

Untersuchungen zur kardialen
Differenzierung adulter Stammzellen
und
Entwicklung lentiviraler Vektoren zur spezifischen
Detektion und Aufreinigung von Kardiomyozyten

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Ina Gruh

geboren am 02.01.1975 in Westerstede

2005

Referent: Prof. Dr. W. Müller
Korreferent: Prof. Dr. U. Martin
Tag der Promotion: 27.06.2005

"... IF I ONLY HAD A HEART..."

***TIN MAN
(WIZARD OF OZ)***

Zusammenfassung

Die Regenerationsfähigkeit von geschädigtem Herzgewebe nimmt im Lauf der Evolution immer weiter ab, für Säugetiere galt lange als Tatsache, dass eine Schädigung irreversibel ist, da ihre Kardiomyozyten postnatal ihre Fähigkeit zur Proliferation verlieren. Neuere Berichte über eine kardiale Regeneration könnten auf einem Wiedereintritt terminal differenzierter Kardiomyozyten in den Zellzyklus beruhen, alternativ ist eine Differenzierung von Kardiomyozyten aus adulten Stammzellen oder Progenitorzellen denkbar. Eine solche Differenzierung ist jedoch in vielen Fällen umstritten, häufig erlaubten die in den vorliegenden Studien angewandten Methoden keine Überprüfung der Veränderungen der betrachteten Zellen auf molekularer Ebene.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollten, u.a. basierend auf lentiviralen Vektoren, Methoden etabliert werden, die eine detailliertere Analyse der strukturellen und molekularen Veränderungen verschiedener Stamm- und Vorläuferzellen bei der Differenzierung zu Kardiomyozyten ermöglichen bzw. vereinfachen. In einem zweiten Teil der Arbeit sollte sowohl die von Badorff et al. beschriebene kardiale Differenzierung humaner Endothelvorläuferzellen als auch das ebenfalls umstrittene Potential mesenchymaler Stammzellen der Ratte zur kardialen Differenzierung eingehend untersucht werden.

Als Hilfsmittel zur Detektion von aus Stamm- und Vorläuferzellen differenzierten Kardiomyozyten wurden lentivirale Reportergerkonstrukte mit herzspezifischen Promotoren für eine stabile Langzeit-Expression hergestellt. Für die Herstellung derartiger viraler Plasmide wurde auf der Basis HIV-1 abgeleiteter Vektoren ein lentivirales Shuttlesystem zur vereinfachten Klonierung von Expressionskassetten entwickelt, zudem führte die Einführung des CMV-Enhancers zu einer signifikant gesteigerten Expression mit verschiedenen ubiquitären Promotoren.

Zur Überprüfung des Potentials humaner Endothelvorläuferzellen (EPCs) zur kardialen Differenzierung wurden markierte EPCs mit Kardiomyozyten kokultiviert und immunhistologisch ausgewertet, u.a. dreidimensional durch konfokale Laser-Scan-Mikroskopie. Es wurden durchflusszytometrische Messungen und Aufnahmen im Elektronenmikroskop angefertigt, sowie RT-PCRs zur spezies-spezifischen Detektion früher humaner kardialer Transkriptionsfaktoren durchgeführt.

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) aus dem Knochenmark der Ratte wurden zur kardialen Differenzierung mit 5-Azacytidin behandelt, anschließend mittels RT-PCR und mit Hilfe der generierten lentiviralen Vektoren auf die Expression kardialer Gene untersucht.

Mit Hilfe des im Rahmen der Dissertation entwickelten Shuttle-Systems konnten in der Arbeitsgruppe zahlreiche lentivirale Konstrukte wesentlich einfacher und schneller generiert werden, als es bei der Verwendung bestehender Systeme möglich gewesen wäre. Mit diesem neuartigen System erfolgreich hergestellte Vektoren mit herzspezifischen Promotoren für humanes ANF und MLC2v bewirkten eine spezifische Expression in Kardiomyozyten und können für eine Detektion oder Aufreinigung kardial differenzierter Zellen eingesetzt werden. Im Falle dieser Vektoren führte die Insertion des CMV-Enhancers zu einer signifikanten Verbesserung der Reporterger-Expression unter weitgehender Erhaltung der Spezifität der kardialen Expression. Große Bedeutung für die Verwendung dieser und anderer lentiviraler Vektoren für die Markierung von Zellen zur Untersuchung der Stammzellendifferenzierung nach Transplantation hat auch der Befund, dass auch rigorose Waschschritte nicht zu einer völligen Elimination infektiöser Viruspartikel auf den transduzierten Zellen führte: In Kokultur-Experimenten und nach Transplantation können auf derart markierten Stammzellen verbliebene infektiöse Virionen zur Reportergerexpression in kokultivierten Zellen bzw. in Zellen des Transplantationsempfängers und damit zu falsch-positiven Ergebnissen führen.

Die Analyse der Kokulturen von markierten EPCs und Kardiomyozyten auf eine Expression kardialer Marker ergab keine Beweise für eine kardiale Differenzierung der EPCs und widerspricht damit den Befunden von Badorff et al.. Scheinbar doppelt positive Zellen konnten in der Mehrzahl der Fälle als markierte humane Zellen oder Zellreste identifiziert werden, die über oder unter Kardiomyozyten lagen, bzw. als von Kardiomyozyten umwachsene Zellfragmente, oder als absterbende, nekrotische Kardiomyozyten mit einer starken Eigenfluoreszenz.

Die Stimulation von mesenchymalen Stammzellen der Ratte mit 5-Azacytidin führte zwar zu einer schwachen Expression einiger herzspezifischer Gene wie GATA-4, ANF und MLC2v, andere Marker wie α -MHC fehlten dagegen, eine Differenzierung zu funktionellen Kardiomyozyten konnte damit nicht nachgewiesen werden. Reportergerkonstrukte mit den herzspezifischen Promotoren für humanes ANF bzw. MLC2v führten in den stimulierten MSCs nicht zu einer messbaren Expression des Reportergergens GFP.

Mit den unter Verwendung des neuartigen lentiviralen Klonierungs-Systems entwickelten kardiomyozytenspezifischen Vektoren konnte erstmals eine zufriedenstellende gewebespezifische lentivirale Reporterger-Expression erreicht werden. Obwohl je nach Anwendung das Risiko einer Virusübertragung zu berücksichtigen ist, eignen sich die Vektoren sowohl für die Detektion einer kardialen Differenzierung in adulten und embryonalen Stamm- und Vorläuferzellen, als auch zum Studium von Differenzierungsvorgängen in der Embryogenese. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Hinweise auf eine kardiale Differenzierung von EPCs nach Kokultivierung mit Kardiomyozyten wahrscheinlich auf rein methodischen Unzulänglichkeiten beruhen. Eine solche Differenzierung konnte im Rahmen der Dissertation durch Anwendung weitergehender Methoden nahezu ausgeschlossen werden, was eine Reihe weiterer Studien, in denen eine zuvor publizierte kardiale Differenzierung anderer adulter Stammzelltypen nicht nachvollzogen werden konnte, bestätigt.

Schlagwörter: Adulte Stammzellen, kardiale Differenzierung, lentivirale Vektoren

Abstract

The capability for regeneration of damaged cardiac tissue decreases in the course of evolution with the development of higher life-forms. For a long time it has been considered a fact that for mammals, myocardial damage is irreversible as their cardiomyocytes lose the potential for proliferation shortly after birth. Recent reports on cardiac regeneration in mammals could result from re-entry of terminally differentiated cardiomyocytes into the cell cycle. Alternatively, a differentiation of cardiomyocytes from adult stem cells or progenitor cells is conceivable. In many cases such a differentiation is controversial. Frequently, the methods applied in existing studies did not allow for the detection of cellular changes on a molecular level.

Within the scope of this thesis, methods, based in part on lentiviral vectors, should be established that allow or simplify a detailed analysis of structural and molecular changes of different stem and progenitor cells in the course of their differentiation towards cardiomyocytes. In a second part of this thesis, the cardiac differentiation of human endothelial progenitor cells, as described by Badorff et al., as well as the controversial potential for cardiac differentiation of rat mesenchymal stem cells should be thoroughly investigated.

As a tool for the detection of stem cell derived cardiomyocytes, lentiviral reporter gene constructs with cardiac specific promoters for stable long term expression were generated. For the generation of such viral plasmids, a shuttle system for simplified cloning of expression cassettes was developed on the basis of HIV-1 derived vectors. In addition, the insertion of the CMV enhancer resulted in a significantly enhanced expression with different ubiquitous promoters.

For evaluation of human endothelial progenitor cells' (EPCs) potential for cardiac differentiation, cocultures of labelled EPCs and cardiomyocytes were examined by means of immunohistology. Confocal laser scan microscopy allowed for a three-dimensional analysis. Measurements by flow cytometry and electron microscopy were conducted, as well as RT-PCRs for a species-specific detection of early human cardiac transcription factors.

Moreover, mesenchymal stem cells (MSCs) from rat bone marrow were treated with 5-Azacytidine for induction of cardiac differentiation, and subsequently analysed for cardiac gene expression by RT-PCR and applying the generated lentiviral vectors.

By means of the shuttle system developed in the course of this thesis, within our work group various lentiviral constructs could be generated more simple and faster than it would have been feasible by using existing systems. Vectors with heart specific promoters of human ANF and MLC2v, generated successfully with this novel system, conferred GFP reporter gene expression in cardiomyocytes, specifically, and can be implemented for the detection and purification of cells differentiated towards the cardiac lineage. For these vectors, insertion of the CMV enhancer led to a significant improvement of reporter gene expression, while largely retaining cardiac specificity. Findings, that even rigorous washing steps do not lead to complete elimination of infectious viral particles on transduced cells, are of highest significance for the application of these and other lentiviral vectors for cell labelling in order to analyse stem cell differentiation after transplantation: In coculture experiments and after transplantation, infectious virions residing on labelled stem cells can lead to reporter gene expression in cocultivated cells or transplant recipient's cells and thereby can lead to false-positive results.

The analysis of cocultivated labelled EPCs and cardiomyocytes for cardiac marker expression did not result in any evidence of cardiac differentiation of human endothelial progenitor cells, and thereby contradicts the findings of Badorff et al.. In the majority of cases, apparently double stained cells could be identified as labelled human cells or cell fragments lying over or under cardiomyocytes, as cardiomyocytes growing around cell fragments, or decaying necrotic cardiomyocytes with high levels of autofluorescence.

Stimulation of rat mesenchymal stem cells with 5-Azacytidine indeed resulted in a weak expression of several heart specific genes, i.e. GATA-4, ANF, and MLC2v, in contrast, they lacked other markers like α -MHC, a differentiation into functional cardiomyocytes could not be demonstrated. Reporter gene constructs with heart specific promoters for human ANF and MLC2v, respectively, did not confer detectable levels of reporter gene expression.

With the cardiomyocyte specific vectors generated by use of the novel lentiviral cloning system, a satisfactory tissue-specific lentiviral reporter gene expression could be achieved for the first time. Although, depending on the application, the problem of virus shuttle has to be taken into consideration, the vectors are suitable for the detection of cardiac differentiation in adult and embryonic stem and progenitor cells, as well as for studies on differentiation processes during embryonic development. Furthermore, it was demonstrated, that recent reports on cardiac differentiation of EPCs after coculture with cardiomyocytes are most likely merely due to shortcomings of the methods applied. Any such differentiation was almost excluded in the course of this thesis by use of more precise methods, thus corroborating a number of studies that were not able to confirm cases of cardiac differentiation of other adult stem cell types recently published.

Keywords: Adult stem cells, cardiac differentiation, lentiviral vectors

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Kardiale Differenzierung von adulten Stamm- und Vorläuferzellen.....	2
1.1.1	Adulte Stammzellen aus dem Herzgewebe.....	2
1.1.2	Adulte Stammzellen aus dem Knochenmark.....	3
1.1.3	Adulte Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut.....	5
1.2	Kardiale Differenzierung und Expression in der Embryogenese.....	8
1.3	Promotoren für den Nachweis kardial differenzierter Stammzellen.....	10
1.4	Lentiviraler Gentransfer.....	14
1.4.1	Das Lentivirus HIV-1.....	15
1.4.2	Lentivirale Vektorsysteme.....	17
1.5	Zielsetzung.....	20
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Material.....	21
2.1.1	Geräte.....	21
2.1.2	Verbrauchsmaterial.....	22
2.1.3	Chemikalien.....	23
2.1.4	Kits.....	24
2.1.5	Zellen:.....	25
2.1.6	Bakterienstämme.....	25
2.1.7	Medien und Lösungen.....	26
2.1.8	Enzyme.....	27
2.1.9	Primärantikörper.....	27
2.1.10	Sekundärantikörper.....	27
2.1.11	Lektine.....	27
2.1.12	Vektoren.....	28
2.1.13	DNA-Molekulargewichtsmarker.....	28
2.1.14	Oligonukleotide für Klonierungen.....	28
2.1.15	Oligonukleotide für RT-PCRs.....	29
2.2	Methoden zur Klonierung von lentiviralen Transfervektoren.....	30
2.2.1	Präparativer Restriktionsverdau.....	30
2.2.2	Präparativer Restriktionsverdau mit I-Ceu I und PI-Sce I.....	30
2.2.3	Dephosphorylierung mit CIP.....	30
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	30
2.2.5	Gelextraktion.....	31
2.2.6	Ligation.....	31
2.2.7	DNA-Fällung.....	32
2.2.8	Transformation durch Elektroporation.....	32
2.2.9	Schnellverfahren zum Nachweis von Plasmiden in Bakterienkolonien.....	33
2.2.10	Plasmidgewinnung aus <i>E. coli</i>	33
2.2.11	Bestimmung des Nukleinsäure-Gehaltes.....	35

2.2.12	Analytischer Restriktionsverdau	35
2.2.13	TA-Klonierung.....	36
2.3	Klonierung von Vektoren.....	37
2.3.1	Klonierung des lentiviralen Transfervektors pLentiShuttle.....	37
2.3.2	Klonierung des „high copy“ Plasmids pBShuttle.....	37
2.3.3	Expressionskassetten mit Reportergenen und ubiquitären Promotoren	38
2.3.4	Expressionskassetten mit Reportergenen und kardialen Promotoren.....	39
2.3.5	Expressionskassetten mit kardialen Transkriptionsfaktoren.....	39
2.3.6	Klonierung von Expressionskassetten in den Transfervektor pLentiShuttle.....	40
2.3.7	Klonierung des CMV-Enhancers	40
2.4	Methoden zur Produktion von replikationsdefizienten Lentiviren	41
2.4.1	Calcium-Phosphat-Transfektion	41
2.4.2	Ernte der replikationsdefizienten Lentiviren.....	42
2.4.3	Konzentration der Lentiviren.....	42
2.4.4	Titerbestimmung durch Transduktion von HEK293T-Zellen.....	42
2.4.5	Virusbestimmung durch Real-Time-PCR.....	43
2.5	Methoden zur Charakterisierung der lentiviralen Vektoren	43
2.5.1	Transfektion durch Lipofektion.....	43
2.5.2	Transduktion	43
2.5.3	Transwell-Versuche	44
2.6	Methoden zur Zellkultur.....	44
2.6.1	Auftauen von Zellen.....	44
2.6.2	Beschichtung von Zellkulturgefäßen.....	45
2.6.3	Kultur von adhärenenten Zellen.....	45
2.6.4	Einfrieren von Zellen.....	45
2.6.5	Zellzahlbestimmung.....	46
2.6.6	Isolierung neonataler Rattenkardiomyozyten	46
2.6.7	Isolierung humaner endothelialer Progenitorzellen	46
2.6.8	Markierung der EPCs	46
2.6.9	Kokultivierung der EPCs mit neonatalen Rattenkardiomyozyten	47
2.6.10	Isolierung mesenchymaler Stammzellen aus der Ratte	48
2.6.11	Differenzierung der rMSCs	48
2.7	Methoden zur Zell-Charakterisierung.....	48
2.7.1	Immunfluoreszenz-Färbung.....	48
2.7.2	Analyse im Durchflusszytometer	49
2.7.3	RNA-Isolierung	50
2.7.4	Bestimmung des RNA-Gehaltes.....	50
2.7.5	DNase-Verdau.....	51
2.7.6	Phenol/Chloroform-Extraktion.....	51
2.7.7	Natrium-Acetat-Fällung.....	51
2.7.8	cDNA-Synthese	52
2.7.9	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	53

3	Ergebnisse.....	54
3.1	Aufbau des LentiShuttle-Systems	54
3.1.1	Titerbestimmung der Lentiviren mit ubiquitären Promotoren	56
3.1.2	Expressionshöhe der Lentiviren mit ubiquitären Promotoren	57
3.1.3	Lentivirale Transduktion der Zielzellen	58
3.2	Lentivirale Vektoren zur Detektion kardialer Differenzierung	60
3.2.1	Durch kardiale Promotoren vermittelte lentivirale hrGFP-Expression	60
3.2.2	Spezifität der LentiShuttle-vermittelten kardialen GFP-Expression	62
3.3	Lentivirale Vektoren zur Induktion kardialer Differenzierung	63
3.3.1	LentiShuttle-vermittelte Expression von GATA4 und Nkx2.5	63
3.4	Übertragung replikationsdefizienter Lentiviren durch transduzierte Zellen	65
3.4.1	Risiko der Übertragung replikationsdefizienter Lentiviren <i>in vivo</i>	65
3.4.2	Risiko der Übertragung replikationsdefizienter Lentiviren <i>in vitro</i>	66
3.5	Versuche zur kardialen Differenzierung von EPCs	71
3.5.1	Charakterisierung der Zellen vor der Kokultur	71
3.5.2	Morphologie der Kokulturen von EPCs und NRCMs	72
3.5.3	Zweidimensionale Analyse der Kokulturen	75
3.5.4	Dreidimensionale Analyse der Kokulturen	77
3.5.5	Untersuchungen zur Autofluoreszenz von Kardiomyozyten in Zellkultur	80
3.5.6	Untersuchungen auf eine kardiale Genexpression in den EPCs	82
3.6	Versuche zur kardialen Differenzierung von MSCs	84
4	Diskussion	87
4.1	Lentivirale Vektoren	87
4.1.1	Entwicklung des LentiShuttle-Systems	87
4.1.2	Lentivirale Vektoren zur Detektion kardialer Differenzierung	89
4.1.3	Lentivirale Vektoren zur Induktion kardialer Differenzierung	93
4.1.4	Übertragung replikationsdefizienter Lentiviren durch transduzierte Zellen	94
4.2	Versuche zur kardialen Differenzierung von EPCs	98
4.3	Versuche zur kardialen Differenzierung von MSCs	105
5	Literatur	108
6	Anhang	117
7	Abkürzungen	119
8	Lebenslauf	123

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1.1 Herzentwicklung in der Maus	8
Abbildung 1.2 ANF-Promotor	11
Abbildung 1.3 α -MHC-Promotor.....	12
Abbildung 1.4 MLC2v-Promotor	13
Abbildung 1.5 Cardiac Actin-Promotor	14
Abbildung 1.6 Aufbau von HIV-1 und Infektion einer Wirtszelle	15
Abbildung 1.7 Aufbau des lentiviralen Vektorsystems	19
Abbildung 3.1 Aufbau des LentiShuttle-Systems	55
Abbildung 3.2 Titer der Lentiviren mit Reportergenen und allgemeinen Promotoren	56
Abbildung 3.3 Expressionshöhen der Lentiviren mit allgemeinen Promotoren	57
Abbildung 3.4 Lentivirale Transduktion der Zielzellen NRCM, MSC und EPC.....	58
Abbildung 3.5 Expressionshöhe in NRCMs und MSCs.....	59
Abbildung 3.6 Kardiomyozyten-spezifische GFP-Expression in NRCMs.....	61
Abbildung 3.7 LentiShuttle-vermittelte Expression von GATA4 und Nkx2.5 in rMSCs	64
Abbildung 3.8 Transplantation transduzierter NRCM in das ZNS	65
Abbildung 3.9 Virusübertragung durch transduzierte NRCMs <i>in vitro</i>	67
Abbildung 3.10 Quantifizierung der Virusübertragung durch transduzierte NRCMs	67
Abbildung 3.11 Vergleich der Virusübertragung durch NRCM und Rat-1	68
Abbildung 3.12 Abnahme der Virusübertragung durch verlängerte Inkubation.....	69
Abbildung 3.13 Abnahme der Titer infektiöser Viren durch verlängerte Inkubation	70
Abbildung 3.14 Charakterisierung der EPCs.....	71
Abbildung 3.15 Morphologie der markierten EPCs	72
Abbildung 3.16 Morphologie der neonatalen Rattenkardiomyozyten	73
Abbildung 3.17 Morphologie der Kokulturen von EPCs und NRCMs.....	74
Abbildung 3.18 Morphologische Veränderungen der EPCs in Kokultur	75
Abbildung 3.19 Kategorien I-III der doppelt-positiven Zellen in den Kokulturen.....	76
Abbildung 3.20 Dreidimensionale Analyse der Kokulturen mit Dil-EPCs.....	77
Abbildung 3.21 Dreidimensionale Analyse der Kokulturen mit Dil-EPCs bzw. Dil-MLE-12 ...	78
Abbildung 3.22 Auto-Fluoreszenz absterbender Kardiomyozyten	79
Abbildung 3.23 FACS-Analyse autofluoreszierender Kardiomyozyten	80
Abbildung 3.24 Elektronenmikroskopie eines absterbenden Kardiomyozyten.....	81
Abbildung 3.25 Spezies-spezifische RT-PCRs der Kokulturen.....	82
Abbildung 3.26 RT-PCRs 5-Azacytidin-behandelter rMSCs	84
Abbildung 3.27 Transduzierte rMSCs 2 Wochen nach 5-Azacytidin-Behandlung	85

Tabelle 1	Verwendete Primärantikörper	27
Tabelle 2	Oligonukleotide für Klonierungen	28
Tabelle 3	Oligonukleotide für RT-PCRs	29
Tabelle 4	Ansatz für die Ligation	31
Tabelle 5	Programm für Ligation bei wechselnden Temperaturen.....	32
Tabelle 6	Bedingungen für die Elektroporation	33
Tabelle 7	Ausbeuten der DNA-Präparationen mit Qiagen-Kits	35
Tabelle 8	Ansatz für analytischen Restriktionsverdau.....	35
Tabelle 9	Variationen der Kokulturbedingungen	47
Tabelle 10	Protokoll intrazelluläre Immunfärbung	49
Tabelle 11	Ansatz für DNase-Verdau	51
Tabelle 12	Ansätze für Standard-PCR.....	53
Tabelle 13	Programm für Standard-PCR	53
Tabelle 14	Spezifität der LentiShuttle-vermittelten kardialen GFP-Expression.....	62
Tabelle 15	Häufigkeitsverteilung der Kategorien I-III in den Kokulturen	76

1 Einleitung

Die Regenerationsfähigkeit von geschädigtem Herzgewebe nimmt im Verlauf der Evolution mit der Entwicklung höherer Lebewesen immer weiter ab. Areale geschädigten Herzgewebes werden bei Fischen [1] und Amphibien [2,3] noch ohne die Bildung von Narben durch neugebildetes funktionelles Myokard ersetzt. Dagegen galt für Säugetiere lange als Tatsache, dass eine Schädigung des Herzgewebes irreversibel ist, da Kardiomyozyten postnatal ihre Fähigkeit zur Proliferation verlieren [4,5]. Abgestorbene Kardiomyozyten werden daher durch Fibroblasten ersetzt, wobei die entstehenden Vernarbungen zu einer eingeschränkten Herzfunktion führen [6,7].

Inzwischen gibt es Hinweise darauf, dass möglicherweise auch bei Säugetieren im adulten Organismus neue Herzmuskelzellen gebildet werden können. Für einen bestimmten Maus-Stamm wurde sogar eine vergleichbare Regenerationsfähigkeit, wie für Amphibien beschrieben [8]. Einer solchen Regeneration können prinzipiell zwei verschiedene Mechanismen zugrunde liegen. Zum einen könnten terminal differenzierte Kardiomyozyten wieder in den Zellzyklus eintreten und durch Proliferation neues Myokard bilden, zum anderen ist auch eine Differenzierung von Kardiomyozyten aus adulten Stammzellen oder Progenitorzellen denkbar.

Viele frühe Daten zu solchen Differenzierungsvorgängen resultieren aus *in vivo* Experimenten, bei denen Zellen in Infarkt-geschädigte Areale des Herzens transplantiert wurden. Anschließend messbare Funktionsverbesserungen der Herzleistung wurden als Indizien für eine potentielle kardiale Differenzierung dieser Zellen in funktionelle Kardiomyozyten gedeutet. Auch bei *in vitro* Experimenten wurden durch chemische Induktion oder Kokultivierung mit Kardiomyozyten Veränderungen der eingesetzten Stamm- oder Progenitorzellen festgestellt.

In vielen Fällen ist jedoch umstritten, ob tatsächlich eine kardiale Differenzierung der Stamm- oder Vorläuferzellen für die beobachteten Effekte verantwortlich ist. Häufig erlaubten es die angewandten Methoden nicht, Veränderungen der betrachteten Zellen auf molekularer Ebene nachzuweisen und damit zu überprüfen, ob es Parallelen zwischen der Entwicklung von Stamm- und Progenitorzellen zu Kardiomyozyten und der Zelldifferenzierung während der Embryonalentwicklung gibt. In vielen Fällen ist daher bisher unklar, ob sich Erkenntnisse aus der Embryogenese auf die Differenzierung adulter Zellen übertragen lassen.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollten Methoden etabliert werden, die mittelfristig eine detaillierte Analyse der strukturellen und molekularen Veränderungen verschiedener Stamm- und Vorläuferzellen bei der Differenzierung zu Kardiomyozyten ermöglichen bzw. vereinfachen.

1.1 Kardiale Differenzierung von adulten Stamm- und Vorläuferzellen

Stammzellen sind embryonale, fetale oder adulte Zellen, die ein bedeutendes, im Falle der embryonalen Stammzellen sogar potentiell unbegrenztes Proliferations- und Differenzierungspotential aufweisen und über ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung definiert werden [9], d.h. bei der Zellteilung von Stammzellen entsteht immer mindestens eine weitere Stammzelle mit gleichen Eigenschaften. Auf dem Weg der Spezialisierung von Zellen in unterschiedliche Gewebe während der Embryogenese nimmt ihr Proliferations- und Differenzierungspotential im allgemeinen immer weiter ab. Aus multipotenten Stammzellen entwickeln sich zunächst tri- und bipotente Progenitorzellen und daraus schließlich eindeutig determinierte und damit unipotente Vorläufer einer bestimmten Körperzelle [10]. Vorläufer- oder Progenitorzellen besitzen nicht die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und weisen ein geringeres Proliferations- und Differenzierungspotential als Stammzellen auf. In einigen Organen sind auch im adulten Zustand noch Zellen vorhanden, die für die Aufrechterhaltung und Regeneration des Organs benötigt werden, wie z.B. die Stammzellen in Haut [11] und Darm [12], die für eine kontinuierliche Erneuerung des Gewebes sorgen.

1.1.1 Adulte Stammzellen aus dem Herzgewebe

Die Möglichkeit einer Regeneration des Herzens nach Schädigungen wie einem Infarkt, die eine Neubildung von myokardialem Gewebe im adulten Organismus erfordern würde, wird kontrovers diskutiert. Der Annahme, das Herz sei ein post-mitotisches Organ und besitze deshalb kein regeneratives Potential [13], stehen neuere Berichte über Subpopulationen von Myozyten gegenüber, die noch nicht terminal differenziert sind und im Gegensatz zu ausdifferenzierten Kardiomyozyten wieder in den Zellzyklus eintreten können und nach einem Infarkt im geschädigten Gewebe mitotische Aktivität zeigen [14,15].

Stammzellpopulationen im adulten Herzen wurden aufgrund der Expression von sca-1, eines potentiellen Markers somatischer Stammzellen, isoliert [16,17], oder aus murinen und humanen Explantaten nach enzymatischer Behandlung und Selektion aufgrund der Morphologie bzw. Proliferationskapazität gewonnen [18]. Eine weitere Populationen von kardialen Progenitorzellen, die sogenannten „Kardioblasten“, wurden durch die

Expression des Homöodomäne Transkriptionsfaktor islet-1 (Isl1) charakterisiert [19], andere Berichte beschreiben $lin^{neg} / c-kit^{pos}$ Stammzellen im adulten Herz [20].

Lange wurde angenommen, dass adulte Stamm- oder Progenitorzellen gewebespezifisch determiniert sind und nur in einen bestimmten Körperzelltyp differenzieren können [10]. Inzwischen gibt es viele Hinweise auf adulte multipotente Progenitor- und Stammzellen, die ein weitaus größeres Differenzierungspotential aufweisen und in verschiedene somatische Zellen differenzieren können. Die Differenzierung einer Progenitorzelle einer bestimmten Entwicklungslinie in eine Körperzelle einer anderen Entwicklungslinie bezeichnet man als „Transdifferenzierung“ [21]. Die Annahme, dass adulte Stammzellen in der Lage sein könnten zu transdifferenzieren, führte zu einem neuen Konzept der Stammzell-„Plastizität“. Dieses geht davon aus, dass die Festlegung differenzierender Zellen auf eine bestimmte Entwicklungslinie möglicherweise nicht strikt definiert sondern weitaus flexibler ist als bisher angenommen wurde [21]. Nach neueren Berichten sind nicht nur adulte Stammzellen aus dem Herzen in der Lage, kardial zu differenzieren, auch für Zellen aus dem Knochenmark und dem peripheren Blut wurden entsprechende Beobachtungen beschrieben.

1.1.2 Adulte Stammzellen aus dem Knochenmark

Das Knochenmark enthält neben Stamm- und Progenitorzellen der hämatopoetischen Zellen auch morphologisch fibroblastenartige Stromazellen [22], die das für die Hämatopoese benötigte Milieu [23] schaffen. Sie enthalten Subpopulationen, die Stammzellpotential aufweisen und sich deutlich von den Stromazellen abgrenzen lassen [24].

Diese mesenchymalen Stammzellen (MSCs) des Knochenmarks entwickeln sich unter Zugabe verschiedener stimulierender Substanzen, wie 5-Azacytidin oder 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, in Adipozyten-, Osteoblasten-, Chondrozyten-, Skelettmyoblasten- [25] und möglicherweise auch in Kardiomyozyten-ähnliche Zellen [26]. 5-Azacytidin, ein Cytosin-Analog, kann die Demethylierung von 5-Methylcytosinresten in der DNA verursachen und reduziert in Zellen die DNA-Methyltransferase-Aktivität [27]. Die resultierende Hypomethylierung könnte zur Aktivierung phänotypspezifischer Gene beitragen.

Durch Zugabe von 5-Azacytidin konnten embryonale Zelllinien der Maus in drei verschiedene mesodermale Zelltypen umgewandelt werden [28,29]. 5-Azacytidin behandelte immortalisierte Klone muriner MSC kontrahierten spontan und exprimierten mehrere herzspezifische Marker [26,30,31]. Auch nach Kokultivierung mit neonatalen

Rattenkardiomyozyten wurde eine kardiale Differenzierung muriner MSCs beschrieben [32].

Untersuchungen zur Differenzierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark von Ratten lieferten unterschiedliche Ergebnisse. Es wurde zunächst gezeigt, dass mit 5-Azacytidin oder 5-Aza-2-deoxycytidin behandelte MSCs myogene Strukturen ausbilden und spontan kontrahieren [33]. Andere Untersuchungen konnten dagegen keine spontanen Kontraktionen der MSC nach Behandlung mit 5-Azacytidin feststellen, die behandelten Zellen zeigten keine Expression von kardialem MHC, Connexin 43 oder Troponin T [34].

Bei Versuchen in der Ratte [35] und im Schwein [36] wurde in einem Infarktmodell nach Transplantation von 5-Azacytidin-behandelten, mit Bromdesoxyuridin markierten Stromazellen eine verbesserte Herzfunktion gezeigt. Die überlebenden Zellen schienen dabei Troponin I zu exprimieren, in der Ratte auch sarkomerisches „myosin heavy chain“ und Connexin 43 [37]. Eine Verbesserung der Herzfunktion konnte auch nach Transplantation unbehandelter Knochenmarks-Stromazellen gezeigt werden [38]. Die Transplantation undifferenzierter mesenchymaler Stammzellen in geschädigtes Herzgewebe führte z.T. aber auch zur Bildung fibroblastischen Narbengewebes [39].

Die Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen in Adipozyten-, Osteoblasten- und Chondrozyten-ähnliche Zellen wurde ebenfalls gezeigt [40]. Eine *ex vivo* Differenzierung von humanen Knochenmarksstammzellen in Kardiomyozyten-ähnliche Zellen soll durch Kultivierung in einem speziellen Medium unter Zusatz von Insulin, Dexamethason und Ascorbinsäure erreicht worden sein [41]. Die so kultivierten Zellen zeigten sarkomere Strukturen und eine Expression von verschiedenen herzspezifischen Proteinen. Erste Studien zur Transplantation humaner Stammzellen aus dem Knochenmark zeigten wie im Tiermodell eine Verbesserung der Herzfunktion nach myokardialen Infarkt [42-44].

Die Definition der mesenchymalen Stammzellen ist nicht einheitlich, es wurden weitere Subpopulationen wie die RS-Zellen („recycling stem cells“) beschrieben [45,46], sowie mesenchymale Stammzellen mit weitergehendem Differenzierungspotential, wie die multipotenten adulten Progenitorzellen (MAPCs) [47] oder die „human bone-marrow derived multipotent stem cells“ (hBMSCs) [44]. Mesenchymale Stammzellen wurden auch aus der Nabelschnur [48] und aus dem Stroma des Fettgewebes isoliert. Diese „adipose tissue stem cells“ (ATSC) zeigten spontan [49] oder nach Kokultivierung mit Extrakten aus Rattenkardiomyozyten [50] eine Differenzierung in Kardiomyozyten-ähnliche Zellen.

Mesenchymale Stammzellen konnten auch im peripheren Blut nachgewiesen werden [51], sie wurden vermutlich aus dem Knochenmark mobilisiert.

Von einer weiteren Zellpopulation aus dem Knochenmark, die durch die Abwesenheit von Markern der hämatopoetischen Linie und der Expression von c-kit charakterisiert wird (lineage⁻/c-kit⁺), wurde berichtet, dass sie in der Maus möglicherweise ebenfalls zu einer Regeneration von geschädigtem Infarktgewebe führt, indem sie in verschiedene kardiale Zelltypen wie Myozyten, Endothelzellen und glatte Muskulatur differenziert [52-54]. Der Tyrosinkinase-Rezeptor c-kit und sein Ligand Stammzell-Faktor (stem cell factor, SCF) sind an Regulationsprozessen der Differenzierung verschiedenster Gewebe beteiligt [55]. Auch für sogenannte „side population“ (SP) Zellen, hochaufgereinigte CD34⁻/c-kit⁺/sca-1⁺ Zellen aus dem Knochenmark wurde von einem kardialen Regenerationspotential nach Transplantation in geschädigte Herzareale berichtet [53,56].

In den meisten Fällen ist nicht endgültig geklärt, welche molekularen Ereignisse *in vivo* zu einer Verbesserung der Herzfunktion nach Transplantation von Stammzellen führen. Zum einen könnten zelluläre Effekte eine Rolle spielen, d.h. die applizierten Zellen selbst führen z.B. durch Transdifferenzierung in Kardiomyozyten zu einer Verbesserung der Funktion. Zusätzlich gibt es Berichte über die Fusion von transplantierten Stammzellen mit Kardiomyozyten [57], diese könnte eine Ursache für falsch-positive Daten über transdifferenzierte Zellen sein. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass eine solche Fusion auch einen therapeutischen Effekt haben könnte, wie er für geschädigtes Lebergewebe bereits gezeigt wurde [58]. Auch eine Verbesserung der Herzfunktion durch eine mechanische Stabilisierung der Infarktzone durch die eingebrachten Zellen wäre möglich. Auf der anderen Seite sind auch parakrine Effekte denkbar, die einen Einfluss auf das Überleben und die Proliferation von Zellen im Myokard oder die Bildung von Narben haben könnten. Da in MSCs bei ungenügender Sauerstoffversorgung die Expression und Sekretion von Cytokinen wie FGF, VEGF und Angiopoetin [59] hochreguliert wird, könnte auch ein Beitrag zur Vaskularisierung eine Rolle spielen, auch für eine Differenzierung von MSCs zu einem endothelialen Phänotyp gibt es Hinweise [60].

1.1.3 Adulte Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut

Die Identifizierung von humanen Endothelvorläuferzellen (endothelial progenitor cells, EPCs) aus dem peripheren Blut widerlegte 1997 die Annahme, dass eine postnatale Neovaskularisierung ausschließlich durch Proliferation und Migration vollständig differenzierter Endothelzellen stattfindet. EPCs wurden zunächst aufgrund der Expression von CD34 und Flk-1 sowie ihrer Adhärenz an Zellkulturschalen identifiziert. Sie sind im

Gegensatz zur Leukozytenfraktion des Blutes CD45-negativ und exprimieren weitere Endothelzellmarker wie KDR, Tie-2 und CD117 [61].

Nach Transplantation markierter EPCs in ischämische Areale bei Mäusen und Kaninchen erfolgte ein Einbau dieser Zellen in Kapillaren und kleinere Arterien in den neovaskulären Zonen [61]. Auf diese Weise könnten EPCs auch im adulten Organismus zur Vaskulogenese beitragen, also einer Neubildung von Gefäßen wie während der Embryonalentwicklung [62-64], und so z.B. nach einem Herzinfarkt durch eine Förderung der eingeschränkten Durchblutung zu einer Funktionsverbesserung führen [65].

Erste Hinweise auf eine angebliche kardiale Transdifferenzierung von Endothelzellen wurden 2001 veröffentlicht [66]. Endothelzellen unterschiedlicher Herkunft wurden zunächst mit Hilfe von Adeno- oder Lentiviren markiert und anschließend mit Kardiomyozyten kokultiviert oder in ischämische Bereiche infarktgeschädigter muriner Herzen injiziert. Anschließend wurden bei bis zu 10% der markierten Zellen kardiale Marker mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen. Eine solche Doppelfärbung als Anzeichen einer Transdifferenzierung der Endothelzellen wurde ausschließlich bei direktem Zell-Zell-Kontakt von Endothelzellen und Kardiomyozyten beobachtet. Dabei zeigten aus der Aorta isolierte murine embryonale Endothelzell-Vorläufer und aus murinen embryonalen Stammzellen generierte Endothelzellen das größte Differenzierungspotential.

Eine kardiale Transdifferenzierung humaner zirkulierender EPCs aus dem peripheren Blut nach Kokultivierung mit primären neonatalen Rattenkardiomyozyten wurde 2003 von Badorff et al. beschrieben [67]. In den Kulturen wurde eine Zunahme der Zellgrößen markierter huEPCs gezeigt, nach Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern schienen ca. 10% der markierten Zellen auch kardiale Markerproteine zu exprimieren. Eine Doppelfärbung trat auch hier nur bei direktem Zell-Zell-Kontakt der huEPCs und Kardiomyozyten auf. Durch Farbstoffübertritt wurden Gap Junctions zwischen huEPCs und Kardiomyozyten gezeigt. Kontrollen mit fixierten Kardiomyozyten sollten dabei die Möglichkeit einer Fusion der Zellen als Grund für die Doppelfärbung ausschließen.

Eine solche kardiale Differenzierung von Endothelvorläuferzellen wurde bisher nicht von anderen Arbeitsgruppen reproduziert, auch der Phänotyp der verwendeten Zellpopulation ist umstritten. Verschieden Studien definieren EPCs als VEGFR2⁺/CD133⁺/CD34⁺ Subpopulationen der mononukleären Blutzellen [62], oder als CD34⁺/VEGFR2⁺ [68] bzw. CD133⁺/VEGFR2⁺ Zellen, die aus dem Knochenmark stammen und von dort bei Bedarf

mobilisiert werden [69]. Es wurden auch CD34⁻ Populationen identifiziert, die zu EPCs und letztlich Endothelzellen differenzieren [47].

Neuere Daten scheinen zu belegen, dass es sich bei den von Badorff et al. als EPCs bezeichneten Zellen, bei denen aufgrund der Aufnahme von acetyliertem LDL und der Bindung des Lektins UEA-1 ursprünglich ein endothelialer Phänotyp angenommen wurde, fast ausschließlich um Zellen handelt, die aus Monozyten/Makrophagen hervorgehen. Sie exprimieren nur zu einem geringen Prozentsatz Endothelzellmarker, weshalb diese Zellen auch als „circulating angiogenic cells“ (CACs) bezeichnet wurden [70]. Die in expandierten EPCs enthaltene CD14⁺/CD34⁻ Zellpopulation könnte durch die Freisetzung parakriner Faktoren einen Angiogenese-fördernden Effekt haben [71]. Diese CD14⁺ Zellen der Leukozyten-Linie setzen außerdem Cytokine frei, die wichtige Signale für eine Wundheilung darstellen könnten [72,73].

Das kardiale Differenzierungspotential der EPCs und ihr möglicher Beitrag zu einer Regeneration von geschädigtem Herzgewebe sind daher bisher nicht geklärt und sollten im Rahmen der vorliegenden Dissertation näher untersucht werden.

Offen bleibt auch, ob eine Regeneration des Myokards durch Einwanderung der entsprechenden Zellen aus dem peripheren Blut oder aus dem Knochenmark und anschließender Differenzierung in kardiale Zelltypen auch *in vivo* eine Rolle spielen könnte. Weiter ist unklar, ob *in vitro* entstehende differenzierte Zellen wirklich „normalen“ ausdifferenzierten Kardiomyozyten entsprechen. Es wäre einerseits möglich, dass die *in vitro* Differenzierung adulter Stammzellen zu artifiziellen Zelltypen führt, die nur einige kardiale Merkmale oder Marker aufweisen, andererseits könnte ihre Differenzierung auch entsprechend der kardialen Differenzierung in der Embryogenese verlaufen.

1.2 Kardiale Differenzierung und Expression in der Embryogenese

Die Entwicklung des Herzens setzt bei Säugetieren sehr früh in der Embryogenese ein und umfasst eine komplexe Abfolge von Ereignissen. Möglicherweise lassen sich Erkenntnisse bezüglich der molekularen Mechanismen der kardialen Differenzierung während der Embryogenese auch auf adulte Stammzellen übertragen. Einzelne Faktoren, die dabei eine wichtige Rolle spielen, könnten als Marker für eine kardiale Differenzierung dienen oder eventuell auch zur gezielten Induktion oder Unterstützung solcher Differenzierungsvorgänge eingesetzt werden und werden deshalb im Folgenden näher beschrieben.

In der Kardiogenese erfolgt zunächst eine Spezifizierung von Zellen aus dem Mesoderm und der Neuralleiste auf die kardiale Entwicklungslinie, dann Wachstum und Differenzierung dieser Zellen zu Kardiomyozyten und schließlich kommt es zur Ausbildung der Morphologie des adulten Herzens [74]. Die bei dieser Entwicklung maßgeblichen Transkriptionsfaktoren sind zwischen den einzelnen Säugetier-Spezies und dem Menschen stark konserviert. Während beim Menschen Kenntnisse über das Zusammenspiel der einzelnen Faktoren hauptsächlich aus dem Studium von zufällig auftretenden Mutationen stammen, die z.T. zu schweren Herzmissbildungen führen, wurden in der Maus gezielte Untersuchungen durchgeführt, bei denen einzelne Faktoren inaktiviert oder reprimiert bzw. überexprimiert wurden.

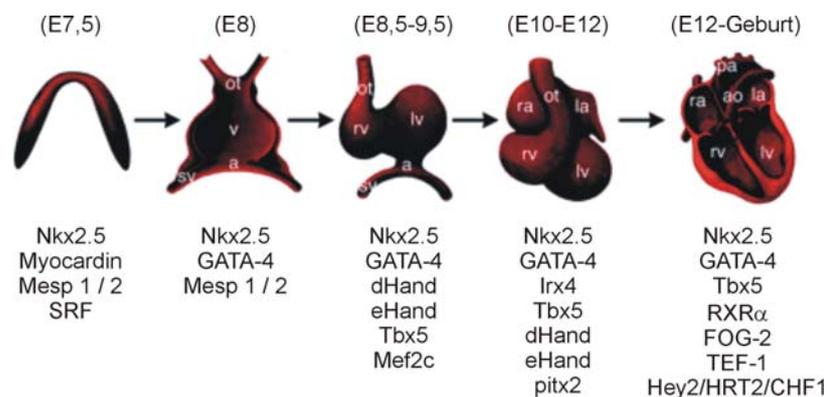


Abbildung 1.1 Herzentwicklung in der Maus

Dargestellt sind die morphologischen Entwicklungsstadien des Herzens im Mausembryo, sowie die in den einzelnen Phasen exprimierten Transkriptionsfaktoren. Abkürzungen: ot, Ausflusstrakt; v, Ventrikel; a, Atrium; sv, Sinus Venosus; rv, rechter Ventrikel; lv, linker Ventrikel; ra, rechtes Atrium; la, linkes Atrium; pa, Pulmonararterie; ao, Aorta. Quelle: [75]

In der Maus lassen sich die frühesten Herzvorläuferzellen auf etwa 50 Ausgangszellen am Tag 6.5 der Entwicklung (E6.5) zurückführen [76]. Diese Zellen wandern in das primäre

Herzfeld im anterioren Mesoderm [77], wo ihre kardiale Differenzierung als Antwort auf induktive Signale aus dem anterioren Endoderm erfolgt, speziell durch Smad-vermitteltes [78] BMP-Signalling [79] und Wnt-Inhibition [80-82]. Die kardialen Zellen migrieren in die Mitte des Embryos und verschmelzen zu einem sichelförmigen Herzplexus, dem „cardiac crescent“ (E7.5). Bereits ab diesem Zeitpunkt werden von den frühen Herzzellen die Transkriptionsfaktoren Myocardin (E7.75) [83] und Nkx2.5 (E7.5) exprimiert [84].

Der Homöobox Transkriptionsfaktor Nkx2.5 enthält wie sein Drosophila-Analog Tinman eine konservierte Helix-Turn-Helix-Domäne, die an die Konsensussequenz TNAAGTGG bindet, sowie eine aminoternale TIN-Domäne. Während Tinman für die kardiale Spezifizierung benötigt wird, ist Nkx2.5 trotz seiner frühen Expression für die Spezifizierung kardialer Progenitorzellen anscheinend nicht essentiell - vermutlich weil es im Vergleich zu Tinman verkürzt ist und nicht die sogenannte kardiogene Region enthält [85]. Nkx2.5 ist in der Maus für die spätere Morphogenese der Ventrikel essentiell und spielt eine Rolle in der Regulation der Expression von ANF, MLC2v und dem Myocyte Enhancer Faktor MEF2c [86], sowie bei der Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren wie z.B. eHAND [87] und GATA4 [88]. Die Expression von Nkx2.5 ist auch im adulten Organismus auf das Myokard beschränkt [89,90].

An Tag 8 schließt sich der Herzplexus zu einem linearen Herzschlauch [75]. Der Zink-Finger-Transkriptionsfaktor GATA4 (ab E7.5) [91] spielt bei der dafür nötigen Zellmigration eine wichtige Rolle, indem er die Entwicklung der endokardialen Schicht reguliert, mit der darauf aufliegende myokardiale Zellen zusammen migrieren [75,92]. GATA4-Nullmutante Mäuse entwickeln schwere morphologische Defekte am Dottersack und am Herzen, zeigen aber wie nach Deletion von Nkx2.5 trotzdem eine kardiale Spezifizierung [92,93]. Alle GATA Proteine enthalten eine konservierte Typ IV Zink-Finger-Domäne, die das Konsensus-Motiv (A/T)GATA(A/T) erkennt und bindet [94]. GATA-4 kann auch mit Nkx2.5 interagieren, beide Transkriptionsfaktoren regulieren so die Expression von ANF, die im frühen Herzschlauch einsetzt [95], sowie die Expression von kardialem α -Actin [88]. Zusammen mit Myocardin aktiviert GATA4 die Expression von MLC2v [96]. GATA4 wird während der Entwicklung in den kardialen Progenitorzellen exprimiert, im adulten Organismus in Kardiomyozyten, in den glatten Muskelzellen des Darms und des Urogenitaltraktes [97] sowie in Ovarien, Testis, Leber und Lunge [94].

