Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie Zentrum für Experimentelle Medizin Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Direktor: Professor Dr. med. Thomas Eschenhagen

## Entwicklung und Validierung eines neuen transgenen Multi-Indikator-Modells zur Markierung von murinen und humanen Stammzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

> Niklas Schofer aus Hamburg

> Hamburg 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. med. Wolfram-Hubertus Zimmermann Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. med. Stephan Baldus

## Inhaltsverzeichnis

In	Inhaltsverzeichnis I-III			
1	Einle	Einleitung		
	1.1	Zel	Itherapie der Herzinsuffizienz	1
	1.2	Sta	mmzellen als Zellquelle	2
	1.3	Lim	itationen der ES-Zell-basierten Therapie der Herzinsuffizienz	4
	1.3	.1	Bereitstellung von Herzmuskelzellen aus ES-Zellen	4
	1.3	.2	Immunologische Aspekte der ES-Zelltherapie	6
	1.3	.3	Ethische Aspekte der ES-Zelltherapie	7
	1.3	.4	Tumorigenität von ES-Zellen	8
	1.4	Auf	gabenstellung und Zielsetzung	9
2	Mate	erial	und Methoden	10
	2.1	Ver	suchstiere und Genehmigungen	10
	2.2	DN	A-Klonierung	10
	2.2	.1	Herstellung kompetenter Bakterien	10
	2.2	.2	Chemische Transformation	11
	2.2	.3	Präparation von Plasmid-DNA	11
	2.2	.4	Bestimmung der DNA-Konzentration	12
	2.2	.5	Restriktionsverdau von DNA	13
	2.2	.6	Agarosegelelektrophorese	13
	2.2	.7	Gelextraktion von DNA-Fragmenten	14
	2.2	.8	Fällung von DNA	14
	2.2	.9	Generierung von stumpfen Enden (blunt ends)	14
	2.2	.10	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase	15
	2.2	.11	DNA-Sequenzierung	15
	2.2	.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Klonierung	16
	2.3	Hu	mane embryonale Nierenzellen 293 (HEK293T-Zellen)	17
	2.3	.1	Kultur von HEK293T-Zellen	17
	2.3	.2	Einfrieren und Auftauen von HEK293T-Zellen	17
	2.3	.3	Genetische Manipulation von HEK293T-Zellen	18
	2	2.3.3	.1 Lipofectamine-Transfektion	18
	2.3	.4	Morphologische Untersuchungen transgener HEK293T-Zellen.	

	2.3	3.4.1	Fluoreszenzmikroskopie	18
	2.3	3.4.2	LacZ-Färbung	19
	2.4 N	Aurine	embryonale Stammzellen (mES-Zellen)	19
	2.4.1	l Mu	rine embryonale Fibroblasten (MEF)	19
	2.4	4.1.1	Isolation von MEF	19
	2.4	4.1.2	MEF-Kultur	20
	2.4	4.1.3	Inaktivierung von MEF mit Mitomycin C	20
	2.4.2	2 mE	S-Zellkultur	21
	2.4.3	B Ein	frieren und Auftauen von mES-Zellen	21
	2.4.4	l Ge	netische Manipulation von mES-Zellen	22
	2.4	4.4.1	Elektroporation	22
	2.4	4.4.2	Selektion transgener mES-Zellen	22
	2.4.5	5 Ge	notypisierung mittels Southern Blot	23
	2.4	4.5.1	DNA-Isolation aus mES-Zellen	23
	2.4	4.5.2	Southern Blot	23
	2.4	4.5.3	Herstellung einer radioaktiv markierten DNA-Sonde	23
	2.4	4.5.4	Hybridisierung	24
	2.4.6	6 Diff	erenzierung von mES-Zellen	24
	2.5 <i>I</i>	n vitro-	Charakterisierung transgener mES-Zellen	25
	2.5.1	l Mo	rphologische Untersuchungen	25
	2.	5.1.1	Lichtmikroskopie	25
	2.	5.1.2	Konfokale Laserscanning Mikroskopie	26
	2.5.2	2 Du	rchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting)	27
	2.6 <i>I</i>	n vivo-	Charakterisierung transgener mES-Zellen	28
	2.6.1	l Tur	norinduktion in SCID-Mäusen	
	2.6.2	2 His	tologische Untersuchungen	
	2.8 N	Aurine	parthenogenetische Stammzellen (mPS-Zellen)	29
	2.9 H	luman	e embryonale Stammzellen (hES-Zellen)	29
	2.7 8	Substa	nzen, Hilfsmittel und Geräte	30
	2.7.1	l Sul	ostanzen	30
	2.9.2	2 Hilf	smittel und Geräte	32
3	Ergeb	nisse		34
	3.1 k	Klonier	ung von PGK- und EF1 $\alpha$ -NIGIL	34
	3.2 F	unktio	nsnachweis der Plasmide in HEK293T-Zellen	35

	3.3	PGK-NIGIL-transgene mES-Zellen	38		
	3.3	nLacZ und eGFP in PGK-NIGIL-transgenen mES-Zellen	38		
	3.3	3.2 Southern Blot	41		
	3.3	3.3 Durchflusszytometrie (FACS)	43		
	3.3	8.4 Nachweis von Stammzellmarkern	46		
	3.3	Differenzierung von PGK-NIGIL-transgenen mES-Zellen	47		
	3	3.3.5.1 <i>In vitro</i> -Pluripotenznachweis	47		
	3	3.3.5.2 In vivo-Pluripotenznachweis	49		
	3.4	PGK-NIGIL transgene mPS-Zellen	49		
	3.5	EF1α- NIGIL-transgene hES-Zellen	50		
4	Disk	ussion	52		
	4.1	PGK-NIGIL und EF1α-NIGIL	53		
	4.2	PGK-NIGIL-transgene mES-Zellen	54		
	4.3	Zukünftige Verwendung PGK-NIGIL-transgener mES-Zellen	56		
	4.4	PGK-NIGIL-transgene mPS-Zellen	59		
	4.4	EF1α-NIGIL-transgene hES-Zellen	59		
	4.5	Herzspezifische NIGIL-Expression	60		
	4.7	Ausblick	60		
5	Zusa	ammenfassung	62		
6	Liter	aturverzeichnis	64		
7	Abki	ürzungsverzeichnis	74		
8	3 Danksagung				
9	J Lebenslauf				
1(	10 Eidesstattliche Versicherung				

## 1 Einleitung

## 1.1 Zelltherapie der Herzinsuffizienz

Herzerkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen in westlichen Industrienationen (Hoppe et al. 2005). Allein in Deutschland sind mehr als 40% aller Todesfälle auf das Versagen der Herzfunktion zurückzuführen (Robert-Koch-Institut 2006). Ursache des Herzversagens ist in den meisten Fällen das Vorliegen einer Koronaren Herzkrankheit (KHK), bei der es aufgrund von Minderperfusion sowohl zur akuten (akuter Myokardinfarkt) als auch zur chronischen (chronische Herzinsuffizienz) Schädigung der Herzmuskulatur kommt. Da sich Herzmuskelzellen bereits von Geburt an in einem postmitotischen Zustand befinden, das Herz sich also nicht von selbst regenerieren kann, sind Schädigungen der Herzmuskulatur weitestgehend irreversibel.

Während die 28-Tage-Mortalität nach akutem Myokardinfarkt zwischen 1985 und 2004 von 11,3% auf 7,9% gesenkt werden konnte (Kuch et al. 2008), steigt die Inzidenz und Prävalenz der chronischen Herzinsuffizienz stetig an (Schannwell et al. 2007) und gewinnt damit als Krankheitsbild immer größere Bedeutung. Heutzutage besteht das konservative therapeutische Vorgehen bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz vor allem aus der Abschirmung der bereits überlasteten Herzmuskulatur vor neurohumoraler Überstimulation durch Katecholamine (β-Blocker), Angiotensin (ACE-Inhibitoren, AT1-Rezeptor-Blocker) und Aldosteron (Spironolakton) sowie vor mechanischen Stressoren, d.h. einer erhöhten Vor- und Nachlast (Diuretika, Nitrate, Hydralazin). Hierdurch wird zwar eine Senkung der Mortalität erzielt, es lässt sich jedoch keine Wiederherstellung von Muskelgewebe im Sinne einer kausalen Therapie erreichen. Im Endstadium einer Herzinsuffizienz bleibt die Herztransplantation die letzte Therapieoption mit guten Langzeitergebnissen (Miniati und Robbins 2002). Sie ist jedoch aufgrund eines Mangels an Spenderorganen sowie der Gefahr der Transplantatabstoßung aufgrund immunologischer Inkompatibilität nur sehr limitiert anwendbar. Dieser Umstand verdeutlicht die Notwendigkeit der Entwicklung alternativer Behandlungsverfahren der Herzinsuffizienz.

Ein neues, vielversprechendes Verfahren ist die zellbasierte Therapie myokardialer Defekte. Hierbei könnten sowohl die Implantation von *in vitro* hergestellten Gewebekonstrukten als auch die Implantation isolierter Zellen in das erkrankte Herz als Therapieverfahren infrage kommen (Zimmermann und Eschenhagen 2003). Experimentelle und auch erste klinische Anwendungserprobungen weisen darauf hin, dass sich verschiedene Zelltypen dazu eignen könnten, die Herzfunktion im Tier und im Menschen zu verbessern (Murry et al. 1996, Robinson et al. 1996, Taylor et al. 1998, Chiu et al. 1995, Menasche et al. 2003, Soonpaa et al. 1994, Scorsin et al. 1997, Reinecke et al. 1999, Orlic et al. 2001, Strauer et al. 2002, Rubart et al. 2003). Dabei ist bisher allerdings unklar inwieweit tatsächlich "therapeutische Zellen" in relevantem Umfang nach Implantation im Herzmuskel verbleiben (Zhang et al. , Zhang et al. 2010).

Mitte der 1990er Jahre wurde gezeigt, dass fetale Herzmuskelzellen der Maus transplantierbar sind und in den Empfängerherzen nicht nur überleben, sondern sich in diese auch strukturell und funktionell integrieren (Soonpaa et al. 1994, Rubart et al. 2003). Damit wurden erste Hinweise erbracht, dass eine zellbasierte kardiale Geweberegeneration prinzipiell möglich ist. Darüber hinaus konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass sich mit der Implantation künstlicher Herzgewebe Heart [EHTs]), (Engineered Tissues hergestellt aus neonatalen Rattenkardiomyozyten, die Pumpfunktion infarzierter Rattenherzen verbessern lässt (Zimmermann et al. 2006), was den möglichen klinischen Nutzen dieser Form der Zelltherapie erahnen lässt. Da allerdings weder fetale noch postnatale eine klinische Anwendung in der Herzmuskelzellen für Behandlung der Herzinsuffizienz am Menschen infrage kommen, ist für die Weiterentwicklung der Zelltherapie die Erschließung geeigneter Zellquellen von entscheidender Bedeutung.

#### 1.2 Stammzellen als Zellquelle

Eine potentielle Quelle für die Erzeugung von Zellen zur myokardialen Gewebereparatur sind Stammzellen. Dabei unterscheidet man zwischen adulten und embryonalen Stammzellen. Adulte Stammzellen lassen sich aus verschiedenen Geweben isolieren und gelten im Wesentlichen als multipotent, d.h. sie haben eingeschränktes Entwicklungspotential. Von einigen Arbeitsgruppen ist eine Differenzierung adulter Stammzellen z.B. aus dem Knochenmark oder dem Fettgewebe in Herzmuskelzellen beschrieben worden (Oh et al. 2003, Bhardwaj et al. 2001, Oh et al. 2004, Fukuda 2003). Ob es sich dabei allerdings um die Induktion eines "echten" Kardiomyozyten-Phänotyps handelt, ist bis heute nicht eindeutig gezeigt worden und tatsächlich umstritten.

Anders verhält es sich mit embryonalen Stammzellen (ES-Zellen). ES-Zellen werden aus Embryonen im Blastozysten-Stadium gewonnen. Die Blastozyste setzt sich aus einem flüssigkeitsgefüllten Hohlraum (Blastozoel), dem umliegenden Trophoblast und einer inneren Zellmasse zusammen (Biswas und Hutchins 2007). Die Zellen der inneren Zellmasse lassen sich *in vitro* als ES-Zellen zur Vermehrung bringen. Werden ES-Zellen in eine Empfänger-Blastozyste reimplantiert, so verhalten sie sich wie normale embryonale Zellen und tragen zur Bildung aller Gewebe und Organe in einem sogenannten Chimer-Organismus bei (Bradley et al. 1984). Anders als die sogenannten totipotenten Blastomer-Zellen des Embryos im 2-8-Zellstadium sind ES-Zellen aber alleine nicht in der Lage, lebensfähige Organismen auszubilden. Man bezeichnet ES-Zellen aufgrund ihrer Eigenschaften als pluripotent.

Die stabile Kultivierung von undifferenzierten murinen ES-Zellen (mES-Zellen) gelang erstmalig der Arbeitsgruppe um Evans und Kaufmann 1981 (Evans und Kaufman 1981). Die ersten stabilen humanen ES-Zellen (hES-Zellen) wurden 1998 von Thomson aus im Rahmen von *in vitro*-Fertilisationen gewonnenen "überzähligen" menschlichen Embryonen generiert (Thomson et al. 1998). *In vitro* sind ES-Zellen vor allem durch ihre Fähigkeit zur unbegrenzten Proliferation unter definierten Kulturbedingungen sowie durch ihre Kapazität zur spontanen Differenzierung in Zelltypen aller drei Keimblätter (Ekto-, Endo- und Mesoderm) gekennzeichnet. Dass bei der spontanen Differenzierung auch funktionelle Herzmuskelzellen entstehen, wurde für mES-Zellen erstmalig von den Arbeitsgruppen um Wobus (Wobus et al. 1991) und Doetschmann (Doetschman et al. 1985) sowie später für hES-Zellen von Kehat et al. (Kehat et al. 2001) gezeigt.

Die Tatsache, dass ES-Zellen in der Zellkultur in Herzmuskelzellen differenzieren können (Xu et al. 2002, Kehat et al. 2001, Wobus et al. 1991, Doetschman et al. 1985, Mummery et al. 2003) und dass sich aufgrund ihrer unbegrenzten

Teilungsfähigkeit große Zellmengen generieren lassen, macht sie grundsätzlich zu einer attraktiven Quelle für die Zelltherapie der Herzinsuffizienz.

## 1.3 Limitationen der ES-Zell-basierten Therapie der Herzinsuffizienz

Bevor allerdings die Verwendung von ES-Zellen zur Therapie von Herzerkrankungen in einem klinischen Maßstab möglich werden kann, müssen folgende limitierende Aspekte der ES-Zell-basierten Therapie überwunden werden:

- Bei der spontanen Differenzierung von ES-Zellen *in vitro* entsteht nur ein geringer Anteil an Herzmuskelzellen sowie ein großer Anteil unerwünschter, d.h. nichtkardialer, Zellspezies.
- 2) Es handelt sich bei der Transplantation von ES-Zellen bzw. deren Derivaten um eine Allotransplantation, also eine Verpflanzung genetisch fremden Materials von einem Spender der selben Spezies. Diese ist in der Regel nur unter einer chronischen Immunsuppression des Empfängers durchführbar.
- Die Gewinnung von ES-Zellen erfordert die Zerstörung eines Lebewesens in einem frühen embryonalen Stadium und führt daher immer auch zu einer ethischen Kontroverse.
- In vivo neigen ES-Zellen zu unkontrolliertem Wachstum und können zur Entstehung embryonaler Tumoren, sog. Teratome oder Teratokarzinome, beitragen.

Im Folgenden wird auf die genannten Probleme vor dem Hintergrund der Aufgabenstellung der vorgelegten Dissertation eingegangen.

#### 1.3.1 Bereitstellung von Herzmuskelzellen aus ES-Zellen

Die spontane Differenzierung in der Standard-ES-Zellkultur verläuft ungerichtet, d.h. es entstehen eine Reihe unterschiedlichster Zellspezies (Wobus und Boheler 2005), darunter befinden sich meist auch Kardiomyozyten. Der Anteil von Kardiomyozyten an der Gesamtzellzahl in einer Differenzierungskultur ist allerdings nur sehr gering (<3% und 5% (Boheler et al. 2002)). Da für den suffizienten Gewebeersatz zur Therapie der Herzinsuffizienz in der Klinik vermutlich >10<sup>8</sup> Kardiomyozyten benötigt werden (Zimmermann und Eschenhagen 2007), ist eine Optimierung der myokardialen Differenzierung und zusätzlich eine Aufreinigung von Herzzellen aus

resultierenden Mischkulturen notwendig. Dies ließe sich möglicherweise erreichen durch:

### 1) Applikation von Wachstumsfaktoren und Akivierung von Signalwegen

Es sind mehrere Wachstumsfaktoren und Signalwege bekannt, die Einfuss auf die kardiale Differenzierung von ES-Zellen *in vitro* nehmen. Bedeutsam in diesem Zusammenhang sind z.B. Wachstumsfaktoren der Interleukin-6-Familie (*Leucemia-Inhibitory-Factor* [LIF]), der *Transforming-Growth-Factor-Beta*-Superfamilie (TGF-β, BMP) sowie die Notch- und Wnt-Signalwege (Perino et al. 2008). Die Wirkung der Wachstumsfaktoren hängt dabei unter anderem vom Differenzierungsstadium der Zellen ab. Ein Beispiel dafür ist LIF (IL-6-Familie), der im frühen Stadium die Differenzierung in Kardiomyozyten hemmt, während er sie in einem späten Stadium fördert (Bader et al. 2000, Bader et al. 2001).

Zuletzt konnte tatsächlich eine reproduzierbare Förderung der Kardiogenese von hES-Zellen durch den Zusatz von *activin A*, *Bone Morphogenetic Protein 4* (BMP4), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *Dickkopf Homolog 1* (DKK1) in Differenzierungskulturen erreicht werden (Yang et al. 2008).

#### 2) Zellzyklusinduktion

Durch gentechnologische Überexpression bestimmter Mediatoren kann der Zellzyklus von Kardiomyozyten aktiviert werden. Eine besondere Rolle spielt hierbei Cyclin D2 (Pasumarthi et al. 2005). In einem Infarktmodell der Maus beispielsweise führte die transgene Überexpression von Cyclin D2 im Gegensatz zu Cyclin D1 und Cyclin D3 vor allem im Infarktbereich zu einer Zellzyklusinduktion in Kardiomyozyten. Hierdurch ließ sich die Infarktgröße nach 180 Tagen im Vergleich zu Kontrolltieren um 50% reduzieren (Hassink et al. 2008, Zhu et al. 2009). Es ist unklar, ob es sich hierbei um eine Zellzyklusinduktion von ausdifferenzierten Kardiomyozyten oder von kardialen Progenitorzellen handelt. Dennoch zeigen diese Versuche, dass es prinzipiell möglich ist, durch Zellzyklusinduktion einem pathologischen myokardialen Zellverlust entgegen zu wirken. Inwieweit mithilfe einer selektiven Aktivierung des entsprechenden Cyklins auch eine Förderung der Kardiogenese von ES-Zellen erreicht werden kann, bleibt abzuwarten.

#### 3) Genetische Selektion

Der Arbeitsgruppe um Field (Klug et al. 1996) gelang es erstmalig, ein Fusionsgen bestehend aus dem herzspezifischen  $\alpha$ -Myosin-Schwereketten-Promotor ( $\alpha$ -myosin heavy chain [ $\alpha$ -MHC]-Promotor) und für eine Aminoglykosidtransferase (Neo<sup>r</sup>) kodierende cDNA in das Genom von mES-Zellen stabil zu integrieren. Die Aminoglykosidtransferase vermittelt dabei eine Resistenz gegen das Antibiotikum Neomycin bzw. dessen Analogon G418. Dieses Modell ermöglicht die gezielte Selektion von Kardiomyozyten, die aus undifferenzierten mES-Zellen entstanden sind. In Differenzierungskulturen von mES-Zellen konnte so der Anteil an Kardiomyozyten auf >99% erhöht werden. Ähnliche Modelle wurden von Kolossov et al und Müller et al verwendet (Kolossov et al. 2006, Muller et al. 2000).

