserer Versuchsanordnung nicht möglich.

### **5.2.5 Sonographische Kontrolle sowie Autopsie der Niere und des oberen Harntrakts**

Die Transplantation der Zellen stellt eine erhebliche Manipulation im Bereich des unteren Harntraktes der Minipigs dar. Sie ist vergleichbar mit den sich beim Menschen ergebenden Komplikationen, weshalb auch bei den Versuchstieren die Entwicklung einer iatrogen bedingten Harnabflussstörung ausgeschlossen werden sollte. Die applizierten Zellen könnten im Falle einer Apoptose oder der Differenzierung in Stromagewebe eine Wirkung wie ein „Bulking Agent“ aufweisen (Thaker and Sharma, 2013) und den Abfluss der Harnblase dauerhaft verlegen (Bedir et al., 2004), sodass es zu einem retrograden Rückstau des Harns bis hin zur Ausbildung einer Stauungsniere kommen kann. Es ist strittig ob sich diese Komplikationen allein mittels des laborchemisch bestimmten Kreatinins erfassen lassen oder ob nicht weitere Nierenfunktionsparameter (Harnstoff, Albumin, etc.) mit in die Untersuchungen einbezogen werden sollten.

Aussagekräftiger sind regelmäßige sonographische Untersuchungen des harnableitenden Systems mit Bestimmungen des Restharnes unmittelbar präoperativ, eventuell während des Eingriffs und regelmäßig während der Aufstallung und abschließend nach Sakrifizierung eine orientierende Autopsie der Nieren und der Harnblase angeschlossen werden sollte.

### 5.2.6 Laborchemisches Monitoring der Versuchstiere

In der Literatur finden sich nur unzureichend und nicht kongruente Angaben bezüglich der laborchemischen Referenzwerte speziell der Göttinger Minipigs. Mag dies für den Referenzbereich der CsA-Plasmakonzentration nur von unwesentlicher Bedeutung sein, spielt es jedoch bei der Auszählung des Blutbildes eine weit bedeutendere Rolle. Somit ist es bei weiterführenden Großtierprojekten sicherlich empfehlenswert, vor den experimentellen Versuchen Datenregister mit intern gewonnenen Normalwerten zu etablieren und Ausgangswerte für jedes Versuchstier festzuhalten.

Bei unserer Versuchsanordnung war – um den Stress für die Versuchstiere zu reduzieren- eine regelmäßige Probenentnahme nicht vorgesehen. Dies erfolgte nur im wöchentlichen Turnus und zu nicht festgelegten Abnahmezeiten. Somit kann keine Aussage über die Metabolisierung des CsA getroffen werden - der Nadir des Plasmaspiegels ist nicht exakt zu bestimmen. Bei zukünftigen Versuchen sollte darauf geachtet werden, die Probenbestimmung jeweils 2 h nach Gabe des Medikamentes durchzuführen (C2-Wert), da diese Messung der Nadir-Bestimmung überlegen ist und sich hieraus gleichzeitig eine Aussage über die biologische Wirkung treffen lässt (Kong et al., 2012). Des Weiteren ergibt sich die Möglichkeit einer zeitnahen Reaktion auf suspekta laborchemische Befunde. Auf sich abzeichnende Schwankungen der Plasmaspiegel kann somit frühzeitig reagiert werden.

Bei Versuchstier 77539 und 77629 wurden an voneinander unabhängigen Tagen massive Erhöhungen des  $\gamma$ -GT Wertes gemessen. Diese standen jedoch in keiner zeitlichen Korrelation zu einem erhöhten CsA-Plasmaspiegel. Somit sahen wir keinen kausalen Zusammenhang mit der stattfindenden CsA-Therapie, sondern vermuteten entweder einen technischen Messfehler seitens des Labors bzw. oder aber eine akute Infektion bei den Versuchstieren, welche sich klinisch nicht manifestierte und symptom- sowie komplikationslos verlief. Die  $\gamma$ -GT-Werte beider Tiere normalisierten sich. Der weitere Verlauf zeigte keinen progredienten

Anstieg wie er bei einem chronisch pathologischen Prozess zu erwarten gewesen wäre.

Weiterhin kontrovers zu betrachten sind die von uns festgelegten Kreatinin-Werte. Während der obere Grenzwert unserer Referenztafel 1,1 mg/dl beträgt, beobachteten *Guan et al.* bei laborchemischen Untersuchungen an 22 Minipigs mittlere Serumkreatinin-Werte von 1,59 mg/dl (*Guan et al.*, 1994). Die grenzwertig erhöhten Kreatinin-Werte der Acht-Wochentiere (1,3 mg/dl) sollten daher nicht als Ausdruck einer chronischen Nierenschädigung (z. B. durch eine Stauungsniere) angesehen werden. Sie bewegen sich vielmehr noch in einem physiologischen Rahmen.

### **5.2.7 Operative Anlage eines zentral venösen Zuganges bei den Versuchstieren**

Die oben vorgeschlagenen Maßnahmen der engmaschigen laborchemischen Kontrolle erfordert eine häufigere venöse Punktion bei den Versuchstieren. Um diese Punktionen zu minimieren wäre es auch aus Gründen des Tierschutzes empfehlenswert, bei der ersten Narkose operativ einen für den gesamten Zeitraum der Aufstallung zu belassenen zentral venösen Zugang zu schaffen. Wie von *Moroni et al.* beschrieben erscheint hierzu die Implantation eines Ports am besten geeignet. Die Tiere tolerierten die Portnadeln problemlos und zeigten kaum Beeinträchtigungen. Nur in einzelnen Fällen traten Komplikationen wie katheterassoziierten Infektion auf. Diese waren jeweils antibiotisch gut zu beherrschen. Es erfolgte keine vorzeitige Euthanasie der Tiere wegen eskalierender Infektionen (*Moroni et al.*, 2011).

Eine weitere Methode eines venösen Zugangs ist die Anlage zentralvenösen Katheters (ZVK). Dieser ist weitaus einfacher anzulegen (*Lombardo et al.*, 2010), bietet aber gegenüber dem Portsystem diverse Nachteile und weist ein höheres Risikoprofil auf (*Patel et al.*, 2014). *Chuang et al.* verglichen in ihrer Arbeit insgesamt 30 Schweine bezüglich der Komplikationen zwischen implantierten Portsystem mit denen eines liegenden ZVK. Bei 72% der „ZVK- Tiere“ kam es zu

einer lokalen Infektion, bei 17% entwickelte sich zudem eine Thrombose der punktierten Vene. Bei den „Port-Tieren“ kam es dagegen im vierwöchigen Beobachtungszeitraum zu keinerlei Komplikationen wie manifesten Infektionen oder Thrombosen (Chuang et al., 2005).

## 5.3 Transplantierte Zellen

### 5.3.1 Eigenschaften von MSC in Abhängigkeit ihres Ursprungsgewebes

De la Garza-Rodea et al. zeigen bei ihren in vitro Untersuchungen unterschiedlich ausgeprägte Differenzierungseigenschaften verschiedener MSC in Abhängigkeit ihres Ursprungsgewebes. Aus Fettgewebe isolierte MSC (AT-MSC) zeigen sich hinsichtlich ihres myogenen Differenzierungspotentials aus Knochenmark isolierten MSC (BM-MSC) überlegen (de la Garza-Rodea et al., 2012). Lin et al. konnten eine myogene Differenzierung der AT-MSC im harninkontinenten Nagermodell nachweisen (Lin et al., 2010). Yamamoto et. al berichten zudem von ersten erfolgreichen Studien an drei männlichen Probanden. Diese litten unter Symptomen der Stressinkontinenz (SUI): durch autologe AT-MSC-Transplantation konnte eine deutliche Besserung der Symptomatik erzielt werden (Yamamoto et al., 2012). Des Weiteren zeigen AT-MSC in vitro eine höhere Rate an Proliferationen sowie Zellteilungen (Kern et al., 2006), sie konservieren im Vergleich mit BM-MSC ihr Differenzierungspotential in Kultur länger (Izadpanah et al., 2006). Ebenso unterdrücken AT-MSC die Funktion aktivierter B-Zellen wirkungsvoller als BM-MSC und führen zu einer effektiveren Inhibition der Immunglobulinsekretion (Bochev et al., 2008). Hinsichtlich der Aktivierung und Proliferation der T-Lymphozyten erweisen sich allerdings die BM-MSC als effektiver (Xishan et al., 2013). Bei all diesen genannten Unterschieden bleibt zu bedenken, welche Risiken und Aufwand bei der Zellgewinnung erforderlich sind. Zur Isolation von BM-MSC benötigt man eigens eine Knochenmarkspunktion - ohne dass sich hieraus weiterer diagnostischer Nutzen ergibt. Dagegen können AT-MSC mit geringem traumatischem Aufwand und in weitaus höherer Menge gewonnen werden (Zuk et al., 2002). MSC-haltiges Fettgewebe lässt sich sowohl im Rahmen ablativer Operationen, wie beispielsweise der radikalen Prostatektomie (welche auch Ursache einer Harninkontinenz sein kann) gewinnen. Aber auch elektive Eingriffe wie beispielsweise Liposuktionen bieten die Möglichkeit zur MSC-Gewinnung in ausreichender Anzahl (Schreml et al., 2009). Jin et. al weisen in ihrer Arbeit auf die Überlegenheit der aus Nabelschnurblut gewonnen MSC (UCB-MSC)

gegenüber AT-MSc sowie BM-MSc hin (Jin et al., 2013). Diese Zellen eignen sich jedoch nicht zur klinischen Anwendung im Sinne eines autologen Therapieansatzes bei erwachsenen Patienten mit Symptomen einer Harninkontinenz und stehen somit nicht im Fokus unserer Forschung. Die von De Coppi et. al beschriebenen, aus Amnionflüssigkeit isolierten MSC, eignen sich wegen der Risiken für die Schwangerschaft genauso wenig als routinemäßiges Verfahren in der klinischen Anwendung und sollten experimentellen Arbeiten vorbehalten bleiben (De Coppi et al., 2007). Für zukünftige Arbeiten im Bereich der rekonstruktiven Urologie können auch die von Bharadwaj et. al beschriebenen, aus Urin gewonnenen, MSC von Bedeutung sein. Diese können nicht-invasiv gewonnen werden - in-vitro gelang der Nachweis einer Differenzierung in glattmuskuläre Zellen (Bharadwaj et al., 2013). Es gilt abzuwarten, ob sich diese erst neulich publizierten Eigenschaften in weitergehender Grundlagenforschung bestätigen. Solange können sowohl AT-MSc als auch BM-MSc als brauchbare Zellquelle zur Entwicklung einer stammzellbasierten Therapie der Harninkontinenz betrachtet werden.

### **5.3.2 PKH26 Labeling**

PKH26 gilt als Goldstandart der reversiblen Zellmarkierung und wurde bei unseren Versuchen zur Zellmarkierung der MSC angewandt (Samlowski et al., 1991) (Hemrich et al., 2006) (Horan et al., 1990). Analog zu Ude et al. konnten wir über einen Zeitraum von mehreren Wochen ein stabiles PKH26 Signal detektierten (Ude et al., 2012). Auffällig erschien bei den angefertigten Semidünnschnitten jedoch die Lokalisation der PKH26 Fluoreszenz, welche sich nahezu über den gesamten Verlauf der Urethra verfolgen ließ, bis in die Adventitia der Urethra reichte und sich nicht -wie eigentlich von uns erwartet- auf den Injektionsbereich der primär PKH26 gelabelten MSC beschränkte. Bereits 2008 äußerten Lassailly et al. den Verdacht einer unspezifischen Bindung des PKH26 Farbstoffes und wiesen eine Verunreinigung des umgebenden Gewebes nach Kokultur mit PKH26 positiven Zellen nach (Lassailly et al., 2010). In



aktuellen Untersuchungen konnten Li et al. diese Eigenschaften des PKH26 bestätigen. Analog hierzu gingen auch wir von einer unspezifischen Färbung des Fluoreszenzfarbstoffes PKH26 aus, der in einer diffusen Fluoreszenz resultiert (Li et al., 2013). In Zusammenschau des negativ ausfallenden Nachweises humaner Zellkerne in der Immunfluoreszenzmikroskopie sowie dem fehlenden molekulargenetischen Nachweis humaner GAPDH bei deutlich PKH26 positiven Strukturen in den korrespondierenden histologischen Schnitten wird diese These weiter untermauert. Schlussendlich gilt es vor weiteren Untersuchungen das in vivo Verhalten des PKH26 Farbstoffes hinsichtlich seiner Elimination und seines Bindungsverhaltens, beispielsweise nach Lyse oder Apoptose der primär markierten Zelle, genauer zu untersuchen.