Der entstandene Herzschlauch beginnt zu pulsieren und faltet sich zur Herzschleife auf (E8.5-E9.5) [75], so dass die zuvor sequentiell angeordneten Atrien und Ventrikel jeweils nebeneinander positioniert werden. Ungefähr zur gleichen Zeit werden weitere Zellen aus

dem Mesoderm rekrutiert, die zu Regionen des Ausflusstraktes, den Atrien und dem rechten Ventrikel beitragen. Dabei ist unklar, ob es sich dabei um Zellen aus einem separaten, sekundären Herzfeld handelt [98] oder um eine Subpopulation aus dem primären Herzfeld [99], die durch eine Expression von Islet-1 gekennzeichnet ist [100].

Die Ausbildung der einzelnen Herzkammern (E10-E12) resultiert aus einer bereits im Herzschlauch vorhandenen kammerspezifischen Genexpression, wie auch die Unterscheidung in den linken und rechten Ventrikel. Diese wird unter anderem durch die gewebespezifischen bHLH-Transkriptionsfaktoren dHAND und eHAND vermittelt [101], die als kanonische Sequenz eine sogenannte E-Box mit der Sequenz CANNTG binden. dHAND und MEF2c aktivieren zusammen die Expression von ANF und α -MHC [102]. Der T-Box Transkriptionsfaktor Tbx5 ist zusammen mit Nkx2.5 an der positiven Regulation von ANF und dem Gap Junction-Protein Connexin 40 beteiligt, und bewirkt eine negative Regulation der MLC2v-Expression. Tbx5 übt außerdem einen Einfluss auf die Expression der Transkriptionsfaktoren Irx4 und Hey2 aus [103,104]. Irx4 spielt bei der postnatalen Repression von ANF im Ventrikel eine Rolle [105], der Faktor Hey2 bewirkt meist ebenfalls eine Repression der Genexpression [106].

Bei der Ausbildung der Septen (E12 bis zur Geburt) [75] spielt der Multitype Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Friend of GATA 2 (FOG2) eine Rolle, der auch an der Differenzierung anderer Gewebe beteiligt ist. FOG2 wird ab E9.0 im Herzschlauch exprimiert und wirkt als Ko-Faktor von GATA4 [107,108], der selbst vermutlich nicht an die DNA bindet [109]. FOG2 aktiviert zusammen mit GATA4 auch die Expression von α -MHC und bewirkt eine Repression der Expression von ANF [109], das im adulten Herzen nur in den Atrien exprimiert wird [95]. Durch dieses Zusammenspiel trägt FOG2 zu einer kammerspezifischen Genexpression bei, obwohl es selbst nicht exklusiv im Herzen exprimiert ist, sondern in der adulten Maus auch in Gehirn und Testis sowie in der Leber vorkommt [109].

1.3 Promotoren für den Nachweis kardial differenzierter Stammzellen

Für den spezifischen Nachweis von aus Stammzellen differenzierten Kardiomyozyten bieten sich Reporterkonstrukte mit verschiedenen kardialen Promotoren an. Neben den Transkriptionsfaktoren zur Regulation der Genexpression werden im adulten Herzen eine Reihe von Proteinen exprimiert, die für die Kontraktilität des Myokardgewebes oder die Aufrechterhaltung des Blutdruckes erforderlich sind und aufgrund ihrer exklusiven Expression im Herzgewebe als kardiale Marker genutzt werden können. Sie können auf der Ebene des Proteins immunhistologisch nachgewiesen werden, auf der Ebene der

mRNA molekularbiologisch mittels RT-PCR oder *in vivo* durch die Verwendung von rekombinanten Reporter-genkonstrukten mit den entsprechenden Promotoren der kardialen Proteine. Damit kann nicht nur die Entwicklung von Kardiomyozyten in der Embryogenese verfolgt werden, sondern auch eine potentielle kardiale Differenzierung adulter Stammzellen. Entsprechende Konstrukte wurden bereits zur Charakterisierung kardial differenzierter embryonaler Stammzellen eingesetzt [110,111]. Für eine detaillierte molekulare Charakterisierung von Kardiomyozyten und differenzierten Stammzellen können diese außerdem mithilfe solcher Reporter-genkonstrukte aufgereinigt werden.

Der Atriale Natriuretische Faktor (ANF) ist ein kardiales Peptidhormon mit diuretischer, natriuretischer und vasodilatatorischer Aktivität, das eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des Blutdruckes und des Natriumgleichgewichtes spielt [102]. Im sehr frühen, linearen Herzschlauch wird das für ANF kodierende Gen noch nicht exprimiert, seine Expression setzt während der frühen Herzschleifenbildung (E8.5) auf der ventralen Seite der frühen Herzschleife ein. Ab E9-9.25 verlagert sich die Expression vom rechten in den linken Ventrikel und die Bereiche der Atrien. Zwischen E9 und E11 nimmt die Expression von ANF im rechten Ventrikel ab, so dass ANF im adulten Myokard als Marker für atriale Zellen angesehen wird, in denen es in sekretorischen Granula vorliegt [95].

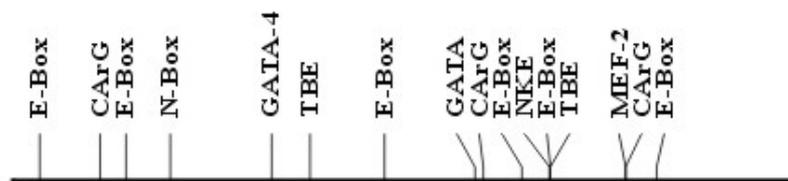


Abbildung 1.2 ANF-Promotor

Schematische Darstellung des humanen ANF-Promotors mit Bindungssequenzen für kardiale Transkriptionsfaktoren; 581 bp; NCBI Gen-Datenbank Nr. gi 178629, ab Position 1. Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren laut TESS-Datenbank [112].

Der Promotor des ANF enthält eine TATA-Box, eine Erkennungssequenz für den Transkriptionsfaktor Nkx2.5 (NKE), auf die eine AT-reiche Sequenz, eine GATA4-Erkennungssequenz sowie mehrere E-Box-Motive [102] und T-Box-Motive folgen [113]. Die Expression von ANF wird durch das Zusammenwirken von Tbx5 und Nkx2.5 bzw. Tbx5 und GATA4 aktiviert, Tbx20 führt dagegen in Kombination mit Nkx2.5 bzw. GATA4 zu einer verminderten Expression [114]. Weiter stromaufwärts bis -700bp liegen Sequenzen des ANF-Enhancers [88]. Diese Sequenzen sind stark konserviert, im Xenopus-Modell wurden in der Promotorregion weitere Bindungsstellen für SRF und MEF2c identifiziert [115], die Expression von ANF wird durch Bindung von Myocardin an

das SRE aktiviert [116]. In der Promotorregion ab -136bp stromaufwärts liegt vermutlich ein Regulatorelement, das die Expression von ANF in nicht-kardialen Zellen reprimiert und zur spezifischen Expression von ANF in atrialen Kardiomyozyten beiträgt [115].

Die kontraktile Funktion des Myokardgewebes beruht unter anderem auf der Expression verschiedener Myosinkomponenten wie den schweren (myosin heavy chain, MHC) und leichten (myosin light chain, MLC) Ketten. Drei Isoformen des MHC konnten im Säugetier-Herz identifiziert werden: V₁, ein Homodimer der α -MHC-Isoform; V₂, ein Heterodimer aus α -MHC und β -MHC; und V₃, ein Homodimer des β -MHCs. Pränatal dominiert die β -Isoform, die in der Maus ab E8-8.5 im gesamten Herzschlauch exprimiert wird und dabei einen anterior-posterioren Gradienten bildet. Nach der Geburt findet eine zunehmende Herunterregulierung des β -MHC-Gens und eine gleichzeitige Hochregulierung des α -MHC-Gens statt, so dass in adulten ventrikulären Kardiomyozyten die α -MHC-Isoform überwiegt. Während β -MHC auch im Skelettmuskel exprimiert wird, gilt das α -MHC als spezifisch kardiales Markerprotein [117]. Durch seine charakteristische ATPase-Aktivität und den daraus resultierenden Einfluss auf die Energieübertragung im Muskel, spielt α -MHC eine wichtige Rolle bei der Regulation der Kontraktions-Geschwindigkeit im Herzmuskel [118].

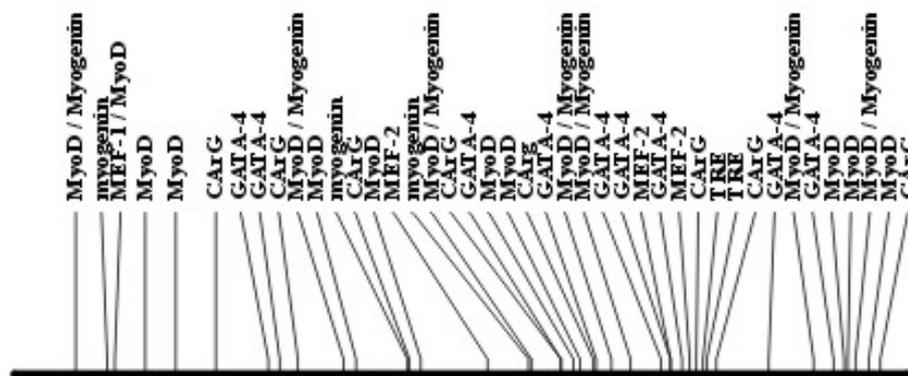


Abbildung 1.3 α -MHC-Promotor

Schematische Darstellung des murinen α -MHC-Promotors mit Bindungssequenzen für kardiale Transkriptionsfaktoren; 5,3 kb; NCBI Gen-Datenbank Nr. gi 1621436, ab Position 146. Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren laut TESS-Datenbank [112].

Die komplementäre Regulation von α -und β -MHC wird zu einem großen Teil durch Thyroxin, ein Thyroid-Hormon vermittelt. In einem Bereich von -200bp stromaufwärts der TATA-Box des α -MHC-Promotors liegen mehrere „thyroid response elements“ (TRE), die durch diese Steroide aktiviert werden können [118]. Daneben enthält der Promotorbereich

des α -MHC-Gens drei GATA4-Bindungssequenzen, sowie mehrere Bindungsstellen für MEF-1 und -2 und CarG-Elemente [119].

Die kardialen Formen der leichten Ketten des Myosins, die MLC2-Gene, werden spezifisch in den Herzkammern exprimiert, auch hier gibt es verschiedene Isoformen. Während das MLC2a relativ spezifisch in atrialen Kardiomyozyten exprimiert wird [30] wird das MLC2v als früher ventrikelspezifischer Marker angesehen [120]. MLC2v wird im kardiogenen Mesoderm ab E7.5-E8 exprimiert [86] und bildet im Herzschlauch entlang der anterior-posterioren Achse einen bilateralen Gradienten aus. Während der Schleifenbildung ist MLC2v noch nicht auf das spätere ventrikuläre Myokard beschränkt, erst ab E9-9.5 wird es in den ANF-positiven Bereichen des atrialen Myokards nicht mehr exprimiert [95].

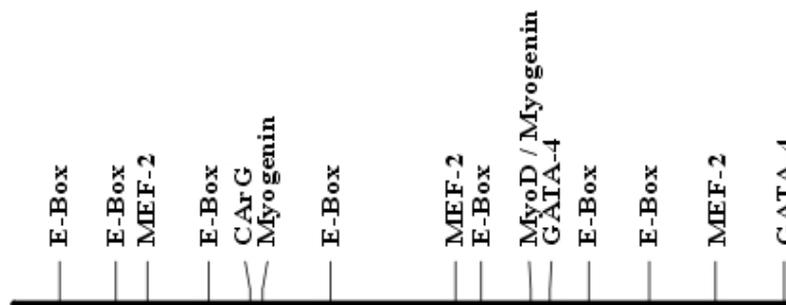


Abbildung 1.4 MLC2v-Promotor

Schematische Darstellung des humanen MLC2v-Promotors mit Bindungssequenzen für kardiale Transkriptionsfaktoren; 1,3 kb; NCBI Gen-Datenbank Nr. gi 340286, ab Position 3. Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren laut TESS-Datenbank [112].

Der Promotorbereich des MLC2v-Gens enthält stromaufwärts der TATA-Box Bindungsstellen für die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren HF-1a, HF-1b, HF-2 und Hf-3 [121]. Die Expression wird durch Bindung von HF-1b und MEF2 an diese AT-reichen Sequenzen reguliert [122]. Die HF-1 Region liegt zwischen -45 bp und -72 bp und enthält neben CarG-Boxen als Bindungsstellen für SRF auch Motive, die von MEF2 erkannt werden [123]. Eine „cardiac specific sequence“ (CSS) bewirkt die Repression der MLC2v-Expression in nicht-kardialen Gewebe [124].

Im Herzen findet außerdem die Expression weiterer MLC-Proteine wie MLC1a und MLC1v statt, die sich außer im Herzen auch im schnellen Skelettmuskel nachweisen lassen [125] sowie von verschiedenen α -Aktin-Formen [26].

In der Maus wird α -Aktin ab Tag E8.5 im frühen Myokard und in den Somiten exprimiert [126]. Nach der Geburt wird das kardiale α -Aktin (α -cardiac actin, CA) im Herzen weiterhin stark exprimiert, während seine Expression im Skelettmuskel gleichzeitig herunterreguliert wird. Komplementär dazu entwickelt sich nach der Geburt das Expressionsmuster des skelettalen α -Aktin [127]. Kardiales α -Aktin ist essentiell für die Ausbildung einer normalen Struktur und Funktion der Kardiomyozyten, eine Nullmutation führt zu einer dramatischen Desorganisation der Sarkomere, die schließlich letal wirkt [128].

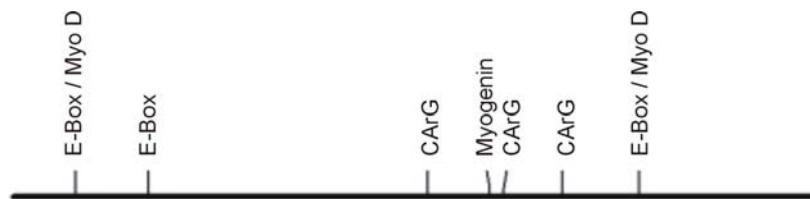


Abbildung 1.5 Cardiac Actin-Promotor

Schematische Darstellung des humanen CA-Promotors mit Bindungssequenzen für kardiale Transkriptionsfaktoren; 554 bp; NCBI Gen-Datenbank Nr. gi 178033, ab Position 1. Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren laut TESS-Datenbank [112].

In der Sequenz des hCA-Promotors liegen neben der TATA-Box und CAAT-Boxen Bindungsstellen für die Faktoren MyoD, SP1 und SRF, die für eine muskelspezifische Expression von hCA essentiell sind [129,130]. Das Sequenzmotiv SRE ist in multiplen Kopien vorhanden und trägt bei Bindung von SRF zur positiven Regulation der Genexpression bei, der Transkriptionsfaktor YY1 kann kompetitiv mit SRF an das SRE binden und ist so an der negativen Regulation des hCA beteiligt [131]. Zur spezifisch kardialen Expression des hCA werden vermutlich weitere kardialer Enhancer benötigt, die sich in der Region -0,7 kb bis 5,4 kb stromaufwärts der TATA-Box befinden [132,133].

1.4 Lentiviraler Gentransfer

Für die geplante Verwendung von Reportergenen mit kardialen Promotoren zur Detektion kardial differenzierter Zellen ist eine ausreichend hohe Effizienz des Gentransfers der entsprechenden rekombinanten Konstrukte in die zu untersuchenden Stamm- und Progenitorzellpopulationen sowie in Kardiomyozyten essentiell.

Konventionelle nicht-virale Methoden erreichen bei einem Gentransfer in diesen Zellen meist nur eine geringe Effizienz, daher erscheint der Einsatz von viralen Vektoren vorteilhaft. Prinzipiell eignen sich für eine Transduktion von Kardiomyozyten als terminal differenzierte, nicht proliferierende Zellen sowohl Adenoviren als auch vom Humanen

Immundefizienz Virus-1 (HIV-1) abgeleitete lentivirale Vektoren. Allerdings haben Lentiviren im Vergleich zu Adenoviren den Vorteil, durch Integration des Transgens in das Genom der Zielzelle eine stabile Langzeit-Expression zu bewirken. Deshalb können mit ihrer Hilfe auch stabil exprimierende transgene Zelllinien, z.B. adulter oder embryonaler Stammzellen, generiert werden.

1.4.1 Das Lentivirus HIV-1

Lentiviren sind eine Familie komplexer Retroviren, die chronische und progressive Erkrankungen induzieren, im Falle des humanen HIV-1 das schwere Immunschwäche-Syndrom AIDS. Das 9 kb große Genom von HIV-1 enthält insgesamt neun Gene, die für 15 Proteine kodieren. Die Virus-Partikel enthalten ein diploides RNA-Genom, das mit verschiedenen Proteinen assoziiert in einem Capsid vorliegt, und werden von einer Membran umhüllt, in die verschiedene Hüllproteine integriert sind.

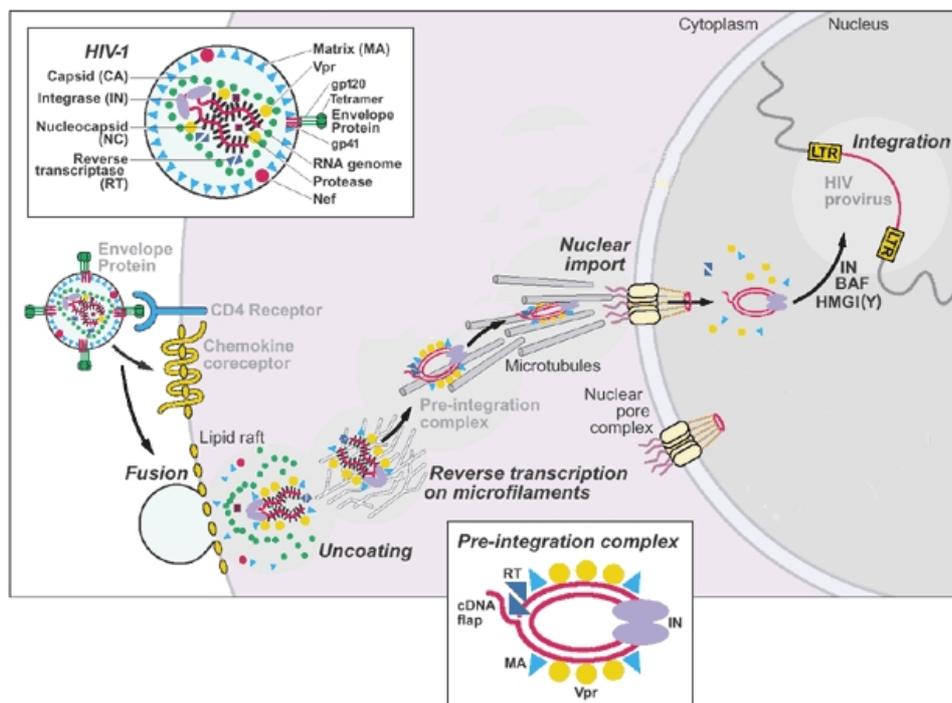


Abbildung 1.6 Aufbau von HIV-1 und Infektion einer Wirtszelle

Schematische Darstellung der frühen Ereignisse während der HIV-Infektion einer Zielzelle, inklusive der Interaktionen zwischen gp120, CD4 und Chemokinrezeptoren (CCR5 oder CXCR4), die zu einer gp41-vermittelten Fusion führen, gefolgt von der Auflösung der Virushülle, der reversen Transkription des RNA-Genoms, dem Kern-Import des viralen Präintegrations-komplex und der Integration der doppelsträngigen viralen cDNA in das Genom der Wirtszelle. Quelle: [134]

HIV tritt in die Wirtszelle durch Fusion und Endozytose ein, eine produktive Infektion erfolgt allerdings nur nach Fusion. Das trimere Oberflächenprotein gp120 auf den Virionen

interagiert mit CD4-Epitopen auf der Wirtszelle, eine dadurch ausgelöste Konformationsänderung begünstigt dann die Bindung an Chemokinrezeptoren [135], die sich hauptsächlich in Cholesterin- und Sphingolipidreichen Domänen der Zellmembran, den „lipid rafts“ befinden [136]. Die Bindung an diese Chemokinrezeptoren bestimmt auch den Tropismus des HIV-1: An den Rezeptor CCR5 binden Makrophagen-spezifische, nicht Syncytien-induzierende virale Isolate (R5 Viren), an den Rezeptor CXCR4 T-Zell-spezifische, Syncytien-induzierende virale Isolate (X4 Viren) [137]. Das Zusammenspiel von gp120, CD4 und Chemokinrezeptoren bewirkt eine Konformationsänderung des Transmembranproteins gp41, das sich über drei Peptid-Fusions-Domänen in die Zellmembran integriert und so eine Fusion von Virus und Wirtszelle induziert [138].

In der Wirtszelle werden die eingeschleusten viralen Elemente entpackt, der entstehende Reverse-Transkriptions-Komplex aus dem diploiden viralen RNA-Genom, tRNA^{Lys}-Primern, den viralen Proteinen Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN), Matrix (MA), Nucleocapsid (NC), dem viralen Protein R (Vpr) und diversen Wirtsproteinen wird durch Vif stabilisiert und dockt an Aktinfilamente an, wo die Reverse Transkription stattfindet [134].

Die Reverse Transkription führt zur Bildung des Präintegrationskomplexes (preintegration complex, PIC) aus doppelsträngiger viraler cDNA, Integrase, Matrix, Vpr, der RT und dem high-mobility group DNA-bindenden Protein HMGI(Y) [139]. Der PIC wird aktiv durch die Kernporen in den Zellkern transportiert, weshalb HIV-1 auch terminal differenzierte Zellen infizieren kann [140], bei denen es aufgrund der fehlenden Zellteilung nicht zu einer Auflösung der Kernmembran kommt, die einen passiven Transport in den Kern ermöglichen würde. Der Kerntransport wird zum einen durch ein kanonisches Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal, NLS) im Matrix-Protein vermittelt, das von Importin- α und - β erkannt wird [141], zum anderen durch nicht-kanonische Kern-Transport-Signale von Vpr [142] und der Integrase [143].

Im Zellkern entfernt die Integrase an den Enden der viralen cDNA einige Nukleotide, so dass ein Überhang von 2 Nukleotiden entsteht, über die der HIV-Provirus in das Chromosom der Wirtszelle integriert wird [139]. Ins Genom integriert, funktionieren die viralen Long Terminal Repeats (LTRs) am 5'-Ende des Provirus wie andere eukaryotische Transkriptionseinheiten, sie enthalten verschiedene Promotorelemente wie den Initiator (Inr), TATA-Box und drei Sp1-Bindungsstellen, die für eine Bindung der RNA-Polymerase II verantwortlich sind [144].

Die vom integrierten viralen Genom kodierten Proteine werden so mithilfe des zelleigenen Transkriptions- und Translations-Apparates exprimiert, sie bewirken schließlich die Verpackung neu gebildeter viraler RNA in weitere Virionen, die aus der Zelle ausgeschleust werden und weitere Zellen infizieren können [134].

1.4.2 Lentivirale Vektorsysteme

Die Fähigkeiten der Lentiviren zur Transduktion von nicht-proliferierenden Zellen und stabiler Integration ihres Genoms in das der Wirtszelle, können in lentiviralen Vektorsystemen für einen Gentransfer genutzt werden [145]. Lentivirale Vektoren haben gegenüber anderen viralen oder nicht-viralen Gentransfer-Technologien etliche Vorteile, neben der hohen Effizienz der Transduktion und der effizienten Integration auch die Langzeit-Expression mit einem geringen Ausmaß an Gen-„Silencing“ [146]. Außerdem zeigten sich lentivirale Vektoren als nicht-immunogen, da nach Transduktion keine viralen Proteine exprimiert werden [147]. Die Höhe der Transgenexpression scheint relativ unabhängig vom Integrationsort des Provirus im Genom zu sein [148], und auch größere Konstrukte können verpackt werden [149].

Der Aufbau lentiviraler Vektorsysteme basiert auf einer Auftrennung von viralen Genen in *cis*-aktive Sequenzen, die für den Transfer des viralen Genoms in die Zielzelle benötigt werden, und *trans*-aktive Sequenzen, die für virale Proteine kodieren. Viruspartikel werden so von viralen Proteinen zusammengesetzt, die *in trans* von Verpackungs-Vektoren exprimiert werden, denen die meisten viralen *cis*-aktiven Sequenzen fehlen. Die viralen *cis*-aktiven Sequenzen sind an eine Expressionskassette mit dem zu übertragenden Transgen gekoppelt und bilden ein Transfervektor-Konstrukt. Die Expressionskassette wird von den viralen LTRs flankiert und liegt stromabwärts des viralen Verpackungssignals (packaging signal, psi bzw. Ψ). Die unterschiedlichen Vektoren für *cis*- und *trans*-aktive Sequenzen werden in dieselbe Zelle eingebracht, in der dann lentivirale Partikel gebildet werden, die ausschließlich Sequenzen des Transfer-Vektors enthalten, und nur diese auf Zielzellen übertragen. Da den Zielzellen die viralen Proteine zur weiteren Bildung von Viruspartikeln fehlen, bleibt es so bei einer einzigen Runde der Transduktion, die rekombinant hergestellten Viren sind replikationsdefizient [148].

Lentivirale Vektoren wurden ursprünglich als virale Hybride konzipiert, die aus den essentiellen Proteinen und Enzymen vom Wildtyp HIV-1 bestehen, kombiniert mit der Proteinhülle eines anderen Virus, meist der des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV) [145].

Neuere lentivirale Vektoren weisen eine Reihe von Modifikationen des Wildtyp HIV-1 auf, diese beruhen z.T. auf den hohen Anforderungen, die an die Sicherheit lentiviraler Vektoren gestellt werden:

1. Nur Gene, die für eine Infektion und bestimmte regulatorische Funktionen essentiell sind, wurden einbezogen; alle Gene, die für die Pathogenität von HIV-1 verantwortlich sind, sowie einige regulatorische Gene wurden deletiert [150].
2. Teile der U3-Region in der 3'-LTR des Transfervektors wurden deletiert, um „selbst-inaktivierende, SIN“ LTRs zu generieren [147]. Diese Deletion der DNA, und damit auch der produzierten Vektor-RNA, wird während der reversen Transkription auf die 5'-LTR der proviralen DNA übertragen. Nach der Integration sollte die 5'-LTR des Provirus deshalb keine Promotoraktivität mehr besitzen.
3. Die verbleibenden viralen Gene wurden auf mindestens drei verschiedene Plasmide verteilt, nur der Transfervektor enthält virale Verpackungssignale. Diese sollten möglichst wenige homologe Sequenzen enthalten, um die Wahrscheinlichkeit der Rekombination zwischen den einzelnen Plasmiden zu vermindern. Diese könnte zur Entstehung von replikationskompetenten rekombinanten Viren (replication competent recombinants, RCR) führen [148].

Eine hohe Effizienz der Viruspartikel-Bildung und Transduktion wurde durch weitere Veränderungen erzielt:

4. Die Einführung einer Sequenz, die den zentralen Polypurin-Trakt (central polypurine tract cPPT) enthält, führte zur Entwicklung von lentiviralen Vektoren der fortgeschrittenen Generation mit einem stark verbesserten Kern-Import [151].
5. Das Ersetzen des HIV env-Gens durch ein entsprechendes Gen des Vesikulären Stomatitis Virus bewirkt eine Pseudotypisierung der Viren mit der Glykoproteinhülle des VSV (VSV-G), wodurch ein breiter Wirtstropismus vermittelt wird [148].

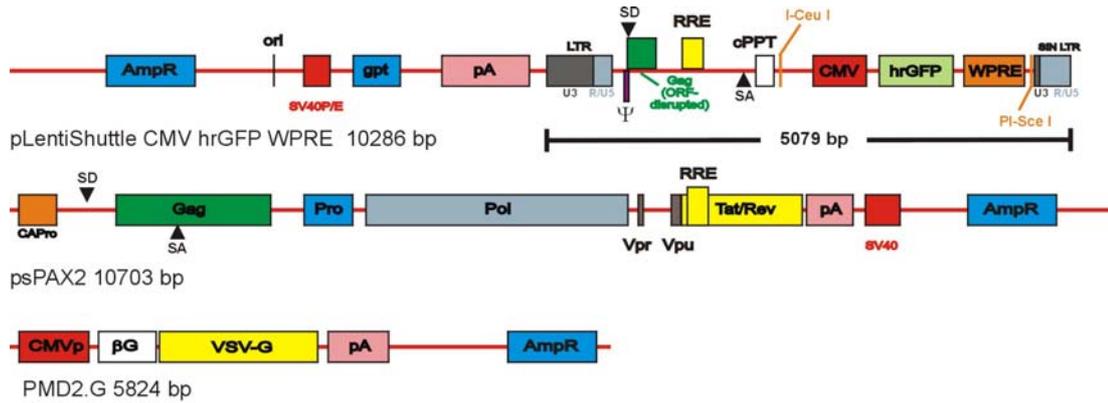


Abbildung 1.7 Aufbau des lentiviralen Vektorsystems

Ein lentiviraler Transfervektor (oben), ein Verpackungsplasmid (Mitte) und ein Hüllproteinplasmid (unten) werden in Verpackungszellen ko-transfiziert, in diesen wird die Sequenz zwischen den LTRs des Transfervektors (schwarzer Balken) dann in virale Partikel mit dem heterologen Hüllprotein VSV-G verpackt. Die Viren können die Sequenz zwischen den LTRs anschließend in das Genom transduzierter Zielzellen integrieren.

Abkürzungen: Amp^r, Ampicillinresistenz-Gen; βG, β-Globin-Intron; CMV, Zytomegalie-Virus Promotor; cPPT, central polyurine tract; gpt, Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen; hrGFP, humanisiertes Renilla r. green fluorescent protein; LTR, Long terminal repeat; ori, origin of replication / Replikationsstartpunkt; pA, Polyadenylierungssignal; Pol, Polymerase; Pro, Protease; Ψ, psi /packaging signal/Verpackungs-signal; RRE, rev responsive element; SA, Spleissakzeptorstelle; SD, Spleissdonorstellen; SIN LTR, selbst-inaktivierende LTR; SV40/E, simian virus 40 Promotor/Enhancer; VSV-G, Glykoprotein des vesikulären Stomatitisvirus; WPRE, Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element.

1.5 Zielsetzung

Die Regenerationsfähigkeit von geschädigtem Herzgewebe nimmt im Lauf der Evolution immer weiter ab, für Säugetiere galt lange als Tatsache, dass eine Schädigung irreversibel ist, da ihre Kardiomyozyten postnatal ihre Fähigkeit zur Proliferation verlieren. Neueren Hinweisen auf eine kardiale Regeneration könnte ein Wiedereintritt terminal differenzierter Kardiomyozyten in den Zellzyklus zugrunde liegen oder eine Differenzierung von Kardiomyozyten aus adulten Stamm- oder Progenitorzellen. Eine solche Differenzierung ist in vielen Fällen jedoch umstritten, häufig erlaubten die bisher angewandten Methoden keine Überprüfung der Veränderungen der betrachteten Zellen auf molekularer Ebene.

In Hinblick auf eine anschließende eingehende Untersuchung der potentiellen kardialen Differenzierung adulter Stammzellen sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation ein Nachweissystem entwickelt werden, das die Detektion und Aufreinigung von aus Stammzellen differenzierten Kardiomyozyten erlaubt, und damit eine detaillierte Analyse der differenzierungsbedingten funktionellen und molekularen Veränderungen verschiedener Stamm- und Vorläuferzelltypen bei der Entwicklung zu Kardiomyozyten ermöglicht bzw. vereinfacht:

1. Auf der Grundlage eines von HIV-1 abgeleiteten lentiviralen Vektorsystems sollte ein effizientes Klonierungs-System für lentivirale Transfervektoren entwickelt werden, um die bei der Verwendung existierender Systeme aufwendigen und zeitintensiven Klonierungen zu vereinfachen und Vektoren mit einer verbesserten Expression zu generieren.
2. Mithilfe dieses Klonierungs-Systems sollte ein *in vivo* Selektionssystem für den Nachweis kardialer Differenzierung durch Reportergenkonstrukte etabliert werden. Kardiomyozyten als Positivkontrolle sowie adulte Stammzellen sollten mit lentiviralen Vektoren transduziert werden, die ein Reportergen unter der Kontrolle von herzspezifischen Promotoren enthalten.
3. Eine kardiale Differenzierung von adulten humanen endothelialen Vorläuferzellen (EPCs) nach Kokultivierung mit neonatalen Rattenkardiomyozyten, wie von Badorff et al. beschrieben, sollte im Rahmen der Dissertation eingehend untersucht werden. Humane EPCs aus dem peripheren Blut sollten mit Kardiomyozyten kokultiviert werden, mithilfe geeigneter zell- und molekularbiologischer Methoden sollte anschließend eine eventuell induzierte kardiale Differenzierung der humanen endothelialen Vorläuferzellen überprüft werden. Das kardiale Differenzierungspotential primärer, nicht-immortalisierter mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark der Ratte unter dem Einfluss von 5-Azacytidin wird bisher ebenfalls kontrovers diskutiert und sollte daher ebenso im Rahmen der vorliegenden Dissertation mithilfe geeigneter Methoden untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Einfrigerbox:	Cryo 1°C freezing container (Nalgene, Roskilde, Dänemark)
Elektroporator:	Gene Pulser II (Bio-Rad, München)
FACS:	FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg)
Geldokumentation:	E.A.S.Y. 429 K (Herolab, Wiesloch)
Gelelektrophoresekammer:	SUB-Cell GT (Bio-Rad, München)
Inkubatoren:	Säugerzellen: Modell BBD 6220 (Heraeus, Osterode) Bakterien: Modell 3032 (GFL, Burgwedel)
Küvette:	Quarzküvette 10 mm HELLMMA (LAT, Garbsen)
Mikroskop:	Olympus Zellkulturmikroskop CK 40 (Olympus, Japan) Fluoreszenzmikroskop, Eclipse TE300 (Nikon, Japan)
Mikrowelle:	MW 4270 E (HTS Haustechnik, Mettmann)
PCR-Cycler:	TRIO-Thermoblock, UNO II-Thermoblock (Biometra, Göttingen) iCycler (Bio-Rad, München)
Photometer:	BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg)
Pipetten:	Eppendorf Reference (Eppendorf, Hamburg) Pipetman (Gilson, Frankreich)
Pipettierhilfe:	Pipetboy akku (Hirschmann, Eberstadt)
Spannungsgerät:	Power Pac 300 (Bio-Rad, München)
Sterilbänke:	Hera Safe HS15, HS18, HSP15 (Heraeus, Osterode)
Thermoshaker:	Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg) Thermomixer 5437 (Eppendorf, Hamburg)
UV-Leuchttisch:	Transilluminator TI1 (Biometra, Göttingen) UVT-28ME (Herolab, Wiesloch)
Vortexer:	MS1 Minishaker (Ika-Works, USA)
Waage:	BP 210S, BP 2100S (Satorius, Göttingen)
Wasserbad:	Modell 1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)
Zentrifugen:	Avanti™ J-25 (Beckmann, Palo Alto USA) Biofuge fresco (Heraeus, Osterode) BIO Fuge PrimoR (Heraeus, Osterode) Megafuge 1.0 R (Heraeus, Osterode) Megafuge 2.0 R (Heraeus, Osterode)

	PICO Fuge (Stratagene, La Jolla USA)
	RC-5 SuperSpeed (Sorvall, Minnesota, USA)
Zentrifugenrotoren:	GSA (Sorvall, Minnesota, USA)
	Heraeus # 7599, # 8155 (Heraeus Instruments, Osterode)
	JA14, JA25.5 (Beckmann, Palo Alto USA)
Zentrifugenröhrchen:	50ml (Beckmann, Palo Alto, USA)
	250ml (Beckmann bzw. Nalgene, Roskilde, Dänemark)

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Culture Slides:	BD-Falcon™ Culture Slides (BD Biosciences, Bedford, USA)
Druckerpapier:	SONY UPP-110HD, 110mmx20m (SONY, Tokyo, Japan)
Einfrierröhrchen:	Cryo-Röhrchen 1,5 ml (Greiner Bio-One, Frickenhausen)
Einmalpipetten:	1 ml - 25 ml (Greiner, Bio-One GmbH, Frickenhausen)
	50 ml (BD-BioSciences, Bedford, USA)
Einwegspitzen:	5 ml, 10 ml, 20 ml (Braun, Melsungen)
Elektroporationsküvette:	CUVETTE Plus™, #610 1 mm (BTX®/Genetronics, USA)
FACS-Röhrchen:	0,5 ml (Sarstedt, Nürnberg)
Filterpipettenspitzen:	Tip One (StarLab, Ahrensburg)
Klebefolie:	für 96-well Platte (Nunc, Roskilde, Dänemark)
Küvetten:	Einmal Plastikkuvetten (Sarstedt, Nürnberg)
Mikrotiterplatten:	PS-Microplate 96K (Greiner, Frickenhausen)
Petrischalen:	Cellstar 94/16mm (Greiner, Frickenhausen)
Pipettenspitzen:	bis 1000 µl (Sarstedt, Nürnberg)
	bis 200 µl (Sarstedt, Nürnberg)
	bis 10 µl (Roth, Karlsruhe)
Reaktionsgefäße:	1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nürnberg)
	Safe Lock 0,5ml PCR- Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg)
	0,25ml thin Wall (Biozym, München)
	14 ml Rundboden-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen)
	15ml und 50ml Falcons (Greiner, Frickenhausen)
	5ml Polystyrolreagenzgläser (Becton Dickinson, New Jersey)
Sterilfilter:	0,22 µm (Millipore, Bedford, USA)
	0,45 µm (Nalgene, Roskilde, Dänemark)
	Bottle Top, 500 ml, 75 µm Membran (Nalgene, Dänemark)
Transwelleinsätze:	0,4 µm Porengröße (Corning Costar, USA)
Zellkulturflaschen:	Cellstar 175 cm ² mit Filterkappe (Greiner, Frickenhausen)
	Cellstar 75 cm ² mit Filterkappe (Greiner, Frickenhausen)
	25 cm ² mit Filterkappe (Integra Biosciences)

	Cellstar 550ml Suspensionskultur (Greiner, Frickenhausen)
	Cellstar 250 ml Suspensionskultur (Greiner, Frickenhausen)
	Cellstar 50 ml Suspensionskultur (Greiner, Frickenhausen)
	6-well-Platten für Zellkultur (Greiner, Frickenhausen)
	12-well-Platten für Zellkultur (Greiner, Frickenhausen)
	24-well-Platten für Zellkultur (Greiner, Frickenhausen)
Zellsieb:	40 µm, 100 µm (BD-BioSciences, Bedford, USA)
Zellschaber:	Einweg Zellschaber (BD-BioSciences, Bedford, USA)

2.1.3 Chemikalien

4,6-Diamidino-2-Phenylindol DAPI (Sigma, Deisenhofen)
5-Azacytidin (Sigma, Saint Louis USA)
Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf)
Ampicillin (Roth, Karlsruhe)
Ampuwa (Fresenius, Bad Homburg)
Biocoll (Biochrom, Berlin)
Bovines Serumalbumin, BSA (Sigma, Deisenhofen)
Bromchlorpropan (Sigma, Deisenhofen)
Bromphenolblau (Sigma, Deisenhofen)
Calciumchlorid CaCl₂ (Merck, Darmstadt)
Chloroform (Roth, Karlsruhe)
Chloroform / Isoamylalkohol 24:1 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad USA)
Chloroquine (Sigma, Deisenhofen)
Diethylpyrocarbonat DEPC (Sigma, Deisenhofen)
Desoxynukleotide Ultra Pure dNTP Set (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
DiIAcLDL (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)
Dimethylsulfoxid DMSO (Sigma, Deisenhofen)
Dithiothreitol DTT (Sigma, Deisenhofen)
Essigsäure (J.T. Baker, Deventer, Niederlande)
Ethanol, absolut (J.T. Baker, Deventer, Niederlande)
Ethidiumbromid-Lösung 10mg/ml (Sigma, Deisenhofen)
Ethyldiamin-Tetraessigsäure EDTA (Sigma, Deisenhofen)
Fetales Kälberserum (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad USA)
Fibronektin aus humanem Plasma (Sigma, Deisenhofen)
Ficoll Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala Schweden)
Gelatine (Sigma, Deisenhofen)
Glycerin (Sigma, Deisenhofen)
HEPES (Sigma, Deisenhofen)

Isoamylalkohol (Sigma, Deisenhofen)
Isopropanol (Sigma, Deisenhofen)
Kaliumacetat (Sigma, Deisenhofen)
L-Glutamin, 100x (PAA Laboratories, Cölbe)
Lipofectamin (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad USA)
Magnesiumchlorid $MgCl_2$ (Sigma, Deisenhofen)
Natriumacetat (Roth, Karlsruhe)
Natriumbutyrat (Upstate Biomol, Hamburg)
Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)
Natriumhydroxid (Merck, Darmstadt)
Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt)
PBS-Feststoff Tabletten (Sigma, Deisenhofen)
Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories, Cölbe)
Percoll (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala Schweden)
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 (Roth, Karlsruhe)
Polybrene = Hexadimethrinbromid (Sigma, Deisenhofen)
Polyethylenglycol PEG (MBI Fermentas, Vilnius, Litaunien)
Poly-L-Lysin-Lösung, 0,1% w/v (Sigma, Deisenhofen)
Protaminsulfat (Sigma, Deisenhofen)
Salzsäure (Merck, Darmstadt)
Sodiumdodecylsulfate SDS (Roth, Karlsruhe)
Transferrin (Sigma, Deisenhofen)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Serva, Heidelberg)
Tris-Base (Merck, Darmstadt)
Triton X-100 (Sigma, Deisenhofen)
Trypanblau (PAA Laboratories, Cölbe)
Trizol Reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad USA)
Vybrant CM-Dil (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

2.1.4 Kits

QIAquick® Gel Extraktion Kit
QIAprep® Spin Miniprep Kit
QIAGEN® Plasmid Purification Midi Kit
QIAGEN® Plasmid Purification Maxi Kit
QIAGEN® EndoFree Maxi Prep Kit
QIAGEN® Plasmid Purification Mega Kit
QIAGEN® Plasmid Purification Giga Kit (alle von Qiagen, Hilden)

BD Adeno-X™ Accessory Kit (Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg)

BD Cytotfix/Cytoperm™ Kit (Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg)

2.1.5 Zellen:

HEK 293T: adhärenente Zellen, Morphologie epithelial, humane embryonale Nierenzelllinie, sind durch Transfektion mit einem fragmentierten Adenovirus-Genom immortalisiert worden. Der Rezeptor für Vitronectin wird exprimiert. Erzeugen in Nacktmäusen Tumore, sind hypotriploid (64 Chromosomen). Enthalten das temperatursensitive SV40 large T-Antigen und sind sehr gut transfizierbar.

HUVEC: adhärenente Zellen, primäre humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene, wurden in der eigenen Arbeitsgruppe isoliert von Frau Ingrid Schmidt-Richter.

Rat-1 Fibroblasten: adhärenente Zellen, Morphologie wie Fibroblasten; Isoliert von der Fischer-Rattenfibroblastenzelllinie 3T3. Sie sind resistent gegen 5-Bromo-2'-deoxyuridin.

hSMC: adhärenente Zellen, humane glatte Muskelzellen aus der Koronararterie. Primäre Zellen von der Firma PromoCell, Heidelberg, Deutschland.

2.1.6 Bakterienstämme

E. coli TOP10 (Invitrogen, Carlsbad USA)

Genotyp: $F^-mcrA\Delta$ (*mrr* – *hsdRMS* – *mcrBC*) $\Phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74$ *recA1 deoR araD139\Delta* (*ara* – *leu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str^R), *endA1 nupG*

E. coli TOP10 wurden zur Klonierung nicht-viraler Plasmide verwendet und in LB-Flüssigmedium sowie auf LB-Agarplatten kultiviert.

ElektroMAX™ STBL4™ (Invitrogen, Carlsbad USA)

Genotyp: *mcrA* $\Delta(mcrBC$ – *hsdRMS* – *mrr*) *recA1 endA1 gal* *supE44* λ^- *thi-1 gyrA96 relA1* $\Delta(lac$ – *proAB*) / F^-proAB^+ *lacI*^q $Z\Delta M15$ TN10 Tet^R

ElektroMAX™ STBL4™ wurden zur Klonierung lentiviraler Vektoren verwendet und in TB-Flüssigmedium sowie auf YT-Agarplatten kultiviert.

E.coli HB101 (Takara Bio Inc., Japan)

Genotyp: *supE44*, $\Delta(mcrC$ –*mrr*), *recA13*, *ara-14*, *proA2*, *lacY1*, *galK2*, *rpsL20*, *xyl-5*, *mtl-1*, *leuB6*, *thi-1*

E. coli HB101 wurden zur Amplifizierung bereits fertiggestellter lentiviraler Vektoren verwendet und in LB-Flüssigmedium sowie auf LB-Agarplatten kultiviert.

E. coli GM33

Genotyp: F⁻, dam-3, sup88 CGSC

E. coli GM33 wurde für die Klonierung mittels dam-sensitiver Restriktionsenzyme verwendet und in LB-Flüssigmedium sowie auf LB-Agarplatten kultiviert.

2.1.7 Medien und Lösungen

Zellkultur:

Alpha-MEM (BioWhittaker, Walkersville USA),

Dulbecco's Minimal Essentials Medium DMEM high glucose (PromoCell, Heidelberg)

Dulbecco's PBS (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad USA)

Endothelial Cell Growth Medium ECGS/H-2 (Clonetics, Walkersville USA)

Mesenchymal stem cell growth medium MSCGM Bullet Kit (Clonetics, Walkersville USA)

Optimem-1 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad USA)

Smooth Muscle Cell Basal Medium 2 (PromoCell, Heidelberg)

Stopp-Medium: DMEM + 20 % FCS

Bakterienkultur:

LB-Medium Luria Broth (Sigma, Deisenhofen)

LB-Agar (Sigma, Deisenhofen)

SOC-Medium (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad USA)

TB-Medium (Roth, Karlsruhe)

2xYT-Agar (Roth, Karlsruhe)

Molekularbiologie/Immunhistochemie:

10x-DNA-Auftragspuffer: 100 mM EDTA, 2% SDS, 60% Glycerin, etwas Bromphenolblau

2xHBS-Puffer: 270 mM NaCl; 54 mM HEPES; 1 mM Na₂HPO₄ in dest. H₂O (pH 7,05)

25x-TAE-Puffer: 1 M Tris-Acetat, 25 mM Essigsäure, 25 mM EDTA pH 8,0

Ampicillin, 50 mg/ml (Invitrogen, Carlsbad USA)

Kanamycin, 50 mg/ml (Invitrogen, Carlsbad USA)

Penicillin (10000U/ml)/Streptomycin (10000µg/ml) (PAA Laboratories, Cölbe)

Phosphate Buffered Saline PBS mit Ca²⁺ und Mg²⁺ (PAA Laboratories, Cölbe)

Phosphate Buffered Saline PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (PAA Laboratories, Cölbe)

Trypsin/EDTA-Lösung 0,05 / 0,02% (w/v) in PBS (PAA Laboratories, Cölbe)

Quicky-Puffer: 40% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau in H₂O

P1-Puffer (Resuspendieren): 50 mM Tris HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A

P2-Puffer (Lyse): 200 mM NaOH, 1 % SDS (w/v)

P3-Puffer (Neutralisation): 3 M Kaliumacetat (pH 5,0)

10x-TBS: 0,5 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan; 1,625 M NaCl; add 4,0 l H₂O (pH 7,6)

TBS+ -Puffer: 95 % 1x TBS; 0,025 % Triton X-100; 5 % tierisches Serum

TE-Puffer: 10 mM Tris Cl (pH 8,0), 1 mM EDTA

2.1.8 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP) (New England Biolabs, Frankfurt)

Proteinase K (Stocklösung: 20 mg/ml) (Merck, Darmstadt)

RedTaq DNA-Polymerase + 10x Puffer (Sigma, Deisenhofen)

DNase I für Molekularbiologie (Stratagene, La Jolla USA)

Desoxyribonuklease II Typ V (DNase) für Zellkultur (Sigma, Deisenhofen)

Reverse Transkriptase M-MLV (Promega, Madison USA)

Reverse Transkriptase SuperScript II (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad USA)

RNAse A (Stocklösung: 10 mg/ml) (Roche Diagnostics, Mannheim)

RNAse Block (Stratagene, La Jolla USA)

T4-DNA-Ligase 1U/μl (MBI Fermentas, Vilnius Litauen)

Trypsin (1:250) (GIBCO™ BRL Life Technologies, Paisley Schottland)

Diverse Restriktionsenzyme (New England Biolabs, Frankfurt)

2.1.9 Primärantikörper

Tabelle 1 Verwendete Primärantikörper

Antigen	Spezies	Isotyp	Klon	Firma
Sarkomer. α -Actinin	Maus	IgG1	Klon EA53	Sigma, Deisenhofen
Sarkomer. Myosin	Maus	IgG2b	MF20	Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA
Troponin T	Maus	IgG2a	CT3	Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA
Titin	Maus	IgG1	MAB1553	Chemicon, Temecula USA

2.1.10 Sekundärantikörper

Cy™2-conjugated*AffiniPure donkey anti-mouse IgG (Jackson Inc., USA)

Cy™3-conjugated*AffiniPure donkey anti-mouse IgG (Jackson Inc., USA)

Cy™5-conjugated*AffiniPure donkey anti-mouse IgG (Jackson Inc., USA)

2.1.11 Lektine

Ulex europaeus agglutinin 1(UEA-1), FITC konjugiert (Vector Laboratories, Burlingame USA)

2.1.12 Vektoren

pCRII-TOPO (Invitrogen, Carlsbad USA)

phrGFP-1 (Stratagene, La Jolla USA)

pHR'SINcPPT-CEW (zur Verfügung gestellt von Didier Trono, Universität Genf)

pHR'SINcPPT-SEW (zur Verfügung gestellt von Didier Trono, Universität Genf)

pBlueScriptII SK (-) (Stratagene, La Jolla USA)

pShuttle (Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg)

p415-Gal-1RedStar (zur Verfügung gestellt von Michael Knop, EMBL Heidelberg)

pCITE2a(+) (Novagen, Madison USA)

pGK-loxP (zur Verfügung gestellt von Francis Stewart, Biotec TU Dresden)

pUCBM20-ANF (in der Arbeitsgruppe vorhanden)

pUCBM20- α MHC (in der Arbeitsgruppe vorhanden)

pCRII-TOPO-huMLC2v (in der Arbeitsgruppe vorhanden, kloniert von Bettina Sohns)

pPv/B Act lacZ (zur Verfügung gestellt von E. Kolossov, Universität Köln)

pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad USA)

pCMV Δ R8.91 (zur Verfügung gestellt von Didier Trono, Universität Genf)

pMD.G (zur Verfügung gestellt von Didier Trono, Universität Genf)

2.1.13 DNA-Molekulargewichtsmarker

SmartLadder (Eurogentec, Seraing Belgien)

SmartLadder SF (Eurogentec, Seraing Belgien)

2.1.14 Oligonukleotide für Klonierungen

Tabelle 2 Oligonukleotide für Klonierungen

Oligonukleotid	Sequenz 5'- 3'	Ziel	T _A	Zyklen
CMV-Enhancer sense	CTATGGCCGCCCCGCTTCTTAATTA AGCCCGACATTGATTATTGACTAGT	CMV-Enhancer in pcDNA3	60°C	40
CMV-Enhancer ras	CTATGGCCGCCCATGGGGCGGA GTTGTTACGACATTTTGGAAAGT			
hu 3 GATA- 4 ex ras	GAAGATTACGCAGTGATTATGTCC	cDNA-Synthese	42°C	-
hu 4 GATA- 4 ex sense	ACAGTTCCTCCCACGCAT A	GATA4 in cDNA	52°C	35
hu 2 GATA- 4 ex ras	GATTACGCAGTGATTATGTCC			
hu 3 Nkx 2.5 ex sense	ACCTGGCGCTGTGAGACT	Nkx2.5 in cDNA	56°C	
hu 3 Nkx 2.5 ex ras	GAGTCAGGGAGCTGTTGAGG			
KM69huANFp sense	GCTCTAGACCTCGAGGGGATCCATTTG	ANFp in pUCBM20	55°C	
KM70huANFp ras	CATATTGGCTGCAGGGTCCG			

T_A: Annealingtemperatur; weitere Oligonukleotide in den Beschreibungen der Klonierungen.