Für eine erfolgreiche zellbasierte Therapie wird es darüberhinaus möglicherweise nötig sein, neben Herzmuskelzellen auch Nicht-Herzmuskelzellen wie z.B. Endothelzellen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen und Nervenzellen zur Verfügung zu stellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher das Ziel verfolgt, ein ubiquitäres transgenes Indikatormodell zu entwickeln, um ES-Zellen *in vitro* und *in vivo* unter dem Einfluss verschiedener Faktoren oder Bedingungen unabhängig von ihrem Differenzierungsstadium jederzeit verfolgen und isolieren zu können und so weitere Erkenntnisse bezüglich der Entstehung von Kardiomyozyten sowie kardialer Nicht-Kardiomyozyten aus ES-Zellen zu erlangen.

#### 1.3.2 Immunologische Aspekte der ES-Zelltherapie

Die Implantation klassischer hES-Zellen in das erkrankte menschliche Herz würde aus immunologischer Sicht einer Allotransplantation entsprechen. Diese Art der Transplantation würde ohne Immunsuppression zu einer Abstoßung des implantierten Materials führen. Es existieren allerdings Daten, die darauf hindeuten, dass ES-Zellen ein gewisses immunologisches Privileg aufweisen, d.h. nach Transplantation zumindest teilweise einer immunologischen Antwort entgehen (Fandrich et al. 2002). Einige Arbeitsgruppen konnten sogar zeigen, dass eine große Anzahl muriner ES-Zellen bis zu 32 Wochen nach Transplantation in Herzen immunkompetenter Ratten im Sinne einer Xenotransplantation ohne den Anhalt für eine Immunreaktion überleben können (Behfar et al. 2002, Min et al. 2002, Min et al. 2003, Hodgson et al. 2004). Andere experimentelle Studien am Tiermodell ergaben dagegen eine eindeutige Immunreaktion des Empfängers auf allogen transplantierte ES-Zellen (Kofidis et al. 2005, Nussbaum et al. 2007). Neuere Daten zur Transplantation von ES-Zellen haben nun eindeutig die Expression von Multihistokompatibilitätsantigenen in ES-Zellen sowie Entzündungsreaktionen *in vivo* gezeigt (Bonnevie et al. 2007). Es ist demnach sehr wahrscheinlich, dass ES-Zellen und ihre Derivate im Rahmen einer klinischen Allotransplantation abgestoßen würden.

Durch die Bereitstellung von ES-Zellen mit einer eindeutigen genetischen Markierung soll es in Zukunft möglich werden, immunologische Reaktionen im Rahmen der ES-Zell-basierten Therapie genauer beschreiben zu können.

#### **1.3.3 Ethische Aspekte der ES-Zelltherapie**

Neben immunologischen Hindernissen ist die Verwendung klassischer ES-Zellen auch unter ethischen Gesichtspunkten bedenklich, da die Gewinnung von ES-Zellen die Vernichtung eines potentiell lebensfähigen Organismus erfordert. Vor diesem Hintergrund sind in den letzten Jahren Technologien entwickelt worden, die es ermöglichen, Zellen mit Eigenschaften von ES-Zellen ohne Zerstörung einer befruchteten Eizelle zu gewinnen (s.u.). Neben der ethischen Rechtfertigung gibt es auch wichtige immunologische Argumente (eine autologe Anwendung scheint möglich), die für eine Verwendung folgender Zelltypen sprechen:

#### 1) Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS)

iPS-Zellen können aus somatischen Zellen, z.B. Fibroblasten, durch genetische Manipulation gewonnen werden. Dabei wird durch Einbringung sogenannter Stammzellfaktoren eine Reprogrammierung differenzierter Zellen erreicht. Dieses Verfahren steht bereits in der Maus (Takahashi und Yamanaka 2006) und dem Menschen (Takahashi et al. 2007) zur Verfügung. Für eine potentielle Anwendung in der zellbasierten myokardialen Reparatur ist wichtig hervorzuheben, dass sich aus iPS-Zellen funktionsfähige Kardiomyozyten gewinnen lassen (Mauritz et al. 2008). Unklar ist allerdings, ob diese Kardiomyozyten eine "physiologische" Qualität erreichen.

#### 2) Parthenogenetische Stammzellen (PS-Zellen)

Unbefruchtete Eizellen können durch chemische Agenzien wie Strontium und Cytochalasin B zur Ausbildung einer parthenogenetischen Blastozyste angeregt

werden. Im Säugetier bilden diese keine lebensfähigen Embryonen. Ursächlich dafür ist ein Mangel an paternal regulierten Genen mit der Folge einer fehlerhaften Ausbildung von extraembryonalem Gewebe. PS-Zellen werden aus der inneren Zellmasse parthenogenetischer Blastozysten gewonnen (Allen et al. 1994, Cibelli et al. 2002, Revazova et al. 2007). Unserer Arbeitsgruppe gelang es, murine PS-Zellen in "echte" Kardiomyozyten zu differenzieren (Christalla 2010).

#### 3) Spermatogoniale Stammzellen (SSCs)

SSCs können sowohl aus dem Hoden adulter Mäuse (Guan et al. 2006) als auch aus dem menschlichen Hoden (Conrad et al. 2008) gewonnen werden. Aus murinen SSCs ließen sich bereits Kardiomyozyten generieren (Guan et al. 2007). Ob es sich bei humanen SSCs wirklich um pluripotente Zellen handelt, ist bis dato umstritten (Ko et al. 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das zunächst im ES-Zellmodell zu etablierende genetische Zellindikatorkonzept auch auf PS-Zellen übertragen werden.

## 1.3.4 Tumorigenität von ES-Zellen

Die Gefahr der Tumorbildung nach einer *in vivo* Applikation von ES-Zellen schränkt ihre Verwendung in einem klinischen Kontext deutlich ein. Problematisch ist vor allem, dass das tumorigene Potential von ES-Zellen eng mit ihrer pluripotenten Natur verknüpft ist. So ist beispielsweise ein entscheidendes Kriterium zum Nachweis der Pluripotenz einer ES-Zelllinie die Teratomentstehung nach subkutaner Implantation. Die Umstände, unter denen es zur Teratomentstehung nach myokardialer Applikation von ES-Zellen kommt (Singla 2009), sind bis heute nicht ausreichend geklärt, und es existieren experimentelle Arbeiten, die sogar nach Implantation undifferenzierter ES-Zellen in das Myokard keine Teratomentstehung zeigen (Singla et al. 2006, Min et al. 2002, Behfar et al. 2002). Die genaue Aufklärung des Mechanismus der Tumorentstehung wird in Zukunft von entscheidender Bedeutung für die Sicherheit der ES-Zell-basierten Therapie der Herzinsuffizienz sein. Vor diesem Hintergrund ist es interessant, dass die amerikanische Zulassungsbehörde (FDA) kürzlich der klinischen Testung von neuronalen ES-Zell-Derivaten zugestimmt hat. Die Entwicklung eines genetischen ES-Zell-Indikatormodels soll in Zukunft auch dazu dienen, ES-Zell-abgeleitete Tumore mit hoher Sensitivität und Spezifität identifizieren zu können.

### 1.4 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein neues genetisches Zellmarkierungsmodell für murine und humane ES-Zellen sowie für PS-Zellen entwickelt und validiert werden, um Stammzellen sowie ihre Derivate *in vitro* und *in vivo* mit Hilfe unterschiedlicher bildgebender Verfahren verfolgen zu können. Zur Markierung sollte zunächst ein Multi-Indikator-Transgen, welches unter der Expressionskontrolle eines ubiquitär aktiven Promotors stehen sollte, entwickelt werden. Als Reportergene sollte einerseits verstärktes grün-fluoreszierendes Protein (*enhanced Green Fluorescent Protein* [eGFP]) und andererseits nukleäre β-Galactosidase (nLacZ) verwendet werden. Die eGFP-Expression sollte dabei die Möglichkeit bieten, die Zellen in Lebendkulturen verfolgen und sie durchflusszytometrisch anhand ihrer Fluoreszenz identifizieren und isolieren zu können. Die nLacZ-Expression sollte mit hoher Sensitivität und Spezifität vor allem die Untersuchung des Verhaltens der Zellen in fixierten Präparaten erlauben.

Für die Entwicklung und Etablierung dieses Multi-Indikator-Modells mussten folgende Arbeitsschritte vollzogen werden:

- 1) Herstellung geeigneter Multi-Indikator-Plasmide.
- 2) Testung der Reporterexpression in einem geeigneten Zellmodell (HEK293).
- 3) Herstellung stabiler muriner Multi-Indikator-ES-Zelllinien.
- 4) Durchflusszytometrische Untersuchung der transgenen Zellen.
- 5) Nachweis der Pluripotenz der manipulierten Zellen *in vitro* und *in vivo*.
- 6) Anwendung des Multi-Indikator-Konzepts in murinen PS-Zellen.
- 7) Anwendung des Multi-Indikator-Konzepts in humanen ES-Zellen.

## 2 Material und Methoden

## 2.1 Versuchstiere und Genehmigungen

Zur Herstellung embryonaler Fibroblastenkulturen (MEF; *Mouse Embryonic Fibroblasts*) wurden tragende NMRI-Mäuse (ED 13-16; Eigenzucht des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf) verwendet (Behörde für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg - Organentnahmegenehmigung #241). Für den *in vivo*-Nachweis der Pluripotenz der im Rahmen dieser Arbeit generierten Multi-Indikator-Stammzelllinien wurden *Severe Combined Immunodeficiency*-Mäuse (SCID-Mäuse, bereitgestellt vom Institut für Anatomie II des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf; Prof. Dr. U. Schumacher) verwendet (Behörde für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg - Tierversuchsgenehmigung: 40/07).

## 2.2 DNA-Klonierung

### 2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

*Escherichia coli* (verwendeter Stamm: DH10B) wurden auf LB-Agar ausgestrichen. Einzelkolonien wurden nach Übernachtkultur bei 37 °C in 10 ml *Luria Broth* (LB)-Medium transferiert und 12 h bei 37 °C unter kontinuierlicher Rotation (250 rpm, C 25 *Incubator Shaker*, New Brunswick Scientific, USA) inkubiert. Darauf wurden 500 ml LB-Medium mit 2 ml der Übernachtkultur angeimpft und bei 37 °C unter kontinuierlicher Rotation (250 rpm) bis zu einer Zelldichte von 4-7x10<sup>7</sup> Zellen/ml (entsprechend einer OD 600 nm = 0,6) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert (5.000 g, 4 °C, 15 min).

Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurde das Zellpellet in 60 ml kaltem TFB1 (*Transformation Buffer 1*) resuspendiert, zentrifugiert (5.000 g, 4 °C, 15 min) und in 8 ml kaltem TFB2 auf Eis erneut resuspendiert. Die Bakteriensuspensionen wurden als 100  $\mu$ l Aliquots in flüssigem Stickstoff (N<sub>2</sub>) schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

<u>LB-Agarplatten:</u>	300 ml LB-Medium und 4,5 g Agar autoklavieren; jeweils 10 ml
	Lösung für eine 10 cm-Platte verwenden; Gemisch zum
	Aushärten abkühlen lassen
LB-Medium:	10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl, auf 1 l mit $H_2O$
	auffüllen; pH 7,0; autoklavieren; Lagerung bei 4 °C
<u>TFB1:</u>	0,3 g K-Acetat, 0,8 MnCl <sub>2</sub> , 1,2 g RbCl <sub>2</sub> , 0,15 g CaCl <sub>2</sub> , 18,9 g
	Glycerin mit Wasser auf 100 ml auffüllen; pH 5,8; steril filtieren
<u>TFB2:</u>	0,1 ml 1 M MOPS (3-[N-Morholino]Propansulfonsäure), 12 mg
	RbCl <sub>2</sub> , 0,11 g CaCl <sub>2</sub> , 1,89 g Glycerin mit Wasser auf 10 ml
	auffüllen; pH 7,0; steril filtieren

## 2.2.2 Chemische Transformation

Kompetente Bakterien (100 µl) wurden auf Eis aufgetaut. Plasmid-DNA (1 µg) und kompetente Bakterien wurden kurz gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C wurden die Bakterien wieder auf Eis gestellt. Die Suspensionen wurden mit 900 µl LB-Medium (37 °C) versetzt, für 45 min bei 37 °C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert, auf LB-Agarplatten (50, 100 und 200 µl/Agarplatte) mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und 12-15 h bei 37 °C inkubiert. Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden Einzelkolonien in 10 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin transferiert und über Nacht bei 37 °C und Rotation (250 rpm) kultiviert.

### 2.2.3 Präparation von Plasmid-DNA

Die DNA-Präparation erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der Firma Qiagen. Dabei wurden die kommerziell erhältlichen Puffer P 1-3 (Qiagen) verwendet. Die DNA wurde allerdings nicht chromatographisch über eine Säule aufgereinigt, sondern direkt gefällt. Hierfür wurden 5 ml einer über Nacht gewachsenen Bakteriensuspension zentrifugiert (9.000 g, RT, 30 sec). Die pelletierten Bakterien wurden in 200 µl P1 suspendiert und anschließend für maximal 5 min bei Raumtemperatur durch Zugabe von 200 µl P2 lysiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 200 µl gekühltem P3 gestoppt. Nach Pelletierung der bakteriellen Membranfragmente und der genomischen DNA (13.000 g, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach Zentrifugation (13.000 g, 4 °C, 20 min) wurde das gebildete DNA-Pellet mit 450 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13.000 g, 4 °C, 5 min). Der Ethanol wurde anschließend vorsichtig abgegossen. Die DNA wurde luftgetrocknet und darauf in 20 µl Aqua ad injectabilia aufgenommen.

Zur Gewinnung großer DNA-Mengen (large scale preparation) wurden 3 ml einer Übernachtkultur in 500 ml LB-Medium mit Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin) transferiert und bei 37 °C unter Schütteln (250 rpm) über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien per Zentrifugation (6.000 g, 15 min, 4 °C) pelletiert und in 10 ml P1 resuspendiert und durch Zugabe von 10 ml P2 lysiert (vorsichtiges Mischen bei RT für 5 min). Nach Zugabe von 10 ml P3 und einer Inkubation von 20 min bei 4 °C wurden die Bakterienlysate zweimal zur Abtrennung von bakteriellen Proteinen und genomischer DNA zentrifugiert (jeweils 20.000 g, 4 °C, 30 min). Die Überstände (enthielten Plasmid-DNA) wurden schließlich zur weiteren Aufreinigung durch Membranfilter gegeben und auf eine mit 10 ml QBT äquilibrierte Silicasäule gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit QC wurde die gebundene Plasmid-DNA mit 15 ml QF eluiert. Die DNA wurde anschließend mit 10 ml Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation pelletiert (30 min, 15.000 g, 4 °C). Das Pellet wurde mit 2,5 ml 70% igem Ethanol gewaschen und anschließend zentrifugiert (10 min, 4 °C, 15.000 g). Nach vorsichtigem Abgießen des Ethanols wurde die DNA luftgetrocknet und in 150 µl Wasser aufgenommen (DNA-Konzentration:  $\sim 1 \mu g/\mu I$ ).

<u>P1:</u>	50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 $\mu\text{g/ml}$ RNase A; pH 8,0; bei
	4 °C lagern
<u>P2:</u>	200 mM NaOH, 1% SDS
<u>P3:</u>	3 M K-Acetat; pH 5,5; bei 4 °C lagern
<u>QBT:</u>	750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, 0.15% Triton X-100;
	рН 7,0
<u>QC:</u>	1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol; pH 7,0
<u>QF:</u>	50 mM MOPS, 1,25 M NaCl, 15% Ethanol; pH 7,0

## 2.2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration isolierter DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von 1 entsprach einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Sambrook und Russell 2006). Die Reinheit der DNA wurde

durch parallele Bestimmung der Extinktion bei 280 nm und Berechnung der 260/280-Ratio bestimmt. Gereinigte Plasmid-DNA wies eine Ratio von >1,8 auf.

## 2.2.5 Restriktionsverdau von DNA

Plasmid- und genomische DNA wurden mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen in NEB (New England Biolabs) Restriktionspuffer 1-4, gegebenenfalls unter Zusatz von bovinem Serumalbumin (BSA, 0,1 µg/µl), bei der für die Enzyme optimalen Aktivitätstemperatur geschnitten. Dabei wurde 1 µg DNA mit 2 U Enzym für 1-3 h in einem Gesamtvolumen von 50 µl verdaut. Anschließend wurden die Restriktionsenzyme bei 60 °C hitzeinaktiviert.

NEB-Puffer 1:	10 mM Bis-Tris-Propan-HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM 1,4-
	Dithiothreitol (DTT); pH 7,9
NEB-Puffer 2:	50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT; pH 7,9
NEB-Puffer 3:	100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT; pH
	7,9
NEB-Puffer 4:	50 mM K-Acetat, 20 mM Tris-Acetat, 10 mM Mg-Acetat, 1 mM
	DTT: pH 7.9

## 2.2.6 Agarosegelelektrophorese

DNA-Moleküle wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. In Abhängigkeit der zu trennenden Molekulargewichte wurden Agarosekonzentrationen im Bereich von 0,7%-1,2% in TAE-Puffer gewählt. An das Agarosegel wurde eine elektrische Gleichspannung von 5-10 V/cm Gellänge angelegt. Nukleinsäuren bewegen sich aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen in ihrem Zucker-Phosphat-Rückgrat zur Anode. Dabei wird die Geschwindigkeit durch die Molekülgröße, die Konformation der DNA, die Agarosekonzentration und die Höhe der angelegten Spannung beeinflusst. Als Molekulargewichtsmarker wurde mit EcoRI und HindIII verdaute (Lamda-)DNA verwendet. Zum Anfärben von DNA-Banden wurde dem Gel vor dem Gießen Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,1 µg/ml zugefügt. Das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid fluoreszierte unter UV-Licht.

<u>TAE-Puffer:</u> 40 mM Tris-Acetat, 20 mM Na-Acetat, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); pH 7,5

## 2.2.7 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Die präparative Isolation von durch Restriktionsverdau hergestellten DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des *QIAspin Gel Extraction Kits*. Auf einem UV-Tisch wurde die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert. Pro 100 mg Gel wurden 300 µl Puffer NT 1 (Qiagen) zugegeben. Die Agarose wurde unter leichtem Schütteln gelöst (10 min, 50 °C). Die DNA-haltige Suspension wurde auf eine NucleoSpin-Säule gegeben und zentrifugiert (1 min, RT, 10.000 g). Die Silikasäule wurde mit 600 µl ethanolischem Puffer NT 3 (Qiagen) gewaschen und zentrifugiert (1 min, 10.000 g, RT). Zur DNA-Eluation wurde die Säule mit 50 µl sterilem Wasser (50 °C) für 1 min inkubiert und die DNA schließlich durch Zentrifugation (1 min, 10.000 g, RT) in einem sterilen Reaktionsgefäß gesammelt.

## 2.2.8 Fällung von DNA

Wässrigen DNA-Lösungen wurden 0,7 Volumenteile Isopropanol und 0,1 Volumenteil 3 M wässrige Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) zugesetzt. Danach wurde die DNA für 15-20 min bei 12.000 g pelletiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, nach Zentrifugation (15.000 g, 4 °C, 20 min) luftgetrocknet und in einer adäquaten Menge TE-Puffer oder Wasser (50 °C) aufgenommen.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA

## 2.2.9 Generierung von stumpfen Enden (blunt ends)

Für die Ligation von DNA-Fragmenten, die keine kompatiblen Enden zueinander aufwiesen, wurden die überstehenden Enden mit der DNA-Polymerase I (Klenow Fragment) aufgefüllt. Das Klenow Fragment der DNA-Polymerase I aus *E.coli* besitzt sowohl eine Polymerase-Aktivität, katalysiert also die Polymerisierung von Desoxynukleosid-Triphosphaten, als auch eine 3'-5' Exonuklease-Aktivität. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die überhängenden Enden des für das Klonieren des Plasmids EF1α-Neo<sup>r</sup>-IRES2-eGFP-IRES2-nLacZ (EF1α-NIGIL) benötigten *Clal-PacI*-Fragments aus pWPI (EF1α-Promotor cDNA; der Vektor wurde freundlicherweise von Prof. D. Trono, Lausanne, zur Verfügung gestellt) sowie die des mit *Clal* linearisierten Vektor-Rückrads (pBSK-NIGIL) mittels Klenow Fragment zu *blunt ends* geschnitten bzw. aufgefüllt. Pipettierschema: DNA: 2 μg dNTPs: 10 mM 10 x NEB Puffer: 1 μl Klenow Fragment: 2 U Wasser zu 10 μl

Der Ansatz wurde für 15 min bei 25 °C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde EDTA in einer finalen Konzentration von 10 mM hinzugegeben und der Ansatz für 20 min auf 75 °C erhitzt.