### **5.3.3 Alternativen einer PKH26 Zellmarkierung**

Aufgrund oben beschriebener Nebeneffekte der PKH26 Zellmarkierung empfiehlt es sich zur Modifikation des Großtiermodells mehr spezifische und selektive Zellmarkierungsmethoden zu wählen. Sie sollten die Möglichkeit einer nicht invasiven in-vivo Bildgebung in Echtzeit bieten und eine Aussage hinsichtlich Vitalität und Verteilung der markierten Zellen erlauben (Jha et al., 2010). Grundsätzlich sind hierbei zwei Methoden möglich: die direkte farbstoffbasierte Markierung, wie in unserer Versuchsanordnung mittels PKH26, und die indirekte Markierung im Sinne einer retroviralen stabilen Transfektion der genetischen Information eines farbgebenden Markerproteins. Letztgenannte bietet den Vorteil, dass sich Aussagen über die Zellproliferation treffen lassen und apoptotische Zellen von vitalen unterschieden werden können (Kircher et al., 2011).

Eine klassische Methode indirekter Zellmarkierung stellt die retrovirale Transfektion eines Luciferase Gens dar (De Vocht et al., 2013). Durch Reaktion des korrespondierenden Substrates kommt es zur Biolumineszenz, die sich nicht invasiv und sogar in-vivo mittels des Optical-Imaging Systems detektieren lässt. Der große Vorteil der Biolumineszenz liegt in der stabilen Transfektion der Zellen

mit dem Luciferase Gen, was theoretisch einen unbegrenzten Detektionszeitraum ermöglicht (Welsh and Kay, 2005). Der Nachteil der Biolumineszenz hingegen liegt einerseits in der limitierten Gewebedurchlässigkeit des Lichtes, welche sich auf wenige Millimeter beschränkt und somit nur für oberflächliche Anwendungen im Großtiermodell geeignet erscheint, andererseits der fehlenden räumlichen Auflösung (Ntziachristos et al., 2005). Derzeit sind lediglich Optical Imaging Systeme zur Untersuchung bei Nagern auf dem Markt erhältlich; bautechnisch bedingt käme somit nur die isolierte unmittelbar nach Sakrifizierung durchgeführte Beurteilung der Urethra infrage. Durch Transfektion retroviraler Vektoren mit nachfolgender Expression eines Fluoreszenzproteins wird aufgrund der Autofluoreszenz eine einfache Detektion der markierten Zellen in histologischen Schnitten ermöglicht. Allerdings sind diese Untersuchungen nur ex-vivo durchzuführen und erlauben keine Beobachtungen in Echtzeit (Belema-Bedada et al., 2008).

Die Bildgebung mittels PET-CT ermöglicht die nicht-invasive Untersuchung mit räumliche Auflösung und Beurteilung der Vitalität der markierten Zellen in-vivo. Kritisch zu beurteilen ist der Einsatz radioaktiver Tracer, weil diese toxische Wirkungen aufzeigen könnten und somit die zelluläre Funktion beeinträchtigen könnten. Wolfs et al. konnten jedoch nachweisen, dass  $^{18}\text{F}$ -FDG - als PET-Tracer - problemlos von retroviral modifizierten MSC aufgenommen wird und zu keiner Beeinträchtigung der zellulären Funktionen führt (Wolfs et al., 2013). Vergleichbare Ergebnisse erzielten Elhami et al. die im speziellen auf eine dosisabhängige Toxizität des Tracers verweisen (Elhami et al., 2011). Eine strahlenfrei Alternative zur PET-Untersuchung mit ähnlicher Aussagekraft bietet sich in Form der MRT basierten Bildgebung an. Zur Detektion der transplantierenden Zellen ist eine spezifische Markierung mit MRT-tauglichen Kontrastmitteln, zum Beispiel Eisenpartikeln, erforderlich. Obwohl in der Forschung weit verbreitet ist hiermit nur ein eingeschränkter Beobachtungszeitraum möglich. Außerdem kommt es häufig zur Kumulation im Gewebe entweder direkt am Injektionsort durch haufenweise Apoptose der markierten Zellen oder im sonstigen Gewebe durch die Tätigkeit von

Makrophagen (Abbau und Transport). Es kann somit bei Detektion der primär markierten Zellen zu falsch positiven Signalen kommen (Vandeputte et al., 2011).

Zusammenfassend erscheint, wenn auch methodisch sehr aufwendig, die Etablierung einer robusten, transgenen MSC-Linie, als die bestmögliche Option zur Umgehung der experimentellen Limitationen. Durch Expression eines autofluoreszierenden Proteins ist eine schnelle und einfache Detektion der Zellen ex-vivo möglich. Die retrovirale Integration eines PET-Reporter Genes erlaubt ein Echtzeit Monitoring der transplantierten Zellen in-vivo mit Aussagen hinsichtlich Migration und Vitalität. Alternativ hierzu können mit den oben beschriebenen Einschränkungen einhergehend weitere Verfahren der direkten Zellmarkierung, beispielsweise mittels Farbstoffen aus der Gruppe der Cyanine, geprüft werden (Hue et al., 2013)

#### **5.3.4 prädifferentzierte MSC vs. native MSC**

Durch unsere Versuche ließ sich abschließend nicht klären, ob eine in-vitro Prädifferenzierung der hMSC als Benefit resultiert. Mackenzie et al. sowie Liechty et al. konnten mit ihren Versuchen an Schafen zeigen, dass native MSC sich in Abhängigkeit ihres Umgebungsmilieus differenzieren (Mackenzie and Flake, 2001, Liechty et al., 2000) und eine Prädifferenzierung somit nicht zwingend erforderlich erscheint. Rosca et al. hingegen sehen in der Exposition gegen 5´ Aza den Vorteil, dass sich hierdurch ein höherer Prozentsatz der transplantierten Zellen zur definierten myogenen Richtung differenziert und somit die unspezifische Differenzierungsrate geringer wird (Rosca and Burlacu, 2011). Weil diese Rate jedoch nur unwesentlich ist, gilt es bei zukünftigen Versuchen kritisch zu überprüfen, ob eine myogene Prädifferenzierung überhaupt anzustreben ist (Drost et al., 2009).

Das Studienkonzept sah vor mittels vergleichender rt-PCR Analysen myogener Marker eine Aussage über die im Empfängerstroma stattfindende Myogenese der MSCs treffen zu können. Bei meinen durchgeführten molekulargenetischen

Untersuchungen war wegen des fehlenden Nachweises humaner Sequenzen jedoch keine Bestimmung weiterer myogener Marker möglich.

### **5.3.5 Der Einfluss einer Immunsuppression auf die Eigenschaften von MSCs**

Wegen des xenogenen Tiermodelles trafen wir die Entscheidung zu einer supportiven Immunsuppression, obwohl diese ihrerseits als unerwünschter Nebeneffekt zu einer Beeinflussung der transplantierten MSC führen kann. Buron et al. weisen in ihrer Arbeit auf eine antagonistischen Wirkung der Calcineurin-Inhibitoren bezüglich der immunmodulatorischen Eigenschaften von MSCs hin. Eggenhofer et al. konnten nachweisen, dass durch Ciclosporin A die Interferon- $\gamma$  Produktion weitestgehend aufgehoben wurde (Buron et al., 2009) (Eggenhofer et al., 2011). Seit längerem ist außerdem eine Beteiligung von Calcineurin an der myogenen Differenzierung, speziell bei der Ausbildung des glatt muskulären Myosins, bekannt (Delling et al., 2000). In-vitro Kulturen glattmuskulärer Zellen mit einer Exposition gegenüber Ciclosporin A zeigten kongruent hierzu eine Induktion derer Dedifferenzierung bei gleichzeitiger Hemmung der vorbestehenden glattmuskulären Differenzierung (Larrieu et al., 2005). Abschließend lässt sich festhalten, dass vor der Durchführung weitere Arbeiten erneut kritisch zu prüfen gilt, welche Art der Immunsuppression zu wählen ist und ob nicht gegebenenfalls eine Umstellung des Medikamentes anzustreben ist. Problematisch gestalten sich hierbei die Umstände einer komplexen Interaktion zwischen MSC und gängigen Immunsuppressiva, die sich in-vitro bereits bei therapeutischen Konzentrationen einstellen (Hoogduijn et al., 2008). Eine geeignete Alternative zu Ciclosporin A scheint Tacrolimus, ebenfalls aus der Gruppe der Calcineurininhibitoren, zu sein, welches sich zudem durch eine größere therapeutische Breite auszeichnet. Poncelet et al. konnten nach Durchführung von Inhibitionsversuchen porciner MSC durch verschiedene Immunsuppressiva aufzeigen, dass Tacrolimus als Einzelsubstanz keine negativen Auswirkungen auf die Proliferationseigenschaften der MSC zeigt.

Hoogduijn et al. weisen sogar auf ein gesteigertes immunsuppressive Potential von MSC nach Tacrolimusgabe hin (Poncelet et al., 2008, Hoogduijn et al., 2008).

### **5.3.6 Immunprivileg von MSC**

Allein schon wegen ihrer suppressiver Wirkung auf nahezu alle Komponenten der zellulären Immunantwort und der natürlichen Killerzellen kommt den MSCs sicherlich eine privilegierte Stellung hinsichtlich deren Immunogenität zu (Sotiropoulou et al., 2006, Uccelli et al., 2008). Ergebnisse wie das von Henriksson et al. beschriebene Überleben xenogen transplantierte MSCs ohne jegliche medikamentöse Immunsuppression über sechs Monate im Schweinmodell sind kritisch zu beurteilen (Henriksson et al., 2009). Die Zellen wurden bei dieser Versuchsanordnung in die Zwischenwirbelscheiben (Bandscheiben) der Tiere eingespritzt, ein Bereich, der fast ausschließlich durch Diffusion ernährt wird und keine Versorgung durch Blutgefäße besitzt. Sie unterlagen somit keiner direkten Präsentation des Immunsystems.

Treffender erscheint die mittlerweile gängige Bezeichnung der MSCs als hypoimmun, weil sie bei einem immunkompetenten Organismus eine Abstoßungsreaktion auslösen können (Nauta et al., 2006, Isakova et al., 2014). Poncelet et al. verweisen ihrerseits auf eine Diskrepanz zwischen in-vitro Beobachtungen und dem tatsächlichen in-vivo auftretenden Verhalten. In einem allogenen Versuchsaufbau porciner MSCs, zeigten sich in-vitro keine immunologischen Reaktionen, wohingegen nach Transplantation der Zellen ohne nachfolgende medikamentöse Immunsuppression eine Aktivierung des porcinen Immunsystems zu beobachten war (Poncelet et al., 2007). Bei weiteren xenogenen Modellorganismen sollte deshalb eine Immunsuppression erfolgen, um einen erfolgreichen Verlauf der Arbeiten zu erzielen.

