

# **Herstellung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) aus Nabelschnurblut**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften  
Dr.rer.nat.  
genehmigte Dissertation  
von

Dipl.-Biol. Alexandra Haase  
geboren am 24. August 1975 in Göttingen

2010

Referent: Prof. Dr. Ulrich Martin  
Korreferent: Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo  
Tag der Promotion: 18.02.2011

Diese Dissertation widme ich meinen Kindern Klara-Marie und Linus Maximilian

## ZUSAMMENFASSUNG

Für die Entwicklung innovativer zellbasierter Therapien stellt die Verfügbarkeit einer geeigneten Zellquelle in vielen Fällen ein bisher unlösbares Problem dar: Die benötigten menschlichen Zelltypen lassen sich entweder nicht oder nur schlecht aus Biopsien gewinnen und kultivieren, oder aber nicht im, für regenerative Therapien, notwendigen Maßstab vermehren.

Im Vergleich zu adulten Stammzellen, stellen pluripotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen) bisher den Goldstandard im Hinblick auf die Differenzierungskapazität und das Expansionspotential dar. ES-Zellen sind in der Lage, jeden Zelltyp des Körpers zu bilden und lassen sich praktisch unbegrenzt vermehren. Auf der anderen Seite kommen menschliche embryonale Stammzellen wegen der fehlenden autologen Verfügbarkeit, sowie vor allem aber aus ethischen Gründen für klinische Anwendungen kaum in Frage.

Die 2007 durch S. Yamanaka vorgestellte, bahnbrechende Technologie zur Herstellung induzierter pluripotenter Stammzellen (iPS-Zellen) durch Reprogrammierung von somatischen Zellen hat inzwischen völlig neue Möglichkeiten zur Herstellung ethisch unbedenklicher und praktisch unbegrenzt vermehrbare Stammzellen eröffnet, die im Prinzip in alle Zelltypen differenziert werden können. Für zukünftige klinische Anwendungen insbesondere autologer iPS-Zellderivate war bisher jedoch ein hochrelevanter, kritischer Aspekt dieser neuen Technologie unbeachtet geblieben: Zeit des Lebens häufen sich Fehler im Erbgut von Körperzellen an, welche entscheidend zur altersbedingten Zunahme von Krebserkrankungen und dem fortschreitenden Funktionsverlust von Organen beitragen. Da bei der Reprogrammierung angehäufte Mutationen nicht korrigiert werden, könnten auch iPS-Zellen, die aus Zellen älterer Individuen generiert werden, eine geringere Funktionalität und eine erhöhte Tendenz zur Entartung aufweisen.

Eine Lösung dieses Problems könnte die Einlagerung junger, patienteneigener Zellquellen für die spätere, bedarfsgerechte Herstellung von iPS-Zellen darstellen. Aufgrund der breiten Verfügbarkeit, der bereits existierenden Infrastrukturen der Stammzellbanken und der Möglichkeit der nicht-invasiven Isolierung bietet Nabelschnurblut als Zellquelle für die Herstellung von iPS-Zellen besondere Vorteile.

Mit diesem Hintergrund war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Eignung von Endothelzellen aus Nabelschnurblut für die Induktion pluripotenter Stammzellen zu prüfen, und resultierende iPS-Zellen detailliert zu charakterisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es nun weltweit erstmals gelungen, menschliche iPS-Zellen aus Nabelschnurblut (hCBiPS-Zellen) herzustellen. Dabei erwiesen sich über Plastikadhärenz aus Nabelschnurblut isolierte Endothelzellen als exzellente Zellquelle für die Reprogrammierung zu iPS-Zellen. Die relativ hohe endogene Expression des Reprogrammierungsfaktors MYC in diesen Endothelzellen scheint dabei eine wichtige Grundlage für die beobachtete effiziente Reprogrammierbarkeit darzustellen. Die hergestellten hCBiPS-Zellen glichen sowohl morphologisch, epigenetisch als auch auf Expressionsebene humanen ES-Zellen. Die Bildung von Teratomen nach Injektion in immundefiziente SCID-Mäuse, genauso wie das nachgewiesene *in vitro* Differenzierungspotential einschließlich der Bildung funktioneller Herzmuskelzellen, sind weitere Belege für die Pluripotenz der generierten hCBiPS-Zellen.

Die gewonnenen Erkenntnisse liefern eine wichtige Grundlage für die geplante, vergleichende Analyse von iPS Zellen, die aus Zellen von jungen und alten Patienten hergestellt wurden und im Hinblick auf deren onkogenes Potential und zelluläre Funktionalität untersucht werden sollen. Langfristig könnte die breite Verfügbarkeit von Nabelschnurblutisolaten in öffentlichen und kommerziellen Zellbanken nicht nur die klinische Anwendung autologer iPS-Zellpräparate, sondern auch den Aufbau weltweiter Banken für die allogene Transplantation von iPS-Derivaten erlauben.

Induzierte pluripotente Stammzellen; Reprogrammierung; Nabelschnurblut

## ABSTRACT

The availability of appropriate cell sources for the development of cell based therapies seems to be an insolvable problem: the required human cell types are difficult to isolate and to cultivate from biopsies and clinical required cell amounts can not be produced.

Embryonic stem cells (ES cells) might provide a viable cell source, due to their potential for unlimited proliferation and the capacity to differentiate into every cell type of the body. On the other hand embryonic stem cells are not appropriate for clinical application since they are not autologous and, in addition, for ethical reasons demanding the destruction of blastocyst-stage embryos.

The groundbreaking technology presented 2007 from S. Yamanaka for the generation of induced pluripotent stem cells (iPS cells) offers new possibilities for the production of ethically unobjectionable, patient-specific pluripotent stem cells, that have an ES cell-like potential.

However, one critical and highly relevant aspect for future clinical application of iPS cell derivatives was hitherto disregarded: genomic mutations of somatic cells accumulate during a lifetime and contribute to age-related increase in tumor formation and progressive loss of organ function.

Acquired chromosomal abnormalities and/or point mutations cannot be corrected during the reprogramming process and are thus likely to influence the function and cancer formation potential of iPS cell derivatives that were reprogrammed from elderly patients.

A possible solution of this problem might be the storage of juvenile, autologous cell sources for future production of iPS cells on demand. Due to the broad availability of established stem cell banks and the non-invasive cell-collection procedure, cord blood is a promising cell source for the generation of iPS cells.

This background in mind, it was the aim of this thesis, to test the ability of cord blood-derived endothelial cells for the induction of pluripotent stem cell and to characterise the resulting iPS cells in detail.

Within this thesis it was enabled for the first time world-wide to generate human iPS cells from cord blood (hCBiPS cells). It was identified that endothelial cells isolated from cord blood by adherence on tissue culture plastic comprise an excellent cell source for the reprogramming into induced pluripotent stem cells. The high endogenous expression of the reprogramming factor MYC seems to be an important basis for the observed relative high reprogramming efficiency of cord blood endothelial cells. The generated hCBiPS cells were morphologically and epigenetically similar to ES cells and express typical ES cell marker genes. Teratoma formation after injection into immunodeficient SCID-mice and the differentiation potential *in vitro*, inclusively generation of functional cardiomyocytes, serve as further evidences for the pluripotency of generated hCBiPS cells.

The herein acquired insights provide an important basis for the future analysis of iPS cells from young versus old patients regarding their oncogenic potential and functionality. Long-term, the broad availability of cord blood isolates in public and commercial cell banks could enable not only the clinical application but also allow the development of global banks for the allogenic, HLA (human leukocyte antigen)-specific iPS line production and storage: these cell banks could finally provide the mandatory cell source for the derivation of clinically relevant cell numbers and quality.

Induced pluripotent stem cells; Reprogramming; Cord blood

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>12</b>
1.1. REGENERATIVE THERAPIEN	12
1.2. STAMMZELLEN ALS ZELLQUELLE FÜR DIE REGENERATIVE THERAPIE	12
1.2.1. <i>Embryonale Stammzellen</i>	13
1.2.2. <i>Adulte Stammzellen</i>	14
1.3. STRATEGIEN ZUR REPROGRAMMIERUNG VON SOMATISCHEN ZELLEN	14
1.3.1. <i>Reprogrammierung durch Zellkerntransfer</i>	15
1.3.2. <i>Reprogrammierung durch Fusion</i>	17
1.4. HERSTELLUNG VON PLURIPOTENTEN ZELLEN DURCH REPROGRAMMIERUNG ANHAND DER ÜBEREXPRESSION VON PLURIPOTENZ-ASSOZIIERTEN FAKTOREN- DIE IPS-TECHNOLOGIE	18
1.4.1. <i>Probleme, Risiken und Fortschritt in der iPS-Technologie</i>	21
1.5. NABELSCHNURBLUT ALS SOMATISCHE ZELLQUELLE ZUR HERSTELLUNG VON IPS-ZELLEN	26
1.6. ZIELSETZUNG	29
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>30</b>
2.1. MATERIAL	30
2.1.1. <i>Geräte</i>	30
2.1.2. <i>Verbrauchsmaterialien</i>	31
2.1.3. <i>Chemikalien</i>	32
2.1.4. <i>Lösungen und Puffer</i>	34
2.1.4.1. <i>Molekularbiologische und immunhistologische Lösungen und Puffer</i>	34
2.1.4.2. <i>Lösungen, Puffer und Enzyme für die Zellkultur</i>	35
2.1.5. <i>Gebrauchsfertige Kits</i>	35
2.1.6. <i>Molekulargewichtsmarker</i>	36
2.1.7. <i>Oligonukleotide</i>	36
2.1.8. <i>Vektoren</i>	39
2.1.9. <i>Antikörper</i>	42
2.1.9.1. <i>Primärantikörper</i>	42
2.1.9.2. <i>Sekundärantikörper</i>	43
2.1.9.3. <i>Isotypen Negativkontrollen</i>	43
2.1.10. <i>Medien</i>	43
2.1.10.1. <i>Nährmedien für Bakterien</i>	43
2.1.10.2. <i>Basalmedien für die Zellkultur</i>	44
2.1.10.3. <i>Medienzusätze</i>	44
2.1.10.4. <i>Kulturmedium für embryonale murine Fibroblasten und humane Lungenfibroblasten (Fibroblastenmedium)</i>	44
2.1.10.5. <i>Kulturmedium für Endothelzellen (Endothelzellmedium)</i>	45
2.1.10.6. <i>Kulturmedium für undifferenzierte Stammzellen (ES-Medium)</i>	45
2.1.10.7. <i>Differenzierungsmedium</i>	45
2.2. METHODEN	46
<i>Zellkultur-Methoden</i>	46
2.2.1. <i>Auftauen von Zellen</i>	46
2.2.2. <i>Isolierung und Kultivierung von Zellen</i>	46
2.2.2.1. <i>Isolierung, Kultivierung und Inaktivierung von murinen embryonalen Fibroblasten</i>	46
2.2.2.2. <i>Isolierung und Kultivierung von humanen Lungenfibroblasten</i>	48

2.2.2.3. Isolierung und Kultivierung von humanen Endothelzellen aus Nabelschnurblut (hCBEC)	48
2.2.2.4. Kultivierung von humanen pluripotenten embryonalen Stammzellen (hES-Zellen) und humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen)	48
2.2.3. Herstellung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen)	49
2.2.4. Zellzahlbestimmung	49
2.2.5. Differenzierung von Zellen	50
2.2.5.1. EB-basierte <i>in vitro</i> -Differenzierung	50
2.2.5.2 In vivo-Differenzierung durch Induktion von Teratomen	50
2.2.6. Karyotypanalyse	51
2.2.7. Immunzytologische Färbungen	51
2.2.8. Durchflusszytometrie	51
2.2.9. Virusproduktion für die lentivirale Transduktion	52
<i>Molekularbiologische Methoden</i>	52
2.2.10. Southern Blot Analyse	52
2.2.11. Bisulfit Sequenzanalyse	53
2.2.12. RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	53
2.2.13. PCR (Polymerase Kettenreaktion)	54
2.2.13.1. Konventionelle semiquantitative RT-PCR	54
2.2.13.2. Realtime PCR	56
2.2.14. Restriktionsanalyse	57
2.2.15. Agarosegelelektrophorese	58
2.2.16. Präparation von Plasmid-DNA	58
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>60</b>
3.1. INDUKTION VON HUMANEN INDUZIERTEN PLURIPOTENTEN STAMMZELLEN (HIPS-ZELLEN)	60
3.1.1. <i>Isolierung und Charakterisierung von humanen Lungenfibroblasten (hLF)</i>	60
3.1.2. <i>Induktion von pluripotenten Stammzellen aus humanen Lungenfibroblasten (hLFiPS)</i>	61
3.1.3. <i>Isolierung und Charakterisierung von humanen Nabelschnurblut-Endothelzellen (hCBEC)</i>	67
3.1.4. <i>Induktion von pluripotenten Stammzellen aus humanen Nabelschnurblut-Endothelzellen (hCBiPS)</i>	70
3.1.4.1. Untersuchungen zur Reprogrammierungseffizienz unterschiedlicher Endothelzellisolate aus Nabelschnurblut	71
3.2. CHARAKTERISIERUNG VON HIPS	75
3.2.1. <i>Morphologische Charakterisierung</i>	77
3.2.2. <i>Analyse der genetischen Stabilität</i>	78
3.2.3. <i>Nachweis der Expression Pluripotenz-assoziiierter Markergene über semiquantitative RT-PCR</i>	79
3.2.4. <i>Nachweis von stammzellspezifischen Markern durch Immunfluoreszenzfärbungen</i>	80
3.2.5. <i>Analyse von CD31 zum Nachweis des Verlustes des endothelialen Phänotypes der Nabelschnurblut-Endothelzellen nach der Reprogrammierung</i>	82
3.2.6. <i>Transgen-Integrationsanalyse mittels Southern Blot</i>	84
3.2.7. <i>Analyse der Expression von Transgenen und Endogenen über Realtime PCR</i>	85
3.2.8. <i>Bisulfit Sequenzanalyse von Promotorregionen</i>	87



---

3.3. DIFFERENZIERUNG VON HIPS	89
3.3.1. Bestimmung der <i>invivo</i> Differenzierungskapazität von hiPS anhand von Teratomen	89
3.3.2. Bestimmung der <i>invitro</i> Differenzierungskapazität von hLFiPS-Zellen und hCBiPS-Zellen in <i>embryoid bodies</i> (EBs)	90
3.3.2.1. Expressionsanalyse typischer Marker von Zellen aller drei Keimblätter über semiquantitative PCR	91
3.3.2.2. Nachweis endo-, meso- und ektodermaler Zellen über Immunfluoreszenzfärbung	93
3.3.2.3. Realtime PCR-Analyse von Transgen- und Endogenexpression im zeitlichen Verlauf der Differenzierung	95
3.3.3. Kardiale Differenzierung von hCBiPSC	96
3.3.3.1. Analyse der Expression mesodermaler und kardialer Marker im Differenzierungsverlauf über semiquantitative RT-PCR	97
3.3.3.2. Charakterisierung iPS-abgeleiteter Kardiomyozyten über Immunfluoreszenzfärbung	97
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>99</b>
4.1. INDUKTION VON HUMANEN INDUZIERTEN PLURIPOTENTEN STAMMZELLEN (iPS-ZELLEN)	99
4.2. CHARAKTERISIERUNG VON HIPS	102
4.3. DIFFERENZIERUNG VON HIPS-ZELLEN	104
<b>5. PERSPEKTIVEN</b>	<b>106</b>
<b>6. ABKÜRZUNGEN</b>	<b>109</b>
<b>7. LITERATUR</b>	<b>113</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>120</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>123</b>

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abb. 1: Herstellung von pluripotenten Zellen durch Kerntransfer. \_\_\_\_\_ 17

Abb. 2: Herstellung von pluripotenten Zellen durch Fusion. \_\_\_\_\_ 18

Abb. 3: Herstellung von pluripotenten Zellen durch die iPS-Zelltechnologie. \_\_\_\_\_ 21

Abb. 4: Schematische Darstellung des lentiviralen Expressionsvektors pSIN-EF2-Oct4-Pur \_ 39

Abb. 5: Schematische Darstellung des lentiviralen Expressionsvektors pSIN-EF2-SOX2-Pur\_ 39

Abb. 6: Schematische Darstellung des lentiviralen Expressionsvektors pSIN-EF2-Nanog-Pur 40

Abb. 7: Schematische Darstellung des lentiviralen Expressionsvektors pSIN-EF2-LIN28-Pur 40

Abb. 8: Schematische Darstellung des lentiviralen Verpackungsplasmids psPAX2. \_\_\_\_\_ 41

Abb. 9: Schematische Darstellung des Hüllplasmids pMD2.G. \_\_\_\_\_ 41

Abb. 10: Mikroskopische Darstellung von humanen Lungenfibroblasten (hLF). \_\_\_\_\_ 61

Abb. 11: Schematische Darstellung der zur Reprogrammierung von humanen Zellen  
verwendeten lentiviralen Vektoren pSIN-EF2-hOCT4-Pur, pSIN-EF2-hSOX2-Pur, pSIN-  
EF2-hNanog-Pur und pSIN-EF2-hLIN28-Pur. \_\_\_\_\_ 62

Abb. 12: Zeitliches Schema zur Induktion von pluripotenten Stammzellen aus somatischen  
Zellen. \_\_\_\_\_ 63

Abb. 13: Darstellung von verschiedenen Phase1-Kolonien \_\_\_\_\_ 64

Abb. 14: Entstehung von hLFiPS. \_\_\_\_\_ 65

Abb. 15: hLFiPS. Mikroskopische Darstellung von typischen undifferenzierten Kolonien in  
Passage 35. \_\_\_\_\_ 66

Abb. 16: Mikroskopische Darstellung von Nabelschnurblut-Endothelzellen (hCBEC). \_\_\_\_\_ 68

Abb. 17: Charakterisierung der hCBEC durch FACS-Analyse und semiquantitative PCR. \_\_\_\_ 69

Abb. 18: CD31-Expression von hCBEC. \_\_\_\_\_ 69

Abb. 19: hCBiPS-Zellen zeigen die typische Morphologie von ES-Zellen. \_\_\_\_\_ 71

Abb. 20: Expressionsanalyse von unterschiedlichen hCBEC-Isolaten durch semiquantitative  
RT-PCR. \_\_\_\_\_ 72

Abb. 21: Proliferationsraten von verschiedenen hCBEC-Isolaten. \_\_\_\_\_ 73

Abb. 22: Reprogrammierungseffizienzen von unterschiedlichen hCBEC-Isolaten, PBMC´s und  
Monozyten. \_\_\_\_\_ 74

Abb. 23: Realttimeanalysen von unterschiedlichen hCBEC-Isolaten \_\_\_\_\_ 75

Abb. 24: Morphologie von pluripotenten Stammzellen. \_\_\_\_\_ 78

Abb. 25: Darstellung von Differenzierungen in hiPS-Kolonien. \_\_\_\_\_ 78

Abb. 26: Karyogramme von hLFiPS-Zellen und hCBiPS-Zellen. \_\_\_\_\_ 79

Abb. 27: hLFiPS und hCBiPS exprimieren die Pluripotenz-assoziierten Gene OCT4, SOX2,  
NANOG und LIN28. \_\_\_\_\_ 80

Abb. 28: hiPS-Zellen exprimieren typische ES-Zellmarker. \_\_\_\_\_ 81

Abb. 29: CD31-Expression vor und nach der Reprogrammierung von hCBEC zu hCBiPS. \_\_\_\_ 83

Abb. 30: Lentivirale Integrationsstellen in hLFiPS- und hCBiPS-Zellen. \_\_\_\_\_ 85

Abb. 31: Quantitative Realtime PCR-Analyse der Transgen-Expression. \_\_\_\_\_ 86

Abb. 32: Quantitative Realtime PCR-Analyse der Endogen-Expression. \_\_\_\_\_ 87

Abb. 33: Bisulfit Sequenzanalyse der OCT4-Promotorregion von hLF, hCBEC, hLFiPS, hCBiPS1  
und hCBiPS2. \_\_\_\_\_ 88

Abb. 34: Die Injektion von undifferenzierten hiPS-Zellen in immundefiziente SCID-beige  
Mäuse führte zur Bildung von Teratomen, die Zellen aller drei Keimblätter enthielten 90

Abb. 35: Morphologie von Embryoid Bodies an Tag 7 der Differenzierung. \_\_\_\_\_ 91

Abb. 36: Differenzierte Derivate von hCBiPS-Zellen exprimieren ektodermale, endodermale  
und mesodermale Marker. \_\_\_\_\_ 92

- 
- Abb. 37: Immunfluoreszenzfärbungen von hCBiPS-Zellen zur Darstellung typischer Marker aller drei Keimblätter. \_\_\_\_\_ 94
- Abb. 38: Transgen- und Endogen-Analyse von OCT4, NANOG, SOX2 und LIN28 während der Differenzierung über quantitative Realtime-PCR. \_\_\_\_\_ 96
- Abb. 39: Darstellung von typischen Kardiomyozyten-Proteinen in hCBiPS2-Differenzierungen durch Immunfluoreszenzfärbung an Tag 21 der Differenzierung. \_\_\_\_\_ 98

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Oligonukleotide für RT-PCR	36
Tabelle 2: Oligonukleotide für Realtime-PCR	38
Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper	42
Tabelle 4: Anzahl der entstandenen Kolonien / $10^6$ Zellen aus verschiedenen Reprogrammierungsexperimenten	74
Tabelle 5: Lentivirale Integrationen in hLFiPS- und hCBiPS-Zellen	85

## **1. EINLEITUNG**

### ***1.1. Regenerative Therapien***

Regenerative Therapien befassen sich mit der Behandlung von verschiedenen genetischen und degenerativen Erkrankungen durch die Wiederherstellung oder den Ersatz von erkrankten oder zerstörten Organen, Geweben oder Zellen des Körpers. Schon seit über 40 Jahren werden einzelne regenerative Therapien wie Knochenmarkstransplantationen erfolgreich eingesetzt [1]. Seit einigen Jahren gilt dabei die Erforschung von potentiellen Therapieansätzen für die Behandlung von vielen degenerativen und genetischen Funktionsstörungen und Erkrankungen wie hämatopoetische Funktionsstörungen und Erkrankungen des Immunsystems, kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes Mellitus, chronische hepatische Schädigungen, gastrointestinale Funktionsstörungen, degenerative Erkrankungen des Gehirns, des Auges oder der Muskulatur und sogar bei Krebserkrankungen als erfolgversprechend [2]. Eine Möglichkeit zur regenerativen Therapie bei geschädigten oder funktionsgestörten Organen und Geweben bietet das sogenannte Tissue Engineering, bei dem lebende Zellen in einem dreidimensionalen Konstrukt kultiviert werden [3] und in den geschädigten Organismus implantiert werden.

### ***1.2. Stammzellen als Zellquelle für die regenerative Therapie***

Ein großes Problem bei der Entwicklung von regenerativen Therapien stellt die Bereitstellung von geeigneten klinisch relevanten Zellquellen dar. Ist eine geeignete Zellquelle identifiziert, stellt sowohl die Qualität, als auch im Besonderen die Quantität der Zellquelle die Forschung vor ein großes, noch zu lösendes Problem.

Stammzellen weisen im Gegensatz zu differenzierten somatischen Zellen ein enorm hohes Potential für klinisch anwendbare regenerative Therapien auf. Das gemeinsame Kennzeichen aller für die regenerative Therapie einsetzbaren Stammzellen ist deren unbegrenzte Kapazität zur Selbsterneuerung und das hohe Differenzierungspotential [2]. Klassischerweise werden bei Stammzellen pluripotente embryonale und gewebe-spezifische adulte Stammzellen unterschieden.

### 1.2.1. Embryonale Stammzellen

Bei embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) handelt es sich um pluripotente Zellen, die im undifferenzierten Zustand zur unbegrenzten *in vitro*-Proliferation fähig sind und das Potential aufweisen, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in Derivate aller Zelltypen der drei embryonalen Keimblätter zu differenzieren [4]. ES-Zellen können aus der inneren Zellmasse (ICM) von frühen Embryonen im Blastozystenstadium isoliert werden.

Die erfolgreiche Isolierung von pluripotenten murinen embryonale Stammzellen gelang erstmals 1981 [5]. 1984 demonstrierten Bradley et al., dass ES-Zellen zu allen somatischen Zellen des murinen Organismus differenzieren können, aber nicht die Fähigkeit zur vollständigen Embryogenese besitzen [6]. In der folgenden Zeit konnten ES-zellähnliche Zellen von mehreren Spezies isoliert werden [7-9]. Die Isolierung von ES-Zellen des Rhesus-Affen gelang erstmals 1995 [10]. Zwei weitere nicht-humane Primaten-ES-Zelllinien wurden 1996 und 2001 von Thomson et al. und Suemori et al. publiziert [11, 12].

Die erste Etablierung von humanen embryonalen Stammzellen wurde 1998 durch Thomson und seine Mitarbeiter beschrieben. Eine detaillierte Charakterisierung humaner ES-Zelllinien zeigte, dass diese durch die Expression von typischen Stammzellmarkern, wie *stage-specific embryonic antigen (SSEA)-3*, *SSEA-4*, *tumor rejection antigen (TRA)-1-60*, *TRA-1-81*, und alkalische Phosphatase charakterisiert sind, hohe Telomerase-Aktivität aufweisen und über Monate bis Jahre kultiviert werden können [4]. Als weitere Stammzell-spezifische Marker konnten Gene wie Oct4 [13], Nanog [14], Sox2 [15] und Rex-1 [16] identifiziert werden. Bis heute sind weltweit etwa 500 humane ES-Zelllinien verfügbar [17].

Humane embryonale Stammzellen weisen ein hohes Potential für den Einsatz in zell-basierten regenerativen Therapien für Krankheiten wie z.B. Morbus Parkinson, Diabetes Mellitus oder Herzerkrankungen auf, kommen aber aufgrund mehrerer Gründe für klinische Anwendungen kaum in Frage. Zum einen sind embryonale Stammzellen als ethisch kontrovers anzusehen [18], da für die Isolierung humane Embryonen zerstört werden müssen. Weiterhin ist die klinische Anwendung schwierig, da (mit Ausnahme von parthenogenetischen Zellen) keine patienteneigenen (autologen) ES-Zellen hergestellt werden können. Dadurch ergibt sich als weiterer Nachteil das Risiko der Bildung von Tumoren, die häufig mit der Transplantation von murinen ES-Zellen in histokompatible adulte Mäuse einhergeht [19]. Ein weiteres in diesem Zusammenhang zu erwähnendes

Problem für die klinische Einsetzbarkeit, von aus embryonalen Stammzellen generierten Organ- oder Zelltransplantaten, stellt die Gewebeabstoßung durch die körpereigene Abwehrmaschinerie aufgrund von HLA-Unterschieden dar.

### **1.2.2. Adulte Stammzellen**

Während embryonale Stammzellen aus dem frühen Embryo isoliert werden können, handelt es sich bei adulten Stammzellen um undifferenzierte Zellen, die im Organismus erst nach der Embryonalentwicklung vorkommen. Aus diesen Zellen werden während der gesamten Lebensdauer des Organismus neue spezialisierte Zellen gebildet. Adulte Stammzellen sind in den meisten Geweben und Organen, besonders im Knochenmark, in der Haut, aber auch im Fettgewebe, in der Nabelschnur, im Gehirn, der Leber oder der Bauchspeicheldrüse zu finden. Man unterteilt sie je nach Gewebe, aus dem sie isoliert werden, in hämatopoetische, neurale, gastrointestinale, epidermale, hepatische und mesenchymale Stammzellen ein [20]. Sie weisen im Allgemeinen ein deutlich geringeres Selbsterneuerungsvermögen und ein eingeschränktes Differenzierungspotential im Vergleich zu embryonalen Stammzellen auf. Obwohl sie hauptsächlich das Potential besitzen in mehrere Linien zu differenzieren, sind sie nicht pluripotent [21].