## 2.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase

DNA-Fragmente wurde mit Vektor-DNA in einem molaren Verhältnis von 3:1 mithilfe von T4-Ligase für 3 h bei RT oder für 12 h bei 14 °C ligiert.

Pipettierschema:	Vektor-DNA: 30 fmol		
	Insert-DNA: 90 fmol		
	10x T4-Ligasepuffer: 1 μl		
	T4-Ligase: 1 U		
	Wasser zu 10 ul		

## 2.2.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung mit *BigDye*-Terminatoren (Applied Biosystems) basiert auf einer modifizierten Form der enzymatischen Didesoxynukleotid-Methode.

Pipettierschema:Plasmid-DNA: 200-400 ngPrimer: 15 pmolBigDye-Terminator-Ready-Reaktion-Mix: 4 μlWasser zu 20 μl

Die DNA wurde in diesem Reaktionsgemisch unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

Denaturierung 1 min, 95 °C, Gefolgt von 25 Zyklen:

Denaturierung	30 sec, 96 °C
Annealing	15 sec, 50 °C
Elongation	4 min, 60 °C

Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 80 µl Natriumacetat (0,3 M, pH 5,2) und 250 µl Ethanol gemischt und zentrifugiert (16.000 g, 30 min, 4 °C). Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet luftgetrocknet und im Servicelabor des Instituts für Pathologie (Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf) analysiert. Die Detektion der vier unterschiedlich markierten *BigDye*-Terminatoren erfolgte dort auf einem Applied Biosystems 377 *DNA-Sequencer*.

## 2.2.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Klonierung

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) diente zur exponentiellen *in vitro*-Amplifikation von DNA-Abschnitten. Durch das 30fache Wiederholen eines Zyklus, bestehend aus Denaturierung, Anlagerung von Primern (*Annealing*) und Komplementärstrangsynthese (*Elongation*) in Anwesenheit einer hitzestabilen DNA-Polymerase erreicht man eine Vervielfachung (ideale Kopienzahl bei 30 Zyklen: 2<sup>30</sup>) des DNA-Fragmentes zwischen den Primern. Im Rahmen dieser Arbeit wurde per PCR der für das klonierte Plasmid PGK-Neo<sup>r</sup>-IRES2-eGFP-IRES2-nLacZ (PGK-NIGIL) benötigte PGK-Promoter amplifiziert. Durch die Anwendung von modifizierten Primerpaaren mit nicht-komplementären Restriktionsschnittstellen konnte das PCR-Produkt gerichtet in einen Zielvektor kloniert werden.

Pipettierschema:	Ausgangs ( <i>template</i> )-DNA: 150-200 ng
	1x PCR-Puffer
	MgCl <sub>2</sub> : 2 mM
	dNTPs: je 0,2 mM
	Primer: je 0,25 μM
	PrimeSTAR HS DNA Polymerase: 1,25 U
	Wasser zu 50 µl

Verwendete Primer zur Amplifikation des PGK-Promoters:

Vorwärtsprimer:

5'-<u>CTCGAG</u>GCACATTTCCCCGAAAAGTGC-3' (*Xhol*-Schnittstelle) 
 Rückwärtsprimer:
 5'-TATCGAT
 TTAGATGGATGCAGGTCGAA AG-3'

 (Clal
 Schnittstelle)
 (Clal
 (Clal</tda)</td>
 (Clal
 (Clal
 <

<u>Programm (30 Zyklen):</u> 98 °C, 10 sec 55 °C, 5 sec 72 °C, 1 min

## 2.3 Humane embryonale Nierenzellen 293 (HEK293T-Zellen)

### 2.3.1 Kultur von HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen wurden auf Adhäsions-Zellkulturschalen (Cell<sup>+</sup>-Gewebekulturschalen; Sarstedt) in HEK-Medium bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten 5% igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Subkonfluente Kulturen wurden im Verhältnis 1:8 bis 1:10 geteilt oder eingefroren (s. 2.3.2). Zum Passagieren der Zellen wurde das Kulturmedium abgesaugt, ca. 1/5 des üblichen Kulturmedium-Volumens an HEK-Trypsin/EDTA zugegeben und zwei bis drei Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Trypsinverdau mit mindestens dem doppelten Volumen an serumhaltigem Medium (HEK-Medium) abgestoppt, die Zellen pelletiert (465 g, 4 °C, 5 min), mit HEK-Zell-Medium resuspendiert und anschließend ausplattiert.

HEK-Medium:Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glucose,10% FCS (fetales Kälberserum), 2 mM L-Glutamin, 100 U/mlPenicillin und 100 μg/ml Streptomycin

HEK-Trypsin/EDTA: 0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA x 4Na in Hank's B.S.S. (Invitrogen)

### 2.3.2 Einfrieren und Auftauen von HEK293T-Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie beim Passagieren vom Boden der Kulturschale gelöst und pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml vorgekühltem HEK-Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden zunächst über Nacht in einem Einfriergefäß bei -80 °C gelagert (Absenkung der Temperatur um 1 °C/h). Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt. Das Auftauen der Zellen erfolgte bei 37 °C im Wasserbad bis nur noch ein kleiner Eisklumpen vorhanden war. Dann wurde die Zellsuspension in mindestens dem dreifachen Volumen an HEK-Medium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde zentrifugiert (465 g, 5 min, 4 °C), das Pellet in HEK-Medium resuspendiert und die Zellen anschließend ausplattiert.

HEK-Einfriermedium: 50% HEK-Medium, 40% FCS, 10% DMSO

## 2.3.3 Genetische Manipulation von HEK293T-Zellen

## 2.3.3.1 Lipofectamine-Transfektion

Um die Funktionalität der im Rahmen dieser Arbeit klonierten Plasmide (PGK-NIGIL, EF1α-NIGIL) zu überprüfen, wurden HEK293T-Zellen auf 3 cm-Zellkulturschalen mit der Lipofectamin<sup>®</sup>-Transfektions-Methode transfiziert. DNA und Lipofectamin<sup>®</sup> 2000 (Invitrogen) wurden zunächst in zwei getrennten Ansätzen mit serumreduziertem Medium (*Opti-MEM*<sup>®</sup> *I*; Invitrogen) vermischt.

Ansatz 1:2,5 μg in Wasser gelöste DNA<br/>Opti-MEM<sup>®</sup> I zu 50μIAnsatz 2:10 μl Lipofectamin<br/>40 μl Opti-MEM<sup>®</sup> I

Beide Ansätze wurden bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert, anschließend wurde Ansatz 2 in Ansatz 1 überführt und das Gemisch (Ansatz 3) für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das HEK-Medium abgesaugt und durch 2 ml Opti-MEM<sup>®</sup> I ersetzt. Nach 20 min wurde Ansatz 3 tropfenweise auf die Zellkulturschale gegeben. Das Transfektions-Medium (Opti-MEM<sup>®</sup> I + Ansatz 3) wurde nach 12-24 Stunden gegen HEK-Medium ausgetauscht.

## 2.3.4 Morphologische Untersuchungen transgener HEK293T-Zellen

## 2.3.4.1 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Analyse der eGFP-Expression wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Hierbei fluoreszieren die Fluorochrome unter Anregung mit UV-Licht. Von jeder Einstellung wurden sowohl Fluoreszenzbilder, als auch Phasenkontrastbilder über eine AxioCamHr Digitalkamera (Zeiss) mit Belichtungszeiten von 50 ms (Phasenkontrastbilder) bis 5-50 s (Fluoreszenzaufnahmen) aufgenommen.

## 2.3.4.2 LacZ-Färbung

Die PGK-NIGIL- bzw. EF1α-NIGIL-transgenen HEK293T-Zellen wurden auf 3 cm-Zellkulturschalen zunächst mit 2%iger Formaldehyd-/0,2%ige Glutaraldehydlösung fixiert (30 s - 1 min). Anschließend wurden die Zellen in PBS ([*Phosphate Buffered Saline*; Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung]) gewaschen und über Nacht bei 37 °C in X-Gal-Färbelösung inkubiert. Die Dokumentation erfolgte mit einer AxioCamHr Digitalkamera (Zeiss).

PBS:8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na2HPO4 x 7(H2O), 0,2 g KH2PO4 in<br/>1,0 l Aqua bidest; pH 7,4Färbelösung:2 mM MgCl2, 5 mM K3[Fe(CN)6], 5 mM K4[Fe(CN)6], 20 mM [2-<br/>Hydroxyethyl]piperazin-N-[2-ethansulfonsäure]KallerHydroxyethyl]piperazin-N-[2-ethansulfonsäure]Kaller<

galactopyranosid; gelöst als 40 mg/ml in DMSO) in Färbelösung

## 2.4 Murine embryonale Stammzellen (mES-Zellen)

Murine embryonale Stammzellen (mES-Zellen) wurden in Anwesenheit des Zytokins *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) auf wachstumsinaktivierten MEFs kultiviert, um eine spontane Differenzierung zu verhindern.

## 2.4.1 Murine embryonale Fibroblasten (MEF)

## 2.4.1.1 Isolation von MEF

MEF wurden unter sterilen Bedingungen aus 13-16 Tage alten Embryonen präpariert. Hierzu wurden den Embryonen der Kopf, die blutbildenden und die intestinalen Organe sowie das Herz entfernt. Die restlichen Gewebe wurden in Trypsinlösung (Difco; 0,2% in PBS) mechanisch durch Rühren mit Glaskugeln vereinzelt (RT, 35 min). Der Trypsinverdau wurde durch Zugabe des doppelten Volumens an MEF-Medium beendet. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (1.000 g, 4 °C, 4 min) und in MEF-Medium resuspendiert.

<u>MEF-Medium:</u> DMEM mit 4,5 g/l Glucose, 10% FCS, 1% nichtessentielle Aminosäuren (NEAA), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

#### 2.4.1.2 MEF-Kultur

Die vereinzelten Fibroblasten wurden auf Gewebekulturschalen, beschichtet mit 0,1% iger wässriger Gelatinelösung, ausplattiert (Zellen aus fünf Embryonen/150 mm-Schale). Als Kulturmedium diente MEF-Medium. Die subkonfluenten Zellen wurden zweimal nach jeweils zwei bis vier Tagen im Verhältnis 1:3 bis 1:6 geteilt. Hierzu wurden die MEFs mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml MEF-Trypsin/EDTA pro 150 mm-Schale für 3 bis 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch Triturieren vereinzelt und anschließend mit doppeltem Volumen serumhaltigem Medium (MEF-Medium) Inaktivierung zur des Trypsins aufgenommen. Nach Pelletierung der Zellen (1.000 g, 4 min, 4 °C) wurden diese in MEF-Medium resuspendiert und anschließend ausplattiert.

<u>MEF-Trypsin/EDTA:</u> 0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA x 4Na in Hank's B.S.S. (Invitrogen)

#### 2.4.1.3 Inaktivierung von MEF mit Mitomycin C

Um weitere Zellteilungen der MEFs zu verhindern, wurden die Zellen für zwei bis drei Stunden mit Mitomycin C (MMC; 10 µg/ml Medium) inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Nach erneuter Inkubation mit MEF-Trypsin/EDTA wurden diese Zellen zunächst vereinzelt und auf Zellkulturschalen (mit 0,1%iger Gelatinelösung beschichtet) ausgebracht (50.000 MEF/cm<sup>2</sup>). Teilungsinaktivierte Fibroblasten konnten zwei bis drei Wochen bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten 5-7% igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert werden. Alternativ wurden die inaktivierten MEFs in MEF-Einfriermedium durch Senkung der Temperatur um 1 °C/h im Isopropanol-Einfriergefäß eingefroren und in flüssigem N<sub>2</sub> bis zur späteren Verwendung gelagert.

# <u>MEF-Einfriermedium:</u> 50% MEF-Medium, 40% FCS, 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)

#### 2.4.2 mES-Zellkultur

Zur Kultur undifferenzierter mES-Zellen wurden inaktivierte MEFs (50.000 MEF/cm<sup>2</sup>) auf Zellkulturschalen (mit 0,1%iger Gelatinelösung beschichtet) ausplattiert. Auf die Fibroblastenschicht wurden nach 1-2 Tagen vereinzelte mES-Zellen ausgebracht. Das Kulturmedium (mES-Medium) wurde täglich gewechselt. Die subkonfluenten mES-Zellen wurden alle 2-3 Tage abhängig von der mES-Zelldichte im Verhältnis 1:3 bis 1:6 geteilt. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen, ca. 1/5 des üblichen Kulturmedium-Volumens an ES-Trypsin/EDTA zugegeben und 3-5 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit einer Pasteurpipette unter Triturierung vereinzelt (im Mikroskop kontrolliert) und der Trypsin-Verdau mit mindestens dem doppelten Volumen an mES-Medium abgestoppt. Anschließend wurden die mES-Zellen zentrifugiert (1.000 g, 4 min, 4 °C), in mES-Medium resuspendiert und erneut ausplattiert (Verhältnis 1:3-1:6). Die Kultur der mES-Zellen erfolgte bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten 7%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

<u>mES-Medium:</u> DMEM-Medium mit 4,5 g/l Glucose, 2 mM L-Glutamin, 15% FCS, 1% NEAA, 100 U/ml Penicillin und 100 μg/ml Streptomycin, 1% Nucleosidmix, 100 μM 2-Mercaptoethanol, 10 ng/ml LIF
 <u>Nucleosidmix:</u> 80 mg Adenosin, 85 mg Guanosin, 73 mg Cytidin, 73 mg Uridin, 24 mg Thymidin in 100 ml PBS bei 37 °C lösen; steril filtrieren
 <u>ES-Trypsin/EDTA:</u> 2,5 g/l Trypsin, 0,38 g/l EDTA x 4 Na in Hank's B.S.S. (Invitrogen)

### 2.4.3 Einfrieren und Auftauen von mES-Zellen

Zum Einfrieren wurden die undifferenzierten Zellen mit PBS gewaschen und mit ES-Trypsin/EDTA abgelöst. Das Trypsin wurde durch Zugabe des doppelten Volumens an mES-Medium inaktiviert. Darauf wurden die Zellen durch Zentrifugation (1.000 g; 4 min; 4 °C) pelletiert und schließlich tropfenweise in eisgekühltem Einfriermedium aufgenommen. Die Zellen (ca. 5x10<sup>7</sup> Zellen/ml) wurden durch Senkung der Temperatur um 1 °C/h im Isopropanol-Einfriergefäß eingefroren. Das Auftauen der undifferenzierten mES-Zellen erfolgte dem Auftauen der HEK293T-Zellen entsprechend. Die aufgetaute Zellsuspension wurde in ES-Medium aufgenommen, pelletiert (1000 g, 4 min, 4 °C), in ES-Medium resuspendiert und ausplattiert. ES-Einfriermedium: 50% mES-Medium, 40% FCS, 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)

## 2.4.4 Genetische Manipulation von mES-Zellen

## 2.4.4.1 Elektroporation

 $2x10^7$  vereinzelte mES-Zellen wurden in 800 µl PBS aufgenommen, in einer Elektroporationsküvette (Gene-Pulser Küvette 0,4 cm) mit 25 µg *Sma*l linearisierter DNA (PGK-NIGIL) gemischt und elektroporiert (300 V, 1.200 µF, Impuls 2 ms). Nach 10 min bei Raumtemperatur wurden die mES-Zellen in mES-Medium resuspendiert und direkt auf vier mit inaktivierten Neonmycin-resistenten MEFs bewachsenen (50.000 MEF/cm<sup>2</sup>; freundlicherweise von PD Dr. I. Hermans-Borgmeyer zur Verfügung gestellt), gelatinierten 100 mm-Schalen ausplattiert.

## 2.4.4.2 Selektion transgener mES-Zellen

Zwei Tage nach der Elektroporation wurde zur Selektion stabil transformierter mES-Zellen G418 (200 µg/ml) für zehn Tage zum Kulturmedium gegeben. Resistente Zellklone wurden zwölf Tage nach der Transfektion isoliert. Dazu wurden die Zellen auf den 100 mm-Schalen einmal mit PBS gewaschen und jeder einzelne Klon mit einer Pipettenspitze in etwa 25 µl PBS in ein well einer unbehandelten 96 well-Platte überführt. Die mES-Zellklone wurden durch Zugabe von je 25 µl ES-Trypsin/EDTA (37 °C, 4 min) und anschließende Triturierung mit einer 100 µl-Pipette vereinzelt, mit 50 µl mES-Medium versetzt und auf eine neue, gelatinierte, mit MEF (50.000 MEF/cm<sup>2</sup>) bewachsene 96 well-Platte transferiert. Zwei Tage später wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit ES-Trypsin/EDTA abgelöst. Nach Zugabe des doppelten Volumens an mES-Medium wurde die eine Hälfte dieser Zellsuspension auf zwei gelatinierte, mit einer dünnen MEF-Schicht (25.000 MEF/cm<sup>2</sup>) besiedelten 96 well-Platten, die andere Hälfte auf zwei gelatinierte, mit 50.000 MEF/cm<sup>2</sup> besiedelte 96-well-Platten überführt. Auf den dicht mit MEF bewachsenen Platten wurden die Stammzellklone bis zur Ausbildung von ausreichend großen Kolonien kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in mES-Trypsin/EDTA vereinzelt und das Trypsin mit doppeltem Volumen mES-Medium abgestoppt. Zu dieser Zellsuspension wurde das gleiche Volumen einer Mischung aus 80% FCS und 20% DMSO hinzugegeben. Nach Überschichten mit Mineralöl wurden die 96 well-Platten bei -80 °C eingefroren. Auf der einen dünn mit MEF bewachsenen 96 well-Platte wurden die mES-Zellen LacZ-gefärbt (s. 2.3.4.2), um einen ersten Überblick über die

Transfektionseffizienz zu erhalten. Auf der anderen dünn mit MEF bewachsenen 96 *well*-Platte wurden die mES-Zellen bis zur Konfluenz kultiviert, um anschließend genomische DNA zu isolieren. Stabil transformierte mES-Zellklone wurden mittels *Southern Blot* identifiziert.

## 2.4.5 Genotypisierung mittels Southern Blot

## 2.4.5.1 DNA-Isolation aus mES-Zellen

Für den Nachweis positiver mES-Zellklone wurde die genomische DNA von in 96 *well*-Platten konfluent gewachsenen mES-Zellen präpariert. Die mES-Zellen wurden dafür zweimal mit PBS gewaschen und in 50  $\mu$ l ES-Zell-Lyse-Puffer/*well* bei 60 °C in einer abgedichteten Feuchtkammer 2 h inkubiert. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l alkoholischer Natriumchlorid-Lösung wurde die DNA 30 min bei Raumtemperatur gefällt. Anschließend wurden die Überstände entfernt, die DNA zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und für etwa 20 min an der Luft getrocknet, bevor der Restriktionsverdau (*Pst*I) in 50  $\mu$ I Restriktionsmix bei 37 °C für 12 h erfolgte. 25  $\mu$ I des Ansatzes wurden mithilfe eines 0,7-1%igen Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde für den *Southern Blot* verwendet.

Restriktionsmix:	1x Restriktionspuffer, 100 μg/ml BSA, 50
	µg/ml RNAse, 10–15 U Restriktionsenzym
ES-Zell-Lyse-Puffer:	10 mM Tris pH 7,5, 10 mM EDTA, 10 mM
	NaCl, 0,5% N-Laurylsarcosin ("Sarcosyl"),
	200 µg/ml Proteinase K
Alkoholische Natriumchlorid-Lösung:	5 M NaCl in Isopropanol

## 2.4.5.2 Southern Blot

Die verdaute genomische DNA wurde im Agarosegel mit 0,25 M Salzsäure 10-20 min depuriniert und anschließend per Kapillarblot-Verfahren (*Southern Blot*) unter alkalischen Transferbedingungen (0,4 N NaOH; 12 h) auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Anschließend wurde die Nylonmembran direkt zur Hybridisierung verwendet.