### 5.3.7 Pluripotente Stammzellen vs. MSC

Spätestens mit der Nobelpreisverleihung für Medizin und Physiologie im Jahre 2012 an Sir John Gurdon und Shinya Yamanaka rückten sogenannte induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs) auch in den Fokus der Öffentlichkeit. Hierbei werden bei adulten ausdifferenzierten Zellen durch genetische Modifikation die Expression einiger Transkriptionsfaktoren aktiviert. Somit weisen sie nach Kultivierung unter embryonalen Umgebungsbedingungen pluripotente Eigenschaften auf (Takahashi and Yamanaka, 2006). Besonders für die medizinische Forschung sind iPSCs von großem Interesse, da sie im Vergleich zu embryonalen Stammzellen ethisch unbedenklich sind und dennoch ein Differenzierungspotential ähnlich dem von embryonalen Zellen aufweisen. In Gestalt dermalen Fibroblasten, die mittels retroviraler Transduktion zu iPSC induziert werden, steht eine einfach zugängliche Zellquelle zur Verfügung, die mit nur geringem operativen Risiko verbunden ist (Meissner et al., 2007). Zudem wurden bereits im Jahre 2007 erste erfolgreiche Versuche beschrieben, bei denen iPSC aus humanen Fibroblasten generiert werden konnten (Park et al., 2008) (Takahashi et al., 2007). Trotz dieser Euphorie muss bedacht werden, dass die Forschung mit iPSCs noch jung ist und somit keine Langzeitbeobachtungen vorliegen. Für das Verständnis der Pluripotenz zugrundeliegender molekularer Mechanismen sind die iPSCs sicherlich geeignet; für eine klinische Anwendung ist es jedoch noch zu früh (Baumann, 2010). Schließlich können diese transfizierten Zellen onkogene Eigenschaften aufweisen und sind für klinischen Einsatz somit als äußerst bedenklich einzustufen: es können zufällige Mutationen mit entsprechenden genetischen Aberrationen bei den Empfängerzellen auftreten. Auch ist die Effizienz der iPSCs Generierung nur gering. Somit ist der therapeutische Einsatz viral transfizierter Zellen als kritisch zu bewerten. (Heffernan et al., 2011). Diese Aspekte sprechen jedoch nur gegen eine klinische Anwendung von iPSCs, nicht gegen ein präklinisches Setting. Es gilt zukünftig nach Abschluss weiterer Grundlagenforschungen und vorliegenden ersten Langzeitergebnissen MSCs sowie iPSCs hinsichtlich ihrer in-vivo

Differenzierungseigenschaften zu beurteilen. Dies mag Anlass für weitere vergleichende Studien sein.

## **5.4 Methodik**

### **5.4.1 Fähigkeiten des Operateurs sowie Applikationstechnik**

Die durchgeführten Operationen sind maßgeblich von den Fähigkeiten des Operateurs abhängig. Sie erfolgten regelmäßig ohne technische Hilfsmittel. Es gibt bislang keine (kommerziell verfügbare) technische Lösung, die eine Perforation der Urethra und damit verbunden eine Injektion der MSC in den paraurethralen Raum verhindern kann. Auch ist es mit dem beschriebenen Versuchsaufbau nicht möglich, die Zellen in eine zuvor definierte Tiefe gezielt in den Schließmuskel zu injizieren. Die Abschätzung der Injektionstiefe kann bisher lediglich anhand der Kanülenlänge getroffen werden. Recht einfach umsetzbar und in der klinischen Anwendung weit verbreitet ist die Möglichkeit der sonographisch gesteuerten Zellapplikation, deren Umsetzung somit für weitere Versuchsvorhaben zu evaluieren ist. Des Weiteren gilt es zu prüfen, inwiefern es zu einer Beeinträchtigung der MSC durch die gewählte Injektionstechnik mittels Kanüle kommt und ob die injizierte Zellzahl je Depot richtig gewählt wurde. In Anlehnung an die Daten von Mittenberger et al. gehen wir davon aus, dass es bei der von uns gewählten Zellzahl je Depot zu keinem Zelluntergang gekommen ist und alle transplantierten Zellen durch Diffusion mit Nährstoffen und Sauerstoff suffizient versorgt wurden (Mittenberger et al., 2008b).

### **5.4.2 Orale Immunsuppression vs. i.v. Gabe**

Kontrovers gilt es sicherlich die von uns gewählte Form der oralen Immunsuppression zu diskutieren, welche keinen konstanten Plasmaspiegel des CsA ermöglichte und unseren Erachtens im Zusammenhang mit der geringen therapeutischen Breite von Ciclosporin A eine kritische Kombination bildet (Schiff et al., 2007). Der Erfolg einer oralen medikamentösen Therapie hängt in großem Maße von der Compliance des Patienten und einer vollständigen Einnahme der verordneten Dosis ab. Ob sich dies bei Versuchstieren praktisch umsetzen lässt, erscheint jedoch nach unseren Beobachtungen fraglich. Die zunächst



angewandte Medikamentenverabreichung über den Gemeinschaftstrog der Versuchstiere erlaubte keine zufriedenstellende Medikamentengabe seitens der Individuen. Selbst bei der anschließenden gezielten Zufütterung der in Marshmallows verpackten Tabletten, konnte nicht mit Sicherheit von einer kompletten Medikamenteneinnahme ausgegangen werden. Es sollte somit überprüft werden, ob nicht die intravenöse (i.v.) Applikation des Medikamentes von Vorteil wäre, ließen sich hierbei nämlich exakte Dosierungen verabreichen. Neben den Problemen der Medikamentengabe gilt es zudem, die individuelle Metabolisierung des Ciclosporin A zu beachten. Diese erfolgt hauptsächlich über Cytochrom P3A4 (CYP3A4) und Cytochrom P3A5 (CYP3A5), welche hinsichtlich ihrer Expression und Aktivität einer großen individuellen Variabilität unterliegen (Lamba et al., 2002). Aufgrund der sich hieraus ergebender individuellen Pharmakokinetik kann es, unabhängig von der Compliance, ebenfalls zu schwankenden Plasmaspiegeln kommen. Auch hier böte eine i. v. Gabe durchaus Vorteile, so könnte beispielsweise bei einem erniedrigten Plasmaspiegel zeitnahe ein Bolus injiziert werden, der entsprechend präzise dosiert werden kann.

### **5.4.3 PCR**

#### **5.4.3.1 Verunreinigungen**

Verfahrenstechnisch bedingt unterlagen unsere durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen einer Vielzahl möglicher Verunreinigungen. Strikte Anwendung biologischer Desinfektionen mittels 70% Alkohollösung sowie der Einsatz spezieller DNA eliminierender Lösungen, konnte eine Kontamination mit humanen Zellen verhindern. Problematisch gestaltete sich jedoch die Deaktivierung ubiquitär vorkommender RNase. Obgleich bei sämtlichen Arbeitsschritten spezielle RNase freie Verbrauchsmaterialien eingesetzt wurden und das entnommene Gewebe ex vivo zeitnah einer ununterbrochenen Kühlkette zugeführt wurde, zeigt sich nach abgeschlossener RNA-Isolation bei einigen Proben in den photometrischen

Messungen mittels des NanoDrop- Messsystems nur ein geringer RNA-Gehalt. Das verwendete Kryofixierungsmedium Tissue-Tek<sup>®</sup> auf Basis wasserlöslicher Glykolen und Kunstharzen ist zwar restlos auswaschbar, inwiefern es jedoch die Filtermembranen des RNA-Isolationskits zusetzt, ließ sich abschließend nicht klären.

#### **5.4.3.2 Alternativen für mRNA basierte molekulargenetischer Untersuchungen**

Die molekulargenetischen Untersuchungen basierten auf aus Kryoschnitten isolierter mRNA. Diese waren für mindestens 6 Monate bei -80°C gelagert und wurden regelmäßig bei Anfertigung der Kryoschnitte auf ca. -20°C erwärmt. Zu beachten ist, dass RNA aufgrund ihrer Konfiguration als Einzelstrang weitaus anfälliger gegenüber physikalischen Stress und wesentlich instabiler als die doppelsträngig konfigurierte DNA ist. Zudem wird mRNA nur in vitalen, stoffwechselaktiven Zellen exprimiert, ein Nachweis apoptotischer Zellen kann hierüber nicht geführt werden. Für weitere Untersuchungen ist es somit sinnvoll bei fehlenden Nachweis humaner mRNA weitere DNA basierte molekulargenetische Untersuchungen anzuschließen. *Yang et al.* beschrieben beispielsweise ein technisch einfach anzuwendendes Verfahren, welches auf mitochondrialer DNA (mtDNA) basierend eine Differenzierung zwischen humaner und porciner mtDNA ermöglicht (Yang et al., 2014). In der forensischen Kriminaltechnik etablierte, auf sogenannten Short Tandem Repeats (DNA-STR) basierende Verfahren, sind technisch aufwendiger, erlauben es aber phylogenetisch sehr eng verwandte Spezies eindeutig zu klassifizieren und differenzieren (Butler, 2006).

#### 5.4.4 Immunologische Prozesse im Bereich der transplantierten hMSC

Bei allen hMSC transplantierten Tieren zeigten sich nach vier bzw. acht Wochen CD45 positive Zellen in der Urethra, wohingegen bei den scheinoperierten Tieren keine Zellinfiltrationen zu sehen waren. CD45 gilt als allgemeines Leukozytenantigen und wird von nahezu allen lymphoidalen Zellen, wie B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert, MSC exprimieren per definitionem kein CD45 (Dahlke et al., 2004) (Penninger et al., 2001, Dominici et al., 2006). Polesskaya et al. sowie Seale et al. berichteten zudem von CD45 positiven Muskelstammzellen, die sich im Rahmen einer Regeneration im Muskelgewebe finden (Polesskaya et al., 2003) (Seale et al., 2004).

Obwohl Gunetti et al. von einem Überleben transplantiertes hMSC über acht Wochen im xenogenen Nagermodell ohne korrespondierende Immunsuppression berichten, gibt es – wie im Abschnitt 5.3.6 ausführlich dargelegt – die Erkenntnis, dass MSC in-vitro zwar immunsuppressiv wirken, sich diese Wirkung aber nicht vollständig auf in-vivo Modelle übertragen lässt und es nach MSC Transplantation zu einer Abstoßungsreaktion kommt (Gunetti et al., 2012). (Sudres et al., 2006). In Zusammenschau aller Ergebnisse der von uns durchgeführten Untersuchungen gehen somit auch wir davon aus, dass es sich bei dem CD45 positiven Zellinfiltrat am ehesten um einen immunologischen Prozess handelt. Hierfür seien aufgeführt:

- Die Ciclosporin A- Plasmaspiegel schwankten stark; es ließ sich kein „steady state“ im therapeutischen Bereich einstellen
- bei über 50% der Messungen lagen die Plasmawerte unterhalb der angestrebten minimalen Erhaltungsdosis von 100ng/ml (vgl. 4.1.1).
- rein histomorphologisch sind die beobachteten follikelartigen Strukturen (deren Maximum sich im Bereich der injizierten hMSC befindet) ebenfalls vereinbar mit einem entzündlichen Prozess. Zentral gelegen werden PKH26 positive Zellkondensationen angetroffen, welche von einem CD45

positiven Wall gesäumt werden und als am ehesten als Detritus anzusehen sind (vgl. 4.3).

- anhand der immunfluoreszenzhistologischen Untersuchungen gelang es nicht, mittels eines geeigneten hochspezifischen Antikörpers gegen humane Zellkerne, diese im Bereich des Harnblasenschließmuskels nachzuweisen (vgl. 3.6.6). (Henriksson et al., 2009).
- in den molekulargenetischen Untersuchungen zeigte sich kein Anhalt für das Vorhandensein humaner GAPDH (vgl. 3.7.6)

Um eine Abklärung hinsichtlich der Genese dieser CD45 positiven Reaktionen zu ermöglichen, regen wir an, bei weiteren Versuchen die drainierenden Lymphknoten zu entnehmen und diese histologisch aufzuarbeiten. Im Rahmen immunologischer Prozesse kommt es regelmäßig zu lokalen Immunreaktionen in den korrespondierenden Lymphknoten. Es ließe sich zudem klären, ob wie von Olasz et al. beschrieben die MSC entlang des lymphatischen Systems migrieren (Olasz et al., 2002).