Adulte Stammzellen sind in jedem Individuum verfügbar, so dass die Perspektive des Ersatzes durch körpereigene, d.h. autologe Zellen gegeben ist und sie sich dadurch für den Einsatz in regenerativen Therapien eignen. Adulte Stammzellen sind im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen nicht als ethisch kontrovers anzusehen. Allerdings wird die klinische Anwendbarkeit durch deren offensichtlich eingeschränkte Differenzierungs- und Proliferationskapazität limitiert.

### **1.3. Strategien zur Reprogrammierung von somatischen Zellen**

Um im Hinblick auf die klinische Anwendbarkeit in regenerativen Therapien die Probleme der ethischen Kontroverse und der Differenzierungskapazität, sowie das Problem der immunologischen Unverträglichkeit von Stammzellen zu umgehen, wäre der Einsatz von autologen, d. h. patienten-eigenen Zellen, die das Potential zur unbegrenzten Proliferations- und Differenzierungskapazität in Zelltypen aller drei Keimblätter (Pluripotenz) zurück

erhalten haben, wünschenswert. Diese Zellen könnten nach bereits bekannten Protokollen gerichtet in den benötigten Zelltyp differenziert werden und nach Bedarf durch z.B. das Tissue Engineering in die benötigten Transplantate weiterverarbeitet werden. Eine mögliche Strategie zur Erzeugung von solchen autologen und selbsterneuernden, ein hohes Differenzierungspotential besitzenden, nicht immunogenen Zellen, stellt die sogenannte Reprogrammierung (Rückführung in den embryonalen Zustand) von somatischen Zellen dar. Der Rückführung in den embryonalen Status einer Zelle liegen vermutlich mehrere, nur zum Teil verstandene, molekulare Mechanismen zugrunde. Für die Reprogrammierung müssen die terminal differenzierten somatischen Zellen zunächst durch die Veränderung des „globalen Genexpressionsmusters“ anhand des *Silencing* von Genen, die für Differenzierungsregulatoren codieren, in einen reprogrammierbaren Zustand versetzt sein. Durch Anschalten von Pluripotenz-assoziierten Genen wie Oct4, Sox2 und Nanog wird die Reprogrammierung erreicht. Hierbei muss durch das sogenannte „epigenetische Remodeling“ eine Modifikation des Chromatins anhand von Prozessen wie Demethylierung und Histon-Acetylierung in Promotorregionen von Pluripotenz-Regulatoren ein transkriptions-aktiver Status erreicht werden.

Zur Reprogrammierung von somatischen Zellen gibt es mehrere im Folgenden beschriebene Strategien.

Bis 2006 verfolgte die Forschung zwei Hauptansätze zur Reprogrammierung von somatischen Zellen, zum einen durch den Transfer des Genoms in entkernte Oozyten anhand von Kerntransfer ((SCNT (*somatic cell nuclear transfer*)) und zum anderen durch die Fusion von somatischen Zellen mit pluripotenten Zellen um Hybridzellen mit pluripotentem Status zu generieren.

### **1.3.1. Reprogrammierung durch Zellkerntransfer**

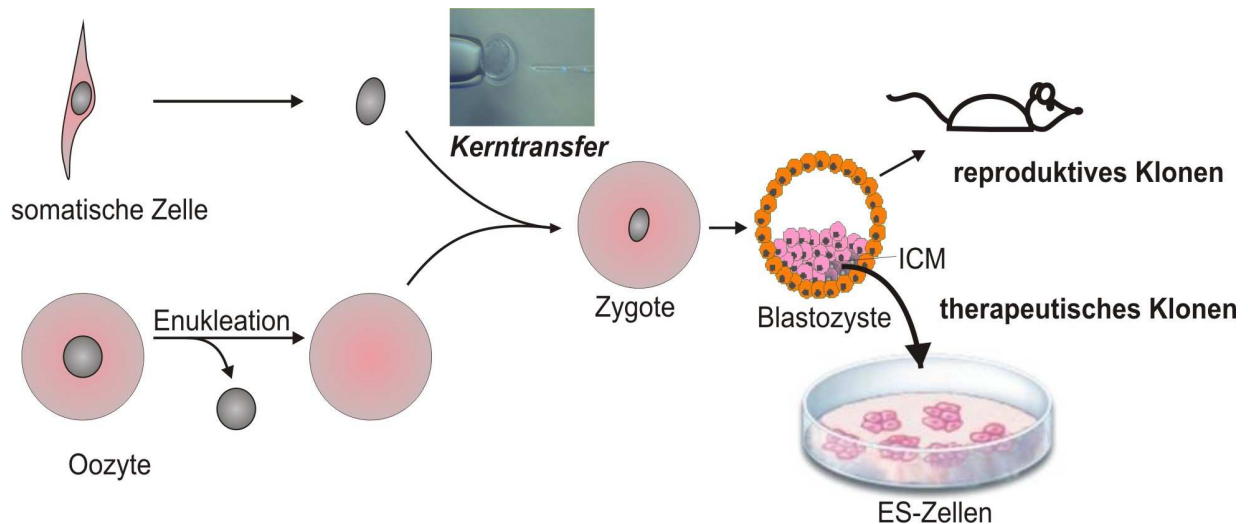
1952 wurde der erfolgreiche Kerntransfer von Briggs und King, die zeigten, dass der Transfer von Zellkernen aus Embryonen im Blastula-Stadium in entkernte Eizellen des Leopardschnecken (*Rana pipiens*) in normalen Kaulquappen resultierte, erstmals publiziert [22]. Als nächster Schritt in der Entwicklung des SCNT konnten 1996 erfolgreich fertile Frösche der Gattung *Xenopus laevis* durch den Transfer von Kaulquappen-Zellkernen in entkernte Eier erzeugt werden [23]. Der erste Kerntransfer in Säugern konnte 1975 mit der Erzeugung des Morulastadiums nach Zellkerntransfer von Morulazellkernen die in Eizellen



von Kaninchen gezeigt werden. Der erfolgreiche Zellkerntransfer von embryonalen Donorzellkernen in verschiedene Säuger-Spezies, der zu adulten Nachkommen führte, wurde in den folgenden Jahren erreicht [23]. 1996 konnte als Durchbruch im Bereich des adulten somatischen Kerntransfers von Wilmut et al., das Schaf „Dolly“, durch Nutzung von adulten Zellkernen aus Follikelzellen, erzeugt werden [24]. Seitdem wurden auch andere Säugerspezies wie Rinder, Mäuse, Ziegen, Schweine, Katzen und Kaninchen durch Zellkerntransfer geklont [23]. Diese auch als reproduktives Klonen bezeichneten Vorgänge des Zellkerntransfers, unterscheiden sich vom sogenannten therapeutischen Klonen (Abb. 1). Beim therapeutischen Klonen handelt es sich um die Zellkerntransfer-basierte Generierung von Embryonen, aus denen im Blastozystenstadium embryonale Stammzellen isoliert werden.

Die Isolierung von pluripotenten Zellen nach Reprogrammierung von somatischen Zellkernen anhand von Zellkerntransfer, wurde erstmals 2001 durch Wakayama et al. erreicht. Hierzu wurden im murinen System Zellkerne aus somatischen Zellen (Schwanzfibroblasten und Kumuluszellen) anhand von Mikroinjektion in Oozyten transferiert. Anschließend konnten ES-Zellen aus den entstandenen Blastozysten isoliert werden [25].

Bei der Reprogrammierung durch somatischen Kerntransfer ist zwar theoretisch die Möglichkeit gegeben, autologe, potentiell für regenerative Zell- und Gewebeersatztherapie einsetzbare pluripotente (ES-)Zellen zu erzeugen und damit das Problem der immunologischen Inkompatibilität von klassisch generierten ES-Zelllinien zu umgehen, aber der Vorgang der Erzeugung der Zellen wird durch den Gebrauch von Oozyten im humanen System als ethisch bedenklich eingestuft. Dementsprechend ist in Deutschland das reproduktive Klonen gemäß § 6 und das therapeutische Klonen nach § 1 Abs. 2 und § 2 Abs. 1 des Embryonenschutzgesetzes strafbar, weil durch die Entnahme der embryonalen Stammzellen aus dem jungen Embryo *in vitro* der Embryo nicht einem seiner Erhaltung dienenden Zweck verwendet wird [26].



**Abb. 1: Herstellung von pluripotenten Zellen durch Kerntransfer.** Der Zellkern einer somatischen Zelle wird in eine entkernte Oozyte transferiert. Nach Entstehung der Blastozyste aus der resultierenden Zygote können entweder Nachkommen entstehen (reproduktives Klonen) oder ES-Zellen aus der inneren Zellmasse (ICM) isoliert werden (therapeutisches Klonen).

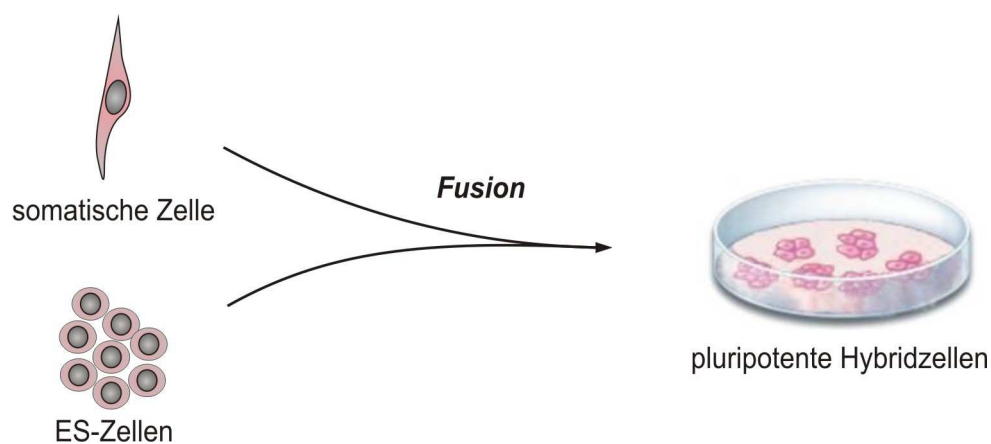
### 1.3.2. Reprogrammierung durch Fusion

1976 konnte die Reprogrammierung von somatischen Zellen in pluripotente Zellen, die durch Fusion von Thymozyten mit embryonalen Karzinomzellen entstanden waren, gezeigt werden [27]. Ähnliche Ergebnisse konnten durch Elektrofusion von murinen Thymozyten mit ES-Zellen gezeigt werden [28]. Do und Schöler fusionierten murine ES-Zellen mit somatischen Zellen (Neurospherezellen, Kumuluszellen) und demonstrierten, dass Pluripotenz-assoziierte Marker im somatischen Zellkern der resultierenden Hybridzellen reaktiviert wurden [29, 30].

Die Reprogrammierung von humanen somatischen Zellen durch Fusion mit ES-Zellen wurde 2005 zum ersten Mal publiziert [31, 32]. Ob das somatische Genom durch die Fusion mit ES-Zellen vollständig reprogrammiert wird ist noch unklar, aber einige Hinweise deuten zumindest auf eine partielle Reprogrammierung hin. So konnten z.B. in Thymozyten-ES-Zellhybriden in Promotorregionen von Pluripotenz-assoziierten Genen wie Oct4 ein ES-Zell-ähnlicher epigenetischer Status nachgewiesen werden [33].

Problematisch für die Anwendungen von aus der Fusion von somatischen Zellen mit ES-Zellen entstandenen pluripotenten Zellen als Zellquelle für regenerative Therapien ist zum einen die Abstoßung bei Implantation von Hybridzellen, ausgelöst durch die Immunantwort auf den MHC (*Major Histocompatibility Complex*), auf die ES-Zell-abstammenden

Chromosomen und zum anderen die bestehende Tumorbildungskapazität. Eine mögliche Lösung stellt hier die Eliminierung von ES-Zellanteilen aus den Hybridzellen dar. Die Eliminierung von einzelnen Chromosomen konnte 2007 gezeigt werden [34], aber die vollständige Entfernung aller Chromosomen ist weiterhin eine technische Herausforderung. Als weitere Lösung könnten ES-Zell-abstammende Chromosomen, die die Gene des MHC (*Major Histocompatibility Complex*) tragen, beseitigt werden [35]. Da diese Hürden für die Anwendbarkeit in regenerativen Therapien aber bis heute noch nicht überwunden sind, ist der Einsatz von durch Fusion entstandenen pluripotenten Zellen nicht denkbar.



**Abb. 2: Herstellung von pluripotenten Zellen durch Fusion.** Somatische Zellen werden durch Fusion mit ES-Zellen reprogrammiert.

#### **1.4. Herstellung von pluripotenten Zellen durch Reprogrammierung anhand der Überexpression von Pluripotenz-assoziierten Faktoren - Die iPS-Technologie**

2006 konnte als der wissenschaftliche Meilenstein in der Generierung von pluripotenten Zellen aus somatischen Zellen von Takahashi und Yamanaka die Reprogrammierung von murinen Fibroblasten durch die Überexpression der vier Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc („Yamanaka-Faktoren“) nach retroviraler Transduktion gezeigt werden [36]. Diese Zellen wurden aufgrund der Art ihrer Herstellung als induzierte pluripotente Stammzellen oder abgekürzt **iPS-Zellen** bezeichnet (Abb. 3). Obwohl die Eigenschaften dieser auch als iPS-Zellen der „ersten Generation“ bezeichneten Zellen, denen von pluripotenten Zellen schon ähnlich waren, aber noch nicht endgültig mit denen von embryonalen

Stammzellen übereinstimmten, da sie nicht vollständig reprogrammiert waren, war der Grundstein für die iPS-Technologie gelegt. Als gravierende Unterschiede im Vergleich zu ES-Zellen sind unter anderem die nur partielle Rückführung der transkriptionellen und epigenetischen Muster vom somatischen zum ES-Zellstatus und die fehlende Keimbahnkompetenz (d.h., die entstandenen Zellen waren nicht in der Lage, nach der Injektion in die Blastozyste eines Maus-Embryos, eine lebende Chimäre zu erzeugen) zu nennen.

2007 gelang es zwei Gruppen zeitgleich, die Herstellung von murinen iPS-Zellen zu zeigen, deren Eigenschaften wie unbegrenzte Selbsterneuerung, ein *in vitro*-Differenzierungspotential in Zellen aller drei Keimblätter, die Expression von pluripotenz-assoziierten Oberflächenmarkern, eine hohe Telomerase-Aktivität und die Fähigkeit zur Teratombildung nach Injektion in immundefiziente Mäuse sowie die vorher nicht gezeigte Keimbahnkompetenz mit ES-Zellen vergleichbar waren [37, 38]. Diese Zellen wurden durch GFP und eine Puromycin-Resistenz, welche in den Nanog-Genlocus inseriert war, selektioniert und wurden als iPS-Zellen der „zweiten Generation“ bezeichnet.

Als weitere Entwicklung konnten iPS-Zellen der „dritten Generation“ auch ohne Selektion, nur anhand von morphologischen Kriterien hergestellt werden [39, 40].

Ebenfalls fast zeitgleich konnten Ende 2007 von Takahashi aus der Yamanaka-Gruppe und Yu aus der Thomson-Gruppe, die Induktion von iPS-Zellen im humanen System gezeigt werden [41, 42]. Das Experiment von Yu aus dem Labor James Thomson wies die Besonderheit auf, dass statt der vier Pluripotenzgene Yamanakas eine andere Kombination von Genen aktiviert wurde: Neben Oct4 und Sox2 konnte die Herstellung von iPS-Zellen durch Verwendung von Nanog und LIN28 („Thomson-Faktoren“) bewiesen werden. Dies zeigte, dass es möglich war, auf c-Myc zu verzichten, welches ein bekanntes starkes Onkogen ist und daher ein vorhersagbares Risiko für die klinische Anwendungen darstellt [43].

Aufgrund der vermuteten geringeren Karzinogenität wurden die von Thomson eingesetzten Faktoren Oct4, Sox2, Nanog und LIN28 auch für die Herstellung der iPS-Zellen in der vorliegenden Arbeit genutzt.

Oct4 gehört zu der POU-Familie (Pit-Oct-Unc) der Transkriptionsfaktoren. Die POU-Familie der Transkriptionsfaktoren erreicht eine Aktivierung oder Expression ihrer Zielgene durch Bindung an das Octamer-Sequenzmotiv einer AGTAAAT- Konsensussequenz [44]. Das Oct4-Protein ist aus zwei Domänen, der POU-Homeodomäne und der POU-spezifischen Domäne,

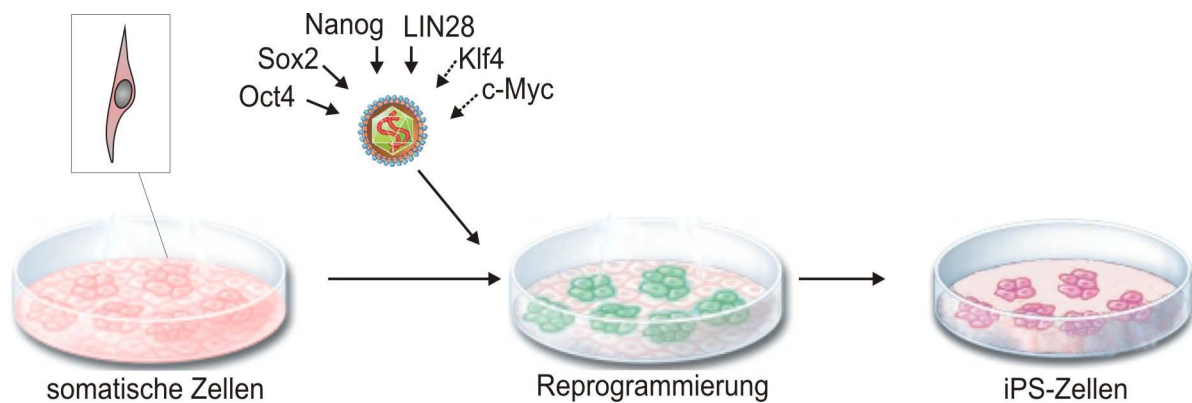
aufgebaut. Da Oct4 als ein Transkriptionsfaktor für viele Gene, die speziell in pluripotenten Zellen exprimiert werden, agiert, gilt Oct4 als Marker für pluripotente embryonale Stammzellen [45].

Sox2 (Sox: sry-related, sox motif binding factor) ist ein Transkriptionsfaktor der *High-Mobility-Group* (HMG). Gene, die durch Oct4/Sox2 reguliert werden, enthalten in ihrem Promotor/Enhancer-Bereich sowohl das Octamer-Motiv für die Bindung von Oct4, als auch eine Bindungsstelle für Sox2, so dass durch ein Zusammenwirken der beiden Faktoren die Expression eines so regulierten Gens ermöglicht wird [46]. In solchen Fällen der synergistischen Aktivität, ermöglicht Oct4 allein keine nachhaltigen Effekte auf die Transkription in ES-Zellen und benötigt Sox2 als Kofaktor, um seine maximale Aktivität zu erreichen [45].

Das humane NANOG ist ein 305 Aminosäuren-Protein und wurde 2003 nach der in der keltischen Mythologie vorkommenden „Insel der ewigen Jugend“ *Tir Nanog* benannt. Das Homeodomänen-Protein spielt als pluripotenz-assoziiertes Transkriptionsfaktor in der ICM und in ES-Zellen sowie bei der Selbsterneuerung von ES-Zellen eine Rolle [14, 47].

Genomweite Untersuchungen von Bindungsstellen der drei Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog zeigten, dass sie einzeln oder zusammenwirkend an Promotorelemente von einigen hundert ES-Zell-assoziierten Genen binden.

Der Transkriptionsfaktor LIN28 enthält eine Zinkfinger- und eine Kälteschock-Domäne (cold shock domain) [48]. Das Gen wird in undifferenzierten humanen embryonalen Stammzellen exprimiert [49] und kodiert für ein zytoplasmatisches mRNA-bindendes Protein [50], das die Translation der mRNA von Igf2, unterstützt [51]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass LIN28 an Vorstufen einer nicht-kodierenden RNA, die an der Steuerung von Entwicklungsprozessen beteiligt ist (let-7), bindet und so die Produktion des reifen let-7-Moleküls in embryonalen Stammzellen der Maus blockiert [52].



**Abb. 3: Herstellung von pluripotenten Zellen durch die iPS-Zelltechnologie.** Somatischen Zellen werden durch Überexpression von Pluripotenz-assoziierten Faktoren reprogrammiert.

### 1.4.1. Probleme, Risiken und Fortschritt in der iPS-Technologie

Realistisch war es mit der Entwicklung von iPS-Zellen erstmalig möglich, eine patienteneigene, pluripotente Zellquelle für die regenerative Medizin bereitzustellen. Im Hinblick auf die tatsächliche klinisch relevante Anwendbarkeit von iPS-Zellen, gab es bis zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung in der iPS-Technologie, genauso wie bei der Anwendung von anderen pluripotenten Zellen, aber noch große, sich speziell aus dieser Technologie ergebende Hürden zu überwinden. Zum einen beinhaltet der virale Transfer der Reprogrammierungsfaktoren ein potentiell Risiko, da in den Zellen unvorhersagbare Veränderungen durch Insertionsmutagenese bei der zufälligen retroviralen oder lentiviralen Transgenintegration entstehen können, was den Einsatz in regenerativen Therapien durch unvorhersagbaren Funktionsverlust von Genen unmöglich macht. Zum anderen ist die Einschleusung von möglichen Onkogenen wie Myc problematisch. Diese Nachteile wurden zumindest prinzipiell mit den im Folgenden beschriebenen Verbesserungen ausgemerzt.

Den initialen Entwicklungen der iPS-Technologie folgten mehrere Studien zur Reduktion der zur Reprogrammierung benötigten Faktoren, so konnte zunächst die Reprogrammierung ohne das Onkogen Myc [53], später die Herstellung von murinen zwei-Faktor iPS-Zellen mit den Faktoren Oct4 und entweder Klf4 oder c-Myc [54] sowie von humanen zwei-Faktor iPS-Zellen mit Oct4 und Sox2 [55] erreicht werden, bis schließlich 2009 von Kim et al. die Generierung von iPS-Zellen aus neuronalen Stammzellen (NSC's) mit ausschließlich Oct4 als einzigem Faktor, gezeigt werden konnte [56]. In diesen Arbeiten wurden die zu

übertragenden Reprogrammierungsfaktoren über retrovirale bzw. lentivirale Transduktion in die Zielzellen eingeschleust.

Ein weiterer Fortschritt bei der Herstellung von klinisch anwendbaren iPS-Zellen stellte die Nutzung von alternativen Methoden zur Übertragung der Transgene dar, um eine Integration von Fremdgenen in das Genom der Zielzellen zu verhindern, oder die eingeschleusten Gene nachträglich zu entfernen.

Eine Strategie zur Herstellung von transgen-freien iPS-Zellen schließt die genomische Integration der Reprogrammierungsvektoren, gefolgt von deren Exzision mit hochspezifischen Enzymen ein. So konnten murine und humane iPS-Zellen durch Cre-loxP-basierte Transgeneliminierung frei von Reprogrammierungsfaktoren erzeugt werden [57, 58]. Yusa et al. und Woltjen et al. gelang 2009 die *piggyBac*-Transposition-vermittelte Herstellung von murinen und humanen iPS-Zellen [59, 60].

Eine weitere Verbesserung betreffend der Sicherheit, der durch iPS-Technologie erzeugten Zellen, wurde durch den Einsatz von nicht ins Genom integrierenden Vektoren erreicht. Hierdurch konnte das Risiko der Insertionsmutagenese minimiert werden. Okita et al. gelang es 2008, murine embryonale Fibroblasten durch die transiente Transfektion mit episomalen Plasmiden, die die cDNA's der Faktoren Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc trugen, zu iPS-Zellen zu reprogrammieren [61]. Murine Fibroblasten und Hepatozyten konnten ebenfalls 2008 durch nicht-integrierende adenovirale Vektoren reprogrammiert werden [62]. Die adenovirale Reprogrammierung von humanen Zellen wurde 2009 von Zhou et al. erreicht [63]. Eine im Vergleich zu den anderen Methoden sehr effiziente Reprogrammierung (1%) von humanen Vorhautfibroblasten durch nicht-integrierende Vektoren, konnte durch die Übertragung der Transgene anhand von Vektoren, die auf Sendai-RNA-Viren basieren, publiziert werden [64]. Eine weitere Methode zur Übertragung der Transgene wurde von Yu et al. publiziert. In dieser Studie gelang die Reprogrammierung von humanen Vorhautfibroblasten durch einen Epstein-Barr Virus-basierenden oriP/EBNA1 Vektor [65]. Hier wurde allerdings die Übertragung von sechs Faktoren (Oct4, Sox2, Nanog, LIN28, c-Myc und Klf4) und der zusätzliche Transfer vom *SV40 large T*-Gene zur Reprogrammierung benötigt.

Auch der Einsatz von microRNA's zeigte, dass diese bei der Herstellung von iPS-Zellen effektiv nutzbar sein können, da z.B. gezeigt wurde, dass microRNA-302 humane Krebszelllinien reprogrammieren konnte [66] und ES-zellspezifische Zellzyklus-regulierende

microRNA's (ESCC; miR-291-3p, miR-294 und miR-295) einzelne Faktoren wie c-Myc ersetzen können [67].

Als innovativste Weiterentwicklung konnte die Generierung von iPS-Zellen sogar durch direkte Übertragung der Reprogrammierungsproteine Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc anhand von Proteintransduktion zunächst im Mausmodell [68] und später im humanen System [69] gezeigt werden. Mit der Übertragung der Reprogrammierungsfaktoren durch Proteintransduktion gelten die Sicherheitsprobleme von iPS-Zellen prinzipiell als gelöst.

Wie die meisten der alternativen Methoden erreicht die Proteintransduktion jedoch eine weitaus niedrigere Effizienz als die virale Transfektion der ursprünglichen vier Pluripotenzgene. Die Effizienz der Reprogrammierung von somatischen Zellen hängt vermutlich von mehreren Faktoren ab. Zum einen scheint sie von dem zu reprogrammierenden Zelltyp abzuhängen. Eine weitere große Rolle scheint die Art der Übertragung der Reprogrammierungsfaktoren zu spielen. Vermutlich beeinflussen auch stochastische epigenetische Ereignisse die Reprogrammierungseffizienz [70].

Während mit der klassischen onkoviralen und lentiviralen Übertragung der Reprogrammierungsfaktoren in humane Zellen Reprogrammierungseffizienzen von 0,002% - 1% [71, 72] erreicht werden konnten, wurden bei der Reprogrammierung mit adenoviralen oder episomalen Vektoren im Durchschnitt etwa 100-fach niedrigere Effizienzen erreicht [73]. So konnte z.B. bei der Reprogrammierung von humanen Zellen, basierend auf oriP/EBNA1-Vektoren, Effizienzen von 0,0006% [65] und bei der Nutzung von adenoviralen Vektoren, Effizienzen von 0,0002% gezeigt werden [63]. Bei der piggyBac-Transposon-vermittelten Herstellung von murinen iPS-Zellen war eine relativ hohe Effizienz von 1% zu erzielen (die Zellen wurden hierbei aber unter Selektion erzeugt) [60], die Generierung von durch Proteintransduktion reprogrammierten humanen iPS erbrachte eine Effizienz von 0,001% [69].