2.1.15 Oligonukleotide für RT-PCRs

Tabelle 3 Oligonukleotide für RT-PCRs

Oligonukleotid	Sequenz 5'- 3'	Ziel	Position	mm	T _A	Zyklen	
hu β -Actin sense	aaggagaagctgtgctacgtc	gi 177967	2302	3	60°C	40	
hu β -Actin ras	tgttgcgctacaggtcttg		2649	3			
r β -Actin sense	caagagatggccactgcc	gi 55574	2467	2			
r β -Actin ras	cttgatctcatggtgctagga		2866	3			
hu FOG2 sense	tgctaccaccaagatgtgat	gi 10862688	2371	2	55°C	35	
hu FOG2 ras	agcctttgggagacgtg		2573	4			
hu GATA4 sense	agcagctcctcaggcagt	gi 4503930	1233	6			
hu GATA4 ras	gcccatggccagacatc		1420	4			
r GATA4 sense	tctaagacaccagcaggtcctc	gi 25282464	1540	2			
r GATA4 ras	ttggagctggcctgtgat		1823	3			
hu Nkx2.5 sense	ccagccctgctctcacg	gi 6161957	184	2			
hu Nkx2.5 ras	gccagcgtaggcctct		351	3			
r ANF sense	atacagtgcggtgtccaaca	gi202905	145	4			
r ANF ras	agccctcagttgctttca		412	3			
KM15 Nkx25 sense	tgcatgctggccgccttcaa	gi 4758089	307	-			59°C
KM16 Nkx25 ras	tagacctgcgcctgcgagaa		628	-			
KM9 Mlc2v sense	cttcactatcatggaccagaacag	gi 340286	5987	-	59°C		
KM10 Mlc2v ras	acacttgaatgcgttgagaatggt		8492	-			

Abkürzungen für Spezies-spezifische Oligonukleotide: r: Ratte; hu: human; mm: Anzahl der Fehlpaarungen mit der Sequenz der jeweils anderen Spezies

2.2 Methoden zur Klonierung von lentiviralen Transfervektoren

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte eine Reihe von lentiviralen Transfervektoren generiert werden, die dafür benötigten DNA-Elemente lagen zum größten Teil bereits als Inserts in verschiedenen Plasmid-Vektoren vor und wurden aus diesen umkloniert.

2.2.1 Präparativer Restriktionsverdau

Für die Vorbereitung der Klonierung wurden sowohl der spätere Vektor als auch der das Insert enthaltende Vektor mit Restriktionsenzymen inkubiert, die spezifische DNA-Sequenzen erkennen und gezielt schneiden [152,153]. Damit wurden die für die Ligation der zu klonierenden Fragmente benötigten kompatiblen kohäsiven Enden geschaffen. Jeweils 1 µg DNA wurden mit je 10 U der Enzyme für 1,5 h bei 37 °C inkubiert, die Enzyme wurden anschließend durch Erhitzen auf 65 °C für 20 min inaktiviert. Die entstandenen Fragmente wurden dann in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, die fluoreszierenden DNA-Banden der gewünschten Größen wurden aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert.

2.2.2 Präparativer Restriktionsverdau mit I-Ceu I und PI-Sce I

Für die Klonierung von Expressionskassetten in pLentiShuttle-Vektoren mithilfe der Meganukleasen I-Ceu I und PI-Sce I aus dem AdenoX-Accessory-Kit (BD Biosciences) wurden jeweils 2 µg Plasmid-DNA mit 0,5 U I-Ceu I und 2 U PI-Sce I für 3 h bei 37 °C inkubiert, die Enzyme wurden anschließend durch Erhitzen auf 65 °C für 20 min inaktiviert. Die entstandenen Fragmente wurden durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Natriumacetat-Fällung gereinigt und dann in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, die fluoreszierenden DNA-Banden der gewünschten Größen wurden aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert.

2.2.3 Dephosphorylierung mit CIP

Zur Dephosphorylierung von 5'-Enden linearisierter DNA-Fragmente [154] wurden direkt im Anschluss an den Restriktionsverdau dem Ansatz 0,5 U CIP (Calf intestinal phosphatase) / pro µg Plasmid-DNA zugesetzt, um in einer anschließenden Ligationsreaktion die Religation des Fragmentes zu verhindern. Der Ansatz wurde für weitere 60 min bei 37°C inkubiert und die geschnittene, dephosphorylierte DNA anschließend durch eine Gelelektrophorese aufgereinigt.

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurde eine Elektrophorese in einem Agarosegel [155] durchgeführt. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 0,8 - 2 g Agarose mit 100 ml 1xTAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Die Lösung wurde bis auf ca. 50°C abgekühlt, dann wurden 5 µl Ethidiumbromid-Lösung zur Färbung der

DNA im Gel zugegeben und die Agaroselösung in eine horizontale Gießkassette mit eingehängtem Probenkamm gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Probenkamm herausgenommen und das Gel in die mit 1x-TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die mit 10x-DNA-Auftragspuffer versetzten Proben und ein Molekulargewichts-Marker wurden aufgetragen, die Elektrophorese erfolgte in der Regel für ca. 1 h bei 130V. Anschließend wurde das Gel auf einem UV-Leuchttisch zur Dokumentation der DNA-Banden fotografiert, DNA-Fragmente, die für eine weitere Klonierung eingesetzt werden sollten, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert.

2.2.5 Gelextraktion

Die Extraktion der gewünschten DNA-Fragmente aus dem Agarosegel [156] erfolgte mit dem Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit nach Anweisung des Herstellers, dabei wurden 30 µl DNA-Lösung in H₂O erhalten. Die Ausbeute der Extraktion liegt bei 70-80% der eingesetzten DNA-Menge.

2.2.6 Ligation

Die Enden verschiedener DNA-Fragmente wurden anschließend zur Generierung neuer Plasmide mithilfe der T4-DNA-Ligase zusammengefügt [157]. In einem Kontrollansatz wurde außerdem Vektor-DNA ohne ein einzufügendes Insert unter gleichen Bedingungen inkubiert, um einen Anhaltspunkt für das Ausmaß der dabei auftretenden Religationsrate zu erhalten.

Tabelle 4 Ansatz für die Ligation

Ligation	Kontrolle
100 ng Vektor-DNA	100 ng Vektor-DNA
10fache Menge Insert-DNA	-
1 µl PEG4000	1 µl PEG4000
2 µl Ligase-Puffer (10x)	2 µl Ligase-Puffer (10x)
1 µl T4-DNA-Ligase	1 µl T4-DNA-Ligase
ad. 20 µl H ₂ O	ad. 20 µl H ₂ O

Die Reaktionen wurden in 0,5 ml-Eppendorffreaktionsgefäße pipettiert und für eine erhöhte Klonierungseffizienz im Thermocycler nach folgendem Schema bei wechselnden Temperaturen inkubiert [158]:

Tabelle 5 Programm für Ligation bei wechselnden Temperaturen

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen	
1	37 °C	20 min	30x	10x
2	10°C	1 min		
3	22°C	30 s		
4	4°C	30 s		
5	30°C	30 s		
6	37°C	60 min	1x	
7	68°C	15 min	1x	
8	4°C	∞	-	

Der gesamte Ansatz wurde anschließend zur Fällung der DNA mit Natriumacetat und Ethanol versetzt, die DNA anschließend in 10 µl TE-Puffer aufgenommen. Von dieser Lösung wurden 3 µl für die Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien durch Elektroporation eingesetzt.

2.2.7 DNA-Fällung

Um DNA-Lösungen zu konzentrieren oder von störenden Salzen zu reinigen, können sie nach Zugabe von monovalenten Salzen mit Alkohol versetzt werden. Die Lösung wird dadurch unpolarer, die polare DNA fällt aus und kann abzentrifugiert werden [159]. Zur Fällung der DNA wurde die jeweilige Probe zunächst mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt, dann mit 10 µl Natriumacetat-Lösung (3M, pH 5,2) und 250 µl kaltem 96%igem Ethanol versetzt. Die Probe wurde durch Umschütteln gemischt und dann bei -20 °C mindestens für 30 min oder über Nacht gefällt. Anschließend wurden die Proben bei 13.000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Pellet wurde 1 x mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in H₂O aufgenommen.

2.2.8 Transformation durch Elektroporation

Bei der Elektroporation entstehen durch Entladung eines starken elektrischen Feldes kurzzeitig Löcher in der Zellmembran der zu transformierenden Zellen, durch die Plasmid-DNA eindringen kann [160]. Je höher dabei die Feldstärke ist, desto mehr Poren entstehen in den Zellmembranen.

Es wurden 3 µl der Plasmidlösung auf ein 50 µl-Aliquot kompetenter Bakterien gegeben, die Mischung wurde anschließend in eine 1mm-Elektroporationsküvette überführt und 2 min auf Eis inkubiert. An die Küvette wurde im Elektroporator ein elektrisches Feld angelegt und durch die Küvette entladen. Die Dauer der Entladung in ms, die sogenannte Zeitkonstante, wird als Maß für die Leitfähigkeit der Lösung angegeben. Direkt im Anschluss an die

Elektroporation wurden die Bakterien mit 800 µl SOC-Medium aus der Küvette gespült, und zur Expression der Antibiotikaresistenz für Ampicillin 30 min, für Kanamycin 60 min bei 37°C inkubiert (für STBL-Bakterien 90 min bei 30°C). Anschließend wurden von jedem Ansatz 100 µl und der durch kurzes Zentrifugieren ankonzentrierte Rest der Bakteriensuspension auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert (für STBL-Bakterien bei 30°C).

Tabelle 6 Bedingungen für die Elektroporation

	TOP10, HB101	STBL4
Widerstand R	400 Ω	200 Ω
Kondensatorkapazität C	25 µF	25 µF
Ausgangsspannung U	2,5 kV/cm	1,2 kV/cm

2.2.9 Schnellverfahren zum Nachweis von Plasmiden in Bakterienkolonien

Beim Schnellverfahren zum Nachweis von Plasmiden wurden die in Bakterien enthaltenen Nukleinsäuren durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert [161]. Dabei werden Proteine denaturiert und sammeln sich in der organischen Phase beziehungsweise an der Grenzschicht zwischen den beiden Phasen an, während Nukleinsäuren in der wässrigen Phase bleiben. Die isolierte Plasmid-DNA kann durch nach Elektrophorese im Agarosegel nachgewiesen werden, ihre Reinheit ist allerdings zu gering für eine genauere Untersuchung in einem Restriktionsverdau.

Jeweils 200 µl LB-Medium mit Antibiotikum wurden mit einzelnen Kolonien angeimpft und für mehrere Stunden bei 37°C schüttelnd inkubiert. 100 µl der Vorkulturen wurden mit 50 µl eines Phenol/Chloroform-Gemisches und 10 µl Quicky-Puffer versetzt und für 30 s gevortext. Anschließend wurde das Gemisch bei 13000 rpm für 3 min zentrifugiert, je 10 µl der oberen, Nukleinsäurehaltigen Phase wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.10 Plasmidgewinnung aus *E. coli*

Die Auswahl der Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakteriensuspensionen richtete sich nach der gewünschten Reinheit und Menge der DNA sowie dem verwendeten Bakterienstamm.

DNA-Präparation durch alkalische Lyse und Phenol/Chloroform-Extraktion

Bei dieser Methode werden die Bakterien im alkalischen Milieu lysiert [162]. Dabei wird die bakterielle DNA besonders effektiv entfernt, weil DNA bei stark alkalischem pH-Wert denaturiert. Nach der Neutralisation hybridisieren die beiden Stränge der kovalent geschlossenen zirkulären Plasmid-DNA rasch wieder, während die weit größere

chromosomale DNA einzelsträngig bleibt, deshalb ausfällt und abgetrennt werden kann. Die Plasmid-DNA wird dann in einer Phenol/Chloroform-Extraktion weiter aufgereinigt.

Zur Gewinnung der Plasmide aus den transformierten *E. coli* wurden jeweils ca. 2 ml LB-Medium (mit Antibiotikum) mit Hilfe einer Pipettenspitze mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Plasmide aus den *E. coli* isoliert. Dazu wurden zunächst 1,5 ml der Übernachtskultur in einem 1,5ml-Eppendorfreaktionsgefäß abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl Puffer P1 (Qiagen) resuspendiert. Dazu wurden 250 µl Puffer P2 (Qiagen) gegeben, alle Proben gründlich gemischt und nach maximal 5 min mit 350 µl Puffer P3 (Qiagen) versetzt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden die Proben für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden mit 250 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, 30 s gevortext und für 3 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die oberen Phasen wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, gevortext und zentrifugiert. Die oberen Phasen wurden abgenommen, mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol versetzt und für 10 min bei RT inkubiert, danach für 20 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Pellets mit Ethanol 70% gewaschen, erneut zentrifugiert, und nach dem Trocknen in 30 µl H₂O aufgenommen.

DNA-Präparation mit dem Qiagen MiniPrep Kit

Bei der Isolierung mit dem Qiagen MiniPrep Kit wird die Plasmid-DNA nach einer alkalischen Lyse der Bakterien über eine Anionenaustauschersäule aufgereinigt. Diese besteht aus einer Matrix mit positiv geladenen Gruppen. Das Rückgrat der Nukleinsäuren enthält dagegen Phosphatgruppen, die oberhalb von pH 2 negativ geladen sind. Zur Aufreinigung wird das Bakterienlysat auf einen niedrigen pH-Wert gebracht und auf die Säule gegeben. Die stark geladenen Nukleinsäuren binden an das Säulenmaterial, während die weit weniger stark geladenen Proteine unter diesen Bedingungen durchlaufen. Mit einem Puffer höherer Ionenstärke wird anschließend die RNA von der Säule gewaschen und schließlich die DNA mit einem Puffer noch höherer Ionenstärke oder niedrigerem pH-Wert eluiert.

Zur Gewinnung der Plasmide aus *E. coli* wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur der ausgewählten Kolonien abzentrifugiert und die Plasmid-DNA mit dem Qiagen Miniprep Kit nach Anweisung des Herstellers gewonnen, wobei etwa 50 µl Plasmidlösung mit einem DNA-Gehalt von ca. 100 ng/µl erhalten wurden.

DNA-Präparation mit dem Qiagen Midi-, Maxi-, Mega- und Gigaprep Kit

Bei dieser Methode zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA erfolgt die Aufreinigung ebenfalls nach alkalischer Lyse der Bakterien über eine Anionenaustauschersäule.

Je nach gewünschter Ausbeute wurden zur Gewinnung der Plasmide aus *E. coli* geeignete Volumina LB-Medium oder TB-Medium mit einem geeigneten Antibiotikum mit einer Übernachtskultur der ausgewählten Kolonien angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde abzentrifugiert, aus dem Pellet mit dem entsprechenden Qiagen Kit nach Anweisung des Herstellers die Plasmid-DNA isoliert.

Tabelle 7 Ausbeuten der DNA-Präparationen mit Qiagen-Kits

Kit	Plasmid Midi	Plasmid Maxi	Plasmid Mega	QiaFilter Giga
Bakteriensuspension	25 ml	100 ml	500 ml	2,5 L
Ausbeute	75-100 µg	300-500 µg	1,5-2,5 mg	7,5-10 mg

2.2.11 Bestimmung des Nukleinsäure-Gehaltes

Zur Bestimmung der DNA- oder RNA-Konzentration in Lösungen [163] wurde die optische Dichte der Lösung oder einer entsprechenden Verdünnung (1:40 oder 1:80 in Puffer) in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Konzentration errechnet sich dann als

$$c \text{ (DNA) [ng/}\mu\text{l]} = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

mit V = Verdünnungsfaktor

und F = Multiplikationsfaktor: 50 für doppelsträngige DNA, 40 für RNA

2.2.12 Analytischer Restriktionsverdau

Um zu überprüfen, ob die selektierten Klone tatsächlich das gewünschte Plasmid enthalten, wurde die aus den Klonen gewonnene Plasmid-DNA einer Restriktionsanalyse unterzogen. Dazu wurden die DNA-Proben mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen inkubiert, die die DNA in Fragmente definierter Größen schneiden und so nach Auftrennung des Gemisches im Agarosegel ein charakteristisches Bandenmuster liefern.

Tabelle 8 Ansatz für analytischen Restriktionsverdau

	Menge
DNA-Lösung	500 ng
10x Puffer	2 µl
10x BSA (optional)	2 µl
Enzym	10 U
H ₂ O	ad 20µl
Σ	20 µl

Dieser Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert, nach dem Restriktionsverdau wurden die Enzyme durch Hitze inaktiviert (65°C für 10 min) und die Fragmente mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dabei sollten sich Fragmente definierter Größen zeigen, die sich aus der Lage der einzelnen Schnittstellen der Restriktionsenzyme im Plasmid ergeben.

2.2.13 TA-Klonierung

Bei der Methode der TA-Klonierung wird ausgenutzt, dass die für PCR-Reaktionen häufig verwendete Taq-Polymerase keine Fragmente mit glatten Enden produziert, sondern meist einen unspezifischen Überhang einer Base schafft [164,165]. Diese Base ist in der Mehrzahl der Fälle ein Adenosin, deshalb lassen sich PCR-Produkte in Vektoren mit einem Thymin-Überhang, sogenannte „T-Vektoren“, klonieren. Die TA-Klonierung von PCR-Produkten wurde mit dem TOPO-TA-Cloning Kit nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

2.3 Klonierung von Vektoren

2.3.1 Klonierung des lentiviralen Transfervektors pLentiShuttle

Das lentivirale Transferplasmid pLentiShuttle enthält alle lentiviralen Elemente eines Transferplasmids einschließlich der LTRs, aber keine Expressionskassette. Um pLentiShuttle zu generieren, wurden die Erkennungssequenzen für die Meganukleasen I-Ceu I und PI-Sce I aus dem Plasmid pShuttle in das Grundgerüst des lentiviralen Vektors pHR'SINcPPT-CEW eingefügt. Dazu wurde das Plasmid pShuttle mit EcoR I und Mfe I geschnitten und religiert, wodurch unter anderem eine Erkennungssequenz für Kpn I deletiert wurde. Aus diesem deletierten Plasmid wurde mittels PCR ein 310 bp Fragment amplifiziert, dabei wurden folgende Primer verwendet: 5'-TGAATTCGCGCGCCACCTGACGTTAA-3' (sense, unterstrichen: Erkennungssequenz für EcoR I) und 5'-TAGGTACCGCGCGCGTTGGCCGATTC-3' (reverse antisense, unterstrichen: Erkennungssequenz für Kpn I). Das PCR-Produkt wurde mit EcoR I und Kpn I geschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen in pHR'SINcPPT-CEW eingefügt und damit der Vektor pLentiShuttle generiert [166].

2.3.2 Klonierung des „high copy“ Plasmids pBShuttle

Das Shuttleplasmid pBShuttle basiert auf dem „high copy“ Plasmid pBluescript II SK (-) und dem Plasmid pShuttle. Aus dem EcoR I / Mfe I deletierten pShuttle wurde mittels PCR ein 311 bp Fragment amplifiziert, dabei wurden folgende Primer verwendet: 5'-TAGGTACCGCGCGCCACCTGACGTTAA-3' (sense, unterstrichen: Erkennungssequenz für Kpn I) and 5'-GCGGAGCTCCGCGCGCGTTGGCCGATTC-3' (reverse antisense, unterstrichen: Erkennungssequenz für Sac I). Das PCR-Produkt wurde mit Kpn I und Sac I geschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen in pBluescript II SK (-) eingefügt. Ein komplettes I-Ceu I /PI-Sce I-Fragment aus pShuttle mit CMV-Promotor, einer multiple cloning site und einem Polyadenylierungssignal wurde zwischen die neu eingefügten Schnittstellen des pBluescript II SK (-) kloniert, um das Plasmid pBShuttle+polyA zu generieren. Dieses Plasmid wurde in den dam^{neg} E.coli Stamm GM33 transformiert, zunächst vollständig geschnitten mit Bcl I, dann partiell mit Bgl II und abschließend religiert. Die resultierende Deletion eines 269 bp Fragmentes, das das Polyadenylierungssignal enthält, ergab das Plasmid pBShuttle [166].

Die Klonierung des Plasmids pBShuttle wurde von Frau Stephanie Wunderlich in ihrer Diplomarbeit „Herstellung lentiviraler Vektoren für die Expression kardialer Transkriptionsfaktoren und einer roten GFP-Variante“ (2003) durchgeführt, Planung und Betreuung der Versuche erfolgten im Rahmen der vorliegenden Dissertation.

2.3.3 Expressionskassetten mit Reportergenen und ubiquitären Promotoren

Neue Expressionskassetten wurden in pBShuttle generiert. Neben dem *Aequorea victoria* eGFP wurden zwei weitere Reporter gene verwendet: das humanisierte *Renilla reniformis* GFP hrGFP und die verbesserte DsRed-Variante RedStar [167].

Das hrGFP und RedStar sowie das regulatorische Element WPRE wurden in die folgende multiple cloning site des pBShuttle eingefügt: Nhe I - Xba I - Xho I - Not I - Kpn I - Afl II. hrGFP wurde als Not I / Kpn I - Fragment aus phrGFP-1 kloniert, RedStar als Xba I / Xho I - Fragment aus dem Plasmid p415-Gal-1RedStar. Das regulatorische Element WPRE wurde zunächst mit Pst I und Sal I aus pHR'SINcPPT-CEW geschnitten und in den Vektor pCITE-2a(+) umklontiert, aus diesem wurde es mittels PCR amplifiziert. An die verwendeten Primer wurden Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen angefügt, um die weitere Klonierung zu erleichtern: 5'-CTGGTACCTTGCATGCCTGCAG-3' (sense, unterstrichen: Erkennungssequenz für Kpn I) and 5'-ATACTTAAGCCGAATTCGAGCTCC-3' (reverse antisense, unterstrichen: Erkennungssequenz für Afl II). Das PCR-Produkt wurde mit Kpn I und Afl II geschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen in pBShuttle kloniert, um pBShuttle CMVp hrGFP WPRE bzw. pBShuttle CMVp RedStar WPRE zu generieren.

Um sicherzustellen, dass die Expression des Transgens nach der Transduktion von Zielzellen ausschließlich durch die eingefügten Promotoren vermittelt wird, und nicht durch eventuell verbleibende regulatorische Elemente der SIN-LTR oder Promotorelementen an der Integrationsstelle, wurde als Negativkontrolle ein weiteres Konstrukt ohne Promotor kloniert. Dazu wurde der CMV-Promotor in pBShuttle deletiert, indem das Plasmid zunächst mit Mfe I und Nhe I geschnitten wurde, die Überhänge wurden mithilfe der Klenow-Polymerase aufgefüllt und das Plasmid anschließend religiert, bevor das hrGFP und das WPRE eingefügt wurden. Drei weitere Expressionskassetten mit dem Reporter gen GFP wurden kloniert, zwei mit dem SFFV Promotor kombiniert mit eGFP bzw. hrGFP, sowie eine weitere mit dem Phosphoglyceratkinase (PGK)-Promotor und dem Reporter gen hrGFP.

Für die Klonierung von pBShuttle SFFVp eGFP WPRE wurde in pBShuttle CMVp hrGFP WPRE ein Mfe I / Xho I Fragment, das den CMV-Promotor enthält, durch ein EcoR I / Sal I - Fragment mit kompatiblen Überhängen aus pHR'SINcPPT-SEW ersetzt, das den SFFV-Promoter und das *Aequorea victoria* eGFP enthält. Für die Klonierung von pBShuttle SFFV hrGFP WPRE wurde in pBShuttle CMVp hrGFP WPRE ein Mfe I / BamH I Fragment, das den CMV-Promotor enthält, durch ein EcoR I / BamH I - Fragment mit kompatiblen Überhängen aus pHR'SINcPPT-SEW ersetzt, das den SFFV-Promoter enthält. In diesem Vektor wurde der SFFV-Promotor durch den PGK-Promotor aus dem Plasmid pGK-loxP ersetzt, um pBShuttle PGKp hrGFP WPRE zu generieren [166].

Alle Klonierungen in pBShuttle wurden in elektrokompententen *E. coli* TOP10 durchgeführt.

2.3.4 Expressionskassetten mit Reportergenen und kardialen Promotoren

Zur lentiviralen Markierung differenzierter Kardiomyozyten durch GFP unter der Kontrolle kardialer Promotoren wurden weitere Expressionskassetten generiert. Als Grundlage dafür wurde das Plasmid pBShuttle mit deletiertem CMV-Promotor verwendet, in das bereits hrGFP und das WPRE eingefügt worden waren. Die kardialen Promotoren wurden in die enthaltene multiple cloning site Nhe I - Xba I - Xho I - Not I - Xma I - BamH I - Kpn I - Afl II eingefügt.

Ein 561 bp großes Fragment des humanen ANF-Promotors wurde aus dem Plasmid pUCBM20-ANF mittels PCR mit den Primern KM69 und KM70 amplifiziert. An die verwendeten Primer wurden Erkennungssequenzen für Xba I und Not I angefügt, das PCR-Produkt wurde mit diesen Enzymen geschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen in pBShuttle kloniert. Der murine α -MHC-Promotor in einer Länge von 5297 bp wurde aus dem Plasmid pUCBM20- α -MHC als Nhe I / Not I - Fragment ebenfalls zwischen die Schnittstellen für Xba I und Not I in pBShuttle kloniert, sowie auch der humane MLC2v-Promotor in einer Länge von 1304 bp als Spe I / Not I - Fragment aus dem Plasmid pCRITOPPO-huMLC2v. Dabei wurde die Kompatibilität der Basenüberhänge von Nhe I-, Spe I- und Xba I-geschnittener DNA ausgenutzt. Der Promotor für humanes kardiales Aktin wurde aus dem Plasmid pPv/B Act lacZ zunächst mithilfe von Sal I und Hind III in das Plasmid pEGFP-1 umkloniert, von dort wurde er als Xma I / Bgl II - Fragment in das Plasmid pBShuttle zwischen die kompatiblen Schnittstellen Xma I und BamH I eingefügt. Alle Klonierungen in pBShuttle wurden in elektrokompententen *E. coli* TOP10 durchgeführt.

Die Klonierung der Vektoren pLentiShuttle huANFp hrGFP WPRE und pLentiShuttle mu α MHCp hrGFP WPRE wurde von Frau Kristin Schwanke durchgeführt, der Vektor pLentiShuttle huCap hrGFP WPRE wurde von Frau Jennifer Heinke als Teil ihrer Diplomarbeit „Einfluss des CMV-Enhancers auf Zellspezifität und Höhe der Transgenexpression in lentiviralen Vektoren“ (2004) generiert, diese Arbeit wurde ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Dissertation betreut. Alle Konstrukte wurden durch analytischen Restriktionsverdau überprüft.

2.3.5 Expressionskassetten mit kardialen Transkriptionsfaktoren

Die humanen kardialen Transkriptionsfaktoren GATA4 und Nkx2.5 wurden in Expressionskassetten unter die Kontrolle eines CMV-Promotors gestellt und in das Plasmid pBShuttle kloniert. Dazu wurde RNA aus humanem Herzgewebe isoliert und zunächst mithilfe der M-MLV Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben, dazu wurde für GATA4

der Primer hu3 GATA4ex ras verwendet, für Nkx2.5 Random-Primer. Mittels PCR wurde mit der entsprechenden cDNA als Template die für GATA4 (1372 bp) bzw. Nkx2.5 (1062 bp) kodierende Sequenz amplifiziert. Die GATA4-Sequenz wurde mit der ProofStart DNA-Polymerase amplifiziert, die Nkx2.5-Sequenz mit der RedTaq DNA-Polymerase. Die PCR-Produkte wurden durch TA-Klonierung in das Plasmid pCRII-TOPO eingebracht, wegen der größeren Fehlerhäufigkeit bei der Amplifizierung durch die RedTaq-Polymerase wurde das Konstrukt pCRIITOPO-Nkx2.5 vor der weiteren Klonierung durch Sequenzierung (Firma SeqLab, Göttingen) mit den Primern T7 und Sp6 überprüft. Für das Konstrukt pCRIITOPO-GATA-4 wurde dagegen wegen der geringeren Fehlerhäufigkeit bei der Verwendung der ProofStart DNA-Polymerase auf eine Sequenzierung verzichtet. Aus pCRII-TOPO wurden die Sequenzen mit Xho I und Hind III in das Plasmid pBShuttle umkloniert. Die Klonierungen in pBShuttle wurden in elektrokompenten *E. coli* TOP10 durchgeführt.

Die Klonierung der lentiviralen Vektoren pLentiShuttle CMV GATA4 und pLentiShuttle CMV Nkx2.5 wurde von Frau Stephanie Wunderlich im Rahmen ihrer Diplomarbeit „Herstellung lentiviraler Vektoren für die Expression kardialer Transkriptionsfaktoren und einer roten GFP-Variante“ (2003) durchgeführt, diese Arbeiten wurde ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Dissertation geplant und betreut. Alle Konstrukte wurden durch analytischen Restriktionsverdau überprüft.

2.3.6 Klonierung von Expressionskassetten in den Transfervektor pLentiShuttle

Alle Expressionskassetten wurden aus pBShuttle mit den Meganukleasen I-Ceu I und PI-Sce I ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen in pLentiShuttle umkloniert. Da die pLentiShuttle-Vektoren lentivirale LTRs enthalten, wurde dieser letzte Klonierungsschritt im *E. coli* Stamm ElectroMax Stbl4 durchgeführt, um unerwünschte Rekombinationen des Vektors zu vermeiden. Die Klonierung der Vektoren pLentiShuttle CMVp hrGFP WPRE und pLentiShuttle CMVp RedStar WPRE wurde von Frau Stephanie Wunderlich in ihrer Diplomarbeit „Herstellung lentiviraler Vektoren für die Expression kardialer Transkriptionsfaktoren und einer roten GFP-Variante“ (2003) durchgeführt, Planung und Betreuung der Versuche waren Teil der vorliegenden Dissertation. Die Klonierung der Vektoren pLentiShuttle SFFVp hrGFP WPRE und pLentiShuttle PGKp hrGFP WPRE wurde von Frau Kristin Schwanke durchgeführt. Alle Konstrukte wurden durch analytischen Restriktionsverdau überprüft und zur Produktion von Lentiviren in HEK293T-Zellen eingesetzt.

2.3.7 Klonierung des CMV-Enhancers

Der CMV-Enhancer wurde mittels PCR aus dem Plasmid pcDNA3 als 573 bp Produkt amplifiziert und in die Eag I-Schnittstelle des Transfervektors pLentiShuttle eingefügt. Der

Enhancer liegt damit zwischen dem lentiviralen RRE und dem im Vektor verbliebenen verkürzten Gag-Fragment von HIV-1. Da er sich stromaufwärts der I-Ceu I-Schnittstelle befindet, konnten anschließend die bereits vorhandenen Expressionskassetten mit hrGFP und WPRE unter der Kontrolle kardialer Promotoren mithilfe der Meganukleasen I-Ceu I und PI-Sce I in den neuen Transfervektor pLentiShuttleCe eingefügt werden. Diese Klonierungen wurden von Frau Jennifer Heinke im Rahmen ihrer Diplomarbeit „Einfluss des CMV-Enhancers auf Zellspezifität und Höhe der Transgenexpression in lentiviralen Vektoren“ (2004) durchgeführt, wobei die Planung und Betreuung der Versuche im Rahmen der vorliegenden Dissertation erfolgte.

2.4 Methoden zur Produktion von replikationsdefizienten Lentiviren

Sämtliche Arbeiten mit replikationsdefizienten Lentiviren wurden in einem gesonderten Labor der Sicherheitsstufe 2 unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

2.4.1 Calcium-Phosphat-Transfektion

Zur Verpackung der klonierten Expressionskassetten in replikationsdefiziente Lentiviren wurden die generierten lentiviralen Transfervektoren mittels Calcium-Phosphat-Transfektion zusammen mit einem Verpackungsplasmid und einem Hüllproteinplasmid in HEK293T-Zellen eingebracht. Bei der Calcium-Phosphat-Transfektion wird die zu übertragende DNA zusammen mit CaCl_2 in einen Phosphat-haltigen Puffer gegeben, in dem sich ein feines Präzipitat aus DNA und Calciumphosphat bildet [168]. Dieses kann dann von Säugerzellen aufgenommen werden.

In Poly-L-Lysin-beschichtete 175cm² Zellkulturflaschen wurden 9×10^6 HEK293T-Zellen in DMEM mit 10% Fötalem Kälberserum (FCS), 2 mmol/L L-glutamine, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 mg/ml) (DMEM mit Zusätzen) ausgesät.

Nach 24 h wurde eine Ko-Transfektion mit dem lentiviralen Transferplasmid, dem Verpackungsplasmid pCMV Δ R8.91, das für die Proteine Gag, Pol, Rev und Tat kodiert, und dem Hüllprotein-Plasmid pMD.G durchgeführt, das für das heterologe Hüllprotein VSV-G kodiert, mit dem die lentiviralen Partikel pseudotypisiert werden.

Dazu wurden 60 μg Transferplasmid, 39 μg Verpackungsplasmids und 21 μg Hüllprotein-Plasmid mit 183 μl einer 2M CaCl_2 -Lösung versetzt und mit H_2O auf 1,5 ml aufgefüllt. Diese DNA/ CaCl_2 -Mischung wurde tropfenweise zu 1,5 ml 2xHBS-Puffer gegeben, dabei wurde mit einer Pipette gleichzeitig kontinuierlich Luft in die Lösung einströmen lassen, damit sich an den aufsteigenden Luftblasen ein feines Calciumphosphat-DNA-Präzipitat bilden konnte. Auf die Zellen wurden 9 ml komplettes DMEM mit 33nM Chloroquine gegeben und das Präzipitat vorsichtig zugetropft. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 weiter kultiviert.

2.4.2 Ernte der replikationsdefizienten Lentiviren

Die in den HEK293T-Zellen nach Ko-Transfektion gebildeten Viruspartikel werden von den Zellen in das Kulturmedium abgegeben und können so geerntet werden [150].

Ca. 16 h nach der Calcium-Phosphat-Transfektion wurden die HEK293T-Zellen mit DMEM mit Zusätzen und 10mM Natriumbutyrat versetzt, nach weiteren 8 h wurde dieses Medium durch DMEM mit 2 mmol/L L-glutamine, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 mg/ml) ersetzt. In dieses serumfreie Medium wurden nun die gebildeten lentiviralen Partikel abgegeben. Nach 16 h und weiteren 24 h wurden die virushaltigen Zellkulturüberstände abgenommen und durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,45µm gereinigt um Rückstände der HEK293T-Zellen zu entfernen.

Die Zellkulturüberstände mit den produzierten lentiviralen Partikeln wurden frisch zur Transduktion von eukaryoten Zellen verwendet oder für 5 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur späteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4.3 Konzentration der Lentiviren

Bei Bedarf an größeren Mengen replikationsdefizienter Lentiviren, wurden die im Zellkulturüberstand enthaltenen lentiviralen Partikel durch Zentrifugieren ankonzentriert. Dazu wurden die filtrierten Überstände in 36ml-Zentrifugationsgefäße überführt und bei 18.000 x g für 16 h bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, das virushaltige Pellet in etwa 1/100 Volumen Zellkulturmedium aufgenommen und sofort zur Transduktion verwendet oder für 5 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur späteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4.4 Titerbestimmung durch Transduktion von HEK293T-Zellen

Zur Bestimmung der biologischen Titer der lentiviralen Partikel in den Zellkulturüberständen und den konzentrierten Viruspräparationen wurde diese in verschiedenen Verdünnungen zur Transduktion von HEK293T-Zellen eingesetzt [169]. Dazu wurden 16 h vor der Transduktion 1×10^5 HEK293T-Zellen in Gelatine-beschichtete 24well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden dann mit je 1 ml der Viruspräparation in verschiedenen Verdünnungen in komplettem DMEM mit 8 µg/ml Polybrene versetzt, für nicht konzentrierten Virus wurden die Verdünnungsstufen 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4} gewählt, für konzentrierten Virus 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} .

72 h nach der Transduktion wurden die Zellen zweimal mit PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen, mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ versetzt und durch Pipettieren abgelöst. Die Zellen wurden im Durchflusszytometer auf ihre GFP-Expression untersucht, als Negativkontrolle dienten nicht-transduzierte HEK293T-Zellen. Aus dem Anteil GFP-positiver Zellen wurde auf den Virus-Titer in 1 ml der Präparation zurückgerechnet und der Titer in infektiösen Einheiten („infectious units“) pro Milliliter (IU/ml) angegeben.

2.4.5 Virusbestimmung durch Real-Time-PCR

Zum Nachweis integrierter lentiviraler Sequenzen nach Transduktion wurden transduzierte Zellen mit Proteinase K lysiert und als Template für eine Real-Time-PCR eingesetzt, die Sequenzen in den viralen LTRs detektiert [169]. Diese wurde freundlicherweise von Frau Sandra Menke durchgeführt, auf eine genaue Beschreibung der Ansätze und Durchführung wird deshalb hier verzichtet.

2.5 Methoden zur Charakterisierung der lentiviralen Vektoren

2.5.1 Transfektion durch Lipofektion

Die Funktionalität der generierten Expressionskassetten sollte zunächst nach nicht-viralem Gentransfer der lentiviralen Transfervektoren in Säugerzellen mittels Transfektion überprüft werden. Bei der Transferrin-vermittelten Transfektion durch Lipofektion wird die zu übertragende DNA zusammen mit Transferrin in kationischen Lipiden komplexiert, diese Komplexe binden an Transferrinrezeptoren auf der Oberfläche von Säugerzellen und werden dann von den Zellen aufgenommen [170,171].

Zur Transfektion durch Lipofektion wurden ca. 16 h vor der Transfektion HEK293T-Zellen in komplettem DMEM in einer Dichte von 2×10^5 pro well in Gelatine-beschichteten 6well-Platten ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen, mit 800 μ l serumfreiem Medium Optimem-1 versetzt und für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ vorinkubiert. Währenddessen wurde der Transfektionsmix vorbereitet. Dazu wurden pro well 1,5 μ g DNA in 100 μ l Optimem-1 verdünnt und weitere 100 μ l Optimem-1 mit 30 μ g bovinem Transferrin und 5 μ l Lipofectamin versetzt. Beide Ansätze wurden zusammengegeben, für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach Ablauf der 2 h Vorinkubation auf die Zellen gegeben. Nach 4-5 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden in komplettem DMEM bei 37°C und 5% CO₂ weiterkultiviert.

2.5.2 Transduktion

Die durch Verpackung in HEK293T-Zellen produzierten rekombinanten Lentiviren sollten für einen viralen Gentransfer durch Infektion verschiedener Zielzellen eingesetzt werden. Zur Transduktion von adhärent wachsenden Zellen mit Lentiviren wurde zunächst das Kulturmedium abgenommen und die Zellen wurden mit Virus in einem geringen Volumen kompletten DMEMs mit 4 μ g/ml Protaminsulfat und 100 μ M Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) versetzt, z.B. 250 μ l je well einer 24well-Platte. Die Transduktion erfolgte durch Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Nach frühestens 4 h oder spätestens 24h wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden in ihrem jeweiligen Kulturmedium

weiterkultiviert. Bei der Transduktion wird das Verhältnis der Anzahl der eingesetzten Viruspartikel zur Zellzahl als „multiplicity of infection“ MOI angegeben.

2.5.3 Transwell-Versuche

Transwell-Einsätze enthalten eine Membran mit definierter Porengröße, durch die sich Zellkulturgefäße in zwei Kompartimente teilen lassen. Zellen in den verschiedenen Kompartimenten stehen nur über das Kulturmedium in Kontakt, ein direkter Zell-Zell-Kontakt wird in der Regel durch die Membran ausgeschlossen, während bei der hier gewählten Porengröße von 0,4 µm z.B. lentivirale Partikel die Membran passieren können.

HEK293T-Zellen wurden in einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro well in komplettem DMEM in Gelatine-beschichtete 6well-Platten ausgesät. Nach 2 h wurden Transwell-Einsätze mit einer Porengröße von 0,4 µm in die wells gesetzt.

Neonatale Rattenkardiomyozyten bzw. rat-1 Fibroblasten wurden lentiviral mit dem Virus pHR'SINcPPT-CEW mit einer MOI von 7 transduziert, anschließend wurden die Zellen in der gleichen Dichte entweder direkt in die Transwell-Einsätze gegeben oder zuvor 1-6 x gewaschen. Zum Waschen wurden die Zellsuspensionen mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ auf 40 ml aufgefüllt, abzentrifugiert und das Pellet in Medium aufgenommen. Die transduzierten und gewaschenen Zellen wurden entweder sofort oder nach Ablauf von 3h oder 9 h in die Transwell-Einsätze gegeben.

Nach 24 h Kokultivierung der HEK293T-Zellen mit den transduzierten Zellen ohne direkten Zellkontakt wurden die Transwell-Einsätze entfernt, die HEK293T-Zellen wurden weiter kultiviert. Nach 5 Tagen wurden die Zellen im Durchflusszytometer auf ihre GFP-Expression untersucht, als Negativkontrolle dienten HEK293T-Zellen, die nicht mit transduzierten Zellen kokultiviert wurden. In einem Kontrollexperiment wurden statt frisch transduzierter Zellen stabil GFP-exprimierende rat-1 Fibroblasten verwendet.

2.6 Methoden zur Zellkultur

Sämtliche Arbeiten mit Säugetierzellen wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Sämtliche Materialien wurden vor der Verwendung durch Autoklavieren bei 121°C für 20 min oder durch Erhitzen auf 180°C für mehr als 4 h sterilisiert. Lösungen und Medien wurden, sofern sie nicht vom Hersteller steril geliefert wurden, autoklaviert oder durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,22 µm sterilfiltriert.

2.6.1 Auftauen von Zellen

Um tiefgefrorene, in flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen in Kultur zu nehmen, wurden die Einfrierröhrchen dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Bevor die Zellsuspension vollständig aufgetaut war, wurde sie in ein Falconröhrchen abgekippt und unter Schütteln mit 10 ml kaltem Stoppmedium DMEM mit 20 % FCS versetzt. Die Zellen

wurden bei 800 bis 1800 rpm abzentrifugiert, das Pellet wurde in 10 ml warmem Kulturmedium aufgenommen und in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt, die für einige Zelltypen zuvor beschichtet wurde.

2.6.2 Beschichtung von Zellkulturgefäßen

Einige adhärent wachsende Zellen benötigen für die Anheftung an Zellkulturgefäße speziell beschichtete Oberflächen. Zur Beschichtung mit Gelatine wurde eine 1%ige Gelatine-Lösung in die Zellkulturgefäße gegeben und für mindestens 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Oberfläche einmal mit PBS (mit Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen und sofort die Zellsuspension aufgegeben. Entsprechend wurde auch die Beschichtung von Oberflächen mit 1% Gelatine und 0,01% Fibronectin durchgeführt.

Zur Beschichtung mit Poly-L-Lysin wurde eine 0,1%ige Poly-L-Lysin auf die Oberfläche gegeben, für mindestens 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und ebenfalls einmal mit PBS (mit Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen. Das PBS wurde anschließend abgenommen, erst nachdem die Oberfläche vollständig trocken war, wurden die Zellen aufgegeben.

2.6.3 Kultur von adhärennten Zellen

Für die Vermehrung und Weiterkultivierung der Zellen wurde regelmäßig das Kulturmedium gewechselt. Sobald die Zellen auf dem gesamten Boden der Flasche einen konfluenten Monolayer bildeten, wurden sie passagiert. Dazu wurde von den Zellen das Kulturmedium abgenommen, die Zellen wurden mit 10 ml PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen, anschließend wurden 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben. Die Zellen wurden 3-5 min bei 37°C inkubiert, und konnten dann vom Boden der Zellkulturflasche abgeschlagen werden. Sie wurden mit 10 ml Stoppmedium DMEM mit 20 % FCS versetzt und bei 800 bis 1800 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Kulturmedium resuspendiert, die Zellen wurden im Verhältnis 1:2 bis 1:10 gesplittet und bei 37°C und 5% CO₂ weiter kultiviert.

2.6.4 Einfrieren von Zellen

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff tiefgefroren gelagert. Dazu wurde von adhärennt wachsenden Zellen einer 75 cm² Zellkulturflasche das Kulturmedium abgenommen, die Zellen wurden mit 10 ml PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen, anschließend wurden 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben. Die Zellen wurden 3-5 min bei 37°C inkubiert, dann vom Boden der Zellkulturflasche abgeschlagen und mit 10 ml kaltem Stoppmedium DMEM mit 20 % FCS versetzt, anschließend wurden die Zellen bei 800 bis 1800 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Einfriermedium aus 90% FCS und 10% DMSO resuspendiert und in ein Einfrierrohrchen überführt. Dieses wurde in einer Einfrierbox anschließend zunächst auf -80°C abgekühlt und nach 24 h in flüssigen Stickstoff überführt.

2.6.5 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte in einer Neubauerkammer. Dafür wurden 10 µl Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau-Lösung gemischt, die die Kerne toter Zellen anfärbt. Ein Tropfen dieser Suspension wurde unter ein Deckgläschen auf die Neubauerkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden die hellen Zellen in 4 Großquadraten ausgezählt. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen nach folgender Formel berechnet:
(Zahl der Zellen in 4 Großquadraten / 4) x 10 x 10⁴ = Zellzahl / ml.