## 2.4.5.3 Herstellung einer radioaktiv markierten DNA-Sonde

Ein Sacl-EcoRV-DNA-Fragment (827 bp) aus PGK-NIGIL wurde mithilfe des Prime-IT RmT Random Primer Labeling Kits durch Einbau von  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP radioaktiv markiert. Dafür wurde das Fragment aus einem Agarosegel eluiert (s. 2.2.7). 10-25 ng der DNA wurde in 45 µl TE-Puffer 10 min denaturiert (100 °C) und anschließend auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde mit dem *Labeling Mix* (*Rediprime* TM II; Amersham) gemischt und nach Zugabe von 5 µl  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (3.000 Ci/mmol) inkubiert (10 min, 37 °C). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl 0,2 M EDTA gestoppt. Das markierte DNA-Fragment wurde über Sephadex-G50-Säulen aufgereinigt. Die verwendete Sonde hatte eine spezifische Aktivität von 100.000-200.000 cpm/µl. Die Sonde wurde direkt vor der Hybridisierung für 5 min bei 100 °C denaturiert.

## 2.4.5.4 Hybridisierung

Die Nylonmembran wurde mit 5 ml Hybridisierungslösung und 40 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml) prähybridisiert (60 °C, 30 min). Anschließend wurde die denaturierte radioaktive Sonde (100.000 cpm/µl Hybridisierungslösung) zur Hybridisierung (12 h, 60 °C) hinzugefügt. Darauf wurde die Membran jeweils bei 60 °C für 5 min mit 10 ml Waschlösung 1 und zweimal mit 10 ml Waschlösung 2 bei 60 °C für jeweils 5 min gewaschen. Anschließend wurde die Membran feucht in Klarsichtfolie eingeschlagen und exponiert (*Phosphorimager*).

 Waschlösung 1:
 2x SSC; 0,5% SDS

 20x SSC-Puffer:
 175,3 g NaCl, 88,2 g Na<sub>3</sub>-Citrat, Aqua bidest. ad 1 l; pH 7,0

 Waschlösung 2:
 0,1x SSC; 0,1% SDS

## 2.4.6 Differenzierung von mES-Zellen

Durch die Bildung von Embryoidkörpern (*embryoid bodies*; EBs) in hängenden Tropfen (500 Zellen/20 µl Differenzierungsmedium 1) wurde die Differenzierung von mES-Zellen für 2 Tage initiiert und in einer fünftägigen Suspensionskultur (Differenzierungsmedium 2) weitergeführt. Für die Suspensionskulturen wurden Kulturschalen mit einer hydrophoben Beschichtung verwendet. Anschließend wurden die EBs auf gelatinierte Adhäsions-Zellkulturschalen ausplattiert und für weitere 7 Tage in Differenzierungsmedium 2 kultiviert.

<u>Differenzierungsmedium 1:</u> DMEM-Medium mit 4,5 g/l Glucose, 2 mM L-Glutamin, 20% FCS, 1% NEAA, 100 µM 2Mercaptoethanol oder 50 µM 1-Thioglycerol, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

<u>Differenzierungsmedium 2:</u> Iscove-Medium mit 20% FCS, 1% NEAA, 2 mM L-Glutamin, 100 μM 2-Mercaptoethanol oder 50 μM 1-Thioglycerol, 100 U/ml Penicillin, 100 μg/ml Streptomycin

## 2.5 In vitro-Charakterisierung transgener mES-Zellen

## 2.5.1 Morphologische Untersuchungen

## 2.5.1.1 Lichtmikroskopie

## LacZ-Färbung

Die LacZ-Färbung von undifferenzierten mES-Zellen und *in vitro*-differenzierten mES-Zellderivaten der PGK-NIGIL-transgenen mESZelllinie sowie deren Dokumentation wurden analog zur LacZ-Färbung der HEK293T-Zellen durchgeführt (s. 2.3.4.2).

## Alkalische Phosphatase-Färbung

Die Überprüfung der Alkalischen Phosphatase Aktivität erfolgte mit dem Vector® Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I (Vector Laboratories). Dabei wird ein sowohl lichtmikroskopisch fluoreszenzmikroskopisch als auch sichtbares. rotes Reaktionsprodukt gebildet. Das Kit besteht aus drei Reagenzien (Reagenz 1, 2 und 3) und einem Puffer. Für die Färbung wurde zunächst die Arbeitslösung hergestellt. Dafür wurden zu 5 ml 100 mM Tris-HCl nacheinander jeweils zwei Tropfen von Reagenz 1, 2 und 3 gegeben und die Lösung nach jeder Zugabe durch schütteln gut gemischt. In der Arbeitslösung wurden schließlich auf 96-well-Platten kultivierte, für 10 min mit 4% Paraformaldehyd fixierte und anschließend zweimal in PBS gewaschene mES-Zellen für 30 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 30 min wurden die Zellen in dem mitgelieferten Puffer gewaschen und anschließend in TBS lichtgeschützt bei 4°C gehalten. Die Dokumentation der Färbung erfolgte mit einer AxioCamHr Digitalkamera (Zeiss).

<u>10x TBS:</u> Trishydroxymethylaminmethan *ultra pure* (TBS) 121,14 g, NaCl 180 g in 2000 ml aqua dest.; pH 7,4

## 2.5.1.2 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

## Detektion von eGFP

Mithilfe eines *Laser Scanning* Mikroskops (LSM 510 META auf Axiovert 100; Zeiss) wurden native, auf 96 *well*-Platten (96 *Well Optical Bottom Plates*; Nunc) kultivierte PGK-NIGIL-transgene mES-Zellen hinsichtlich der Emission des eGFP-Signals untersucht. Die Zellen wurden dabei mit einem Argonlaser (488 nm) zur Emission von Fluoreszenzimpulsen angeregt.

## Immunfluoreszenzfärbungen

In dieser Arbeit wurden auf 96 *well*-Platten (*96 Well Optical Bottom Plates*; Nunc) kultivierte PGK-NIGIL-transgene mES-Zellen zunächst für 10 min mit 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und dann nach dem Protokoll in Tabelle 1 immunfluoreszenzmarkiert. Die Zellkerne wurden dabei mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; Sigma) angefärbt. Die emittierte Fluoreszenz wurde anschließend mit dem konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop (LSM 510 META auf Axiovert 100; Zeiss) detektiert.

1.	Blocklösung	RT	30 min
2.	TBS	RT	2x5 min
3.	Primärer Antikörper	4 °C	Über Nacht in einer Feuchtkammer
4.	TBS	RT	2x5 min
5.	Sekundärer Antikörper	RT	1 h in einer Feuchtkammer
6.	TBS	RT	5 min
7.	TBS + DAPI 1:1000	RT	5 min
8.	TBS	RT	2x5 min

**Tabelle 1:**Protokoll der Immunfluoreszenzfärbungen.

Primäre Antikörper:

- Anti-Oct 3/4 (Kaninchen, IgG, Verdünnung: 1:500; Abcam)
- Anti-SSEA-1 (Maus, IgM, Verdünnung: 1:50; Hybridoma Bank)
- Anti-nanog (Kaninchen, IgG, Verdünnung: 1:1000; Abcam)

- Anti-Neurofilament Protein M (Maus, IgG2A, Verdünnung: 1:1000; Abcam)
- Anti-Cytokeratin 18 (Maus, IgG1, Verdünnung: 1:20; Progen Biotechnik)
- Anti-alpha-sarkomerisches Aktinin (Maus, IgG, Verdünnung 1:200; Sigma)

Sekundäre Antikörper:

- Anti-Maus IgG (Kaninchen, Label: Alexa 546, Verdünnung: 1:800; Molecular Probes)
- Anti-Kaninchen IgG (Ziege, Label: Cy3, Verdünnung: 1:500; Rockland)
- Anti-Kaninchen IgG (Ziege, Label: Alexa 633, Verdünnung: 1:1000; Molecular Probes)

Die Verdünnung der Antikörper erfolgte jeweils mit Dako<sup>®</sup> Dilution Buffer 1 (Dako).

Blocklösung: 10% FCS, 1% BSA, 0,5% Triton X-100, 0,05% Thimerosal in TBS

## 2.5.2 Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting)

Mithilfe der Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting: FACS) lassen sich Zellen anhand ihrer Fluoreszenz- sowie ihrer Streulichteigenschaften analysieren und sortieren. Die Zellen werden hierbei durch eine Kapillare gesaugt, deren Querschnitt sich so verengt, dass sie einzeln an einem Analysepunkt vorbeigeführt werden. An diesem Analysepunkt werden die Zellen von einem Argonlaser (488 nm) getroffen, woraufhin sie Streulicht emittieren, das anschließend detektiert wird. Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) gibt Auskunft über die Zellgröße. Das Seitwärtsstreulich (Side Scatter, SSC) hängt vornehmlich von der Granularität der Zellen ab. Darüber hinaus können von den Zellen emittierte Fluoreszenzimpulse gemessen werden. Durch die Kombination der verschiedenen Parameter lassen sich unterschiedliche Zellpopulationen gut voneinander unterscheiden. Mithilfe des so genannten Live-Gatings ist es während der Messung möglich, auch in einer heterogenen Probe unter Ausgrenzung anderer Zellpopulationen ausschließlich eine bestimmte Zellpopulation zu analysieren. Nach der Messung können die Zellen dann in unterschiedliche Fraktionen sortiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden PGK-NIGIL-transgene mES-Zellen, mES-Zellen vom Wildtyp (Zelllinie R1), hES-Zellen vom Wildtyp (H1- und H9-Linie), EF1 $\alpha$ -NIGILtransgene hES-Zellen sowie MEFs einer analytischen FACS-Untersuchung unterzogen. Dieses wurde im Institut für Knochenmarkstransplantation am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Dr. C. Lange, Prof. Dr. Dr. Zander) durchgeführt. Für die Analyse wurden die subkonfluenten Zellen wie beim Passagieren zunächst vom Boden der Kulturschale gelöst, vereinzelt, pelletiert und in 2 ml PBS resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend durch einen mit 500 µl PBS benetzten *Pre-Separation-*Filter mit einer Maschenweite von 30 µm (Milteny Biotec) gegeben. Der Filter wurde 2-3 Mal mit 500 µl PBS gespült, das Filtrat erneut pelettiert und in 1 ml PBS resuspendiert. Die Einzelzellsuspensionen wurden bis zur Analyse auf Eis gehalten.

Um den MEF-Gehalt in der Probe zu reduzieren, wurden die mES-Zellen vor dem Filtrieren für 1 Stunde auf gelatinierten 15 cm-Kulturschalen ausplattiert. Nachdem ein großer Teil der MEFs adhärent geworden war, wurde der die mES-Zellen enthaltende Überstand abgenommen, die Zellen pelletiert und in PBS resuspendiert.

## 2.6 In vivo-Charakterisierung transgener mES-Zellen

### 2.6.1 Tumorinduktion in SCID-Mäusen

Um die Pluripotenz der im Rahmen dieser Arbeit generierten Multi-Indikator-mES-Zellline zu überprüfen, wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Anatomie II des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Frau Feldhaus, Prof. Dr. U. Schumacher) jeweils 2 SCID-Mäusen unter sterilen Bedingungen 100.000 mES-Zellen in 10 µl DMEM-Medium mit 4,5 g/l Glucose subkutan in den Nacken injiziert. Anschließend wurden die Tiere bei Wasser und Futter *ad libitum* gehalten. 14 Tage nach der Zellinjektion wurden die Tiere geopfert, nachdem im Bereich der Injektionsstelle Tumorwachstum deutlich zu erkennen war.

### 2.6.2 Histologische Untersuchungen

Die histologische Aufbereitung (Färbung mit Hämatoxylin&Eosin) des Tumorgewebes wurde freundlicherweise vom Frau Feldhaus im Institut für Anatomie II des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. U Schumacher) durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte mit einer AxioCamHr Digitalkamera (Zeiss).

#### 2.8 Murine parthenogenetische Stammzellen (mPS-Zellen)

Die experimentelle Arbeit mit mPS-Zellen erfolgte in Zusammenarbeit mit P. Christalla und Dr. med. M. Didié. Hierfür wurden zunächst unbefruchtete murine Eizellen durch Strontium (10 mM) und Cytochalasin B (5 µg/ml) parthenogenetisch aktiviert. Darauffolgend wurden mPS-Zellen aus Parthenoten im Blastozystenstadium isoliert und anschließend auf MEFs kultiviert. Die genetische Manipulation der mPS-Zellen mit PGK-NIGIL und der anschließende Nachweis der Transgenexpression und –integration erfolgte analog zur Herstellung PGK-NIGIL-transgener mES-Zellen.

#### 2.9 Humane embryonale Stammzellen (hES-Zellen)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kultivierung und genetische Manipulation von hES-Zellen von C. Rogge und Dr. med. A. Hansen durchgeführt. Dabei wurden hES-Zellen der Firma WiCell (H1- und H9-Linie) verwendet. Die Anwendung dieser Zellen wurde durch das Robert-Koch-Institut (www.rki.de) genehmigt (12. Genehmigung). Für die Kultur von undifferenzierten humanen ES-Zellen (hES-Zellen) waren wie bei den mES-Zellen MEFs erforderlich. Um den undifferenzierten Zustand zu erhalten, wurden anstelle von FCS und LIF Serum Replacement und basic Fibroblast growth factor (bFGF; 8 ng/ml) verwendet. Die Kultur erfolgte bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten 5% igen CO2-Atmosphäre bei täglichem Mediumwechsel. Undifferenzierte hES-Zellen wurden geteilt, wenn (1) die MEFs älter als 10 Tage waren, (2) die Kolonien zu dicht gewachsen oder zu groß waren, oder (3) die hES-Zellen zu differenzieren begannen. Hierzu wurde das Kulturmedium von den Platten abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und für 10 min bei 37 °C mit Kollagenase-Lösung (100 µl/cm<sup>2</sup>) inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Zellkulturschaber von den Kulturplatten abgelöst und mit einer weitlumigen Pipette 10x auf- und abpipettiert. Dabei musste ein zu starkes Auseinanderbrechen der Zellkolonien verhindert werden. Die Zellen wurden zentrifugiert (200 g, RT, 5 min), in 3 ml hES-Medium vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert (200 g, RT, 5 min). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in hES-Medium erneut resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:5 ausplattiert.

Die Herstellung von EF1-NIGIL-transgenen hES-Zellen mit Elektroporation einer Zellsuspension von vereinzelten hES-Zellen in Anwesenheit des Vektors und

anschließender Kultivierung unter Selektionsdruck mit G418 sowie Nachweis der Transgenexpression mittels nLac-Z-Färbung und FACS-Analyse entsprach den jeweiligen Experimenten mit PGK-NIGIL-transgenen mES-Zellen.

## 2.7 Substanzen, Hilfsmittel und Geräte

## 2.7.1 Substanzen

- Agarose, Invitrogen, Deutschland
- Ampicillintrihydrat, Serva, Deutschland
- Aqua ad injectabilia (bidestilliert, deionisiert, pyrogenfrei), Pharmacia & Upjohn GmbH, Deutschland
- Bacto Trypton, Becton Dickinson, USA
- Bacto Yeast-Extract (Hefe-Extrakt), Becton Dickinson, USA
- BigDye Terminator Ready Reaction Mix, Applied Biosystems, Deutschland
- Bovines Serumalbumin (BSA), Sigma Chemical Co., USA
- Bovines Serumalbumin (BSA), 100X, NEB, USA
- 5-Brom-4-chlor-indolyl-ß-D-galaktosid (X-Gal), Sigma, Deutschland
- Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>), Merck, Deutschland
- Carbogengas (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>), Linde AG, Deutschland
- Chloroform, Merck, Deutschland
- 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), Sigma, Deutschland
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma, Deutschland
- DMEM, Gibco-BRL, Deutschland
- DNA ladder, 1Kb, NEB, USA
- DNA ladder, 100bp, NEB, USA
- dNTP-Mix, MBI Fermentas, USA
- D-PBS, Gibco, Deutschland
- Eosin G, gelblich, Merck, Deutschland
- Ethanol, Apotheke Roth, Deutschland
- Ethidiumbromid-Lösung, wässrig, 1%, Fluka, Deutschland
- Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (Na<sub>2</sub>EDTA; Titriplex<sup>®</sup> III), Merck, Deutschland
- Fetales Kälberserum (FCS), 0,1 µm steril filtriert, Gibco, Deutschland
- Formaldehyd, säurefrei mindestens 37%, Merck, Deutschland

- Geneticinsulfat (G418), Gibco, Deutschland
- Glucose, Merck, Deutschland
- Glutamin (100x=200 mM), Gibco-BRL, Deutschland
- Glycerol, Merck, Deutschland
- Hybridisierungslösung ExpressHyb Solution, BD Bioscience, USA
- Hydrogenchlorid (HCI), Merck, Deutschland
- [2-Hydroxyethyl]piperazin-N-[2-ethansulfonsäure] (HEPES), Sigma Chemical Co., USA
- Isopropranolol, Merck, Deutschland
- Leukemia Inhibitory Factor (LIF),10<sup>7</sup> U/ml, Esgro Chemicon, Deutschland
- Loading dye, 6x, Fermentas, Deutschland
- Mega prime DNA Labeling System, Amersham, Deutschland
- Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>), Merck, Deutschland
- Magnesiumsulfat (MgSO<sub>4</sub>), Merck, Deutschland
- Methanol, Merck, Deutschland
- MEM, non-essential amino acids, Gibco, Deutschland
- 2- Mercaptoethanol, Gibco, Deutschland
- Mineralöl, Sigma, Deutschland
- Minimal Essential Medium (MEM), Gibco BRL, Life Technologies LTD, Schottland
- Mitomycin C, Sigma, Deutschland
- Natriumchlorid (NaCl), Merck, Deutschland
- Natriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), Merck, Deutschland
- Natriumhydroxid (NaOH), Merck, Deutschland
- Natriumpyruvat, Gibco, Deutschland
- NEBuffer 1-4, NEB, USA
- NucleoSpin plasmid isolation kit, Macherey & Nagel, Deutschland
- <sup>32</sup>P-dCTP, Amersham, Deutschland
- Penicillin/Streptomycin (100x; P/S), Gibco-BRL, Deutschland
- PrimeSTAR HS DNA Polymerase, Takara Bio Europe, Frankreich
- Prime-IT RmT Random Primer Labeling Kit, Amersham, Deutschland
- Puffer P1, P2, P3, Qiagen, Deutschland
- Qiaquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Deutschland
- Sodium-dodecyl-sulfat (SDS), Sigma Chemical Co, USA
- T4 DNA Ligase, NEB, USA
- T4 DNA Ligase buffer, NEB, USA
- Thimerosal, Sigma Chemical Co, USA
- Trishydroxymethylaminmethan (Tris), Merck, Deutschland
- Trypsin EDTA, Gibco, Deutschland

Alle verwendeten Substanzen verfügten über den höchsten im Handel erhältlichen Reinheitsgrad.