Um die vergleichsweise geringen Effizienzen bei der Generierung von pluripotenten Zellen aus somatischen Zellquellen in der iPS-Technologie zu verbessern, wurden weitere Ansätze entwickelt, die den Einsatz von genetischen Faktoren, *Small molecules* und Molekülen von Signalkaskaden als Reprogrammierung-verstärkende Substanzen oder als Substituenten für einzelne Faktoren nutzten. So konnte der *orphan nuclear Receptor Esrrb* für den Ersatz des Reprogrammierungsfaktors Klf4 genutzt werden [74], die vollständige Reprogrammierung von reifen B-Lymphozyten konnte nur durch die Zugabe von Pax5 RNAi oder C/EPPa erreicht



werden [75], das Signalkaskademolekül Wnt3a begünstigte die Reprogrammierung von murinen Fibroblasten [76] und das *SV 40 Large T*-Antigen und die humane Telomerase-Reverse-Transkriptase *hTERT*, verstärkten die Effizienz der Reprogrammierung von humanen Fibroblasten [77, 78]. Bei den sogenannten *Small Molecules* handelt es sich um kleine, die Reprogrammierungseffizienz beeinflussende oder Faktoren-substituierende Chemikalien. Unter den bekannten Chemikalien sind einige, wie die DNA Methyltransferase-Inhibitoren RG108 und AZA und die Histondeazetylase-Inhibitoren VPA, TSA und SAHA, dafür bekannt, Veränderungen des Chromatins hervorzurufen und damit durch Modifikationen der Histonstruktur und durch Demethylierung der Promotorregionen von Pluripotenzgenen, wichtige epigenetische Barrieren zu eliminieren und damit die Reprogrammierung zu unterstützen. Die Wirkung des G9a Histonmethyltransferase-Inhibitors BIX-01294 beruht möglicherweise auf einer Reaktivierung von endogenem Oct4 und anderen embryonalen Genen, wie Nanog und Dnmt3l [79]. Teilweise noch ungeklärt ist die Wirkung von anderen, die Reprogrammierung beeinflussenden Chemikalien, wie BayK8644. Die *Small molecules* Dexamethason, PD0325901, CHIR99021 und A-83-01 greifen in Signaltransduktionswege, wie den MEK, GSK3-, TGF $\beta$ - und Wnt-Transduktionsweg ein (Übersichtsartikel: [80]).

Die gerichtete Differenzierung von iPS-Zellen in viele verschiedene Zelltypen wie z. B. endotheliale Zellen [81], Neuronen [58], hämatopoetische Zellen [82], kardiovaskuläre Zellen [83] und Kardiomyozyten [84-86], Hepatozyten, Adipozyten [87], reife, insulinproduzierende Pankreaszellen [88] und glatte Muskelzellen [89] konnte bereits gezeigt werden.

Basierend auf diesen Fortschritten gelang auch die Etablierung von Krankheitsmodellen durch die Isolierung von humanen iPS-Zellen von Patienten mit Krankheiten wie Amyotropher Lateralsklerose [90] oder Spinaler Muskelatrophie [91] sowie Morbus Parkinson [58] und diese zu Neuronen differenzieren zu lassen. Auch iPS-Zellen von Patienten mit Fanconi-Anämie [92],  $\beta$ -Thalassämie [93] und Typ 1 Diabetes [88] konnten bereits isoliert werden. Bei Mäusen ist es gelungen, mittels Transplantation von iPS-Zellen Sichelzellanämie zu therapieren [94] und im Rattenmodell die Symptome der Parkinson-Krankheit zu lindern [95].

Seit der bahnbrechenden Veröffentlichung von Takahashi und Yamanaka 2006, in der die zuerst etablierte erfolgreiche Reprogrammierung von Fibroblasten gezeigt wurde, konnten

Zellen aus unterschiedlichen Organen und Geweben wie Blut [75], Leber und Magen [96], Gehirn [56, 97, 98], Pankreas [99], Darm und Nebennieren [100] zu iPS-Zellen umprogrammiert werden.

Neben humanen und murinen iPS-Zellen konnte die Reprogrammierung von somatischen Zellen aus verschiedensten Spezies wie Ratte [101], Schwein [102, 103] und Rhesusaffe [104] gezeigt werden.

Im Hinblick auf die Anwendbarkeit für Zell- und Gewebeersatztherapien scheinen bis heute schon viele Hürden, die die Sicherheit von möglichen patienten-eigenen iPS-Zellen betreffen, überwunden zu sein. Ein weiteres, bis jetzt aber noch nicht ausreichend beleuchtetes Problem stellt das „Alter“ der zur Reprogrammierung verwendeten Zellquellen dar. Im Laufe des Lebens eines Organismus scheinen sich Mutationen in adulten Stammzellen und differenzierten Zellen anzureichern und führen hierdurch zur Alterung und zur Erhöhung des Krebsrisikos [105]. Diese Mutationen betreffen nicht nur das Zellkerngenom, sondern werden auch in akkumulierter Form in den Mitochondrien der Zellen gefunden [106]. Diese Mutationen können mit dem Funktionsverlust der betroffenen Zellen einhergehen. Bei der Herstellung von patienten-eigenen iPS-Zellen können erworbene, persistierende chromosomale Abweichungen und/oder Punktmutationen der Zellquelle während des Prozesses der Umprogrammierung nicht ausgelöscht werden und werden somit auf die resultierenden Zellen übertragen und könnten deren Funktion beeinflussen. Weiterhin könnten Zellklone mit Mutationen, die zu höheren Reprogrammierungsraten und Proliferationsraten führen, gegenüber nicht-mutierten selektiert und angereichert werden. Die Selektion von diesen Klonen dürfte während der Reprogrammierung und der anschließenden Proliferationsphase der resultierenden iPS-Zellen weiter verstärkt werden und könnte damit vermutlich zu einer Anreicherung entarteter Zellen führen. Für die Generierung von geeigneten klinisch relevanten und für regenerative Therapien einsetzbaren Zellen, muss demnach eine möglichst „junge“ Zellquelle mit einer geringen Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von akkumulierten Mutationen gefunden werden.

Weiterhin müssen die bis jetzt für die Herstellung von iPS-Zellen eingesetzten Zellquellen [71] (mit Ausnahme von Keratinozyten) durch invasive Methoden gewonnen werden, und denkt man an die medizinische Anwendung, wären Zellen, die ohne Risiko für die (oft auch juvenilen) Patienten isoliert werden könnten von Vorteil. Eine juvenile, eine minimale Anzahl

von Mutationen enthaltende ohne invasive Methoden isolierbare Zellquelle stellt das im Folgenden beschriebene Nabelschnurblut dar.

### **1.5. Nabelschnurblut als somatische Zellquelle zur Herstellung von iPS-Zellen**

Als Nabelschnurblut bezeichnet man Blut, das bei Säugern nach der Geburt und Abnabelung des Nachkommens in der Nabelschnur (*Funiculus umbilicales*), speziell in den Nabelschnurgefäßen verbleibt. Die humane Nabelschnur setzt sich zum Zeitpunkt der Geburt normalerweise aus drei Gefäßen, der *Vena umbilicales* und den zwei *Arteriae umbilicalis* zusammen. Nabelschnurblut entstammt dem fötalen Kreislauf und enthält alle grundlegenden Elemente von Blut wie Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten und Plasma. Zusätzlich enthält es beim Menschen eine etwa 10fach erhöhte Anzahl von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen gegenüber adultem peripherem Blut [107, 108].

Zur Gewinnung von Nabelschnurblut wird dieses von einer geburtshilflich geschulten Person durch Punktion der *Vena umbilicales* mittels eines geschlossen, drucklosen Systems entnommen und in einen speziellen Blutbeutel mit Antikoagulans geleitet [109]. Durchschnittlich können ca. 75 ml Nabelschnurblut pro Nabelschnur entnommen werden. Nabelschnurblut aus freiwilligen Spenden wird in kommerziellen und privaten Blutbanken weltweit gesammelt und eingelagert. Bis heute sind mehr als 450.000 immunologisch charakterisierte Nabelschnurblut-Einheiten weltweit über ein Netzwerk von Nabelschnurblutbanken erhältlich [110]. Führende Nabelschnurblutbanken sind die *New York Cord Blood Bank* und im europäischen Raum Nabelschnurblutbanken in Mailand, Düsseldorf und Paris (*Eurocord*). Autologe Präparate werden in Europa vor allem von Firmen wie *Vita 34* in Leipzig, *Seracell* und *Eticur* verarbeitet.

Die im Nabelschnurblut enthaltenen hämatopoetischen Stammzellen wurden 1988 erstmals durch die französische Ärztin Eliane Gluckman in Paris medizinisch genutzt, um einen 6-jährigen Jungen mit Fanconi-Anämie erfolgreich zu behandeln [111]. Bis 2009 wurden weltweit mehr als 20.000 Patienten einer Nabelschnurblutstammzellen-Transplantation unterzogen [110].

Als Vorteile von Transplantationen mit Zellen aus Nabelschnurblut gegenüber denen aus peripheren Blut oder Knochenmark gelten die risikoarme Gewinnung, ohne invasive Eingriffe [112], die sofortige Verfügbarkeit, die bessere Verträglichkeit, wenn die HLA-Merkmale von Spender und Empfänger nicht übereinstimmen [109], die höhere Proliferationsrate der Zellen durch höhere Telomeraseaktivität [113], das höhere Differenzierungspotential, die geringere Kontamination durch virale Elemente und die vermutlich geringeren chromosomalen Veränderungen wie Punktmutationen.

Trotz der vorher genannten Vorteile weisen Nabelschnurblutzellen im Vergleich zu pluripotenten Stammzellen ein limitiertes Potential für den therapeutischen Einsatz auf. Zum einen ist das geringere Differenzierungspotential von Nabelschnurblutzellen zu nennen. Weiterhin ist die pro Nabelschnur zu gewinnende Blut- und damit Zellmenge limitiert.

Zur Gewinnung der im Nabelschnurblut enthaltenen hämatopoetischen Stammzellen wird das Blut –nach virologischer und bakterieller Austestung, sowie Zellzählung– auf ca.  $-190^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und eingelagert. Die Einlagerung erfolgt entweder autolog oder allogene. Die im Nabelschnurblut befindlichen Stammzellen können durch einen Separator automatisch aufgereingt werden.

Außer hämatopoetischen Stammzellen enthält Nabelschnurblut aber auch Progenitorzellen von verschiedenen anderen Körperzellen und -Gewebe. In der vorliegenden Dissertation wurden Nabelschnurblut-Endothelzellen (human cord blood endothelial cells, hCBEC) als Zellquelle eingesetzt. Endothelzellen kleiden im Organismus normalerweise als einzellige Schicht das innere Lumen von Gefäßen aus. hCBEC können aus im Nabelschnurblut vorkommenden Endothelprogenitorzellen (EPC's) differenziert [108] oder als zirkulierende Endothelzellen isoliert, und anschließend kultiviert werden [114].

Diese Zellen weisen als juvenile Zellquelle alle für die Reprogrammierung und spätere klinisch relevante Einsetzbarkeit in regenerativen Therapien wünschenswerten Eigenschaften auf: Sie können sowohl autolog als auch, anhand der ausreichenden immunologischen Charakterisierung der Nabelschnurblutspende, allogene eingesetzt werden. Die Gewinnung ist risikoarm und ohne invasive Eingriffe möglich. Das hohe Proliferationspotential durch hohe Telomerase-aktivität [113] von Nabelschnurblut-basierenden Zellen trägt vermutlich zur besseren Reprogrammierbarkeit der Zellen bei. Weiterhin machen die geringere Kontamination, durch im Laufe des Lebens normalerweise erworbenen viralen Elementen und die vorher schon beschriebene geringere Rate an

---

nuklären und mitochondrialen Mutationen Endothelzellen aus Nabelschnurblut zu einer ausgezeichneten Zellquelle zur Reprogrammierung von somatischen Zellen zu pluripotenten Zellen und für regenerative Zell- und Gewebeersatztherapien.

## **1.6. Zielsetzung**

Basierend auf der 2007 erstmals gezeigten Generierung von iPS-Zellen soll in der vorliegenden Arbeit eine humane Zellquelle identifiziert werden, die alle Kriterien für eine spätere klinisch relevante Einsetzbarkeit der resultierenden reprogrammierten Zellen erfüllen sollte. Da nukläre und chromosomale Mutationen von den Ausgangszellen während des Reprogrammierungsprozesses auf die resultierenden iPS-Zellen übertragen werden, soll ein möglichst juveniler und mutationsarmer Zelltyp verwendet werden. Die Zellen sollen einfach und kostensparend zu isolieren sein. Um eine immunologische Reaktion beim möglichen klinischen Einsatz zu verhindern, soll die Zellquelle möglichst autolog sein. Die Gewinnung der somatischen, zu reprogrammierenden Zellen ohne invasive Methoden bei der Entnahme, ist für eine klinische Anwendung wünschenswert.

Nach der Identifizierung einer geeigneten Zellquelle soll die Generierung von iPS-Zellen aus dieser Zellquelle etabliert werden. Dabei sind Parameter wie die Kombinationen der in der Literatur beschriebenen Reprogrammierungsfaktoren OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, KLF4 und c-MYC auszutesten. Die Transduktionsbedingungen zur lentiviralen Übertragung der Reprogrammierungsfaktoren sollen für eine erfolgreiche Reprogrammierung der identifizierten Zellquelle optimiert werden.

Weiterhin ist eine Etablierung von Kultivierungsbedingungen der resultierenden iPS-Zellen notwendig.

Die generierten iPS-Zellen sollen auf molekularer und funktioneller Ebene anhand von zytologischen und molekularbiologischen Methoden (z.B. morphologische Beschreibung, Immunzytologie, konventionelle- und Realtime-PCR, Southern Blot Analyse, Bisulfit-Sequenz-Analyse und Karyotypisierung) charakterisiert werden. Um die Vergleichbarkeit der induzierten pluripotenten Zellen mit embryonalen Stammzellen und damit die klinische Anwendbarkeit herauszustellen, soll außerdem eine *in vitro*- und *in vivo*- Differenzierung in Zellen aller drei Keimblätter gezeigt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer	(Agilent, Böblingen)
Avanti J-25, Zentrifuge	(Beckmann, UK)
Axiovert A1 Mikroskop	(Zeiss, Göttingen)
Biophotometer	(Eppendorf, Hamburg)
BIOfuge <i>fresco</i>	(Heraeus, Osterode)
Elektrische Pipettierhilfe Pipetus®	(Hirschmann, Eberstadt)
Elektrophorese Kammer, Sub Cell GT	(Bio Rad, München)
Eppendorf mastercycler	(Eppendorf, Hamburg)
Eppendorf realplex	(Eppendorf, Hamburg)
Einfrierbox, Cryo 1°C freezing container	(Nalgene, Neerjise, Belgien)
FACS Calibur	(Becton Dickinson, USA)
Geldoc	(Bio-Rad, München)
Mikrowelle MW 13141E	(Amica, Ascheberg)
Neubauer Zellzählkammer	(Omnilab, Bremen)
Olympus Zellkultur Mikroskop CK 40	(Olympus, Hamburg)
Orbitalshaker S-3.02.10M	(LTF, Wasserburg)
pH Meter, pH539	(WTW, Weilheim)
PICO Fuge	(Stratagen, La Jolla, USA)
Pipetten	
BIOHIT	
1-10µl	
20-200µl	
100-1000µl	(BIOHIT, Helsinki, Finnland)
Pipetman	
1-10µl	
2-20µl	
50-200µl	

200-1000µl	(Gilson, Middletown, USA)
Sanyo CO2 Inkubator MCO-20AIC	(Sanyo, Bad Nenndorf)
Sanyo Bakterieninkubator	(Sanyo, Bad Nenndorf)
Spannungsgerät Power Pac 300	(Bio-Rad, München)
Spektrophotometer, Nano Drob, ND-10000	(PeqLab, Erlangen)
Sterilwerkbank Herasafe	(Heraeus, Osterode)
Sterilwerkbank Heraeus LaminAir	(Heraeus, Osterode)
Thermomixer 5436	(Eppendorf, Hamburg)
Thermomixer compact	(Eppendorf, Hamburg)
TRIO Thermoblock	(Biometra, Göttingen)
UNO II Thermoblock	(Biometra, Göttingen)
Vortexer	(Ika-Works, Wilmington, USA)
Wasserbad GFL 1083	(GFL, Langenhagen)

### 2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Elektroporationsküvetten:	Gene Pulser Cuvette 0,1cm, 0,4 cm (BioRad, München)
Einfrierröhrchen:	PP 1 ml-12,5,42 (Greiner, Frickenhausen)
FACS Probenröhrchen:	0,5 ml (Sarstedt, Nürnberg)
Gewebekulturschalen:	Cellstar 100 mm (Greiner, Frickenhausen) Ultra-low attachment Schale (Corning Inc., NY, USA)
Injektionskanülen:	Einweg Gr. 1 (Braun, Melsungen)
Labortücher:	Kimtech (Kimberly-Clark ,England)
Multiwell-Platten:	6-Well-Platten (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) 12-Well-Platten 24-Well-Platten 96-Well-Platten
Pasteurpipetten:	150 mm (Brand, Wertheim)
Petrischalen für Bakterien:	Petri Dish 100 mm (Greiner, Frickenhausen)



Pipettenspitzen:	TIP-ONE 1-20µl; 20-200µl; 100-1000µl (Star Lab, Ahrensburg)
	Pipettenspitzen, blau max. 1 ml (Sarstedt, Nürnberg)
	Pipettenspitzen, gelb max. 200µl (Sarstedt, Nürnberg)
	Mikrospitze 0,1-10µl (Roth, Karlsruhe)
Reaktionsgefäße:	0,5 ml (Sarstedt, Nürnberg)
	1,5 ml (Sarstedt, Nürnberg)
	2,0 ml (Sarstedt, Nürnberg)
	15 ml Falcon-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen)
	50 ml Falcon-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen)
	14 ml sterile Greiner-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen)
Serologische Pipetten:	1 ml-50 ml (Sarstedt, Nürnberg)
Spritzen:	Einmalspritzen 20 ml; 5 ml; 1 ml (Braun, Melsungen)
Sterilfilter:	Bottle Top Fiter, 0,2 µm (Nalgenunc, New York, USA)
	Spritzenvorsatzfilter Millex-GP, 0,22 µm (Millipore, Bedford, USA)
Zellkulturflaschen:	Cellstar 75 cm <sup>2</sup> ; 175 cm <sup>2</sup> mit Filterkappe (Greiner, Frickhausen)
Zellsiebe:	100 µm (VWR, Darmstadt)

### 2.1.3. Chemikalien

Agarose NEE0 Ultra Qualität	(Roth, Karlsruhe)
Ampicillin (50 mg/ml)	(Roth, Karlsruhe)
Aqua ad injectabilia	(Braun, Melsungen)
Bovines Serumalbumin (BSA)	(Sigma, St. Louis, USA)
Bromphenolblau	(Serva, Heidelberg)
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	(Sigma, St.Louis, USA)
Chloroform	(Roth, Karlsruhe)
Chloroquine	(Sigma, St.Louis, USA)
Desoxynucleotide Ultra Pure dNTP Set	(Amersham, Freiburg)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Sigma, St Louis, USA)
DNA-Marker: Smart SF Ladder	(Eurogentec, Heidelberg)

---

DNA-Marker: Small Smart Ladder	(Eurogentec, Heidelberg)
4, 6- Diamin-2-Phenolindol (DAPI)	(Sigma, St Louis, USA)
Ethylendiaminessigsäure (EDTA)	(Sigma, St Louis, USA)
Ethanol (zur Analyse)	(Baker, Deventer, Niederlande)
Ethidiumbromid (10mg/ml)	(Sigma, St Louis, USA)
Fetales Kälberserum (FCS)	(PAA, Cölbe)
Gelantine Typ A (porcin)	(Sigma, St.Louis, USA)
Glycerin	(Sigma, St Louis, USA)
Glycogen	(Boehringer, Mannheim)
Isoamylalkohol	(Merck, Darmstadt)
Isopropanol	(Sigma, St Louis, USA)
Kollagenase	(Gibco, Carlsbad, USA)
Magnesiumchlorid	(Sigma, St Louis)
Natriumacetat	(Sigma, St Louis, USA)
Natrium-Butyrat	(Biomol, Hamburg)
Natriumchlorid	(Sigma, St Louis)
Paraformaldehyd	(Sigma, St Louis)
Penicillin (10000 U/ml)/ Streptomycin (10000µg/ml)	(Biochrom, Berlin)
Polybrene	(Sigma, St Louis, USA)
Tris- Base	(Merck, Darmstadt)
Triton-X-100	(Sigma, St Louis, USA)
Trizol Reagenz	(Life Technologies, Eggstein)
Trypanblau	(PAA, Cölbe)

Alle anderen Chemikalien wurden von Sigma, St Louis, USA bezogen.

## 2.1.4. Lösungen und Puffer

### 2.1.4.1. Molekularbiologische und immunhistologische Lösungen und Puffer

Gelelektrophorese-Puffer:	25 x TAE-Puffer: 1 M Tris-acetat Essigsäure 25 mM EDTA pH 8,0
DNA-Loading-Puffer:	100 mM EDTA 2 % SDS 60 % Glycerin wenig Bromphenolblau
“Quick-Check“-Puffer:	40 % Glycerin 0,25 % Bromphenolblau in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
25 x TAE-Puffer:	1 M Tris-acetat Essigsäure 25 mM EDTA pH 8,0
Färbepuffer:	1% BSA in PBS (ohne Mg <sup>2+</sup> und Ca <sup>2+</sup> )
FACS-Puffer:	0.5% BSA in PBS (ohne Mg <sup>2+</sup> und Ca <sup>2+</sup> ) FACS Flow (Becton Dickinson, USA) FACS Clean (Becton Dickinson, USA) FACS Rinse (Becton Dickinson, USA)
10x TBS:	0,5 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan 1,625 M NaCl Auf 4,0 l mit H <sub>2</sub> O auffüllen, pH 7,6
TBS+ Puffer:	95% 1x TBS 0,025% Triton-X-100 5% Serum des Tieres, aus dem der Sekundärantikörper isoliert wurde

### 2.1.4.2. Lösungen, Puffer und Enzyme für die Zellkultur

Elastase :	60 U/ml, Worthington
Gelatinelösung:	1% (10g/L) in PBS
Dispaselösung:	1.18 U/ml Worthington, Lakewood, NJ
PBS:	1x Dulbecco´s Phosphat Puffered Saline (Sigma, St Louis)
Mitomycin-Lösung:	10 ml Wachstumsmedium f. Feeder-Zellen 50 µl Mitomycin C (2µg/ml) (Sigma, St.Louis)
Poly-L-Lysin-Lösung:	0,1% w/v in H <sub>2</sub> O, Thimersosal 0,1% (Sigma St.Louis, USA)
Penicillin/Streptomycin-Lösung:	(100x) 10.000 Units/10mg/ml in Saline (PAA, Cölbe)
Trypanblau-Lösung:	0,4% 1:10 in PBS (PAA, Cölbe)
Trypsin-Lösung:	Trypsin/EDTA Lösung 0,05/0,02% (w/v) in 10% PBS (Biochrom)

### 2.1.5. Gebrauchsfertige Kits

ABSOLUTE™ QPCR SYBR® GREEN MIX	(Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
Double Digestion Kit	(Clontech, Palo Alto, USA)
Go-Taq Polymerase	(Promega, Mannheim)
HP Plasmid Maxi Kit	(Sigma, St Louis, USA)
NucleoSpin RNA II Kat. 740955.250	(Macherey Nagel, Düren)
Gen Elute™ HP Plasmid Maxiprep Kit	(Sigma, St.Louis, USA)
QIAamp DNA Blood Mini Kit	(Qiagen, Hilden)
qPCR Core Kit	(Eurogentec, Heidelberg)
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit Kat.K1632	(Fermentas, St Leon-Rot)

## 2.1.6. Molekulargewichtsmarker

### SmartLadder (Eurogentec, Heidelberg)

14 Banden zwischen 200 bp und 10.000 bp

10.000 bp/ 8.000 bp/ 6.000 bp/ 5.000 bp/ 4.000 bp/ 3.000 bp/ 2.500 bp/ 2.000 bp/ 1.500 bp/ 1.000 bp/ 800 bp/ 600 bp/ 400 bp/ 200 bp

### SmartLadder SF (Eurogentec, Heidelberg)

9 Banden zwischen 100 und 1.000 bp

1.000 bp/ 800 bp/ 700 bp/ 600 bp/ 400 bp/ 300 bp/ 200 bp/ 100 bp

## 2.1.7. Oligonukleotide

Für die semiquantitative RT-PCR wurden die im Folgenden aufgeführten Oligonukleotide verwendet.