Die oben beschriebenen reaktiven Veränderungen können jedoch nicht nur im Sinne einer Abstoßungsreaktion gesehen werden. Beispielsweise kommt es auch bei einer Regeneration zu immunologischen Prozessen im Sinne von Abräumvorgängen. Initial entsteht, vermittelt über M1-Makrophagen, eine proinflammatorische Reaktion, der sich im weiteren Verlauf eine Phase des Remodeling und der Immunregulation anschließt. Dieser Prozess wird über die anti-inflammatorischen Eigenschaften von M2-Makrophagen reguliert und führt im Verlauf zu einer Toleranz des Fremdgewebes (Brunelli and Rovere-Querini, 2008). Wie unlängst in einigen Studien nachgewiesen, gibt es zudem Ansätze einer zytokinvermittelten Interaktion zwischen Makrophagen und MSCs. So beschreiben beispielsweise Freytes et al. eine wachstumsfördernde Wirkung der M2-Makrophagen auf MSCs, wohingegen M1-Makrophagen deren Proliferation inhibieren (Freytes et al., 2013). Für die therapeutische Anwendung von MSC erscheint somit die Schaffung eines antiinflammatorischen Milieus vorteilhaft, welches, wie von Cho et al. gezeigt, über die Induktion von Makrophagen zum M2-Typ von den MSCs selbst generiert werden kann (Cho et al., 2014).

Für nachfolgenden Arbeiten bedeutet dies konkret, dass anhand der unterschiedlichen Polarisation der Makrophagen mittels spezifischer Antikörper in histologischen Schnitten sich eine Differenzierung dieser immunologischen Reaktion durchführen lässt und festgestellt werden kann, ob es sich tatsächlich um eine Host vs. Graft-Reaktion handelt oder ob nicht eine physiologische Immunreaktion zugrunde liegt, die wachstumsfördernd auf die MSC wirkt (Gordon and Taylor, 2005, Weiss et al., 2013).

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

---

Bei den durchgeführten Arbeiten handelt es sich um eine Machbarkeitsstudie, anhand derer die prinzipielle Eignung humaner mesenchymaler Stammzellen (MSC) zur Entwicklung einer stammzellbasierten Therapie der Harninkontinenz aufgezeigt werden sollte. Untersucht wurde das in vivo Verhalten nativer, sowie myogen prädifferenzierter MSC im xenogenen Großtiermodell. Als Modellorganismus dienten insgesamt sechs Göttinger Minipigs, welche über einen Zeitraum von vier bzw. acht Wochen nach Zelltransplantation beobachtet wurden. Die Transplantation der Zellen erfolgte mittels konventionellen medizintechnischen Hilfsmittel, um einen möglichst lückenlosen Transfer der gewonnenen Erkenntnisse in später klinische Erprobungen einfließen zu lassen. Nach Injektion der xenogenen, humanen- MSCs wurden die Tiere einer oralen Immunsuppression mittels des Calcineurininhibitors Ciclosporin A (CsA) zugeführt. Durch regelmäßige Untersuchungen des peripheren Blutes erfolgte ein Monitoring sowohl der Entzündungszeichen als auch des CsA-Plasmaspiegels. Bei keinem der Tiere trat im Verlauf der iatrogen induzierten Immunsuppression eine infektiöse Komplikation auf, die CsA-Dosen wurden von den Tieren problemlos vertragen. Die laborchemisch bestimmten CsA-Plasmaspiegel wiesen kein stabiles Niveau auf und waren großen individuellen Schwankungen unterworfen; zu den meisten Untersuchungszeitpunkten noch im therapeutischen Bereich.

In den ex-vivo Untersuchungen konnten anhand des Fluoreszenzfarbstoffes PKH26 eine anatomisch korrekte Applikation der transplantierten Zellen nachgewiesen werden. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie sowie rt-PCR war es nicht möglich, an den gegebenen Untersuchungszeitpunkten Zellen humanen Ursprungs zu detektieren, stattdessen zeigten sich immunfluoreszenzmikroskopisch bei den zelltransplantierten Tieren eine CD45 positive Reaktion im Bereich der gesamten Urethra, was für eine lokale Immunreaktion des jeweiligen Empfängertieres spricht.

Es konnte die prinzipielle Eignung des Modellorganismus Minipig zur Etablierung einer stammzellbasierten Therapie der Harninkontinenz aufgezeigt werden. Die

Zellen lassen sich mit konventionellen Instrumenten zielgenau applizieren, es kommt postoperativ zu keiner Verlegung der harnableitenden Wege oder weiteren klinischen Komplikationen. Letztlich gilt es noch das Regime der Immunsuppression zu modifizieren, stabile CsA-Plasmaspiegel zu erreichen und somit fragliche Transplantatabstoßungen zu unterdrücken.

## 7 ANHANG

### 7.1 Blutwerte der Schweine in tabellarischer Übersicht

#### Schwein 77539

Tag	Erythrozyten	Leukozyten	Lymphozyten	Kreatinin	y-GT	CsA
Ref.	5.8-8.1 T/l	10-22 G/l	49-85%	< 2,5 mg/dl	< 40U/l	Ng/ml
OP-Tag	hämolytisch	hämolytisch	hämolytisch	hämolytisch	16	<20
5	6,6	8,1	20,00%	0,8	116	122
12	6,36	8,6	42,00%	0,5	702	44,7
19	6,48	7,8	33	0,8	72	50,5
26	6,85	7,8	41	0,8	82	131

*Tabelle 7-1 Übersicht ausgewählter Laborwerte des scheinoperierten Versuchstieres 77539 innerhalb der 4 Wochen Standzeit. Die Bestimmungen erfolgten im Zentrallabor des UKT.*

#### Schwein 77629 (Zellimplantation 13.08.2008, Gewebeentnahme 10.09.2008)

Tag	Erythrozyten	Leukozyten	Lymphozyten	Kreatinin	y-GT	CsA
Ref.	5.8-8.1 T/l	10-22 G/l	49-85%	< 2,5 mg/dl	< 40U/l	Ng/ml
OP-Tag	hämolytisch	hämolytisch	27,00%	hämolytisch	63	30200
5	8,09	12,01	48,00%	0,8	90	167
12	8	12,5	42,00%	0,6	436	35,2
19	7,07	10,1	66	0,8	273	131
26	8,42	11,8	17	1,1	57	97,5

*Tabelle 7-2 Übersicht ausgewählter Laborwerte des zelltransplantierten Versuchstieres 77629 innerhalb der 4 Wochen Standzeit. Die Bestimmungen erfolgten im Zentrallabor des UKT.*



**Schwein 103963**

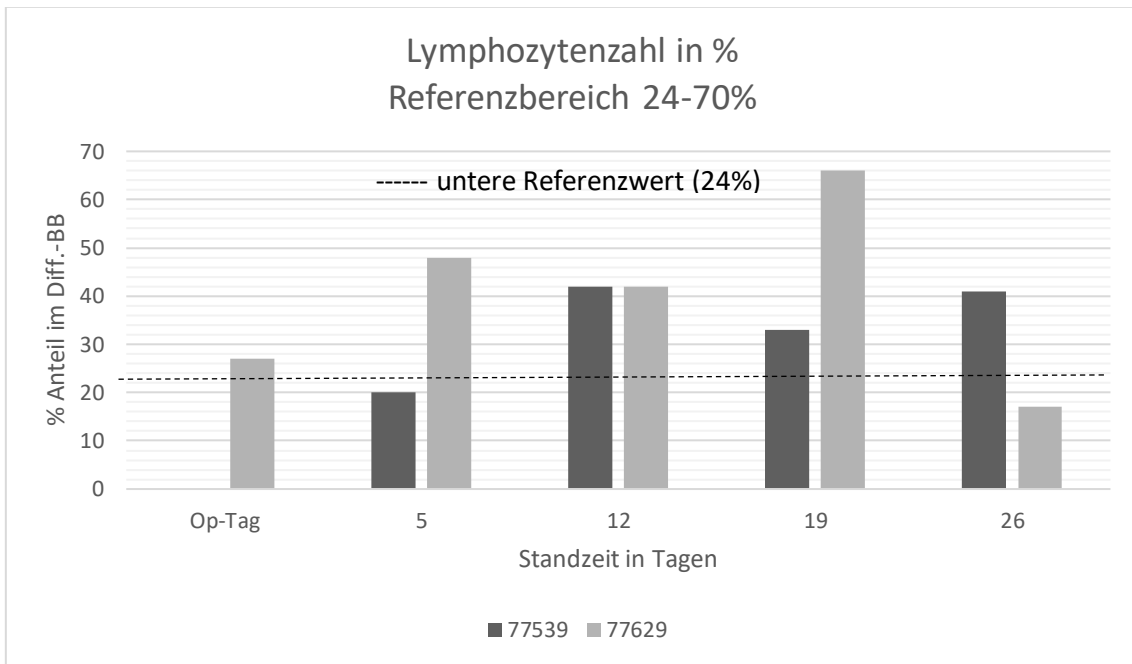
Tag	Ery	Leuko	Krea	y-GT	CsA
Ref.	4,2-6,2 Mio/ $\mu$ l	4000-9500 1/ $\mu$ l	0-1,0 mg/dl	< 40U/l	ng/ml
OP-Tag	4,93	7300	0,9	98	12897
5	6,25	9710	1,1	67	89
12	5,74	6720	1	55	131
19	6,76	7100	1,1	65	98
26	7,1	5990	1	88	93
33	6,79	6440	1	80	45
40	6,54	8310	1,3	75	56
42	-	-	-	-	139
47	6,86	5510	1,2	62	66
49	-	-	-	-	59
54	6,07	5740	1,2	83	129

*Tabelle 7-3 Übersicht ausgewählter Laborwerte des scheinoperierten Versuchstieres 103963 innerhalb der 8 Wochen Standzeit. Die Bestimmungen erfolgten im Zentrallabor des UKT.*

**Schwein 104125**

Tag	Erythrozyten	Leukozyten	Kreatinin	y-GT	CsA
Ref.	4,2-6,2 Mio/ $\mu$ l	4000-9500 1/ $\mu$ l	0-1,0 mg/dl	< 40U/l	ng/ml
OP-Tag	5,4	8610	0,8	65	8406
5	6,87	10690	1	124	298
12	geronnen	geronnen	1	58	273
19	7,68	8040	1,2	66	143
26	7,56	9290	1,2	72	195
33	7,78	8710	1,1	101	76
40	8,13	11470	1,3	76	147
47	7,72	8360	1,3	106	128
54	7,56	9000	1,1	79	421

*Tabelle 7-4 Übersicht ausgewählter Laborwerte des scheinoperierten Versuchstieres 104125 innerhalb der 8 Wochen Standzeit. Die Bestimmungen erfolgten im Zentrallabor des UKT.*



*Diagramm 7-1 Darstellung des Verlaufes der Lymphozytenzahl im peripheren Blut bei den beiden Pilottieren über die gesamte Standzeit von 4 Wochen. Bei Versuchstier 77539 handelt es sich um ein scheinoperiertes Schwein, eine hMSC Transplantation erfolgte bei Versuchstier 77629. Die Lymphozytenzahl präsentiert sich unauffällig und bewegt sich im Rahmen des Referenzbereiches. Die EDTA-Probe von Schwein 77539 am Operationstag konnte nicht ausgewertet werden (von beauftragten Labor als hämolytisch beschrieben).*