2.6.6 Isolierung neonataler Rattenkardiomyozyten

Neonatale Rattenkardiomyozyten (NRCMs) wurden aus den Herzen von neugeborenen, maximal einen Tag alten Wistar-Ratten isoliert [172]. Die Tiere wurden dekapitiert, die entnommenen Herzen rasch zerkleinert und durch Inkubation mit Trypsin und DNase enzymatisch vorbehandelt. Anschließend wurden die einzelnen Kardiomyozyten durch Pipettieren mechanisch aus dem Gewebe gelöst. Die gewonnene Einzelzell-Suspension wurde zur Entfernung von Geweberesten über ein 100µm-Zellsieb gegeben und bei 600 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Die Zellen wurden im Zellkulturmedium Dulbecco's Minimal Essentials Medium (DMEM) mit 10% Fötalem Kälberserum (FCS), 2 mmol/L L-glutamine, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 mg/ml) aufgenommen und in Gelatinebeschichteten Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ weiter kultiviert.

Die Isolierung der neonatalen Rattenkardiomyozyten wurde in der Regel von Frau Ingrid Schmidt-Richter durchgeführt.

2.6.7 Isolierung humaner endothelialer Progenitorzellen

Humane Endotheliale Progenitorzellen (EPCs) wurden aus dem peripheren Blut freiwilliger Spender isoliert [173]. Direkt nach der Entnahme wurde das Blut mit PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) im Verhältnis 1:1 verdünnt und vorsichtig auf eine Biocoll Trennlösung der Dichte 1,073 g/cm³ geschichtet. Nach einer Zentrifugation bei 800 rpm und 18°C für 20 min hatten sich die mononukleären Zellen über der Phasengrenze gesammelt und konnten vorsichtig abgenommen werden. Die Zellen wurden noch zweimal mit PBS gewaschen, anschließend im Medium EGM mit 10 % oder 20 % FCS verschiedener Chargen aufgenommen und in mit Gelatine und Fibronectin beschichtete Zellkulturgefäße ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ weiter kultiviert. Nach drei Tagen wurden die nicht-adhärenenten Zellen durch Waschen mit PBS und einen Wechsel des Mediums entfernt.

2.6.8 Markierung der EPCs

Wenn die isolierten EPCs mit anderen Zellen kokultiviert werden sollten, wurden sie zuvor mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert [173]. Zum einen wurden die adhärenenten EPCs mit dem rot fluoreszierenden Carbocyanin Farbstoff Vybrant CM-Dil markiert, der sich in

Zellmembranen einlagert. Dazu wurden die Zellen mit 5 μM CM-Dil in Medium für 20 min bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Zum anderen wurde zur Markierung der EPCs acetyliertes low-density Lipoprotein (LDL) aus humanem Plasma verwendet, an das der rote Fluoreszenzfarbstoff Dil gebunden ist. Dieses DilAcLDL wird selektiv von Endothelzellen, aber auch von Monozyten/Makrophagen aufgenommen. Zur Markierung wurden die EPCs mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DilAcLDL in Medium für 24h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit Medium gewaschen und für die Kokulturen eingesetzt.

2.6.9 Kokultivierung der EPCs mit neonatalen Rattenkardiomyozyten

Eine Kokultivierung der EPCs mit neonatalen Rattenkardiomyozyten zur Untersuchung einer eventuell induzierten kardialen Differenzierung der EPCs [67] erfolgte in „CultureSlides“, Objektträgern mit aufgesetzten Kammern für Zellkulturmedium, in denen die Zellen zunächst kultiviert und anschließend immunhistologisch gefärbt werden können. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Zellen für die Färbung nicht abgelöst werden müssen und ihre Morphologie erhalten bleibt.

Für die Kokultivierung wurden die EPCs nach der Isolierung in „CultureSlides“ ausgesät und nach drei Tagen markiert. Anschließend wurden zu den EPCs frisch isolierte Kardiomyozyten gegeben, wobei das Verhältnis der Zellzahlen 1:4 oder 1:1 betrug. Die Zellen wurden zunächst in DMEM mit 10% Pferdeserum (horse serum, HS) und 5% Fötalem Kälberserum, 2 mmol/L L-glutamine, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 mg/ml) kultiviert, nach 2 Tagen wurde auf DMEM gewechselt, das 5% Pferdeserum, 2 mmol/L L-glutamine, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 mg/ml) enthielt. Dieses Medium wurde alle 2 Tage ersetzt. Als Kontrollen wurden in weiteren Ansätzen humane EPCs und Kardiomyozyten unter den gleichen Bedingungen getrennt kultiviert. Für die Kokultivierung von EPCs und neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden außerdem eine Reihe von Variationen in verschiedenen Kombinationen getestet:

Tabelle 9 Variationen der Kokulturbedingungen

Parameter	Variation	Variation	Variation	Variation
Beschichtung	keine	Gelatine	Gelatin / Fibronectin	Laminin
EPC-Medium	Endothelial Growth Medium (PromoCell)	EGM (CellSystems)	+ 10% FCS oder + 20% FCS	-
EPC-Labeling	CM-Dil	DilAcLDL	-	-
Verhältnis EPC / NRCM	1:1	1:4	-	-
Kokultur-Medium	Für 2 Tage: DMEM + 5%FCS + 10% HS, danach: DMEM + 5% HS	Für 2 Tage: DMEM + 10% FCS danach: DMEM + 5% HS	DMEM + 10% FCS	-
Färbung	Anti sarkomer. α -Actinin	Anti sarkomer. Myosin	Anti Troponin T	Anti Titin

2.6.10 Isolierung mesenchymaler Stammzellen aus der Ratte

Die Isolierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark von Ratten (rMSCs) erfolgte durch Aspirieren bzw. Ausspülen gereinigter und durchtrennter Knochen von Femur und Tibia [174]. Dazu wurden die präparierten Knochen zunächst von Geweberesten befreit und durchgebrochen. Die Hohlräume der Röhrenknochen wurden dann mit PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) ausgespült. Die gewonnene Suspension wurde bei 1500 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert, das Pellet wurde in 10 ml PBS mit 2% FCS und 1mM EDTA resuspendiert. Diese Suspension wurde über 5 ml einer Percoll-Lösung der Dichte 1,073 g/ml geschichtet, und bei 1100 rpm für 30 min bei 22°C zentrifugiert. Anschließend wurde die deutlich sichtbare Zellschicht oberhalb der Phasengrenze, die sogenannte „low density“-Fraktion, vorsichtig abgenommen und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden nach der letzten Zentrifugation in 5 ml Alpha-MEM aufgenommen und in Zellkulturflaschen weiter bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert.

2.6.11 Differenzierung der rMSCs

Der Einfluss der Substanz 5-Azacytidin auf die kardiale Differenzierung der rMSC [33] sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation untersucht werden. Zur Stimulierung der Differenzierung wurde 5-Azacytidin in einer Konzentration von 10 μM zum Kulturmedium der rMSC gegeben, die Zellen wurden für 24 h inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde das Kulturmedium gewechselt, die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO_2 weiter kultiviert.

2.7 Methoden zur Zell-Charakterisierung

2.7.1 Immunfluoreszenz-Färbung

Zum Nachweis zelltypspezifischer Proteine der undifferenzierten und differenzierten Zellen wurden immunhistologische Färbungen durchgeführt. Die Zellen wurden zu diesem Zweck in „CultureSlides“ kultiviert und zunächst in 4% Paraformaldehyd für 4 min bis 1h bei 4°C fixiert. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurden die Objektträger für 20 min mit dem Puffer TBS+ inkubiert, dem Serum derjenigen Spezies zugesetzt ist, aus welcher der Sekundärantikörper stammt. Dann wurde mit dem Primärantikörper verdünnt in Färbepuffer (PBS + 1% BSA) in der Regel für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper für 30 min. Zwischen allen Inkubationsschritten wurden die Objektträger jeweils 3 x 5 min mit PBS bei 4°C zum Waschen inkubiert. Die Zellen wurden für eine Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (1,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert, bevor die Rahmen der „CultureSlides“ entfernt, die Objektträger mit MountingMedium versetzt und mit Deckgläschen versiegelt wurden. Für Mehrfachfärbungen wurden die Zellen mit den jeweiligen Primär- bzw. Sekundärantikörpern gleichzeitig inkubiert.

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden in der Regel von Frau Ingrid Schmidt-Richter durchgeführt.

Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mit Filtern für die entsprechenden Wellenlängen oder am konfokalen Laser-Scan Mikroskop.

2.7.2 Analyse im Durchflusszytometer

Der Nachweis zelltypspezifischer Proteine erfolgte z.T. auch durch Inkubation mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern und anschließender Analyse der Zellen im Durchflusszytometer. Dort durchfließen die Zellen einzeln eine Messkapillare, wobei in verschiedenen Kanälen Messwerte erfasst werden, die charakteristisch für die Zellgröße und die Zellgranularität sowie für Fluoreszenz der Zellen sind. Um dabei die Überlappung der Emissionsspektren einzelner Fluorochrome zu kompensieren, wird dabei vom Signal eines gemessenen Fluorochroms ein prozentualer Anteil des im benachbarten Kanal detektierten Signals subtrahiert. Damit wird ein Messwert erreicht, der dem tatsächlich vom einzelnen Fluorochrom emittierten entspricht.

Die Färbung von Zellen mit Antikörpern gegen intrazelluläre Antigene erfolgte mit dem BD Cytotfix/Cytoperm Kit. Die Zellen wurden zunächst mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und abzentrifugiert, pro Ansatz wurden 5×10^4 bis 2×10^5 Zellen in jeweils 200 μl Cytotfix/Cytoperm resuspendiert, in eine 96well-Mikrotiterplatte gegeben und für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden sie und bei 2000 rpm für 2 min abzentrifugiert und der Reihe nach mit folgenden Lösungen inkubiert:

Tabelle 10 Protokoll intrazelluläre Immunfärbung

Lösung	Volumen [μl]	Inkubation
Cytotfix/Cytoperm	100	20 min
1x BD Perm/Wash	200	-
1x BD Perm/Wash	200	-
Primärantikörper in 1x BD Perm/Wash	50	1 h
1x BD Perm/Wash	200	-
1x BD Perm/Wash	200	-
Sekundärantikörper in 1x BD Perm/Wash	50	30 min
1x BD Perm/Wash	200	-
1x BD Perm/Wash	200	-

Zum Wechseln der Lösungen wurde die Platte nach einer Zentrifugation (2000 rpm, 2 min) auf einem saugfähigen Untergrund abgekippt, die neue Lösung wurde in die wells gegeben, die Platte mit einer Klebefolie versiegelt, gevortext und bei 4°C inkubiert. Zum Schluss wurden die Antikörper-markierten Zellen in 200 µl PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ aufgenommen, in 500µl-Polystyrolreagenzgläser überführt und für die Messungen am Durchflusszytometer eingesetzt. Die Messungen erfolgten in einem BD FACSCalibur Gerät, die Auswertung der Daten mit den Programmen CellQuest, WinMDI, Corel PHOTO-PAINT und CorelDRAW, Microsoft Excel und GraphPad Prism 3.0.

2.7.3 RNA-Isolierung

Alle Arbeiten mit RNA wurden an einem gesonderten Arbeitsplatz durchgeführt um eine Kontamination mit RNAsen zu vermeiden. Alle verwendeten Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt, um RNAsen zu inaktivieren.

Zur Isolierung der Gesamt-RNA [175] wurde von den Zellen das Kulturmedium abgenommen, 1 x mit PBS gewaschen und 1 ml TriZol pro 10 cm² Kulturfläche zugegeben. Die Zellen wurden durch auf- und abpipettieren lysiert und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 0,1 ml Bromchlorpropan (BCP) je ml TriZol zugegeben, die Proben für 15 s gevortext und für weitere 2-3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 12000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 0,5 ml Isopropanol je ml TriZol gemischt, für 10 min bei RT inkubiert und anschließend für 10 min bei 12000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min abzentrifugiert (12000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde getrocknet und konnte dann in 50 µl DEPC-H₂O aufgenommen werden. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

2.7.4 Bestimmung des RNA-Gehaltes

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration in Lösungen [163] wurde die optische Dichte der Lösung oder einer entsprechenden Verdünnung (meist 1:80 in H₂O) in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

Die Konzentration errechnet sich dann als

$$c(\text{DNA}) [\text{ng}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

mit V = Verdünnungsfaktor und F = Multiplikationsfaktor, für RNA = 40.

2.7.5 DNase-Verdau

Um kontaminierende DNA aus RNA-Präparationen zu entfernen, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Dabei wurde folgender Ansatz verwendet:

Tabelle 11 Ansatz für DNase-Verdau

Lösung	Menge
RNA	11 µg
Tris-HCl, pH 7,5	50 mM
RNAse Block	40 U
MgCl ₂	10 mM
DTT	1 mM
DNase	10 U
H ₂ O	ad 30 µl

Der Ansatz wurde für 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.7.6 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Aufreinigung der RNA nach dem DNase-Verdau wurde der Ansatz mit DEPC-H₂O auf 200 µl aufgefüllt und mit 100 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt [176]. Der Ansatz wurde gevortext und bei 12000 rpm und 4°C für 2 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, zur unteren, organischen Phase wurden 100 µl DEPC-H₂O gegeben und erneut gevortext und zentrifugiert. Die oberen, wässrigen Phasen wurden vereint, mit 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol versetzt und nochmals gevortext und zentrifugiert. Die in der wässrigen oberen Phase enthaltene aufgereinigte RNA wurde anschließend durch eine Natrium-Acetat-Fällung ankonzentriert.

2.7.7 Natrium-Acetat-Fällung

Zur Aufreinigung der RNA von unerwünschten Salzen und Proteinen in Lösungen wurde eine Natrium-Acetat-Fällung durchgeführt [159]. Die RNA-Lösung wurde mit einem 1/10 Volumen Natriumacetat-Lösung (3M, pH 7,5) und der 3-fachen Menge eiskaltem 96%igen Ethanol versetzt und für 30 min bei -80°C inkubiert. Anschließend wurde für 30 min bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 75%igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min abzentrifugiert (12000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde getrocknet und konnte dann in 11 µl DEPC-H₂O aufgenommen werden, die Lagerung der DNase-behandelten RNA erfolgte bei -80°C.

2.7.8 cDNA-Synthese

Die Umschreibung der isolierten RNA in stabilere cDNA für eine anschließende PCR zur Detektion der zellulären Genexpression erfolgte *in vitro* durch Inkubation mit einer Reversen Transkriptase, die mit Hilfe von RNA als Matrize 2'-Desoxynucleotidtriphosphate unter Diphosphat-Abspaltung zur komplementären DNA polymerisiert [177]. Verwendet wurde die M-MLV Reverse Transkriptase oder für geringe RNA-Mengen die Superscript Reverse Transkriptase. Die Polymerase benötigt für die Erststrang-DNA-Synthese Primer, dafür wurden Oligo-dT-Primer aus 16-20 Thymidinen verwendet, die an den PolyA⁺-Schwanz von mRNAs binden, wodurch alle Erststränge der DNA beginnend am 3'-Ende der mRNAs synthetisiert werden, oder Hexamerprimer („Random Hexamers“ oder „Random Primer“), die irgendwo auf der RNA hybridisieren.

Für Ansätze mit der M-MLV wurden jeweils 2 µg RNA mit 1 µl Random Primer oder Oligo dT Primer versetzt, für 5 min bei 70°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Dann wurden hinzugefügt:

5,0 µl DEPC-H₂O

5,0 µl M-MLV-RT 5x Puffer

2,0 µl dNTPs

1,0 µl RNase Block

1,0 µl M-MLV Reverse Transkriptase

Der gesamte Ansatz wurde für eine Stunde inkubiert, das Temperaturoptimum für die Reverse Transkription lag bei der Verwendung von Random Primern bei 37°C, bei der Verwendung von Oligo dT Primern bei 42°C, anschließend wurden die Ansätze für 5 min auf 95°C erhitzt.

Für Ansätze mit der SuperScript II-Reversen Transkriptase wurden zunächst jeweils 0,75 µg RNA mit 1 µl Random Primer (200ng/µl) und 1 µl dNTP-Mix (10mM) versetzt und auf ein Volumen von 12 µl mit H₂O aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Dann wurden hinzugefügt:

4 µl 5x-FirstStrand Buffer

2 µl DTT 0,1M

1 µl RNase Block

Der Ansatz wurde für 2 min bei 25°C inkubiert, dann 1 µl SuperScript II Reverse Transkriptase zugegeben und für 10 min bei 25°C, für 50 min bei 42°C und abschließend für 15 min bei 72°C inkubiert.

Die Lagerung der cDNA bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei –20°C.

2.7.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen für eine weitere Klonierung oder zur Analyse der zellulären Genexpression erfolgte *in vitro* mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) [178]. Dabei binden nach Denaturierung des Ausgangsmoleküls zwei kurze einzelsträngige Oligonukleotide (Primer) an die DNA-Sequenz, eines komplementär zum 5'-Ende der gesuchten DNA-Sequenz und ein zweites komplementär zum 5'-Ende des entsprechenden Gegenstrangs. Eine thermostabile DNA-Polymerase verlängert diese Primer und synthetisiert dabei aus Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) exakte Kopien der Ausgangssequenz. Zum Nachweis der Expression spezifischer Gene in untersuchten Zellen mittels RT-PCR wurde von mRNA mittels reverser Transkriptase umgeschriebene cDNA für eine PCR-Reaktion eingesetzt, die Primerpaare wurden so gewählt, dass eine Amplifikation durch die RedTaq-DNA-Polymerase Produkte spezifischer Länge ergibt. Dazu wurden jeweils 1 µl der cDNA-Lösung mit 18 µl Master Mix und 6 µl Primer Mix versetzt.

Tabelle 12 Ansätze für Standard-PCR

Master Mix	Primer Mix
1 µl dNTPs (10 mM)	1 µl Primer 1 (10 pmol/µl)
2,5 µl 10x Puffer	1 µl Primer 2 (10 pmol/µl)
1,25 µl RedTaq Polymerase	4 µl H ₂ O
13,25 µl H ₂ O	

Die Proben durchliefen in einem Thermocycler nach einer kompletten Denaturierung aller zugesetzter DNAs in Einzelstränge mehrere Zyklen von Denaturierung, Annealing der Primer an die zu amplifizierende DNA und Elongation der DNA-Sequenzen. In einem abschließenden Elongationsschritt sollte die Synthese bereits begonnener DNA-Stränge abgeschlossen werden. Standardmäßig wurde folgendes PCR-Programm verwendet, dabei wurde die Annealingtemperatur ($T_{\text{Annealing}}$) den jeweiligen Schmelztemperaturen der einzelnen Primerpaare angepasst:

Tabelle 13 Programm für Standard-PCR

T [°C]	t [min]	Zyklen
94	1	1
94	1	35
$T_{\text{Annealing}}$	1	
72	1	
72	10	1
4	∞	1

3 Ergebnisse

3.1 Aufbau des LentiShuttle-Systems

Für die Detektion kardial differenzierter Zellen sollte ein Nachweissystem etabliert werden, für das Reportergene unter der Kontrolle herzspezifischer Promotoren mittels lentiviralem Gentransfer in die zu untersuchenden Zellen eingebracht werden.

Die Klonierung der dazu benötigten lentiviralen Transfervektoren erwies sich zu Beginn der Arbeiten als problematisch. Schwierigkeiten ergaben sich aus der Größe der Vektoren, der Abwesenheit von Polylinker-Bereichen mit einer ausreichenden Anzahl an Schnittstellen für Restriktionsenzyme und hohen Rekombinationsraten. Die für das Einbringen neuer Elemente in das lentivirale Transferplasmid durchgeführten Klonierungen ergaben oft nicht das gewünschte Produkt, stattdessen entstanden häufig kleinere Plasmide, die nicht mit den Ausgangsplasmiden identisch waren, sondern rekombinierte Plasmide darstellten. Es stellte sich heraus, dass die viralen LTRs auch in üblicherweise zur Klonierung viraler Vektoren verwendeten rekombinationsdefizienten *E. coli* Stämmen wie HB101 nicht ausreichend stabil repliziert wurden. Dieses Problem konnte durch die Verwendung spezieller Rekombinase-defizienter Bakterienstämme wie STBL2 und STBL4 umgangen werden, allerdings ist die Klonierung in STBL-Stämmen aufwendiger und teurer als für herkömmliche Bakterienstämme.

Um die Generierung von lentiviralen Transfervektoren zu vereinfachen, sollte deshalb die Zahl der Klonierungsschritte im lentiviralen Vektor durch den Aufbau eines geeigneten Shuttle-Systems minimiert werden. Ausgehend vom selbst-inaktivierenden lentiviralen Transferplasmid pHR'SINcPPT-CEW [179] wurde im Rahmen der Promotion das lentivirale Shuttle-Klonierungssystem „LentiShuttle“ generiert [166], mit dem es möglich ist, komplette Expressionskassetten zunächst in einem konventionellen „high copy“ Plasmid in herkömmlichen Bakterienstämmen wie *E. coli* TOP10 fertigzustellen und diese Kassetten anschließend in einem einzigen Klonierungsschritt in Rekombinase-defizienten STBL-Bakterien in den lentiviralen Transfervektor einzufügen.

Dazu wurden sowohl in ein „high copy“ Plasmid als auch in das lentivirale Transferplasmid Schnittstellen für die Homing Endonukleasen I-Ceu I und PI-Sce I eingefügt. Die Nuklease I-Ceu I stammt aus *Chlamydomonas eugametos*, PI-Sce I aus *Saccharomyces cerevisiae*, beide Nukleasen erkennen und schneiden ähnlich wie Restriktionsenzyme spezifische DNA-Sequenzen, wobei sich die beiden Enzyme durch besonders lange Erkennungssequenzen

auszeichnen (26 bp für I-Ceu I, 39 bp für PI-Sce I), weshalb sie auch als Meganukleasen bezeichnet werden. Deshalb ist es sehr unwahrscheinlich, dass diese Sequenzen auch in den zu klonierenden DNA-Fragmenten vorkommen, bei denen es sich meist um Säugetier-Gene, virale Elemente oder Plasmide handelt.

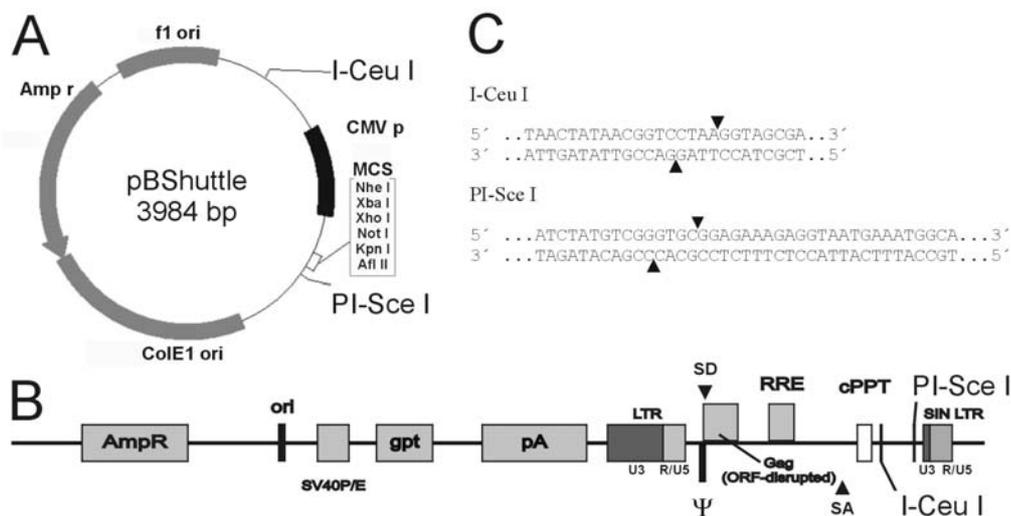


Abbildung 3.1 Aufbau des LentiShuttle-Systems

Das „high copy“ Plasmid pBShuttle (A) und das lentivirale Transferplasmid pLentiShuttle (B) wurden durch Einfügen der Schnittstellen für die Meganukleasen I-Ceu I und PI-Sce I (C) generiert. Expressionskassetten können so in pBShuttle generiert und in einem letzten Schritt komplett in den Transfervektor pLentiShuttle umkloniert werden. Aus [166].

Da alle genetischen Elemente in einem lentiviralen Transferplasmid einen Einfluss auf die Höhe der zu erreichenden Virustiter und die Höhe der Transgenexpression haben können, wurde untersucht, ob die in pLentiShuttle eingefügten Sequenzen mit den Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme I-Ceu I und PI-Sce I einen negativen Einfluss ausüben. Dazu wurden verschiedene Expressionskassetten mit Reportergenen unter der Kontrolle von allgemeinen Promotoren kloniert, die einen direkten Vergleich mit entsprechenden Expressionskassetten in konventionellen Transferplasmiden ermöglichen.

Um zu überprüfen, ob die Expressionskassetten in den lentiviralen Transfervektoren funktionell sind, wurden die Vektoren durch Transferrin-vermittelte Lipofektion in HEK293T-Zellen eingebracht. Nach 2 Tagen wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop und durchflusszytometrisch auf eine Reportergen-Expression untersucht (Daten nicht gezeigt). Transfervektoren, die nach Transfektion zu einer ausreichend starken Expression führten, wurden für die Produktion von Lentiviren eingesetzt.

3.1.1 Titerbestimmung der Lentiviren mit ubiquitären Promotoren

Lentiviren wurden in HEK293T-Zellen nach Calcium-Phosphat-Transfektion mit den lentiviralen Transfervektoren und den Verpackungsplasmiden pCMV Δ R8.91 und pMD.G produziert. Mit den infektiösen Viruspartikeln im Zellkulturüberstand wurden HEK293T-Zellen transduziert, nach 3 Tagen wurde im Durchflusszytometer der Prozentsatz der Zellen bestimmt, die das Reportergen exprimieren. Daraus wurden die Titer der Viren als infektiöse Einheiten pro ml Zellkulturüberstand (infectious units per ml = IU/ml) berechnet.

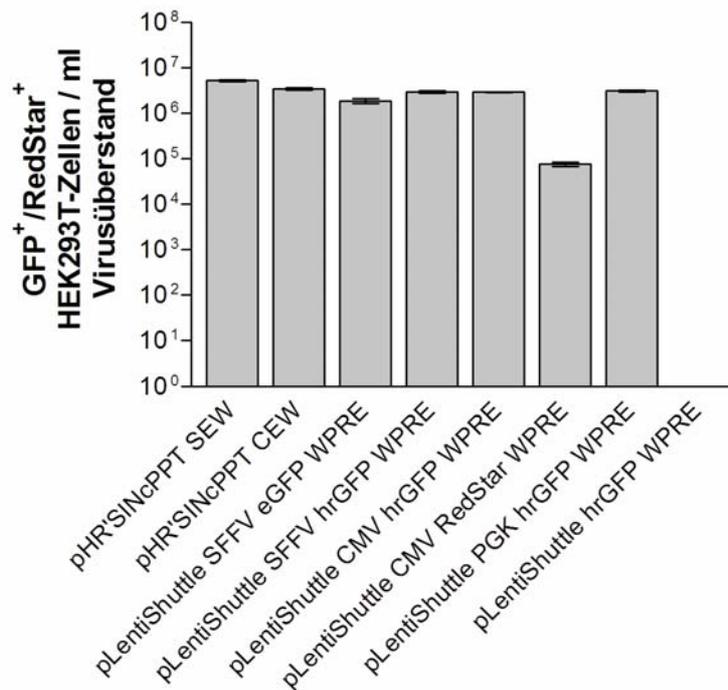


Abbildung 3.2 Titer der Lentiviren mit Reportergenen und allgemeinen Promotoren

Anzahl der Reportergen-exprimierenden HEK293T-Zellen je ml eingesetztem Zellkulturüberstand für die einzelnen lentiviralen Vektoren. Aus [166].

Die mit pLentiShuttle-Konstrukten erzielten Titer waren mit denen konventioneller lentiviraler Vektoren mit ähnlichen Expressionskassetten vergleichbar. Ein direkter Vergleich des konventionellen lentiviralen Vektors der fortgeschrittenen Generation pHR'SINcPPT-SEW ($5 \times 10^6 \pm 2 \times 10^5$ IU/ml) mit dem entsprechenden LentiShuttle-Vektor pLentiShuttle SFFV eGFP WPRE ($2 \times 10^6 \pm 2 \times 10^5$ IU/ml) und pLentiShuttle SFFV hrGFP WPRE ($3 \times 10^6 \pm 2 \times 10^5$ IU/ml) zeigt sehr ähnliche Titer. Auch der konventionelle Vektor pHR'SINcPPT-CEW ($4 \times 10^6 \pm 2 \times 10^5$ IU/ml) und pLentiShuttle CMV hrGFP WPRE ($3 \times 10^6 \pm 4 \times 10^4$ IU/ml) sowie pLentiShuttle PGK hrGFP WPRE ($3 \times 10^6 \pm 1 \times 10^5$ IU/ml) zeigten ähnliche Werte. Etwa um den Faktor 40 niedrigerer Titer wurde mit dem Vektor pLentiShuttle CMV RedStar WPRE ($8 \times 10^4 \pm 9 \times 10^3$ IU/ml) erzielt.

Die Transduktion von HEK293T-Zellen mit dem promotorlosen Kontroll-Vektor pLentiShuttle hrGFP WPRE führte nicht zu einer messbaren Expression von hrGFP, der Titer im Zellkulturüberstand als Maß für die Effizienz der Virusproduktion lässt sich in diesem Fall durchflusszytometrisch nicht bestimmen. Mit pLentiShuttle hrGFP WPRE transduzierte HEK293T-Zellen wurden deshalb zusätzlich lysiert und die DNA in den Lysaten mittels quantitativer Real-Time-PCR auf das Vorhandensein integrierter lentiviraler Sequenzen untersucht. Die dabei erhaltenen Werte für die Zahl der integrierten Sequenzen und damit viralen Partikel schwankten z.T. erheblich (ohne Abbildung), belegten aber auch für pLentiShuttle hrGFP WPRE eine vergleichbare Transduktionsrate in HEK293T-Zellen wie für die anderen, durchflusszytometrisch bestimmbaren Vektoren.

3.1.2 Expressionshöhe der Lentiviren mit ubiquitären Promotoren

Neben dem Einfluss auf die Virus-Titer sollte auch ein potentieller Einfluss der in die lentiviralen Vektoren eingefügten Sequenzen mit den Restriktionsschnittstellen für die Meganukleasen I-Ceu I und PI-Sce I auf die Expressionshöhe der lentiviralen Vektoren nach Transduktion untersucht werden.

Dazu wurden HEK293T-Zellen mit einer MOI von 1 transduziert. Verwendet wurden Viren der konventionellen Vektoren pHR'SINcPPT-SEW und pHR'SINcPPT-CEW, damit verglichen wurden die Vektoren pLentiShuttle SFFV hrGFP WPRE und pLentiShuttle CMV hrGFP WPRE. Nach 3 Tagen wurden die Zellen im Durchflusszytometer untersucht.

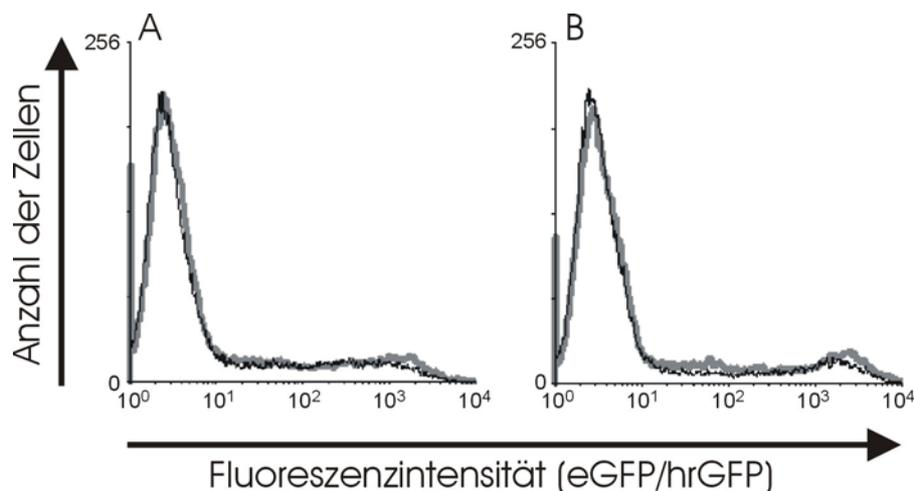


Abbildung 3.3 Expressionshöhen der Lentiviren mit allgemeinen Promotoren

Die Expressionshöhe des Reportergens in transduzierten HEK293T-Zellen (MOI von 1) von konventionellen lentiviralen Vektoren mit eGFP WPRE (breite graue Linie) wurden mit pLentiShuttle-Konstrukten mit hrGFP WPRE (schwarze Linie) im Durchflusszytometer verglichen, A) SFFV-Promotor, B) CMV-Promotor. Aus [166].

Die durchflusszytometrische Analyse transduzierter HEK293T-Zellen zeigt für pLentiShuttle-Vektoren und konventionellen lentiviralen Vektoren eine sehr ähnliche Verteilung der Fluoreszenzintensitäten über einen großen Messbereich. Ein negativer Einfluss der eingefügten Sequenzen auf die GFP-Expression in HEK293T-Zellen konnte nicht festgestellt werden.

3.1.3 Lentivirale Transduktion der Zielzellen

Für eine Verwendung der generierten Lentiviren zur Detektion von kardial differenzierten Zellen ist eine ausreichend hohe Effizienz der Transduktion sowohl von Kardiomyozyten als auch von den verwendeten Stammzellpopulationen entscheidend. Um diese zu überprüfen, wurden neonatale Rattenkardiomyozyten (NRCMs), humane endotheliale Progenitorzellen (huEPCs) und mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark adulter Ratten (rMSCs) zunächst mit dem Lentivirus LentiShuttle CMV hrGFP WPRE mit einer MOI von 5-10 transduziert. Nach 3-5 Tagen wurde die Reporter-gen-Expression mit dem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

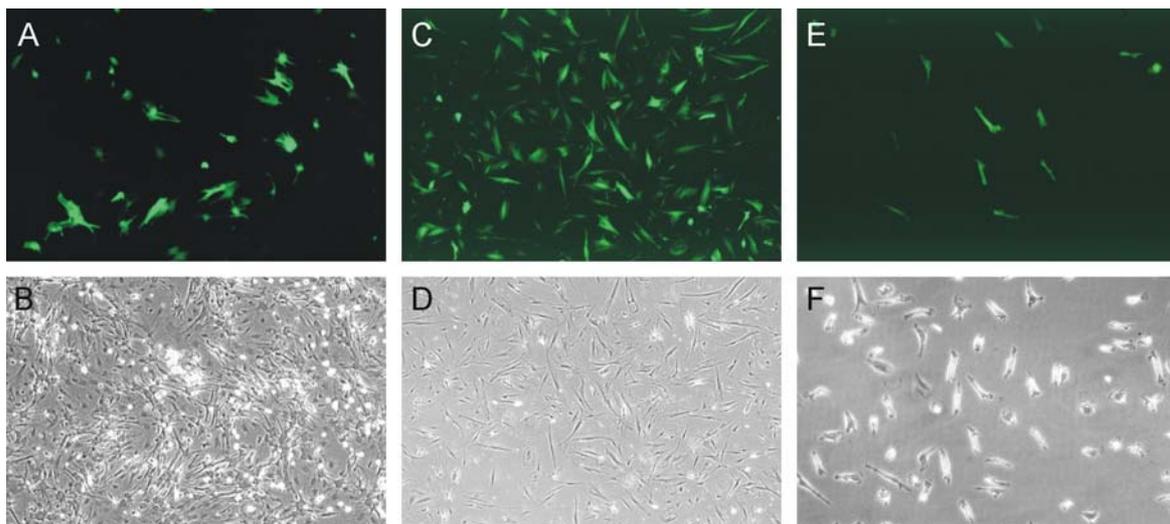


Abbildung 3.4 Lentivirale Transduktion der Zielzellen NRCM, MSC und EPC

Neonatale Rattenkardiomyozyten (A, B), MSCs (C, D) und humane EPCs (E, F) wurden mit dem Lentivirus LentiShuttle CMV hrGFP WPRE mit einer MOI von 5-10 transduziert, die Zellen wurden nach 3-5 Tagen am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Originalvergrößerung A-D 100x, E, F 200x.

Für alle Zielzellen zeigte die Auswertung der Transduktion mit dem Fluoreszenzmikroskop eine deutliche hrGFP-Expression, in alle untersuchten Zelltypen lassen sich also mithilfe lentiviraler Vektoren Transgene einbringen und exprimieren. Es stellte sich weiterhin heraus, dass nach 3 Tagen die GFP-Expression in den Kardiomyozyten eher schwach war, erst an Tag 5 wurde die maximale Expressionshöhe erreicht.

Für neonatale Rattenkardiomyozyten und MSCs der Ratte wurde zusätzlich die Höhe der Reporterexpression für eine Reihe von lentiviralen Vektoren untersucht. Dazu wurden die Zellen mit einer MOI von 5 transduziert, die Auswertung der Expressionshöhe des jeweiligen Reportergens erfolgte nach 5 Tagen im Durchflusszytometer.

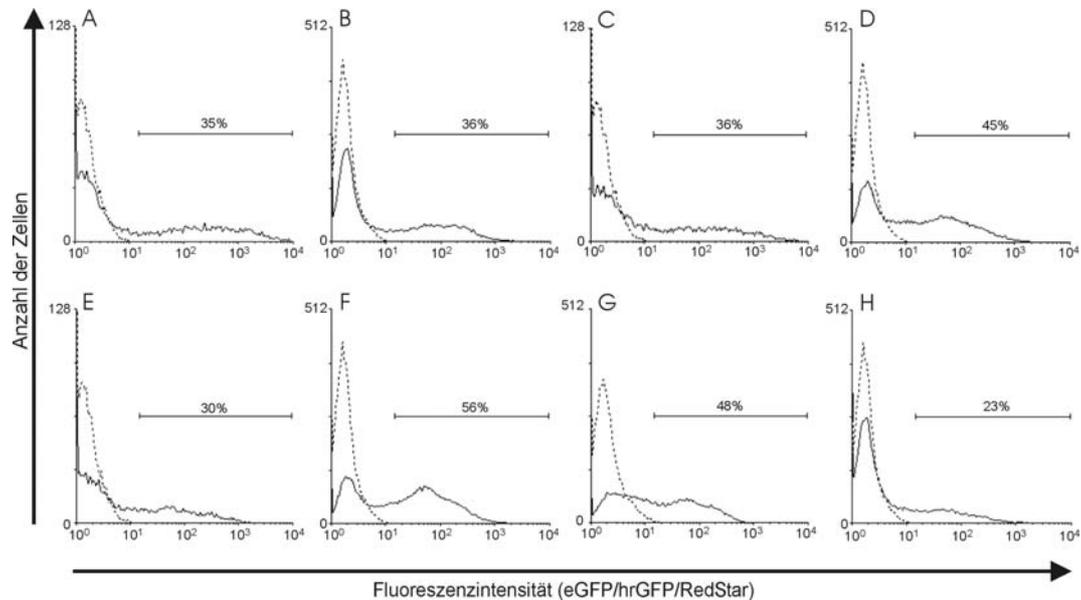


Abbildung 3.5 Expressionshöhe in NRCMs und MSCs

Durchflusszytometrische Untersuchung der Expressionshöhe in NRCMs (A, C, E) und Ratten-MSCs (B, D, F, G, H), transduziert mit den Vektoren pHR'SINcPPT-CEW (A, B) sowie pLentiShuttle SFFV hrGFP WPRE (C, D), pLentiShuttle PGK hrGFP WPRE (E, F), pLentiShuttle CMV RedStar WPRE (G) und pLentiShuttle CMV hrGFP WPRE (H), alle als durchgehende Linie. Gestrichelte Linie: Hintergrundfluoreszenz nicht-transduzierter Zellen. In jedem Histogramm ist der Prozentsatz der Transgen-positiven Zellen angegeben.

In der durchflusszytometrischen Analyse transduzierter Kardiomyozyten und rMSCs zeigten sich vergleichbare Expressionshöhen für Viren konventioneller und von pLentiShuttle abgeleiteter lentiviraler Vektoren. Bei einer MOI von 5 lag die Effizienz der Transduktion in den rMSCs mit durchschnittlich 42 % Transgen-positiven Zellen etwas höher als in den Kardiomyozyten mit 34 %.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass sich mit lentiviralen Transfervektoren, die mithilfe des pLentiShuttle-Systems kloniert wurden, vergleichbare Titer von lentiviralen Partikeln erzielen ließen wie bei konventionellen lentiviralen Vektoren, nach Transduktion verschiedener Zielzellen ergaben sich außerdem vergleichbare Expressionshöhen von verschiedenen Reportergenen. Ein negativer Einfluss durch die eingefügten Sequenzen wurde nicht festgestellt, dabei wurde die Klonierung neuer lentiviraler Vektoren durch die Verwendung des Shuttle-Systems stark vereinfacht.

Zusätzlich wurde mit dem Konstrukt pLentiShuttle CMV RedStar WPRE erstmals ein rot fluoreszierendes Reporter-gen erfolgreich in einen rekombinanten Lentivirus integriert, woraus sich die Möglichkeit einer Mehrfarben-Reporter-gen-Analyse durch stabil in die Zielzellen integrierte lentivirale Konstrukte ergibt.

Das auf Funktionalität überprüfte LentiShuttle-System wurde anschließend für die Generierung von lentiviralen Vektoren zur Detektion kardialer Differenzierung eingesetzt.

3.2 Lentivirale Vektoren zur Detektion kardialer Differenzierung

3.2.1 Durch kardiale Promotoren vermittelte lentivirale hrGFP-Expression

Lentiviren zur Expression von hrGFP unter der Kontrolle kardialer Promotoren huANFp, huMLC2vp, $\mu\alpha$ -MHCp und huCAp wurden durch Transduktion von neonatalen Rattenkardiomyozyten getestet, da humane Kardiomyozyten bisher nicht zur Verfügung standen. Bei Präparationen von NRCMs handelt es sich nicht um reine Kardiomyozyten, das Herzgewebe enthält auch Fibroblasten, die bei der Kardiomyozyten-Isolierung mit aufgereinigt werden. Während der Kultur proliferieren die Fibroblasten im Gegensatz zu den Kardiomyozyten bis sie bei vollständiger Konfluenz im Kulturgefäß durch Zell-Zell-Kontakt in ihrem Wachstum inhibiert werden. Der Kardiomyozytenanteil wurde nach Färbung der Zellen mit einem herzspezifischen α -Aktinin-Antikörper im Durchflusszytometer bestimmt, direkt nach der Isolierung beträgt er 60-70% (Daten nicht gezeigt) und nimmt dann wegen der wachsenden Anzahl an Fibroblasten ab. Da das Herzgewebe auch Blutgefäße enthält, ist nicht auszuschließen, dass sich in den Präparationen auch ein geringer Anteil an Endothelzellen und glatten Muskelzellen befinden könnte.

Präparationen von Kardiomyozyten wurden nach zwei Tagen in Kultur in adhärentem Zustand mit Lentiviren zur Expression von hrGFP unter der Kontrolle der verschiedenen kardialen Promotoren sowie als Positivkontrolle mit LentiShuttle CMVp hrGFP WPRE transduziert. Um zu untersuchen, ob sich die LentiShuttle-vermittelte hrGFP-Expression tatsächlich auf Kardiomyozyten beschränkt, wurden die Zellen nach weiteren 5 Tagen in Kultur fixiert und mit einem anti- α -Aktinin-Antikörper und einem Cy3-markierten Sekundärantikörper immunhistologisch angefärbt.

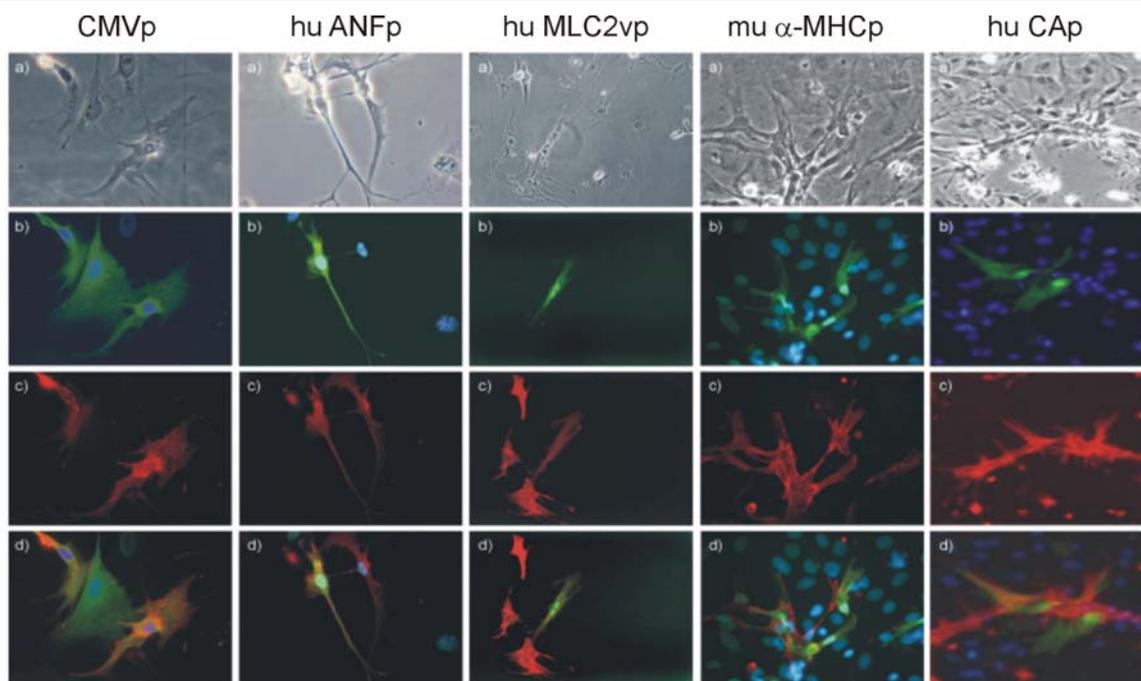


Abbildung 3.6 Kardiomyozyten-spezifische GFP-Expression in NRCMs

NRCMs lentiviral transduziert mit hrGFP WPRE unter der Kontrolle der Promotoren CMVp, hu ANFp, hu MLC2vp, mu α -MHCp und hu CAP. a) Phasenkontrast-Aufnahme; b) GFP (grün) und DAPI-Kernfärbung (blau); c) Immunhistologische Färbung mit anti- α -Aktinin-Antikörper und Cy3-markiertem Sekundäntikörper (rot); d) GFP, DAPI und Cy3. Original-Vergrößerung 200x.

Für alle verwendeten Promotoren ließen sich in den Kardiomyozyten-Kulturen hrGFP-positive Zellen detektieren. Aufgrund der in den Kulturen vorhandenen Fibroblasten konnten erste Aussagen über die kardiale Spezifität der LentiShuttle-vermittelten hrGFP-Expression getroffen werden. Nach Transduktion mit LentiShuttle CMV hrGFP WPRE wurde eine GFP-Expression wie erwartet in Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten gezeigt. Die Promotoren huANFp, huMLC2vp und mu α -MHCp vermittelten dagegen ausschließlich eine Expression in den α -Aktinin-positiven Kardiomyozyten. Es wurden keine GFP-positiven / α -Aktinin-negativen Zellen detektiert. Diese wurden aber bei Verwendung des Cardiac Aktin-Promotors beobachtet, der keine ausschließlich Kardiomyozyten-spezifische hrGFP-Expression vermittelte.

Es zeigte sich auch, dass die Expression des Reportergens hrGFP in den Kardiomyozyten z.T. eher schwach war, während nur einzelne hell fluoreszierende Zellen beobachtet werden konnten. Deshalb wurden vor der weiteren Charakterisierung und Verwendung der Lentiviren mit kardialen Promotoren weitere Konstrukte generiert, bei denen die Expression durch Insertion des CMV-Enhancers (Ce) gesteigert werden sollte. Es konnte gezeigt werden, dass die Insertion des CMV-Enhancers zu einer verstärkten GFP-Expression bereits nach 3 Tagen führte, während ein Einfluss auf die Höhe der Virustiter nicht zu erkennen war.