**Tabelle 1: Oligonukleotide für semiquantitative RT-PCR**

Primer	Ziel	Position	Annealing-Temperatur	Produktgröße	Sequenz
β-actin sense	GI 168480144	238	55°C	785bp	GACGAGGCCAGAGCAAGAG
β-actin ras		1022			ATCTCCTTCTGCATCCTGTC
Brachyury sense	GI 19743811	1382	55°C	357bp	CGGAACAATTCTCCAACCTATT
Brachyury ras		1738			GTACTGGCTGTCCACGATGTCT
NKX2-5 sense	GI 4038730	184	55°C	168bp	CCAGCCCTGCTCTCACG
NKX2-5 ras		351			GCCCAGCGTAGGCCTCT
FOG2 sense	GI 10862688	2371	55°C	203bp	TGCTACCACCCAAGATGTGAT
FOG2 ras		2573			AGCCTTTTGGGAGACGTG
TBX5 sense	GI 31652233	1303	55°C	108bp	AGCAGTGACTTCTACCAGAAC
TBX5 ras		1411			TGACATTCTGTGCAGCTCCAT
TBX20 sense	GI 31652229	486	50°C	470bp	AGGTACCGCTACGCCTAC
TBX20 ras		893			GTCAGTGAGCCTGGAGGA
MLC2a sense	GI 20380769	4	60°C	446bp	GAGGAGAATGGCCAGCAGGAA
MLC2a ras		451			GCGAACATCTGCTCCACCTCA
αMHC sense	GI 27764860	1796	50°C	469bp	AGGATCCTCTCAACGAGACT
αMHC ras		2265			GTGATCAATGTCCAGAGAGC

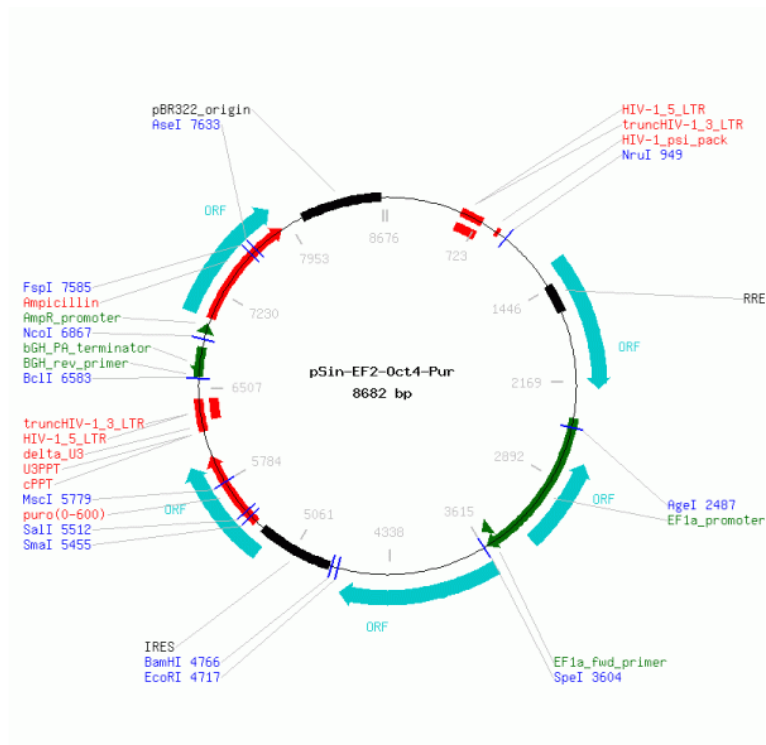
SPARC sense	GI 338312	55	65°C	923bp	CTGCAGGGAGTGGATTTAGATCAC
SPARC ras		978			CTGCAGACCATGAGGGCCTGGATC
AFP sense	GI 20379786	1518	55°C	255bp	ACTCCAGTAAACCCTGGTGTG
AFP ras		1772			GAAATCTGCAATGACAGCCTCA
TTR sense	GI 18089144	228	55°C	153bp	AAAACCAGTGAGTCTGGAGAGC
TTR ras		380			GTTGGCTGTGAATACCACCTCT
FOXA2 sense	GI 194363755	676	60°C	730bp	GCTTGGTTCTCGTTGAGTGG
FOXA ras		1406			CAGGAGCTTATAGGGCTCAGA
WNT1 sense	GI 16936523	306	55°C	190bp	TATTGTGAACGTAGCCTCCT
WNT1 ras		495			ATTCCGGAAGTCCACTTG
FGF5 sense	GI 73486654	570	55°C	253bp	ATCCACGAAGCCAATATGTTA
FGF5 ras		822			GTGAAAGAAAGTTCTGGCTGCT
Nestin sense	GI 38176299	852	62°C	388bp	CAGCGTTGGAACAGAGGTTGG
Nestin ras		1240			TGGCACAGGTGTCTCAAGGGTAG
$\beta$ 3 Tubulin sense	GI 50592995	1173	66°C	242bp	CAACAGCACGGCCATCCAGG
$\beta$ 3 Tubulin ras		1415			CTTGGGGCCCTGGGCCTCCGA
$\alpha$ -Actin sense	GI 168480144	23	60°C	176bp	AGCCTCGCCTTTGCCGA
$\alpha$ -Actin ras		196			CTGGTGCTGGGGCG
CD31 sense	GI 189775	1697	60°C	412bp	AGGTGATAGCCCCGGTGG
CD31 ras		2109			CTGCTTGGCCTTGGCTTTC
FLT-1 sense	GI 156104875	1706	51°C	122bp	ATCATTCCGAAGCAAGGTGTGAC
FLT-1 ras		1828			TCCTTCTATTATTGCCATGCGCT
FLK-1 sense	GI 11321596	2454	51°C	132bp	TGGGAACCGGAACCTCACTATC
FLK-1 ras		2586			GTCTTTTCTGGGCACCTTCTATT
vWF sense	GI 9257255	5081	51°C	499bp	CCTGCCTCTGATGAGATC
vWF ras		5580			GCAAAGCCCAAGGCATCC
VEcad sense	GI 14589894	1408	51°C	329bp	GAGAAAGAACTGGACAGAG
VEcad ras		1737			CTTGACTGTGATGTTGGC

Für die Realtime-PCR wurden die im Folgenden aufgeführten Oligonukleotide verwendet.

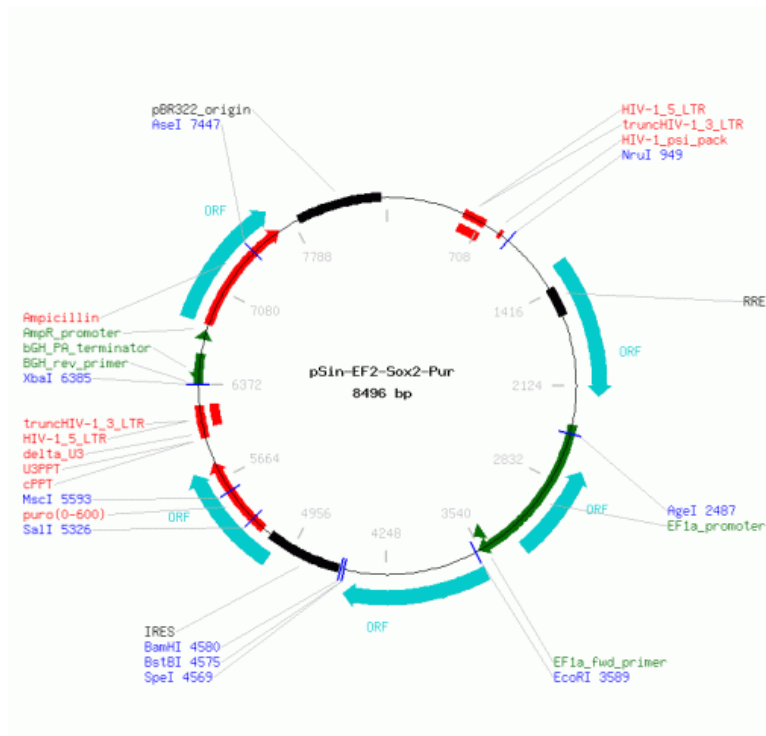
**Tabelle 2: Oligonukleotide für Realtime-PCR**

Primer	Ziel	Position	Annealing-Temperatur	Produktgröße	Sequenz
β-actin RT <sub>s</sub>	GI 168480144	1028	60°C	176bp	ATTGCCGACAGGATGCAGAA
β-actin RT <sub>r</sub>		1165			GGGCCGGACTCGTCATACTC
hOCT4-F4	GI 116235483	3'UTR 1119,12 66	60°C	104bp	TCCCATGCATTCAAAGTGG
hOCT4-R4					CCTTTGTGTTCCCAATTCCTCC
hNANOG-F6	GI 153945815	3'UTR 1190, 1292	60°C	143bp	GGACTGGCTGAATCCT TCC
hNANOG-R6					CTCGCTGATTAGGCTCCAACC
hSOX2-F6	GI 29826338	3'UTR 1471, 1582	60°C	112bp	ATGGAGAAAACCCGGTACGC
h-SOX2-R6					TTTTGCGTGAGTGTGGATGG
hLIN28-F4	GI 94536796	3'UTR 786, 947	60°C	162bp	TTGAGGAGCAGGCAGAGTGG
hLIN28-R4					TGCATTTGGACAGAGCATGG
hOCT4-exo2 <sub>s</sub>	Plasmid pSIN-EF2- OCT4-Pur	4654	55°C	126bp	TGTCTCCGTCACCACTCTGG
hOCT4-exo2 <sub>r</sub>		4779			ATGCATGCGGATCCTTCG
hNANOG-exo7 <sub>s</sub>	Plasmid pSIN-EF2- NANOG-Pur	4370	55°C	216bp	GCAGTTCCAGCCAAATTCTC
hNANOG-exo7 <sub>r</sub>		4585			ACTAGCGTACCGGACTCAG
hSOX2-exo2 <sub>s</sub>	Plasmid pSIN-EF2- SOX2-Pur	4468	55°C	117bp	CCAGCAGACTTACATGTCC
hSOX2-exo2 <sub>r</sub>		4584			GATCCTTCGAACTAGTTTCC
hLIN28-exo3 <sub>s</sub>	Plasmid pSIN-EF2- LIN28-Pur	4101	55°C	172bp	GCATCAGCCATATGGTAGCC
hLIN28-exo3 <sub>r</sub>		4272			ATGCATGCGGATCCTTCG
h c-mycRT-S2	GI 71774082	1872	55°C	123bp	CGGAACTCTTGTGCGTAAGG
h c-mycRT-R2		1995			CTCAGCCAAGGTTGTGAGGT

## 2.1.8. Vektoren

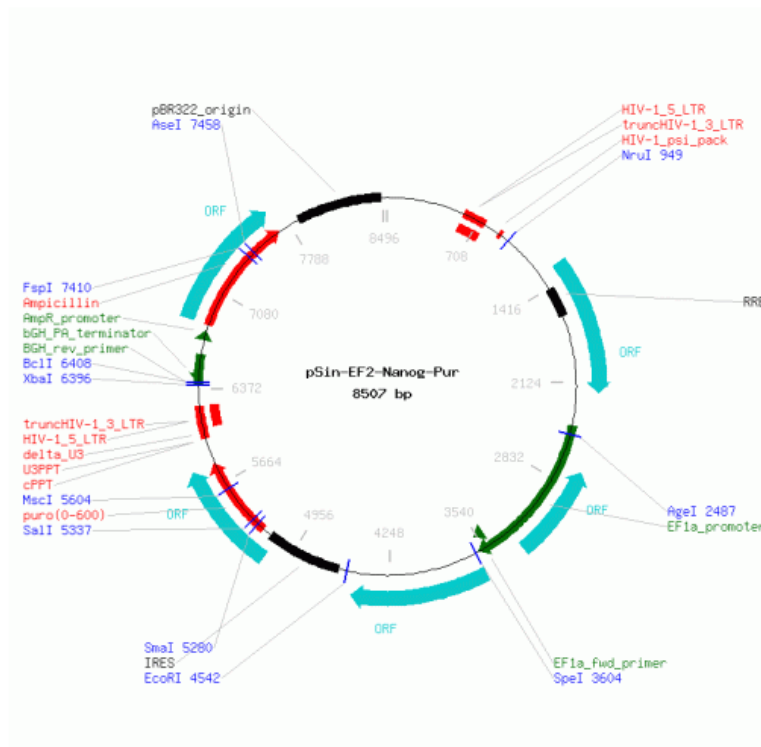


**Abb. 4: Schematische Darstellung des lentiviralen Expressionsvektors pSIN-EF2-Oct4-Pur (J.Thomson-Lab).** pSIN-EF2-Oct4-Pur wurde von Addgene zur Übertragung des Transgens Oct4 zur Herstellung von humanen iPS-Zellen bezogen.

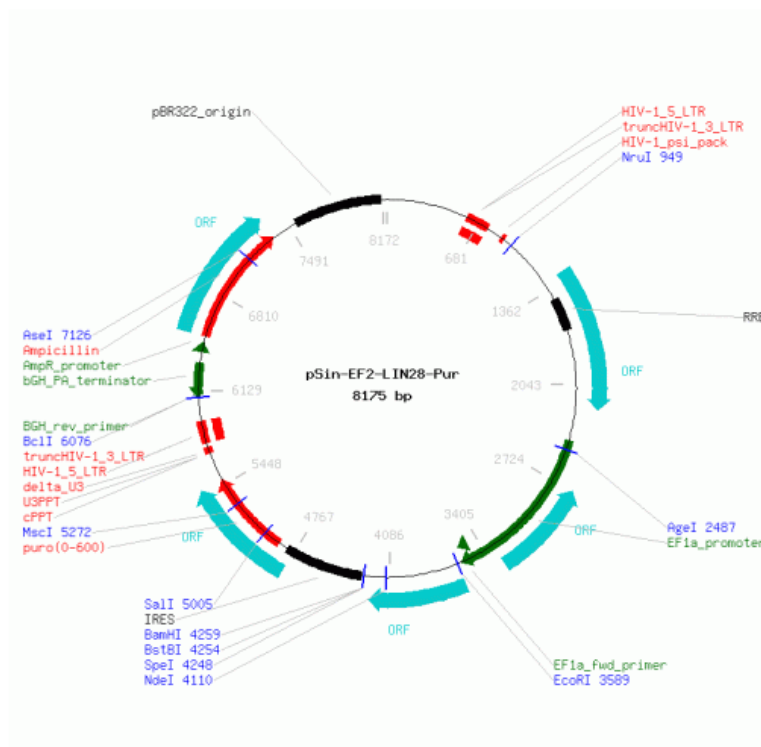


**Abb. 5: Schematische Darstellung des lentiviralen Expressionsvektors pSIN-EF2-SOX2-Pur (J.Thomson-Lab).** pSIN-EF2-SOX2-Pur wurde von Addgene zur Übertragung des Transgens Oct4 zur Herstellung von humanen iPS-Zellen bezogen.

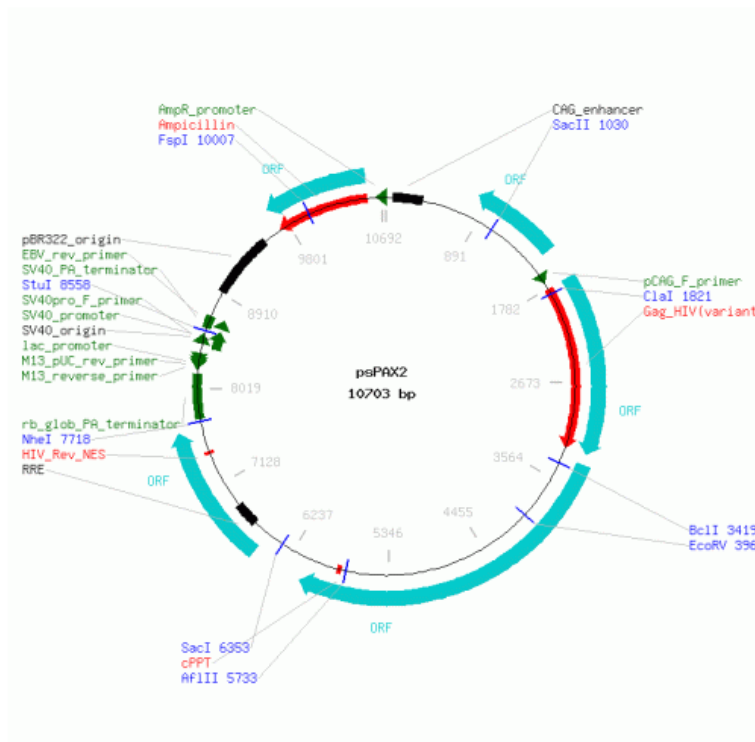




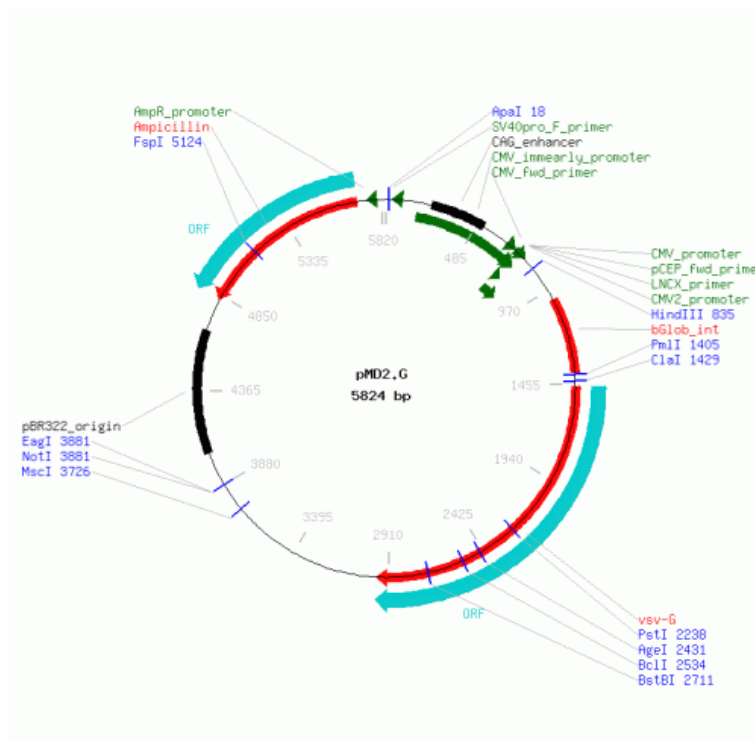
**Abb. 6: Schematische Darstellung des lentiviralen Expressionsvektors pSIN-EF2-Nanog-Pur (J.Thomson-Lab).** pSIN-EF2-Nanog-Pur wurde von Addgene zur Übertragung des Transgens Oct4 zur Herstellung von humanen iPS-Zellen bezogen.



**Abb. 7: Schematische Darstellung des lentiviralen Expressionsvektors pSIN-EF2-LIN28-Pur (J.Thomson-Lab).** pSIN-EF2-LIN28-Pur wurde von Addgene zur Übertragung des Transgens Oct4 zur Herstellung von humanen iPS-Zellen bezogen.



**Abb. 8:** Schematische Darstellung des lentiviralen Verpackungsplasmids psPAX2. (Zur Verfügung gestellt von Didier Trono, Universität Genf)



**Abb. 9:** Schematische Darstellung des Hüllplasmids pMD2.G. (Zur Verfügung gestellt von Didier Trono, Universität Genf)

## 2.1.9. Antikörper

### 2.1.9.1. Primärantikörper

**Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper**

Spezies	Klasse	Name	Klonalität	Firma	Verdünnung
Mouse	IgG2b	Anti-OCT4	Monoclonal	Santa Cruz Biotechnologie, CA,USA	1 : 100
Mouse	IgG1	Anti-NANOG	Monoclonal	Abcam, Cambridge, USA	1 : 500
Goat	Goat IgG	Anti-SOX2	Polyclonal	Santa Cruz Biotechnologie, CA,USA	1 : 200
Goat	Goat IgG	Anti-LIN28	Polyclonal	R&D Systems, Minneapolis, USA	1: 200
Mouse	IgM	Anti-TRA-1-60	Monoclonal	Abcam, Cambridge, USA	1 : 100
Mouse	IgM	Anti-SSEA-3	Monoclonal	Hybridoma Bank, Iowa City, IA, USA	1 :100
Mouse	IgG3	Anti-SSEA-4	Monoclonal	Hybridoma Bank, Iowa City, IA, USA	1 : 70
Mouse	IgG1	Anti-Troponin T	Monoclonal	Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany	1 : 100
Mouse	IgG1	Anti-Sarcomeric- $\alpha$ -Actinin	Monoclonal	Sigma, Missouri, USA	1 : 800
Mouse	IgG1	Anti- $\alpha$ -Fetoprotein	Monoclonal	R&D Systems, Minneapolis, USA	1 : 300
Mouse	IgG1	Anti-CD31	Monoclonal	Dako, Glostrup, Denmark	1 : 20
Mouse	IgG2a	Anti- $\beta$ -Tubulin	Monoclonal	Upstate, NY, USA	1 : 400
Rabbit	IgG1	Anti-Connexin43	Monoclonal	Chemicon, Massachusetts, USA	1 : 100
Mouse	IgG2a	Anti-CD14-FITC	Monoclonal	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany	1 : 11
Mouse	IgG2a	Anti-CD34-FITC	Monoclonal	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany	1 : 11
Mouse	IgG2a	Anti-CD45-FITC	Monoclonal	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany	1 : 11
Mouse	IgG1	Anti-CD146-FITC	Monoclonal	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany	1 : 11
Mouse	IgG1	Anti-CD31-FITC	Monoclonal	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany	1 : 11
Mouse	IgG1	Anti-CD133-FITC	Monoclonal	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany	1 : 11
Mouse	IgG2a	Anti-HNF4	Monoclonal	Abcam, Cambridge, USA	1 : 50
Mouse	IgG1	Anti-Desmin	Monoclonal	Progen Biotechnik, Heidelberg, Germany	1 : 20
Mouse	IgG1	Anti-Cytocerin 18	Monoclonal	Dako, Glostrup, Denmark	1 : 25
Goat	Goat IgG	Anti-Sox17	Monoclonal	R&D Systems, Minneapolis, USA	1 : 200

### 2.1.9.2. Sekundärantikörper

Cy <sub>TM</sub> 2-conjugated AffiniPure donkey anti-mouse IgG Verdünnung 1: 200	Jackson Immunoresearch Laboratories, Suffolk, UK
Cy <sub>TM</sub> 3-conjugated AffiniPure donkey anti-mouse IgG, Verdünnung 1:200	Jackson Immunoresearch Laboratories, Suffolk, UK
Cy <sub>TM</sub> 3-conjugated AffiniPure donkey anti-mouse IgM, Verdünnung 1:200	Jackson Immunoresearch Laboratories, Suffolk, UK

### 2.1.9.3. Isotypen Negativkontrollen

Maus IgG1	R&D Systems, Minneapolis, USA
Maus IgG2a	Dako, Glostrup, Dänemark
Maus IgG2b	Dako, Glostrup, Dänemark
Maus IgG3	Dako, Glostrup, Dänemark
Maus IgM	R&D Systems, Minneapolis, USA
Rabbit IgG1	Chemicon, Massachusetts, USA
Goat IgG	R&D Systems, Minneapolis, USA

### 2.1.10. Medien

#### 2.1.10.1. Nährmedien für Bakterien

Luria Broth-Medium:	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g Natriumchlorid add H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> 1L pH 6,9
Luria Broth-Agar:	LB-Medium + 15 g Agar add H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> 1L pH 6,9
Terrific Broth-Medium:	12 g Trypton 24g Hefeextrakt 9,4g Dikaliumphosphat 2,2g Kaliumdiphosphat add H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> 1 L
SOC-Medium:	20 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 5g NaCl <sub>2</sub>

2,5 mM KCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM MgSO<sub>4</sub>  
20 mM Glucose  
add H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> 1L  
pH 6,9

YT-Agar: 16 g Trypton  
10 g Hefeextrakt  
5 g NaCl<sub>2</sub>  
15g Agar  
add H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

### 2.1.10.2. Basalmedien für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Kat. 21969-035 (Invitrogen, Karlsruhe)  
KnockOut DMEM Kat. 10829-018 (Invitrogen, Karlsruhe)  
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) Kat. 21980-032 (Invitrogen, Karlsruhe)

### 2.1.10.3. Medienzusätze

MEM nicht essentielle Aminosäuren Kat. 11140-035 (Invitrogen, Karlsruhe)  
L-Glutamin Kat. 25030-024 (Invitrogen, Karlsruhe)  
Serumersatz (KnockOut Serumreplacement) Kat.10828- (Invitrogen, Karlsruhe)  
β-Mercaptoethanol Kat. 31350-010 (Invitrogen, Karlsruhe)  
Basic fibroblast growth factor (bFGF), bereitgestellt vom Institut für Technische Chemie,  
Leibniz Universität Hannover  
Rho Kinase Inhibitor (Y27632) (RI), bereitgestellt vom Institut für organische Chemie,  
Leibniz Universität Hannover

### 2.1.10.4. Kulturmedium für embryonale murine Fibroblasten und humane Lungenfibroblasten (Fibroblastenmedium)

90 % Dulbecco's Modified Eagle Medium  
10 % Fötales Kälberserum (PAA, Cölbe)  
1 % nicht essentielle Aminosäuren  
1 % L-Glutamin (2mM)

### **2.1.10.5. Kulturmedium für Endothelzellen (Endothelzellmedium)**

EBM-2 (Endothelzell Basalmedium (Lonza, Verviers, Belgium))

2 % FCS (PAA, Cölbe)

EGM-2 (Wachstumsfaktorenzusatz mit VEGF,EGF,FGF-2, R3-IGF-1, Hydrokortison, Ascorbinsäure, Heparin, Gentamycin und Amphotericin B (Lonza, Verviers, Belgium))

### **2.1.10.6. Kulturmedium für undifferenzierte Stammzellen (ES-Medium)**

80 % KnockOut DMEM

20 % Serumersatz

1% nicht essentielle Aminosäuren

0,1 % L-Glutamin (1mM)

0,025 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (0,1mM)

8 ng / ml basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (ES-Zellen)

oder 16 ng / ml bFGF (iPS-Zellen)

### **2.1.10.7. Differenzierungsmedium**

80 % IMDM

20 % Fötale Kälberserum (Perbio, Kat.CH30160.03 LOT CPB0054)

1 % nicht essentielle Aminosäuren

0,1 % L-Glutamin (1mM)

0,025 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (0,1 mM)

## **2.2. Methoden**

### **Zellkultur-Methoden**

#### **2.2.1. Auftauen von Zellen**

Das Auftauen von eukaryoten Zellen erfolgte durch vorsichtige Erwärmung der Zellsuspension in Kryoröhrchen im 37°C-Wasserbad.

Zum Auftauen von murinen embryonalen Fibroblasten, humanen Lungenfibroblasten und Nabelschnurblut-Endothelzellen wurden die Kryoröhrchen aus flüssigem Stickstoff direkt in ein 37°C-Wasserbad überführt und darin geschwenkt, bis nur noch wenig gefrorene Zellen als Eisklumpen identifizierbar waren. Mit Hilfe einer Pipette wurden die Zellen anschließend in 10 ml vorgekühltes Kulturmedium in einem 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 253 x g für 5 min bei 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und in Petrischalen mit 5 ml vorgelegtem Kulturmedium ausgesät. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> im Zellkulturbrutschrank.

Zum Auftauen von pluripotenten Zellen, wie iPS- und ES-Zellen wurden diese im Wasserbad erwärmt. Es erfolgte eine Überführung der Zellen in 4 ml, auf Eis vorgekühltem Kulturmedium für ES-Zellen. Das Medium wurde 3 min bei 134 x g, 4°C abzentrifugiert und die Zellen in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Auf bestrahlten Feeder-Zellen wurden anschließend 2 ml Kulturmedium für ES-/iPS-Zellen vorgelegt und die Zellen darauf durch vorsichtiges Pipettieren an den Rand des Wells ausgesät.

#### **2.2.2. Isolierung und Kultivierung von Zellen**

##### ***2.2.2.1. Isolierung, Kultivierung und Inaktivierung von murinen embryonalen Fibroblasten***

Murine embryonale Fibroblasten wurden aus Mäuseembryonen (13 d.p.c.) isoliert und als „Feeder-Zellen“ für pluripotente Stammzellen verwendet. Feeder-Zellen dienen als Lieferanten verschiedener Faktoren. Durch die Verwendung von Feeder-Zellen wird das

Verbleiben von pluripotenten Zellen im undifferenzierten Zustand gewährleistet. Zur Isolierung wurden trächtige weibliche Mäuse durch Genickbruch getötet und durch 70%igen Ethanol desinfiziert. Der Bauchraum wurde mit Hilfe eines Skalpells geöffnet. Die Uteri der Mäuse wurden vorsichtig herauspräpariert und in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  überführt. Anschließend konnten die Embryonen in der Petrischale aus den Uteri entnommen werden, sie wurden decapitiert und die Entfernung der Innereien wurde vorgenommen. Es erfolgte ein 2-maliges Waschen des verbleibenden Embryos in je 10 ml PBS. Anschließend wurde das Gewebe auf Eis in 2 ml Trypsinlösung mechanisch zerkleinert. Es wurden 15 ml 0,05% / 0,2% Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben und die Zellsuspension in einen 250 ml-Kolben überführt. Dann erfolgte eine Inkubation der Suspension für 15 min auf dem Magnetrührer bei 37°C im Brutschrank zur Dissoziation des Gewebes. Durch Zugabe von 51 ml Fibroblastenmedium wurde der Verdau abgestoppt. Es folgte ein Resuspendieren der Zellen durch auf- und abpipettieren. Zur Verdünnung wurden 22 ml PBS zugegeben. Die Zellsuspension wurde durch 100- $\mu\text{m}$  Zellsiebe filtriert. Es folgte eine Pelletierung der Zellen bei 134 x g für 10 min bei 4°C. Die Zellpellets wurden anschließend in je 2 ml Fibroblastenmedium aufgenommen und gepoolt. Es folgte eine Zellzahlbestimmung und das Aussäen der Zellen auf Petrischalen mit einer Dichte von  $2,5 \times 10^6$  Zellen. Nach 24 h konnte das Medium gewechselt werden. Bei konfluentem Bewuchs der Schalen wurden die Zellen eingefroren.