# 2.9.2 Hilfsmittel und Geräte

- Agarose GEL Electrophoresis System Sub-Cell GT, Bio-Rad Laboratories, USA
- Autoklav, Wesarg, Medizintechnik, Deutschland
- Brutschrank, Hera cell 240, Heraeus Instruments, Deutschland
- Brutschrank, BBD 6220 Heraeus Instruments, Deutschland
- Cell Counter CASY, Schärfe System, Deutschland
- Chromatographierpapier 3MM Whatman, Schleicher & Schuell, Deutschland
- Curix cassette 35X43 cm, AGFA-GEVAERT, USA
- Einfriergefäße 1,8 ml, Nunc, Deutschland
- Einwegspritzen, Injekt 10 ml, 20 ml, B.Braun Melsungen AG, Deutschland
- Elektroporationsküvette, BioRad Laboratories, USA
- Eppendorf Safe Lock Reaktionsgefäße, Deutschland
- Feinanalysewaage, Mettner H51, Deutschland
- Fluoreszenzmikroskop, Axioplan mit Kamera, Carl Zeiss, Deutschland
- Fuji Imaging Plate 23X40 cm, FUJI, Deutschland
- Gene Pulser II Bio-Rad Laboratories, USA
- GeneScreen plus Membran NEF 1017, NEN, USA
- Heizplatte, FMI EHE-3501, Föhr Medical Instruments GmbH, Deutschland
- Hybridization Bottles HB-OV-BM, Thermo EC, USA
- Hybridization mini oven MKII HYBAID, Thermo EC, USA
- Konfokales Laser Scanning Mikroskop, LSM 510 Meta auf Axiovert 100, Zeiss, Deutschland
- Kühlzentrifuge Modell J-6B mit Schwenkbecherrotor 5200, Beckman Instruments Inc., USA
- Kulturschalen, Nunc, Deutschland
- Kulturschalen (Polymethylpenten), Nalge Co, Nalgene Labware Div., USA
- Kulturschalen, Sarstedt, Deutschland

- Mikroskop, Labovert, Leitz, Deutschland
- Mikroskop, Axioplan, Carl Zeiss, Deutschland
- Mikrowelle, SHARP, Deutschland
- Multikanalpipetten, 8 und 12 Kanäle, Deutschland
- Neubauer-Zählkammer, Glaswarenfabrik Karl Hecht KG "Assistent", Deutschland
- Nitrozellulosemembran Protan BA85, 0,45 µm, Schleicher & Schuell, Deutschland
- Parafilm, American National, USA
- Pasteur Pipetten, Brand GmbH, Deutschland
- pH-Meter, Knick GmbH, Deutschland
- Phospho Imager FLA 3000, Fujifilm, Deutschland
- Pipetten 10 µl, 100 µl und 1000 µl, Sarstedt, Deutschland
- Pipetten, 10 ml , wide tip with plug, Becton Dickinson Labware, USA
- Pipetten (serologisch), 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, Sarstedt, Deutschland
- Pipettenspitzen, Sarstedt, Deutschland
- Pipettierhilfe, pipettus-akku, Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
- Power Pac Basic supply, Bio-Rad Laboratories, USA
- Präparationsbesteck, Hammacher Instrumente, Deutschland
- Sephadex G-50 Spin Säulen, Amersham Pharmacia Biotech, Deutschland
- Silikon, Dow Corning GmbH, Deutschland
- Skalpell, sterile Skalpellklinge, Bayha, Deutschland
- Sterilbank, Lamin Air HB 2448, Heraeus Instruments, Deutschland
- Sterilfilter (0,2 µm), einmal Filterhalter, Schleicher & Schuell, Deutschland
- Sterilfilter (0,22 μm), Steritop, Vakuumfilter, Millipore, USA
- Thermomixer, Eppendorf, Deutschland
- Ultrazentrifuge Centricon T-2170, Kontron Instruments, Deutschland
- Vortex Typ REAX 1, Heidolph, Deutschland
- Waage, OHAUS GT410, Florham Peak, USA
- Waage, PM 480 Delta Range, Mettler Instruments, Deutschland
- Wasserbad, GfL m.b.H., Deutschland
- Wasserbad, Medax Nagel GmbH, Deutschland
- Zellsieb, 60 mesh (250 μm), CD-1 Sieb, Sigma Chemical Co, USA
- Zentrifugierröhrchen 15 ml, 50 ml, Sarstedt, Deutschland

## 3 Ergebnisse

## 3.1 Klonierung von PGK- und EF1α-NIGIL

Für die Herstellung von Multi-Indikator-ES-Zelllinien mussten zunächst die für die Transfektion benötigten Plasmide generiert werden. Das Ziel war, Plasmide herzustellen, die unter der Kontrolle eines ubiquitären Promotors sowohl für Indikatorproteine kodieren als auch eine Selektionskassette zur Positivselektion der transgenen Zellen enthalten. Eine in unserer Arbeitsgruppe klonierte DNA-Sequenz, die für eine Neomycinresistenz vermittelnde Aminoglykosidtransferase (Neo<sup>r</sup>) sowie die Indikatorproteine verstärktes grün-fluoreszierendes Protein (enhanced Green *Fluorescent Protein*, eGFP) und nukleäre  $\beta$ -Galactosidase (nLacZ) kodiert, stand bereits in einem pBluescript-Vektor (pBSK NIGIL; S. Döker) zur Verfügung. In diesem sog. NIGIL-Konstrukt sind Neo<sup>r</sup> (N), eGFP (G) und nLacZ (L) über interne ribosomale Eintrittsstellen (Internal Ribosomal Entrv Site aus dem Encephalomyokarditisvirus, IRES2 [I]) miteinander verbunden (Abb. 1). Auf mRNA-Ebene vermittelt IRES2 unabhängig von der sonst dazu benötigten 5'-Cap-Struktur die Initiation der Translation und ermöglicht so die gleichzeitige Synthese verschiedener, nicht zusammenhängender Proteine ausgehend von einer polycistronischen mRNA. In dieser Arbeit ging es nun also zunächst darum, das NIGIL-Konstrukt unter den Einfluss eines ubiquitären Promotors zu bringen. Für die Herstellung einer transgenen murinen ES-Zelllinie wurde hierzu auf den Phosphoglyceratkinase (PGK)-Promotor zurückgegriffen. Analog dazu sollte für die Generierung einer humanen Multi-Indikator-ES-Zelllinie der Elongationsfaktor  $1\alpha$  (EF1 $\alpha$ )-Promotor vor das NIGIL-Konstrukt kloniert werden.

Der PGK-Promotor wurde aus seinem Ursprungsvektor mittels PCR amplifiziert, wobei über die Primer im Sinne einer erzwungenen Mutation (*forced mutation*) Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Xho*I (Vorwärtsprimer) und *Cla*I (Rückwärtsprimer) in das Amplifikat eingefügt wurden. Das Amplifikat wurde dann zunächst in einen *pBluescript*-Vektor eingefügt (pBSK PGK) und anschließend unter Zuhilfenahme von *Xho*I und *Cla*I gerichtet über eine *sticky end*-Ligation in den Zielvektor pBSK-NIGIL überführt. Die erfolgreiche Ligation wurde durch Restriktionsanalyse mit *Stu*I und *Nhe*I sowie Sequenzierung verifiziert. Abb. 1A zeigt die schematische Darstellung der Klonierung von PGK-NIGIL.

Der Ef1 $\alpha$ -Promotor wurde mithilfe der Restriktionsenzyme *Cla*l und *Pac*l aus seinem Ursprungvektor (pWPI) geschnitten, die überhängenden Enden mit Klenow aufgefüllt und anschließend über eine *blunt end*-Ligation in pBSK NIGIL eingefügt. Die erfolgreiche Ligation wurde durch Restriktionsanalyse mit *Xho*l sowie ebenfalls mittels Sequenzierung der DNA nachgewiesen. Abb. 1B zeigt die schematische Darstellung der Klonierung von EF1 $\alpha$ -NIGIL.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der Klonierung der Multi-Indikator-Plasmide (A) PGK- und (B) EF1α-NIGIL. Von links nach rechts: Vektorkarte des die jeweilige Promotorsequenz tragenden Ursprungsplasmids mit seinen Enzym-Schnittstellen, Gelelektrophorese des entsprechenden Restriktionsverdaus, Vektorkarte des Multi-Indikator-Plasmids nach Ligation mit der entsprechenden Promotorsequenz und Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus zur Kontrolle des Klonierungserfolges.

## 3.2 Funktionsnachweis der Plasmide in HEK293T-Zellen

Um die Funktion von PGK-NIGIL und EF1α-NIGIL *in vitro* nachzuweisen, wurden zunächst HEK293T-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Als

Vergleichskontrolle diente die Transfektion von HEK293T-Zellen mit einem lentiviralen Plasmid, das unter der Kontrolle des Cytomegalie-Virus (CMV)-Promotors für eGFP kodiert (CMV-eGFP). Ca. 24 h nach der Transfektion ließen sich mikroskopisch unter Anregung mit UV-Licht in allen drei Ansätzen grünfluoreszierende Zellen erkennen (Abb. 2 IIa-IIc). Die Transfektionseffizenz war in der Positivkontrolle höher (Abb. 2 IIa).

Anschließend wurden die drei Ansätze nLacZ-gefärbt, wobei die CMV-eGFPtransgenen HEK293T-Zellen diesmal als Negativkontrolle dienen sollten. Nachdem die fixierten Zellen über Nacht in der X-Gal enthaltenen Färbelösung inkubiert wurden, ließ sich sowohl makroskopisch (Abb. 2 IIIb-IIIc) als auch mikroskopisch (Abb. 2 IVb-IVc) in den PGK-NIGIL- und EF1 $\alpha$ -NIGIL-transgenen HEK293T-Zellen eine erfolgreiche nLacZ-Färbung nachweisen. Der nukleären Lokalisation der  $\beta$ -Galaktosidase entsprechend erfolgte die X-Gal-Reaktion vor allem im Zellkern und führte daher vor allem dort zu einer Blaufärbung, ein Teil des entstandenen Farbstoffes entwich dabei in das Zytoplasma (Abb. 2 IVb-IVc). Die Effizienz der nLacZ-Färbung entsprach in etwa der des zuvor detektierten eGFP-Signals. Die Negativkontrolle zeigte keine Blaufärbung (Abb. 2 IIIa, Abb. 2 IVa).

Da HEK293T-Zellen mit einer endogenen Neomycinresistenz ausgestattet sind, konnte die Funktion der Aminoglykosid-Transferase als Selektionsinstrument in diesem Modell nicht überprüft werden.



**Abb. 2**: Funktionsnachweis der Multi-Indikator-Plasmide PGK-NIGIL und EF1 $\alpha$ -NIGIL in HEK293T-Zellen. (Ia-Ic) Mikroskopische Aufnahme nativer HEK293T-Zellen, die mit dem lentiviralem Plasmid CMV-eGFP als Kontrolle (Ia) sowie mit PGK-NIGIL (Ib) und EF1 $\alpha$ -NIGIL (Ic) transfiziert wurden. (IIa-IIc) Detektion von eGFP in CMV-eGFP- (IIa), PGK-NIGIL- (IIb) und EF1 $\alpha$ -NIGIL-transgenen Zellen (IIc) unter dem Fluoreszenzmikroskop. Makroskopische (IIIa-IIIc) und mikroskopische (IVa-IVc) Analyse der nLac-Z-Expression in CMV-eGFP- (IIIa, IVa), PGK-NIGIL- (IIIb, IVb) und EF1 $\alpha$ -NIGIL-transgenen Zellen (IIIc, IVc). Maßstäbe: 3 mm (Ia-IIc), 800  $\mu$ m (IVa), 400  $\mu$ m (IVb-IVc).

### 3.3 PGK-NIGIL-transgene mES-Zellen

Anschließend an die erfolgreiche Überprüfung von DNA-Sequenz sowie Funktion des PGK-NIGIL-Konstruktes wurden mES-Zellen der R1-Zelllinie mit 25 µg des mit Sma1 linearisierten Konstruktes mittels Elektroporation transfiziert. Nach einer 10-tägigen Kulturphase in Anwesenheit von G418 (200 µg/ml) wurden 456 resistente Klone isoliert und nach einmaligem Passagieren einer Phänotypisierung zur Identifikation der transgenen Zellklone unterzogen.

## 3.3.1 nLacZ und eGFP in PGK-NIGIL-transgenen mES-Zellen

Um einen ersten Überblick über das mögliche Vorhandensein PGK-NIGIL-transgener mES-Zellklone zu erhalten, wurden die 456 G418-resistenten mES-Zellklone zunächst auf die Expression von nLacZ untersucht. Die nLacZ-Färbung ergab eine bereits makroskopisch deutlich zu erkennende Blaufärbung von insgesamt 14 mES-Zellklonen (Abb. 3). Lichtmikroskopische Aufnahmen zeigten blau gefärbte mES-Zellkolonien ohne eindeutig nukleär lokalisierte Blaufärbung. Als Negativkontrolle dienten sowohl die in der mES-Kultur enthaltenden MEFs als auch ES-Zellen der Ursprungszelllinie R1 (Abb. 4E). Alle 14 als transgen identifierten Zellklone wiesen neben blau gefärbten, offensichtlich Transgen-exprimierenden mES-Zellen auch nicht blau gefärbte, das Transgen nicht exprimierende mES-Zellen auf. Lichtmikroskopisch ließ sich dabei sowohl ein Mischbild von nLacZ-positiven und – negativen Zellen innerhalb einzelner mES-Zellkolonien (Abb. 4D) als auch ein Nebeneinander ganzer homogen nLacZ-positiver und -negativer Kolonien erkennen (Abb. 4C). Die homogenste Blaufärbung von mES-Zellen und mES-Zellkolonien wies

Der Nachweis der eGFP-Expression der transgenen mES-Zellklone erfolgte mittels konfokaler *Laser Scanning* Mikroskopie. Auch hier zeigte der mES-Zellklon IIE4 das homogenste Bild einer zytoplasmalokalisierten Grünfluoreszenz (Abb. 5A-5B). Weiter bestätigte sich bei der Detektion des eGFP das bereits nach der LacZ-Färbung zu beobachtende Vorhandensein von Mischklonen. Die als Negativkontrolle dienenden mES-Zellen der Ursprungslinie R1 wiesen keine Grünfluoreszenz auf (Abb. 5C).



**Abb. 3:** Makroskopische Analyse der nLacZ-Expression von 456 mES-Zellklonen nach Transfektion mit dem Multi-Indikator-Plasmid PGK-NIGIL und anschließender 10-tägiger G418-Selektionskultur. Die roten Kreise markieren die 14 nLacZ-positiven mES-Zellklone.



**Abb. 4:** Mikroskopische Analyse der nLacZ-Expression in mES-Zellen vor und nach Transfektion mit dem Multi-Indikator-Plasmid PGK-NIGIL. Übersichts- (A) und Nahaufnahme (B) des ubiquitär nLacZ-positven mES-Zellklons IIE4. (C) Übersichtsaufnahme eines mES-Zellklons mit inhomogener nLacZ-Expression. Die rote Markierung weist auf die Koexistenz homogen nLacZ-positiver und -negativer Zellkolonien hin. (D) Nahaufnahme eines mES-Zellklons mit nLacZ-positiver und -negativen Zellen innerhalb einer mES-Zellkolonie. (E) nLacZ-negative Ursprungs-Zelllinie R1. Maßstäbe: 3 mm (A, C, E), 500  $\mu$ m (B, D).



**Abb. 5:** Detektion von eGFP in mES-Zellen vor und nach Transfektion mit dem Multi-Indikator-Plasmid PGK-NIGIL. (A, B) Aufnahme des eGFP-exprimierenden mES-Zellklons IIE4 mithilfe des konfokalen *Laser Scanning* Mikroskops. (C) Die Ursprungs-Zelllinie R1 zeigt bei gleicher Einstellung des Mikroskops kein eGFP-Signal. Maßstäbe: 50 μm.

# 3.3.2 Southern Blot

Der endgültige Beweis der stabilen Integration des PGK-NIGIL-Konstruktes in das Genom der G418-resistenten, nLacZ- und eGFP-exprimierenden mES-Zellen sollte mit dem *Southern Blot*-Verfahren geliefert werden. Dazu wurde die mit *Pst*l verdaute genomische DNA der mutmaßlich transgenen mES-Zellklone mit einer radioaktiv

markierten, an die nLacZ-Sequenz bindenden DNA-Sonde (827 bp) hybridisiert. Durch den DNA-Verdau mit *Pst*I, das Restriktionsschnittstellen innerhalb des PGK-NIGIL-Konstruktes aufweist, entstand ein die nLacZ-Sequenz enthaltendes, 6,2 kb umfassendes DNA-Fragment (Abb. 6A). Die Detektion von Radioaktivität an diesem definierten DNA-Fragment sollte somit als exakter Nachweis der stabilen Integration von PGK-NIGIL dienen.

Anhand dieser Methode konnte die stabile Integration von PGK-NIGIL in 9 transgenen mES-Zellklonen nachgewiesen werden, unter denen auch Mischklone waren. Bis auf den Klon IIE4 ließ sich allerdings bei allen anderen Klonen neben diesem definierten DNA-Fragment ein weiteres radioaktiv markiertes Fragment nachweisen, das eine Basenlänge von ca. 10 kb aufwies (Abb. 6B). Diese zusätzliche Bande ist wahrscheinlich auf einen unvollständigen Verdau mit *Pstl* zurückzuführen und stellt unverdautes PGK-NIGIL-Plasmid (9913 bp) dar. Nach der Hybridisierung von genomischer DNA des Ursprungsklons R1 mit der gleichen DNA-Sonde ließ sich keine radioaktiv markierte Bande detektieren (Abb. 6B).

Aufgrund der Beobachtungen von eGFP- und nLacZ-Signal sowie des eindeutigen Transgennachweises mittels *Southern Blot* wurden alle weiteren Experimente mit dem mES-Zellklon IIE4 durchgeführt.



**Abb. 6:** Southern Blot-Analyse von mES-Zellen nach Transfektion mit dem Multi-Indikator-Plasmid PGK-NIGIL. (A) Schematische Darstellung der Southern Blot-Strategie. Durch die Restriktion mit *Pst*I entstand zunächst ein die nLacZ-Sequenz

enthaltendes DNA-Fragment (*Pst*I-Fragment, 6212 bp). Anschließend wurde die mES-Zell-DNA mit einer radioaktivmarkierten, an die nLacZ-Sequenz bindenden DNA-Sonde hybridisiert. (B) Im *Southern Blot* ergab sich daher bei Integration des Transgens eine dem *Pst*I-Fragment entsprechende Bande (untere Markierung). In einigen transgenen Zellklonen ließ sich eine weitere, ca. 10 kb große Bande detektieren (obere Markierung), die wahrscheinlich linearisiertem PGK-NIGIL-Plasmid (9913 bp) entspricht. Wildtyp (WT)-DNA vom Ursprungsklon R1 zeigte keine Bande. M: DNA-Längenstandard.

## 3.3.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Zur weiteren Untersuchung der Transgenexpression in mES-Zellen des IIE4-Klons wurden analytische FACS-Untersuchungen durchgeführt. Hierbei wurden zunächst eine nicht transgene Zellpopulation (R1-Stammzellen; Negativkontrolle) und dann der transgene IIE4-Klon untersucht. Der transgene IIE4-Klon (eGFP-positiv) zeigte eine mittlere eGFP-Signalstärke von 4053 (Abb. 7B2) und damit eine um den Faktor 7,03 höhere eGFP-Signalstärke als die nicht transgene R1-mES-Zellpopulation, bei der eine mittlere eGFP-Signalstärke von 576 gemessen wurde (Abb. 7A2). IIE4-Zellen wiesen dabei eine große Heterogenität des eGFP-Signals auf.

Um zu überprüfen, ob sich Zellen des IIE4-Klons von Wildtyp-R1-Zellen per FACS abgrenzen lassen, wurden die Zellpopulationen im Verhältnis 1:1 vermischt und analysiert (Abb. 7C). Die Messung der eGFP-Signalstärke ergab in dieser Mischprobe erwartungsgemäß eine zweigipflige Verteilungskurve, wobei der R1-Klon mit seiner schmalbasigen Verteilung (Autofluoreszenz) gut vom breitbasigen eGFP-Signal des IIE4-Klon abzugrenzen war (Abb. 7C2).

In der Folge wurde ein Grenzwert festgelegt, über den Autofluoreszenz und spezifisches eGFP-Signal getrennt wurden. Bezogen auf die Einzelmessungen (Abb. 7A und B) zeigte sich, dass der Grenzwert die eGFP-positive IIE4-Population (P2) mit hoher Spezifität und Sensitivität markierte: 80,4% der mES-Zellen des IIE4-Klons und lediglich 3.9% der mES-Zellen des R1-Klons (Abb. 7A und 7B).