3.2.2 Spezifität der LentiShuttle-vermittelten kardialen GFP-Expression

Die Spezifität der GFP-Expression unter der Kontrolle der verwendeten kardialen Promotoren wurde abschließend durch Transduktion von Kardiomyozyten und verschiedenen anderen Zelltypen überprüft, die Kontaminationen von Kardiomyozyten-Präparationen darstellen könnten. Kardiomyozyten-Präparationen aus Atrium und Ventrikel, Zellen der Fibroblasten-Linie rat-1, humane glatte Muskelzellen (huSMC) und humane Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC) wurden mit den einzelnen Lentiviren transduziert. Eine Auswertung der GFP-Expression erfolgte nach 5 Tagen am Fluoreszenzmikroskop. Die Höhe der beobachteten Reporter-Gen-Expression in den verschiedenen Zellen ist in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14 Spezifität der LentiShuttle-vermittelten kardialen GFP-Expression

	NRCM atrial	NRCM ventrikulär	Fibroblasten in NRCM	rat-1 Fibroblasten	huSMC	HUVEC
CMVp	+++	+++	+++	+++	+++	+++
huANFp ohne Ce	+ in wenigen Zellen	-	-	-	-	-
huANFp mit Ce	++	+ in wenigen Zellen	+ in wenigen Zellen	+ in <5% der Zellen	+ in <1% der Zellen	-
huMLC2vp ohne Ce	-	+ in wenigen Zellen	-	-	-	-
huMLC2vp mit Ce	-	++ in vielen Zellen	+ in wenigen Zellen	+ in <10% der Zellen	+ in <10% der Zellen	-
muα-MHCp ohne Ce	++ in wenigen Zellen	++	-	n.d.	n.d.	n.d.
huCAp ohne Ce	+ in wenigen Zellen	+ in wenigen Zellen	+ in wenigen Zellen	+ in <5% der Zellen	-	+ in <5% der Zellen
huCAp mit Ce	++	++	++	++ in >75% der Zellen	+ in >30% der Zellen	+ in >75% der Zellen

Die Reporter-Gen-Expression in den einzelnen Zelltypen wurde 5 Tage nach der Transduktion im Fluoreszenzmikroskop bewertet, die NRCM-Präparationen wurden dazu mit einem anti-sarcomeric α -Aktinin-Antikörper und einem Cy3-markiertem Sekundärantikörper gefärbt. Expressionshöhen: +++ sehr hoch, ++ hoch, + niedrig, - negativ, n.d. nicht durchgeführt.

Die Spezifität der kardialen Promotoren ANFp und MLC2vp wurde durch den CMV-Enhancer nur in geringem Ausmaß beeinflusst, es zeigten nun auch einige Nicht-Kardiomyozyten eine GFP-Expression, diese war aber deutlich schwächer als die durch den CMV-Enhancer verstärkte Expression in Kardiomyozyten. Die Spezifität der GFP-Expression unter der Kontrolle des murinen α -MHC-Promotors wurde noch nicht vollständig untersucht, für das verwendete Fragment des Cardiac Aktin-Promotor steht dagegen bereits fest, dass es keine spezifische kardiale Expression vermittelt.

Mit den im Rahmen der Dissertation mithilfe des LentiShuttle-Systems entwickelten Vektoren zur Expression von hrGFP unter der Kontrolle der Promotoren ANFp und MLC2vp konnte damit zum ersten Mal mithilfe von Lentiviren eine ausreichend starke gewebespezifische Expression eines Reportergens erzielt werden. Aufgrund des akzeptablen Hintergrunds in nicht-kardialen Zellen sollte mit ihnen auch eine Selektion von kardial differenzierten Stammzellen möglich sein.

3.3 Lentivirale Vektoren zur Induktion kardialer Differenzierung

3.3.1 LentiShuttle-vermittelte Expression von GATA4 und Nkx2.5

Neben der Verwendung lentiviraler Vektoren für eine gewebespezifische Reportergen-Expression, gibt es weitere Anwendungsmöglichkeiten wie die stabile Überexpression von Proteinen in Säugerzellen. Eine solche Überexpression von kardialen Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Stammzellen könnte möglicherweise ihre kardiale Differenzierung induzieren oder unterstützen. Hierfür wurden ebenfalls geeignete lentivirale Transfervektoren auf der Grundlage des pLentiShuttle-Systems generiert.

Die generierten Lentiviren zur Expression von GATA4 und Nkx2.5 wurden durch Transduktion von mesenchymalen Stammzellen der Ratte (rMSC) getestet. Die Zellen wurden mit je 1 ml virushaltigem Überstand von LentiShuttle CMV GATA4 und LentiShuttle CMV Nkx2.5 sowie LentiShuttle CMV hrGFP WPRE als Positivkontrolle transduziert. Nach 4 Tagen war für die Positivkontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop eine deutliche GFP-Expression zu erkennen (ohne Abbildung). Nach 20 Tagen in Kultur wurde die Gesamt-RNA der Zellen isoliert, DNase-behandelt und in cDNA umgeschrieben. Diese wurde mittels RT-PCR auf eine Expression von GATA4 und Nkx2.5 in den rMSCs untersucht. Dabei wurden Primer verwendet, die spezie-spezifisch ausschließlich die Expression der humanen Formen von GATA4 und Nkx2.5 detektieren, während die entsprechende Sequenz der Ratte kein Signal ergibt.

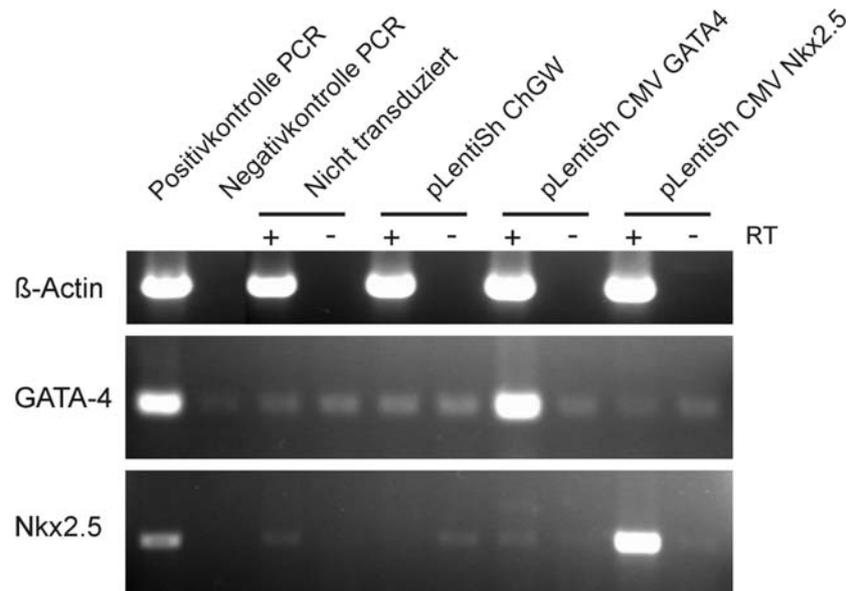


Abbildung 3.7 LentiShuttle-vermittelte Expression von GATA4 und Nkx2.5 in rMSCs

RT-PCR von cDNAs aus rMSC, 20 Tage nach Transduktion mit den angegebenen Vektoren. Produktgrößen: humanes β -actin 254 bp (für cDNA, 348 bp für genomische DNA), humanes GATA-4 188 bp, humanes Nkx2.5 168 bp, beide für cDNA und genomische DNA. Positivkontrolle: cDNA aus humanem Herzgewebe. Negativkontrolle: H₂O. Kontaminationen in den Negativkontrollen und einigen Ansätzen vermutlich durch PCR-Produkte.

Die Analyse RT-PCR zeigte durch deutliche β -Actin-Banden für alle Proben eine intakte cDNA, und damit auch mRNA zum Zeitpunkt der reversen Transkription. Auch wenn die Kontrollansätze vermutlich aufgrund von Kontaminationen mit PCR-Produkten z.T. ebenfalls schwache Banden zeigten, konnte für die mit LentiShuttle CMV GATA4 transduzierten rMSCs eine deutliche Expression von humanem GATA4 nachgewiesen werden, sowie für die mit LentiShuttle CMV Nkx2.5 transduzierten rMSCs eine deutliche Expression von humanem Nkx2.5.

Damit wurde gezeigt, dass LentiShuttle-Konstrukte, deren Expressionskassetten die Sequenzen für humanes GATA4 und Nkx2.5 unter der Kontrolle des CMV-Promotors enthalten, zumindest für die Bildung der entsprechenden RNAs funktionell sind und für weitere Versuche zur Überexpression der kardialen Transkriptionsfaktoren eingesetzt werden können.

3.4 Übertragung replikationsdefizienter Lentiviren durch transduzierte Zellen

3.4.1 Risiko der Übertragung replikationsdefizienter Lentiviren *in vivo*

Lentivirale Vektoren bieten sich für einen effizienten Gentransfer *in vitro* und *in vivo* an. Sie können klinisch für eine *ex vivo* Gentherapie genutzt werden, zum anderen aber auch experimentell zur Markierung von Zellen. Eine Anwendung ist dabei die Markierung von Stammzellen vor einer Transplantation zur Untersuchung einer anschließenden potentiellen Differenzierung dieser Zellen *in vivo*.

Im Rahmen von Untersuchungen zur Regeneration von geschädigtem Herzgewebe wurden innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Ulrike Blömer und Herrn Hendrik Witschel frisch transduzierte neonatale Rattenkardiomyozyten in Rattenherzen transplantiert. In Kontrollansätzen wurden auch in einen Hinterlauf-Muskel bzw. das Gehirn von Ratten lentiviral markierte Zellen injiziert, die zuvor zweimal gewaschen worden waren. Nach Transplantation zeigte sich, anders als erwartet, nicht nur in den transplantierten Zellen eine GFP-Expression, sondern auch in anliegenden Skelettmuskelfasern und neuronalen bzw. Glia-Zellen [180]. Im Gegensatz dazu führte die Transplantation stabil GFP-exprimierender Fibroblasten nicht zu einer Expression in benachbarten Zellen.

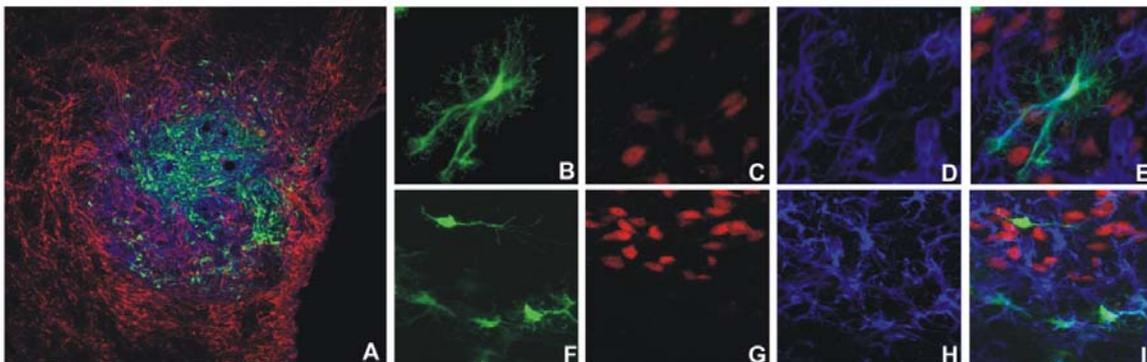


Abbildung 3.8 Transplantation transduzierter NRCM in das ZNS

Frisch transduzierte NRCMs (grün) wurden zweimal gewaschen und in das ZNS der Ratte transplantiert. Die Zellen integrierten in das Gewebe (A), auch Nervenzellen des Empfängers erwiesen sich als GFP-positiv (B, F). NeuN wurde als Marker für terminal differenzierte Neuronen verwendet (rot, C, E, G, I); GFAP färbt spezifisch Astrozyten (blau, D, E, H, I). Aus [180].

Theoretisch können für diesen Effekt eine Reihe von Mechanismen wie z.B. eine in diesem Fall eher unwahrscheinliche Zelldifferenzierung oder eine Fusion von Zellen verantwortlich sein. Außerdem könnten transduzierten Zellen möglicherweise als Folge von Rekombinationen der verwendeten Plasmide replikationskompetente Viren gebildet haben und nach Transplantation freisetzen. Deshalb wurden die Zellkultur-Überstände von Rat-1

Fibroblasten 5 Passagen nach Transduktion in einem p24-Assay untersucht. Replikationskompetente Viren werden dabei in einem ELISA-Test aufgrund ihres HIV-p24-Proteins detektiert. Der Assay mit einer Nachweisgrenze von 15 pg zeigte für die verwendeten Viruspräparationen ein negatives Ergebnis und schloss die Bildung replikationskompetenter Viren in den transduzierten Zellen aus. Der p24-Assay wurde freundlicherweise von Frau Patricia Schult-Dietrich vom Georg-Speyer-Haus in Frankfurt durchgeführt.

Als weitere Möglichkeit kommt auch eine Übertragung von viralen Partikeln zusammen mit den frisch transduzierten Zellen in Betracht. Diese Übertragung könnte zu einer unerwünschten Transduktion von Empfängerzellen *in vivo* führen und kann prinzipiell nicht ausgeschlossen werden, obwohl die Zellen nach der lentiviralen Transduktion zweimal gewaschen wurden.

Um zu klären, welche der oben genannten Mechanismen für die beobachteten Effekte verantwortlich sind, wurden als Ergänzung zu den *in vivo* Versuchen von Prof. Dr. Ulrike Blömer und Herrn Hendrik Witschel im Rahmen der vorliegenden Dissertation weitergehende *in vitro* Untersuchungen einer Übertragung von Lentiviren durch transduzierte Zellen durchgeführt.

3.4.2 Risiko der Übertragung replikationsdefizienter Lentiviren *in vitro*

Es sollte in *in vitro* Untersuchungen der Übertragung von Lentiviren zum einen geklärt werden, ob Kardiomyozyten nach der Transduktion tatsächlich lentivirale Partikel abgeben, die andere Zellen transduzieren können. Zum anderen sollte untersucht werden, wie sich die weitere Behandlung der transduzierten Zellen, z.B. die Anzahl der nach der Transduktion durchgeführten Waschschriffe, auf die Anzahl der übertragenen Viren auswirkt.

Zu diesem Zweck wurden frisch transduzierte neonatale Rattenkardiomyozyten einer unterschiedlichen Anzahl von Waschschriffen unterzogen und anschließend mit HEK293T-Zellen in einem Transwell-System kokultiviert. Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden mit dem Vektor pHR'SINcPPT-CEW bei einer MOI von 7 für 5 h bei 37°C lentiviral transduziert. Anschließend wurde der virushaltige Überstand durch Zentrifugation von den Zellen abgetrennt, die Zellen wurden mehrfach durch Resuspendieren in PBS und erneutes Zentrifugieren gewaschen. Nach bis zu 6 Waschschriffen waren die transduzierten Kardiomyozyten vital, nach dem Waschen direkt ausgesät, zeigten sie in Kultur spontane Kontraktionen (nicht gezeigt).

Die frisch transduzierten Zellen wurden anschließend in die obere Kammer eines Transwell-Einsatzes gegeben, der auf kultivierte HEK293T-Zellen gesetzt wurde. Noch in der Zellsuspension existierende infektiöse Viren können so durch die Membran des Transwell-Einsatzes in das untere Kompartiment gelangen, ohne dass ein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen Kardiomyozyten und HEK293T-Zellen stattfindet. Nach 24 h Kokultivierung wurden die Transwell-Einsätze entfernt, nach 5 Tagen weiterer Kultivierung wurden die HEK293T-Zellen im Fluoreszenzmikroskop auf eine GFP-Expression untersucht.



Abbildung 3.9 Virusübertragung durch transduzierte NRCMs *in vitro*

Im Transwell-System mit frisch transduzierten NRCMs kokultivierte HEK293T-Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop untersucht. A) HEK293T-Zellen nach Kokultur mit nicht gewaschenen NRCMs; B) mit 1 x gewaschenen NRCMs; C) mit 6 x gewaschenen NRCMs. Originalvergrößerung 100x. Aus [180].

Zur Quantifizierung der transduzierten HEK293T-Zellen wurden die Zellen zusätzlich im Durchflusszytometer untersucht.

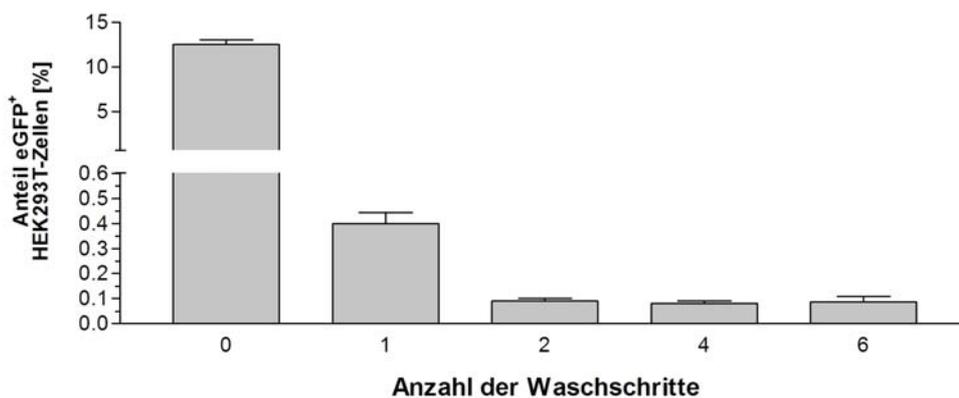


Abbildung 3.10 Quantifizierung der Virusübertragung durch transduzierte NRCMs

Als Maß für die Virusübertragung wurde der Anteil der eGFP⁺-HEK293T-Zellen nach Kokultur mit frisch transduzierten NRCMs im Durchflusszytometer bestimmt. Angegeben ist die Anzahl der Waschschrte, denen die NRCMs vor Kokultivierung unterzogen wurden. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 3 Ansätzen dar. Aus [180].

Bei der Verwendung von nicht gewaschenen NRCMs wurden nach 5 Tagen $12,55\% \pm 0,48\%$ GFP-positive transduzierte HEK293T-Zellen beobachtet. Ein Waschschrift verminderte den Titer kontaminierender lentiviraler Vektorpartikel signifikant, so dass noch $0,4\% \pm 0,04\%$ GFP-positive transduzierten HEK293T-Zellen detektiert wurden. Auch nach 6 Waschschriften konnte ein geringer Titer kontaminierender lentiviraler Vektorpartikel festgestellt werden, der zu einem Anteil von $0,09\% \pm 0,02\%$ GFP-positive HEK293T-Zellen führte.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob es sich bei der gezeigten Virusübertragung um einen Kardiomyozyten-spezifischen Effekt handelt. Dazu wurde ein vergleichender Versuch mit frisch transduzierte Kardiomyozyten und frisch transduzierten Rat-1 Fibroblasten durchgeführt. Der Anteil GFP-positiver transduzierter HEK293T-Zellen wurde wieder nach 5 Tagen im Durchflusszytometer bestimmt.

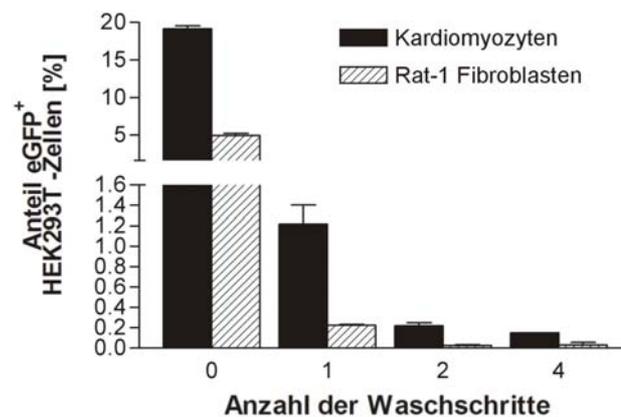


Abbildung 3.11 Vergleich der Virusübertragung durch NRCM und Rat-1

Als Maß für die Virusübertragung wurde der Anteil der eGFP⁺-HEK293T-Zellen nach Kokultur mit frisch transduzierten NRCMs bzw. Rat-1 Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Angegeben ist die Anzahl der Waschschriffe, denen die Zellen vor Kokultivierung unterzogen wurden. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 2 Ansätzen dar. Aus [180].

Obwohl bei der Verwendung von frisch transduzierten Rat-1 Fibroblasten nach dem Waschen geringere Mengen lentiviraler Vektorpartikel verblieben als bei Kardiomyozyten, wurden für beide Zelltypen Kontaminationen mit infektiösen Vektorpartikeln festgestellt. Nach 4 Waschriffen führten diese im Fall der Kardiomyozyten zu $0,15\%$ GFP-positiven HEK293T-Zellen, für die Rat-1 Fibroblasten zu $0,03\%$ GFP-positiven HEK293T-Zellen, daher kann die gezeigte Virusübertragung nicht als Kardiomyozyten-spezifischer Effekt angesehen werden. Bei der Verwendung stabil transduzierter Rat-1 Fibroblasten für die Transwell-Kokultur, konnte anschließend für die HEK293T-Zellen keine GFP-Expression festgestellt werden.

In einer Verlaufsstudie wurde durch zusätzliche Inkubation der Zellen nach der Transduktion untersucht, ob sich die Zahl der an den transduzierten Zellen anhaftenden Viren durch weitere Fusion vermindert. Ein Teil der Zellen wurde nach der Transduktion und den verschiedenen häufigen Waschschritten zunächst für weitere 3 oder 9 h unter Transduktionsbedingungen inkubiert und erst dann in die Transwell-Einsätze gegeben. Der Anteil GFP-positiver transduzierter HEK293T-Zellen wurde wieder nach 5 Tagen im Durchflusszytometer bestimmt.

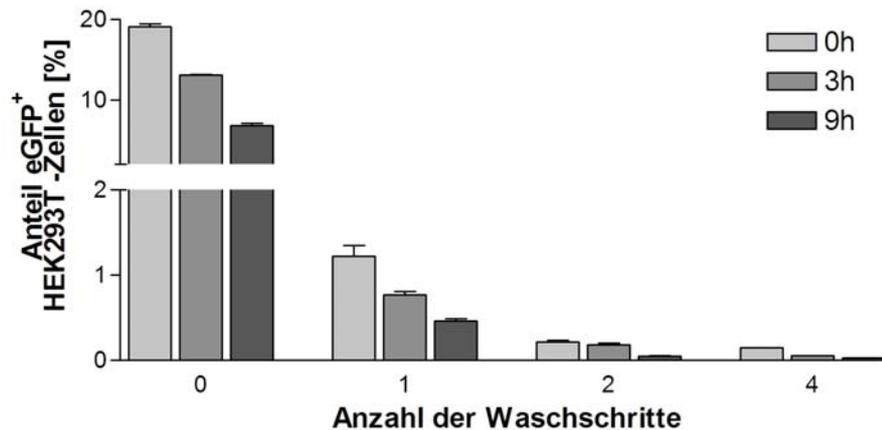


Abbildung 3.12 Abnahme der Virusübertragung durch verlängerte Inkubation

Als Maß für die Virusübertragung wurde der Anteil der eGFP⁺-HEK293T-Zellen nach Kokultur mit frisch transduzierten NRCMs im Durchflusszytometer bestimmt. Angegeben ist die Anzahl der Waschschr. den die Zellen vor Kokultivierung unterzogen wurden. Die Zellen wurden nach dem Waschen für weitere 0, 3 oder 9 Stunden inkubiert. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 2 Ansätzen dar. Aus [180].

Zusätzliche Inkubation nach der Transduktion und dem Waschen führte zu einer deutlich verminderten Anzahl kontaminierender lentiviraler Partikel auf durchschnittliche $68,4\% \pm 0,96\%$ nach 3 h, bzw. $35,9\% \pm 1,95\%$ nach 9 h. Allerdings waren selbst nach 4 Waschschr. und 9 h zusätzlicher Inkubation bei 37°C noch deutlich messbare 0,03% infektiöse kontaminierende virale Partikel nachweisbar.

Abschließend wurde untersucht, ob tatsächlich eine weitere Aufnahme der Partikel in transduzierte Zellen oder ein anderer Mechanismus für die Reduktion der Anzahl lentiviraler Partikel verantwortlich sein könnte. Dazu wurden Lentiviren unter zellfreien, ansonsten identischen Bedingungen, ebenfalls für weitere 0, 3 bzw. 9 h, zusätzlich zu einer angenommenen Dauer der Transduktion von 5 h, inkubiert und anschließend für eine Transduktion von HEK293T-Zellen eingesetzt. Die Virusmenge wurde dabei so gewählt, dass bei 100% intakten Viruspartikeln eine MOI von 0,5 bei der Transduktion eingesetzt wurde.

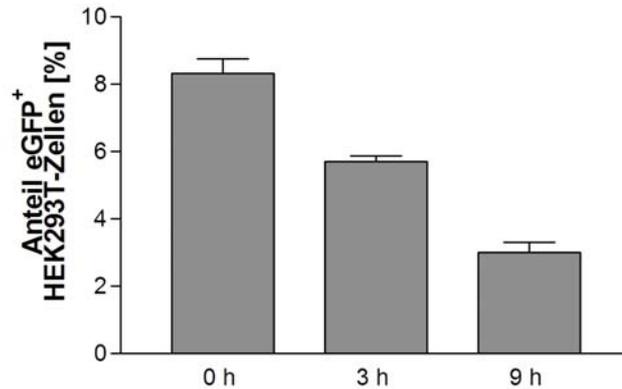


Abbildung 3.13 Abnahme der Titer infektiöser Viren durch verlängerte Inkubation

Lentiviren wurden für 5h + 0h, 5h + 3h bzw. 5h + 9h unter Transduktionsbedingungen in einem zellfreien Ansatz inkubiert und in einer MOI von 0,5 zur Transduktion von HEK293T-Zellen eingesetzt. Gezeigt ist der im Durchflusszytometer bestimmte Anteil eGFP^{pos}-HEK293T-Zellen nach 5 Tagen. Aus [180].

Es zeigte sich, dass die Virustiter nach weiterer Inkubation für 3h bzw. 9 h bei 37°C auf einen Wert von 68,4% ± 2,13% bzw. 36,0% ± 3,59% reduziert wurden. Dabei entsprach die Abnahme in einem zellfreien Milieu sehr genau der Abnahme lentiviraler Partikel bei weiterer Inkubation zusammen mit Zielzellen für eine Transduktion, so dass eine weitere Aufnahme der Partikel in transduzierte Zellen nicht der entscheidende Faktor für die verminderten Mengen an Lentiviren sein kann. Stattdessen scheint die Infektiosität der Viren bei Inkubation in Zellkulturmedium bei 37°C stark abzunehmen.

Frisch transduzierte Zellen können damit also eine Quelle für die Übertragung kontaminierender virale Partikel sein, die sich bei den im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen auch durch intensives Waschen nicht vollständig entfernen ließen [180]. Das Risiko einer solchen Virus-Übertragung wurde in bisherigen Studien, in denen frisch transduzierte Zellen verwendet wurden, nur ungenügend berücksichtigt, obwohl eine solche Übertragung einen großen Einfluss auf die erhaltenen Ergebnisse und auch auf die gentechnische Sicherheit bei solchen Versuchen haben kann.

3.5 Versuche zur kardialen Differenzierung von EPCs

Die erstmals 2003 von Badorff et al. beschriebene Differenzierung humaner Endothelvorläuferzellen (EPCs) in funktionelle Kardiomyozyten nach Kokultivierung mit neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRCMs) [67] wurde bisher nicht von anderen Arbeitsgruppen reproduziert. Das Differenzierungspotential der EPCs in solchen Kokulturen und ihr möglicher Beitrag zu einer Regeneration von geschädigtem Herzgewebe sind daher bisher nicht geklärt und wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation näher untersucht. Kokulturen von EPCs und Kardiomyozyten wurden durchgeführt und mithilfe verschiedener zell- und molekularbiologischer Methoden in Hinblick auf eine kardiale Differenzierung der EPCs analysiert. Dabei sollten die verwendeten Methoden detailliertere Aussagen über die Vorgänge innerhalb der Kokulturen ermöglichen als die bisher veröffentlichten Daten.

Humane EPCs aus dem peripheren Blut freiwilliger Spender wurden isoliert, über einen Biocoll-Gradienten aufgereinigt und in beschichteten „CultureSlides“ kultiviert. Nach drei Tagen wurden die nicht adhärenen Zellen entfernt, die EPCs mit dem Farbstoff Vybrant CM-Dil oder Dil-konjugiertem AcLDL markiert und frisch isolierte neonatale Rattenkardiomyozyten zugegeben. Zusammen wurden die Zellen weitere 5-10 Tage kokultiviert und anschließend analysiert. In Kontrollansätzen wurden EPCs bzw. Kardiomyozyten einzeln unter gleichen Bedingungen wie in den Kokulturen kultiviert.

3.5.1 Charakterisierung der Zellen vor der Kokultur

Wie von Badorff et al. beschrieben, wurden EPCs aus humanem Blut isoliert und kultiviert [67,173]. Nach drei Tagen, der typischen Zeitspanne vor der Kokultivierung, wurden die Zellen mit Dil-konjugiertem AcLDL inkubiert, das von Endothelzellen, aber auch von Monozyten / Makrophagen aufgenommen wird [70]. Zusätzlich wurden die Zellen nach Paraformaldehyd-Fixierung mit dem FITC-gekoppelten Lektin UEA-1 gegengefärbt, dieses Lektin wird u.a. benutzt, um Endothelzellen (UEA-1^{pos}) von Fibroblasten (UEA-1^{neg}) zu unterscheiden [181,182].

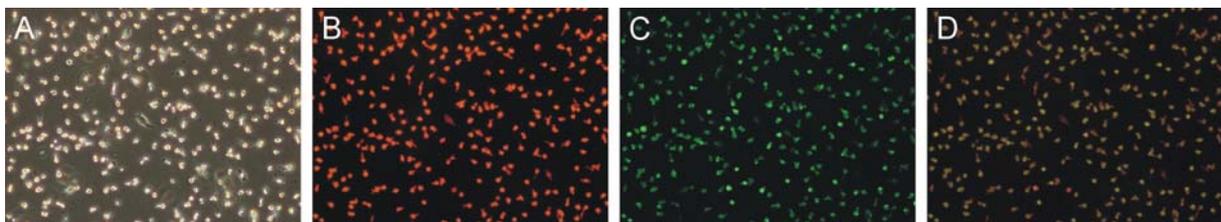


Abbildung 3.14 Charakterisierung der EPCs

Isolierte EPCs wurden in Endothelzellmedium für 3 Tage kultiviert (A), mit Dil-assoziiertem AcLDL inkubiert (B, rot) und mit UEA-1-FITC gefärbt (C, grün); übereinandergelegte Bilder (D). Originalvergrößerung 100x.

Es zeigte sich, dass nahezu 100% der Zellen Dil-assoziiertes AcLDL aufgenommen hatten und gleichzeitig mit dem FITC-gekoppelten Lektin UEA-1 angefärbt werden konnten. Damit entsprechen die isolierten Zellen dem beschriebenen Phänotyp [173]. Allerdings handelt es sich bei der Mehrheit der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut, die sich nach der Isolierung in Zellkultur anfangs an Plastikoberflächen anheften, um Monozyten / Makrophagen [183], die ebenfalls DilAcLDL^{pos} / UEA-1^{pos} sind [70,184]. Trotz des monozytären / makrophagen-ähnlichen Phänotyps der großen Mehrzahl der Zellen werden die in den Versuchen verwendeten Zellen in der Dissertation der Einfachheit halber weiterhin als „EPC“-Präparationen bezeichnet.

Die Rattenkardiomyozyten wurden aus den Herzen neonataler Ratten (maximal 1 Tag alt) durch enzymatischen Verdau und mechanische Dissoziation des Gewebes isoliert. Die gewonnenen Einzelzellen adhärirten nach 1-2 Tagen in Kultur und kontrahierten spontan. Direkt nach der Isolierung und nach 2 Tagen lag der im Durchflusszytometer nach Färbung gegen sarkomerisches α -Aktinin bestimmte Kardiomyozytenanteil in den Kulturen bei > 67%. Bei den < 33% kontaminierenden Zellen handelt es sich hauptsächlich um Fibroblasten, die immunhistologisch mit einem Antikörper gegen Prolyl4-hydroxylase (Acris, Himmelreich) nachgewiesen wurden (ohne Abbildung).

3.5.2 Morphologie der Kokulturen von EPCs und NRCMs

In den durchgeführten Kokulturen sowie den Kontrollansätzen mit getrennt kultivierten EPCs und Kardiomyozyten wurde nach 6 Tagen zunächst die Morphologie der eingesetzten Zellen untersucht, die markierten EPCs wurden dabei im Fluoreszenzmikroskop anhand der Dil-Markierung identifiziert.

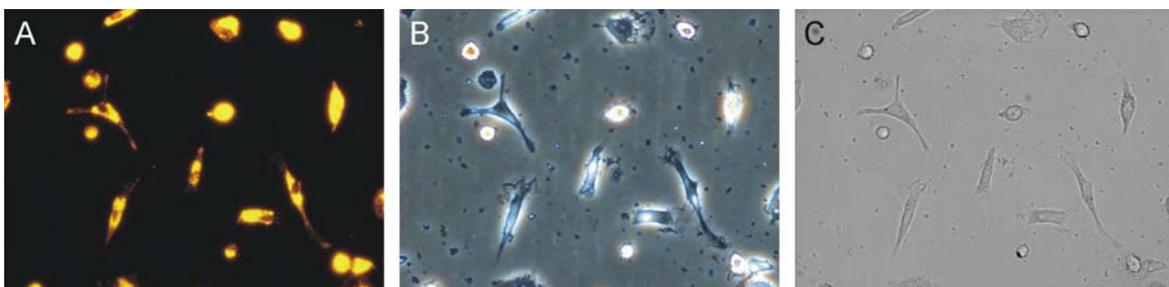


Abbildung 3.15 Morphologie der markierten EPCs

Dil-markierte EPCs nach 6 Tagen Kultur, A: Fluoreszenz-Aufnahme, B: Phasenkontrast-Aufnahme, C: Hellfeld-Aufnahme. Originalvergrößerung 200x.

Die EPCs zeigten nach insgesamt 10 Tagen Kultivierung (4 Tage in Endothelzellmedium, 6 Tage unter Kokultur-Bedingungen) eine heterogene Morphologie, ein Teil der Zellen ist rund

wie direkt nach der Isolierung, ein anderer Teil weist eine langgestreckte Form auf, die häufig spindelförmig, z.T. auch verzweigt ist. Die EPCs erscheinen in der Phasenkontrast-Aufnahme (B) häufig sehr hell und können dadurch in den Kokulturen z.T. auch ohne Markierung identifiziert werden. In der Zellkultur zeigten die EPCs keine nennenswerte Proliferation.

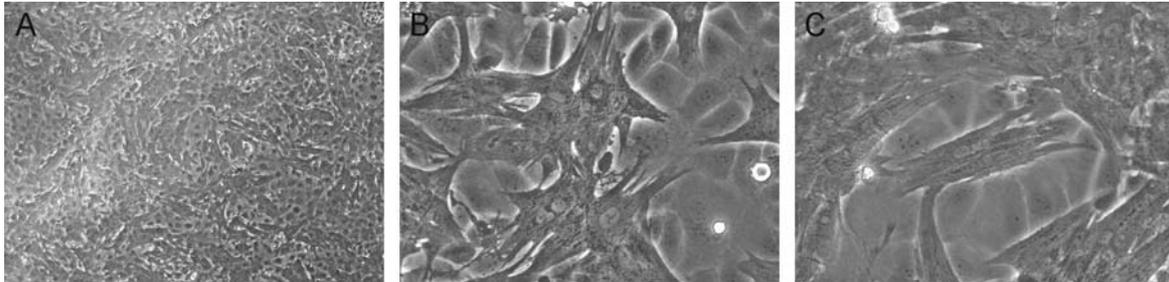


Abbildung 3.16 Morphologie der neonatalen Rattenkardiomyozyten

NRCMs nach 6 Tagen Kultur, Übersicht (A) und Detailaufnahme (B) sternförmiger Kardiomyozyten-Aggregate, einzeln liegende Zellen sind langgestreckt und quergestreift (C). Originalvergrößerung 40x (A) bzw. 200x (B, C).

Die isolierten Kardiomyozyten sind nach 6 Tagen Kultivierung unter Kokulturbedingungen in einen konfluenten Monolayer kontaminierender Fibroblasten integriert (A). Sie bilden Aggregate aus mehreren Zellen, die durch die Ausläufer der einzelnen Kardiomyozyten häufig ein sternförmiges Aussehen haben (A, B). In einigen einzeln liegenden Zellen (C, von Endothelzellen umgebene Kardiomyozyten) lassen sich bereits in der Phasenkontrast-Aufnahme kontraktile Elemente der Zellen als Querstreifen erkennen. Die Kardiomyozyten sind elektrisch gekoppelt und zeigen spontan synchrone rhythmische Kontraktionen.

Zusätzlich zu den Monokulturen von EPCs bzw. Kardiomyozyten wurde auch die Morphologie der Zellen in den Kokulturen der beiden Zelltypen nach 6 Tagen untersucht.

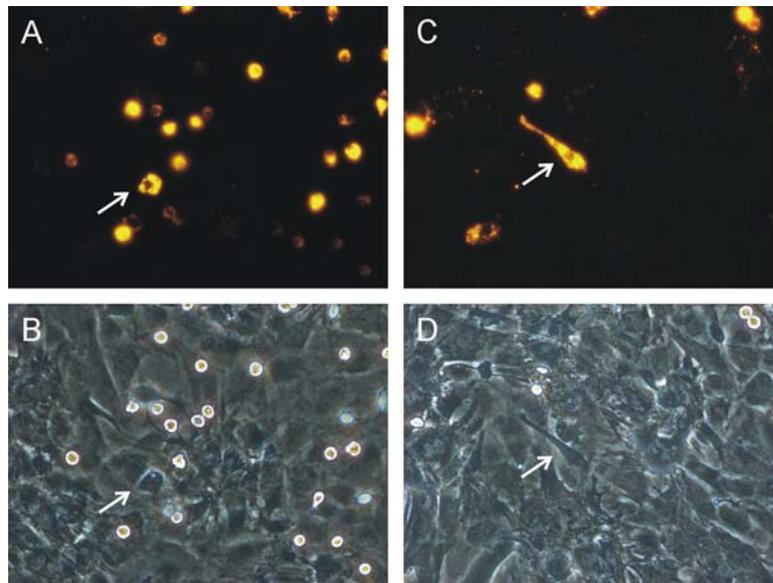


Abbildung 3.17 Morphologie der Kokulturen von EPCs und NRCMs

EPCs + NRCMs nach 6 Tagen Kokultur, Fluoreszenzaufnahmen zur Detektion der markierten EPCs (A, C), jeweils mit den entsprechenden Phasenkontrast-Aufnahmen (B, D). Pfeile markieren Beispiele für unterschiedliche Morphologien der Dil^{pos} Zellen. Originalvergrößerung 200x.

In den Kokulturen lassen sich klar Dil^{pos} Zellen erkennen, diese liegen z.T. als kleine runde, sehr helle Zellen auf den anderen Zellen auf (A, B), sie adhäreren zwar, scheinen aber nicht in den Zellverband integriert zu sein. Andere, integrierte Zellen erscheinen ebenfalls eher rund (A, B, Pfeil) oder auch langgestreckt (C, D, Pfeil) wie in den Monokulturen. In den Kokulturen wurden auch Dil-markierte Zellen beobachtet, die sich rhythmisch bewegten, allerdings schienen diese Bewegungen bei genauerer Betrachtung in den meisten Fällen auf einer mechanischen Kopplung der Zellen an kontrahierende Kardiomyozyten zu beruhen.

Um zu beurteilen, ob die morphologischen Veränderungen der Dil^{pos} EPCs in den Kokulturen wie von Badorff et al. [67] angedeutet, ein Zeichen einer kardialen Differenzierung der EPCs sein könnten, wurden diese Veränderungen sowohl in den Kokulturen als auch in EPC-Monokulturen verglichen. Zur Quantifizierung der morphologischen Veränderungen wurden die Zell-Längen und -Flächen der Dil-markierten EPCs in Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen mithilfe der Software ImageJ [185] und GraphPad Prism [186] ausgewertet. Zum Vergleich wurde ebenfalls die durchschnittliche Länge der neonatalen Rattenkardiomyozyten nach 6 Tagen Kultivierung bestimmt.

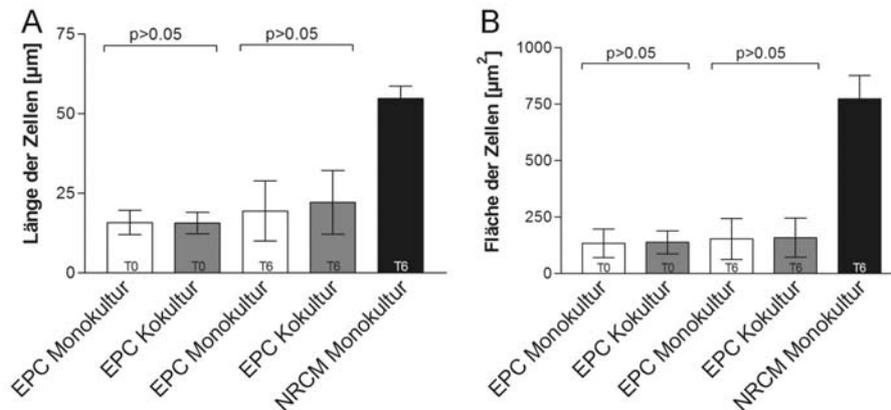


Abbildung 3.18 Morphologische Veränderungen der EPCs in Kokultur

Auswertung der Zell-Längen (A) und Zell-Fläche (B) der EPCs in Monokultur bzw. Kokultur an Tag 0 bzw. Tag 6. Zum Vergleich: NRCMs in Monokultur nach 6 Tagen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der einzelnen Messwerte.

In den Kokulturen nahm die durchschnittliche Zellgröße der EPCs von Tag 0 zu Tag 6 tatsächlich leicht zu. Allerdings wurde neben der Zunahme von Länge und Fläche in den Kokulturen auch in den Monokulturen der EPCs eine entsprechende Veränderung der Morphologie der Zellen beobachtet. Die Zellen wurden auch hier länger bzw. flacher, z.T. bildeten sich lange Zellausläufer. Es wurde gezeigt, dass die Unterschiede der Werte für Länge und Fläche der EPCs an Tag 0 und Tag 6 im Vergleich von Kokulturen und Monokulturen statistisch nicht signifikant waren (Auswertung mit Kruskal-Wallis Test inklusive Dunn's Post-Test, durch GraphPad Prism Software [186]). Die Morphologie der Kardiomyozyten in den Kulturen wurde nach Färbung mit einem Antikörper gegen sarkomerisches α -Aktinin und einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper ebenfalls mit ImageJ ausgewertet. Die für Kardiomyozyten an Tag 6 bestimmten Werte für Zell-Länge ($55 \mu \pm 11 \mu\text{m}$) und Zell-Fläche ($774 \pm 309 \mu\text{m}^2$) waren deutlich größer als für die EPCs in den Kokulturen (Länge $22 \pm 10 \mu\text{m}$; Fläche $159 \pm 87 \mu\text{m}^2$).

3.5.3 Zweidimensionale Analyse der Kokulturen

Für den Nachweis einer kardialen Differenzierung der EPCs wurden die Kokulturen nach 5 bzw. 10 Tagen immunhistologisch untersucht. Die Zellen wurden nach Paraformaldehyd-Fixierung mit Antikörpern gegen herzspezifische Proteine wie sarkomerisches α -Aktinin inkubiert, dabei wurden Cy2TM-markierte Sekundärantikörper (grün) verwendet. Bei doppelt-positiven Zellen in den Kokulturen könnte es sich dann theoretisch um humane EPCs handeln (Dil-markiert, rot), die einen kardialen Phänotyp angenommen haben (α -Aktinin^{POS}, grün). In den gefärbten und im Fluoreszenzmikroskop analysierten Kokulturen erschienen eine Reihe von Zellen zumindest teilweise doppelt positiv gefärbt, wie von Badorff et al. beschrieben [67]. Die in den Kokulturen beobachteten anscheinend oder tatsächlich doppelt

gefärbten Zellen wurden in drei Kategorien eingeteilt, für die in der Abbildung 3.19 repräsentative Bilder dargestellt sind.

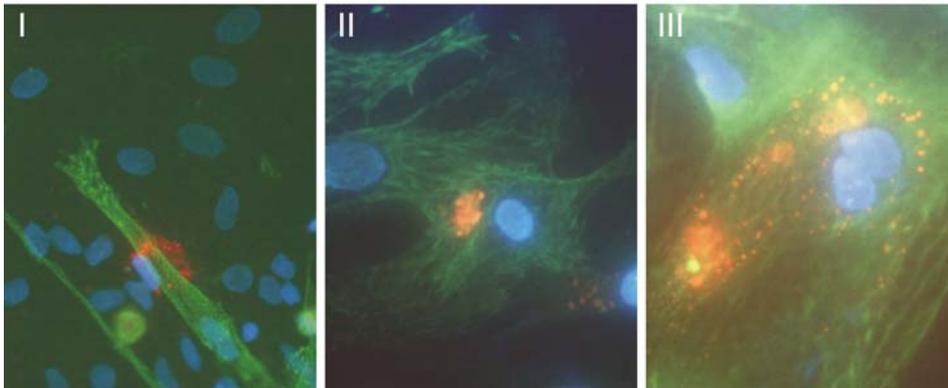


Abbildung 3.19 Kategorien I-III der doppelt-positiven Zellen in den Kokulturen

Die Kokulturen wurden an Tag 6 fixiert und mit Antikörpern gegen herzspezifische Proteine wie sarkomerisches α -Aktinin (+ Cy2TM-markiertem Sekundärantikörper, grün) gefärbt. Rot: Dil, blau: Kernfärbung mit DAPI. Die Zellen wurden nach der Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer echten Doppelfärbung in die Kategorien I-III eingeteilt. Kategorie I: es ist deutlich zu erkennen, dass zwei verschieden gefärbte Zellen übereinander liegen. Kategorie II: es kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die rote Färbung innerhalb eines Kardiomyozyten lokalisiert ist, aber möglicherweise beruht die Doppelfärbung darauf, dass Kardiomyozyten über EPCs oder EPC-Fragmente oder um diese herum gewachsen sind. Kategorie III: die Auswertung der zweidimensionalen Bilder erlaubt definitiv keine Unterscheidung zwischen doppelt-gefärbten und möglicherweise transdifferenzierten (oder mit Rattenkardiomyozyten fusionierten) EPCs einerseits und auf EPCs oder EPC-Fragmenten liegenden Kardiomyozyten andererseits.

Die Häufigkeitsverteilung, mit der Bilder der Kategorien I-III in den Kokulturen beobachtet wurden, ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15 Häufigkeitsverteilung der Kategorien I-III in den Kokulturen

Markierung der EPCs	Kategorie I	Kategorie II	Kategorie III	Summe
CM-Dil	668 (75,6%)	141 (16,0%)	75 (8,5%)	884
Dil-AcLDL	251 (59,0%)	96 (22,6%)	78 (18,4%)	425
Summe	919 (70,2%)	237 (18,1 %)	153 (11,7%)	1309

Häufigkeitsverteilung, mit der Bilder der Kategorien I-III in den Kokulturen beobachtet wurden. Kokulturen aus Dil-markierten EPCs und gefärbten Kardiomyozyten wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet, doppelt-positive Zellen wie in Abbildung 3.19 wurden in die Kategorien I-III eingeteilt und ausgezählt.

Es zeigte sich, dass für ca. 12 % der Fälle eine echte Doppelfärbung möglich erscheint, in der zweidimensionalen Analyse der Kulturen kann sie zumindest nicht ausgeschlossen werden. Ähnliche Bilder wurden nach Färbung mit weiteren herzspezifischen Antikörpern gegen sarkomerisches Myosin (MF20), Troponin T oder Titin erhalten (ohne Abbildung). Die Kokulturen zur Bestimmung der Häufigkeit von Doppelfärbungen, sowie die Einteilung der Ereignisse in den Kategorien I-III, wurden von Frau Janina Beilner im Rahmen ihrer medizinischen Dissertation durchgeführt.

3.5.4 Dreidimensionale Analyse der Kokulturen

Um zu überprüfen, ob es sich bei den im Fluoreszenzmikroskop beobachteten Ereignissen tatsächlich um doppelt-positive, möglicherweise transdifferenzierte Zellen handelt, oder ob Zellen in den Kulturen übereinander liegen, wurden zusätzliche Analysen am konfokalen Laser-Scan-Mikroskop durchgeführt, das eine dreidimensionale Darstellung der Kulturen erlaubt. Eine repräsentative Aufnahme ist in Abbildung 3.20 dargestellt.