Murine embryonale Fibroblasten wurden in Kunststoff-Gewebekulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm kultiviert. Pro Schale wurden ca. 10 ml Fibroblastenmedium zugegeben, das alle 2-3 Tage gewechselt wurde. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  im Zellkulturbrutschrank. Die Zellen wurden bei Erreichen von ca. 80-90% Konfluenz passagiert. Zum Passagieren wurden die Zellen einmal mit PBS w/o gewaschen und mit 0,05% / 0,2% Trypsin/EDTA Lösung (5 min 37°C) von der Zellkulturschale abgelöst. Die Reaktion wurde mit Fibroblastenmedium gestoppt und die Zellen nach Zentrifugation (5 min 500 x g 4°C) auf neue Zellkulturschalen ausgesät. Zur Inaktivierung wurden die Zellen abgelöst, mit  $\gamma$ -Strahlen behandelt und in definierten Zellzahlen in 90%FCS+10%DMSO eingefroren. Zur Verwendung als Feeder-Zellen, wurden die inaktivierten Fibroblasten aufgetaut und in einer Dichte von ca. 30.000 Zellen /  $\text{cm}^2$  ( $0,28 - 0,3 \times 10^6$  Zellen pro Well einer 6 Well Platte) auf mit 1% Gelatine beschichteten Zellkulturplatten ausgesät. Die inaktivierten Fibroblasten wurden für höchstens sieben Tage als Feeder-Zellen verwendet.



#### **2.2.2.2. Isolierung und Kultivierung von humanen Lungenfibroblasten**

Humane Lungenfibroblasten wurden aus Lungenresektionen nach schriftlicher Einwilligung der Spender isoliert. Normales Lungengewebe aus der subpleuralen Region wurde in kleine Stücke zerschnitten und mit Dispaselösung bei 4°C für 18 h inkubiert. Die Lösung wurde durch ein 100 µm Zellsieb gefiltert. Die verbleibenden Gewebefragmente wurden mit Elastase und Trypsinlösung für 30 min bei 37°C behandelt. Die resultierende Zellsuspension wurde durch sequenzielles Pipettieren und Filtrieren durch 40 µm und 100 µm Zellsiebe homogenisiert. Die isolierten Lungenfibroblasten wurden in Fibroblastenmedium mit 5% Penicillin/Streptomycin in Kunststoff-Gewebekulturschalen- oder -Flaschen kultiviert. Bei Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin passagiert.

#### **2.2.2.3. Isolierung und Kultivierung von humanen Endothelzellen aus Nabelschnurblut (hCBEC)**

Zur Isolation von humanen endothelialen Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut (human cord blood progenitor cells, hCBEPCs), wurde heparinisiertes humanes umbilicales Nabelschnurblut (2,5 I.E Heparin/ml), von gesunden neugeborenen Spendern, nach Einwilligung der Eltern 1 : 1 mit PBS mit 2 mM EDTA gemischt. Je 30 ml wurden für 20 min bei 840 x g und 20°C ohne Bremse einer Dichtegradientenzentrifugation mit 15 ml Ficoll unterzogen. Die mononukleäre Zellen enthaltende Interphase wurde mit 50 ml PBS + 2 mM EDTA gewaschen und in Endothelzellmedium auf Gelatine-beschichteten Zellkulturflaschen ausgesät. Die Zellkulturflaschen wurden nach fünf Tagen auf das Auftreten von Endothelzell-Kolonien mit Kopfsteinpflaster-Morphologie kontrolliert. Ein Mediumwechsel erfolgte im 1–2-tägigen Rhythmus. Bei Erreichen von 70% Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin passagiert.

#### **2.2.2.4. Kultivierung von humanen pluripotenten embryonalen Stammzellen (hES-Zellen) und humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen)**

Humane embryonale Stammzellen (hES-Zellen) und humane induzierte pluripotente Zellen (hiPS-Zellen) wurden in Multiwell-Platten auf durch  $\gamma$ -Strahlen inaktivierten murinen Fibroblasten (Feeder-Zellen) kultiviert. Die eingesetzten 3 ml ES-Medium pro Well wurden im Abstand von 24–48 h gewechselt. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> im

Zellkulturbrutschrank. Die Zellen wurden täglich durch mikroskopische Beobachtung beurteilt. Wenn die Kolonien eine bestimmte Größe oder Dichte überschritten, wurde sie passagiert. Das Passagieren erfolgte meist nach 3–5 Tagen durch eine kombinierte enzymatische und mechanische Behandlung. Dazu wurden die Kolonien für 10–15 min mit 0,2% Kollagenase IV Lösung bei 37°C inkubiert und anschließend durch leichtes Klopfen an die Platte oder durch vorsichtiges Spülen mit Kulturmedium von den Feeder-Zellen gelöst. Nach Zentrifugation für 3 min. bei 100 x g wurden die Stammzellkolonien vorsichtig resuspendiert und auf frische Feeder-Zellen ausgesät.

### **2.2.3. Herstellung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen)**

Zur Herstellung von hiPS-Zellen wurden  $8 \times 10^5$  oder  $4 \times 10^5$  Ausgangszellen (hLF oder hCBEC) mit den lentiviralen Vektoren pSIN-EF2-Oct4-Pur, pSIN-EF2-Sox2-Pur, pSIN-EF2-Nanog-Pur and pSIN-EF2-LIN28-Pur mit einer MOI (Multiplizität der Infektion) von 20 oder 50 in einem Volumen von 1–1,5 ml mit 8 µg / ml Polybrene transduziert. Nach der Inkubation für 4 h bei 37°C in Rotation wurde das Zell-Virus-Gemisch auf 10 cm Gewebekulturschalen ausgesät und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte am nächsten Tag. Die Zellen wurden für sechs Tage ohne Passagierung in Endothelzellmedium (hCBEC) oder Fibroblastenmedium (hLF) kultiviert und wurden dann auf inaktivierte Feeder-Zellen transferiert. 26–30 Tage nach Transduktion konnten die ersten iPS-Zellkolonien beobachtet werden. Die Kolonien wurden bei Erreichen einer bestimmten Größe mechanisch passagiert, d.h. nach Ausschneiden mit Hilfe einer Glaskapillare anhand einer Pipettenspitze auf frische Feeder-Zellen überführt.

### **2.2.4. Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Neubauerkammer. 10µl der zu bestimmenden Zellsuspension wurden mit 90µl Trypanblaulösung versetzt. Trypanblau färbt die Kerne toter Zellen blau, und erlaubt so die Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen. Das Deckglas der Neubauerkammer wurde durch Anhauchen befeuchtet und so auf die Neubauerkammer gepresst, so dass sich deutlich sichtbare *Newtonsche Ringe* bildeten. Die mit Trypanblaulösung versetzte Zellsuspension wurde vorsichtig unter das Deckglas pipettiert. Die Auszählung von vier Großquadraten erfolgte am Durchlicht-Mikroskop bei

einer 20-fachen Vergrößerung. Anschließend wurde die Gesamtzellzahl der Zellsuspension mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{N}{Q \cdot V_K} \cdot \frac{V_G}{V_Z} = x$$

N = Anzahl gezählte Zellen [Zellen]

Q = Anzahl gezählte Quadrate

V<sub>K</sub> = Kammervolumen über einem Großquadrat (= 10<sup>-4</sup> ml)

V<sub>G</sub> = eingesetztes Gesamtvolumen Trypanblau Zellsuspension [ml]

V<sub>Z</sub> = Volumen der eingesetzten Zellsuspension [ml]

x = Zellzahl [Zellen/ml]

## 2.2.5. Differenzierung von Zellen

### 2.2.5.1. EB-basierte *in vitro*-Differenzierung

Um die *in vitro*-Differenzierung von humanen ES- und iPS-Zellen zu induzieren wurden diese in kleinen Aggregaten für sieben Tage in *Ultra-Low Attachment*-Schalen in Differenzierungsmedium kultiviert. Je 20 resultierende EB's pro Well wurden auf 0,1%-Gelatine-beschichtete 6-Well-Platten ausplattiert. Beginnend an Tag acht der Differenzierung, wurden die Zellen täglich auf spontan kontrahierende Areale kontrolliert.

### 2.2.5.2 *In vivo*-Differenzierung durch Induktion von Teratomen

Zur *in vivo*-Differenzierung wurden hiPS-Zellen mit dem Rho-Kinase (ROCK) Inhibitor (10µM) für 1 h bei 37°C vorbehandelt und mit 0,2% Kollagenase IV von den Feeder-Zellen abgelöst. Anschließend wurden Teratome durch Injektion der Zellsuspension unter die Nierenkapsel oder den hinteren Oberschenkelmuskel von SCID-beige Mäusen (Charles River Laboratories, Wilmington, USA) induziert. Nach 8–10 Wochen wurden die Tiere getötet und die Teratome herauspräpariert. Es erfolgte die Fixierung in 4% Formalin. Nach der Dehydratation mit dem Shandon Hypercenter, XP wurden die Teratome in Paraffin eingebettet. 2µm-Schnitte wurden mit Xylen deparaffinisiert und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

### **2.2.6. Karyotypanalyse**

Die Überprüfung des Karyotypes erfolgte anhand von G-Banden Karyogrammen. Hierfür wurden die adhärenenten Zellen 30 min mit 0,025, 0,05 und 0,1 µg /ml Colcemid behandelt und mit 0,83 % Trypsin / EDTA dissoziiert, gefolgt von einer Behandlung mit 60 nM oder 75 nM Kaliumchlorid für 20 min bei 37°C. Die G-Banden Karyogramme wurden in der Abteilung für Humangenetik der MH-Hannover hergestellt und von Prof. K. Miller beurteilt.

### **2.2.7. Immunzytologische Färbungen**

Immunzytologische Färbungen wurden nach Fixierung der Zellen mit 4% Paraformaldehyd vorgenommen. Das Paraformaldehyd wurde durch dreimaliges Waschen in PBS entfernt. Um unspezifische Bindungen der Sekundärantikörper zu verhindern, wurden die Proben im nächsten Schritt mit 1 x TBS+ für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen des Ansatzes in PBS wurden die Primärantikörper, wie in Tabelle 3 (Seite 38/39) beschrieben, eingesetzt. Die Zellen wurden für 1 h mit dem in Färbepuffer verdünnten Antikörper inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Eine weitere Inkubation wurde mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (Abschnitt 2.1.9.2, Seite 39) für 30 min bei Raumtemperatur angeschlossen. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellenkerne mit DAPI gegengefärbt und mikroskopisch analysiert.

### **2.2.8. Durchflusszytometrie**

Die zu analysierenden Zellen wurden zu Einzelzellsuspensionen dissoziiert. Es wurden  $1-1,5 \times 10^5$  Zellen in ein Well einer 96-Well V-Bottom-Platte überführt und pelletiert (2 min bei 300 x g). Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen mit dem spezifischen Antikörper, in entsprechender Verdünnung in FACS-Puffer, für 45 min bei 4°C inkubiert. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurde anschließend zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte im Dunkeln für 30 min bei 4°C. Vor der Messung wurde überschüssiger Sekundärantikörper durch zweimaliges Waschen mit FACS-Puffer entfernt und die Proben in FACS Probenröhrchen überführt. Die

für die Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3 (Seite 38/39) aufgeführt. Um tote Zellen von den Analysen ausschließen zu können, wurde zusätzlich zu den spezifischen Antikörperfärbungen eine Färbung mit Propidiumiodid (PI) vorgenommen. PI kann nur die nicht intakte Zellmembran von geschädigten Zellen passieren. Geschädigte beziehungsweise tote Zellen zeigen daher ein Fluoreszenzsignal bei einer Wellenlänge von 590 nm. PI-positive Zellen konnten so bei der anschließenden Auswertung ausgeschlossen werden. Die Messung der Proben erfolgte mit dem FACS Calibur (Becton Dickinson, USA). Die erhaltenen Rohdaten wurden mit der Software WinMDI 2.9 ausgewertet.

### **2.2.9. Virusproduktion für die lentivirale Transduktion**

Die Plasmide pSIN-EF2-Oct4-Pur, pSIN-EF2-Sox2-Pur, pSIN-EF2-Nanog-Pur and pSIN-EF2-Lin28-Pur wurden von Addgene ([www.Addgene.org](http://www.Addgene.org)) erworben. Für die Virusproduktion wurde ein zweite-Generation, drei-Plasmid-Verpackungssystem genutzt. Dieses System beinhaltet das Verpackungsplasmid psPAX2 und das Hüllplasmid pMD2.G zur Pseudotypisierung der lentiviralen Partikel mit VSV-G. Das lentivirale Transferkonstrukt (30µg), psPAX2 (19,5µg) und pMD2.G (10µg) wurden durch Anwendung der Kalzium-Phosphat-DNA-Präzipitation in  $9 \times 10^6$  HEK 293T-Zellen kotransferiert. Das Medium wurde nach 48 h gesammelt und durch einen Filter mit 0,45 µm-Porengröße filtriert. Es folgte eine Konzentration durch Zentrifugation für 16 h bei 18.000 x g. Die Viruspeletts wurden in DMEM oder ES-Zellmedium aufgenommen und in flüssigen N<sub>2</sub> eingefroren. Es erfolgte die Bestimmung der aktiven biologischen Titer der Viren anhand von Realtime-PCR.

## **Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.10. Southern Blot Analyse**

Für die Southern Blot Analysen wurden 10µg genomische DNA, die zuvor mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit isoliert wurden, mit *EcoRI* oder *SpeI* enzymatisch verdaut. Die resultierenden Fragmente wurden auf einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt, auf eine Biotinylated Nylonmembran transferiert, mit dem DecaLabel™ DNA Labeling Kit hybridisiert und durch Standard-Protokolle [115] *gestripped*. Um die Provirus-Kopienanzahl zu

bestimmen und um die Klonalität sicherzustellen, wurden die folgenden cDNA-Fragmente als Sonden verwendet: für OCT4, ein Eco81I-Fragment von pSIN-EF2-Oct4-Pur, für SOX2, ein PstI/NcoI-Fragment von pSIN-EF2-Sox2-Pur, für NANOG, ein NcoI-Fragment von pSIN-EF2-Nanog-Pur, für LIN28, ein SmaI/NdeI-Fragment von pSIN-EF2-LIN28-Pur.

### **2.2.11. Bisulfit Sequenzanalyse**

Die Bisulfit Sequenzanalyse wurde mit Hilfe des EpiTect Bisulfit Kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die im Folgenden aufgeführten Primer und Annealingtemperaturen wurden eingesetzt:

OCT4 distal enhancer (DE) 1st sense 5-AGGAGTTATTAGGAAAATGGGTAGTAG-3,

OCT4 DE 1st antisense 5-TACCTTCTAAAAAATAAATATCCC-3,

OCT4 DE 2nd sense 5-ATTTGTTTTTTGGGTAGTTAAAGGT-3,

OCT4 DE 2nd antisense 5-CCAACATCTTCATCTTAATAACATCC-3 (221 bp, 55°C)

Die PCR Produkte wurden in den Vektor PCR 2.1 TOPO (Invitrogen) subkloniert und einzelne Klone wurden durch GATC Biotech, Konstanz, Germany (<http://www.gatc-biotech.com>) sequenziert. Nur Klone mit einer 90 %igen Cytosin-Konversion wurden mit einbezogen und alle möglichen Klonalitäten wurden basierend auf der BIQ Analyzer Software (Max-Planck-Gesellschaft) ausgeschlossen. Es wurden mindestens 10 Replikate der ausgesuchten Regionen angefertigt.

### **2.2.12. RNA-Isolierung und cDNA-Synthese**

Die Gesamt RNA-Isolierung aus Zellkulturproben wurde mit Hilfe eines kombinierten Protokolls aus TRIzol® und dem RNA Isolationskit NucleoSpin® RNA II durchgeführt. Die Zellkulturproben wurden in TRIzol® aufgenommen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Chloroform versetzt und 15 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde laut Herstellerangaben des RNA Isolations Kits zur Isolierung eingesetzt. Die isolierte Gesamt RNA wurde mit Hilfe von RNA 600 nano Chips (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) analysiert. Die eingesetzte RNA wird dabei kapillarelektrophoretisch auf dem Chip aufgetrennt und die

Konzentration durch den Bezug auf einen internen Standard bestimmt. Zusätzlich ermöglichte die Darstellung der enthaltenen 18s und 28s rRNA eine Aussage zur Qualität der isolierten RNA.

Durch den Einsatz der viralen Reversen Transkriptase ist es möglich die isolierte Gesamt RNA in komplementäre DNA (complementary DNA (cDNA)) umzuschreiben, welche als Template in die PCR Analyse eingesetzt werden kann. Die cDNA Synthese erfolgte mit dem RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit laut Herstellerangaben. Für die Synthese wurden Random Primer verwendet.

### **2.2.13. PCR (Polymerase Kettenreaktion)**

[Saki et al.,1988]

#### **2.2.13.1. Konventionelle semiquantitative RT-PCR**

Um semiquantitative Aussagen zur Genexpression der zu analysierenden Zellen treffen zu können, wurde nach Isolierung von zellulärer RNA und anschließender RT-Reaktion zur Generierung von cDNA die konventionelle PCR angewendet. Das PCR-Verfahren macht es möglich, *in vitro* von bestimmten DNA-Sequenzen enzymatisch vielfache Kopien herzustellen. Diese Methode ermöglicht es, sogar geringste Mengen von DNA-Sequenzen zu amplifizieren und zu analysieren. Während der PCR synthetisiert eine DNA-Polymerase, ausgehend von Startermolekülen, einen neuen DNA-Strang an einer einzelsträngigen Nukleinsäure-Matrize. Als Starter- Moleküle (Primer) werden synthetische DNA-Oligonukleotide eingesetzt, die an die Matrizen-DNA hybridisieren. Von deren 3'-Ende aus synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase, z.B. die Taq-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*), den neuen DNA-Doppelstrang. Durch Auswahl eines gegenläufig orientierten Oligonukleotid-Primers kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern amplifiziert werden. Das wichtigste Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, wodurch die Matrize exponentiell amplifiziert wird. Um Kopien von DNA-Abschnitten mit einer höheren Sequenzgenauigkeit herzustellen, kann eine DNA-Polymerase mit „Proofreading“-Aktivität eingesetzt werden. Die PCR lässt sich in mehrere Reaktionsschritte unterteilen:

**1. Denaturierung:**

Der zu amplifizierende DNA-Doppelstrang wird thermisch denaturiert, indem bei ca. 94°C die DNA aufgeschmolzen wird. Es entstehen einzelsträngige DNA-Matrizenmoleküle.

**2. Primer-Annealing:**

Es folgt die Primer-Hybridisierung an die einzelsträngige DNA, wobei die synthetischen Oligonukleotide bei Temperaturen von ca. 45–72°C an die komplementären Sequenzen der Matrizen-DNA binden. Die Annealing-Temperatur der Primer richtet sich nach deren G/C- und A/T-Gehalt und sollte für jedes Primerpaar ermittelt werden.

**3. DNA-Synthese:**

Die Polymerase synthetisiert (in der Regel bei ihrem Temperaturoptimum von 72°C) durch Einbau zugegebener dNTP's (Desoxynukletidtriphosphate) ausgehend von der freien 3'OH-Gruppe der Primer den Strang. Auf diese Weise kommt es zur Amplifikation des zwischen den Primern gelegenen Sequenzabschnittes. Die Schritte 1–3 werden ca. 20–30 x wiederholt, um eine ausreichende Ausbeute der zu amplifizierenden Sequenz zu erhalten. Im Rahmen der Arbeit wurde eine 25 µl Standard-PCR-Reaktion wie folgt in einem 0,5-ml-Eppendorfreaktionsgefäß angesetzt:

1 µl DNA-Template (ca.1 ng/µl)  
5 µl PCR-Puffer (5x)  
1 µl dNTP's (10 mM)  
1 µl Primer 1 (10 pmol/µl)  
1 µl Primer 2 (10 pmol/µl)  
0,25 µl GoTaq-Polymerase (1U/µl)  
15,75 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>  
Σ 25 µl

Bei jeder Reaktion wurde eine entsprechende Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt.

Die Reaktion wurde im Thermocycler mit folgendem Standardprogramm durchgeführt:

1' 94°C  
1' 94°C  
45'' T<sub>A</sub> } 20-30 Zyklen  
90'' 72°C  
15' 72°C  
∞ 4°C  
T<sub>A</sub>= Annealingtemperatur



Die Annealingtemperatur wurde für die verschiedenen Primer, wie in Tabelle 1 (Seite 33/34) aufgeführt, variiert. Die Analyse der Produkte erfolgte durch Agarosegelelektrophorese.

### **2.2.13.2. Realtime PCR**

Um quantitative Aussagen zu Expression von transgenen und endogenen Pluripotenz-assoziierten Genen oder Veränderungen der Genexpression während des Differenzierungsverlaufes treffen zu können, wurde die Methode der quantitativen Real Time PCR (qPCR) verwendet. Zur Quantifizierung wurde der nicht spezifische Farbstoff SYBR® Green eingesetzt. Der Farbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA, wobei der aus Farbstoff und DNA resultierende Komplex Licht der Wellenlänge 520 nm emittiert. Die Menge des aufgenommenen Farbstoffs ist proportional zur Menge des entstandenen PCR-Produkts und wird als Fluoreszenzintensität nach jedem PCR-Zyklus gemessen. Um sicherzustellen, dass ein spezifisches Produkt amplifiziert wurde und somit das Fluoreszenzsignal die Menge des gewünschten Produkts repräsentiert, ist eine Schmelzkurvenanalyse am Ende des PCR-Prozesses notwendig. Hierbei wird die Temperatur schrittweise von 60°C auf 95°C erhöht und die Abnahme der Fluoreszenzintensität verfolgt. Abhängig von Länge und GC-Gehalt des PCR-Produkts kommt es bei einer spezifischen Temperatur zur vollständigen Dissoziation der Doppelstränge, was zur Freisetzung des SYBR® Green Farbstoffs und so zur Abnahme des Fluoreszenzsignals führt. Die Analyse der erhaltenen Daten erfolgt über den sogenannten Ct-Wert. Der Ct-Wert einer Probe ist der PCR-Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal den Wert der Hintergrundfluoreszenz überschreitet und sich der Prozess in der exponentiellen Phase befindet. Zur Quantifizierung der Veränderungen in den Expressionshöhen der untersuchten Gene wurde zunächst die genaue Kopienzahl des Zielgens mit Hilfe einer Standardreihe berechnet. Die Berechnung erfolgte mit der Software ep realplex. Zur relativen Quantifizierung wurde die Expression des Zielgens auf die Expression eines internen Standards bezogen. Als interner Standard wurden die sogenannten Housekeeping-Gene verwendet. Hierbei handelt es sich um Gene, deren Expressionshöhe von den untersuchten Versuchsbedingungen oder des Entwicklungszustandes unbeeinflusst sein sollte. Die für die qPCR verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2 (Seite 34/35) zusammengefasst. Die PCR-Ansätze wurde nach folgendem Schema mit dem ABSOLUTE™ QPCR SYBR® GREEN MIX pipettiert:

5  $\mu$ l cDNA (1 : 5 verdünnt)  
12,5  $\mu$ l SYBR® Green Supermix  
1  $\mu$ l Primer 1 (10  $\mu$ mol)  
1  $\mu$ l Primer 2 (10  $\mu$ mol)  
5,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O  
 $\Sigma$  25  $\mu$ l

Das verwendete PCR Programm ist im Folgenden dargestellt:

15' 95°C  
15'' 95°C  
60'' T<sub>A</sub> } 40 Zyklen  
60'' 72°C  
15'' 95°C  
je 10'' 50°C-98°C; 0,5°C-Schritte  
 $\infty$  4°C  
T<sub>A</sub>= Annealingtemperatur

Die Annealing-Temperatur war vom jeweils verwendeten Primerpaar abhängig. Die Oligonukleotide wurden anhand der GI-Sequenzen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mit Hilfe der Software von Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) entwickelt. Die Synthese der verwendeten Oligonukleotide erfolgte durch MWG Biotech AG.

### 2.2.14. Restriktionsanalyse

Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme) sind eine Klasse von bakteriellen Enzymen, die in ihrer ursprünglichen Funktion fremde, in Bakterienzellen eingedrungene, DNA-Moleküle spalten. Von den drei unterschiedlichen Klassen von Restriktionsenzymen werden in der Molekularbiologie meist nur Typ II Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Restriktionsendonukleasen erkennen in der Regel spezifische 4–8 Basenpaar lange Sequenzen der DNA, binden an diese und führen innerhalb dieser Sequenzen Doppelstrangbrüche durch hydrolytische Spaltung von Phosphodiester-Bindungen ein. Bei den Erkennungssequenzen handelt es sich meist um Palindrome, d.h., sie sind punktsymmetrisch und damit in beiden DNA-Strängen gleich. Es entstehen bei den gespaltenen DNA-Molekülen entweder glatte („blunt ends“) 5'- bzw. 3'-überstehende („sticky ends“) Enden, die eine anschließende Ligation mit kompatiblen Enden ermöglichen. Restriktionsspaltungen wurden als analytische Verdaue zur Charakterisierung der von

Addgene erworbenen Plasmidkonstrukte durchgeführt. Bei einem Restriktionsverdau wurden 0,3–0,5 µg DNA mit 5–10 U / µg DNA der entsprechenden Restriktionsenzyme unter geeigneten Pufferbedingungen verdaut. Der Verdau wurde in der Regel nach 1–2 h durch Hitzeinaktivierung gestoppt. Je nach Restriktionsendonuklease ergaben sich unterschiedliche Inkubations- und Inaktivierungsbedingungen. Die Inkubation und Inaktivierung wurde entweder im Heizblock oder in einem Thermocycler mit Deckelheizung durchgeführt.

### **2.2.15. Agarosegelelektrophorese**

Zur Identifizierung und Analyse wurden die nach Restriktionsspaltung entstandenen DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Elektrophorese ist ein Verfahren, bei dem geladene Moleküle in einem elektrischen Feld wandern, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe und der Form der Moleküle sowie ihrer elektrischen Ladung abhängt. Kleine und kompakte DNA-Moleküle können schneller wandern, als große oder entfaltete Moleküle. Aufgrund ihrer negativen Grundladung wandern Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld zur Anode. Je nach gesuchter Fragmentgröße kann die Porengröße des Agarosegels durch Zugabe von unterschiedlichen Mengen Agarose variiert werden. Zur optischen Visualisierung wurden die Fragmentbanden durch Zugabe von Ethidiumbromid markiert. Dieses zeigt nach Bindung an DNA eine ca. 50-fach stärkere Fluoreszenz als in ungebundener Form. Die Größen der gesuchten Fragmente konnten durch Vergleich mit einem Größenstandard bestimmt werden. Dazu wurden jeweils 5 µl des SmartLadder-Molekulargewichtsmarkers eingesetzt.