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- ABOUSHWAREB, T. & ATALA, A. 2008. Stem cells in urology. *Nat Clin Pract Urol*, 5, 621-31.
- ABRAMS, P., CARDOZO, L., FALL, M., GRIFFITHS, D., ROSIER, P., ULMSTEN, U., VAN KERREBROECK, P., VICTOR, A. & WEIN, A. 2002. The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol Urodyn*, 21, 167-78.
- AGGARWAL, S. & PITTENGER, M. F. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105, 1815-22.
- ANJOS-AFONSO, F., SIAPATI, E. K. & BONNET, D. 2004. In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. *J Cell Sci*, 117, 5655-64.
- BAUMANN, K. 2010. Achieving pluripotency. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 677.
- BEDIR, S., KILCILER, M., OZGOK, Y., DEVECI, G. & ERDURAN, D. 2004. Long-term complication due to dextranomer based implant: granuloma causing urinary obstruction. *J Urol*, 172, 247-8.
- BELEMA-BEDADA, F., UCHIDA, S., MARTIRE, A., KOSTIN, S. & BRAUN, T. 2008. Efficient homing of multipotent adult mesenchymal stem cells depends on FROUNT-mediated clustering of CCR2. *Cell Stem Cell*, 2, 566-75.
- BENNINGHOFF, A. & DRENCKHAHN, D. 2008. *Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem*, München, Elsevier, Urban & Fischer.
- BEUTEL, M. E., HESSEL, A., SCHWARZ, R. & BRAHLER, E. 2005. [Prevalence of urinary incontinence in the German population]. *Urologe A*, 44, 232-8.
- BEYTH, S., BOROVSKY, Z., MEVORACH, D., LIEBERGALL, M., GAZIT, Z., ASLAN, H., GALUN, E. & RACHMILEWITZ, J. 2005. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*, 105, 2214-9.
- BHARADWAJ, S., LIU, G., SHI, Y., WU, R., YANG, B., HE, T., FAN, Y., LU, X., ZHOU, X., LIU, H., ATALA, A., ROHOZINSKI, J. & ZHANG, Y. 2013. Multi-Potential Differentiation of Human Urine-Derived Stem Cells: Potential for Therapeutic Applications in Urology. *Stem Cells*.
- BOCHEV, I., ELMADJIAN, G., KYURKCHIEV, D., TZVETANOV, L., ALTANKOVA, I., TIVCHEV, P. & KYURKCHIEV, S. 2008. Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro. *Cell Biol Int*, 32, 384-93.
- BRACK, A. S., CONBOY, M. J., ROY, S., LEE, M., KUO, C. J., KELLER, C. & RANDO, T. A. 2007. Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science*, 317, 807-10.
- BRIVANLOU, A. H., GAGE, F. H., JAENISCH, R., JESSELL, T., MELTON, D. & ROSSANT, J. 2003. Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells. *Science*, 300, 913-6.
- BRUNELLI, S. & ROVERE-QUERINI, P. 2008. The immune system and the repair of skeletal muscle. *Pharmacol Res*, 58, 117-21.
- BURDZINSKA, A., CRAYTON, R., DYBOWSKI, B., KOPERSKI, L., IDZIAK, M., FABISIAK, M., PACZEK, L. & RADZISZEWSKI, P. 2012. Urethral distension as a novel method to simulate sphincter insufficiency in the porcine animal model. *Int J Urol*, 19, 676-82.
- BURON, F., PERRIN, H., MALCUS, C., HEQUET, O., THAUNAT, O., KHOLOPP-SARDA, M. N., MOULIN, F. T. & MORELON, E. 2009. Human mesenchymal stem cells and immunosuppressive drug interactions in allogeneic responses: an in vitro study using human cells. *Transplant Proc*, 41, 3347-52.

- BUTLER, J. M. 2006. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *J Forensic Sci*, 51, 253-65.
- CAPLAN, A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9, 641-50.
- CARR, L. K., ROBERT, M., KULTGEN, P. L., HERSCHORN, S., BIRCH, C., MURPHY, M. & CHANCELLOR, M. B. 2013. Autologous muscle derived cell therapy for stress urinary incontinence: a prospective, dose ranging study. *J Urol*, 189, 595-601.
- CHANCELLOR, M. B., YOKOYAMA, T., TIRNEY, S., MATTES, C. E., OZAWA, H., YOSHIMURA, N., DE GROAT, W. C. & HUARD, J. 2000. Preliminary results of myoblast injection into the urethra and bladder wall: a possible method for the treatment of stress urinary incontinence and impaired detrusor contractility. *Neurourol Urodyn*, 19, 279-87.
- CHEN, Y., SHAO, J. Z., XIANG, L. X., DONG, X. J. & ZHANG, G. R. 2008. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 815-20.
- CHO, D. I., KIM, M. R., JEONG, H. Y., JEONG, H. C., JEONG, M. H., YOON, S. H., KIM, Y. S. & AHN, Y. 2014. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Exp Mol Med*, 46, e70.
- CHUANG, M., ORVIETO, M., LAVEN, B., GERBER, G., WARDRIP, C., RITCH, C. & SHALHAV, A. 2005. Comparison of external catheters with subcutaneous vascular access ports for chronic vascular access in a porcine model. *Contemp Top Lab Anim Sci*, 44, 24-7.
- COMITER, C. V. 2006. The male perineal sling--a viable alternative to the artificial urinary sphincter. *Nat Clin Pract Urol*, 3, 118-9.
- CONBOY, I. M., CONBOY, M. J., SMYTHE, G. M. & RANDO, T. A. 2003. Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science*, 302, 1575-7.
- CONBOY, I. M., CONBOY, M. J., WAGERS, A. J., GIRMA, E. R., WEISSMAN, I. L. & RANDO, T. A. 2005. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature*, 433, 760-4.
- CRISAN, M., YAP, S., CASTEILLA, L., CHEN, C. W., CORSELLI, M., PARK, T. S., ANDRIOLO, G., SUN, B., ZHENG, B., ZHANG, L., NOROTTE, C., TENG, P. N., TRAAS, J., SCHUGAR, R., DEASY, B. M., BADYLAK, S., BUHRING, H. J., GIACOBINO, J. P., LAZZARI, L., HUARD, J. & PEAULT, B. 2008. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, 3, 301-13.
- CSELENYAK, A., PANKOTAI, E., HORVATH, E. M., KISS, L. & LACZA, Z. 2010. Mesenchymal stem cells rescue cardiomyoblasts from cell death in an in vitro ischemia model via direct cell-to-cell connections. *BMC Cell Biol*, 11, 29.
- DA SILVA MEIRELLES, L., CAPLAN, A. I. & NARDI, N. B. 2008. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 26, 2287-99.
- DA SILVA MEIRELLES, L., CHAGASTELLES, P. C. & NARDI, N. B. 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*, 119, 2204-13.
- DAHLKE, M. H., LARSEN, S. R., RASKO, J. E. & SCHLITT, H. J. 2004. The biology of CD45 and its use as a therapeutic target. *Leuk Lymphoma*, 45, 229-36.
- DAVIS, N. F., KHERADMAND, F. & CREAGH, T. 2013. Injectable biomaterials for the treatment of stress urinary incontinence: their potential and pitfalls as urethral bulking agents. *Int Urogynecol J*, 24, 913-9.
- DAVIS, N. J., VAUGHAN, C. P., JOHNSON, T. M., 2ND, GOODE, P. S., BURGIO, K. L., REDDEN, D. T. & MARKLAND, A. D. 2012. Caffeine Intake and its Association with Urinary Incontinence in United States Men: Results from National Health and Nutrition Examination Surveys 2005-2006 and 2007-2008. *J Urol*.
- DE COPPI, P., BARTSCH, G., JR., SIDDIQUI, M. M., XU, T., SANTOS, C. C., PERIN, L., MOSTOSLAVSKY, G., SERRE, A. C., SNYDER, E. Y., YOO, J. J., FURTH, M. E., SOKER, S. &

- ATALA, A. 2007. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*, 25, 100-6.
- DE LA GARZA-RODEA, A. S., VAN DER VELDE-VAN DIJKE, I., BOERSMA, H., GONCALVES, M. A., VAN BEKKUM, D. W., DE VRIES, A. A. & KNAAN-SHANZER, S. 2012. Myogenic properties of human mesenchymal stem cells derived from three different sources. *Cell Transplant*, 21, 153-73.
- DE VOCHT, N., LIN, D., PRAET, J., HOORNAERT, C., REEKMANS, K., LE BLON, D., DAANS, J., PAUWELS, P., GOOSSENS, H., HENS, N., BERNEMAN, Z., VAN DER LINDEN, A. & PONSARTS, P. 2013. Quantitative and phenotypic analysis of mesenchymal stromal cell graft survival and recognition by microglia and astrocytes in mouse brain. *Immunobiology*, 218, 696-705.
- DELLING, U., TURECKOVA, J., LIM, H. W., DE WINDT, L. J., ROTWEIN, P. & MOLKENTIN, J. D. 2000. A calcineurin-NFATc3-dependent pathway regulates skeletal muscle differentiation and slow myosin heavy-chain expression. *Mol Cell Biol*, 20, 6600-11.
- DEVORE, E. E., TOWNSEND, M. K., RESNICK, N. M. & GRODSTEIN, F. 2012. The epidemiology of urinary incontinence in women with type 2 diabetes. *J Urol*, 188, 1816-21.
- DEZAWA, M., ISHIKAWA, H., ITOKAZU, Y., YOSHIHARA, T., HOSHINO, M., TAKEDA, S., IDE, C. & NABESHIMA, Y. 2005. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science*, 309, 314-7.
- DIKRANIAN, A. H., CHANG, J. H., RHEE, E. Y. & ABOSEIF, S. R. 2004. The male perineal sling: comparison of sling materials. *J Urol*, 172, 608-10.
- DIOKNO, A. C. 2006. Erosions of the artificial urinary sphincter: risk factors, outcomes and management. *Nat Clin Pract Urol*, 3, 580-1.
- DMOCHOWSKI, R. R. & APPELL, R. A. 2000. Injectable agents in the treatment of stress urinary incontinence in women: where are we now? *Urology*, 56, 32-40.
- DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D. & HORWITZ, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315-7.
- DROST, A. C., WENG, S., FEIL, G., SCHAFFER, J., BAUMANN, S., KANZ, L., SIEVERT, K. D., STENZL, A. & MOHLE, R. 2009. In vitro myogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells as a potential treatment for urethral sphincter muscle repair. *Ann N Y Acad Sci*, 1176, 135-43.
- EBERLI, D., ANDERSSON, K. E., YOO, J. J. & ATALA, A. 2009. A canine model of irreversible urethral sphincter insufficiency. *BJU Int*, 103, 248-53.
- EGGENHOFER, E., RENNER, P., SOEDER, Y., POPP, F. C., HOOGDUIJN, M. J., GEISLER, E. K., SCHLITT, H. J. & DAHLKE, M. H. 2011. Features of synergism between mesenchymal stem cells and immunosuppressive drugs in a murine heart transplantation model. *Transpl Immunol*, 25, 141-7.
- ELHAMI, E., GOERTZEN, A. L., XIANG, B., DENG, J., STILLWELL, C., MZENGEZA, S., ARORA, R. C., FREED, D. & TIAN, G. 2011. Viability and proliferation potential of adipose-derived stem cells following labeling with a positron-emitting radiotracer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 38, 1323-34.
- FOWLER, C. J., GRIFFITHS, D. & DE GROAT, W. C. 2008. The neural control of micturition. *Nat Rev Neurosci*, 9, 453-66.
- FREYTES, D. O., KANG, J. W., MARCOS-CAMPOS, I. & VUNJAK-NOVAKOVIC, G. 2013. Macrophages modulate the viability and growth of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*, 114, 220-9.