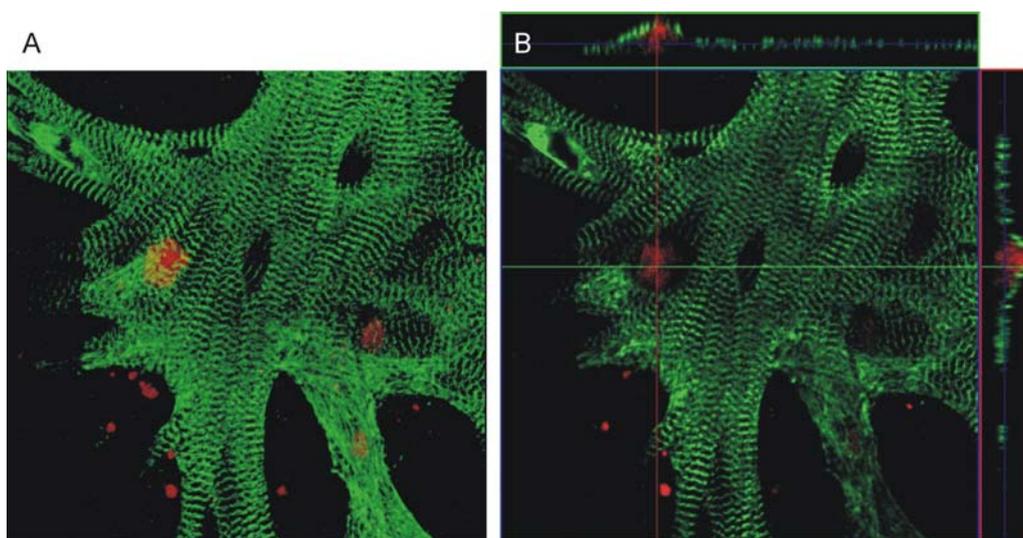


Abbildung 3.20 Dreidimensionale Analyse der Kokulturen mit Dil-EPCs

Kokulturen aus Dil-markierten EPCs (rot) und gefärbten Kardiomyozyten (anti sarkomerisches α -Aktinin + Cy2TM, grün) wurden mit dem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop ausgewertet, A: Projektion aller aufgenommenen Ebenen, B: 3D-Auswertung, oben und an der Seite Schnitte entlang der grünen bzw. roten Linie, die blaue Linie zeigt die Ebene, in der das große Bild aufgenommen wurde.

Mithilfe der dreidimensionalen Analyse konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Mehrheit der untersuchten vermeintlich doppelt positiven Zellen (A) tatsächlich um Kardiomyozyten handelte, die auf oder unter EPCs oder EPC-Fragmenten lagen bzw. um diese herumgewachsen waren. Dies wurde besonders in der durch die dreidimensionale Auswertung ermöglichten Seitenansicht der Kokulturen deutlich (B).

Für einige vermeintlich doppelt-positive Zellen war es aber aufgrund der Komplexität der erhaltenen Bilder auch mithilfe der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie nicht möglich, zwischen einer echten Doppelfärbung und damit Transdifferenzierung oder Fusion der Zellen einerseits und übereinander liegenden bzw. ineinander gewachsenen Zellen andererseits zu unterscheiden (siehe Abbildung 3.21A). Ob in diesen Fällen andere Mechanismen als eine Transdifferenzierung zur vermeintlichen Doppelfärbung führen könnten, wurde in weiteren Kokultur-Ansätzen untersucht. Dazu wurden Kardiomyozyten mit anderen Zelltypen als EPCs kokultiviert, z.B. mit der terminal differenzierten Pneumozytenzelllinie MLE-12 und der Ratten Fibroblastenlinie RAT-1 und ebenfalls im konfokalen Laser-Scan-Mikroskop ausgewertet. Repräsentative Beispiele sind in der Abbildung 3.21B dargestellt.

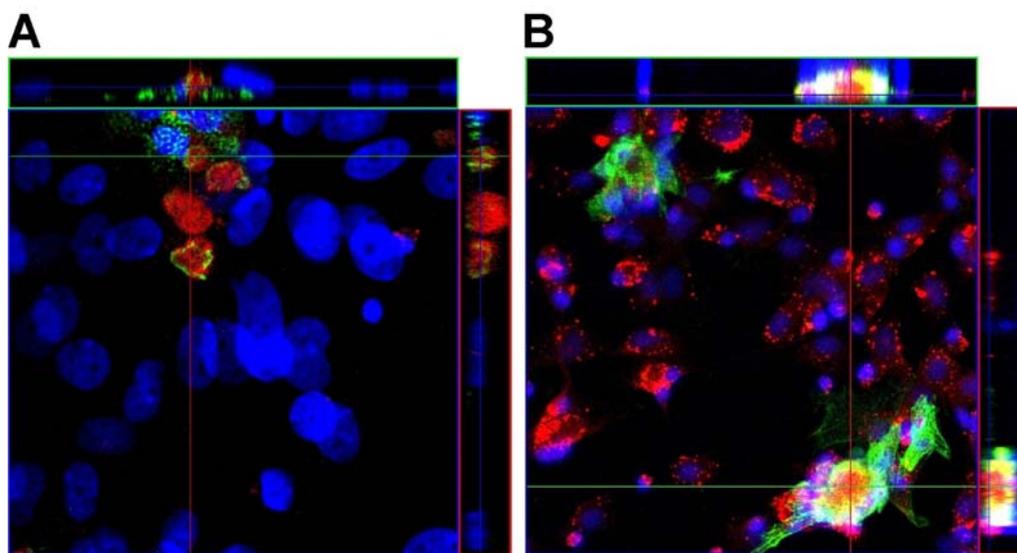


Abbildung 3.21 Dreidimensionale Analyse der Kokulturen mit Dil-EPCs bzw. Dil-MLE-12

Kokulturen aus Dil-markierten EPCs (rot) (A) bzw. MLE-12-Zellen (B) und gefärbten Kardiomyozyten (anti sarkomerisches α -Aktinin + Cy2TM, grün) wurden mit dem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop ausgewertet, bei der 3D-Auswertung, sind oben und an der Seite Schnitte entlang der grünen bzw. roten Linie zu sehen, die blaue Linie zeigt die Ebene, in der das große Bild aufgenommen wurde.

Obwohl für die verwendeten Zelltypen MLE-12 und Rat-1 eine kardiale Differenzierung nicht beschrieben ist und als ausgesprochen unwahrscheinlich erscheint, ergaben sich auch hier im konfokalen Laser-Scan-Mikroskop Bilder, bei denen eine echte Doppelfärbung nicht ausgeschlossen werden konnte. Damit könnten auch andere Mechanismen als eine kardiale Differenzierung als Ursache für die scheinbare Doppelfärbung in Kokulturen aus Rattenkardiomyozyten und EPCs in Frage zu kommen.

Neben vermeintlich doppelt-gefärbten Zellen, die eine für Kardiomyozyten in der Zellkultur typische Morphologie aufwiesen, wurden in den mithilfe des konfokalen Laser-Scan-Mikroskops untersuchten Kokulturen auch eine Vielzahl kleiner runder Zellen oder Vesikel beobachtet, die sowohl positiv für sarkomerisches Aktinin waren, als auch eine rote Fluoreszenz zeigten. Die Abbildung 3.22 zeigt repräsentative Bilder dieser Zellen.

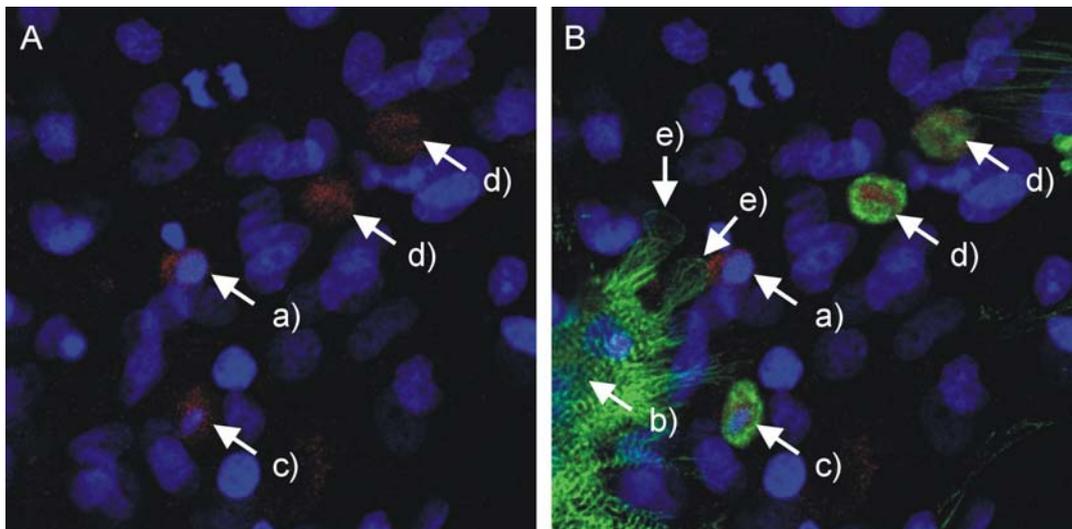


Abbildung 3.22 Auto-Fluoreszenz absterbender Kardiomyozyten

Die Kokulturen von NRCMs und EPCs wurden an Tag 6 mit Paraformaldehyd fixiert und mit Antikörpern gegen herzspezifische Proteine wie sarkomerisches α -Aktinin (+ Cy2-markiertem Sekundärantikörper, grün) gefärbt und im konfokalen Laser-Scan-Mikroskop ausgewertet. Rot: Dil, blau: Kernfärbung mit DAPI.

In den Kokulturen sind sowohl markierte EPCs (a) als auch Aggregate vitaler Kardiomyozyten (b) zu erkennen. Die vermeintlich doppelt-positiven Zellen befanden sich hauptsächlich in der unmittelbaren Nähe dieser Aggregate. Durch eine Kernfärbung mit DAPI konnte gezeigt werden, dass die Mehrheit dieser Zellen bzw. Zytosome einen kondensierten Zellkern (c) hatte oder sogar überhaupt keinen Zellkern (d). Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass diese kernlosen, für sarkomerisches α -Aktinin positiven Partikel aus Vesikeln entstanden sind, die von den Kardiomyozyten abgeschnürt werden (e). Die rot fluoreszierenden, α -Aktinin^{POS} Zellen wurden nicht nur in den Kokulturen mit Dil-markierten EPCs beobachtet, sondern auch in Kokulturen mit nicht-markierten EPCs und reinen Kardiomyozyten-Kulturen. Die detektierte rote Fluoreszenz beruhte also nicht auf einer Dil-Färbung, sondern einer starken Autofluoreszenz der Kardiomyozyten, wobei die Morphologie der autofluoreszierenden Zellen vermuten ließ, dass es sich um absterbende Kardiomyozyten handelt.

3.5.5 Untersuchungen zur Autofluoreszenz von Kardiomyozyten in Zellkultur

Eine starke Eigenfluoreszenz der Kardiomyozyten konnte ebenfalls im Durchflusszytometer gezeigt werden. Die Zellen wurden nach der Isolierung 2 oder 7 Tage unter den Kokultur-Bedingungen kultiviert, anschließend wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und nach Färbung gegen sarkomerisches α -Aktinin (+ Cy2TM-markiertem oder Cy5TM-markiertem Sekundärantikörper) im Durchflusszytometer analysiert.

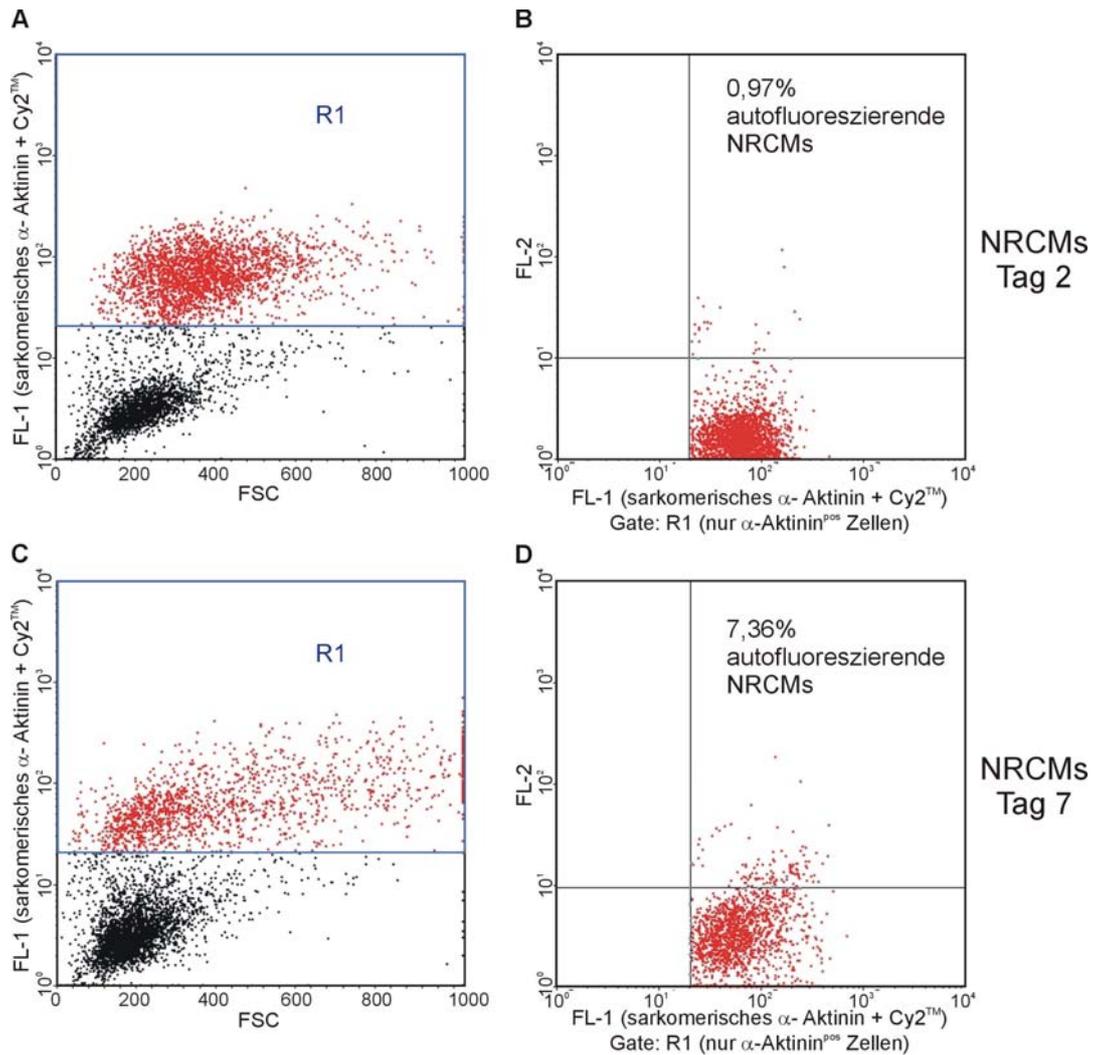


Abbildung 3.23 FACS-Analyse autofluoreszierender Kardiomyozyten

Kardiomyozyten-Kulturen wurden 2 (A, B) und 7 Tage (C, D) nach der Isolierung untersucht. In den Kulturen wurden NRCMs zunächst als α -Aktinin^{pos} identifiziert (A, C, Zellen innerhalb der Region R1), nur diese Zellen wurden dann auf eine rote Fluoreszenz (Detektionskanal FL-2) untersucht (B, D). Die Zahl autofluoreszierender NRCMs ist als Prozentsatz α -Aktinin^{pos} / FL-2^{pos} angegeben.

Die Analyse reiner Kardiomyozyten-Kulturen im FACS zeigte einen deutlichen Anstieg der rot autofluoreszierenden α -Aktinin^{pos} Zellen im Verlauf der Kultur. Die genauen Prozentsätze

dieser Zellen, die bei einer Untersuchung auf doppelt-positive Zellen als Anzeichen für eine Differenzierung zu falsch-positiven Ergebnissen beitragen könnten, schwankten stark zwischen verschiedenen Kulturen (ohne Abbildung), ein wie hier beobachteter Anstieg der autofluoreszierenden Zellen war aber jeweils deutlich zu erkennen.

Obwohl das Vorhandensein kondensierter Zellkerne in den vermutlich absterbenden Kardiomyozyten ein Anzeichen für eine Apoptose der Zellen darstellt, konnte diese in einem TUNEL-Assay von Kardiomyozyten-Kulturen an Tag 2 und Tag 6 nicht nachgewiesen werden (ohne Abbildung).

Als weiterer Ansatz zur Charakterisierung der absterbenden Kardiomyozyten wurden von Herrn PD Dr. Andreas Schmiedl, Abteilung „Funktionelle und Angewandte Anatomie“ der Medizinischen Hochschule Hannover, Aufnahmen der Kulturen im Elektronenmikroskop angefertigt und ausgewertet.

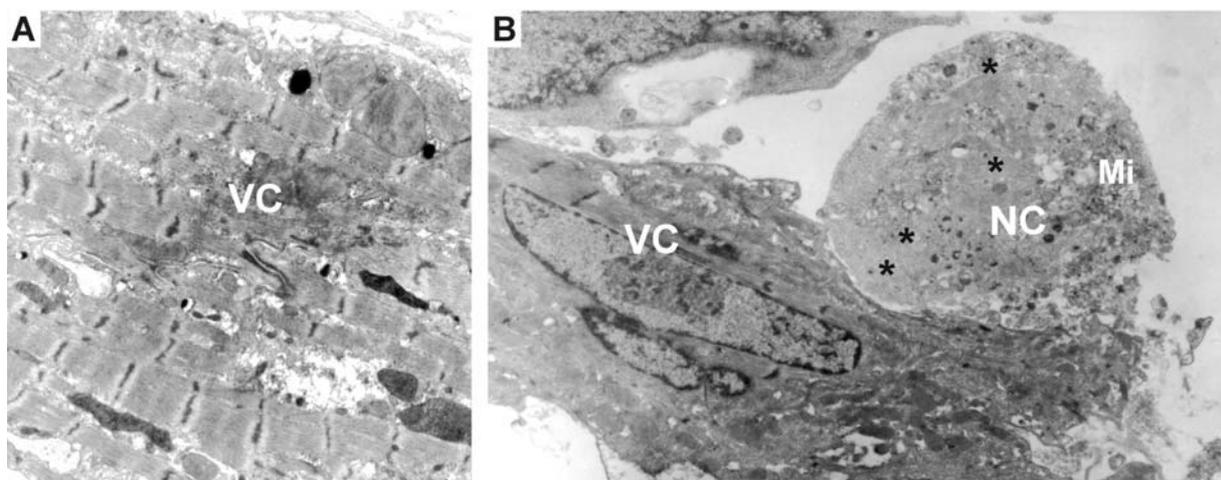


Abbildung 3.24 Elektronenmikroskopie eines absterbenden Kardiomyozyten

Elektronenmikroskopische Aufnahme von NRCMs nach 6 Tagen in Kultur. Neben vitalen Kardiomyozyten (VC, in A und B) sind nekrotische Kardiomyozyten (NC) mit geschädigten Mitochondrien (Mi) und Resten des kontraktiven Apparates (*) zu erkennen (in B). Originalvergrößerung 6000x.

Die Aufnahmen der neonatalen Rattenkardiomyozyten nach 6 Tagen in Kultur zeigten zum überwiegenden Teil vitale Kardiomyozyten mit intakter Sarkomerstruktur. Neben den vitalen Kardiomyozyten wurden auch abgerundete Zellen mit desintegriertem Zellkern, geschädigten Mitochondrien und Restfragmenten des kontraktiven Apparates beobachtet. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um nekrotische Zellen, die in der Kultur durch eine starke Autofluoreszenz eine ähnliche rote Fluoreszenzfärbung wie nach einer Dil-Markierung aufweisen.

3.5.6 Untersuchungen auf eine kardiale Genexpression in den EPCs

Um eine kardiale Differenzierung humaner EPCs in den Kokulturen mit neonatalen Rattenkardiomyozyten auf molekularer Ebene zu detektieren, wurden spezies-spezifische RT-PCRs für frühe humane kardiale Transkriptionsfaktoren etabliert. Da für diese PCRs eine sehr niedrige Nachweisgrenze von 10-100 Molekülen pro PCR-Ansatz gezeigt werden konnte (ohne Abbildung), sollten damit durchgeführte Expressionsanalysen auch eine kleine Anzahl von kardial transdifferenzierten humanen Zellen nachweisen können.

Da sich bei anderen Versuchen innerhalb der Arbeitsgruppe eine starke Abhängigkeit der Effizienz der kardialen Differenzierung muriner ES-Zellen von dem zur Kultivierung verwendeten FCS gezeigt hatte, wurden auch für die Kokulturen der humanen EPCs mit Kardiomyozyten verschiedene FCS-Marken und -Chargen sowie -Konzentrationen getestet. Die Ergebnisse der RT-PCRs für 4 verschiedene FCS sind exemplarisch in der Abbildung 3.25 dargestellt.

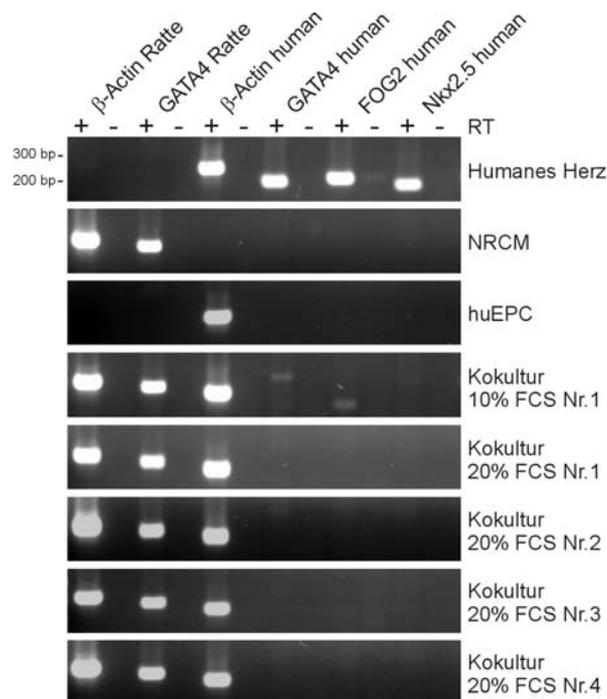


Abbildung 3.25 Spezies-spezifische RT-PCRs der Kokulturen

Aus den Kulturen isolierte Gesamt-RNA wurde DNase-behandelt, Produkte der cDNA-Synthese mit Reverser Transkriptase (+RT) und ohne RT (-RT) wurden als Template für eine PCR mit spezies-spezifischen Primern eingesetzt. Die eingesetzten β -Actin-Primer umschließen ein Intron, Produktgrößen: Ratte β -Actin genomisch 400 bp; Ratte β -Actin cDNA 305 bp; Ratte GATA-4 284 bp; humanes β -Actin, genomisch 348 bp; humanes β -Actin cDNA 254 bp; humanes GATA-4 188 bp; humanes FOG-2 203 bp; humanes Nkx 2.5 168 bp.

Es konnte für alle durchgeführten Ansätze der Kokulturen durch die Expression von β -Actin und GATA-4 der Ratte die Anwesenheit von neonatalen Rattenkardiomyozyten gezeigt

werden. Mit der Expression von humanem β -Actin wurden die humanen EPCs in den Kokulturen nachgewiesen. Dagegen konnte trotz der großen Sensitivität der RT-PCRs in keinem der Kokultur-Ansätze eine Expression der frühen humanen relativ herzspezifischen Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden. Es zeigten sich lediglich einige schwache unspezifische Banden. In einem hier nicht gezeigten früheren Versuch ergab sich für die Kokulturen von EPCs und Kardiomyozyten eine sehr schwache Bande für FOG-2, das allerdings auch in lymphozytären Zellen exprimiert wird [187], die eventuell die EPC-Präparation kontaminiert haben könnten.

In den im Rahmen der Promotion durchgeführten Versuchen ließ sich damit die von Badorff et al. beschriebene Differenzierung humaner EPCs in funktionelle Kardiomyozyten [67] nicht bestätigen. Durch morphologische Analysen der Kokulturen ließen sich keine schlüssigen Beweise für eine kardiale Differenzierung der humanen EPCs in Kokulturen mit neonatalen Rattenkardiomyozyten finden. Bei vermeintlich doppelt-positiven Zellen, die durch rote Fluoreszenz zunächst als Dil-markierte EPCs identifiziert wurden, und deren grüne Fluoreszenz auf einen kardialen Phänotyp hinwies, handelte es sich in den meisten Fällen um Kardiomyozyten, die auf oder unter markierten EPCs oder EPC-Fragmenten lagen, oder alternativ dazu, um nekrotische, stark autofluoreszierende Kardiomyozyten. Auch eine Fusion von EPC-Fragmenten mit Kardiomyozyten konnte nicht ausgeschlossen werden. In den kokultivierten EPCs konnte keine Expression humaner kardialer Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden, die sowohl nach einer Transdifferenzierung der Zellen als auch bei einer Fusion von humanen EPCs mit Rattenkardiomyozyten zu erwarten gewesen wäre. Obwohl letztlich nicht völlig ausgeschlossen werden kann, dass geringe Abweichungen von den beschriebenen Bedingungen für die Isolierung der EPCs [173] und die Kokultivierung mit neonatalen Rattenkardiomyozyten [67] eine Differenzierung der EPCs in den durchgeführten Versuchen verhindert haben könnten, konnten im Rahmen der Dissertation deutlich die Grenzen einiger standardmäßig zur Analyse von Kokulturen verwendeten Methoden wie FACS-Analyse, zweidimensionaler Fluoreszenzmikroskopie und sogar der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie aufgezeigt werden.

Da sich zeigte, dass es in den humanen EPCs in den Kokulturen mit Kardiomyozyten nicht zu einer kardialen Differenzierung kommt, wurde auf den Einsatz der generierten Lentiviren zur Detektion kardialer Differenzierung in EPCs verzichtet. Ihr Potential zur Detektion kardialer Differenzierung in lebenden Zellen sollte stattdessen zunächst an mesenchymalen Stammzellen der Ratte getestet werden, für die eine Reihe von Berichten über eine Expression herzspezifischer Gene nach Behandlung mit 5-Azacytidin vorliegen.

3.6 Versuche zur kardialen Differenzierung von MSCs

Eine Induktion kardialer Genexpression in mesenchymalen Stammzellen verschiedener Spezies durch Behandlung mit 5-Azacytidin ist bereits mehrfach beschrieben worden. Bisher wurde allerdings kontrovers diskutiert, ob eine solche Differenzierung von MSCs auch bei primären, nicht immortalisierte Ratten-MSCs induziert werden kann [33,34]. Diese Frage sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation mithilfe der generierten Lentiviren zur Detektion kardialer Differenzierung untersucht werden.

Aus dem Knochenmark von Ratten isolierte MSCs wurden zur Induktion einer kardialen Genexpression für 24 h mit 10 μ M 5-Azacytidin inkubiert. In ersten Vorversuchen zur Induktion kardialer Differenzierung durch Überexpression von humanem GATA-4 und Nkx2.5 sollte darüber hinaus getestet werden, ob in den mit LentiShuttle CMV GATA4 bzw. LentiShuttle CMV Nkx2.5 transduzierten rMSCs ein Einfluss auf die kardiale Genexpression nach 5-Azacytidin-Behandlung festgestellt werden kann. Nach vierwöchiger weiterer Kultivierung konnten in den Kulturen keine morphologischen Veränderungen festgestellt werden, besonders die von Makino et al. als Zeichen einer kardialen Differenzierung angegebene Bildung von Myotuben [26] sowie spontane Kontraktionen der Zellen wurden nicht beobachtet. Deshalb wurde aus den Kulturen isolierte RNA zunächst auf die Expression der kardialer Proteine ANF und MLC2v untersucht, da diese für eine Verwendung der generierten LentiShuttle-Vektoren zur Detektion kardialer Differenzierung entscheidend ist.

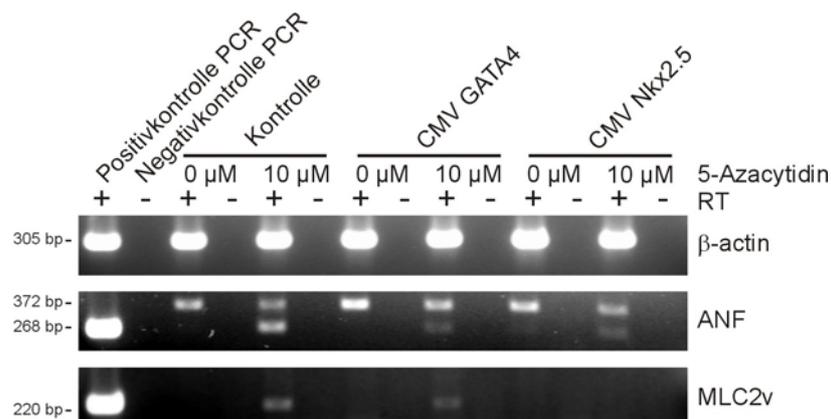


Abbildung 3.26 RT-PCRs 5-Azacytidin-behandelter rMSCs

rMSCs wurden mit den Lentiviren LentiShuttle CMV hrGFP WPRE (Kontrolle), LentiShuttle CMV GATA4 bzw. LentiShuttle CMV Nkx2.5 transduziert und nach Behandlung mit 10 μ M bzw. ohne 5-Azacytidin 4 Wochen kultiviert. Aus den Kulturen isolierte RNA wurde DNase-behandelt, Produkte der cDNA-Synthese mit Reverser Transkriptase (+RT) und ohne RT (-RT) als Template für die PCR eingesetzt. Die eingesetzten Primerpaare umschließen ein Intron, Produktgrößen: β -Actin genomisch 400 bp; β -Actin cDNA 305 bp; ANF genomisch 372 bp; ANF cDNA 268 bp; MLC2v genomisch 2500 bp; MLC2v cDNA 220 bp.

Dabei zeigte sich in den mit 10 μM 5-Azacytidin-stimulierten Ansätzen eine schwache ANF-Expression, die ohne Stimulierung nicht gezeigt werden konnte. Daneben detektierte die sehr sensitive ANF-PCR in allen Ansätzen das Produkt für genomische DNA, die trotz DNase-Behandlung der RNA noch in geringen Mengen vorhanden war. Ein signifikanter Unterschied zwischen GATA-4 / Nkx2.5 -exprimierenden Zellen und dem Kontrollansatz konnte dabei nicht festgestellt werden. Dagegen zeigte die PCR für MLC2v nur im Kontrollansatz und bei GATA-4 transduzierten Zellen eine schwache Expression der 5-Azacytidin-behandelten Zellen. Nach Transduktion mit Nkx 2.5 konnte diese nicht festgestellt werden. In weiteren, hier nicht dargestellten RT-PCRs konnte auch die Induktion der Expression von GATA-4 nach 5-Azacytidin-Behandlung gezeigt werden, während RT-PCRs für α -MHC und MLC2a negativ blieben.

Aufgrund der positiven Befunde für eine Expression von ANF und MLC2v wurde ein Teil der Zellen mit den Lentiviren LentiShuttle Ce huANFp hrGFP WPRE bzw. LentiShuttle Ce huMLC2vp hrGFP WPRE zur Detektion kardialer Genexpression transduziert. In einem Kontrollansatz erfolgte eine Transduktion weiterer rMSCs mit dem Virus LentiShuttle CMV hrGFP WPRE, das unabhängig von einer Differenzierung eine GFP-Expression vermitteln sollte. Zur Induktion einer kardialen Genexpression wurden die kultivierten rMSCs in Passage 17 für 24 h mit 10 μM 5-Azacytidin inkubiert. Im Verlauf einer weiteren 5-wöchigen Kultivierung wurden die Zellen regelmäßig fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. In Abbildung 3.27 sind repräsentative Zellen 2 Wochen nach 5-Azacytidin-Behandlung dargestellt.

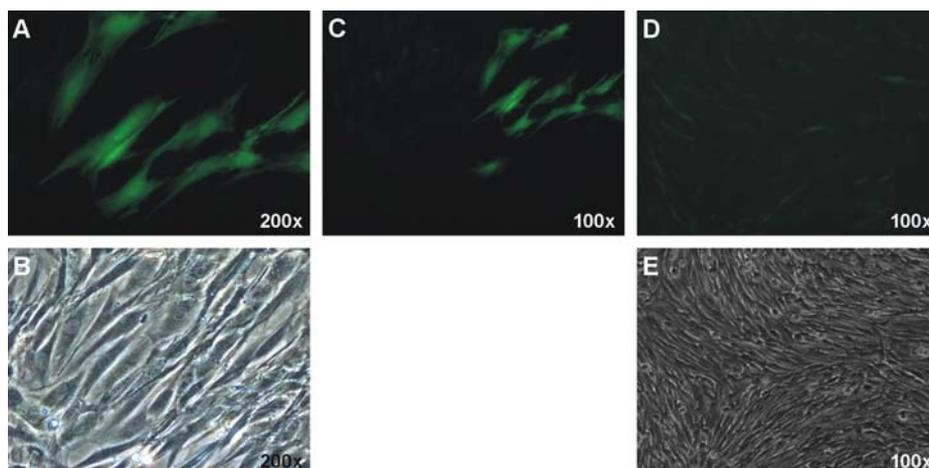


Abbildung 3.27 Transduzierte rMSCs 2 Wochen nach 5-Azacytidin-Behandlung

rMSCs wurden mit den Lentiviren LentiShuttle CMV hrGFP WPRE (Kontrolle)(A, B, C), LentiShuttle Ce MLC2vp hrGFP WPRE (D, E) bzw. LentiShuttle Ce ANFp hrGFP WPRE (ohne Abbildung) transduziert und nach Behandlung mit 10 μM bzw. ohne 5-Azacytidin insgesamt 5 Wochen kultiviert. Die Zellen wurden anschließend am Fluoreszenzmikroskop untersucht, Originalvergrößerungen sind im Bild angegeben.

Dabei zeigte sich wie zu erwarten durchgehend eine stabile GFP-Expression für die als Positivkontrolle mit LentiShuttle CMV hrGFP WPRE transduzierten rMSCs unabhängig von einer Behandlung mit 5-Azacytidin. Allerdings ergab sich auch für die zuvor mit Lentiviren zur Detektion kardialer Differenzierung (mit ANFp und MLC2vp, jeweils mit CMV-Enhancer) transduzierten Ansätze zu allen Zeitpunkten eine schwache Expression von GFP in einigen Zellen, auch hier unabhängig von einer 5-Azacytidin-Behandlung. Die Intensität der Fluoreszenz entsprach dabei der bereits in transduzierten Fibroblasten der Kardiomyozyten-Präparationen beobachteten unspezifischen Fluoreszenz. Die mit LentiShuttle Ce huANFp hrGFP WPRE transduzierten Zellen zeigten eine sehr schwache Fluoreszenz und sind daher nicht abgebildet.

Ein Anstieg des Anteils GFP-positiver Zellen oder das Erscheinen wesentlich stärker fluoreszierender Zellen als Folge einer Induktion kardialer Expression durch 5-Azacytidin konnte im Verlauf der 5-wöchigen Kultivierung nicht festgestellt werden (ohne Abbildung).

Damit konnte auch in diesem Versuch eine kardiale Differenzierung von Stammzellen nicht mithilfe der generierten LentiShuttle-Vektoren dokumentiert werden. Die durchgeführten RT-PCRs zeigten zwar einen Anstieg der Expression von ANF und MLC2v in den Kulturen nach 5-Azacytidin-Behandlung, erlauben aber keine Aussage über die Höhe der Expression in einzelnen Zellen. Es wäre deshalb möglich, dass in vielen Zellen geringe Mengen der herzspezifischen RNAs gebildet werden, die zusammen in der PCR zu einem schwachen Signal führen. Die Expressionshöhe in den einzelnen Zellen und damit auch die Fluoreszenzintensität eines Reportergens könnte dagegen für eine Detektion mit LentiShuttle-Vektoren zu gering gewesen sein.

4 Diskussion

4.1 Lentivirale Vektoren

Für eine Detektion kardialer Differenzierung von Stamm- und Progenitorzellen, bzw. für die Aufreinigung derart differenzierter Zellen, bietet sich die Verwendung lentiviraler Vektoren an. Diese sind in der Lage, auch nicht-proliferierende Zellen [145] wie Kardiomyozyten effizient zu transduzieren und erlauben durch eine stabile Integration der Transgene in das Genom der Zielzelle eine Langzeit-Expression bei einem geringen Maß an Gen-Silencing [146]. Die für die Generierung rekombinanter Lentiviren benötigten genetischen Informationen werden in der Regel durch drei bis vier Plasmide kodiert, mit denen virusproduzierende Zellen ko-transfiziert werden [148]. Eines dieser Plasmide ist das lentivirale Transferplasmid, in das die zu übertragenden Transgen-Sequenzen zwischen zwei virale LTRs und hinter einem Verpackungssignal eingefügt werden.

4.1.1 Entwicklung des LentiShuttle-Systems

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollten lentivirale Transfervektoren generiert werden, die eine Expression von Reportergenen unter der Kontrolle herzspezifischer Promotoren vermitteln. Anfängliche Schwierigkeiten bei der Klonierung lentiviraler Transfervektoren ergaben sich besonders durch hohe Rekombinationsraten in mehreren standardmäßig im Labor zur Klonierung von Plasmiden verwendeten *E.coli* Stämmen wie TOP10, DH5 α und auch den Rekombinase-defizienten Bakterien HB101. Lentivirale Transfervektoren sind in *E. coli* -Bakterien nicht stabil, da die enthaltenen lentiviralen LTRs häufig rekombinieren, dies führt häufig zu einer kompletten Deletion der zwischen den beiden LTRs liegenden Expressionskassette, zurück bleibt eine einzelne Kopie der LTR [188]. Zwar kann dieses Problem durch die Verwendung spezieller Rekombinase-defizienter Bakterienstämme wie STBL2 und STBL4 umgangen werden, die ist aber u.a. wegen der geringeren Wachstumsraten der bei 30°C zu kultivierenden Bakterien aufwendiger und wegen der ausschließlich kommerziellen Verfügbarkeit kompetenter Bakterien auch teurer als für herkömmliche Bakterienstämme.

Im Rahmen der Dissertation wurde deshalb auf der Basis eines selbst-inaktivierenden lentiviralen Transferplasmids das lentivirale Shuttle-Klonierungssystem „LentiShuttle“ entwickelt [166]. Dieses System ermöglicht zunächst die Fertigstellung kompletter Expressionskassetten in einem konventionellen „high copy“ Plasmid in herkömmlichen Bakterienstämmen, die gesamte Kasette wird anschließend in einem einzigen Klonierungsschritt in den lentiviralen Transfervektor eingefügt. Nur für den letzten Schritt müssen STBL-Bakterien verwendet werden. Um für diesen abschließenden Schritt eine

standardisierte Klonierung für alle Expressionskassetten zu erlauben, wurden sowohl in ein „high copy“ Plasmid als auch in das lentivirale Transferplasmid Schnittstellen für die Homing Endonukleasen I-Ceu I und PI-Sce I eingefügt.

Die viralen Titer und Expressionshöhen, die mit LentiShuttle-Konstrukten erreicht wurden, waren mit denen konventioneller lentiviraler Vektoren mit ähnlichen Expressionskassetten absolut vergleichbar (Abb. 3.2). Ein negativer Einfluss durch die eingefügten Sequenzen wurde nicht festgestellt. Für den Titer des Konstrukts pLentiShuttle CMV RedStar WPRE erhaltene Werte lagen dagegen deutlich niedriger. Allerdings ist der tatsächliche Titer des pLentiShuttle CMV RedStar WPRE wahrscheinlich höher als in den durchgeführten Titerbestimmungen gemessen, da die Wellenlänge, die im Durchflusszytometer zur Anregung der Fluoreszenz-Reporter verwendet wurde (Standard-Argonlaser, 488 nm), nur schlecht zum Exzitationsmaximum des RedStar passt, dieses liegt bei einer Wellenlänge von 558 nm. Für eine optimale Titerbestimmung könnte daher das RedStar mit einem leider im FACSCalibur-Gerät nicht verfügbaren Helium-Neon-Laser (543 nm) wesentlich effektiver angeregt werden.

Da für das Kontrollplasmid pLentiShuttle hrGFP WPRE keine Reporterexpression festgestellt wurde (Abb. 3.2), konnte gezeigt werden, dass die Expression von Transgenen in den lentiviralen Expressionskassetten ausschließlich von den eingefügten Promotoren abhängt. Eine Integration der Expressionskassette in transduzierte Zellen wurde dabei mittels quantitativer Real-Time-PCR bestätigt. Die für LentiShuttle-Viren erreichten Expressionshöhen in transduzierten Zellen waren sowohl für HEK293T-Zellen (Abb. 3.3) als auch für neonatale Rattenkardiomyozyten und mesenchymale Stammzellen der Ratte (Abb. 3.5) vergleichbar mit denen konventioneller lentiviraler Vektoren der fortgeschrittenen Generation.

Es konnte damit gezeigt werden, dass das im Rahmen der Promotion entwickelte Klonierungssystem „LentiShuttle“ [166] zur Generierung lentiviraler Transfervektoren eine vereinfachte Klonierung bei vergleichbaren Resultaten in Bezug auf Titer und Expressionshöhe der erhaltenen rekombinanten Lentiviren ermöglicht. Mit der Reduzierung der Klonierungsschritte im lentiviralen Vektor durch den Transfer kompletter Expressionskassetten konnte damit eines der Hauptprobleme bei der Klonierung lentiviraler Vektoren gelöst werden.

Mit dem Konstrukt pLentiShuttle CMV RedStar WPRE wurde darüber hinaus erstmals ein rot fluoreszierendes Reporter gen erfolgreich in einen rekombinanten Lentivirus integriert,

woraus sich die Möglichkeit einer Mehrfarben-Reporter-Gen-Analyse durch stabil in die Zielzellen integrierte lentivirale Konstrukte ergibt. Das Fluoreszenzprotein RedStar hat dabei gegenüber bereits existierenden Rotvarianten des GFP den Vorteil, dass es aus einer anderen Spezies (einer Koralle des Genus *Discosoma*) isoliert wurde und aufgrund von geringen Homologien zum Wild-Typ GFP nicht von GFP-Antikörpern detektiert werden sollte, sowie eine kurze Reifungszeit des Chromophors [167], die bei anderen rot fluoreszierenden Proteinen einen langsamen Farbwechsel über grün nach rot einschließt, und so in Zweifarben-Analysen zu verfälschten Ergebnissen führen kann.

4.1.2 Lentivirale Vektoren zur Detektion kardialer Differenzierung

Mit dem LentiShuttle-System generierte Viren zur Expression von hrGFP unter der Kontrolle der kardialen Promotoren huANFp, huMLC2vp, $\mu\alpha$ -MHCp und huCAP wurden zur Transduktion von neonatalen Rattenkardiomyozyten-Präparationen eingesetzt, bei denen es sich um eine Mischkultur aus Kardiomyozyten und Fibroblasten handelt.

Die Transduktion mit LentiShuttle CMV hrGFP WPRE führte dabei aufgrund des verwendeten ubiquitären Promotors wie erwartet zu einer GFP-Expression in Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten. Die kardialen Promotoren huANFp, huMLC2vp und $\mu\alpha$ -MHCp in den ursprünglichen Konstrukten ohne CMV-Enhancer vermittelten wie gewünscht ausschließlich eine Reporter-Gen-Expression in den Kardiomyozyten. Allerdings konnte für den im Rahmen der Promotion verwendeten Cardiac Aktin-Promotor keine ausschließlich herzspezifische hrGFP-Expression festgestellt werden.

Es zeigte sich auch, dass die Expression des Reportergens hrGFP in den Kardiomyozyten meist eher schwach war, während nur einzelne hell fluoreszierende Zellen beobachtet werden konnten. Zunächst wurde vermutet, dass niedrige Titer der Viren mit kardialen Promotoren für die schwache Expression in wenigen Zellen verantwortlich sein könnten. Bei Lentiviren gibt es zwar im Gegensatz zu anderen Retroviren keine definierte Obergrenze für die Größe der verpackten Sequenzen, allerdings nimmt die Verpackungseffizienz mit zunehmender Größe der eingefügten Sequenzen stark ab [149], so dass zumindest für den mit über 5 kb langen $\mu\alpha$ -MHCp ein reduzierter Titer erwartet wurde. Da sich aber mit der gleichen Häufigkeit auch für die kürzeren Promotoren huANFp und huMLC2vp das gleiche Bild einzelner hell leuchtender Zellen ergab, schienen andere Mechanismen eine Rolle zu spielen. Eine Möglichkeit ist ein Einfluss des genomischen Umfelds, in das die Expressionskassette des lentiviralen Provirus integriert. Eventuell könnte eine durch eher schwache kardiale Promotoren vermittelte Reporter-Gen-Expression nur in denjenigen Zellen

zu einer deutlichen Fluoreszenz führen, in denen sie durch Elemente in der genomischen DNA nahe dem Integrationsort verstärkt wird.

Deshalb wurden weitere lentivirale Konstrukte mit kardialen Promotoren generiert, bei denen die Expression in allen transduzierten Zellen durch Insertion eines verstärkenden Elementes stromaufwärts der Expressionskassetten gesteigert werden sollte. Hierfür wurde der CMV-Enhancer ausgewählt, der bereits in nicht-viralen Konstrukten für die Steigerung der Expressionshöhe in Kombination mit ubiquitären Promotoren verwendet wurde [189]. Dagegen gibt es erst wenige Berichte über eine Kombination des CMV-Enhancers mit zelltyp-spezifischen Promotoren in nicht-viralen Vektoren [111,190], in lentiviralen Vektoren für eine zelltyp-spezifische Expression wurde er bisher noch gar nicht eingesetzt. Nach Integration des CMV-Enhancer (Ce) in den lentiviralen Transfervektor pLentiShuttle konnte tatsächlich eine verstärkte GFP-Expression gezeigt werden, ein negativer Einfluss auf die Höhe der Virustiter war nicht zu erkennen.

Um die Spezifität der durch kardiale Promotoren vermittelten GFP-Expression zu überprüfen, wurden stellvertretend für die drei Zelltypen Fibroblasten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen, die als Kontaminationen in Kardiomyozyten-Präparationen vorhanden sein können, rat-1 Fibroblasten, huSMC und HUVEC mit den generierten Lentiviren transduziert. Bei einer durch die Lentiviren mit kardialen Promotoren vermittelten ausschließlich herzspezifischen Expression sollte in diesen Zellen keine signifikante Fluoreszenz zu beobachten sein. In der Realität zeigte sich z.T. auch in Nicht-Kardiomyozyten eine schwache Fluoreszenz, deren Intensität allerdings sehr deutlich geringer war als die in Kardiomyozyten beobachtete. Für diese relativ niedrige, aber doch klar nachweisbare Hintergrundexpression des Reportergens gibt es zunächst mehrere Erklärungsansätze:

In den Viruspräparationen könnten Reste von Plasmid-DNA der Transfervektoren vorhanden sein, die unter Transduktionsbedingungen ebenfalls in die Zellen gelangt sind. Durch die Promotoraktivität der lentiviralen 5'-LTR im Plasmid, die bei den SIN-Vektoren erst bei der Integration des Provirus in das Genom der Zielzelle inaktiviert wird [148], könnte es dann auch ohne Induktion des kardialen Promotors zu einer GFP-Expression kommen. Diese sollte dann allerdings nicht stabil sein, sondern nur solange auftreten wie die Plasmide in den Zellen vorhanden sind. Da eine schwache Expression in Nicht-Kardiomyozyten mindestens über zwei Wochen auch in den primären humanen glatten Muskelzellen (hSMCs) beobachtet werden konnte, in denen eingebrachte Plasmide nicht repliziert werden sollten, scheint diese Möglichkeit aber eher eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass der kardiale Promotor an sich bereits eine unspezifische Expression vermittelt, z.B. weil das verwendete Fragment zu kurz gewählt wurde und wichtige Elemente wie Bindungsstellen für herzspezifische Faktoren fehlen. Dies scheint insbesondere für den verwendeten cardiac Actin-Promotor der Fall sein. Obwohl Berichte über eine spezifisch kardiale Expression für das im Rahmen der Promotion verwendete Fragment des cardiac Aktin-Promotors vorlagen, welches Bereiche der 5'-UTR bis ca. -0,5 kb stromaufwärts der TATA-Box umfasst [191], bestätigten die hier beschriebenen Ergebnisse doch eher andere Publikationen, die zu dem Schluss kommen, dass für eine spezifische Expression in Kardiomyozyten durch den hCA-Promotor verschiedene Enhancer-Bereiche benötigt zu werden, die sich in der Region -0,7 kb bis -5,4 kb stromaufwärts der TATA-Box befinden [132,133].