### **2.2.16. Präparation von Plasmid-DNA**

Es gibt mehrere Möglichkeiten, Plasmid-DNA nach der Vermehrung in *E. coli*-Bakterien zu präparieren. Die Wahl der Methode richtet sich nach der gewünschten Menge und Reinheit der zu isolierenden DNA, basiert aber in der Regel auf der Methode von Birnboim und Doly (1979). Zunächst werden die Bakterien mit RNAsen-haltigem Puffer zur Eliminierung von bakterieller RNA behandelt. Anschließend erfolgt eine alkalische Lyse und die Denaturierung der DNA durch einen SDS enthaltenden Puffer. Durch Behandlung mit einem dritten Puffer,

welcher Kaliumacetat enthält, kommt es zur Neutralisation der Lösung. Dabei hybridisieren die Stränge der Plasmid-DNA wieder, während die größere chromosomale DNA im einzelsträngigen Zustand verbleibt und zusammen mit Proteinen und anderen Zelltrümmern in SDS-Kalium-Flocken ausfällt. Eine Separation von Plasmid-DNA-haltigem Überstand kann erfolgen.

Die von Addgene erworbenen und in *E. coli*-Bakterien gelieferten Plasmide zur Reprogrammierung von somatischen Zellen wurden nach Vermehrung der Bakterien in Antibiotikum-haltigen Medien durch Präparation isoliert.

Um große Mengen reiner Plasmid-DNA für die anschließende Transfektion und Virusproduktion in eukaryoten Zellen zu erhalten, wurde eine Plasmid-Maxipräparation durchgeführt. Dazu wurde das Gen Elute™ HP Plasmid Maxiprep Kit eingesetzt. Für die Maxipräparation wurden 100ml Antibiotikum-haltiges Medium mit 100µl Flüssig-Vorkultur der Plasmid-haltigen Bakterien inokuliert und über Nacht bis zu einer OD<sub>570</sub> von ca. 0,3 inkubiert. Es erfolgte die Präparation der DNA nach Herstellerangaben. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde im Anschluss durch eine Isopropanolfällung ankonzentriert. Eine Bestimmung der Konzentration erfolgte am Nano-Drop-Spektrophotometer.

### **3. ERGEBNISSE**

#### ***3.1. Induktion von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen)***

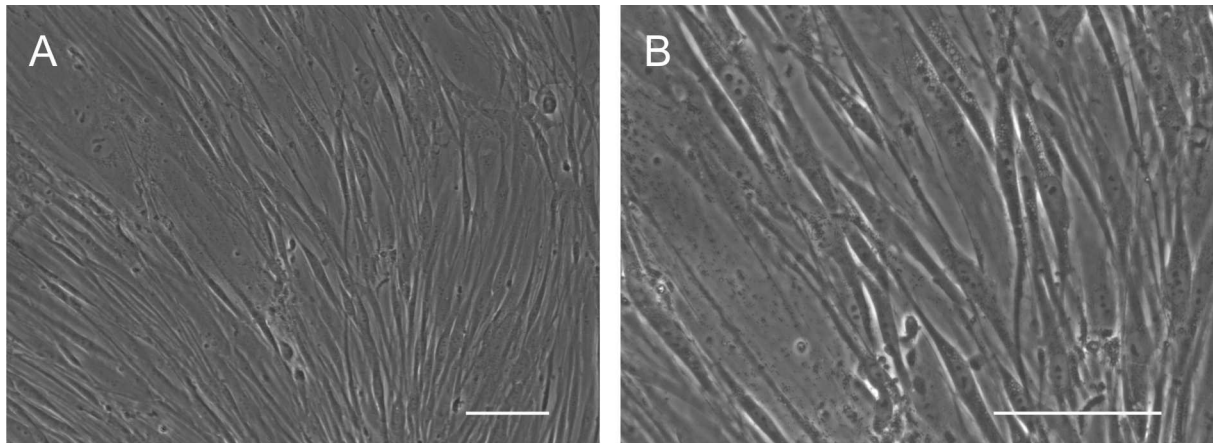
Vor dem eigentlichen Beginn der Versuche zur Induktion von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS), stand zunächst einmal die Austestung von einigen Versuchsbedingungen. Hierzu zählten die Identifizierung eines geeigneten klinisch relevanten Zelltyps als Ausgangszellen, sowie die Etablierung der Bedingungen zur lentiviralen Transduktion, um die Reprogrammierung der Ausgangszellen zur Induktion von hiPS-Zellen zu erreichen. Weiterhin mussten die Kultivierungsbedingungen nach der Transduktion der Ausgangszellen und nach deren Reprogrammierung zu iPS-Zellen experimentell ermittelt werden. Erst nachdem diese Parameter ausgetestet waren, konnte mit der Generierung und allgemeinen Charakterisierung der humanen iPS-Zellen begonnen werden.

##### **3.1.1. Isolierung und Charakterisierung von humanen Lungenfibroblasten (hLF)**

Um zu testen, ob die Reprogrammierung von humanen somatischen Zellen mit den im Rahmen der Arbeit ausgewählten Methoden möglich war, wurden zunächst Vorversuche mit einer der Arbeitsgruppe zur Verfügung stehendem Zellisolat, den humanen Lungenfibroblasten (hLF) gemacht.

Die Isolierung von humanen Lungenfibroblasten erfolgte durch Dr. Christian Hess, AG Bioartifizielle Lunge, HTTG, MH-Hannover, wie im Methodenteil unter (2.2.2.2.) beschrieben. Nach dem enzymatischen Verdau und der Kultivierung des Lungengewebes, war in den Zellkulturgefäßen eine homogen erscheinende, adhärend wachsende Zellpopulation mit Fibroblastenmorphologie zu beobachten (Abb. 10).

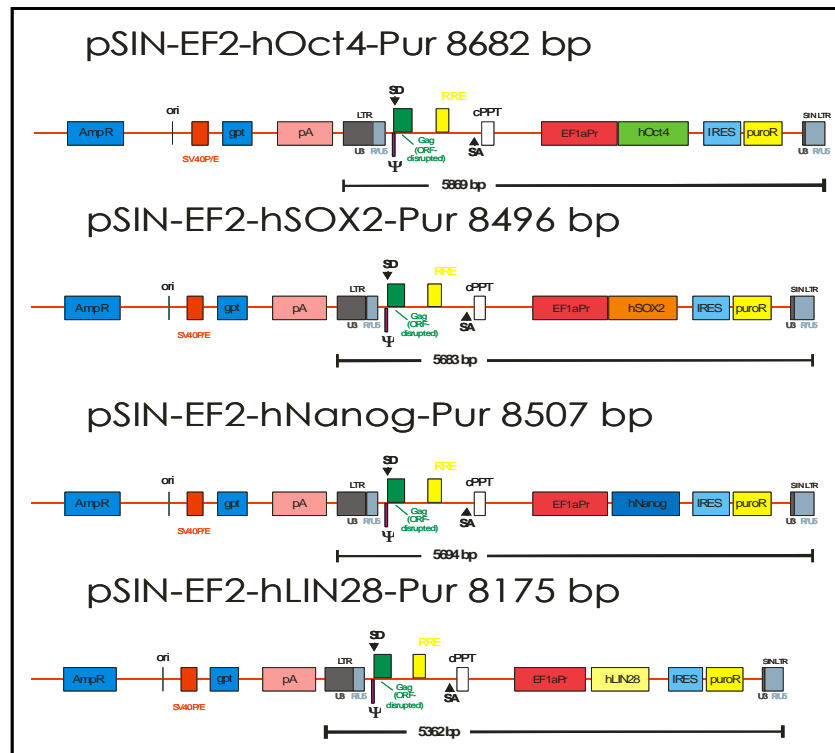
Da es sich bei der Reprogrammierung von hLF nur um einen Vorversuch handelte, erfolgte die Charakterisierung der Zellen ausschließlich durch die typische, ausgeprägte Morphologie der Fibroblasten.



**Abb. 10: Mikroskopische Darstellung von humanen Lungenfibroblasten (hLF).** Die aus humanem Lungengewebe isolierten Zellen wiesen die typische Morphologie von Fibroblasten auf. Vergrößerung: 200-fach (A) und 400-fach (B). Skalierung: 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.2. Induktion von pluripotenten Stammzellen aus humanen Lungenfibroblasten (hLFiPS)

Zu Beginn der Reprogrammierungsversuche war zunächst die Etablierung eines Protokolls zur Induktion von pluripotenten Stammzellen aus humanen somatischen Zellen notwendig. In diesen Vorversuchen sollte die Reprogrammierung von pluripotenten Stammzellen aus den in diesem Fall aus humanem Lungengewebe gewonnenen Fibroblasten, die laut Literatur [15, 42, 94] erfolgreich reprogrammierbar sein sollten, durch lentivirale Transduktion mit den Viren pSIN-EF2-hOct4-Pur, pSIN-EF2-hSOX2-Pur, pSIN-EF2-Nanog-Pur und pSIN-EF2-hLIN28-Pur [42] (Abb. 11) und der damit ausgelösten Überexpression der Reprogrammierungsfaktoren OCT4, SOX2, NANOG und LIN28 unter Kontrolle des humanen EF1 $\alpha$ -Promotors gezeigt werden.



**Abb. 11:** Schematische Darstellung der zur Reprogrammierung von humanen Zellen verwendeten lentiviralen Vektoren pSIN-EF2-hOCT4-Pur, pSIN-EF2-hSOX2-Pur, pSIN-EF2-hNanog-Pur und pSIN-EF2-hLIN28-Pur.

Hierbei waren mehrere Parameter, die zu einer erfolgreichen Reprogrammierung der Zellen führen sollten, auszutesten: 1. benötigte Zellzahl der Ausgangszellen 2. MOI der Viren zur Transduktion, 3. Kultivierungsbedingungen der Fibroblasten nach der Transduktion, 4. Kultivierungsbedingungen der möglichen iPS-Zellen nach Reprogrammierung der Ausgangszellen.

Im ersten Vorversuch wurden  $0,3 \times 10^6$  hLF mit pSIN-EF2-hOct4-Pur, pSIN-EF2-hSOX2-Pur, pSIN-EF2-Nanog-Pur und pSIN-EF2-hLIN28-Pur mit einer unbekanntem MOI (die Titerbestimmung der produzierten Viren war noch nicht abgeschlossen) transduziert. Die transduzierten Zellen wurden direkt am nächsten Tag enzymatisch mit Trypsin von den Gewebekulturschalen gelöst, auf murine Feeder-Zellen ausgesät und in ES-Zellmedium kultiviert. Es erfolgte eine tägliche mikroskopische Kontrolle auf morphologische Veränderungen der hLF und eine mögliche ES-zellartige Koloniebildung. Die mikroskopische Kontrolle in den nächsten 30 Tagen zeigte in diesem ersten Vorversuch keine Bildung von Kolonien.

In einem weiteren Experiment wurden die Reprogrammierungsbedingungen an die von

Thomson und Yamanaka beschriebenen Protokolle [42, 116] angepasst (Abb. 12). Je Ansatz wurden  $4 \times 10^5$  hLF mit pSIN-EF2-hOct4-Pur, pSIN-EF2-hSOX2-Pur, pSIN-EF2-Nanog-Pur und pSIN-EF2-hLIN28-Pur mit einer bekannten MOI von 20 oder 50 transduziert. Die Proliferationszeit der Zellen auf Gelatine-beschichteten Petrischalen in Fibroblasten-Medium wurde auf sechs Tage erhöht. Erst nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen in ES-Zellkultivierungsbedingungen überführt, d.h., sie wurden auf einen murinen Feeder-Layer umgesetzt und in ES-Zellmedium kultiviert. Bei diesem Experiment konnten bereits nach 14 Tagen morphologische Veränderungen innerhalb des Fibroblasten-Zellrasens beobachtet werden. Diese später als „Phase1-Kolonien“ (Abb. 13) bezeichneten Veränderungen, wiesen jedoch vermutlich keine vollständig reprogrammierten Zellen auf, da sie nicht die für pluripotente embryonale Stammzellen charakteristische Morphologie zeigten. Die Zellen innerhalb der Phase1-Kolonien wiesen, im Vergleich zu ES-Zellen, eine aufgelockerte Wuchsform auf und waren nicht kompakt Zelle an Zelle gelegen. Die einzelnen Zellen waren zwar kleiner als die ursprünglichen Lungenfibroblasten, wiesen aber nicht die ES-zelltypische rundliche bis ovale Zellform auf. Eine Verdrängung des murinen Feederzellrasens, ähnlich der von ES-Zellkolonien, konnte auch bei den Phase1-Kolonien beobachtet werden. Diese ersten entstandenen Phase1-Kolonien wurden auf frische Feeder-Zellen umgesetzt, konnten aber nicht weiter kultiviert werden und waren im Laufe von zwei Passagen innerhalb des Feederzellrasens nicht mehr zu erkennen.

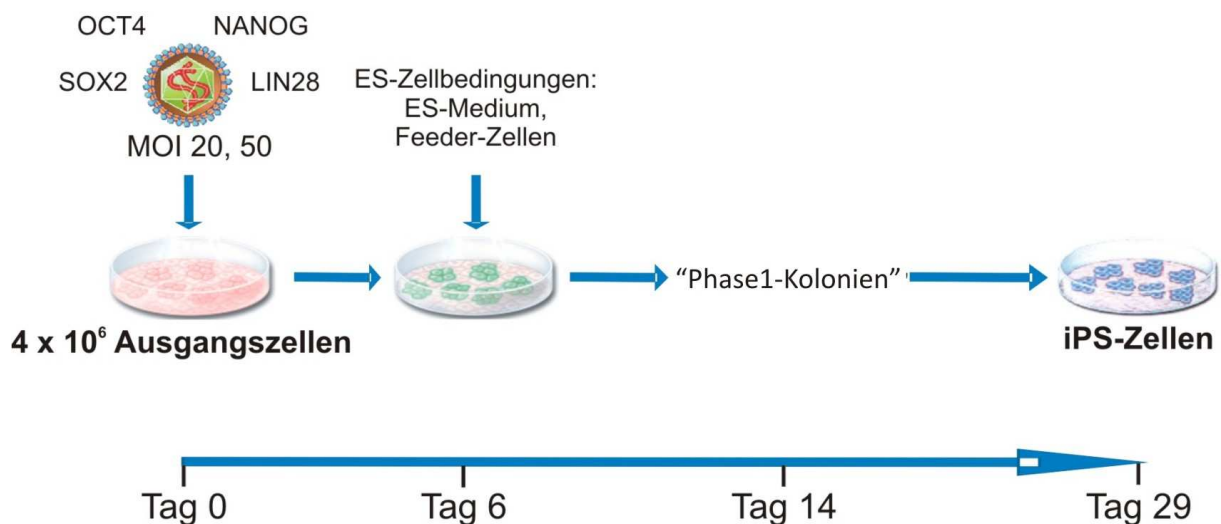
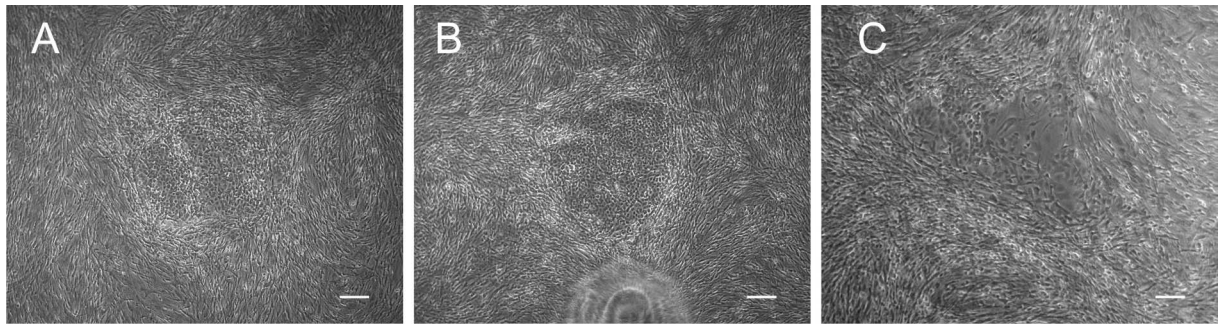


Abb. 12: Zeitliches Schema zur Induktion von pluripotenten Stammzellen aus somatischen Zellen.

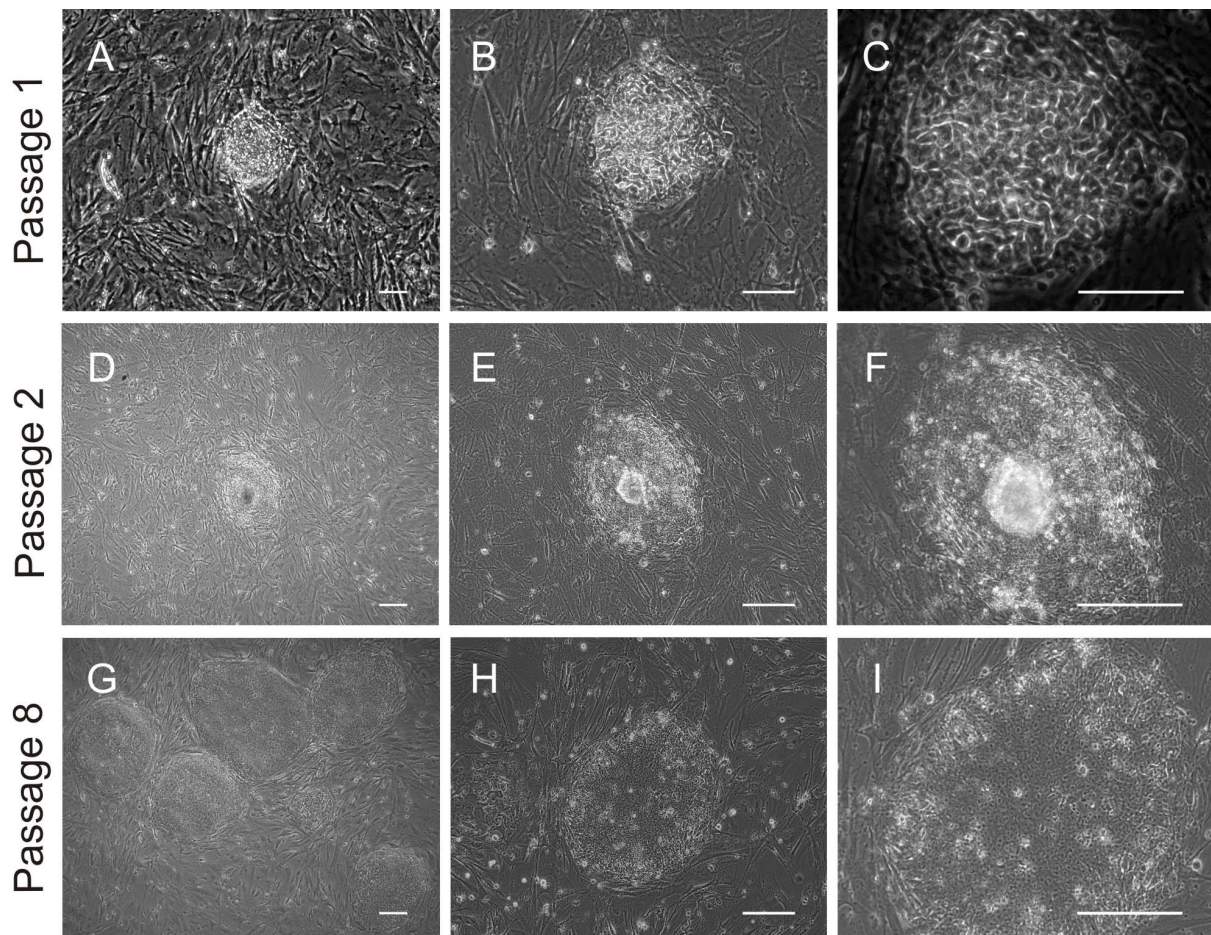




**Abb. 13: Darstellung von verschiedenen Phase1-Kolonien (A-C).** Bei der Reprogrammierung von humanen Lungenfibroblasten entstanden Strukturen aus unvollständig reprogrammierte Zellen. Skalierung: 200  $\mu\text{m}$ .

Nach weiteren 15 Tagen (Tag 29 nach Transduktion) konnten in den gleichen Versuchsansätzen erneut Veränderungen bei den transduzierten Zellen, im Vergleich zu den Ausgangs-Fibroblasten, beobachtet werden. Es bildeten sich Bereiche mit höherer Zelldichte, die sich mikroskopisch deutlich vom Feederzellrasen abhoben. Die einzelnen Zellen wiesen eine rundlich-ovale Form mit hohem Kern-Zytoplasma-Verhältnis und prominenten Nukleoli auf, ähnelten somit morphologisch embryonalen Stammzellen (Abb. 14 A-C). Bei diesen kolonieartigen Zellverbänden konnte ein schnelles Wachstum beobachtet werden, wodurch sich die Zellen nach weiteren 24 h (Tag 30 nach Transduktion) noch deutlicher von den Ursprungzellen und dem Feederzellrasen abhoben und durch Ausschneiden mit Glaskapillaren auf frische Feeder-Zellen umgesetzt werden konnten (mechanisches Passagieren).

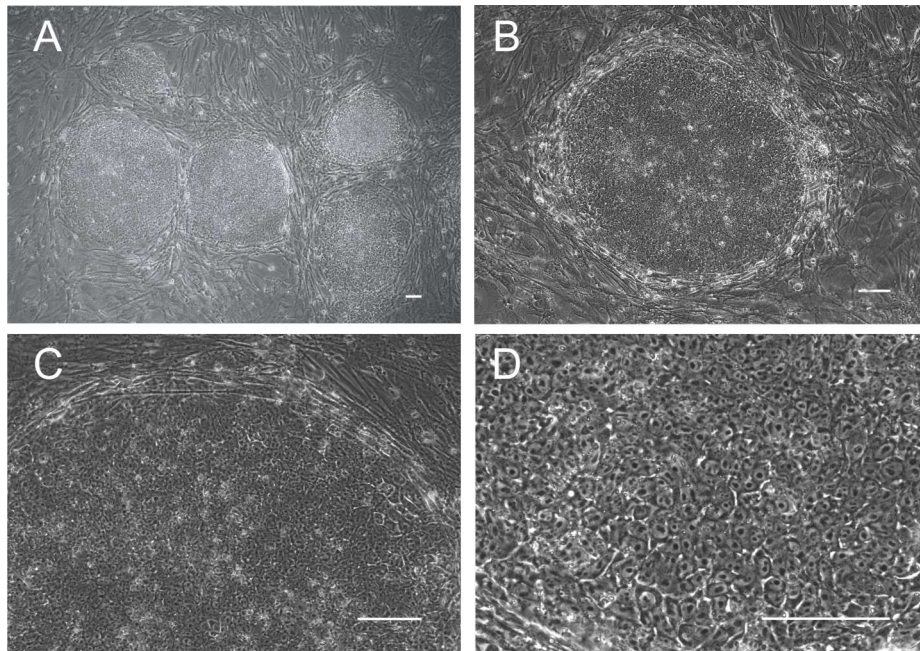
Das Adhären und eine weitere Proliferation von einigen Kolonien, konnte innerhalb weiterer 24 h beobachtet werden. Die ab diesem Zeitpunkt als hLFiPS-Zellen bezeichneten Zellen bildeten erneut Zellaggregate, mit einer Koloniemorphologie, die typisch für embryonale Stammzellen war (Abb. 14 D-F). Allerdings zeigten diese frühen Kolonien noch nicht den für humane ES-Zellen charakteristischen hellen und klaren Rand (Abb. 14 A-F). Die Zellen wuchsen noch in eher lockerer, nicht flächig ausgebreiteten, sondern eher typisch für murine ES- Zellen, auch dreidimensional in die Höhe.



**Abb. 14: Entstehung von hLFiPS.** Darstellung einer ES-zellähnlichen hLFiPS-Kolonie in Passage 1 in 50-facher, 100-facher und 200-facher Vergrößerung (A-C). In frühen Passagen zeigten die Kolonien noch keinen klaren Rand und wuchsen noch nicht flächig ausgebreitet (D-F). Ab Passage 8 konnten teilweise Kolonien mit klarem Rand erkannt werden (G-H). Skalierung 200µm.

Erst im Verlauf der weiteren Kultivierung und Passagierung wurden die Kolonien immer ES-zellähnlicher. Ab Passage acht zeigten sich erstmals teilweise ein klarer Rand (Abb.14 G), ebenso wie weitere für ES-Zellen typische morphologische Merkmale wie eine flache, eng gepackte Koloniemorphologie.

Im Laufe der weiteren Kultivierung wurden die Zellen mit steigender Passagenzahl regelmäßiger und glichen undifferenzierten humanen ES-Zellen (Abb. 15) Die generierten hLFiPS-Zellen ließen sich ähnlich wie embryonale Stammzellen vermehren. Alle 3–5 Tage war eine Passagierung im Verhältnis von mindestens 1:6 möglich.



**Abb. 15: hLfiPS. Mikroskopische Darstellung von typischen undifferenzierten Kolonien in Passage 35.** Gezeigt sind Kolonien in 50-facher (A), 100-facher (B), 200-facher (C) und 400-facher (D) Vergrößerung. Skalierung: 100  $\mu\text{m}$

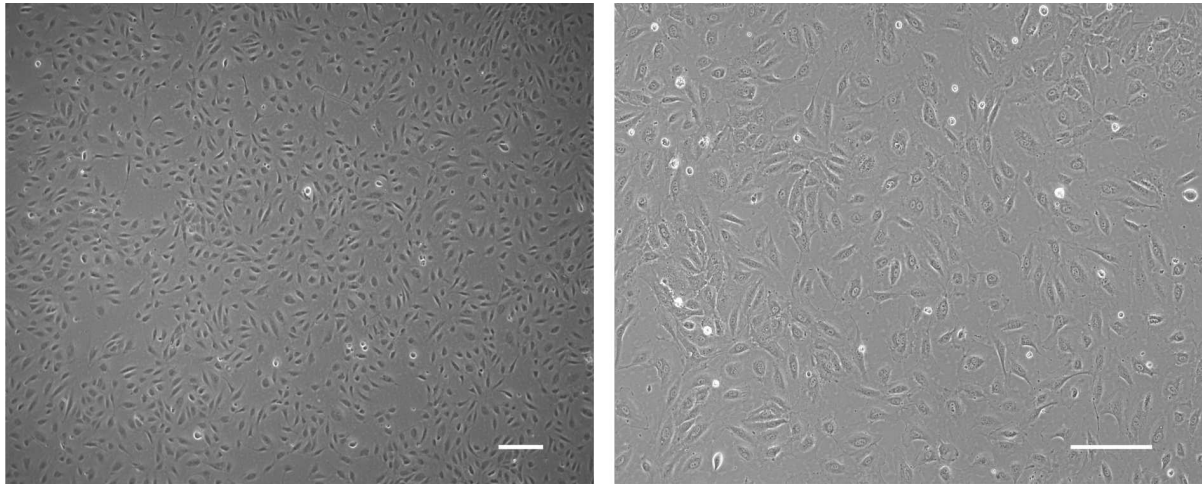
Die Kultivierungsbedingungen der hLfiPS-Zellen konnten im Laufe der Zeit an die in der Arbeitsgruppe etablierten Protokolle für ES-Zellen von Rhesus-Affen [117] angepasst werden, die sich humanen ES-Zellen sehr ähnlich verhalten. Anfangs wurden die iPS-Zellen noch mechanisch durch Ausschneiden mit Glaskapillaren und anschließendem Überführen mit der Pipette passagiert. Später konnten die Zellen ähnlich wie ES-Zellen mit 0,2 % Kollagenase enzymatisch behandelt und durch vorsichtiges Abklopfen oder Abspülen vom Feederzellrasen gelöst, und nach mechanischer Zerkleinerung auf frische Feeder-Zellen ausgesät werden. Bei der Kultivierung von hiPS-Zellen wurde, im Vergleich zur Kultivierung von ES-Zellen, die doppelte Menge bFGF (8 ng/ml) zum Kultivierungsmedium zugegeben.