Eine weitere Darstellung der drei Messungen zeigen die Abbildungen 7A3, 7B3 und 7C3. Zu erkennen ist das Verhältnis von Zellgröße zu eGFP-Signalstärke innerhalb der Population P1 (rot) und ihrer Teilpopulation P2 (grün). Die im Vergleich zum R1-

Klon (Abb. 7A3) wesentlich größere Messwolke des IIE4-Klons (Abb. 7B3) entspricht der größeren Heterogenität der eGFP-Signalstärke in dieser Probe. Die roten Anteile der Messwolke in Abb. 7B3 zeigen die nicht in P2 enthaltenen mES-Zellen des transgenen IIE4-Klons, die grünen Anteile in Abb. 7A3 die in P2 enthaltenen mES-Zellen des Zellen des nicht transgenen R1-Klons. Abb. 7C3 zeigt die entsprechende Messwolke der Mischprobe.



**Abb. 7:** FACS-Analyse von mES-Zellen. (A1-A3) GFP-negative mES-Zellen (R1). (B1-B3) GFP-positive mES-Zellen (IIE4). (C1-C3) Mischprobe aus R1 und IIE4.

## 3.3.4 Nachweis von Stammzellmarkern

Im Anschluss an die Untersuchung der Expression des PGK-NIGIL-Transgens sollte die Pluripotenz des mES-Zellklons IIE4 nachgewiesen werden. Neben der charakteristischen mES-Zellmorphologie in der Standard-ES-Zellkultur (Abb. 8A) deuten das Vorhandensein einer hohen Aktivität der Alkalischen Phosphatase (Abb. 8B) sowie die Expression typischer Stammzellmarker *Oct 3/4* (rot in Abb. 8 la-lc), *Nanog* (gelb in Abb. 8 IIIa-IIIc) und *Stage Specific Embryonic Antigen-1 (SSEA-1;* rot in Abb. 8 IIa-IIc) bereits auf den Erhalt der Pluripotenz vom mES-Zellen IIE4 hin.



**Abb. 8:** Nachweis von Stammzellmarkern in undifferenzierten Multi-IndikatormES-Zellen (IIE4). Lichtmikroskopische Aufnahmen (A) nativer PGK-NIGILtransgener mES-Zellen sowie (B) nach chromogenem Nachweis der Aktivität der Alkalischen Phosphatase mithilfe des *Vector<sup>®</sup> Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit* I. Immunfluoreszenz-färbungen zur Überprüfung der Expression typischer Stammzellmarker in PGK-NIGIL-transgenen mES-Zellen mit Antikörpern gegen Oct 3/4 (Ia-Ic, rot), SSEA-1 (IIa-c, rot) und *Nanog* (IIIa-IIIc, gelb). Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (Ia-IIIc, blau). Maßstäbe: 3 mm (A, B), 50 μm (Ia-IIIc).

# 3.3.5 Differenzierung von PGK-NIGIL-transgenen mES-Zellen

Um die Transgenexpression in differenzierten Zellderivaten des mES-Zellklons IIE4 zu überprüfen, wurde zunächst die Differenzierung von mES-Zellen der besagten Zelllinie mithilfe der "Methode des hängenden Tropfens" initiiert. Die dabei entstandenen Embryoidkörper (*Embryoid Bodies*, EBs) wurden dann für 5 Tage in Suspensions- und anschließend in Adhäsionskultur gehalten. Die Differenzierung der mES-Zellen der Linie IIE4 ergab zunächst die Formierung der EBs mit typischer Morphologie (Abb. 9A). Als Indikator für eine weitreichende Differenzierung wurde der Nachweis spontan kontrahierenden Arealen innerhalb der EBs nach einigen Tagen in der Adhäsionskultur gewertet.

nLacZ-Färbungen zeigten eine Blaufärbung differenzierter EBs (Abb. 9B). Außerdem ließen sich mithilfe des konfokalen *Laser Scanning* Mikroskops überwiegend GFP-positive Zellen innerhalb des EBs nachweisen (Abb. 9C).

# 3.3.5.1 *In vitro*-Pluripotenznachweis

Zur detaillierten Analyse des Differenzierungspotentials wurden mittels Immunfluoreszenz die Strukturproteine Cytokeratin 18 (Krt 1-18), Neurofilament Protein M (NFM) und  $\alpha$ -Aktinin in aus mES-Zellen der Linie IIE4 generierten EBs markiert. Die Ausbildung von Krt 1-18 zeigt dabei die Differenzierung der Zellen in endodermale, die von NFM in ektodermale und die von  $\alpha$ -Aktinin in mesodermale bzw. kardiale Derivate an. Abb. 9 Ia-IIIc zeigt das Vorhandensein der drei genannten Proteine in aus mES-Zellen der Linie IIE4 generierten EBs.



**Abb. 9:** Charakterisierung differenzierter Multi-Indikator-mES-Zellen (IIE4). (A) Lichtmikroskopische Aufnahme eines aus PGK-NIGIL-transgenen mES-Zellen generierten EB's. Lichtmikroskopische Analyse der nLacZ-Expression (B) sowie eGFP-Detektion mittels *Laserscanning* Mikroskop (C) in PGK-NIGIL-transgenen EBs. (Ia-IIIc) Immunfluoreszenzfärbungen PGK-NIGIL-transgener EBs mit Antikörpern gegen *NFM* (Ia, Ic, rot) als Indikator für ektodermale, *Krt 1-18* (IIa, IIc, rot) als Indikator für endodermale und  $\alpha$ -Aktinin (IIIa, IIIc, rot) als Indikator für mesodermale/kardiale Differenzierung. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (Ia-IIIc, blau). Maßstäbe: 5 mm (A), 1 mm (B), 50 µm (C, Ia-Ic), 20 µm (IIa-IIIc).

## 3.3.5.2 *In vivo*-Pluripotenznachweis

Um die Pluripotenz des mES-Zellklons IIE4 auch *in vivo* zu bestätigen, wurden 100.000 Zellen dieses Klons in 10 µl DMEM subkutan jeweils in den Nacken von 2 SCID-Mäusen injiziert. Die transplantieren Zellen bildeten in einem der beiden Tiere nach 14 Tagen ein Teratom mit einem Durchmesser von 27,4 mm aus. Histologisch zeigten sich nach Hämatoxylin&Eosin-Färbungen Knochen- und Knorpelgewebe sowie Epithel vom intestinalen, verhornten und respiratorischen Typ (Abb. 10). Teratome, generiert aus mES-Zellen der Linie R1, zeigten identische Wachstums-, Größen- und Struktureigenschaften



**Abb: 10:** *In vivo*-Pluripotenznachweis von Multi-Indikator-mES-Zellen. (A-E) Hämatoxylin&Eosin-Färbung eines Teratoms 14 Tage nach subkutaner Injektion von mES-Zellen der Linie IIE4 in eine SCID-Maus: Knorpelgewebe (A), Epithel vom respiratorischen Typ (B), Epithel vom verhornten Typ (C), Knochengewebe (D), Epithel vom glandulär-intestinalen Typ. Maßstäbe: 50  $\mu$ m (A-E).

# 3.4 PGK-NIGIL transgene mPS-Zellen

Neben mES-Zellen wurden in unserer Arbeitsgruppe auch mPS-Zellen mit dem PGK-NIGIL-Konstrukt transfiziert (Ergebnisse der Arbeit von P. Christalla und M. Didie). Nach Elektroporation und initialer G418-Selektion wurde die transgene PS-Zelllinie 1F3 etabliert und die stabile Transfektion der Zellen mittels *Southern Blot* (Abb. 11E) bestätigt. 1F3 zeigte eine homogene eGFP- und nLacZ-Expression (Abb. 11A-11B). Die nLacZ-Expression konnte auch *in vivo* in von diesen Zellen stammenden Teratomen nachgewiesen werden (Abb. 11C-11D). Wie schon zuvor bei der Herstellung PGK-NIGIL-transgener mES-Zellen konnten auch unter den transgenen mPS-Zellen Mischklone nachgewiesen werden.



**Abb. 11:** Analyse von mPS-Zellen nach Transfektion mit dem Multi-Indikator-Plasmid PGK-NIGIL. Detektion von eGFP (A) und nLacZ (B) in undifferenzierten mPS-Zellen der Linie 1F3. Die markierten Bereiche stellen jeweils Vergrößerungen dar. (C) Analyse der nLacZ-Expression in einem von 1F3-mPS-Zellen ausgehendem Teratom, Sternchen kennzeichnet n-LacZ-negatives Ursprungsgewebe. (D) Mikroskopische Darstellung eines LacZ-gefärbten Paraffin-Schnittes innerhalb des Teratoms. (E) *Southern Blot*-Analyse von 1F3. M: DNA-Längenstandard. Maßstäbe: 100 μm (A-B), 2 mm (C), 20 μm (D).

# 3.5 EF1<sub>α</sub>- NIGIL-transgene hES-Zellen

Das EF1α-NIGIL-Konstrukt diente der Generierung einer humanen Multi-Indikator-ES-Zelllinie. Die Kultivierung und genetische Manipulation der hES-Zellen wurde von C. Rogge und A. Hansen durchgeführt. Im Anschluss an die Elektroporation konnten in der LacZ-Färbung lediglich Mischklone von nLac-positiven und –negativen hES-Zellen identifiziert werden (Abb. 12A-12B). Erwartungsgemäß ließ sich mittels FACS lediglich eine unvollständige eGFP-Expression (37,6% eGFP-positive Zellen in der vermeintlichen hES-Zellpopulation [P2 in Abb 13B]) der EF1-NIGIL-transgenen hES-Zellen nachweisen (Abb. 13A-13B). Auch nach mehrfacher Subklonierung eGFPpositiver hES konnte keine stabile Zelllinie etabliert werden.



**Abb. 12:** Mikroskopische Analyse der nLacZ-Expression in hES-Zellen nach Transfektion mit dem Multi-Indikator-Plasmid EF1α-NIGIL. (A, B) nLacZ-Expression im hES-Zellklon IIB3. Maßstäbe: 3 mm.



**Abb. 13:** FACS-Analyse von hES-Zellen. (A) GFP-negative hES-Zellen. (B) GFP-positive hES-Zellen (IIB3).

# 4 Diskussion

ES-Zellen werden aufgrund ihrer unbegrenzten Teilungsfähigkeit und ihrer Fähigkeit zur kardialen Differenzierung als eine potentielle Quelle für die zellbasierte Therapie der Herzinsuffizienz diskutiert. Die unzureichende Effizienz der spontanen kardialen Differenzierung, immunologische Unverträglichkeit, ethische Bedenken und die mögliche Ausbildung von Tumoren limitieren den Einsatz von ES-Zellen in einem klinischen Kontext.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Multi-Indikator-Modell für murine und humane ES-Zellen sowie für ES-Zell-ähnliche Zellen (PS-Zellen) etabliert werden. Dieses Modellsystem soll schließlich dazu dienen, die Anwendung von Stammzellen in der Zell-basierten kardialen Reparatur detailliert überprüfen zu können. Im Gegensatz zu bereits etablierten Zellmarkierungsmodellen sollte hier erstmals eine genetische einerseits Dreifachmarkierung erfolgen, um durch die Expression eines fluoreszierenden Proteins Lebendzelldarstellungen sowie FACS-Aufreinigung von ES-Zellen und deren Derivaten zu ermöglichen und andererseits durch Expression einer kernständigen β-Galaktosidase eine eindeutige Markierung auch in stark autofluoreszierenden histologischen Präparaten (wie z.B. dem Herzgewebe) zu erlauben. Die zusätzliche Anwendung einer Antibiotikaresistenz sollte eine Selektion von ES-Zellen sowie deren Derivaten in Mischkulturen ermöglichen.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- Es konnten Multi-Indikator-Plasmide mit einer cDNA, die f
  ür eine Neomycinresistenz sowie eGFP und nLacZ kodiert, unter der Kontrolle von ubiquit
  ären Promotoren (PGK und EF1) generiert werden.
- 2. Es konnten PGK-NIGIL-transgene mES-Zelllinien generiert werden.
- 3. Die stabile Integration des PGK-NIGIL-Transgens in das mES-Zell-Genom konnte mittels *Southern Blot*-Verfahren nachgewiesen werden.
- 4. Undifferenzierte PGK-NIGIL-transgene mES-Zellen zeigten eine überwiegend homogene Expression von eGFP und nLacZ.
- 5. Differenzierte PGK-NIGIL-transgene mES-Zellderivate zeigten eine überwiegend homogene Expression von eGFP und nLacZ.
- 6. PGK-NIGIL-transgene mES-Zellen lassen sich FACsortieren.
- 7. PGK-NIGIL-transgene mES-Zellen sind pluripotent.

- 8. Das PGK-NIGIL-Markierungskonzept ließ sich auch in mPS-Zellen anwenden.
- EF1α-NIGIL-transgene hES-Zellen zeigten eine unzureichende und lediglich transiente Transgenexpression.

## 4.1 PGK-NIGIL und EF1α-NIGIL

Die Markierung von Zellen mittels Reportergenen ist eine geeignete Methode, um ihr Verhalten *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen (Rubart et al. 2003, Roell et al. 2002, Kolossov et al. 2006). Als Reporter haben sich sowohl β-Galaktosidase als auch Fluorochrome, wie GFP, *yellow Fluorescent Protein* (YFP) oder *Cyan Fluorescent Protein* (CFP), bewährt (Chalfie et al. 1994, Kain and Ganguly 2001). Für die Entwicklung und Nutzbarmachung grün fluoreszierender Proteine sowie deren Derivate zur Lebendzellmarkierung wurde im Jahr 2008 der Nobelpreis für Chemie an O. Schimomura, M. Chalfie und R. Tsien verliehen.

Neben der Beobachtung des Zellverhaltens in Lebendkultur erlaubt die Fluorochromexpression die Identifikation und Isolierung der Zellen mittels FACS. Bei der Detektion von Fluorochrom-exprimierenden Zellen *in vivo* kann allerdings eine vom Empfängergewebe ausgehende sogenannte Autofluoreszenz störend sein. Da gerade das Myokard und hier vor allem infarziertes Gewebe einen hohen Grad an Autofluoreszenz aufweist (Jackson et al. 2004, Billinton und Knight 2001), kann die Expression eines Fluorochroms als alleiniger Reporter für die Untersuchung des Verhaltens von intramyokardial applizierten Zellen aufgrund mangelnder Spezifität nicht gut geeignet sein.

Das für die bakterielle  $\beta$ -Galaktosidase kodierende nLacZ-Transgen ermöglicht die eindeutige Kennzeichnung von Zellen auch in fixierten, stark autofluoreszierenden Präparaten. Der Vorteil der LacZ-Färbung ist, dass die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität auch durch quervernetzende Fixative (Formaldehyd und Glutaraldehyd) bei kurzer Einwirkzeit kaum in Mitleidenschaft gezogen wird. Bei der Metabolisierung von X-Gal durch die  $\beta$ -Galaktosidase entsteht durch einen enzymatischen Prozess ein blauer Farbstoff, der den Zellkern der transgenen Zellen deutlich sichtbar anfärbt. Somit ist dies eine geeignete Methode, um gerade in den Herzmuskel applizierte Zellen mit hoher Sensitivität und Spezifität in histologischen Präparaten zu identifizieren. Die zugrunde liegende Hypothese dieser Promotionsarbeit war, dass die gleichzeitige Expression eines fluoreszierenden Proteins und eines β-Galaktosidase-Systems eine optimale Zellmarkierung in Stammzellen ermöglicht, ohne dabei deren Differenzierungskapazität zu beeinträchtigen. Das Modell sollte zum einen eine Analyse des Zellverhaltens in Lebendkulturen (eGFP) und die Aufreinigung transgener Zellen aus Mischkulturen per FACS (eGFP) ermöglichen. Zum anderen sollte es in Implantationsstudien zu einer eindeutigen Abgrenzung transgener, implantierter Zellen von nativem Myokard (nLacZ) verhelfen. Durch die in dem Modell enthaltene Selektionskassette (Neomycinresistenz) sollten die transgenen Zellen schonend selektioniert werden. Hierfür wurde das von unserer Arbeitsgruppe (S. Döker) entwickelte NIGIL-Konstrukt verwandt.

Die stabile, ubiquitäre NIGIL-Transgenexpression muriner ES-Zellen sollte unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven PGK-Promotors stattfinden, dessen Eignung für die Herstellung transgener muriner Zellen gut belegt ist (Klug et al. 1996, Wobus und Boheler 2005). Für die Entwicklung NIGIL-transgener humaner ES-Zellen wurde in dieser Arbeit auf den EF1 $\alpha$ -Promotor zurückgegriffen, der im Vergleich zum PGK-Promotor eine stabilere Transgenexpression in humanen ES-Zellen, vor allem in deren differenzierten Derivaten gewährleisten soll (Liu et al. 2004, Liu et al. 2008, Norrman et al. 2010).

### 4.2PGK-NIGIL-transgene mES-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich PGK-NIGIL-transgene mES-Zellen herstellen lassen. Eine weitestgehend homogene Transgenexpression konnte morphologisch in Form von nLacZ- und eGFP-positiven mES-Zellen nachgewiesen werden. Diese ließ sich auch in von ihnen abgeleiteten differenzierten Zellderivaten feststellen. Die Bestätigung der stabilen Integration des NIGIL-Transgens in das mES-Zellgenom gelang mittels Southern Blot. Mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen konnte demonstriert werden, dass undifferenzierte PGK-NIGIL-transgene mES-Zellen in **ES-Zellmarker** vitro wie Alkalische Phosphatase, Oct 3/4, Nanog und SSEA-1 exprimieren. Der Nachweis dieser Marker in undifferenzierten mES-Zellen lässt auf Pluripotenz und damit auf das Potential zur Differenzierung in Derivate aller drei Keimblätter schließen (Berrill et al. 2004, Nichols et al. 1998, Chambers et al. 2003). Es ließen sich darüber hinaus aus PGK- NIGIL-transgenen mES-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ekto-, endo- und mesodermale Zellderivate generieren. Wichtig für das postulierte Markierungskonzept ist der Erhalt der Reportersignale auch nach Zelldifferenzierung. Die in dieser Arbeit generierten Daten weisen darauf hin, dass die genetische Manipulation das Differenzierungsverhalten nicht beeinflusst hat.

Es muss angemerkt werden, dass das nLacZ-Signal in PGK-NIGIL-transgenen mES-Zellen nicht eindeutig nukleär lokalisiert war. Dies ist am ehesten mit einer unzureichenden Formaldehydfixierung der Zellen mit konsekutiver Kernlyse und Entweichung der  $\beta$ -Galaktosidase in das Zytoplasma zu erklären. Der Nachweis einer eindeutigen Kernlokalisation des LacZ-Signals in PGK-NIGIL- und EF1 $\alpha$ transgenen PS- bzw. hES-Zellen weist zumindest darauf hin, dass es sich hierbei nicht um eine grundsätzliche Fehlfunktion des Transgens handelt.

Als weitere Limitation dieser Arbeit kommt hinzu, dass unter den PGK-NIGILtransgenen mES-Zellklonen keine eindeutig ubiquitäre Transgenexpression - wie ursprünglich angestrebt - gezeigt werden konnte. Alle PGK-NIGIL-transgenen mES-Zellkone wiesen ein mosaikartiges Transgenexpressionsmuster von allerdings unterschiedlichem Ausmaß auf. Da sich auch durch erneute G418-Selektion keine homogene Transgenexpression dieser Klone erreichen ließ (eigene Beobachtung), ist nicht davon auszugehen, dass die unvollständige Transgenexpression aufgrund einer Kontamination des Klons mit nicht-transgenen mES-Zellen zustande kommt. Möglicherweise ist das beobachtete Phänomen auf sogenanntes Silencing von Transgenen zurückzuführen, bei dem die Expression von Transgenen oder bestimmter Abschnitte der Transgene aktiv durch DNA-Methylierung abgeschaltet wird. Es ist bekannt, dass Transgen-Silencing die Verwendung gentechnisch manipulierter ES-Zellen limitieren kann (Wang et al. 2008, Boheler et al. 2002, Wobus und Boheler 2005). Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass bei der gentechnischen Manipulation von ES-Zellen immer mit einer unvollständigen Transgenexpression gerechnet werden muss, selbst wenn die stabile Integration des Transgens auf DNA-Ebene nachgewiesen wurde. Dies muss vor allem dann bedacht werden, wenn Transgene zell- oder organspezifisch exprimiert werden sollen, da Silencing-Vorgänge in diesem Fall weniger offensichtlich sind als in der vorliegenden Arbeit. Unter Umständen hängt das Auftreten von *Silencing* mit der ungerichteten Integration des Transgens in das ES-Zell-Genom zusammen und ließe sich vermeiden, wenn Transgene gezielt in definierte *loci* des Genoms, z.B. *ROSA*- oder *HPRT-locus*, eingebracht würden (Teng et al. 2003).