- FRIEDENSTEIN, A. J., CHAILAKHJAN, R. K. & LALYKINA, K. S. 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 3, 393-403.
- FRIEDENSTEIN, A. J., CHAILAKHYAN, R. K., LATSINIK, N. V., PANASYUK, A. F. & KEILISS-BOROK, I. V. 1974. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*, 17, 331-40.
- FRIEDENSTEIN, A. J., PETRAKOVA, K. V., KUROLESOVA, A. I. & FROLOVA, G. P. 1968. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6, 230-47.
- GERULLIS, H., EIMER, C., GEORGAS, E., HOMBURGER, M., EL-BAZ, A. G., WISHAHI, M., BOROS, M., ECKE, T. H. & OTTO, T. 2012. Muscle-derived cells for treatment of iatrogenic sphincter damage and urinary incontinence in men. *ScientificWorldJournal*, 2012, 898535.
- GLEASON, J. L., RICHTER, H. E., REDDEN, D. T., GOODE, P. S., BURGIO, K. L. & MARKLAND, A. D. 2013. Caffeine and urinary incontinence in US women. *Int Urogynecol J*, 24, 295-302.
- GORDON, S. & TAYLOR, P. R. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 5, 953-64.
- GUAN, Z., KIRULUTA, G., COOLSAET, B. & ELHILALI, M. 1994. Conscious minipig model for evaluating the lower urinary tract. *Neurourol Urodyn*, 13, 147-58.
- GUNETTI, M., TOMASI, S., GIAMMO, A., BOIDO, M., RUSTICHELLI, D., MARESCHI, K., ERRICHELLO, E., PAROLA, M., FERRERO, I., FAGIOLI, F., VERCELLI, A. & CARONE, R. 2012. Myogenic potential of whole bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and in vivo for usage in urinary incontinence. *PLoS One*, 7, e45538.
- GYHAGEN, M., BULLARBO, M., NIELSEN, T. & MILSOM, I. 2013. A comparison of the long-term consequences of vaginal delivery versus caesarean section on the prevalence, severity and bothersomeness of urinary incontinence subtypes: a national cohort study in primiparous women. *BJOG*.
- HANNESTAD, Y. S., RORTVEIT, G., DALTVET, A. K. & HUNSKAAR, S. 2003. Are smoking and other lifestyle factors associated with female urinary incontinence? The Norwegian EPINCONT Study. *BJOG*, 110, 247-54.
- HEFFERNAN, C., SUMER, H. & VERMA, P. J. 2011. Generation of clinically relevant "induced pluripotent stem" (iPS) cells. *J Stem Cells*, 6, 109-27.
- HEMMRICH, K., MEERSCH, M., VON HEIMBURG, D. & PALLUA, N. 2006. Applicability of the dyes CFSE, CM-Dil and PKH26 for tracking of human preadipocytes to evaluate adipose tissue engineering. *Cells Tissues Organs*, 184, 117-27.
- HENRIKSSON, H. B., SVANVIK, T., JONSSON, M., HAGMAN, M., HORN, M., LINDAHL, A. & BRISBY, H. 2009. Transplantation of human mesenchymal stems cells into intervertebral discs in a xenogeneic porcine model. *Spine (Phila Pa 1976)*, 34, 141-8.
- HOOGDUIJN, M. J., CROP, M. J., KOREVAAR, S. S., PEETERS, A. M., EIJKEN, M., MAAT, L. P., BALK, A. H., WEIMAR, W. & BAAN, C. C. 2008. Susceptibility of human mesenchymal stem cells to tacrolimus, mycophenolic acid, and rapamycin. *Transplantation*, 86, 1283-91.
- HORAN, P. K., MELNICOFF, M. J., JENSEN, B. D. & SLEZAK, S. E. 1990. Fluorescent cell labeling for in vivo and in vitro cell tracking. *Methods Cell Biol*, 33, 469-90.
- HORWITZ, E. M., LE BLANC, K., DOMINICI, M., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F. C., DEANS, R. J., KRAUSE, D. S. & KEATING, A. 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7, 393-5.

- HUE, J. J., LEE, H. J., JON, S., NAM, S. Y., YUN, Y. W., KIM, J. S. & LEE, B. J. 2013. Distribution and accumulation of Cy5.5-labeled thermally cross-linked superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the tissues of ICR mice. *J Vet Sci*, 14, 473-9.
- HUNSKAAR, S., LOSE, G., SYKES, D. & VOSS, S. 2004. The prevalence of urinary incontinence in women in four European countries. *BJU Int*, 93, 324-30.
- ISAKOVA, I. A., LANGLIOS, C., BRUHN, J., KURODA, M. J., BAKER, K. C., KRISHNAPPA, V. & PHINNEY, D. G. 2014. Allo-reactivity of mesenchymal stem cells in rhesus macaques is dose and haplotype dependent and limits durable cell engraftment in vivo. *PLoS One*, 9, e87238.
- IZADPANAH, R., TRYGG, C., PATEL, B., KRIEDT, C., DUFOUR, J., GIMBLE, J. M. & BUNNELL, B. A. 2006. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem*, 99, 1285-97.
- JHA, P., GOLOVKO, D., BAINS, S., HOSTETTER, D., MEIER, R., WENDLAND, M. F. & DALDRUP-LINK, H. E. 2010. Monitoring of natural killer cell immunotherapy using noninvasive imaging modalities. *Cancer Res*, 70, 6109-13.
- JIANG, Y., JAHAGIRDAR, B. N., REINHARDT, R. L., SCHWARTZ, R. E., KEENE, C. D., ORTIZ-GONZALEZ, X. R., REYES, M., LENVIK, T., LUND, T., BLACKSTAD, M., DU, J., ALDRICH, S., LISBERG, A., LOW, W. C., LARGAESPADA, D. A. & VERFAILLIE, C. M. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418, 41-9.
- JIN, H. J., BAE, Y. K., KIM, M., KWON, S. J., JEON, H. B., CHOI, S. J., KIM, S. W., YANG, Y. S., OH, W. & CHANG, J. W. 2013. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *Int J Mol Sci*, 14, 17986-8001.
- JOLLER, D., MUSHKOLAJ, S., RATIA-GARCIA, J., MARTI, F., BACHMANN, A. & MULLER, B. 2012. Minipig urethra: a suitable animal model in vitro. *Technol Health Care*, 20, 329-36.
- JONSSON FUNK, M., SIDDIQUI, N. Y., KAWASAKI, A. & WU, J. M. 2012. Long-term outcomes after stress urinary incontinence surgery. *Obstet Gynecol*, 120, 83-90.
- KASSIS, I., ZANGI, L., RIVKIN, R., LEVDANSKY, L., SAMUEL, S., MARX, G. & GORODETSKY, R. 2006. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant*, 37, 967-76.
- KERN, S., EICHLER, H., STOEVE, J., KLUTER, H. & BIEBACK, K. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 24, 1294-301.
- KHULLAR, V., SEXTON, C. C., THOMPSON, C. L., MILSOM, I., BITOUN, C. E. & COYNE, K. S. 2013. The relationship between BMI and urinary incontinence subgroups: Results from EpiLUTS. *Neurourol Urodyn*.
- KIM, S. O., NA, H. S., KWON, D., JOO, S. Y., KIM, H. S. & AHN, Y. 2011. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation enhances closing pressure and leak point pressure in a female urinary incontinence rat model. *Urol Int*, 86, 110-6.
- KIRCHER, M. F., GAMBHIR, S. S. & GRIMM, J. 2011. Noninvasive cell-tracking methods. *Nat Rev Clin Oncol*, 8, 677-88.
- KLOTZ, T., BRUGGENJURGEN, B., BURKART, M. & RESCH, A. 2007. The economic costs of overactive bladder in Germany. *Eur Urol*, 51, 1654-62; discussion 1662-3.
- KNOBLICH, J. A. 2008. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell*, 132, 583-97.
- KNOEPP, L. R., SEMINS, M. J., WRIGHT, E. J., STEELE, K., SHORE, A. D., CLARK, J. M., MAKARY, M. A., MATLAGA, B. R. & CHEN, C. C. 2013. Does Bariatric Surgery Affect Urinary Incontinence? *Urology*.
- KOIDE, Y., MORIKAWA, S., MABUCHI, Y., MUGURUMA, Y., HIRATSU, E., HASEGAWA, K., KOBAYASHI, M., ANDO, K., KINJO, K., OKANO, H. & MATSUZAKI, Y. 2007. Two distinct stem cell lineages in murine bone marrow. *Stem Cells*, 25, 1213-21.



- KONG, D. C., SHUTTLEWORTH, P., BAILEY, M. & GRIGG, A. 2012. CsA 2-h concentration correlates best with area under the concentration-time curve after allo-SCT compared with trough CsA. *Bone Marrow Transplant*, 47, 54-9.
- KRAMPERA, M., COSMI, L., ANGELI, R., PASINI, A., LIOTTA, F., ANDREINI, A., SANTARLASCI, V., MAZZINGHI, B., PIZZOLO, G., VINANTE, F., ROMAGNANI, P., MAGGI, E., ROMAGNANI, S. & ANNUNZIATO, F. 2006. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24, 386-98.
- KRAMPERA, M., GLENNIE, S., DYSON, J., SCOTT, D., LAYLOR, R., SIMPSON, E. & DAZZI, F. 2003. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, 101, 3722-9.
- KUJAWA, M. J., LENNON, D. P. & CAPLAN, A. I. 1989. Growth and differentiation of stage 24 limb mesenchyme cells in a serum-free chemically defined medium. *Exp Cell Res*, 183, 45-61.
- KWON, D., KIM, Y., PRUCHNIC, R., JANKOWSKI, R., USIENE, I., DE MIGUEL, F., HUARD, J. & CHANCELLOR, M. B. 2006. Periurethral cellular injection: comparison of muscle-derived progenitor cells and fibroblasts with regard to efficacy and tissue contractility in an animal model of stress urinary incontinence. *Urology*, 68, 449-54.
- LAHARIE, D., BOURREILLE, A., BRANCHE, J., ALLEZ, M., BOUHNIC, Y., FILIPPI, J., ZERBIB, F., SAVOYE, G., NACHURY, M., MOREAU, J., DELCHIER, J. C., COSNES, J., RICART, E., DEWIT, O., LOPEZ-SANROMAN, A., DUPAS, J. L., CARBONNEL, F., BOMMELAER, G., COFFIN, B., ROBLIN, X., VAN ASSCHE, G., ESTEVE, M., FARKKILA, M., GISBERT, J. P., MARTEAU, P., NAHON, S., DE VOS, M., FRANCHIMONT, D., MARY, J. Y., COLOMBEL, J. F., LEMANN, M. & GROUPE D'ETUDES THERAPEUTIQUES DES AFFECTIONS INFLAMMATOIRES, D. 2012. Ciclosporin versus infliximab in patients with severe ulcerative colitis refractory to intravenous steroids: a parallel, open-label randomised controlled trial. *Lancet*, 380, 1909-15.
- LALU, M. M., MCINTYRE, L., PUGLIESE, C., FERGUSON, D., WINSTON, B. W., MARSHALL, J. C., GRANTON, J., STEWART, D. J. & CANADIAN CRITICAL CARE TRIALS, G. 2012. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PLoS One*, 7, e47559.
- LAMBA, J. K., LIN, Y. S., SCHUETZ, E. G. & THUMMEL, K. E. 2002. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev*, 54, 1271-94.
- LARRIEU, D., THIEBAUD, P., DUPLAA, C., SIBON, I., THEZE, N. & LAMAZIERE, J. M. 2005. Activation of the Ca(2+)/calcineurin/NFAT2 pathway controls smooth muscle cell differentiation. *Exp Cell Res*, 310, 166-75.
- LASSAILLY, F., GRIESSINGER, E. & BONNET, D. 2010. "Microenvironmental contaminations" induced by fluorescent lipophilic dyes used for noninvasive in vitro and in vivo cell tracking. *Blood*, 115, 5347-54.
- LE BLANC, K., FRASSONI, F., BALL, L., LOCATELLI, F., ROELOFS, H., LEWIS, I., LANINO, E., SUNDBERG, B., BERNARDO, M. E., REMBERGER, M., DINI, G., EGELER, R. M., BACIGALUPO, A., FIBBE, W., RINGDEN, O., DEVELOPMENTAL COMMITTEE OF THE EUROPEAN GROUP FOR, B. & MARROW, T. 2008. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*, 371, 1579-86.
- LE BLANC, K. & MOUGIAKAKOS, D. 2012. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol*, 12, 383-96.
- LI, P., ZHANG, R., SUN, H., CHEN, L., LIU, F., YAO, C., DU, M. & JIANG, X. 2013. PKH26 can transfer to host cells in vitro and vivo. *Stem Cells Dev*, 22, 340-4.
- LIECHTY, K. W., MACKENZIE, T. C., SHAABAN, A. F., RADU, A., MOSELEY, A. M., DEANS, R., MARSHAK, D. R. & FLAKE, A. W. 2000. Human mesenchymal stem cells engraft and

- demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*, 6, 1282-6.
- LIN, G., WANG, G., BANIE, L., NING, H., SHINDEL, A. W., FANDEL, T. M., LUE, T. F. & LIN, C. S. 2010. Treatment of stress urinary incontinence with adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy*, 12, 88-95.
- LOMBARDO, C., DAMIANO, G., CASSATA, G., PALUMBO, V. D., CACCIABAUDO, F., SPINELLI, G., CALVAGNA, C., GIOVIALE, M. C., MAIONE, C. L. & LO MONTE, A. I. 2010. Surgical vascular access in the porcine model for long-term repeated blood sampling. *Acta Biomed*, 81, 101-3.
- MACKENZIE, T. C. & FLAKE, A. W. 2001. Human mesenchymal stem cells persist, demonstrate site-specific multipotential differentiation, and are present in sites of wound healing and tissue regeneration after transplantation into fetal sheep. *Blood Cells Mol Dis*, 27, 601-4.
- MASSEY, J. A., ANDERSON, R. S. & ABRAMS, P. 1987. Mechanisms of continence during raised intra-abdominal pressure. *Br J Urol*, 60, 529-31.
- MCGUIRE, E. J. 2006. Urethral bulking agents. *Nat Clin Pract Urol*, 3, 234-5.
- MEISSNER, A., WERNIG, M. & JAENISCH, R. 2007. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 25, 1177-81.
- MIN, J. Y., SULLIVAN, M. F., YANG, Y., ZHANG, J. P., CONVERSO, K. L., MORGAN, J. P. & XIAO, Y. F. 2002. Significant improvement of heart function by cotransplantation of human mesenchymal stem cells and fetal cardiomyocytes in postinfarcted pigs. *Ann Thorac Surg*, 74, 1568-75.
- MITTERBERGER, M., MARKSTEINER, R., MARGREITER, E., PINGGERA, G. M., COLLESELLI, D., FRAUSCHER, F., ULMER, H., FUSSENEGGER, M., BARTSCH, G. & STRASSER, H. 2007. Autologous myoblasts and fibroblasts for female stress incontinence: a 1-year follow-up in 123 patients. *BJU Int*, 100, 1081-5.
- MITTERBERGER, M., MARKSTEINER, R., MARGREITER, E., PINGGERA, G. M., FRAUSCHER, F., ULMER, H., FUSSENEGGER, M., BARTSCH, G. & STRASSER, H. 2008a. Myoblast and fibroblast therapy for post-prostatectomy urinary incontinence: 1-year followup of 63 patients. *J Urol*, 179, 226-31.
- MITTERBERGER, M., MARKSTEINER, R., SCHWAIGER, W., KLIMA, G., SCHWENTNER, C., MULLER, T., BARTSCH, G., RADMAYR, C., STRASSER, H. & OSWALD, J. 2008b. Can autologous myoblasts be used as a potential bulking agent? *BJU Int*, 102, 1731-6.
- MIYAHARA, Y., NAGAYA, N., KATAOKA, M., YANAGAWA, B., TANAKA, K., HAO, H., ISHINO, K., ISHIDA, H., SHIMIZU, T., KANGAWA, K., SANNO, S., OKANO, T., KITAMURA, S. & MORI, H. 2006. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*, 12, 459-65.
- MORONI, M., COOLBAUGH, T. V., MITCHELL, J. M., LOMBARDINI, E., MOCCIA, K. D., SHELTON, L. J., NAGY, V. & WHITNALL, M. H. 2011. Vascular access port implantation and serial blood sampling in a Gottingen minipig (*Sus scrofa domestica*) model of acute radiation injury. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 50, 65-72.
- NAUTA, A. J., WESTERHUIS, G., KRUISSELBRINK, A. B., LURVINK, E. G., WILLEMZE, R. & FIBBE, W. E. 2006. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood*, 108, 2114-20.
- NIEDERSTADT, C., GABER, E. & FÜSGEN, I. 2007. Themenheft 39 "Harninkontinenz". 392007.
- NOORT, W. A., OERLEMANS, M. I., ROZEMULLER, H., FEYEN, D., JAKSANI, S., STECHER, D., NAAIJKENS, B., MARTENS, A. C., BUHRING, H. J., DOEVENDANS, P. A. & SLUIJTER, J. P. 2012. Human versus porcine mesenchymal stromal cells: phenotype, differentiation

- potential, immunomodulation and cardiac improvement after transplantation. *J Cell Mol Med*, 16, 1827-39.
- NTZIACHRISTOS, V., RIPOLL, J., WANG, L. V. & WEISSLEDER, R. 2005. Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging. *Nat Biotechnol*, 23, 313-20.
- OLASZ, E. B., LANG, L., SEIDEL, J., GREEN, M. V., ECKELMAN, W. C. & KATZ, S. I. 2002. Fluorine-18 labeled mouse bone marrow-derived dendritic cells can be detected in vivo by high resolution projection imaging. *J Immunol Methods*, 260, 137-48.
- ONDER, G., CARPENTER, I., FINNE-SOVERI, H., GINDIN, J., FRIJTERS, D., HENRARD, J. C., NIKOLAUS, T., TOPINKOVA, E., TOSATO, M., LIPEROTI, R., LANDI, F. & BERNABEI, R. 2012. Assessment of nursing home residents in Europe: the Services and Health for Elderly in Long TERM care (SHELTER) study. *BMC Health Serv Res*, 12, 5.
- PANDIT, M., DELANCEY, J. O., ASHTON-MILLER, J. A., IYENGAR, J., BLAIVAS, M. & PERUCCHINI, D. 2000. Quantification of intramuscular nerves within the female striated urogenital sphincter muscle. *Obstet Gynecol*, 95, 797-800.
- PAPANICOLAOU, S., HUNSKAAR, S., LOSE, G. & SYKES, D. 2005. Assessment of bothersomeness and impact on quality of life of urinary incontinence in women in France, Germany, Spain and the UK. *BJU Int*, 96, 831-8.
- PARK, I. H., ZHAO, R., WEST, J. A., YABUUCHI, A., HUO, H., INCE, T. A., LEROU, P. H., LENSCH, M. W. & DALEY, G. Q. 2008. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451, 141-6.
- PATEL, G. S., JAIN, K., KUMAR, R., STRICKLAND, A. H., PELLEGRINI, L., SLAVOTINEK, J., EATON, M., MCLEAY, W., PRICE, T., LY, M., ULLAH, S., KOCZWARA, B., KICHENADASSE, G. & KARAPETIS, C. S. 2014. Comparison of peripherally inserted central venous catheters (PICC) versus subcutaneously implanted port-chamber catheters by complication and cost for patients receiving chemotherapy for non-haematological malignancies. *Support Care Cancer*, 22, 121-8.
- PENG, C. W., CHEN, J. J., CHANG, H. Y., DE GROAT, W. C. & CHENG, C. L. 2006. External urethral sphincter activity in a rat model of pudendal nerve injury. *Neurourol Urodyn*, 25, 388-96.
- PENNINGER, J. M., IRIE-SASAKI, J., SASAKI, T. & OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. 2001. CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nat Immunol*, 2, 389-96.
- PERUCCHINI, D., DELANCEY, J. O., ASHTON-MILLER, J. A., GALECKI, A. & SCHAER, G. N. 2002a. Age effects on urethral striated muscle. II. Anatomic location of muscle loss. *Am J Obstet Gynecol*, 186, 356-60.
- PERUCCHINI, D., DELANCEY, J. O., ASHTON-MILLER, J. A., PESCHERS, U. & KATARIA, T. 2002b. Age effects on urethral striated muscle. I. Changes in number and diameter of striated muscle fibers in the ventral urethra. *Am J Obstet Gynecol*, 186, 351-5.
- PITTENGER, M. F., MACKAY, A. M., BECK, S. C., JAISWAL, R. K., DOUGLAS, R., MOSCA, J. D., MOORMAN, M. A., SIMONETTI, D. W., CRAIG, S. & MARSHAK, D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-7.
- POLESSKAYA, A., SEALE, P. & RUDNICKI, M. A. 2003. Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell*, 113, 841-52.
- PONCELET, A. J., NIZET, Y., VERCRUYSSSE, J., HIEL, A. L., SALIEZ, A. & GIANELLO, P. 2008. Inhibition of humoral response to allogeneic porcine mesenchymal stem cell with 12 days of tacrolimus. *Transplantation*, 86, 1586-95.
- PONCELET, A. J., VERCRUYSSSE, J., SALIEZ, A. & GIANELLO, P. 2007. Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vitro, intracardiac injection elicits an immune response in vivo. *Transplantation*, 83, 783-90.

- RAPP, D. E. & KOBASHI, K. C. 2008. The evolution of midurethral slings. *Nat Clin Pract Urol*, 5, 194-201.
- RAZ, R., GENNESIN, Y., WASSER, J., STOLER, Z., ROSENFELD, S., ROTTENSTERICH, E. & STAMM, W. E. 2000. Recurrent urinary tract infections in postmenopausal women. *Clin Infect Dis*, 30, 152-6.
- REINDERS, M. E., DE FIJTER, J. W., ROELOFS, H., BAJEMA, I. M., DE VRIES, D. K., SCHAAPHERDER, A. F., CLAAS, F. H., VAN MIERT, P. P., ROELEN, D. L., VAN KOOTEN, C., FIBBE, W. E. & RABELINK, T. J. 2013. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of allograft rejection after renal transplantation: results of a phase I study. *Stem Cells Transl Med*, 2, 107-11.
- RINGE, J., KAPS, C., SCHMITT, B., BUSCHER, K., BARTEL, J., SMOLIAN, H., SCHULTZ, O., BURMESTER, G. R., HAUPL, T. & SITTINGER, M. 2002. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res*, 307, 321-7.
- ROGERS, R. G. 2008. Clinical practice. Urinary stress incontinence in women. *N Engl J Med*, 358, 1029-36.
- ROSCA, A. M. & BURLACU, A. 2011. Effect of 5-azacytidine: evidence for alteration of the multipotent ability of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 20, 1213-21.
- SACCO, E., PRAYER-GALETTI, T., PINTO, F., FRACALANZA, S., BETTO, G., PAGANO, F. & ARTIBANI, W. 2006. Urinary incontinence after radical prostatectomy: incidence by definition, risk factors and temporal trend in a large series with a long-term follow-up. *BJU Int*, 97, 1234-41.
- SAMLOWSKI, W. E., ROBERTSON, B. A., DRAPER, B. K., PRYSTAS, E. & MCGREGOR, J. R. 1991. Effects of supravital fluorochromes used to analyze the in vivo homing of murine lymphocytes on cellular function. *J Immunol Methods*, 144, 101-15.
- SASSOLI, C., PINI, A., CHELLINI, F., MAZZANTI, B., NISTRÌ, S., NOSI, D., SACCARDI, R., QUERCIOLO, F., ZECCHI-ORLANDINI, S. & FORMIGLI, L. 2012. Bone marrow mesenchymal stromal cells stimulate skeletal myoblast proliferation through the paracrine release of VEGF. *PLoS One*, 7, e37512.
- SCHIFF, J., COLE, E. & CANTAROVICH, M. 2007. Therapeutic monitoring of calcineurin inhibitors for the nephrologist. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2, 374-84.
- SCHMIDT, R. F., LANG, F. & HECKMANN, M. 2011. Physiologie des Menschen. *mit Pathophysiologie*. 31., überarbeitete und aktualisierte Auflage ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- SCHREML, S., BABILAS, P., FRUTH, S., ORSO, E., SCHMITZ, G., MUELLER, M. B., NERLICH, M. & PRANTL, L. 2009. Harvesting human adipose tissue-derived adult stem cells: resection versus liposuction. *Cytotherapy*, 11, 947-57.
- SEALE, P., ISHIBASHI, J., SCIME, A. & RUDNICKI, M. A. 2004. Pax7 is necessary and sufficient for the myogenic specification of CD45<sup>+</sup>:Sca1<sup>+</sup> stem cells from injured muscle. *PLoS Biol*, 2, E130.
- SOTIROPOULOU, P. A., PEREZ, S. A., GRITZAPIS, A. D., BAXEVANIS, C. N. & PAPAMICHAIL, M. 2006. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*, 24, 74-85.
- SPRADLING, A., DRUMMOND-BARBOSA, D. & KAI, T. 2001. Stem cells find their niche. *Nature*, 414, 98-104.
- STANFORD, J. L., FENG, Z., HAMILTON, A. S., GILLILAND, F. D., STEPHENSON, R. A., ELEY, J. W., ALBERTSEN, P. C., HARLAN, L. C. & POTOSKY, A. L. 2000. Urinary and sexual function after radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer: the Prostate Cancer Outcomes Study. *JAMA*, 283, 354-60.