Zur Berechnung der Effizienz der Induktion von hLfiPS-Zellen, wurde die Reprogrammierungseffizienz durch Auszählen der entstandenen Kolonien bestimmt. Anschließend wurde die Anzahl der Kolonien ins Verhältnis zu der Anzahl der zur Induktion eingesetzten Ausgangszellzahl gesetzt. Bei diesem Vorversuch zur Reprogrammierung von humanen Lungenfibroblasten, konnte eine Reprogrammierungseffizienz von 0,0005 % berechnet werden.

### **3.1.3. Isolierung und Charakterisierung von humanen Nabelschnurblut-Endothelzellen (hCBEC)**

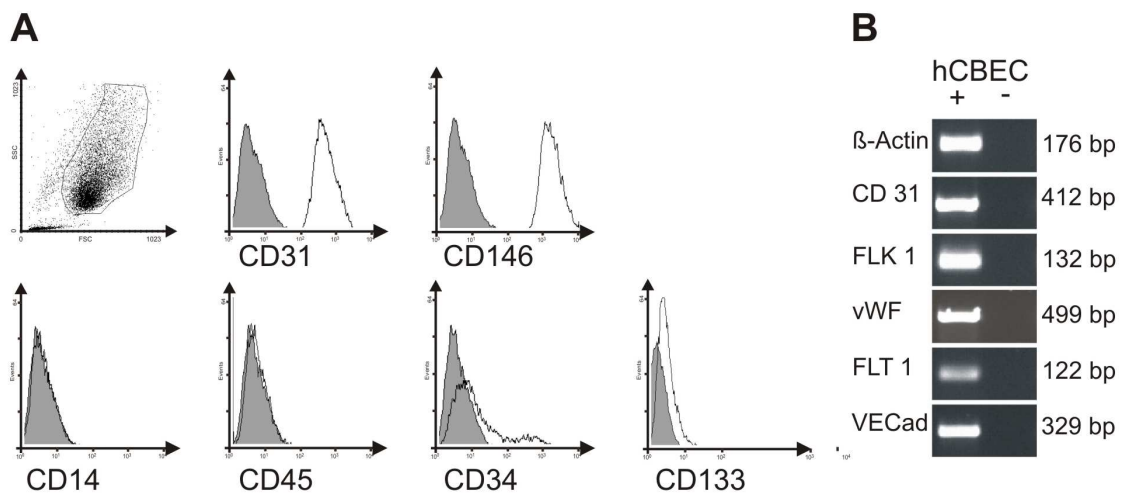
Eine geeignete, klinisch relevante Zellquelle zur Herstellung von therapeutisch einsetzbaren humanen iPS-Zellen, sollte die im Folgenden beschriebenen Eigenschaften erfüllen: Die Zellen sollten einfach und kostensparend zu isolieren sein. Weiterhin sollte der Zelltyp aus die Reprogrammierung betreffenden technischen Gründen möglichst adhärent wachsen und proliferativ sein. Die Gewinnung der somatischen, zu reprogrammierenden Zellen ohne invasive Methoden bei der Entnahme, wäre für eine klinische Anwendung wünschenswert. Zusätzlich sollte die verwendete Zellart anhand von zelltypischen Markern (z.B. Oberflächenmolekülen) eindeutig und einfach zu charakterisieren sein. Da diese Eigenschaften von den zur ersten Austestung der Versuchparameter genutzten Fibroblasten nicht erfüllt wurde, sollte als nächstes die Induktion von pluripotenten Stammzellen aus humanen Nabelschnurblutzellen gezeigt werden. Bei der Identifizierung des zu reprogrammierenden Zelltyps, standen mehrere im Nabelschnurblut vorkommende Zelltypen zur Auswahl. Der lymphozytäre Anteil des Blutes ist schwer zu isolieren und wurde deshalb nicht in Betracht gezogen. Monozyten und Makrophagen wurden innerhalb der Arbeitsgruppe für die Reprogrammierung getestet, zeigten sich jedoch, vermutlich aufgrund der fehlenden Proliferativität nach der Isolierung, als nicht geeignet. Die Isolierung von CD 34 positiven Zellen des Blutes gilt als eher aufwändig und die Isolate sind nicht primär adhärent. Als einziger, alle oben genannten Kriterien erfüllender Zelltyp des Nabelschnurblutes, wurden Endothelzellen des Nabelschnurblutes (hCBEC) ausgewählt.

Die erfolgreiche Isolierung von humanen Nabelschnurblut-Endothelzellen erfolgte durch Dr. Christian Hess, AG Bioartifizielle Lunge, HTTG, MH-Hannover, wie im Methodenteil unter (2.2.2.3.) beschrieben. Nach der Isolierung wiesen die Zellen die für Endothelzellen typische Kopfsteinpflaster-Morphologie auf (Abb. 16).



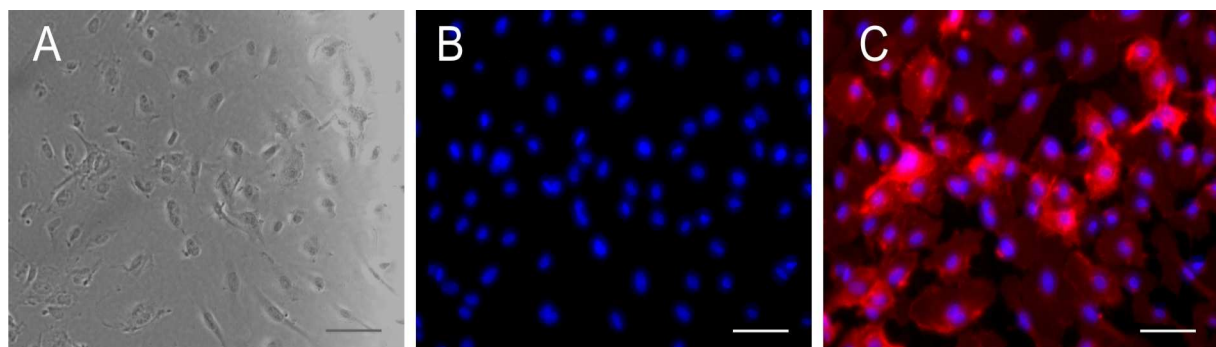
**Abb. 16: Mikroskopische Darstellung von Nabelschnurblut-Endothelzellen (hCBEC).** Die Isolierten hCBEC zeigten in Passage 10 die typische Kopfsteinpflaster-Morphologie. Skalierung: 200  $\mu\text{m}$ .

Die Zellen wurden durch Dr. Christian Hess und Dr. Ruth Olmer über FACS Analysen in Bezug auf Expression von Endothelzell- bzw. Monozytenmarker charakterisiert (Abb. 17 A). Die resultierenden Ergebnisse belegen einen endothelialen Phänotyp: Die isolierten Zellen wiesen hohe Expressionslevel der Endothelzellmarker CD31 und CD146, jedoch keine Expression für den Monozytenmarker CD14 oder den Lymphozytenmarker CD45 auf. Einige Zellen zeigten ein positives Signal für die Marker CD133 und CD34, was auf einen Progenitorcharakter der isolierten Endothelzellen hinweisen könnte. Eine weitere Charakterisierung durch semiquantitative PCR-Analyse unterstützte diese Ergebnisse. Die Expression von CD31 sowie weiteren typischen Endothelzell-spezifischen Markern wie Fetal Liver Kinase 1 (FLK1), von Willebrand Faktor (vWF), Fms-related Tyrosin Kinase 1 (FLT1) und Vascular Endothelial Cadherin (VECad), belegt klar einen endothelialen Phänotyp (Abb. 17 B).



**Abb. 17: Charakterisierung der hCBEC durch FACS-Analyse und semiquantitative PCR.** Die isolierten Zellen zeigen hohe Expressionslevels der Endothelzellmarker CD 31 und CD146, jedoch keine Expression des Monozytenmarkers CD14 oder des Lymphozytenmarkers CD45. Der Progenitorcharakter der Zellen wurde durch den Nachweis von CD34 und CD133 herausgestellt. Die grau hinterlegten Histogramme bezeichnen die korrespondierenden Isotypen-Kontrollen (A). Die Expression der Endothelzell-spezifischen Marker CD31, Fetal Liver Kinase 1 (FLK1), von Willebrand Faktor (vWF), Fms-related Tyrosin Kinase 1(FLT1) und Vascular Endothelial Cadherin (VECad), konnte durch semiquantitative PCR gezeigt werden (B).

Die Expression des Endothelzellmarkers CD31 lässt sich ebenfalls durch eine immunhistologische Färbung der hCBEC darstellen (Abb. 18). Die Färbung zeigte das für CD31 typische Färbemuster.

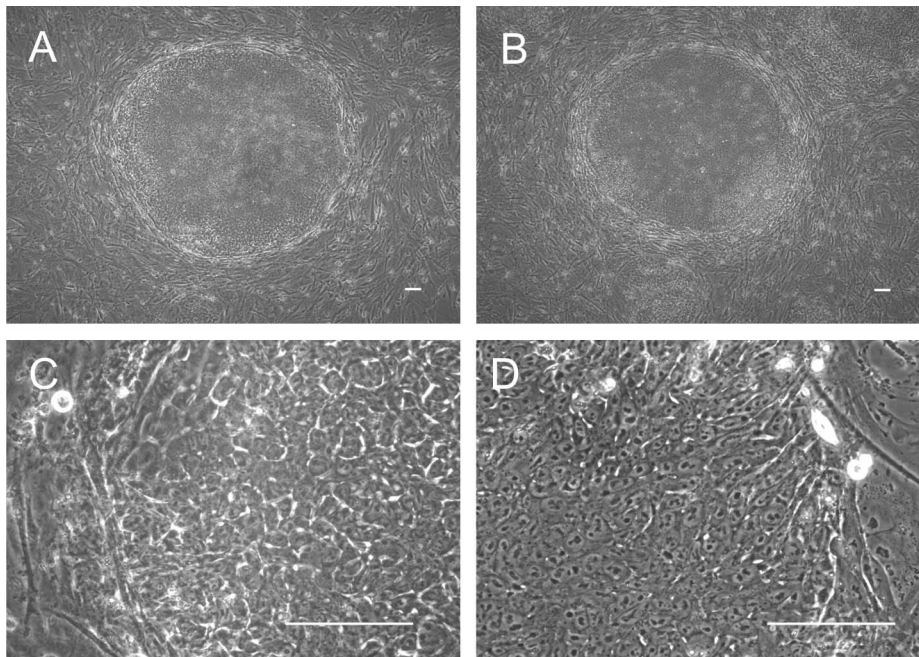


**Abb. 18: CD31-Expression von hCBEC.** Die Immunhistologische Färbung von hCBEC in Passage 9 zeigt ein positives Signal für den Endothelzell-spezifischen Marker CD31. Dargestellt sind Durchlichtaufnahmen (A), Färbung der Zellkerne mit DAPI (B) und eine Überlagerung von CD31-Färbung (rot) mit Zellkerndarstellung (DAPI, blau) in 400-facher Vergrößerung. Skalierung: 100 µm.

### **3.1.4. Induktion von pluripotenten Stammzellen aus humanen Nabelschnurblut-Endothelzellen (hCBiPS)**

Die zuvor durch die Vorversuche bei Reprogrammierung von humanen Lungenfibroblasten zu hLfiPS gewonnen experimentell bestimmten Versuchsparmeter, konnten auf die Induktion von pluripotenten Stammzellen aus humanen Nabelschnurblut-Endothelzellen übertragen werden, sodass für diese Ausgangszellsorte schnell ein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden konnte. Die Herstellung von induzierten pluripotenten Stammzellen aus humanen Nabelschnurblut-Endothelzellen erfolgte ähnlich wie die Herstellung von hLfiPS. 28 Tage nach der Transduktion von  $4 \times 10^5$  hCBEC mit Oct4-, Nanog-, Sox2- und LIN28-übertragenden Viren (Abb. 11), konnte das Auftreten von ersten Veränderungen innerhalb der Endothelzellen beobachtet werden. Diese entstandenen Zellverbände ähnelten, anders als bei den ersten Reprogrammierungsversuchen, gleich zu Beginn der Kultivierung morphologisch schon sehr denen humaner ES-Zellen (Abb. 19). Durch Ausschneiden und Umsetzen auf frische Feeder-Zellen konnten die Kolonien mechanisch überführt werden. Einige kolonieartige Zellverbände konnten jedoch nicht erfolgreich umgesetzt und weitervermehrt werden, andere differenzierten während der Vermehrungsphase schnell aus und konnten somit ebenfalls nicht erhalten werden.

Die Proliferationsgeschwindigkeit der kultivierbaren Zellen war vergleichbar mit der von humanen ES-Zellen und ES-Zellen des Rhesusaffen. Die Zellen konnten aufgrund der bei den hLfiPS gewonnen Erfahrungen durch weiteres Passagieren schnell expandiert werden. Somit wurde aus zwei humanen iPS-Zellklonen je eine Zelllinie generiert. Die iPS-Zelllinien wurden im Folgenden mit hCBiPS1 und hCBiPS2 bezeichnet und standen für die weitere detaillierte Charakterisierung zur Verfügung. In weiteren Versuchen wurden innerhalb der Arbeitsgruppe noch weitere Zelllinien generiert, die teilweise in die folgende Charakterisierung (siehe 3.2.) miteinbezogen wurden.



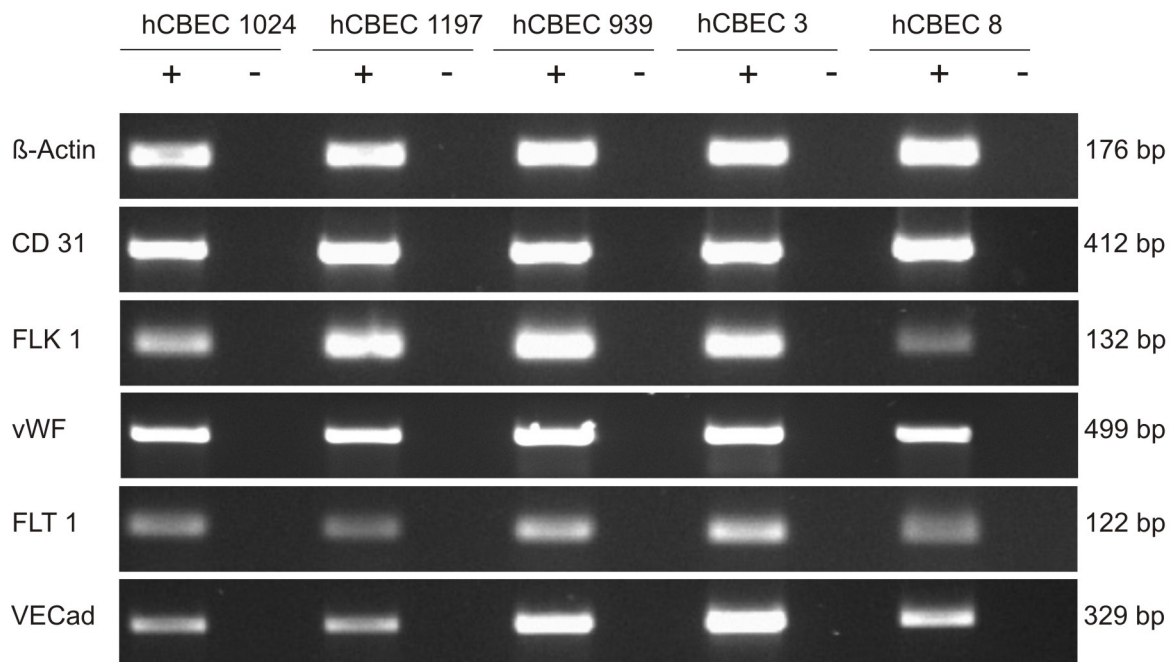
**Abb. 19: hCBiPS-Zellen zeigen die typische Morphologie von ES-Zellen.** Mikroskopische Darstellung von typischen undifferenzierten Kolonien in Passage 17. hCBiPS1 in 50-facher und 400-facher Vergrößerung (A&C). hCBiPS2 in 50-facher und 400-facher Vergrößerung (B&D). Skalierung: 100  $\mu\text{m}$ .

Für die erste Induktion von hCBiPS konnte eine Reprogrammierungseffizienz von 0,001 % ermittelt werden.

### 3.1.4.1. Untersuchungen zur Reprogrammierungseffizienz unterschiedlicher Endothelzellisolate aus Nabelschnurblut

Um die Reprogrammierungseffizienz verschiedener Endothelzellisolate zu vergleichen, wurden innerhalb der Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit Dr. Stephanie Wunderlich Isolate von unterschiedlichen Patienten untersucht. Die Charakterisierung der einzelnen Isolate, die mit hCBEC3, hCBEC8, hCBEC939, hCBEC1024 und hCBEC1197 bezeichnet wurden, anhand von semiquantitativer RT-PCR (durchgeführt von der AG Bioartifizielle Lunge) ergab keine bemerkenswerten Unterschiede in der Expression der Endothelzell-spezifischen Gene CD31, Fetal Liver Kinase 1 (FLK1), von Willebrand Faktor, Fms-related Tyrosin Kinase 1 (FLT1) und Vascular Endothelial Cadherin (VECad) (Abb. 20).

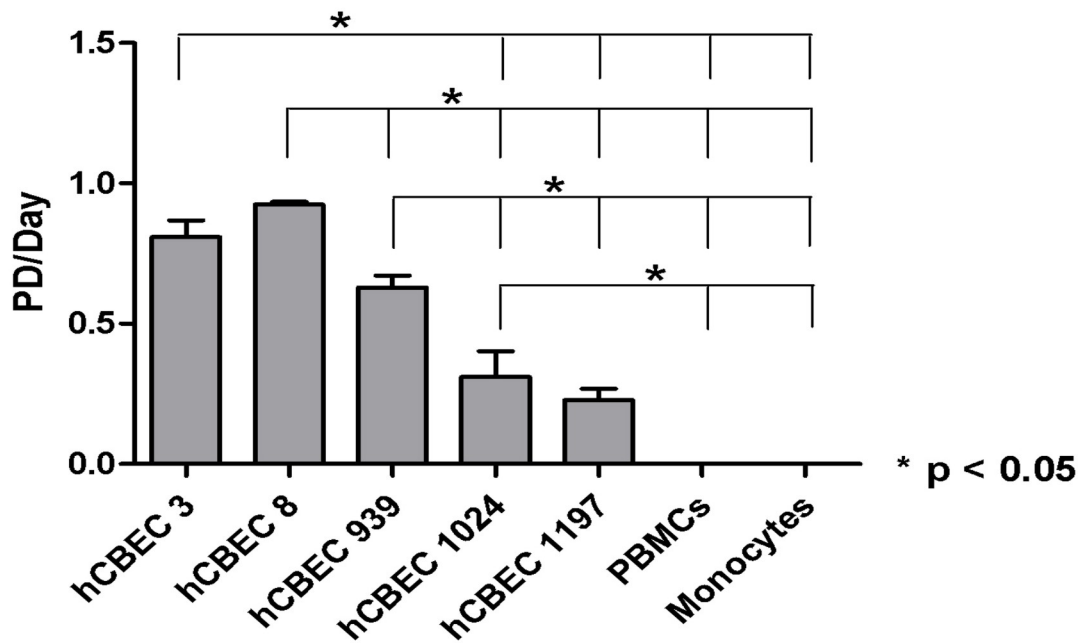




**Abb. 20: Expressionsanalyse von unterschiedlichen hCBEC-Isolaten durch semiquantitative RT-PCR.** Die Analyse zeigt vergleichbare Expression der Endothelzell-spezifischen Gene CD31 (PECAM), Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (FLT1), Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (FLK1), von Willebrand Factor (vWF), and Vascular Endothelial Cadherin (VECad) bei unterschiedlichen Isolaten.

Zusätzlich wurden nicht-fraktionierte adulte periphere mononukleäre Zellen (PBMC's) und Monozyten in die Untersuchungen mit einbezogen.

Die Proliferationskapazität der verschiedenen Isolate und Zelltypen wurden durch Messung der Populationsverdopplung pro Tag (PD/Day) bestimmt. Zwischen den verschiedenen hCBEC-Isolaten konnte eine unterschiedliche Proliferationsaktivität bestimmt werden. Die eher langsam wachsenden Isolate hCBEC1024 und hCBEC1197 und hCBEC939 wiesen eine durchschnittliche Verdopplung von  $0,31 \pm 0,09$  bis  $0,628 \pm 0,042$  pro Tag auf, während für die schneller wachsenden Isolate hCBEC3 und hCBEC8 eine durchschnittliche Verdopplung von  $0,80 \pm 0,06$  bis  $0,925 \pm 0,009$  pro Tag bestimmt werden konnte. PBMC's und Monozyten hatten ihre Zellteilung vollständig eingestellt (Abb. 21).



**Abb. 21: Proliferationsraten von verschiedenen hCBEC-Isolaten.** Gezeigt sind die Proliferationsraten von verschiedenen Isolaten als Populationsverdopplung pro Tag (PD/Day). Die Proliferationsraten der unterschiedlichen Isolate variierten, während für PBMC's und Monozyten keine Proliferation nachgewiesen werden konnte..

In einem weiteren Experiment wurden die Reprogrammierungseffizienzen der unterschiedlichen Isolate und Zelltypen durch Auszählen von entstandenen Kolonien pro  $10^6$  Ausgangszellen evaluiert. Die Ergebnisse wiesen auf eine Korrelation der Reprogrammierungseffizienz mit der Proliferationsaktivität der Zellen hin. Die Reprogrammierungsexperimente mit adulten, nicht-proliferativen PBMC's oder Monozyten, führten nicht zur Bildung von ES-zellähnlichen Kolonien. Bei hCBEC war die Reprogrammierungseffizienz der langsam-proliferierenden Isolate hCBEC939, hCBEC1024 und hCBEC1197 zwischen 0,0001%–0,0003% mit im Durchschnitt  $1,66 \pm 3,30$  Kolonien/ $10^6$  Zellen eher gering. hCBEC3- und hCBEC8-Isolate, für die eine beschleunigte Proliferationsrate nachgewiesen werden konnte, zeigten eine beträchtlich höhere Reprogrammierungseffizienz zwischen 0,01%–0,03% mit im Durchschnitt  $167,92 \pm 104$  Kolonien (Abb. 22, Tabelle 4).

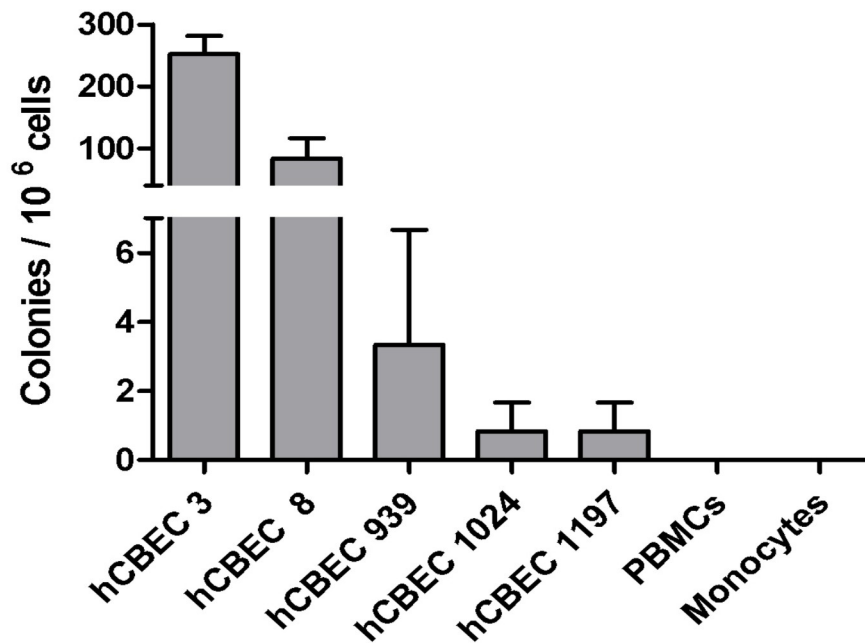


Abb. 22: Reprogrammierungseffizienzen von unterschiedlichen hCBEC-Isolaten, PBMC's und Monozyten.

Tabelle 4: Anzahl der entstandenen Kolonien / 10<sup>6</sup> Zellen aus verschiedenen Reprogrammierungsexperimenten

Isolat	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Ø
hCBEC 3	195 (0.01950 %)	285 (0.02850 %)	277.5 (0.02775 %)	252.5 (0.02525 %)
hCBEC 8	50 (0.00500 %)	50 (0.00500 %)	150 (0.01500 %)	83.3 (0.00833 %)
hCBEC 939	10 (0.00100 %)	0	0	3.33 (0.00033 %)
hCBEC 1024	2.5 (0.00025 %)	0	0	0.83 (0.00008 %)
hCBEC 1197	2.5 (0.00025 %)	0	0	0.83 (0.00008 %)
PBMCs	0	0	0	0
Monocytes	0	0	0	0

Um die molekulare Grundlage für die variierenden Proliferationskapazitäten und Reprogrammierungseffizienzen zwischen den verschiedenen hCBEC-Isolaten zu untersuchen, wurden quantitative Realtime-PCR-Analysen spezifisch für die endogenen Pluripotenz-assoziierten Gene Oct4, Sox2, Nanog, LIN28 und Myc durchgeführt. Wie erwartet, wurde nur minimale, bzw. keine Expression von SOX2 und LIN28 ohne signifikante Unterschiede zwischen den Isolaten gemessen. Dies galt auch für die NANOG-Expression mit Ausnahme

vom Isolat hCBEC3 das eine ca. 500-fach niedrige Expression als in humanen ES-Zellen aufwies. Für Oct4 konnten ca. 200–500-fach niedrigere Expressionslevels als in humanen ES-Zellen detektiert werden. Im Gegensatz zu den vorher bestimmten Genen wurden für endogenes Myc 2,9–5,7-fach höhere Level als in hES-Zellen beobachtet.