Die Spezifität der kardialen Genexpression durch die gewählten Promotoren könnte aber auch durch die Insertion des CMV-Enhancers beeinflusst werden. In diesem Zusammenhang fällt auf, dass die Spezifität der kardialen Promotoren im Falle des huANFp und des huMLC2vp nur geringfügig beeinflusst wurde, und in Nicht-Kardiomyozyten nur eine schwache GFP-Expression beobachtet wird, während sich für den huCAp nach Insertion des CMV-Enhancers eine starke GFP-Expression in allen untersuchten Zelltypen zeigte. Für den μ α -MHC-Promotor liegen bisher keine Ergebnisse für Expressionskassetten mit einem zusätzlichen CMV-Enhancer vor.

Aufgrund von Deletionsmutanten der Promotorregion wird vermutet, dass der ANF-Promotor negativ reguliert wird, also die ANF-Expression in Nicht-Kardiomyozyten reprimiert und so die spezifische ANF-Expression in atrialen Kardiomyozyten etabliert wird [115]. Da auch für den MLC2v-Promotor eine Repression von hMLC2V in nicht-kardialen Zellen durch die „cardiac specific sequence“ CSS erfolgt [124], liegt die Vermutung nahe, dass eine allgemeine Verstärkung der Expression über den CMV-Enhancer durch diese Repressor-Elemente in nicht-kardialen Zellen aufgehoben bzw. unterdrückt werden kann und die kardiale Spezifität der Promotoren so erhalten bleibt. Dagegen wird die kardiale Expression durch den humanen CA-Promotor hauptsächlich durch verstärkende Elemente positiv reguliert [132,133], die ubiquitäre Verstärkung des Promotors durch den CMV-Enhancer kann in diesem Fall in Nicht-Kardiomyozyten nicht unterdrückt werden. Für den α -MHC-Promotor liegen derzeit keine Erkenntnisse über Elemente zur Repression der Expression in nicht-kardialen Zellen vor, der Einfluss des CMV-Enhancers auf die Spezifität der α -MHCp vermittelten Expression bleibt deshalb abzuwarten.

In Hinblick auf die Tatsache, dass verschiedene Zellen auch natürlicherweise schon eine mehr oder weniger hohe Eigenfluoreszenz zeigen, ist für die Verwendung der generierten Lentiviren zur Detektion kardial differenzierter Zellen letztlich ein ausreichend großer Intensitätsunterschied der herzspezifischen GFP-Expression im Vergleich zur unspezifischen Expression in Nicht-Kardiomyozyten entscheidend. Dieser ist im Falle der CMV-Enhancer-verstärkten Expression von hrGFP unter der Kontrolle des humanen ANF-Promotors wie auch des MLC2v-Promotors klar erkennbar und sollte z.B. eine selektive Aufreinigung stark GFP-positiver kardialer Zellen oder kardial differenzierter Stammzellen mithilfe eines FACS-Sorters ermöglichen. Damit konnte insgesamt durch die Insertion des CMV-Enhancers eine signifikante Verbesserung der bisher vorhandenen pLentiShuttle-Konstrukte erzielt werden. Mit den im Rahmen der Promotion entwickelten Vektoren zur Expression von hrGFP unter der Kontrolle der Promotoren ANFp und MLC2vp konnte außerdem erstmals eine ausreichend starke gewebespezifische Expression eines Reportergens durch lentiviralen Gentransfer erzielt werden.

Lentiviralen Konstrukte zur Detektion kardialer Differenzierung, bei denen GFP unter der Kontrolle des humanen ANF-Promotors bzw. des MLC2v-Promotors exprimiert wird, lassen sich vermutlich auch verwenden, um innerhalb der Kardiomyozyten-Präparationen oder auch bei kardial differenzierten Stammzellen zwischen einem atrialen (ANF-exprimierenden) und ventrikulären (MLC2v-exprimierenden) Phänotyp zu unterscheiden. Erste Ergebnisse entsprechender Immunfluoreszenzfärbungen GFP-positiver Zellen gegen die Proteine ANF und MLC2v sind vielversprechend und zeigen eine sehr gute Korrelation von ANF- bzw. MLC2v-Promotor vermittelter GFP-Expression und der entsprechenden ANF- bzw. MLC2v-Antikörperfärbung. Während der Embryonalentwicklung des Herzens wird allerdings zunächst z.B. auch in den ventrikulären Kardiomyozyten ANF exprimiert, die Expression von ANF geht in den Ventrikeln postnatal erst innerhalb einer Woche zurück und ist erst im adulten Herzen ausschließlich auf die Atrien beschränkt [115].

Zur Zeit werden deshalb außerdem Versuche durchgeführt, in denen ANF- bzw. MLC2v-GFP-positive Zellen auf Unterschiede in ihrer Elektrophysiologie untersucht werden. Nur derartige Messungen erlauben letztendlich eine Aussage darüber, ob die verwendeten Konstrukte spezifisch atriale, ventrikuläre oder auch Kardiomyozyten des Reizleitungssystems anfärben. Die Morphologie einiger ANFp-GFP-positiver Zellen, die extrem schmal und langgestreckt erscheinen, wie z.B. in Abbildung 3.6 zu erkennen ist, deutet bereits darauf hin, dass es sich hier um derartige Reizleitungszellen handeln könnte, die ebenfalls ANF exprimieren und ebenfalls mithilfe der generierten Vektoren detektiert werden könnten.

Zur abschließenden Bestimmung der jeweiligen Spezifität der humanen Promotoren für ANF und MLC2v sollten daher die entsprechenden Versuche auch in adulten Kardiomyozyten sowie Kardiomyozyten verschiedener Spezies, u. a. humanen Zellen, wiederholt werden.

4.1.3 Lentivirale Vektoren zur Induktion kardialer Differenzierung

Lentivirale Vektoren könnten auch für eine stabile Überexpression von Proteinen in Säugerzellen eingesetzt werden. Eine solche Überexpression von kardialen Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Stammzellen könnte möglicherweise ihre kardiale Differenzierung induzieren oder unterstützen. Ein solcher Effekt wurde z.B. für die Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen in viszerales Endoderm durch ektopische Expression der Transkriptionsfaktoren GATA-4 und GATA-6 gezeigt [192]. Die Überexpression von GATA-4 führte zu einer gesteigerten Kardiogenese in murinen ES-Zellen [193] sowie bei gleichzeitiger Überexpression von Nkx2.5 zu einer kardialen Differenzierung in P19CL6noggin Zellen [194].

Auf der Grundlage des pLentiShuttle-Systems generierte lentivirale Transfervektoren für eine Überexpression der herzspezifischen Transkriptionsfaktoren GATA-4 und Nkx2.5, zeigten nach Transduktion von Ratten MSCs eine starke Expression auf der mRNA-Ebene. Diese war deutlich von den schwachen Banden zu unterscheiden, die vermutlich durch Kontaminationen der PCRs mit PCR-Produkten oder aber genomischer DNA zu erklären sind (Abb.3.7). Nach einer ersten Anwendung der LentiShuttle-Vektoren zur Überexpression von GATA-4 und Nkx2.5 im Rahmen der Versuche zur kardialen Differenzierung von MSCs wurde aber zunächst kein Einfluss auf die kardiale Genexpression festgestellt (Abb. 3.26, siehe auch Diskussion 4.3). Allerdings wurde im Rahmen der zur Promotion durchgeführten Versuche auch nicht explizit untersucht, ob nach lentiviraler Transduktion als Folge der RNA-Expression auch funktionelle Proteine in den Zielzellen vorhanden waren. Weil die GATA-4 Sequenz mit der wenig fehleranfälligen ProofStart-Polymerase amplifiziert wurde, ist für sie auf eine Sequenzierung verzichtet worden. Deshalb wäre es theoretisch auch möglich, dass die zur Klonierung verwendete Sequenz Fehler enthielt und deshalb kein funktionelles Protein gebildet wurde.

4.1.4 Übertragung replikationsdefizienter Lentiviren durch transduzierte Zellen

Lentivirale Vektoren können für einen effizienten Gentransfer *in vitro* und *in vivo* genutzt werden und bieten sich auch klinisch für eine *ex vivo* Gentherapie an. Experimentell werden sie immer häufiger zur Markierung von Zellen verwendet [66]. Eine mögliche Anwendung ist dabei die Markierung von Stammzellen vor einer Transplantation zur Untersuchung einer anschließenden potentiellen Differenzierung dieser Zellen *in vivo*. Einige hierfür verwendete Zelltypen müssen direkt nach der Isolierung bzw. Transduktion transplantiert werden, um zu verhindern, dass sie in Kultur absterben, differenzieren oder auch dedifferenzieren, wie z.B. bei hämatopoetischen Stammzellen zu beobachten. Dies gilt auch für primäre Kardiomyozyten, die in Kultur relativ schnell dedifferenzieren und zudem nicht passagiert werden können.

Innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe wurden von Prof. Dr. Ulrike Blömer und Herrn Hendrik Witschel frisch transduzierte neonatale Rattenkardiomyozyten in Rattenherzen transplantiert, um eine eventuell daraus resultierende Regeneration von geschädigtem Herzgewebe zu untersuchen. In Kontrollansätzen wurden diese Zellen außerdem in einen Hinterlauf-Muskel bzw. das Gehirn von Ratten injiziert. Nach der *ex vivo* Transduktion mit einem GFP-Expression vermittelnden lentiviralen Vektor waren die Zellen vor der Transplantation dabei zweimal gewaschen worden, um überschüssige virale Partikel aus dem Transduktionsansatz zu entfernen. Es zeigte sich, dass die markierten Zellen anschließend in histologischen Schnitten der Gewebe leicht identifiziert werden konnten. Allerdings erwiesen sich im Muskel außer den transplantierten Zellen überraschenderweise auch Empfängermuskelfasern als GFP-positiv. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich nach Transplantation der frisch transduzierten und gewaschenen Kardiomyozyten in das Zentrale Nervensystem (ZNS) des Rattengehirns. Auch hier integrierten die GFP-positiven Kardiomyozyten in das Gewebe. Verschiedene Nervenzellen des Empfängers, die durch immunhistologische Anfärbung als Neuronen und Astrozyten identifiziert wurden, waren ebenfalls GFP-positiv. Nach Transplantation stabil GFP-exprimierender Fibroblasten wurden dagegen keine GFP^{pos} Empfängerzellen detektiert [180].

Theoretisch können für diesen Effekt eine Reihe von Mechanismen verantwortlich sein. Zum einen wäre es prinzipiell denkbar, dass transplantierte Zellen im Gewebe zu Skelettmuskelzellen bzw. Gehirnzellen differenzieren und deshalb neben der GFP-Markierung auch die beobachteten gewebespezifischen Marker aufweisen. Auch eine Fusion der transplantierten GFP^{pos} Zellen mit Skelettmuskel- oder Gehirnzellen wäre möglich. Diese Möglichkeiten können *in vivo* zwar nicht ausgeschlossen werden, erscheinen bei der

Verwendung von terminal differenzierten Kardiomyozyten zur Transplantation aber eher unwahrscheinlich.

Die GFP-exprimierende Zellen im Skelettmuskel und im Gehirn entstanden daher vermutlich als Folge einer Transduktion von Empfängerzellen durch infektiösen Virus, der mit den transduzierten Kardiomyozyten zusammen übertragen wurde. Zu dieser Virusübertragung kam es, obwohl die transduzierten Zellen vor der Transplantation zweimal gewaschen worden waren. In einem negativen p24-Assay wurde das Vorhandensein replikationskompetenter Viren in den transduzierten Zellen ausgeschlossen, die theoretisch ebenfalls nach Freisetzung aus den transplantierten Zellen für eine Transduktion von Empfängerzellen verantwortlich sein könnten.

Als Ergänzung zu den oben beschriebenen Versuchen von Frau Prof. Dr. Ulrike Blömer und Herrn Hendrik Witschel wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation *in vitro* Transwell-Experimente [180] durchgeführt, um weitere Hinweise auf eine Übertragung von Lentiviren während der Transplantation transduzierter Zellen zu erhalten. Dabei sollte auch überprüft werden, ob ein intensiveres Waschen der Zellen nach der Transduktion diese Übertragung verhindern könnte. Bei diesen Versuchen wurde lentiviralen Partikeln, die an transduzierte Zellen anhaften und von diesen in das Kulturmedium abgegeben werden, die Möglichkeit gegeben, durch eine Membran, die einen direkten Zell-Zell-Kontakt verhindert, in ein Kompartiment mit HEK293T-Zellen zu gelangen und diese Zellen zu transduzieren. Vor Zugabe der transduzierten Zellen in das Transwell-System wurden sie in der Regel einer verschiedenen Zahl von Waschschritten unterzogen.

Die Transwell-Experimente zeigten, dass auch nach sechs Waschschritten einzelne Kolonien GFP^{pos} transduzierter HEK293T-Zellen im unteren Teil der Transwellplatten detektiert werden (Abb. 3.9), es kann nur spekuliert werden, warum selbst dann noch infektiöse virale Partikel in den Kardiomyozyten-Präparationen vorhanden sind. Wie die Abb. 3.10 zeigt, nimmt der Anteil infektiöser Partikel ab dem zweiten Waschschrift nicht signifikant ab. Einige Partikel scheinen daher unter den Bedingungen beim Waschen der Zellen an deren Membran zu adhären, obwohl sie unter den Bedingungen der weiteren Kultivierung freigesetzt werden können.

Eine mögliche Erklärung dafür ist die Tatsache, dass die verwendeten Lentiviren mit der Glykoprotein-Hülle des Vesikulären Stomatitis Virus pseudotypisiert wurden, um einen breiteren Tropismus sowie eine größere Stabilität der Lentiviren zu vermitteln. Der Eintritt von Lentiviren in die Wirtszelle beruht auf einer Membranfusion, die durch eine

Konformationsänderungen der viralen Hüllproteine ausgelöst wird [195]. Eine Infektion mit dem Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) wird durch das Glykoprotein G vermittelt, das im sauren Milieu der Endosomen eine Membranfusion induziert. Die VSV-G induzierte Fusion findet in einem sehr engen pH-Bereich statt und kann durch einen abweichenden pH-Wert verhindert werden [196]. Es ist daher möglich, dass das verwendete Kulturmedium die Freisetzung von an Zellen gebundenen viralen Partikeln, die noch nicht mit der Zellmembran fusioniert sind, ermöglicht. Ob es sich dabei um eine besondere Eigenschaft VSV-G-pseudotypisierter Viren handelt, oder ob dieses Phänomen auch bei der Verwendung anderer Hüllproteine beobachtet werden kann, ist noch nicht geklärt.

Die wesentlich geringeren Zahlen kontaminierender viraler Partikel in Präparationen von frisch transduzierten Rat-1 Fibroblasten im Vergleich zu Kardiomyozyten (siehe Abb. 3.11) lassen vermuten, dass die Zahl der anhaftenden Partikel von spezifischen Eigenschaften der Membranoberflächen des jeweiligen Zelltyps abhängen könnte.

Eine Zeitverlaufsstudie zeigte, dass die Zahl der kontaminierenden infektiösen Virionen bei weiterer Inkubation der frisch transduzierten Zellen vor dem Aussäen in den Transwell-Experimenten reduziert wurde (Abb. 3.12). Im Prinzip können dafür zwei Mechanismen verantwortlich sein: 1. Virionen, die an die Zelloberfläche gebunden haben, können weiter fusionieren und infizieren dadurch die Zelle, an die sie sich angeheftet haben und 2. Anhaftende Viren verlieren unter den verwendeten Kulturbedingungen mit der Zeit ihre Infektiosität. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, bei dem Viren unter gleichen Bedingungen in einer zellfreien Umgebung inkubiert wurden. Es zeigten sich hier vergleichbare Raten einer Abnahme der infektiösen Titer wie bei einer weiteren Inkubation frisch transduzierter Zellen (Abb. 3.13). Dieser Befund spricht eher für einen physikalischen Zerfall der Virionen, oder einen Verlust der Infektiosität, als für eine weitere Virusaufnahme in Zielzellen als dem Hauptgrund für die beobachtete Abnahme der Titer kontaminierender Viren im Zeitverlauf.

Obwohl bereits deutliche Mengen kontaminierender lentiviraler Vektoren in den Transwell-Experimenten nachgewiesen werden konnten, ist die Zahl infektiöser Virionen unter *in vivo* Bedingungen wie bei der Transplantation eventuell noch wesentlich höher. In den Transwell-Versuchen können nur die Viren, die sich von den Kardiomyozyten ablösen und durch die Transwell-Membran zu den HEK293T-Zellen gelangen und diese transduzieren, nachgewiesen werden. Dagegen sollte bei den *in vivo* Bedingungen nahezu jeder virale Partikel, der noch auf den transduzierten Zellen haftet, nach Transplantation direkten Kontakt zu einer Empfängerzelle haben und diese theoretisch auch transduzieren können.

Zwar kann in den *in vivo* Transplantations-Experimenten wie schon erwähnt auch eine Fusion von transduzierten Zellen und Empfängerzellen nicht völlig ausgeschlossen werden, diese kann aber den Nachweis GFP^{pos} HEK293T-Zellen in den *in vitro* Experimenten nicht erklären. Es wurde auch von einem direkten Transfer des GFP-Proteins, eine sogenannte Pseudotransduktion, in andere Zellen berichtet, wobei nicht-transgene Zellen für bis zu 4 Tage eine grüne Fluoreszenz zeigten [197]. Prinzipiell könnte auch dieser Mechanismus zu einer Anfärbung der Empfängerzellen nach Transplantation transduzierter Zellen geführt haben. Allerdings scheint ein solcher direkter GFP-Transfer in den durchgeführten Versuchen eher unwahrscheinlich, da in diesem Fall auch für stabil transduzierte GFP-exprimierender Rat-1 Fibroblasten eine solche Übertragung erwartet würde.

Zusammenfassend zeigen die im Rahmen der Promotion durchgeführten *in vitro* Experimente, zusammen mit den Befunden aus den *in vivo* Versuchen, deutlich, dass eine Transplantation von Zellen unmittelbar nach einer lentiviralen Transduktion das Risiko einer unerwünschten Übertragung von infektiösen Viren auf die Zellen des Empfängers birgt [180]. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse sollten z.B. Experimente zur Differenzierung von Stammzellen, bei denen diese direkt nach Transduktion transplantiert [179,198] oder kokultiviert wurden [66], kritisch betrachtet werden, da falsch-positive Resultate als Folge eines Virus-Transfers möglich sind. Für Versuche, bei denen sich eine sofortige Verwendung der transduzierten Zellen nicht vermeiden lässt, sollte in entsprechenden Kontrollexperimenten unter möglichst ähnlichen Bedingungen das Ausmaß kontaminierender viraler Partikel überprüft werden.

Weiterhin ist die im Rahmen der Dissertation demonstrierte Übertragung von infektiösen Viren durch transduzierte Zellen auch im Hinblick auf die gentechnische Sicherheit bei der Verwendung von Lentiviren, und vermutlich auch von anderen Retroviren, sowohl experimentell als auch klinisch von Bedeutung. Zum einen müssen Zellen nach einer Transduktion eventuell länger als bisher angenommen unter den Bedingungen eines S2-Labors weiter kultiviert werden, bis von ihnen definitiv nicht mehr die Gefahr der Übertragung infektiöser Viren ausgeht. Zum anderen sollte auch die klinische Anwendung frisch transduzierter Zellen, wie z.B. hämatopoetischer Stammzellen für eine *ex vivo* Gen-Therapie [199] äußerst kritisch überdacht werden, da auch hier eine Übertragung infektiöser Viren mit den transduzierten Zellen in den Patienten nicht ausgeschlossen werden kann.

4.2 Versuche zur kardialen Differenzierung von EPCs

Bei einer Reihe von Herzerkrankungen einschließlich ischämischer Schädigungen des Herzens nach einem Infarkt gibt es bisher keine therapeutischen Ansätze, die eine Regeneration des geschädigten Gewebes ermöglichen. In diesem Bereich stellt die Transplantation von Zellen möglicherweise eine Alternative zu konventionellen Behandlungsmethoden dar. Da adulte Kardiomyozyten nach dem derzeitigen Wissensstand kein signifikantes Potential für eine Proliferation besitzen, werden zur Zeit andere Zelltypen, besonders Stammzellen auf ihre Eignung als Quelle für transplantierbare Kardiomyozyten untersucht. Obwohl klinische Studien bereits geringfügige, aber anscheinend signifikante Funktionsverbesserungen der Herzleistung nach Transplantation von verschiedenen Stamm- / oder Progenitorzellpopulationen gezeigt haben [43], ist bisher nicht klar, ob parakrine Mechanismen, die Bildung von Endothelzellen als Beitrag zur Angiogenese oder Differenzierung der transplantierten Zellen in Kardiomyozyten für diese Beobachtungen verantwortlich sind.

Für die im allgemeinen als „Endotheliale Progenitorzellen, EPCs“ bezeichneten mononukleären Zellen aus dem Blut, die durch ihre Adhärenz an Plastik-Zellkultur-Gefäße isoliert wurden, haben Studien belegt, dass es sich hauptsächlich um nicht-proliferierende DiIAcLDL^{pos} / UEA-1^{pos} aktivierte Monozyten bzw. Makrophagen-artige Zellen handelt, die Angiogenese-fördernde Faktoren wie „vascular endothelial growth factor, VEGF“ und „hepatocyte growth factor, HGF“ freisetzen können [70]. Allerdings enthalten diese Zellen auch einen kleinen Anteil an sogenannten „late outgrow endothelial cells“, bei denen es sich tatsächlich um proliferierende endotheliale Progenitorzellen handelt [184]. In vivo Studien zeigen klar eine EPC-abhängige Steigerung der Neovaskularisierung [61,63], es wird zur Zeit intensiv untersucht, ob die Freisetzung von Zytokinen oder eher eine Differenzierung in funktionelle Endothelzellen für diesen Effekt hauptverantwortlich ist.

Kürzlich wurde darüber hinaus eine „effiziente Transdifferenzierung von humanen Endothelialen Progenitorzellen in funktionelle Kardiomyozyten“ beschrieben [67]. Humane mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMCs) wurden durch Zentrifugation über einen Dichte-Gradienten isoliert, für 3 Tage in Endothelzellmedium kultiviert, dann markiert und schließlich mit neonatalen Rattenkardiomyozyten kokultiviert, wodurch die kardiale Differenzierung der „EPCs“ induziert werden sollte. Diese Befunde sollten im Rahmen der vorliegenden Dissertation kritisch beleuchtet und auf die zugrunde liegenden Mechanismen untersucht werden.

Die im Rahmen der Promotion durchgeführten Versuche zeigten in Präparationen humaner EPCs nach 3 Tagen Kultivierung für nahezu 100% der Zellen eine Aufnahme von AcLDL und eine Bindung des Lektins UEA-1. Dieses Ergebnis war unabhängig von den gewählten Kulturbedingungen, wie der Beschichtung der Zellkulturgefäße oder dem verwendeten Endothelzellmedium und entsprach damit dem für EPC-Präparationen beschriebenen Phänotyp [70]. Obwohl es sich bei den isolierten Zellen nach nur 3 Tagen in Kultur mit Sicherheit zu einem großen Anteil um Monozyten bzw. Makrophagen handelte, zeigten viele Zellen eine längliche, spindelförmige Morphologie, ähnlich kultivierten, nicht-konfluent wachsenden Endothelzellen.

In den Kokulturen von humanen EPCs und Kardiomyozyten nahm die Länge und Oberfläche der markierten EPCs leicht zu, allerdings veränderten sich auch EPCs, die ohne Kardiomyozyten kultiviert wurden, zu einem gewissen Grad. Da nicht beschrieben und auch nicht anzunehmen ist, dass EPCs alleine spontan kardial differenzieren, und da die durchschnittliche Größe der Kardiomyozyten signifikant höher lag als die der kokultivierten EPCs, kann eine Zunahme der Zellgröße per se kaum als Beweis einer kardialen Differenzierung angesehen werden. Die zu beobachtenden morphologischen Veränderungen können genauso auch auf einer Abflachung der Zellen und der Bildung von Zellausläufern beruhen, die mit einer Differenzierung der EPCs zu Endothelzellen verbunden sind.

Um das Potential der EPCs zur kardialen Differenzierung näher zu untersuchen, wurden sie mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff Dil markiert und für Kokulturen mit Kardiomyozyten eingesetzt, diese wurden anschließend mikroskopisch untersucht. Die Markierung der EPCs erfolgte zunächst, wie von Badorff et al. beschrieben, durch Dil-markiertes, acetyliertes low-density-Lipoprotein (LDL). Dieses wird von Endothelzellen, aber auch von Monozyten und Makrophagen, nach Bindung an Scavenger-Rezeptoren aufgenommen und in die Zellmembran integriert. Laut Angaben verschiedener Hersteller (Molecular Probes bzw. CellSystems) ist die Dil-Komponente dabei nicht kovalent an das LDL gebunden, sondern nur mit diesem assoziiert. Das LDL wird letztendlich in den Lysosomen der Zelle verstoffwechselt, wenn dort die aufgenommenen Komplexe dissoziieren, ist theoretisch die Möglichkeit einer unerwünschten Farbstoff-Übertragung des Dil auf unmarkierte Zellen gegeben. Obwohl Kontroll-Experimente keine solche Farbstoffübertragung über das Medium zeigten, wurden deshalb alternativ Färbungen mit dem Membranfarbstoff Vybrant™ CM-Dil durchgeführt, der kovalent an Zellmembrankomponenten bindet, wodurch das Risiko eines Farbstofftransfers auf Kardiomyozyten zumindest theoretisch reduziert wird. In einer Reihe von Experimenten wurden Kokulturen wie von Badorff et al. [67] beschrieben, sowie mit einigen Variationen durchgeführt. Eine potentielle Differenzierung der EPCs zu

Kardiomyozyten wurde nach Gegenfärbung für verschiedene herzspezifische Proteine analysiert.

Die zunächst erhaltenen Ergebnisse gleichen den von Badorff et al. [67] beschriebenen Daten. EPCs integrieren in den konfluenten Monolayer aus Kardiomyozyten und Fibroblasten, einige Zellen zeigen dabei auch rhythmische Bewegungen, diese beruhen aber bei genauerer Betrachtung vermutlich auf einer mechanischen Kopplung von EPCs an kontrahierende Kardiomyozyten. Die von Badorff et al. [67] beschriebene Ausbildung von Gap Junctions zwischen EPCs und Kardiomyozyten bestätigt andere Berichte über Gap Junctions auf Endothelzellen [200,201], sie ist daher nicht unbedingt ein Zeichen für die elektrische Kopplung zweier kardialer Zellen und belegt an sich keine Differenzierung der EPCs zu Kardiomyozyten.

Ähnlich wie bei Badorff et al. wurden bei der Analyse der Kokulturen im Fluoreszenzmikroskop zunächst anscheinend Dil^{pos} Kardiomyozyten beobachtet. Allerdings zeigte eine genauere Untersuchung, dass ein Großteil der anscheinend Dil^{pos} Kardiomyozyten nicht Kardiomyozyten zeigt, die aus humanen EPCs entstanden sind, sondern Kardiomyozyten, die über oder unter EPCs oder EPC-Fragmenten liegen. Solche Bilder wurden, wie in Abbildung 3.19 gezeigt, in die Kategorien I und II eingeteilt. Bei der Analyse anscheinend doppelt-gefärbter Kardiomyozyten der Kategorie III wurden dagegen die Grenzen der konventionellen zweidimensionalen Immunfluoreszenz-Mikroskopie deutlich. Die erhaltenen Bilder doppelt-gefärbter Kardiomyozyten ließen sich weder als echte differenzierte EPCs mit Dil-Markierung und kardialer Marker-Expression noch zweifelsfrei als übereinander liegende Zellen identifizieren.

Dagegen zeigte eine dreidimensionale Analyse mithilfe des konfokalen Laser-Scan-Mikroskops für die Mehrheit der doppeltgefärbten Ereignisse der Kategorie III, dass Kardiomyozyten einfach über oder unter Dil-markierten EPCs oder EPC-Fragmenten lagen.

Für eine Minderheit der Kategorie III Ereignisse erlaubten allerdings auch die dreidimensionalen Abbildungen keine zweifelsfreie Interpretation der Bilder, wodurch die Schwierigkeiten bei der Analyse von Differenzierungen in Kokultur-Ansätzen mithilfe mikroskopischer Methoden verdeutlicht wurden. Auch mit Hilfe kofokaler Lasermikroskopie war es in einigen Fällen nicht möglich, zwischen einer Transdifferenzierung von Dil-markierten EPCs und Fusion von Dil-markierten EPCs oder EPC-Fragmenten mit Kardiomyozyten zu unterscheiden. Die Tatsache, dass ähnliche Beobachtungen anscheinend doppelt-gefärbter Zellen auch in Kokulturen gemacht wurden, für die kein

Potential für eine kardiale Differenzierung angenommen werden kann, belegt dass auch andere Mechanismen als eine Transdifferenzierung für eine Detektion Dil-gefärbter Kardiomyozyten verantwortlich sein könnten. Entsprechende Ergebnisse wurden sowohl mit einer immortalisierten Fibroblastenzelllinie als auch bei Kokultur von Kardiomyozyten mit terminal differenzierten Typ II Pneumozyten-ähnlichen MLE-12-Zellen erzielt. Eine Übertragung des Farbstoffes über das Medium wurde zwar nicht gezeigt, allerdings handelt es sich bei Makrophagen, die einen Großteil der sogenannten „EPC“-Präparationen ausmachen um einen der fusogensten Zelltypen überhaupt [202]. Eine Fusion vitaler EPCs mit Kardiomyozyten scheint vermutlich in den durchgeführten Versuchen keine große Rolle zu spielen, da in diesem Fall eine kardiale Genexpression der humanen Zellen zu erwarten gewesen wäre, die aber nicht gezeigt werden konnte (Abb. 3.25). Stattdessen erscheint eine Fusion von Dil-markierten Fragmenten abgestorbener „EPCs“ mit Kardiomyozyten oder das Anhaften solcher Fragmente an Kardiomyozyten wahrscheinlicher, die für ihre sehr adhäsive Zelloberfläche bekannt sind.

Neben Artefakten wie in den Abbildungen 3.20 und 3.21 gezeigt, wurden in der Umgebung von vitalen Kardiomyozyten eine beträchtliche Anzahl kleiner, sphärischer Zellen beobachtet, die sich α -Aktinin^{pos} darstellten und gleichzeitig eine rote, Dil-ähnliche Fluoreszenz zeigten (Abb. 3.22). Diese Zellen oder Zytosome waren sowohl in den Kokulturen als auch in reinen Kardiomyozyten-Kulturen vorhanden. Die Zahl dieser Zellen nahm mit dem Alter der Kulturen zu. Mithilfe des konfokalen Laser-Scan-Mikroskop konnte gezeigt werden, dass die Mehrheit dieser Zellen einen stark kondensierten Zellkern hatten, wie er für apoptotische Zellen typisch ist. Darüber hinaus wurden auch α -Aktinin^{pos} Zytosome mit ähnlichen Eigenschaften beobachtet, die anscheinend gar keinen Zellkern besaßen. Da bekannt ist, dass absterbende Zellen eine starke Autofluoreszenz zeigen, und da keinerlei Querstreifung in den kleinen kugeligen α -Aktinin^{pos} Zellen bzw. Zytosome zu erkennen war, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen Zellen vermutlich um absterbende oder tote Kardiomyozyten handelt, bei denen die kontraktile Strukturen bereits stark desorganisiert sind. Das Auftreten von Autofluoreszenz in alternden Kardiomyozyten-Kulturen ist schon seit längerem bekannt und wurde z.B. von Gao et al. beschrieben [203]. Zusammenfassend weisen die oben dargestellten Ergebnisse darauf hin, dass zumindest ein deutlicher Anteil der detektierten doppelt-positiver Zellen in den Kokulturen nicht die Folge einer Transdifferenzierung von humanen EPCs ist.

Um zu überprüfen, ob die mikroskopisch nachgewiesenen autofluoreszierenden Zellen auch die durchflusszytometrischen Ergebnisse von Badorff et al. erklären können, wurden EPCs mit Kardiomyozyten kokultiviert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Die

Kardiomyozyten wurden dazu mit einem herzspezifischen Antikörper gegen sarkomerisches α -Aktinin angefärbt. Im Gegensatz zu den von Badorff et al. durchgeführten Versuchen wurden die humanen Zellen nicht mit einem PE-gekoppelten Antikörper gegen HLA-DR, ein MHC Klasse II Antigen, identifiziert, da MHC Klasse II-Moleküle weder von humanen Kardiomyozyten [204] noch Rattenkardiomyozyten [205] exprimiert werden, und es deshalb auch zweifelhaft ist, ob aus EPCs differenzierte humane Kardiomyozyten MHC Klasse II Moleküle tragen würden. Stattdessen wurden die EPCs vor der Kokultivierung mit Kardiomyozyten mit dem roten Membranfarbstoff CM-Dil markiert. Wie von Badorff et al. berichtet, nahm der Anteil der Zellen, die für sarkomerisches α -Aktinin positiv waren und gleichzeitig eine rote Fluoreszenz zeigten, während der Kokultivierung von Tag 0 zu Tag 6 zu. Allerdings zeigten auch Kokulturen mit unmarkierten EPCs und sogar reine Kardiomyozyten-Kulturen ebenfalls eine Zunahme α -Aktinin^{pos} Zellen mit einer Dil-ähnlichen roten Autofluoreszenz (Abb. 3.23).

Zusätzlich zur bereits diskutierten Autofluoreszenz könnten bei der durchflusszytometrischen Analyse der Kokulturen noch weitere Mechanismen, wie z.B. eine Farbstoffübertragung von markierten EPCs, Fusion von Kardiomyozyten mit EPCs oder EPC-Fragmenten oder einfach eine unvollständige Trennung der einzelnen Zellen durch die Trypsinbehandlung vor der Messung für die Detektion von doppelt-positiven Ereignissen verantwortlich sein. Da die doppelt-positiven Ereignisse sowohl bei der Verwendung eines grün fluoreszierenden Cy2TM-markierten Sekundäntikörpers zur Detektion von sarkomerischem α -Aktinin, als auch mit einem Cy5TM-markierten auftraten, kann ausgeschlossen werden, dass die im Rahmen dieser Dissertation beschriebenen durchflusszytometrischen Ergebnisse, insbesondere an nicht-Dil markierten Kulturen, in einer Überlappung von Emissionsspektren begründet liegen. Rot fluoreszierende Farbstoffe und das bei einer wesentlich höheren Wellenlänge emittierenden Cy5TM werden im FACSCalibur-Gerät durch zwei verschiedene Laser zeitversetzt angeregt und auch nacheinander detektiert.

Obwohl die im konfokalen Laser-Scan-Mikroskop beobachteten kondensierten Zellkerne der autofluoreszierenden Zellen typisch für apoptotische Zellen sind, wurde in einem TUNEL-Assay keine Apoptose nachgewiesen. Als zusätzlicher Ansatz zum Nachweis von Apoptose und/oder Nekrose der Zellen, wurden die Kardiomyozyten-Kulturen im Elektronenmikroskop untersucht. Mithilfe dieser Methode konnte eine beträchtliche Anzahl von Zellen in der Umgebung von Aggregaten vitaler Kardiomyozyten aufgrund ihrer Morphologie als nekrotische Kardiomyozyten identifiziert werden (Abb. 3.24), die den im konfokalen Laser-Scan-Mikroskop beobachteten autofluoreszierenden Kardiomyozyten gleichen. Ob es sich dabei tatsächlich wie vermutet um die gleichen Zellen handelt, wurde bisher nicht gezeigt, für

diesen Nachweis würde sich z.B. eine Färbung der Schnitte mit Gold-markierten Antikörpern gegen kardiale Proteine anbieten.

Um abschließend auch auf molekularer Ebene nach Hinweisen auf eine kardiale Differenzierung der humanen EPCs zu suchen, wurden spezies-spezifische RT-PCRs für die Detektion humaner herzspezifischer Transkriptionsfaktoren etabliert. Da diese PCRs mit einer Nachweisgrenze von maximal 100 Template-Molekülen pro PCR-Absatz sehr sensitiv waren, sollte mithilfe dieser Methode auch eine geringe Expression in einem kleinen Teil von transdifferenzierten oder auch fusionierten Zellen messbar sein. Die Transkriptionsfaktoren GATA-4, Nkx2.5 und FOG-2 wurden als Markergene ausgewählt, da sie nicht in EPCs exprimiert werden (auch nicht in den kontaminierenden Zelltypen Monozyten und Makrophagen) oder in anderen Zelltypen, die aus den EPC-Präparationen hervorgehen können, wie differenzierten Endothelzellen. Stattdessen ist die Expression dieser Transkriptionsfaktoren relativ spezifisch auf humane Kardiomyozyten in allen Entwicklungsstufen beschränkt. Von den drei ausgewählten Genen zeigt Nkx2.5 die früheste Expression bereits im frühen Herzfeld, dem „Cardiac Crescent“ [75]. Es wird in allen Entwicklungsstadien und im adulten Herz exprimiert und ist zumindest in P19-Karzinomzellen für die Festlegung der mesodermalen Zellen auf eine Entwicklung zu Herzmuskelzellen essentiell [206]. Eine Expression von GATA-4 kann zuerst im linearen Herzschauch detektiert werden, es wird außer in Kardiomyozyten auch vom Epithel des Intestinaltraktes, primitivem Endoderm und den Gonaden exprimiert [207]. Die Expression von FOG-2, dem Bindungspartner von GATA-4, setzt während der Auffaltung der Herzschleife ein. FOG-2 wird hauptsächlich im Herzen exprimiert, sowie im Nervensystem und im Hoden, aber auch in geringen Mengen in Lymphozyten [187]. Beide Faktoren, GATA-4 und FOG-2 können auch im adulten Herzen nachgewiesen werden [208].

Wie in der Abbildung 3.25 gezeigt, konnte in den Kokulturen keine Expression von GATA-4 und Nkx2.5 nachgewiesen werden, unabhängig davon, welches FCS für die Kultivierung verwendet wurde. Im Gegensatz dazu zeigte sich in einigen Fällen eine kaum nachweisbare Expression von FOG-2. Allerdings scheint diese sehr schwache FOG-2-Expression nicht die Anwesenheit humaner Kardiomyozyten widerzuspiegeln, sondern eher eine Kontamination humaner EPC-Präparationen mit anderen Zellen wie Lymphozyten, die ebenfalls FOG-2 exprimieren [187].

Zusammenfassend konnten im Rahmen der vorliegenden Dissertation keine Beweise für eine Differenzierung von adulten humanen EPCs aus dem peripheren Blut in Kardiomyozyten nach Kokultivierung mit neonatalen Rattenkardiomyozyten erbracht werden.

Obwohl nicht ganz ausgeschlossen werden kann, dass geringfügig abweichende Protokolle zu den unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben könnten, zeigen die im Rahmen der Promotion durchgeführten Versuche deutlich, dass die übliche Zwei-Farben-Analyse im Durchflusszytometer und konventionelle zweidimensionale Immunfluoreszenz-Mikroskopie nicht ausreichen, um eine Transdifferenzierung in Kokultur-Experimenten zweifelsfrei zu belegen oder auch auszuschließen. Eine Reihe von z.T. methodisch bedingten Artefakten, sowie die im Zusammenhang mit der Verwendung von Fluoreszenzmarkierungen bisher nicht berücksichtigte starke Autofluoreszenz von Kardiomyozyten, können leicht zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Auch die dreidimensionale konfokale Mikroskopie stößt bei der Beurteilung solcher Ereignisse an ihre Grenzen. Daten zur Differenzierung von Zellen in Kokultur-Systemen, die mithilfe dieser Methoden generiert wurden, sollten deshalb kritisch beurteilt und durch weitere Untersuchungen bestätigt werden.

4.3 Versuche zur kardialen Differenzierung von MSCs

Die Induktion kardialer Genexpression in mesenchymalen Stammzellen durch Behandlung mit 5-Azacytidin, die unter anderem für Zellen aus der Ratte beschrieben wurde [33], sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation überprüft werden, da eine solche Differenzierung umstritten ist und für nicht immortalisierte Zellen bisher nicht gezeigt werden konnte [34]. Zum einen sollten zu diesem Zweck die generierten Lentiviren zur Detektion kardialer Differenzierung zur Transduktion von rMSCs verwendet werden, zum anderen sollten außerdem die Lentiviren zur Induktion einer solchen Differenzierung getestet werden.

In den verwendeten primären rMSCs zeigten sich auch 4 Wochen nach der Behandlung mit 10 μ M 5-Azacytidin keine morphologischen Veränderungen wie eine Bildung von Myotuben oder spontane Kontraktionen der Zellen, wobei die von Makino et al. beschriebene Ausbildung von Myotuben [26] auch eher für Skelettmuskeln als für Kardiomyozyten charakteristisch gewesen wäre. Tatsächlich konnte aber in den rMSCs eine schwache Expression von ANF, MLC2v (siehe Abb. 3.26) und GATA-4 mittels RT-PCR gezeigt werden, dagegen kam es nicht zu einer nachweisbaren Expression von α -MHC und MLC2a. Die Expression einiger kardialer Gene bei gleichzeitiger Abwesenheit anderer Marker könnte darauf hinweisen, dass keine gerichtete Differenzierung zu Kardiomyozyten induziert wird. Stattdessen wäre denkbar, dass die Behandlung mit 5-Azacytidin durch dessen Einfluss auf eine Hypomethylierung der DNA eventuell zur Aktivierung einzelner Gene führt.

Die Anwendung der LentiShuttle-Vektoren zur Überexpression von GATA-4 und Nkx2.5 führte dabei zu keiner signifikanten Änderung des Expressionsmusters. Bei einer lentiviralen Expression von Nkx2.5 konnte in den durchgeführten Versuchen in der RT-PCR keine MLC2v-Expression nachgewiesen werden, allerdings ist die entsprechende Bande auch in den anderen Ansätzen sehr schwach, so dass die gebildete Menge der MLC2v-RNA eventuell dicht an der Nachweisgrenze der RT-PCR liegt.

Die Transkriptionsfaktoren Nkx2.5 und GATA-4 spielen normalerweise eine große Rolle bei der Aktivierung der Expression von ANF und MLC2v [86,88,96], allerdings wurde im Rahmen der durchgeführten Versuche weder für Nkx2.5 noch für GATA-4 gezeigt, dass nach einer Transduktion mit den entsprechenden lentiviralen Vektoren neben der RNA auch funktionelle Proteine gebildet werden. Dies könnte z.B. durch die Verwendung spezifischer Antikörper überprüft werden, wobei die volle Funktionalität der Transkriptionsfaktoren in Bezug auf ihre Fähigkeit zur Bindung an die DNA und Wechselwirkung mit anderen Faktoren nur in weitergehenden Untersuchungen (wie z.B. einem Gel-Shift-Assay oder nach Überexpression der Faktoren in Nkx2.5- bzw. GATA-4-defizienten Zellen/Tieren) bestätigt werden könnte.

Dass im vorliegenden Fall kein Einfluss der Transkriptionsfaktoren beobachtet wurde, könnte weiterhin auch auf Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies zurückzuführen sein: Ob eine Überexpression der humanen kardialen Transkriptionsfaktoren prinzipiell einen Einfluss auf Zellen der Ratte ausüben kann, ist bisher nicht geklärt. Eventuell ergeben sich daher abweichende Ergebnisse für humane Zellen, dies wurde im Falle der MSCs aber bisher nicht untersucht. Eine Verwendung der generierten Konstrukte zur Überexpression von humanem Nkx2.5 und GATA-4 ist im Rahmen weiterführender Studien nicht nur für humane MSCs geplant, sondern auch für MSCs sowie ES-Zellen aus Rhesus-Affen, da bei diesen Spezies stärkere Homologien der herzspezifischen Genexpression und -regulation als in der Kombination human / Ratte angenommen werden können.

Bei der Verwendung der generierten LentiShuttle-Vektoren Ce huANFp hrGFP WPRE bzw. Ce huMLC2vp hrGFP WPRE zur Detektion einer kardialen Differenzierung konnte die in der RT-PCR nachgewiesene Expression von ANF und MLC2v nicht bestätigt werden. Für alle transduzierten Zellen zeigte sich schon zu Beginn der Versuche eine schwache Fluoreszenz, die sich nach der Behandlung mit 5-Azacytidin nicht signifikant steigerte. Die Intensität der Fluoreszenz entsprach dabei der bereits beobachteten unspezifischen Fluoreszenz von Fibroblasten in Kardiomyozyten-Kulturen, die mit lentiviralen Vektoren mit herzspezifischen Promotoren transduziert wurden. Auch hier zeigte sich nach Transduktion mit pLentiShuttle Ce MLC2vp hrGFP WPRE eine etwas stärkerer Hintergrund als mit pLentiShuttle Ce ANFp hrGFP WPRE. Da im Verlauf der Kultivierung außerdem keine Veränderung der Fluoreszenzintensität beobachtet wurde, scheint es sich auch in den rMSCs um eine unspezifische Hintergrundfluoreszenz zu handeln.

Es wäre daher möglich, dass in der RT-PCR erhaltenen Signale auf eine Expression von ANF und MLC2v auf einem niedrigen Niveau in vielen Zellen hinweisen. Dieses Niveau hat demnach vermutlich nicht ausgereicht, um auch in den zuvor getesteten, in Kardiomyozyten funktionellen Reporterkonstrukten eine messbare GFP-Expression zu bewirken. Falls in den mit 5-Azacytidin behandelten Kulturen einzelne stark exprimierende Zellen vorhanden gewesen wären, die in der RT-PCR ebenfalls nur zu schwachen Banden führen sollten, wären sie vermutlich auch mit den LentiShuttle-Vektoren aufgrund ihrer stärkeren Fluoreszenz identifiziert worden.

Obwohl die Eignung der mithilfe des LentiShuttle-Systems generierten LentiShuttle-Vektoren als Nachweissystem zur Detektion kardialer Genexpression in Kardiomyozyten im Rahmen der Promotion erfolgreich demonstriert werden konnte, steht ihr Einsatz zur Überwachung von Differenzierungsvorgängen in Stammzellen noch aus.

Neben der Detektion kardialer Differenzierung in adulten Stammzellen ist innerhalb der Arbeitsgruppe auch die entsprechende Anwendung der im Rahmen der vorliegenden Dissertation entwickelten Vektoren in embryonalen Stammzellen aus Maus und Rhesus-Affe geplant. Noch ist unklar, wie hoch die ANF- und MLC2v-Expression in den aus Stammzellen generierten Kardiomyozyten im Vergleich zu den für die Testung der Vektoren verwendeten Rattenkardiomyozyten tatsächlich ist. Deshalb könnte auch hier die Höhe der Expression kardialer Gene und Transkriptionsfaktoren in den differenzierenden Zellen einen limitierenden Faktor für die Sensitivität des Nachweissystems darstellen.

5 Literatur

1. **Poss KD, Wilson LG, Keating MT.** Heart regeneration in zebrafish. *Science* 2002; 298: 2188-2190.
2. **Bettencourt-Dias M, Mittnacht S, Brockes JP.** Heterogeneous proliferative potential in regenerative adult newt cardiomyocytes. *J Cell Sci* 2003; 116: 4001-4009.
3. **Oberpriller JO, Oberpriller JC.** Response of the adult newt ventricle to injury. *J Exp Zool* 1974; 187: 249-253.
4. **Nadal-Ginard B.** Commitment, fusion and biochemical differentiation of a myogenic cell line in the absence of DNA synthesis. *Cell* 1978; 15: 855-864.
5. **Carbone A, Minieri M, Sampaolesi M, Fiaccavento R, De Feo A, Cesaroni P, Peruzzi G, Di Nardo P.** Hamster cardiomyocytes: a model of myocardial regeneration? *Ann N Y Acad Sci* 1995; 752: 65-71.
6. **Lutgens E, Daemen MJ, de Muinck ED, Debets J, Leenders P, Smits JF.** Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes. *Cardiovasc Res* 1999; 41: 586-593.
7. **Nakatsuji S, Yamate J, Kuwamura M, Kotani T, Sakuma S.** In vivo responses of macrophages and myofibroblasts in the healing following isoproterenol-induced myocardial injury in rats. *Virchows Arch* 1997; 430: 63-69.
8. **Lefterovich JM, Bedelbaeva K, Samulewicz S, Zhang XM, Zwas D, Lankford EB, Heber-Katz E.** Heart regeneration in adult MRL mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 9830-9835.
9. **Wobus AM.** Potential of embryonic stem cells. *Mol Aspects Med* 2001; 22: 149-164.
10. **Young HE, Black AC, Jr.** Adult stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004; 276: 75-102.
11. **Janes SM, Lowell S, Hutter C.** Epidermal stem cells. *J Pathol* 2002; 197: 479-491.
12. **Bjerknes M, Cheng H.** Multipotential stem cells in adult mouse gastric epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G767-777.
13. **Soonpaa MH, Field LJ.** Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res* 1998; 83: 15-26.
14. **Beltrami AP et al.** Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001; 344: 1750-1757.
15. **Urbanek K et al.** Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 10440-10445.
16. **Oh H et al.** Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 12313-12318.
17. **Matsuura K et al.** Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2004; 279: 11384-11391.
18. **Messina E et al.** Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 2004; 95: 911-921.
19. **Laugwitz KL et al.** Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 2005; 433: 647-653.
20. **Beltrami AP et al.** Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114: 763-776.
21. **Wagers AJ, Weissman IL.** Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004; 116: 639-648.
22. **Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS.** The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3: 393-403.
23. **Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV.** Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 1974; 17: 331-340.
24. **Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL.** Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 1998; 176: 57-66.
25. **Prockop DJ.** Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71-74.
26. **Makino S et al.** Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103: 697-705.
27. **Haaf T, Schmid M.** Experimental condensation inhibition in constitutive and facultative heterochromatin of mammalian chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 91: 113-123.