- STRASSER, H., TIEFENTHALER, M., STEINLECHNER, M., BARTSCH, G. & KONWALINKA, G. 1999. Urinary incontinence in the elderly and age-dependent apoptosis of rhabdosphincter cells. *Lancet*, 354, 918-9.
- SUBAK, L. L., WHITCOMB, E., SHEN, H., SAXTON, J., VITTINGHOFF, E. & BROWN, J. S. 2005. Weight loss: a novel and effective treatment for urinary incontinence. *J Urol*, 174, 190-5.
- SUBAK, L. L., WING, R., WEST, D. S., FRANKLIN, F., VITTINGHOFF, E., CREASMAN, J. M., RICHTER, H. E., MYERS, D., BURGIO, K. L., GORIN, A. A., MACER, J., KUSEK, J. W., GRADY, D. & INVESTIGATORS, P. 2009. Weight loss to treat urinary incontinence in overweight and obese women. *N Engl J Med*, 360, 481-90.
- SUDRES, M., NOROL, F., TRENADO, A., GREGOIRE, S., CHARLOTTE, F., LEVACHER, B., LATAILLADE, J. J., BOURIN, P., HOLY, X., VERNANT, J. P., KLATZMANN, D. & COHEN, J. L. 2006. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J Immunol*, 176, 7761-7.
- SURANI, A. & TISCHLER, J. 2012. Stem cells: a sporadic super state. *Nature*, 487, 43-5.
- 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, 861-72.
- TAKAHASHI, K. & YAMANAKA, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-76.
- THAKER, H. & SHARMA, A. K. 2013. Regenerative medicine based applications to combat stress urinary incontinence. *World J Stem Cells*, 5, 112-123.
- THOM, D. H., HAAN, M. N. & VAN DEN EEDEN, S. K. 1997. Medically recognized urinary incontinence and risks of hospitalization, nursing home admission and mortality. *Age Ageing*, 26, 367-74.
- THUROFF, J. W., CASPER, F. & HEIDLER, H. 1987. Pelvic floor stress response: reflex contraction with pressure transmission to the urethra. *Urol Int*, 42, 185-9.
- TIAN, H., BHARADWAJ, S., LIU, Y., MA, P. X., ATALA, A. & ZHANG, Y. 2010. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into bladder cells: potential for urological tissue engineering. *Tissue Eng Part A*, 16, 1769-79.
- UCCELLI, A., MORETTA, L. & PISTOIA, V. 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 8, 726-36.
- UDE, C. C., SHAMSUL, B. S., NG, M. H., CHEN, H. C., NORHAMDAN, M. Y., AMINUDDIN, B. S. & RUSZYMAH, B. H. 2012. Bone marrow and adipose stem cells can be tracked with PKH26 until post staining passage 6 in in vitro and in vivo. *Tissue Cell*, 44, 156-63.
- VANDEPUTTE, C., THOMAS, D., DRESSELAERS, T., CRABBE, A., VERFAILLIE, C., BAEKELANDT, V., VAN LAERE, K. & HIMMELREICH, U. 2011. Characterization of the inflammatory response in a photothrombotic stroke model by MRI: implications for stem cell transplantation. *Mol Imaging Biol*, 13, 663-71.
- VISCO, A. G., BRUBAKER, L., RICHTER, H. E., NYGAARD, I., PARAISO, M. F., MENEFFEE, S. A., SCHAFFER, J., LOWDER, J., KHANDWALA, S., SIRLS, L., SPINO, C., NOLEN, T. L., WALLACE, D., MEIKLE, S. F. & PELVIC FLOOR DISORDERS, N. 2012. Anticholinergic therapy vs. onabotulinumtoxin for urgency urinary incontinence. *N Engl J Med*, 367, 1803-13.
- WAKITANI, S., SAITO, T. & CAPLAN, A. I. 1995. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*, 18, 1417-26.
- WANG, A. C., CHIH, S. Y. & CHEN, M. C. 2006. Comparison of electric stimulation and oxybutynin chloride in management of overactive bladder with special reference to urinary urgency: a randomized placebo-controlled trial. *Urology*, 68, 999-1004.
- WATANABE, T., MARUYAMA, S., YAMAMOTO, T., KAMO, I., YASUDA, K., SAKA, Y., OZAKI, T., YUZAWA, Y., MATSUO, S. & GOTOH, M. 2011. Increased urethral resistance by

- periurethral injection of low serum cultured adipose-derived mesenchymal stromal cells in rats. *Int J Urol*, 18, 659-66.
- WATT, F. M. & HOGAN, B. L. 2000. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*, 287, 1427-30.
- WEISS, M., BLAZEK, K., BYRNE, A. J., PEROCHEAU, D. P. & UDALOVA, I. A. 2013. IRF5 is a specific marker of inflammatory macrophages in vivo. *Mediators Inflamm*, 2013, 245804.
- WELSH, D. K. & KAY, S. A. 2005. Bioluminescence imaging in living organisms. *Curr Opin Biotechnol*, 16, 73-8.
- WILLIAMS, K. S., ASSASSA, R. P., GILLIES, C. L., ABRAMS, K. R., TURNER, D. A., SHAW, C., HASLAM, J., MAYNE, C., MCGROTHER, C. W. & LEICESTERSHIRE, M. R. C. I. S. T. 2006. A randomized controlled trial of the effectiveness of pelvic floor therapies for urodynamic stress and mixed incontinence. *BJU Int*, 98, 1043-50.
- WING, R. R., WEST, D. S., GRADY, D., CREASMAN, J. M., RICHTER, H. E., MYERS, D., BURGIO, K. L., FRANKLIN, F., GORIN, A. A., VITTINGHOFF, E., MACER, J., KUSEK, J. W., SUBAK, L. L., PROGRAM TO REDUCE INCONTINENCE BY, D. & EXERCISE, G. 2010. Effect of weight loss on urinary incontinence in overweight and obese women: results at 12 and 18 months. *J Urol*, 184, 1005-10.
- WOLFS, E., STRUYS, T., NOTELAERS, T., ROBERTS, S. J., SOHNI, A., BORMANS, G., VAN LAERE, K., LUYTEN, F. P., GHEYSSENS, O., LAMBRICHTS, I., VERFAILLIE, C. M. & DEROOSE, C. M. 2013. 18F-FDG labeling of mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells for PET imaging: effects on ultrastructure and differentiation capacity. *J Nucl Med*, 54, 447-54.
- XISHAN, Z., BAOXIN, H., XINNA, Z. & JUN, R. 2013. Comparison of the effects of human adipose and bone marrow mesenchymal stem cells on T lymphocytes. *Cell Biol Int*, 37, 11-8.
- YAMAMOTO, T., GOTOH, M., KATO, M., MAJIMA, T., TORIYAMA, K., KAMEI, Y., IWAGURO, H., MATSUKAWA, Y. & FUNAHASHI, Y. 2012. Periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells for the treatment of male stress urinary incontinence: Report of three initial cases. *Int J Urol*, 19, 652-9.
- YANG, L., TAN, Z., WANG, D., XUE, L., GUAN, M. X., HUANG, T. & LI, R. 2014. Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. *Sci Rep*, 4, 4089.
- YOKOYAMA, T., HUARD, J., PRUCHNIC, R., YOSHIMURA, N., QU, Z., CAO, B., DE GROAT, W. C., KUMON, H. & CHANCELLOR, M. B. 2001. Muscle-derived cell transplantation and differentiation into lower urinary tract smooth muscle. *Urology*, 57, 826-31.
- ZINI, L., LECOEUR, C., SWIEB, S., COMBRISSE, H., DELMAS, V., GHERARDI, R., ABBOU, C., CHOPIN, D. & YIOU, R. 2006. The striated urethral sphincter of the pig shows morphological and functional characteristics essential for the evaluation of treatments for sphincter insufficiency. *J Urol*, 176, 2729-35.
- ZUK, P. A., ZHU, M., ASHJIAN, P., DE UGARTE, D. A., HUANG, J. I., MIZUNO, H., ALFONSO, Z. C., FRASER, J. K., BENHAIM, P. & HEDRICK, M. H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13, 4279-95.

## 9 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

---

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Urologie der Eberhard Karls Universität zu Tübingen unter Betreuung von Univ.- Prof. Dr. med. Arnulf Stenzl durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. med. Markus Renninger.

Die Isolierung der humanen mesenchymalen Stammzellen erfolgte durch die Mitarbeiter des transfusionmedizinischen Institutes der Universitätsklinik Tübingen (einzelne Namensnennung anhand der Aktenlage nicht möglich).

Die nachfolgenden Zellkulturen, die Markierung mit PKH26 und die Induktion der myogenen Prädifferenzierung wurden durch die zuständigen medizintechnischen Assistenten des Labors für regenerative Urologie an der Universitätsklinik für Urologie Tübingen durchgeführt.

Sämtliche Eingriffe am Großtiermodell wurden von Dr. med. Renninger unter Assistenz des zuständigen Tierarztes (T.O. Greiner) und den Mitarbeitern des Labors für Regenerative Urologie der Universitätsklinik für Urologie Tübingen durchgeführt.

Die ex vivo Aufarbeitung und Untersuchungen der porcinen Harnröhren wurden nach Einarbeitung durch Mitarbeiter des Labors für Regenerative Urologie der Universitätsklinik für Urologie Tübingen eigenständig von mir durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig (nach Anleitung durch Dr. med. Markus Renninger) verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet habe. Jedwede fremde Unterstützung ist in der Dissertation angegeben. Alle Publikationen, die wörtlich oder sinngemäß zitiert worden sind, sind als solche kenntlich gemacht. Bei der durchgeführten experimentellen Laborarbeit habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis nach der Satzung der Eberhard Karls Universität Tübingen eingehalten.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Univ.- Professor Dr. Arnulf Stenzl, Ärztlicher Direktor der Klinik für Urologie am Universitätsklinikum in Tübingen, für die Bereitstellung des Themas meiner Doktorarbeit und der benötigten Ressourcen, danken.

Mein weiterer Dank gebührt meinem Betreuer Herr Dr.med. Markus Renninger für das Vertrauen und die Unterstützung meiner Dissertation sowie die jederzeitige Bereitschaft zur Hilfe bei auftretenden Fragen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Diplom Biologen J. Hennenlotter, der mir bei sämtlichen Fragen bereitwillig zur Seite stand.

Dem IZKF-Promotionskolleg der Medizinischen Fakultät danke ich für die großzügige Gewährung des Stipendiums, welches eine gewisse (finanzielle) Unabhängigkeit darstellte und mich meine Ideen in die Tat umsetzen ließ.

Der größte Dank gebührt letzten Endes meiner Familie für die kompromisslose Unterstützung während des gesamten Studiums.