Zusammenfassend lässt sich jedoch feststellen, dass sich auch mittels ungerichteter Integration des PGK-NIGIL-Konstrukts geeignete murine Multi-Indikator-ES-Zelllinien mit einer überwiegend homogenen Zellmarkierung unter der Voraussetzung herstellen lassen, dass mehrere transgene Zelllinien isoliert und analysiert werden (Anzahl der isolierten PGK-NIGIL-transgenen Zelllinien in dieser Arbeit = 14).

### 4.3Zukünftige Verwendung PGK-NIGIL-transgener mES-Zellen

Die in dieser Arbeit generierte PGK-NIGIL-transgene mES-Zelllinie ermöglicht die Durchführung einer Reihe von Untersuchungen, die wichtige Erkenntnisse über das kardiale Differenzierungspotential und die Tumorigenität von ES-Zellen liefern könnten.

Einige Implantationsstudien konnten zeigen, dass die lokale kardiale Umgebung die Differenzierung unreifer Kardiomyozyten fördert (Reinecke et al. 1999, Muller-Ehmsen et al. 2002, Zimmermann et al. 2002). Es besteht daher die Hoffnung, dass auch die Differenzierung von ES-Zellen durch ein kardiales Milieu beeinflusst wird. Dabei könnten sowohl parakrin vermittelte Effekte als auch direkte Zell-Zell-Interaktion die Zellen dazu veranlassen, einen kardialen Differenzierungsweg einzuschlagen. Eine fundamentale Frage ist also, wie sich ES-Zellen in einem kardialen Milieu verhalten, bzw. ob ein kardiales Milieu die Differenzierung von ES-Zellen in einen kardialen Zelltyp in irgendeiner Weise beeinflusst. Da natives Myokard bis zu 70% aus "Nicht-Kardiomyozyten", d.h. Endothelzellen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Nervenzellen und Leukozyten, besteht (Nag und Zak 1979), die ebenfalls von großer Bedeutung für die kardiale Entwicklung und Funktion sind (Long et al. 1991, Shah et al. 1996, Gray et al. 1998), sollten sich diesbezügliche Untersuchungen nicht ausschließlich auf die Entstehung von Kardiomyozyten konzentrieren. Eine eindeutige Markierung Stammzellderivaten, von wie exemplarisch im Teratommodell im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, sollte in diesem Kontext wichtige Befunde liefern.

Singla et al. (Singla et al. 2006) konnten zeigen, dass allogene undifferenzierte mES-Zellen 2 Wochen nach Transplantation in infarzierte Herzen von immunkompetenten tatsächlich Herzmuskelzellen glatte Muskelzellen Mäusen in sowie und Endothelzellen differenzieren. Zugleich konnte in diesem Modell eine Verbesserung der Herzfunktion nach myokardialer Zellinjektion nachgewiesen werden. In nichtinfarzierten Herzen zeigte sich nur noch ein verschwindend geringer Anteil der implantierten mES-Zellen. In einer anderen Arbeit von Behfar et al. (Behfar et al. 2002) zeigte sich, dass sowohl die Co-Kultur von undifferenzierten mES-Zellen mit postmitotischen Kardiomyozyten als auch die Transplantation der Zellen in infarzierte und nicht-infarzierte Mäuseherzen die kardiale Differenzierung fördern. Dabei soll sowohl in vitro als auch in vivo den Signalproteinen transforming growth factor  $\beta 1$ (TGF-β) und Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) eine entscheidende Bedeutung zukommen. Auch hier verbesserte sich im Infarktmodell die Herzfunktion nach Transplantation von ES-Zellen. Tumorwachstum wurde in keiner der beiden Studien beobachtet.

Diese Arbeiten stehen im Kontrast zu Studien von Nussbaum et al. (Nussbaum et al. 2007) und Kolossov et al. (Kolossov et al. 2006), die nach der Implantation von undifferenzierten mES-Zellen in infarzierte und nicht-infarzierte Herzen der Maus weder eine Förderung der kardialen Differenzierung der ES-Zellen noch deren strukturelle Integration in das Empfängergewebe beobachteten. Hingegen kam es in fast allen Fällen zur Ausbildung von Teratomen innerhalb des Myokards, was als Ausdruck einer unkontrollierten Vermehrung und Differenzierung der ES-Zellen zu werten ist.

Nach Singla scheint die Tumorigenität *in vivo* abhängig von der Dosis bzw. der absoluten Zahl injizierter ES-Zellen sowie von dem umgebenden Zellmilieu zu sein. Es besteht die Vermutung, dass Teratome insbesondere dann entstehen, wenn die ES-Zellen dieses Milieu nach Implantation quantitativ dominieren. Bei niedrigen ES-Zelldosen oder –zahlen soll das vom Empfängergewebe dominierte Milieu die Ausdifferenzierung der ES-Zellen *in vivo* fördern und einer Teratomentstehung somit entgegen wirken (Singla 2009).

Die ausgeprägte Divergenz der geschilderten Ergebnisse verdeutlicht zum einen, dass der tatsächliche Einfluss einer kardialen Umgebung auf die Differenzierung von ES-Zellen sowie die Umstände des ES-Zell-induzierten Tumorwachstums weiterhin unklar bleiben. Zum anderen deutet sie aber auch darauf hin, dass der Vorgang der ES-Zell-Differenzierung einen sehr komplexen und unter Umständen sehr störanfälligen Prozess darstellt, was die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen erschwert.

In den genannten Arbeiten wurden ebenfalls, wie in der vorliegenden Arbeit, Indikator-mES-Zellen verwendet, die allerdings nur durch jeweils ein Reportergen markiert waren (GFP oder LacZ). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Multi-Indikator-mES-Zelllinie mit einem dualen Reporter-System generiert, mit der in Zukunft der Einfluss einer kardialen Umgebung auf das Verhalten von mES-Zellen in vitro und in vivo besser untersucht werden kann. Die Zellen lassen sich nämlich unabhängig von ihrem Differenzierungsgrad jederzeit in Lebendkulturen und in fixierten Präparaten verlässlich verfolgen. So kann man das Verhalten undifferenzierter mES-Zellen nach intramyokardialer Applikation hinsichtlich der Entstehung kardialer Zelltypen sowie möglicher von ihnen ausgehender Tumore exakt analysieren und beispielsweise mit dem Verhalten von zuvor in vitro systematisch vordifferenzierten mES-Zellderivaten vergleichen, um den Effekt verschiedener Differenzierungsstadien auf das kardiogene und tumorigene Potential der Zellen in vivo zu prüfen. Gerade die Schwächen eines rein Fluoreszenz-basierten Ansatzes sollen mit dem geschaffenen Modell überwunden werden

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, lässt sich der überwiegende Teil der Multi-Indikator-mES-Zellen anhand der eGFP-Expression auch mittels FACS identifizieren. Dadurch wird die Möglichkeit geboten, mES-Zellen, die zunächst *in vitro* mit kardialen Zellen, z.B. postmitotischen Kardiomyozyten oder kardialen Fibroblasten, co-kultiviert wurden, anschließend mittels FACS wieder zu isolieren. Mithilfe morphologischer sowie molekularbiologischer Untersuchungen dieser Zellen kann so der Einfluss einer künstlich geschaffenen kardialen Umgebung auf das Verhalten von mES-Zellen *in vitro* untersucht werden.

#### 4.4PGK-NIGIL-transgene mPS-Zellen

Das in dieser Arbeit generierte PGK-NIGIL-Modell ließ sich auch auf mPS-Zellen übertragen. Auch hier konnte die stabile Integration des Transgens mittels *Southern Blot*, sowie eine überwiegend homogene eGFP- und nLacZ- Expression der Zellen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. Die erfolgreiche Transfektion der Zellen für stabile gentechnische Manipulation. Die stabile gentechnische Manipulation weiterer Transgen-Modelle (s.u.) in diesem Zellsystem. Daneben lassen sich mithilfe des Multi-Indikator-mPS-Zell-Modells Untersuchungen hinsichtlich der Tumorigenität sowie des kardialen Entwicklungspotentials der parthenogenetisch erzeugten Zellen *in vitro* und *in vivo* - analog zur zukünftigen Verwendung PGK-NIGIL-transgener, klassischer mES-Zellen - durchführen. Die Tatsache, dass das PGK-NIGIL-Modell auch außerhalb eines Kontextes mit klassischen mES-Zellen erfolgreich angewendet werden konnte, eröffnet zudem die Möglichkeit, es in Zukunft für die Etablierung weiterer mES-Zellalternativen (z.B. iPS-Zellen oder SSCs) zu verwenden.

#### 4.4EF1α-NIGIL-transgene hES-Zellen

Für die Entwicklung einer humanen Multi-Indikator-ES-Zelllinie wurde in der vorliegenden Arbeit das EF1 $\alpha$ -NIGIL-Konstrukt hergestellt. Zwar ließen sich nach der Transfektion der hES-Zellen in der Zellkultur LacZ- und eGFP-positive Zellen nachweisen, jedoch zeigte keine der EF1a-NIGIL-transgenen Zelllinien eine ausreichend homogene Transgenexpression. Auch mittels intensiver G418-Selektion ließ sich keine homogene Transgenexpression herbeiführen. Es ist demnach möglich, dass es sich auch hier um einen Silencing-Vorgang handelt, der zu unvollständiger Transgenexpression führt. Die gezielte Integration der Transgene in einen definierten genomischen Lokus (s.o.) könnte hier eventuell von Vorteil sein. Zusammenfassend lässt sich die Bedeutung des EF1α-NIGIL-Modells für hES-Zellen anhand der bisher erzielten Ergebnisse nicht abschließend beurteilen. Sie zeigen lediglich, dass das NIGIL-Transgen grundsätzlich auch in hES-Zellen exprimiert werden Möglicherweise kann. lassen sich jedoch in Zukunft mit der Weiterentwicklung der technisch bisher sehr aufwändigen hES-Zellkultur und -Transfektion bessere Ergebnisse erzielen.

#### 4.5 Herzspezifische NIGIL-Expression

Anhand der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lässt sich feststellen, dass es zumindest in murinen Stammzellen zu einer stabilen NIGIL-Transgenexpression unter Wahrung der Pluripotenz der Zellen kommen kann. Welche zukünftigen experimentellen Möglichkeiten die Entwicklung von Zellen mit ubiguitärer NIGIL-Expression bietet, wurde bereits erwähnt. Der Nachweis der grundsätzlichen Umsetzbarkeit des NIGIL-Konzepts auf ES-Zell-Ebene rechtfertigt zudem die Herstellung einer ES-Zelllinie mit organspezifischer NIGIL-Expression. In unserer Arbeitsgruppe ist bereits eine mES-Zelllinie mit herzspezifischer NIGIL-Expression generiert worden (Dr. C. Rogge). Dabei wird das NIGIL-Transgen unter der Kontrolle des herzspezifischen  $\alpha$ MHC-Promotors exprimiert. Zusätzlich enthält das Konstrukt eine ubiquitäre Hygromycinresistenz (unter der Kontrolle des PGK-Promotors) zur Selektion der transgenen Zellen. Dieses Modell ermöglicht demnach die pharmakologische Selektion von aus mES-Zellen entstandenen Kardiomyozyten mittels Neomycin (bzw. G418) sowie die Identifikation von Herzmuskelzellen in vitro und in vivo mithilfe der Reportergene eGFP und nLacZ. Die Kardiomyozytenspezifische Selektion der Zellen könnte einerseits den Kardiomyozyten-Anteil in Differenzierungskulturen erhöhen und andererseits die Neigung der Zellen zur tumorigenen Entartung reduzieren. Des Weiteren können mit  $\alpha$ MHC-NIGILtransgenen mES-Zellen, z.B. durch Analyse der Zellteilungsaktivität von Kardiomyozyten mithilfe der β-Galaktosidase, Faktoren identifiziert werden, die eine Ausbildung von Herzmuskelgewebe fördern oder gegensätzliche Effekte hervorrufen. Problematisch ist, dass in diesem Modell ein partielles Silencing des Transgens zunächst unerkannt bleibt, was die Aussagekraft von erzielten Ergebnissen reduzieren kann. Daher sollten auch hier vor einer experimentellen Nutzung der Zellen mehrere transgene Zelllinien isoliert und die Transgenexpression über einen längeren Zeitraum analysiert werden.

### 4.7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte ein transgenes Multi-Indikator-Modell für murine ES- und PS-Zellen sowie für humane ES-Zellen entwickelt und im Falle der murinen Zellen auch erfolgreich validiert werden. Das etablierte Multi-Indikator-Modell soll Untersuchungen zum Differenzierungspotential von Stammzellen *in vitro* und *in vivo* 

unterstützen. Im Tierexperiment ist bereits gezeigt worden, dass fetale und neonatale Kardiomyozyten im Gegensatz zu adulten Herzmuskelzellen in Empfängerherzen überleben und über die Expression der Proteine Connexin 43 und N-Cadherin eine Kopplung mit ansässigen Zellen des Empfängergewebes eingehen (Reinecke et al. 1999). Derartige Untersuchungen zur Zell-Zell-Kopplung von ES-Zellen und deren differenzierter Derivate könnten mit dem vorliegenden Modell einfach und verlässlich durchgeführt werden. Neben der Zellintegration könnten mit diesem Modell außerdem Studien hinsichtlich Zellzyklusaktivität und Zelltod (Apoptose) nach Implantation *in vivo* sowie *in vitro* in Ko-Kultur-Experimenten wichtige neue Erkenntisse für die ES-Zell-basierte Therapie liefern.

Da die Etablierung einer stabilen, humanen Multi-Indikator-ES-Zelllinie bislang nicht gelungen ist, sollte hierfür in Zukunft, neben der Weiterentwicklung der Zellkulturbedingungen, die gezielte Transgenintegration in definierte Gen-*loci* (z.B. *ROSA-* oder *HPRT-locus*) erprobt werden (Dai et al. 2007).

Mit der Herstellung einer für das Multi-Indikator-Modell kodierenden DNA-Sequenz sollte auch die Schaffung eines transgenen NIGIL-Mausmodells möglich werden. Mithilfe eines solchen Tiermodelles ließen sich die Organspezifität der NIGIL-Expression unter entsprechender Promotorkontrolle überprüfen und in der Folge Transgen-markierte neonatale oder adulte Herzzellen für weitere Untersuchungen Ein Kardiomyozyten-spezifisches NIGIL-Modell ist von gewinnen. unserer Arbeitsgruppe bereits für mES-Zellen entwickelt worden. Wie aktuelle Arbeiten zeigen, lassen sich zudem in ES-Zellkulturen teilungsfähige, kardiale Vorläuferzellen finden, aus denen eine ganze Reihe verschiedener, kardialer Zelltypen entstehen können (Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen oder Endothelzellen) (Laugwitz et al. 2005, David et al. 2008, Moretti et al. 2006). Sollten in Zukunft diesbezüglich Zellspezifisch exprimierte Gene/Promotoren identifiziert werden, ließe sich auch ein Multi-Indikator-Modell speziell für diesen vielversprechenden Zelltyp entwickeln.

# 5 Zusammenfassung

<u>Hintergrund:</u> Die Mortalität von Patienten mit Herzinsuffizienz ist trotz Fortschritten in der medikamentösen Therapie noch sehr hoch, die Herztransplantation als letzte Therapieoption nur limitiert anwendbar. Der Verlust von Muskelgewebe lässt sich derzeit therapeutisch noch nicht beheben. Vielversprechend sind diesbezüglich die sogenannten zellbasierten Therapien, die den Ersatz des zugrunde gegangenen Gewebes zum Ziel haben. Hierfür wären embryonale Stammzellen (ES-Zellen) aufgrund ihrer unbegrenzten Teilungsfähigkeit sowie ihrer Fähigkeit zur kardialen Reifung eine potentiell geeignete Quelle. Die unzureichende Effizienz der spontanen kardialen Differenzierung, immunologische Unverträglichkeiten, ethische Bedenken sowie die mögliche Tumorigenität haben den klinischen Einsatz von ES-Zellen bisher verhindert. In der vorliegenden Arbeit sollte ein Multi-Indikator-Modell für murine und humane ES-Zellen (mES- und hES-Zellen) sowie für parthenogenetische Stammzellen (PS-Zellen) etabliert werden, über das Zellen unter Wahrung ihrer Pluripotenz mittels stabiler Expression von Reportergenen ubiquitär markiert werden.

<u>Methoden:</u> Es wurden zwei Multi-Indikator-Plasmide (PGK-NIGIL, EF1α-NIGIL) kloniert. Beide Transgen-Modelle wurden in HEK293T-Zellen getestet. Anschließend wurde die NIGIL-Sequenz unter ubiquitär aktiver Promotorkontrolle in das Genom von unterschiedlichen pluripotenten Stammzellen (ES- und PS-Zellen) integriert und diese in verschiedenen Differenzierungsstadien mittels Lichtmikroskopie, konfokaler Laserscanning Mikroskopie, *Southern Blot, Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) und Immunfluoreszenz sowie im histologischen Präparat nach subkutaner Injektion in immundefiziente Mäuse untersucht.

<u>Ergebnisse</u>: Nach erfolgreicher Klonierung der PGK-NIGIL und EF1α-NIGIL DNA-Sequenzen wurde deren Funktionsfähigkeit zunächst in HEK293T-Zellen demonstriert. Anschließend wurden PGK-NIGIL-transgene mES-Zellen hergestellt, die eine überwiegend homogene eGFP- und nLacZ-Expression zeigten und von denen der überwiegende Teil per FACS anhand der eGFP-Expression auch in Mischkulturen identifiziert werden konnte. Mittels *Southern Blot* gelang zudem der Nachweis der stabilen Integration des NIGIL-Transgens in das mES-Zellgenom. Mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen konnte demonstriert werden, dass undifferenzierte PGK-NIGIL-transgene mES-Zellen *in vitro* typische ES-Zellmarker wie Alkalische Phosphatase, *Oct 3/4, nanog* und *SSEA-1* exprimieren. Des Weiteren ließen sich aus PGK-NIGIL-transgenen mES-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ekto-, endo- und mesodermale Zellderivate generieren. Das PGK-NIGIL-Modell wurde daraufhin erfolgreich auf mPS-Zellen übertragen. EF1 $\alpha$ -NIGIL-transgene hES-Zellen zeigten hingegen eine unzureichende Transgenexpression.

<u>Schlussfolgerung:</u> In der vorliegenden Arbeit konnte ein transgenes Multi-Indikator-Modell für murine ES- und PS-Zellen sowie für humane ES-Zellen entwickelt und im Falle der murinen Zellen auch erfolgreich validiert werden. Dieses Modell soll weiterführende Untersuchungen zum kardialen Entwicklungspotentials und der Tumorigenität von ES- bzw. PS- Zellen *in vitro* und *in vivo* unterstützen.

## 6 Literaturverzeichnis

Allen ND, Barton SC, Hilton K, Norris ML & Surani MA (1994) A functional analysis of imprinting in parthenogenetic embryonic stem cells. Development 120: 1473-82.

Bader A, Al-Dubai H & Weitzer G (2000) Leukemia inhibitory factor modulates cardiogenesis in embryoid bodies in opposite fashions. Circ Res 86: 787-94.

Bader A, Gruss A, Hollrigl A, Al-Dubai H, Capetanaki Y & Weitzer G (2001) Paracrine promotion of cardiomyogenesis in embryoid bodies by LIF modulated endoderm. Differentiation 68: 31-43.

Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, Rauzier JM, Kane GC, Terzic A & Puceat M (2002) Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. FASEB J 16: 1558-66.