28. **Taylor SM, Jones PA.** Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* 1979; 17: 771-779.
29. **Constantinides PG, Jones PA, Gevers W.** Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature* 1977; 267: 364-366.
30. **Fukuda K.** Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif Organs* 2001; 25: 187-193.
31. **Hakuno D, Fukuda K, Makino S, Konishi F, Tomita Y, Manabe T, Suzuki Y, Umezawa A, Ogawa S.** Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation* 2002; 105: 380-386.
32. **Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, Zhou H, Chen Y.** Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004; 229: 623-631.
33. **Wakitani S, Saito T, Caplan AI.** Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995; 18: 1417-1426.
34. **Liu Y, Song J, Liu W, Wan Y, Chen X, Hu C.** Growth and differentiation of rat bone marrow stromal cells: does 5-azacytidine trigger their cardiomyogenic differentiation? *Cardiovasc Res* 2003; 58: 460-468.
35. **Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ.** Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999; 100: II247-256.
36. **Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, Jia ZQ, Tumiati LC, Allidina Y, Liu P, Li RK.** Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123: 1132-1140.
37. **Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, Chedrawy E, Eliopoulos N, Chiu RC.** Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 120: 999-1005.
38. **Olivares EL et al.** Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed infarcted rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H464-470.
39. **Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E, Chiu RC.** The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 122: 699-705.
40. **Pittenger MF et al.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.
41. **Shim WS et al.** Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 481-488.
42. **Perin EC et al.** Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2004; 110: II213-218.
43. **Wollert KC, Drexler H.** Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res* 2005; 96: 151-163.
44. **Yoon YS et al.** Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 2005; 115: 326-338.
45. **Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ.** Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 7841-7845.
46. **Prockop DJ, Sekiya I, Colter DC.** Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. *Cytotherapy* 2001; 3: 393-396.
47. **Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM.** Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002; 109: 337-346.
48. **Rosada C, Justesen J, Melsvik D, Ebbesen P, Kassem M.** The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. *Calcif Tissue Int* 2003; 72: 135-142.
49. **Planat-Benard V, Menard C, Andre M, Puceat M, Perez A, Garcia-Verdugo JM, Penicaud L, Casteilla L.** Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res* 2004; 94: 223-229.
50. **Gaustad KG, Boquest AC, Anderson BE, Gerdes AM, Collas P.** Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314: 420-427.
51. **Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG.** Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 2001; 153: 1133-1140.
52. **Orlic D et al.** Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-705.

53. **Jackson KA et al.** Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; 107: 1395-1402.
54. **Kajstura J et al.** Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res* 2005; 96: 127-137.
55. **Smith MA, Pallister CJ, Smith JG.** Stem cell factor: biology and relevance to clinical practice. *Acta Haematol* 2001; 105: 143-150.
56. **Goodell MA et al.** Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 938: 208-218; discussion 218-220.
57. **Zhang S, Wang D, Estrov Z, Raj S, Willerson JT, Yeh ET.** Both cell fusion and transdifferentiation account for the transformation of human peripheral blood CD34-positive cells into cardiomyocytes in vivo. *Circulation* 2004; 110: 3803-3807.
58. **Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW.** Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003; 422: 901-904.
59. **Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE.** Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004; 94: 678-685.
60. **Silva GV et al.** Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* 2005; 111: 150-156.
61. **Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM.** Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-967.
62. **Peichev M et al.** Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95: 952-958.
63. **Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T.** Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2000; 105: 1527-1536.
64. **Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T.** Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3422-3427.
65. **Kawamoto A et al.** Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 103: 634-637.
66. **Condorelli G et al.** Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 10733-10738.
67. **Badorff C et al.** Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 2003; 107: 1024-1032.
68. **Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S.** Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001; 89: E1-7.
69. **Gill M et al.** Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res* 2001; 88: 167-174.
70. **Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL.** Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003; 107: 1164-1169.
71. **Rehman J, Li J, Parvathaneni L, Karlsson G, Panchal VR, Temm CJ, Mahenthiran J, March KL.** Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte/macrophage-derived angiogenic cells. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 2314-2318.
72. **Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z.** Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science* 1988; 241: 708-712.
73. **Hubner G, Brauchle M, Smola H, Madlener M, Fassler R, Werner S.** Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine* 1996; 8: 548-556.
74. **Firulli AB, Thattaliyath BD.** Transcription factors in cardiogenesis: the combinations that unlock the mysteries of the heart. *Int Rev Cytol* 2002; 214: 1-62.
75. **Bruneau BG.** Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circ Res* 2002; 90: 509-519.
76. **Tam PP, Parameswaran M, Kinder SJ, Weinberger RP.** The allocation of epiblast cells to the embryonic heart and other mesodermal lineages: the role of ingression and tissue movement during gastrulation. *Development* 1997; 124: 1631-1642.
77. **Lough J, Sugi Y.** Endoderm and heart development. *Dev Dyn* 2000; 217: 327-342.

78. **Rafferty LA, Sutherland DJ.** TGF-beta family signal transduction in Drosophila development: from Mad to Smads. *Dev Biol* 1999; 210: 251-268.
79. **Schultheiss TM, Burch JB, Lassar AB.** A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev* 1997; 11: 451-462.
80. **Marvin MJ, Di Rocco G, Gardiner A, Bush SM, Lassar AB.** Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev* 2001; 15: 316-327.
81. **Schneider VA, Mercola M.** Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev* 2001; 15: 304-315.
82. **Tzahor E, Lassar AB.** Wnt signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis. *Genes Dev* 2001; 15: 255-260.
83. **Wang D, Chang PS, Wang Z, Sutherland L, Richardson JA, Small E, Krieg PA, Olson EN.** Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* 2001; 105: 851-862.
84. **Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RP.** Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* 1993; 119: 419-431.
85. **Ranganayakulu G, Elliott DA, Harvey RP, Olson EN.** Divergent roles for NK-2 class homeobox genes in cardiogenesis in flies and mice. *Development* 1998; 125: 3037-3048.
86. **Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, Harvey RP.** Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes Dev* 1995; 9: 1654-1666.
87. **Tanaka M, Chen Z, Bartunkova S, Yamasaki N, Izumo S.** The cardiac homeobox gene *Csx/Nkx2.5* lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development. *Development* 1999; 126: 1269-1280.
88. **Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz RJ, Nemer M.** The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *Embo J* 1997; 16: 5687-5696.
89. **Turbay D, Wechsler SB, Blanchard KM, Izumo S.** Molecular cloning, chromosomal mapping, and characterization of the human cardiac-specific homeobox gene *hCsx*. *Mol Med* 1996; 2: 86-96.
90. **Komuro I, Izumo S.** *Csx*: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 8145-8149.
91. **Heikinheimo M, Scandrett JM, Wilson DB.** Localization of transcription factor GATA-4 to regions of the mouse embryo involved in cardiac development. *Dev Biol* 1994; 164: 361-373.
92. **Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN.** Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 1997; 11: 1061-1072.
93. **Kuo CT, Morrissey EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Parmacek MS, Soudais C, Leiden JM.** GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev* 1997; 11: 1048-1060.
94. **Molkentin JD, Heikinheimo M, Scandrett JM, Wilson DB.** The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression Localization of transcription factor GATA-4 to regions of the mouse embryo involved in cardiac development. *J Biol Chem* 2000; 275: 38949-38952.
95. **Christoffels VM et al.** Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev Biol* 2000; 223: 266-278.
96. **Small EM, Warkman AS, Wang DZ, Sutherland LB, Olson EN, Krieg PA.** Myocardin is sufficient and necessary for cardiac gene expression in *Xenopus*. *Development* 2005; 132: 987-997.
97. **Laverriere AC, MacNeill C, Mueller C, Poelmann RE, Burch JB, Evans T.** GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem* 1994; 269: 23177-23184.
98. **Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME.** The arterial pole of the mouse heart forms from *Fgf10*-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell* 2001; 1: 435-440.
99. **Abu-Issa R, Waldo K, Kirby ML.** Heart fields: one, two or more? *Dev Biol* 2004; 272: 281-285.
100. **Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, Evans S.** *Isl1* identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell* 2003; 5: 877-889.
101. **Srivastava D, Thomas T, Lin Q, Kirby ML, Brown D, Olson EN.** Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, *dHAND*. *Nat Genet* 1997; 16: 154-160.

102. **Zang MX, Li Y, Wang H, Wang JB, Jia HT.** Cooperative interaction between the basic helix-loop-helix transcription factor dHAND and myocyte enhancer factor 2C regulates myocardial gene expression. *J Biol Chem* 2004; 279: 54258-54263.
103. **Bruneau BG, Logan M, Davis N, Levi T, Tabin CJ, Seidman JG, Seidman CE.** Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome. *Dev Biol* 1999; 211: 100-108.
104. **Bruneau BG, Bao ZZ, Tanaka M, Schott JJ, Izumo S, Cepko CL, Seidman JG, Seidman CE.** Cardiac expression of the ventricle-specific homeobox gene *Irx4* is modulated by Nkx2-5 and dHand. *Dev Biol* 2000; 217: 266-277.
105. **Bruneau BG et al.** Cardiomyopathy in *Irx4*-deficient mice is preceded by abnormal ventricular gene expression. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 1730-1736.
106. **Kageyama R, Ishibashi M, Takebayashi K, Tomita K.** bHLH transcription factors and mammalian neuronal differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 1389-1399.
107. **Tevosian SG, Deconinck AE, Cantor AB, Rieff HI, Fujiwara Y, Corfas G, Orkin SH.** FOG-2: A novel GATA-family cofactor related to multitype zinc-finger proteins Friend of GATA-1 and U-shaped. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 950-955.
108. **Crispino JD, Lodish MB, Thurberg BL, Litovsky SH, Collins T, Molkentin JD, Orkin SH.** Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG cofactors. *Genes Dev* 2001; 15: 839-844.
109. **Lu JR, McKinsey TA, Xu H, Wang DZ, Richardson JA, Olson EN.** FOG-2, a heart- and brain-enriched cofactor for GATA transcription factors. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 4495-4502.
110. **Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ.** Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996; 98: 216-224.
111. **Muller M et al.** Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells in vitro. *Faseb J* 2000; 14: 2540-2548.
112. **Schug J, Overton C.** TESS: Transcription Element Search Software on the WWW. Computational Biology and Informatics Laboratory, School of Medicine University of Pennsylvania, 1997.
113. **Stennard FA et al.** Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts with Nkx2-5, GATA4, and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart. *Dev Biol* 2003; 262: 206-224.
114. **Plageman TF, Jr., Yutzey KE.** Differential expression and function of Tbx5 and Tbx20 in cardiac development. *J Biol Chem* 2004; 279: 19026-19034.
115. **Argentin S, Ardati A, Tremblay S, Lihmann I, Robitaille L, Drouin J, Nemer M.** Developmental stage-specific regulation of atrial natriuretic factor gene transcription in cardiac cells. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 777-790.
116. **Ueyama T, Kasahara H, Ishiwata T, Nie Q, Izumo S.** Myocardin expression is regulated by Nkx2.5, and its function is required for cardiomyogenesis. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 9222-9232.
117. **Metzger JM, Lin WI, Johnston RA, Westfall MV, Samuelson LC.** Myosin heavy chain expression in contracting myocytes isolated during embryonic stem cell cardiogenesis. *Circ Res* 1995; 76: 710-719.
118. **Subramaniam A, Jones WK, Gulick J, Wert S, Neumann J, Robbins J.** Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J Biol Chem* 1991; 266: 24613-24620.
119. **Sanbe A, Gulick J, Hanks MC, Liang Q, Osinska H, Robbins J.** Reengineering inducible cardiac-specific transgenesis with an attenuated myosin heavy chain promoter. *Circ Res* 2003; 92: 609-616.
120. **Meyer N, Jaconi M, Landopoulou A, Fort P, Puceat M.** A fluorescent reporter gene as a marker for ventricular specification in ES-derived cardiac cells. *FEBS Lett* 2000; 478: 151-158.
121. **Franz WM, Breves D, Klingel K, Brem G, Hofschneider PH, Kandolf R.** Heart-specific targeting of firefly luciferase by the myosin light chain-2 promoter and developmental regulation in transgenic mice. *Circ Res* 1993; 73: 629-638.
122. **Zou Y, Chien KR.** EFIA/YB-1 is a component of cardiac HF-1A binding activity and positively regulates transcription of the myosin light-chain 2v gene. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2972-2982.
123. **Zhu H, Roy AL, Roeder RG, Prywes R.** Serum response factor affects preinitiation complex formation by TFIID in vitro. *New Biol* 1991; 3: 455-464.
124. **Shen RA, Goswami SK, Mascareno E, Kumar A, Siddiqui MA.** Tissue-specific transcription of the cardiac myosin light-chain 2 gene is regulated by an upstream repressor element. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 1676-1685.

125. **Miller-Hance WC, LaCorbiere M, Fuller SJ, Evans SM, Lyons G, Schmidt C, Robbins J, Chien KR.** In vitro chamber specification during embryonic stem cell cardiogenesis. Expression of the ventricular myosin light chain-2 gene is independent of heart tube formation. *J Biol Chem* 1993; 268: 25244-25252.
126. **Sassoon DA, Garner I, Buckingham M.** Transcripts of alpha-cardiac and alpha-skeletal actins are early markers for myogenesis in the mouse embryo. *Development* 1988; 104: 155-164.
127. **Garner I, Sassoon D, Vandekerckhove J, Alonso S, Buckingham ME.** A developmental study of the abnormal expression of alpha-cardiac and alpha-skeletal actins in the striated muscle of a mutant mouse. *Dev Biol* 1989; 134: 236-245.
128. **Kumar A et al.** Rescue of cardiac alpha-actin-deficient mice by enteric smooth muscle gamma-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 4406-4411.
129. **Gustafson TA, Kedes L.** Identification of multiple proteins that interact with functional regions of the human cardiac alpha-actin promoter. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 3269-3283.
130. **Sartorelli V, Webster KA, Kedes L.** Muscle-specific expression of the cardiac alpha-actin gene requires MyoD1, CArG-box binding factor, and Sp1. *Genes Dev* 1990; 4: 1811-1822.
131. **Chen CY, Schwartz RJ.** Competition between negative acting YY1 versus positive acting serum response factor and tinman homologue Nkx-2.5 regulates cardiac alpha-actin promoter activity. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 812-822.
132. **Biben C, Hadchouel J, Tajbakhsh S, Buckingham M.** Developmental and tissue-specific regulation of the murine cardiac actin gene in vivo depends on distinct skeletal and cardiac muscle-specific enhancer elements in addition to the proximal promoter. *Dev Biol* 1996; 173: 200-212.
133. **Lemonnier M, Buckingham ME.** Characterization of a cardiac-specific enhancer, which directs {alpha}-cardiac actin gene transcription in the mouse adult heart. *J Biol Chem* 2004; 279: 55651-55658.
134. **Greene WC, Peterlin BM.** Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* 2002; 8: 673-680.
135. **Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA.** Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 1998; 393: 648-659.
136. **Kozak SL, Heard JM, Kabat D.** Segregation of CD4 and CXCR4 into distinct lipid microdomains in T lymphocytes suggests a mechanism for membrane destabilization by human immunodeficiency virus. *J Virol* 2002; 76: 1802-1815.
137. **Doms RW, Trono D.** The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. *Genes Dev* 2000; 14: 2677-2688.
138. **Chan DC, Kim PS.** HIV entry and its inhibition. *Cell* 1998; 93: 681-684.
139. **Miller MD, Farnet CM, Bushman FD.** Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol* 1997; 71: 5382-5390.
140. **Weinberg JB, Matthews TJ, Cullen BR, Malim MH.** Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. *J Exp Med* 1991; 174: 1477-1482.
141. **Bukrinsky MI et al.** A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 1993; 365: 666-669.
142. **Sherman MP, de Noronha CM, Heusch MI, Greene S, Greene WC.** Nucleocytoplasmic shuttling by human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol* 2001; 75: 1522-1532.
143. **Gallay P, Hope T, Chin D, Trono D.** HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 9825-9830.
144. **Taube R, Fujinaga K, Wimmer J, Barboric M, Peterlin BM.** Tat transactivation: a model for the regulation of eukaryotic transcriptional elongation. *Virology* 1999; 264: 245-253.
145. **Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D.** In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; 272: 263-267.
146. **Blomer U, Naldini L, Kafri T, Trono D, Verma IM, Gage FH.** Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol* 1997; 71: 6641-6649.
147. **Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D, Kelly M, Nguyen M.** Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery - A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 1998; 72: 9873-9880.

-
148. **Vigna E, Naldini L.** Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med* 2000; 2: 308-316.
149. **Kumar M, Keller B, Makalou N, Sutton RE.** Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 1893-1905.
150. **Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D.** Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 1997; 15: 871-875.
151. **Follenzi A, Ailles LE, Bakovic S, Geuna M, Naldini L.** Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet* 2000; 25: 217-222.
152. **Meselson M, Yuan R.** DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* 1968; 217: 1110-1114.
153. **Arber W, Linn S.** DNA modification and restriction. *Annu Rev Biochem* 1969; 38: 467-500.
154. **Mossner E, Boll M, Pfeleiderer G.** Purification of human and bovine alkaline phosphatases by affinity chromatography. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1980; 361: 543-549.
155. **Ogden RC, Adams DA.** Electrophoresis in agarose and acrylamide gels. *Methods Enzymol* 1987; 152: 61-87.
156. **Vogelstein B, Gillespie D.** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 615-619.
157. **Brady G, Frey J, Danbara H, Timmis KN.** Replication control mutations of plasmid R6-5 and their effects on interactions of the RNA-I control element with its target. *J Bacteriol* 1983; 154: 429-436.
158. **Lund AH, Duch M, Pedersen FS.** Increased cloning efficiency by temperature-cycle ligation. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 800-801.
159. **Wallace DM.** Precipitation of nucleic acids. *Methods Enzymol* 1987; 152: 41-48.
160. **Calvin NM, Hanawalt PC.** High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* 1988; 170: 2796-2801.
161. **Akada R.** Quick-check method to test the size of *Escherichia coli* plasmids. *Biotechniques* 1994; 17: 58.
162. **Birnboim HC, Doly J.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7: 1513-1523.
163. **Berger SL.** Quantifying ³²P-labeled and unlabeled nucleic acids. *Methods Enzymol* 1987; 152: 49-54.
164. **Clark JM.** Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 9677-9686.
165. **Marchuk D, Drumm M, Saulino A, Collins FS.** Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 1154.
166. **Gruh I, Schwanke K, Wunderlich S, Blömer U, Scherr M, Ganser A, Haverich A, Martin U.** Shuttle System allowing simplified cloning of expression cassettes into advanced generation lentiviral vectors. *Biotechniques* 2005; 38: 530-534.
167. **Knop M, Barr F, Riedel CG, Heckel T, Reichel C.** Improved version of the red fluorescent protein (drFP583/DsRed/RFP). *Biotechniques* 2002; 33: 592, 594, 596-598 passim.
168. **Chen C, Okayama H.** High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 2745-2752.
169. **Scherr M, Battmer K, Blomer U, Ganser A, Grez M.** Quantitative determination of lentiviral vector particle numbers by real-time PCR. *Biotechniques* 2001; 31: 520, 522, 524, passim.
170. **Wagner E, Zenke M, Cotten M, Beug H, Birnstiel ML.** Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 3410-3414.
171. **Wagner E, Cotten M, Foisner R, Birnstiel ML.** Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 4255-4259.
172. **Kofidis T et al.** In vitro engineering of heart muscle: artificial myocardial tissue. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 124: 63-69.
173. **Dimmeler S et al.** HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 2001; 108: 391-397.
174. **Javazon EH, Colter DC, Schwarz EJ, Prockop DJ.** Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells* 2001; 19: 219-225.
175. **Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
176. **Wallace DM.** Large- and small-scale phenol extractions. *Methods Enzymol* 1987; 152: 33-41.
177. **Verma IM.** The reverse transcriptase. *Biochim Biophys Acta* 1977; 473: 1-38.

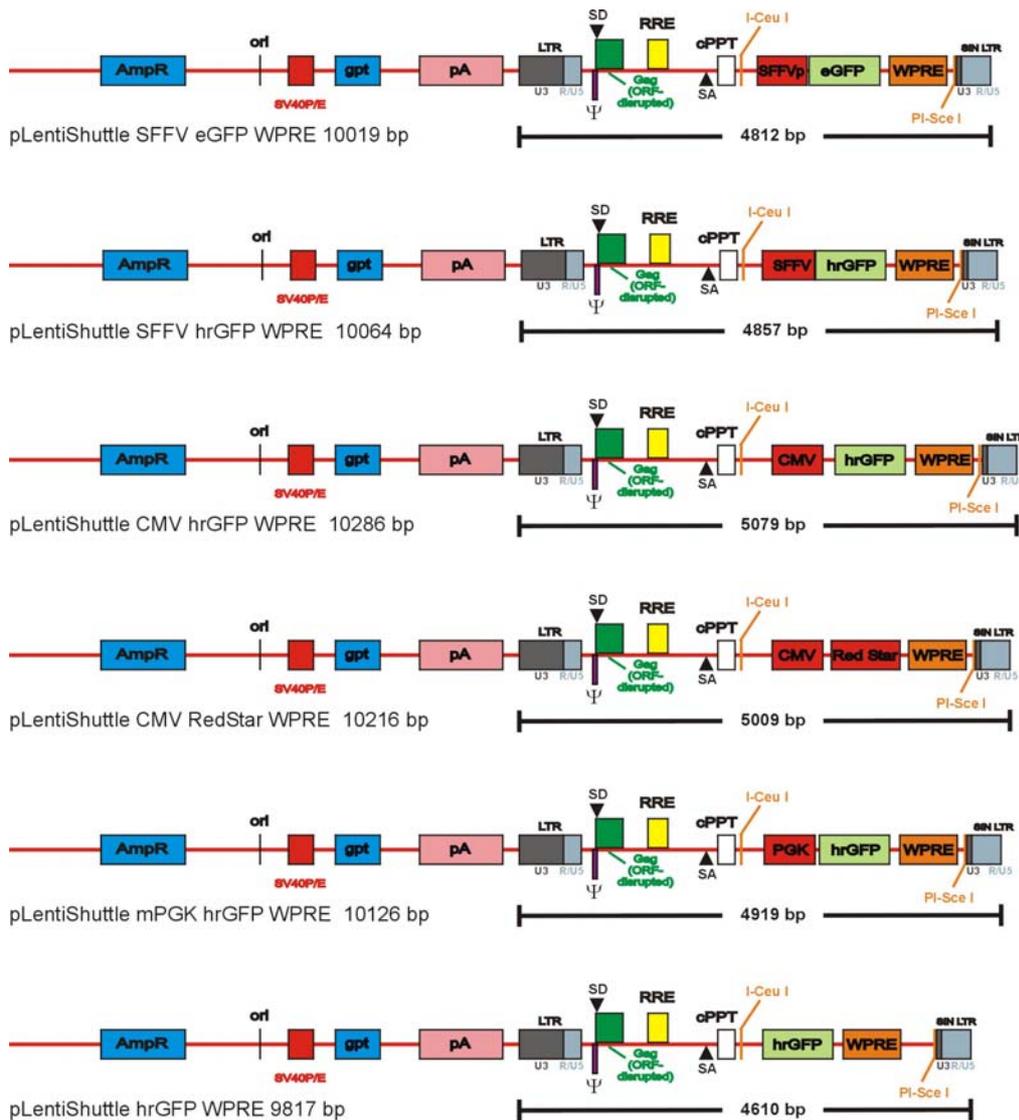
178. **Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-1354.
179. **Demaison C, Parsley K, Brouns G, Scherr M, Battmer K, Kinnon C, Grez M, Thrasher AJ.** High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of imunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 803-813.
180. **Blomer U, Gruh I, Witschel H, Haverich A, Martin U.** Shuttle of lentiviral vectors via transplanted cells in vivo. *Gene Ther* 2005; 12: 67-74.
181. **Holthofer H, Virtanen I, Kariniemi AL, Hormia M, Linder E, Miettinen A.** Ulex europaeus I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues. *Lab Invest* 1982; 47: 60-66.
182. **Jackson CJ, Garbett PK, Nissen B, Schrieber L.** Binding of human endothelium to Ulex europaeus I-coated Dynabeads: application to the isolation of microvascular endothelium. *J Cell Sci* 1990; 96 (Pt 2): 257-262.
183. **Martin U, Bock D, Arseniev L, Tornetta MA, Ames RS, Bautsch W, Kohl J, Ganser A, Klos A.** The human C3a receptor is expressed on neutrophils and monocytes, but not on B or T lymphocytes. *J Exp Med* 1997; 186: 199-207.
184. **Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Vile RG, Simari RD.** Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res* 2003; 93: 1023-1025.
185. **Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ.** Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 2004; 11: 36-42.
186. **Motulsky HJ.** Analyzing Data with GraphPad Prism. *GraphPad Software Inc.* 1999; San Diego.
187. **Holmes M, Turner J, Fox A, Chisholm O, Crossley M, Chong B.** hFOG-2, a novel zinc finger protein, binds the co-repressor mCtBP2 and modulates GATA-mediated activation. *J Biol Chem* 1999; 274: 23491-23498.
188. **Yamada K, Morozumi H, Okamoto T.** LTR-directed homologous recombination of full-length HIV-1 provirus clone in recA(-) bacteria. *Arch Virol* 1995; 140: 1007-1014.
189. **Kobayashi M, Tanaka A, Hayashi Y, Shimamura S.** The CMV enhancer stimulates expression of foreign genes from the human EF-1 alpha promoter. *Anal Biochem* 1997; 247: 179-181.
190. **Liu BH, Wang X, Ma YX, Wang S.** CMV enhancer/human PDGF-beta promoter for neuron-specific transgene expression. *Gene Ther* 2004; 11: 52-60.
191. **Minty A, Keddes L.** Upstream regions of the human cardiac actin gene that modulate its transcription in muscle cells: presence of an evolutionarily conserved repeated motif. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 2125-2136.
192. **Passier R, Mummery C.** Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 324-335.
193. **Grepin C, Nemer M.** Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor. *Development* 1997; 124: 2387-2395.
194. **Monzen K et al.** Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 7096-7105.
195. **Conti C, Mastromarino P, Orsi N.** Role of membrane phospholipids and glycolipids in cell-to-cell fusion by VSV. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1991; 14: 303-313.
196. **Nagata S, Kurata T, Ueno Y, Chiba J.** Vesicular stomatitis virus-mediated cell fusion subsequent to virus adsorption at different pH values. *Jpn J Med Sci Biol* 1991; 44: 171-180.
197. **Haas DL, Case SS, Crooks GM, Kohn DB.** Critical factors influencing stable transduction of human CD34(+) cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Mol Ther* 2000; 2: 71-80.
198. **Tiede A, Eder M, von Depka M, Battmer K, Luther S, Kiem HP, Ganser A, Scherr M.** Recombinant factor VIII expression in hematopoietic cells following lentiviral transduction. *Gene Ther* 2003; 10: 1917-1925.
199. **Gaspar HB et al.** Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 2004; 364: 2181-2187.
200. **Hoffmann A, Gloe T, Pohl U, Zahler S.** Nitric oxide enhances de novo formation of endothelial gap junctions. *Cardiovasc Res* 2003; 60: 421-430.
201. **Ryan MJ, Liu B, Herbowy MT, Gross KW, Hajduczuk G.** Intercellular communication between renin expressing As4.1 cells, endothelial cells and smooth muscle cells. *Life Sci* 2003; 72: 1289-1301.

-
202. **Camargo FD, Chambers SM, Goodell MA.** Stem cell plasticity: from transdifferentiation to macrophage fusion. *Cell Prolif* 2004; 37: 55-65.
 203. **Gao G, Johansson U, Rundquist I, Ollinger K.** Lipofuscin-induced autofluorescence of living neonatal rat cardiomyocytes in culture. *Mech Ageing Dev* 1994; 73: 79-86.
 204. **Steinhoff G, Wonigeit K, Schafers HJ, Haverich A.** Sequential analysis of monomorphic and polymorphic major histocompatibility complex antigen expression in human heart allograft biopsy specimens. *J Heart Transplant* 1989; 8: 360-370.
 205. **Milton AD, Spencer SC, Fabre JW.** Absence of class II major histocompatibility complex antigen induction in cyclosporine A--treated recipients of heart and kidney allografts in the rat. *Transplant Proc* 1987; 19: 192-194.
 206. **Jamali M, Rogerson PJ, Wilton S, Skerjanc IS.** Nkx2-5 activity is essential for cardiomyogenesis. *J Biol Chem* 2001; 276: 42252-42258.
 207. **Doevendans PA, van Bilsen M.** Transcription factors and the cardiac gene programme. *Int J Biochem Cell Biol* 1996; 28: 387-403.
 208. **Svensson EC, Tufts RL, Polk CE, Leiden JM.** Molecular cloning of FOG-2: a modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 956-961.

6 Anhang

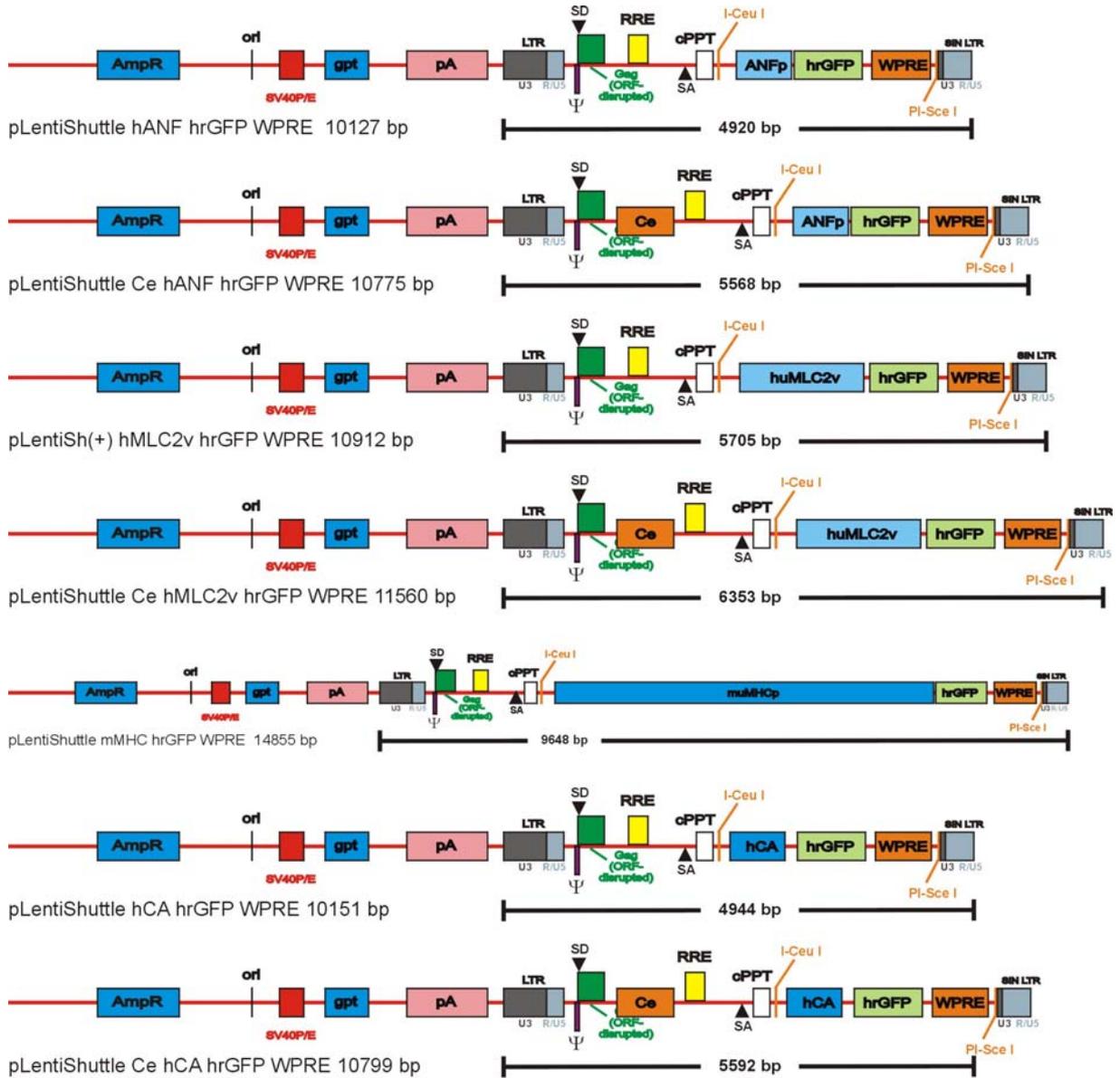
Maßstabsgetreue Abbildungen der generierten pLentiShuttle-Vektoren zur Herstellung replikationsdefizienter Lentiviren, die zirkulären Plasmide sind hier linearisiert dargestellt.

pLentiShuttle-Vektoren mit ubiquitären Promotoren:

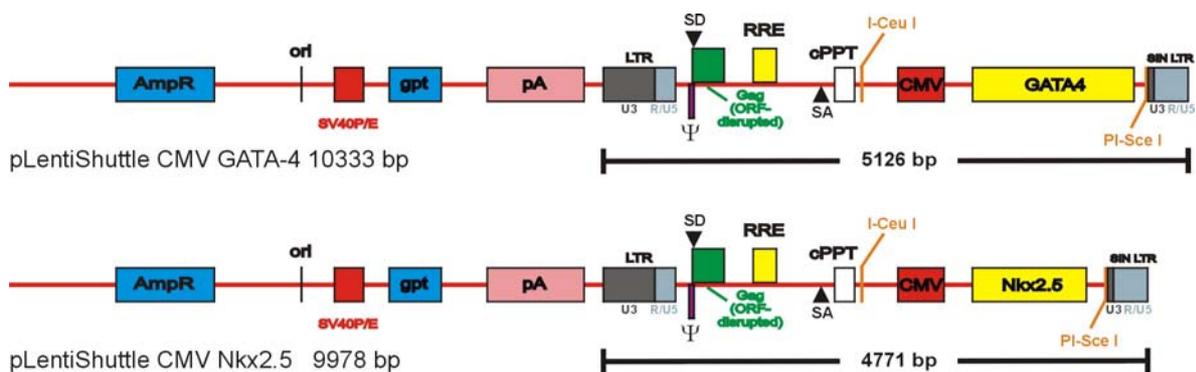


Abkürzungen: Amp^r, Ampicillinresistenz-Gen; cPPT, central polyurine tract; gpt, Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen; LTR, Long terminal repeat; ori, origin of replication / Replikationsstartpunkt; pA, Polyadenylierungssignal; Ψ, psi /packaging signal/Verpackungs-signal; RRE, rev responsive element; SA, Spleissakzeptorstelle; SD, Spleissdonorstellen; SIN LTR, selbst-inaktivierende LTR; SV40/E, simian virus 40 Promotor/Enhancer.

pLentiShuttle-Vektoren mit kardialen Promotoren:



pLentiShuttle-Vektoren zur Expression kardialer Transkriptionsfaktoren:



7 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
AIDS	„Acquired Immunodeficiency Syndrom“, erworbenes Immunschwäche-Syndrom
ANF	Atrialer Natriuretischer Faktor
ATPase	Adenosintriphosphatase
B CP	Bromchlorpropan
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CA	„Cardiac Actin“, kardiales α -Aktin
cDNA	„Copy“- oder komplementäre DNA
Ce	CMV-Enhancer
CIP	„Calf intestinal phosphatase“
CMV	Zytomegalie-Virus
cPPT	“central polypurine tract”
CSS	„Cardiac specific sequence“, Sequenz für kardiale Spezifität
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
Dil	1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DMEM	„Dulbecco´s Minimal Essentials Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EB	„Elution Buffer“, Elutionspuffer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	“Enhanced Green Fluorescent Protein”
EPC	„Endothelial progenitor cell“, Endothel-Vorläuferzelle
et al.	„et alii“, und andere

FACS	„Fluorescence Activated Cell Sorting“, Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FL-1	Fluoreszenzkanal 1 im Durchflusszytometer
FL-2	Fluoreszenzkanal 2 im Durchflusszytometer
FOG-2	„Friend of GATA“- 2
FSC	„Forward Scatter“, Engwinkelstreulicht
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GFP	„Green fluorescent protein“, Grünes Fluoreszenz-Protein
h	Stunde
h, hu	human
HIV-1	Humanes Immundefizienzvirus 1
hrGFP	Humanisiertes <i>Renilla reniformis</i> . Green Fluorescent Protein
HUVEC	„Human umbilical vein endothelial cells“, humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IU	„infectious units“, infektiöse Einheiten
KM	Bezeichnung für Kardiomyozyten-Primer
L	Liter
LB	Luria Broth
LDL	“Low density lipoprotein”
LTR	“Long terminal repeat”
M	Molar, mol/L
m...	Milli...
μ...	Mikro...
MEF	“Myocyte enhancer factor”
MHC	„Myosin heavy chain“, Schwere Kette- Myosin oder “Major Histocompatibility Complex”
min	Minute
MLC	„Myosin light chain“, Leichte Kette- Myosin
mm	„mismatch“, Basenfehlpaarung bei Oligonukleotiden
M-MLV	Moloney Muriner Leukämie Virus
MOI	„multiplicity of infection“, Virenzahl pro Zellzahl
mRNA	messenger-RNA
MSC	„Mesenchymal stem cells“, mesenchymale Stammzellen

MSCGM	„Mesenchymal stem cell growth medium“
mu	murin
n...	Nano...
NLS	„Nuclear localization signal“, Kerntransportsignal
NRCM	„Neonatal rat cardiomyocytes“, neonatale Rattenkardiomyozyten
OD	Optische Dichte
ON	über Nacht
p	Promotor
PBMCs	„Peripheral blood mononuclear cells“ Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PD	Privatdozent
PEG	Polyethylenglycol
PenStrep	Penicillin, Streptomycin
PGK	Phosphoglyceratkinase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PIC	Präintegrationskomplex
polyA	Polyadenylierungssignal
r	Ratte
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rPH	„rat prolyl-hydroxylase“, Antigen von Rattenfibroblasten
rpm	„rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
RS-Zellen	„Recycling stem cells“
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkription - Polymerase Kettenreaktion
s	Sekunde
SCF	„Stem cell factor“, Stammzellfaktor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIN	selbst-inaktivierend
SFFV	„Spleen Focus Forming Virus“
SMC	„Smooth muscle cells“, Glatte Muskelzellen
SP-Zellen	„Side-population“-Zellen
SRF	„Serum Response factor“
SSC	„Side Scatter“, Seiten-Streulicht

T_A	Annealingtemperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA (-Puffer)
TRE	„Thyroid response element“
TUNEL	„Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling“
U	Unit, Enzymaktivitätseinheit
u.a.	unter anderem
UEA-1	<i>Ulex europaeus</i> agglutinin 1
UTR	“Untranslated region”
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	„Vascular endothelial growth factor“
VSV-G	Glykoprotein des Vesikulären Stomatitisvirus
WPRE	„Woodchuck Hepatitis virus post-transcriptional regulatory element“
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

8 Lebenslauf

Von Dipl.-Biochem. Ina Gruh, geb. Schaffmeister

Schulbildung	1981-1985 Grundschule Augustfehn 1985-1987 Orientierungsstufe Apen 1987-1994 Gymnasium Westerstede
Schulabschluss	Allgemeine Hochschulreife
Studium	1995-2001 Diplom-Biochemie an der Universität Hannover, Diplomarbeit: „Untersuchungen zur kardialen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen“ in den Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe, Medizinische Hochschule Hannover
Studienabschluss	2001 mit Abgabe der Diplomarbeit
Promotion	2001-2005 Promotion Biochemie an der Universität Hannover, „Untersuchungen zur kardialen Differenzierung adulter Stammzellen und Entwicklung lentiviraler Vektoren zur spezifischen Detektion und Aufreinigung von Kardiomyozyten“, in den Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe, Medizinische Hochschule Hannover

Bisherige Publikationen

Gruh I, Wunderlich S, Winkler M, Schwanke K, Heinke J, Blömer U, Ruhparwar A, Haverich A, Martin U. Human CMV enhancer: a versatile tool to enhance cell-type-specific expression from lentiviral vectors. *Manuskript in Vorbereitung* 2005.

Gruh I, Beilner J, Blömer U, Schmiedl A, Schmidt-Richter I, Haverich A, Martin U. No Evidence of Cardiac Differentiation of Human Endothelial Progenitor Cells after Coculture with Neonatal Rat Cardiomyocytes. *Zur Veröffentlichung eingereicht* 2005.

Gruh I, Schwanke K, Wunderlich S, Blömer U, Scherr M, Ganser A, Haverich A, Martin U. Shuttle System allowing simplified cloning of expression cassettes into advanced generation lentiviral vectors. *Biotechniques* 2005; 38: 530-534.

Blömer U, Gruh I, Witschel H, Haverich A, Martin U. Shuttle of lentiviral vectors via transplanted cells in vivo. *Gene Ther* 2005; 12: 67-74.

Abstracts

Gruh I, Beilner J, Blömer U, Schmiedl A, Schmidt-Richter I, Haverich A, Martin U. No Evidence of Cardiac Differentiation of Human Endothelial Progenitor Cells after Coculture with Neonatal Rat Cardiomyocytes. *The International Society for Heart and Lung Transplantation 25th Annual Meeting and Scientific Sessions*: Philadelphia, USA, 2005.

Gruh I, Beilner J, Blömer U, Schmiedl A, Schmidt-Richter I, Haverich A, Martin U. No Evidence for Cardiac Differentiation of Human Endothelial Progenitor Cells after Coculture with Neonatal Rat Cardiomyocytes. *Leibniz Symposium on Transplantation and Regeneration of Thoracic Organs*: Hannover, 2004.

Gruh I et al. Construction of lentiviral vectors mediating cardiomyocyte specific expression. *Leibniz Symposium on Transplantation and Regeneration of Thoracic Organs*: Hannover, 2004.

Gruh I, Beilner J, Blömer U, Scherr M, Schmidt-Richter I, Haverich A, Martin U. No Evidence for Cardiac Differentiation of Human Endothelial Progenitor Cells after Coculture with Neonatal Rat Cardiomyocytes. *13. Jahrestagung der Deutschen Transplantations-Gesellschaft*: Kiel, 2004.

Gruh I, Beilner J, Blömer U, Scherr M, Schmidt-Richter I, Haverich A, Martin U. No Evidence for Cardiac Differentiation of Human Endothelial Progenitor Cells after Coculture with Neonatal Rat Cardiomyocytes. *12th Annual International Symposium on Recent Advances in Stem Cell Transplantation*: Heidelberg, 2004.

Gruh I, Beilner J, Blömer U, Scherr M, Schmidt-Richter I, Haverich A, Martin U. No Evidence for Cardiac Differentiation of Human Endothelial Progenitor Cells after Coculture with Neonatal Rat Cardiomyocytes. *2nd International Meeting Stem Cell Network North Rhine Westphalia*: Bonn/Bad Godesberg, 2004.

Gruh I, Beilner J, Blömer U, Scherr M, Schmidt-Richter I, Haverich A, Martin U. No Evidence for Cardiac Differentiation of Human Endothelial Progenitor Cells after Coculture with Neonatal Rat Cardiomyocytes. *Keystone Symposium "Stem Cells"*: Colorado, USA, 2004.

Scherr M, Gruh I, Schwanke K, Blömer U, Beilner J, Ruhparwar A, Ganser A, Haverich A, Martin U. Construction of lentiviral vectors allowing selection of stem cell derived cardiomyocytes. *German Society for Cell Biology, Society for Developmental Biology: 1st Cell Biology and Development Meeting*: Bonn, 2003.

Scherr M, Gruh I, Schwanke K, Blömer U, Beilner J, Ruhparwar A, Ganser A, Haverich A, Martin U. Construction of lentiviral vectors allowing selection of stem cell derived cardiomyocytes. *Keystone Symposium "From Stem Cells to Therapy"*: Colorado, USA, 2003.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. W. Müller herzlich für die Übernahme des Referates und für die Betreuung in der Endphase der Promotion.

Bei Herrn Prof. Dr. A. Haverich und Herrn Prof. Dr. Ulrich Martin möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, die vorliegende Arbeit in den Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe an der MHH anfertigen zu können.

Uli danke ich außerdem für die Betreuung meiner Arbeit und die Übernahme des Korreferats, seine Unterstützung in den letzten Jahren, seine Ideen, Lob und Kritik, sowie für die gute Zusammenarbeit, bei der ich immer etwas von ihm lernen konnte.

Ein besonderer Dank gilt auch Ingrid Schmidt-Richter, ohne deren Hilfe ich das Langzeitprojekt „Kokulturen“ wohl nicht überstanden hätte. Ich danke ihr nicht nur für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche, sondern auch für ihre Geduld und den gegenseitigen seelischen Beistand, den das Projekt hin und wieder erforderte.

Allen Diplomanden und Praktikanten danke ich für die Klonierung von immer neuen Vektoren und ihre vielen Fragen zum Thema Lentiviren. Besonders möchte ich mich bei Stephanie Wunderlich und Jennifer Heinke bedanken, die im Rahmen ihrer Diplomarbeiten das „S2-Land“ kennen gelernt haben und mir dort eine große Hilfe waren - wie es Steffi jetzt noch immer ist. Auch bei Kristin Schwanke möchte ich mich für die Klonierung zahlreicher Vektoren bedanken. Danke dafür und auch für den Spaß, den wir bei der gemeinsamen Arbeit hatten.

Dafür danke ich auch Sandra Menke und Dr. Monica Winkler, sowie für das entspannte Gespräch zwischendurch, die angenehme Gesellschaft beim Essen oder im „Denkraum“ und so manchen fachlichen Rat.

Ich danke weiterhin allen, die sich mit mir zusammen an der Isolierung von adulten Kardiomyozyten versucht haben. Danke vor allem an Dr. Bettina Sohns, die mir auch sonst in der Anfangsphase meiner Diplom- und Promotionszeit sehr geholfen hat, an Kristin Schwanke und an Arne Kowalski. In diesem Zusammenhang danke ich auch Frau Prof. Dr. Sian Harding und Peter O’Gara (National Heart and Lung Institute, London) für die Einblicke in ihre Arbeit.

Ich bedanke mich bei Sandra Menke auch für die Durchführung der Real-Time-PCRs, bei Janina Beilner für die Durchführung einiger Kokultur-Experimente, bei Prof. Dr. Ulrike Blömer für die gute Zusammenarbeit bei den Transwell-Versuchen und die Aufnahmen am „Confocal“ in Kiel, bei Prof. Dr. Michaela Scherr für die Möglichkeit, in der Abteilung Hämatologie/Onkologie der MHH das Arbeiten im S2-Labor zu erlernen und bei Karin Battmer für die nette Unterstützung dabei.

Ich danke auch der Graduiertenförderung der Medizinischen Hochschule Hannover sowie der Niedersachsen Stiftung / CORTISS für ihre Unterstützung während der Promotion.

Mein Dank gilt außerdem allen Mitgliedern des LEBAO, die dazu beigetragen haben, dass ich mich dank der netten Atmosphäre dort immer sehr wohlfühlt habe. Insbesondere danke ich allen auch für einen unvergesslichen Junggesellenabschied.

Nicht zuletzt danke ich meinem Mann Alexander, der mich bei meiner Arbeit immer unterstützt und bestärkt hat, für sein Verständnis und seine Anteilnahme an den Höhen und Tiefen während des Studiums und besonders während der Promotionszeit. Danke.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Untersuchungen zur kardialen Differenzierung adulter Stammzellen und Entwicklung lentiviraler Vektoren zur spezifischen Detektion und Aufreinigung von Kardiomyozyten“ selbständig verfasst sowie alle benutzten Hilfsmittel, Quellen und zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe. Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation nicht bereits als Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, April 2005