Berrill A, Tan HL, Wuang SC, Fong WJ, Choo AB & Oh SK (2004) Assessment of Stem Cell Markers During Long-Term Culture of Mouse Embryonic Stem Cells. Cytotechnology 44: 77-91.

Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, Ling LE, Karanu FN & Bhatia M (2001) Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. Nat Immunol 2: 172-80.

Billinton N & Knight AW (2001) Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. Anal Biochem 291: 175-97.

Biswas A & Hutchins R (2007) Embryonic stem cells. Stem Cells Dev 16: 213-22.

Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV & Wobus AM (2002) Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. Circ Res 91: 189-201.

Bonnevie L, Bel A, Sabbah L, Al Attar N, Pradeau P, Weill B, Le Deist F, Bellamy V, Peyrard S, Menard C, Desnos M, Bruneval P, Binder P, Hagege AA, Puceat M & Menasche P (2007) Is xenotransplantation of embryonic stem cells a realistic option? Transplantation 83: 333-5. Bradley A, Evans M, Kaufman MH & Robertson E (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. Nature 309: 255-6.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW & Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263: 802-5.

Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S & Smith A (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. Cell 113: 643-55.

Chiu RC, Zibaitis A & Kao RL (1995) Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. Ann Thorac Surg 60: 12-8.

Christalla P (2010) Entwicklung von bioartifiziellem Herzgewebe aus parthenogenetischen Stammzellen der Maus (Mus musculus, Linnaeus, 1758). Dissertation Fachbereich Biologie, Universität Hamburg.

Cibelli JB, Grant KA, Chapman KB, Cunniff K, Worst T, Green HL, Walker SJ, Gutin PH, Vilner L, Tabar V, Dominko T, Kane J, Wettstein PJ, Lanza RP, Studer L, Vrana KE & West MD (2002) Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. Science 295: 819.

Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, Aicher W, Buhring HJ, Mattheus U, Mack A, Wagner HJ, Minger S, Matzkies M, Reppel M, Hescheler J, Sievert KD, Stenzl A & Skutella T (2008) Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. Nature 456: 344-9.

Dai W, Field LJ, Rubart M, Reuter S, Hale SL, Zweigerdt R, Graichen RE, Kay GL, Jyrala AJ, Colman A, Davidson BP, Pera M & Kloner RA (2007) Survival and maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in rat hearts. J Mol Cell Cardiol 43: 504-16.

David R, Brenner C, Stieber J, Schwarz F, Brunner S, Vollmer M, Mentele E, Muller-Hocker J, Kitajima S, Lickert H, Rupp R & Franz WM (2008) MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation through Dkk-1-mediated blockade of Wnt-signalling. Nat Cell Biol 10: 338-45. Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W & Kemler R (1985) The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J Embryol Exp Morphol 87: 27-45.

Evans MJ & Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 292: 154-6.

Fandrich F, Lin X, Chai GX, Schulze M, Ganten D, Bader M, Holle J, Huang DS, Parwaresch R, Zavazava N & Binas B (2002) Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. Nat Med 8: 171-8.

Fukuda K (2003) Application of mesenchymal stem cells for the regeneration of cardiomyocyte and its use for cell transplantation therapy. Hum Cell 16: 83-94.

Gray MO, Long CS, Kalinyak JE, Li HT & Karliner JS (1998) Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. Cardiovasc Res 40: 352-63.

Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W & Hasenfuss G (2006) Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. Nature 440: 1199-203.

Guan K, Wagner S, Unsold B, Maier LS, Kaiser D, Hemmerlein B, Nayernia K, Engel W & Hasenfuss G (2007) Generation of functional cardiomyocytes from adult mouse spermatogonial stem cells. Circ Res 100: 1615-25.

Hassink RJ, Pasumarthi KB, Nakajima H, Rubart M, Soonpaa MH, de la Riviere AB, Doevendans PA & Field LJ (2008) Cardiomyocyte cell cycle activation improves cardiac function after myocardial infarction. Cardiovasc Res 78: 18-25.

Hodgson DM, Behfar A, Zingman LV, Kane GC, Perez-Terzic C, Alekseev AE, Puceat M & Terzic A (2004) Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol 287: H471-9.

Hoppe UC, Bohm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA & Erdmann E (2005) [Guidelines for therapy of chronic heart failure]. Z Kardiol 94: 488-509.

Jackson KA, Snyder DS & Goodell MA (2004) Skeletal muscle fiber-specific green autofluorescence: potential for stem cell engraftment artifacts. Stem Cells 22: 180-7.

Kain SR & Ganguly S (2001) Overview of genetic reporter systems. Curr Protoc Mol Biol Chapter 9: Unit9 6.

Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J & Gepstein L (2001) Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. J Clin Invest 108: 407-14.

Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY & Field LJ (1996) Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embronic stem cells form stable intracardiac grafts. J Clin Invest 98: 216-24.

Ko K, Arauzo-Bravo MJ, Tapia N, Kim J, Lin Q, Bernemann C, Han DW, Gentile L, Reinhardt P, Greber B, Schneider RK, Kliesch S, Zenke M & Scholer HR (2010) Human adult germline stem cells in question. Nature 465: E1; discussion E3.

Kofidis T, deBruin JL, Tanaka M, Zwierzchoniewska M, Weissman I, Fedoseyeva E, Haverich A & Robbins RC (2005) They are not stealthy in the heart: embryonic stem cells trigger cell infiltration, humoral and T-lymphocyte-based host immune response. Eur J Cardiothorac Surg 28: 461-6.

Kolossov E, Bostani T, Roell W, Breitbach M, Pillekamp F, Nygren JM, Sasse P, Rubenchik O, Fries JW, Wenzel D, Geisen C, Xia Y, Lu Z, Duan Y, Kettenhofen R, Jovinge S, Bloch W, Bohlen H, Welz A, Hescheler J, Jacobsen SE & Fleischmann BK (2006) Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. J Exp Med 203: 2315-27.

Kuch B, Heier M, von Scheidt W, Kling B, Hoermann A & Meisinger C (2008) 20-year trends in clinical characteristics, therapy and short-term prognosis in acute myocardial infarction according to presenting electrocardiogram: the MONICA/KORA AMI Registry (1985-2004). J Intern Med 264: 254-64.
Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, Platoshyn O, Yuan JX, Evans S & Chien KR (2005) Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. Nature 433: 647-53.

Liu J, Jones KL, Sumer H & Verma PJ (2008) Stable transgene expression in human embryonic stem cells after simple chemical transfection. Mol Reprod Dev.

Liu YP, Dovzhenko OV, Garthwaite MA, Dambaeva SV, Durning M, Pollastrini LM & Golos TG (2004) Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells stably over-expressing enhanced green fluorescent protein. Stem Cells Dev 13: 636-45.

Long CS, Henrich CJ & Simpson PC (1991) A growth factor for cardiac myocytes is produced by cardiac nonmyocytes. Cell Regul 2: 1081-95.

Mauritz C, Schwanke K, Reppel M, Neef S, Katsirntaki K, Maier LS, Nguemo F, Menke S, Haustein M, Hescheler J, Hasenfuss G & Martin U (2008) Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. Circulation 118: 507-17.

Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP & Duboc D (2003) Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. J Am Coll Cardiol 41: 1078-83.

Min JY, Yang Y, Converso KL, Liu L, Huang Q, Morgan JP & Xiao YF (2002) Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. J Appl Physiol 92: 288-96.

Min JY, Yang Y, Sullivan MF, Ke Q, Converso KL, Chen Y, Morgan JP & Xiao YF (2003) Long-term improvement of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embryonic stem cells. J Thorac Cardiovasc Surg 125: 361-9.

Miniati DN & Robbins RC (2002) Heart transplantation: a thirty-year perspective. Annu Rev Med 53: 189-205.

Moretti A, Caron L, Nakano A, Lam JT, Bernshausen A, Chen Y, Qyang Y, Bu L, Sasaki M, Martin-Puig S, Sun Y, Evans SM, Laugwitz KL & Chien KR (2006)

Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. Cell 127: 1151-65.

Muller-Ehmsen J, Peterson KL, Kedes L, Whittaker P, Dow JS, Long TI, Laird PW & Kloner RA (2002) Rebuilding a damaged heart: long-term survival of transplanted neonatal rat cardiomyocytes after myocardial infarction and effect on cardiac function. Circulation 105: 1720-6.

Muller M, Fleischmann BK, Selbert S, Ji GJ, Endl E, Middeler G, Muller OJ, Schlenke P, Frese S, Wobus AM, Hescheler J, Katus HA & Franz WM (2000) Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells in vitro. FASEB J 14: 2540-8.

Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, Hassink R, van der Heyden M, Opthof T, Pera M, de la Riviere AB, Passier R & Tertoolen L (2003) Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. Circulation 107: 2733-40.

Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM & Hauschka SD (1996) Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. J Clin Invest 98: 2512-23.

Nag AC & Zak R (1979) Dissociation of adult mammalian heart into single cell suspension: an ultrastructural study. J Anat 129: 541-59.

Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H & Smith A (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. Cell 95: 379-91.

Norrman K, Fischer Y, Bonnamy B, Wolfhagen Sand F, Ravassard P & Semb H (2010) Quantitative comparison of constitutive promoters in human ES cells. PLoS One 5: e12413.

Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, Virag JA, Ware CB, Masino A, Muskheli V, Pabon L, Reinecke H & Murry CE (2007) Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. FASEB J 21: 1345-57.

Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML & Schneider MD (2003) Cardiac

progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 12313-8.

Oh H, Chi X, Bradfute SB, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Schwartz RJ, Entman ML & Schneider MD (2004) Cardiac muscle plasticity in adult and embryo by heart-derived progenitor cells. Ann N Y Acad Sci 1015: 182-9.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A & Anversa P (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature 410: 701-5.

Pasumarthi KB, Nakajima H, Nakajima HO, Soonpaa MH & Field LJ (2005) Targeted expression of cyclin D2 results in cardiomyocyte DNA synthesis and infarct regression in transgenic mice. Circ Res 96: 110-8.

Perino MG, Yamanaka S, Li J, Wobus AM & Boheler KR (2008) Cardiomyogenic stem and progenitor cell plasticity and the dissection of cardiopoiesis. J Mol Cell Cardiol 45: 475-94.

Reinecke H, Zhang M, Bartosek T & Murry CE (1999) Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. Circulation 100: 193-202.

Revazova ES, Turovets NA, Kochetkova OD, Kindarova LB, Kuzmichev LN, Janus JD & Pryzhkova MV (2007) Patient-specific stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts. Cloning Stem Cells 9: 432-49.

Robert-Koch-Institut(2006)GesundheitinDeutschland.Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Robert-Koch-Institut, Berlin.

Robinson SW, Cho PW, Levitsky HI, Olson JL, Hruban RH, Acker MA & Kessler PD (1996) Arterial delivery of genetically labelled skeletal myoblasts to the murine heart: long-term survival and phenotypic modification of implanted myoblasts. Cell Transplant 5: 77-91.

Roell W, Lu ZJ, Bloch W, Siedner S, Tiemann K, Xia Y, Stoecker E, Fleischmann M, Bohlen H, Stehle R, Kolossov E, Brem G, Addicks K, Pfitzer G, Welz A, Hescheler J

& Fleischmann BK (2002) Cellular cardiomyoplasty improves survival after myocardial injury. Circulation 105: 2435-41.

Rubart M, Pasumarthi KB, Nakajima H, Soonpaa MH, Nakajima HO & Field LJ (2003) Physiological coupling of donor and host cardiomyocytes after cellular transplantation. Circ Res 92: 1217-24.

Sambrook J & Russell DW (2006) The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schannwell CM, Hennersdorf MG & Strauer BE (2007) [Hypertension and cardiac failure]. Internist (Berl) 48: 909-20.

Scorsin M, Hagege AA, Marotte F, Mirochnik N, Copin H, Barnoux M, Sabri A, Samuel JL, Rappaport L & Menasche P (1997) Does transplantation of cardiomyocytes improve function of infarcted myocardium? Circulation 96: II-188-93.

Shah AM, Grocott-Mason RM, Pepper CB, Mebazaa A, Henderson AH, Lewis MJ & Paulus WJ (1996) The cardiac endothelium: cardioactive mediators. Prog Cardiovasc Dis 39: 263-84.

Singla DK (2009) Embryonic stem cells in cardiac repair and regeneration. Antioxid Redox Signal 11: 1857-63.

Singla DK, Hacker TA, Ma L, Douglas PS, Sullivan R, Lyons GE & Kamp TJ (2006) Transplantation of embryonic stem cells into the infarcted mouse heart: formation of multiple cell types. J Mol Cell Cardiol 40: 195-200.

Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG & Field LJ (1994) Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. Science 264: 98-101.

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G & Wernet P (2002) Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. Circulation 106: 1913-8.

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.

Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, Glower DD & Kraus WE (1998) Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. Nat Med 4: 929-33.

Teng L, Meng G, Xing Y, Shang K, Wang X & Gu J (2003) Labeling embryonic stem cells with enhanced green fluorescent protein on the hypoxanthineguanine phosphoribosyl transferase locus. Chin Med J (Engl) 116: 267-72.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS & Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282: 1145-7.

Wang R, Liang J, Jiang H, Qin LJ & Yang HT (2008) Promoter-dependent EGFP expression during embryonic stem cell propagation and differentiation. Stem Cells Dev 17: 279-89.

Wobus AM & Boheler KR (2005) Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. Physiol Rev 85: 635-78.

Wobus AM, Wallukat G & Hescheler J (1991) Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca2+ channel blockers. Differentiation 48: 173-82.

Xu C, Police S, Rao N & Carpenter MK (2002) Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. Circ Res 91: 501-8.

Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, Roepke TK, Kattman SJ, Kennedy M, Henckaerts E, Bonham K, Abbott GW, Linden RM, Field LJ & Keller GM (2008) Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. Nature 453: 524-8.

Zhang H, Chen H, Wang W, Wei Y & Hu S Cell survival and redistribution after transplantation into damaged myocardium. J Cell Mol Med 14: 1078-82.

Zhang H, Chen H, Wang W, Wei Y & Hu S (2010) Cell survival and redistribution after transplantation into damaged myocardium. J Cell Mol Med 14: 1078-82.

Zhu W, Hassink RJ, Rubart M & Field LJ (2009) Cell-cycle-based strategies to drive myocardial repair. Pediatr Cardiol 30: 710-5.

Zimmermann WH, Didie M, Wasmeier GH, Nixdorff U, Hess A, Melnychenko I, Boy O, Neuhuber WL, Weyand M & Eschenhagen T (2002) Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. Circulation 106: I151-7.

Zimmermann WH & Eschenhagen T (2003) Cardiac tissue engineering for replacement therapy. Heart Fail Rev 8: 259-69.

Zimmermann WH & Eschenhagen T (2007) Embryonic stem cells for cardiac muscle engineering. Trends Cardiovasc Med 17: 134-40.

Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, Didie M, Naito H, Nixdorff U, Hess A, Budinsky L, Brune K, Michaelis B, Dhein S, Schwoerer A, Ehmke H & Eschenhagen T (2006) Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. Nat Med 12: 452-8.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

- αMHC α Myosin Heavy Chain
- Aqua bidest. Aqua bidestilata
- bFGF basic Fibroblast Growth Factor
- BMP Bone Morphogenetic Protein
- bp Basenpaar
- BSA Bovines Serumalbumin
- °C Grad Celsius
- CFP Cyant Fluorescent Protein
- CMV Cytomegalie-Virus
- d Tag
- DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol
- DKK1 Dickkopf Homolog 1
- DMEM Dulbecco's Minimal Essential Medium
- DMSO Dimethylsulfoxid
- DNA Desoxyribonukleinsäure
- EB Embroid Body
- ED *Embryonic Day*
- ED *Embryonic Day*
- EDTA Ethylendiamintetraessigsäure
- EF-1α Elongationsfaktor 1α
- eGFP enhanced Green Fluorescent Protein
- EHT Engineered Heart Tissue
- ES-Zellen Embryonale Stammzellen
- FACS Fluorescence Activated Cell Corting
- FCS fetales Kälberserum
- FDA Food and Drug Administration
- FSC Forward Scatter
- g Gramm
- G Gravidationskonstante
- h Stunde
- HE Hämatoxilin&Eosin

- HEK293-Zellen Human Embryonic Kidney 293-Zellen
- hES-Zellen humane Embryonale Stammzellen
- IL-6 Interleukin-6
- iPS Induzierte pluripotente Stammzellen
- IRES Internal Ribosomal Entry Site
- Kg Kilogramm
- KHK Koronare Herzerkrankung
- Krt 1-18 Cytokeratin 18
- L Liter
- LB *Luria Broth*
- LIF Leucemia-Inhibitory-Factor
- M Mol/Liter
- MEF Mouse Embryonic Fibroblasts
- MEM Minimal Essential Medium
- mES-Zellen murine Embryonale Stammzellen
- µg Mikrogramm
- µl Mikroliter
- mg Milligramm
- min Minute
- ml Milliliter
- mm Millimeter
- mm Millimeter
- mM Millimolar
- mmol Millimol
- mRNA *messenger* RNA
- NEB New England Biolabs
- Neo<sup>r</sup> Neomycinresistenz
- NFM Neurofilament Protein M
- nLacZ nukleäres LacZ
- nm Nanometer
- PBS Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
- PCR Polymerase Chain Reaction
- PGK Phosphoglyceratkinase

- pH negativer dekadischer Logarithmus der H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>-
- Ionenkonzentration
- PS-Zellen Parthenogenetische Stammzellen
- RNA Ribonukleinsäure
- rpm Rotationen pro Minute
- RT Raumtemperatur
- SCID Severe Combined Immunodeficiency
- SSC Side Scatter
- SSCs Spermatogonial Stem Cells
- SSEA Stage-Specific Embryonic Antigen
- TBS Tris Buffered Saline
- TFB1 Transformation Buffer 1
- TGF- $\beta$  Transforming Growth Factor  $\beta$
- Tris Trishydroxymethylaminomethan
- U *Unit*
- UV Ultraviolett
- V Volt
- VEGF Vascular Endothelial Growth Factor
- WT Wildtyp
- YFP Yellow Fluorescent Protein

### 8 Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. med Thomas Eschenhagen, Direktor des Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinkums Hamburg-Eppendorf, bedanke ich mich für die Vergabe der Promotionsarbeit.

Herzlichst danke ich Professor Dr. med Wolfram-Hubertus Zimmermann für die Überlassung des Themas und die Betreuung meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Christina Rogge für die Einführung in die Arbeit mit murine embryonalen Stammzellen, Dr. rer nat. Stefan Döker für die Unterstützung bezüglich der DNA-Klonierung, Dr. rer. nat. Christina Rogge und Dr. med. Arne Hansen für die Kultivierung humaner embryonaler Stammzellen, Dr. rer. nat. Peter Christalla und Dr. med. Michial Didié für die Generierung und Kultivierung muriner parthenogenetischer Stammzellen sowe Dr. rer. nat. Olaf Friese für die kompetente Unterstützung beim Southern-Blot-Verfahren.

Desweiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinkums Hamburg-Eppendorf, insbesondere bei Hanna Behr, Bijoy Chandapillai Karikkineth, Malte Tiburcy und Monika Nose für die kollegiale und freundliche Zusammenarbeit.

Vor allem aber möchte ich meinen Eltern, meiner Schwester Anne, meiner Freundin Lara und meinem Schwager Felix für den immerwährenden und bedingungslosen Rückhalt während der Doktorarbeit und des Studiums danken.

# 9 Lebenslauf

#### Persönliche Daten:

Name:	Niklas Schofer
Geburtsdatum:	26. Juni 1982
Geburtsort:	Hamburg

#### Schullaufbahn:

1988-1992	Grundschule Rathsmühlendamm, Hamburg
1992-2001	Albert-Schweitzer-Gymnasium, Hamburg

#### Studienlaufbahn:

2003-2010	Studium der Humanmedizin am
	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
2005	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2010	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

#### Berufslaufbahn:

Seit Juni 2010 Assistenzarzt in der Weiterbildung zum Facharzt für Innere Medizin und Kardiologie, Klinik und Poliklinik für Allgemeine und Interventionelle Kardiologie des Universitären Herzzentrums Hamburg

## 10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den

Niklas Schofer