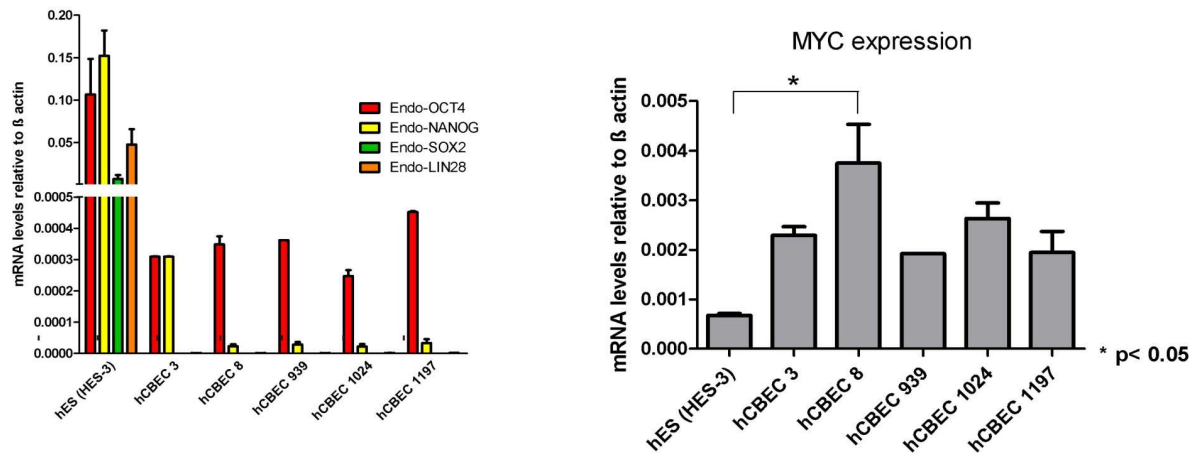


Abb. 23: Realttimeanalysen von unterschiedlichen hCBEC-Isolaten

### **3.2. Charakterisierung von hiPS**

Die Charakterisierung der generierten humanen iPS-Zellen wurde im direkten Vergleich mit embryonalen Stammzellen als Goldstandard durchgeführt. Dabei wurden die Zellen hinsichtlich der folgenden Charakteristika untersucht:

#### **1. Phänotyp:**

- **Morphologie:** iPS-Zellen sollten morphologisch mit ES-Zellen vergleichbar sein. Die Einzelzellen weisen eine runde Form auf, haben einen prominenten Nukleolus und wenig Zytoplasma. Aus den Einzelzellen sollten klar abgegrenzte, eng gepackte Kolonien mit hellem Rand gebildet werden, die ES-Zellkolonien entsprechen.
- **Wachstumseigenschaften:** Die Teilungsrate und die mitotische Aktivität sollte mit der von ES-Zellen vergleichbar sein, da iPS- und ES-Zellen durch eine aktive Selbsterneuerung gekennzeichnet sind.
- **Stammzellmarker:** Die Expression von typischen ES-Zelloberflächenmarkern sollte auch bei iPS-Zellen nachzuweisen sein. Bei humanen iPS-Zellen sollten Marker von humanen ES-Zellen, inklusive SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, exprimiert werden.
- **Pluripotenzmarker:** In iPS-Zellen sollte die Expression von OCT4, SOX2, NANOG und LIN28 nachzuweisen sein.

#### **2. Epigenetischer Zustand:**

- **Promoter Demethylierung:** In terminal differenzierten Zellen behindert die ausgedehnte Methylierung bestimmter Gene deren Expression durch Verhinderung der Aktivität von Expressionsproteinen- und Enzymen. Durch die Methylierung wird die Transkription der Gene unterbunden und sie sind effektiv „*gesilenced*“. In iPS-Zellen sollten, wie in ES-Zellen, die Promotor-Regionen von Pluripotenz-assoziierten Genen wie OCT4 und NANOG demethyliert sein, um deren Aktivität und damit die Expression der Pluripotenz-assoziierten Gene zu gewährleisten.

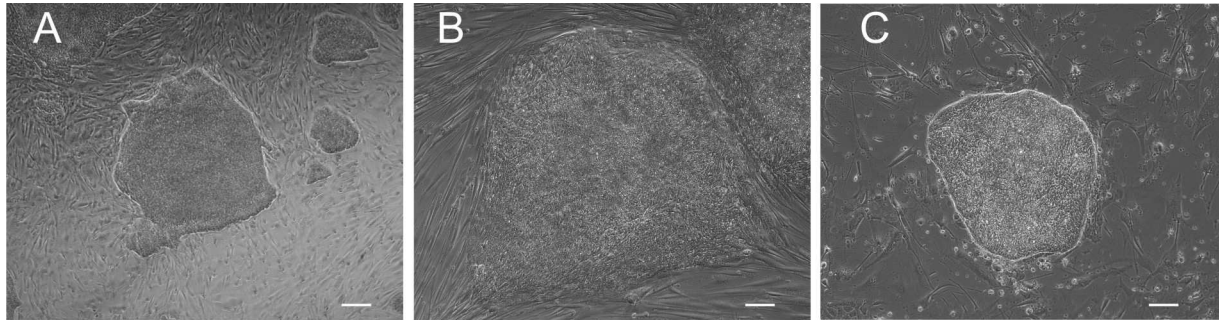
**3. Pluripotenz:** iPS-Zellen sollten, wie ES-Zellen in Zellen aller drei Keimblätter, differenzierbar sein. Der Nachweis hierfür kann erbracht werden durch:

- Teratombildung: Werden ES-Zellen in immunodefiziente Mäuse injiziert, sollten sich nach 8–10 Wochen Teratome bilden. Teratome sind Tumoren multipler Abstammung, die Zellen und Gewebe der drei Keimblätter Endoderm, Mesoderm und Ektoderm enthalten. Die Fähigkeit zur Teratombildung gilt auch für iPS-Zellen als unverzichtbarer Nachweis der Pluripotenz.
- Embryoid bodies: hES-Zellen bilden bei Differenzierung spontan rundliche embryoartige Strukturen, sogenannte „embryoid bodies“ (EB's), die einen Kern aus mitotisch aktiven und differenzierenden ES-Zellen und eine Peripherie aus terminal differenzierten Zellen aller drei Keimblätter enthalten. iPS-Zellen sollten bei Differenzierung ebenfalls EB's bilden.
- Kardiale Differenzierung: iPS-Zellen sollten in spontan kontrahierende Kardiomyozyten differenzierbar sein.

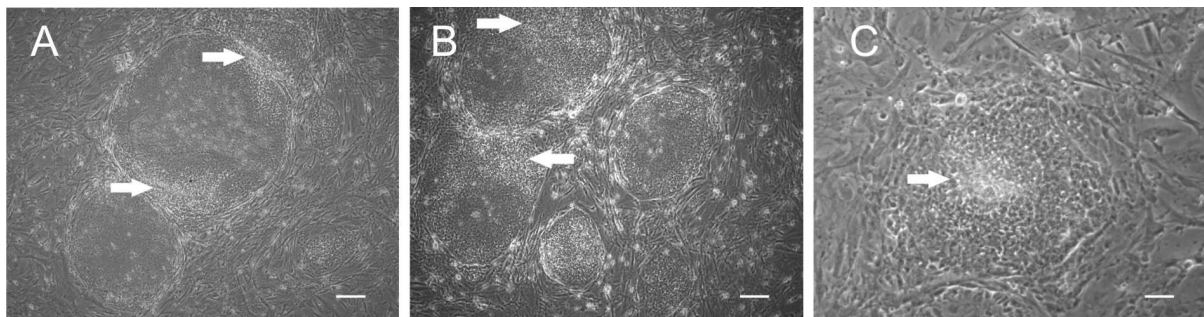
Zwei aus Nabelschurblut-Endothelzellen generierten iPS-Zelllinien hCBiPS1 und hCBiPS2 wurden im Hinblick auf die oben genannten Merkmale detailliert charakterisiert. Weitere Zelllinien aus Nabelschnurblut-Endothelzellen und eine aus Lungenfibroblasten generierte Zelllinie hLFiPS wurden nur in einige Untersuchungen miteinbezogen.

### 3.2.1. Morphologische Charakterisierung

Die im Rahmen der Arbeit hergestellten humanen iPS-Zellen wurden im direkten Vergleich mit embryonalen Stammzellen verschiedener Spezies morphologisch beurteilt. Die Zell- und Koloniemorphologie der aus somatischen Zellen hergestellten humanen iPS-Zellen, war vergleichbar mit der von human embryonalen Stammzellen und embryonalen Stammzellen des Rhesusaffen (RECS) (Abb. 23). Die Zellen wiesen ein hohes Kern-Zytoplasma-Verhältnis, markante Nukleoli und die für ES-Zellen typische annähernd runde Koloniemorphologie mit eng gepackten, sich schnell teilenden, unorientiert liegenden, rundlich bis ovalen Einzelzellen auf. Bei den Kolonien der humanen iPS-Zellen war der für ES-Zellen typische klare, helle Rand zu erkennen [4]. Bei beginnender Differenzierung der Zellen wiesen diese Veränderungen innerhalb der Kolonien auf. Vergleichbar mit ES-Zellen bildeten sich unregelmäßige Strukturen (Abb. 24).



**Abb. 24: Morphologie von pluripotenten Stammzellen.** Embryonale Stammzellen des Rhesusaffen in Passage 58 (RESC, A), humane embryonale Stammzellen in Passage 91 (HES-3, B) und induzierte pluripotente Stammzellen aus Nabelschnurblut in Passage 66 (hCBiPS2, C) weisen eine vergleichbare Morphologie auf. Skalierung: 100 $\mu$ m.

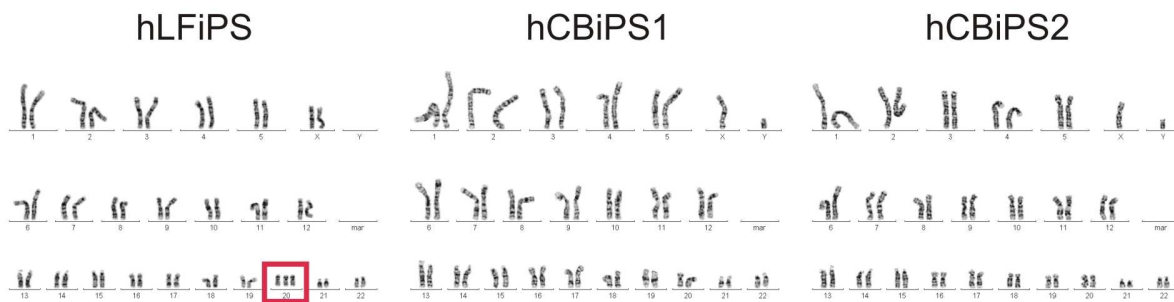


**Abb. 25: Darstellung von Differenzierungen in hiPS-Kolonien.** Bei beginnender Differenzierung bildeten sich Veränderungen in der Peripherie der Kolonien von hCBiPS1 und hCBiPS2 (A+B, Pfeile). Eine Kolonie von hLFiPS zeigte in der Mitte differenzierte Bereiche (C, Pfeile). Skalierung: 200 $\mu$ m.

### 3.2.2. Analyse der genetischen Stabilität

Um zu untersuchen, ob durch den Prozess der Reprogrammierung grundlegende Veränderungen im Genom der Zellen hervorgerufen wurden, wurde die genetische Stabilität der generierten iPS-Zellen untersucht. Die Analyse der genetischen Stabilität erfolgte anhand von G-Banden Karyogrammen und wurde in Kooperation mit dem Institut für Humangenetik, Medizinische Hochschule Hannover, von Herrn Prof. Dr. Miller durchgeführt. G-Banden-Karyogramme sind eine sortierte Anordnung aller mitotischen Chromosomen und geben Auskunft über den Karyotyp der Zellen. Für die Analyse dienten als Ausgangsmaterial die induzierten pluripotenten iPS-Zellen aus Lungenfibroblasten hLFiPS und die beiden bei der Reprogrammierung von Nabelschnurblut-Endothelzellen generierten Zelllinien hCBiPS1 und hCBiPS2. Untersucht wurden die 22 humanen Autosomenpaare sowie die

Geschlechtschromosomen. Dargestellt wurden repräsentative Metaphasen. Pro Zellsorte wurden mindestens zehn Metaphasen analysiert. Die Bestimmung des Karyotypes durch G-Banden-Karyogramme der Nabelschnurblut-abstammenden iPS-Linien hCBiPS1 und hCBiPS2 in Passage 32, zeigte keine chromosomale Abweichungen vom humanen Karyotyp 46 XY. Bei den Lungenfibroblasten-abstammenden hLFiPS wurde in Passage 30 eine Trisomie 20 diagnostiziert (Abb. 25).



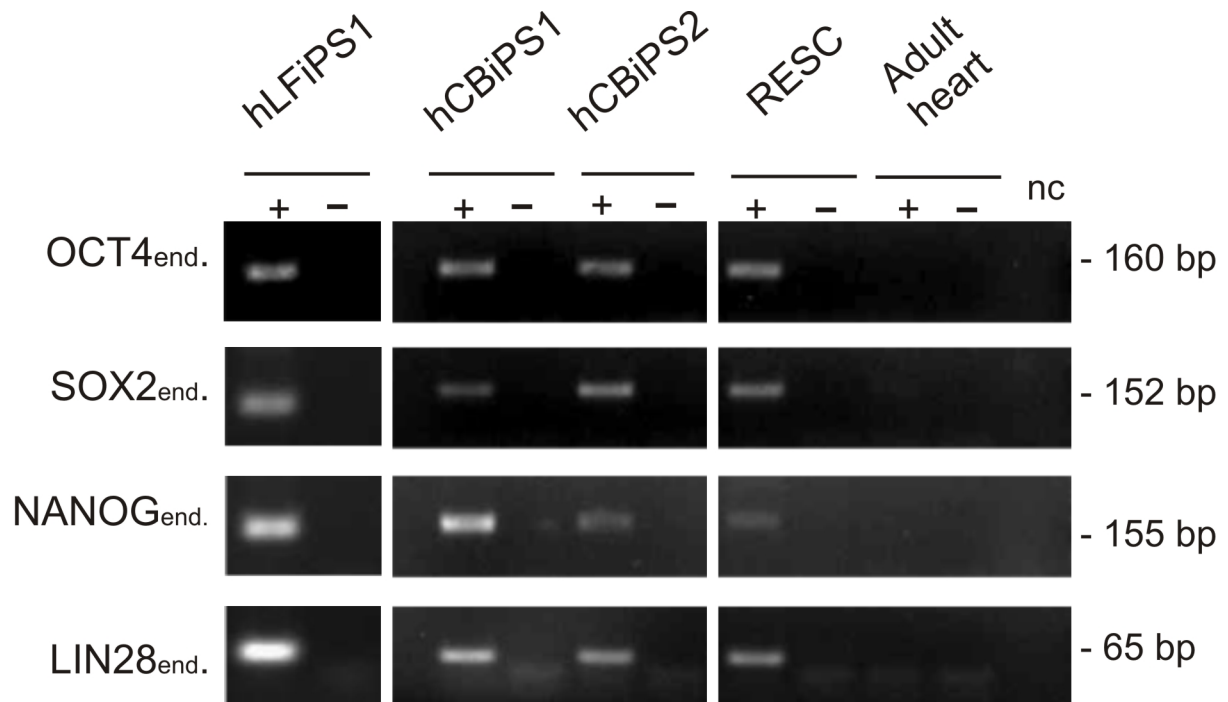
**Abb. 26: Karyogramme von hLFiPS-Zellen und hCBiPS-Zellen.** Dargestellt sind die 22 Autosomenpaare und die Geschlechtschromosomen XY bzw. XX als G-Banden Karyogramm zur Bestimmung des Karyotypes der generierten Zellen. hCBiPS1 und hCBiPS2 wiesen den Karyotyp 46 XY normal auf, während hLFiPS eine Trisomie 20 trugen.

### 3.2.3. Nachweis der Expression Pluripotenz-assoziiierter Markergene über semiquantitative RT-PCR

Um einen ersten Eindruck zu bekommen ob es sich bei den entstanden Zellen tatsächlich um reprogrammierte pluripotente Zellen handelte, wurde die Expression der Pluripotenz-assoziierten Gene OCT4, SOX2 und NANOG und LIN28 durch semiquantitative RT-PCR analysiert. In iPS-Zellen sollten im Gegensatz zu den Ausgangszellen die Expression von endogenem OCT4, SOX2 und NANOG und LIN28 nachweisbar sein, hervorgerufen durch die Veränderung des epigenetischen Status der Zellen während des Reprogrammierungsprozesses. Die Primer für die semiquantitative RT-PCR wurden so entworfen, dass sie spezifisch nur die betreffenden endogenen Transkripte detektieren. Die korrespondierenden Transgene, die nach der lentiviralen Transduktion in den Zellen vorhanden sein sollten, und bei Nachweis durch PCR keinen Hinweis auf den Pluripotenzstatus der Zellen liefern konnten, wurden bei dieser Untersuchung nicht erfasst. Bei allen untersuchten Zellklonen konnte eine Expression von endogenem OCT4, SOX2 und NANOG und LIN28 gezeigt werden (Abb. 26). Durch die Transduktion wurden demnach die



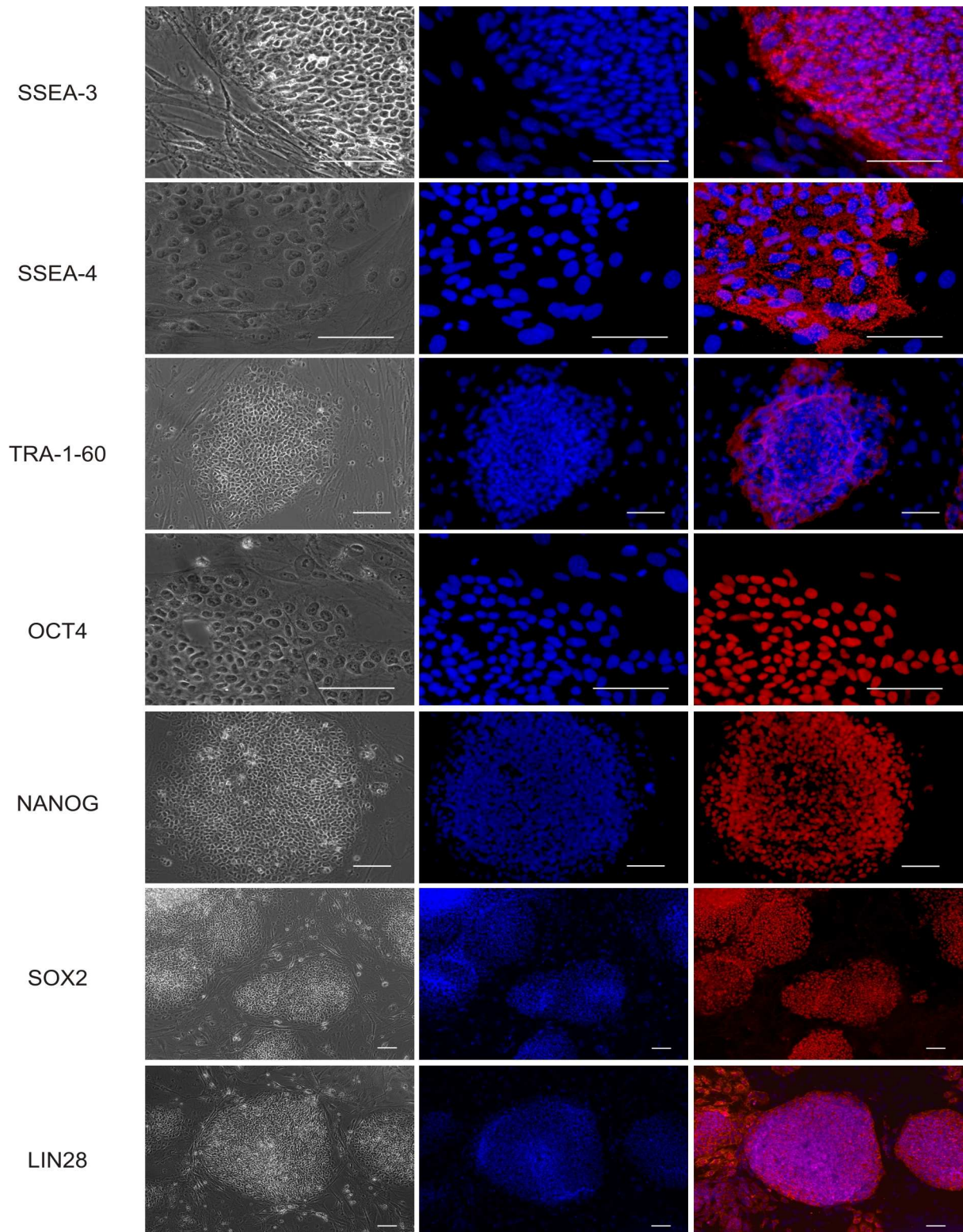
Ursprungszellen so verändert, dass es zu einer Expression der Pluripotenz-assoziierten Gene kommen konnte: Diese Untersuchung gab somit einen ersten Hinweis auf die Reprogrammierung der Ausgangszellen zu pluripotenten Zellen.



**Abb. 27: hLFiPS und hCBiPS exprimieren die Pluripotenz-assoziierten Gene OCT4, SOX2, NANOG und LIN28.** Die Expressionsanalyse erfolgte anhand von semiquantitativer PCR. Durch entsprechendes Primerdesign wurden nur die endogenen Transkripte detektiert. Als Positivkontrolle wurden embryonale Stammzellen des Rhesusaffen (RESC) mitgeführt. Humanes adultes Herz diente als Negativkontrolle. Um falschpositive Ergebnisse aufgrund von kontaminierender, genomischer DNA auszuschließen, wurden Kontrollen ohne RT (-) gemacht. Auf der rechten Seite sind die Größen der amplifizierten PCR-Produkte aufgeführt.

### 3.2.4. Nachweis von stammzellenspezifischen Markern durch Immunfluoreszenzfärbungen

Weitere Hinweise auf die erfolgreiche Reprogrammierung und die Ähnlichkeit der im Rahmen der Doktorarbeit generierten iPS-Zellen zu pluripotenten embryonalen Stammzellen, sollte die Immunfluoreszenzfärbung von stammzellenspezifischen Markern geben. Hierbei wurden die typischerweise auf undifferenzierten humanen embryonalen Stammzellen vorkommenden Oberflächenantigene SSEA-3 (Stage Specific Embryonic Antigen 3), SSEA-4 (Stage Specific Embryonic Antigen 4) und das Keratansulfat-Proteoglykan Tumor Rejection Antigen 1-60 (TRA-1-60), sowie die Pluripotenzmarker OCT4 (Octamer binding transcription factor 4, POU5F1), SOX2 (SRY (sex determining region Y)-box 2), NANOG und LIN28 getestet.



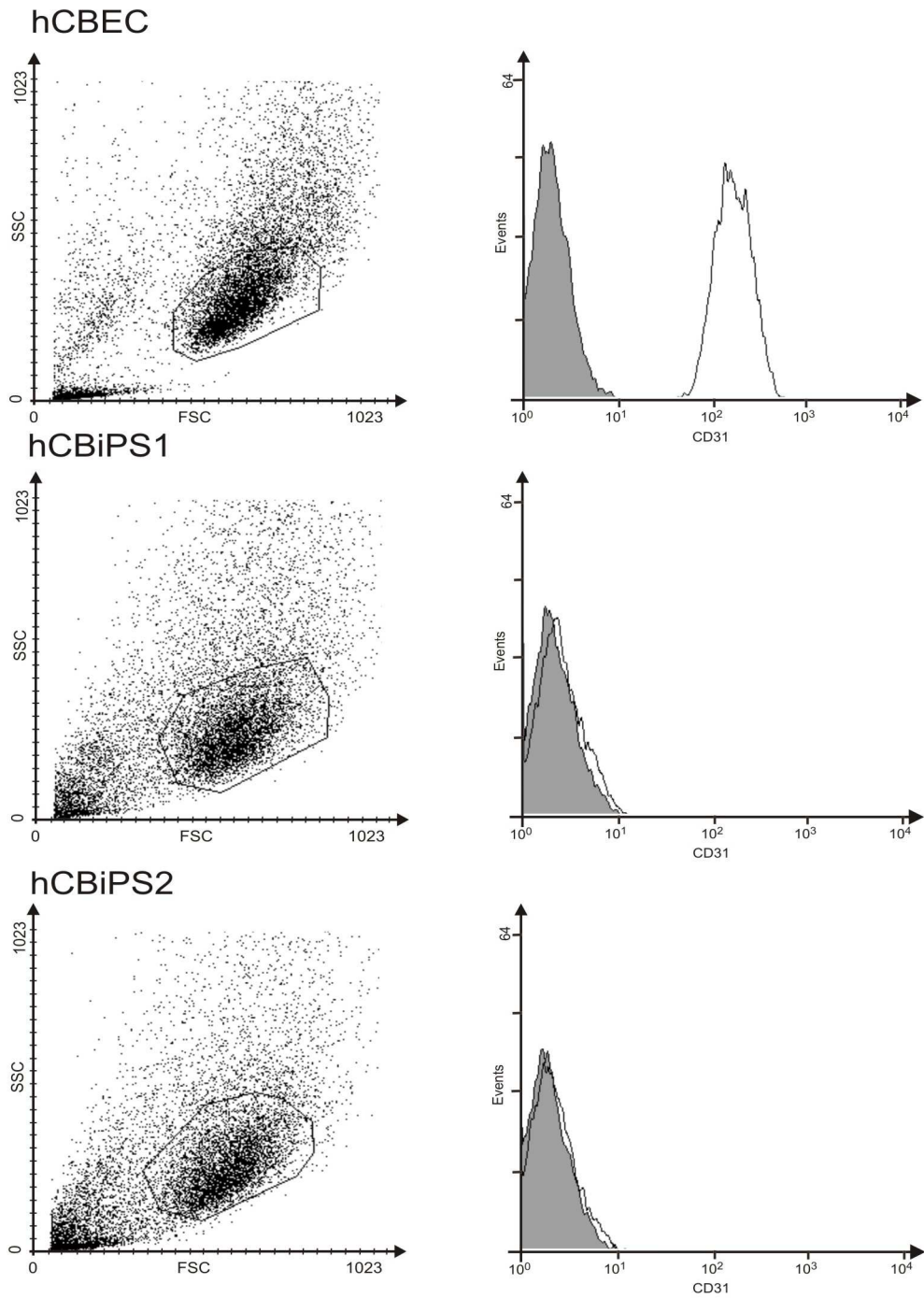
**Abb. 28: hiPS-Zellen exprimieren typische ES-Zellmarker.** Die typischen ES-Zelloberflächeantigene SSEA-3, SSEA-4 und Tra-1-60, sowie die Pluripotenzmarker OCT4, NANOG, SOX2 und LIN28 (rot), sind für hCBiPS1 (Passage7) gezeigt. Die Zellkerne wurden durch DAPI (blau) dargestellt. Skalierung: 100  $\mu$ m.

Die Färbungen wurden nach Fixierung von morphologisch als undifferenziert beurteilten Zellen in frühen Passagen von Dr. Ruth Olmer und Tilman Schnick durchgeführt. Für alle untersuchten Marker konnte eine positive Immunreaktivität auf die jeweiligen Antikörper

nachgewiesen werden. Diese sind exemplarisch für hCBiPS1 in Passage 7 gezeigt (Abb. 27). Für SSEA-3 und SSEA-4 und TRA-1-60 konnte die typische, etwas diffuse Anfärbung des Zytoplasmas der Zellen demonstriert werden, während OCT4, SOX2 und NANOG ihrer Lokalisation in der Zelle entsprechend im Zellkern angefärbt wurden. Die Färbung von LIN28 zeigte wie erwartet eine positive Antikörper-Antigen-Reaktion im Zytoplasma. Die vermutete Reprogrammierung der Ausgangszellen in undifferenzierte, pluripotente ES-zellartige Zellen konnten durch diese Ergebnisse untermauert werden.

### **3.2.5. Analyse von CD31 zum Nachweis des Verlustes des endothelialen Phänotypes der Nabelschnurblut-Endothelzellen nach der Reprogrammierung**

Einen Hinweis auf die vollständige Reprogrammierung der Nabelschnurblut-Endothelzellen sollte die Veränderung des endothelialen Phänotypes der nach der Transduktion mit den OCT4, SOX2, NANOG und LIN28 übertragenden Lentiviren erbringen. Die generierten Zellen und die Ausgangszellen wurden durch Immunfluoreszenzfärbung und anschließender FACS-Analyse von Dr. Ruth Olmer auf den Endothelzell-spezifischen Marker CD31 untersucht. Die Expression von CD31 konnte, im Vergleich zu den Ausgangszellen, auf den humanen hCBiPS-Zellen nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 28). Der Verlust der CD31-Expression zeigt die Veränderung des endothelialen Phänotyps der Ausgangszellen nach deren Reprogrammierung in einen undifferenzierten Phänotyp ohne endotheliale Ausrichtung und damit deren vollständige Reprogrammierung.



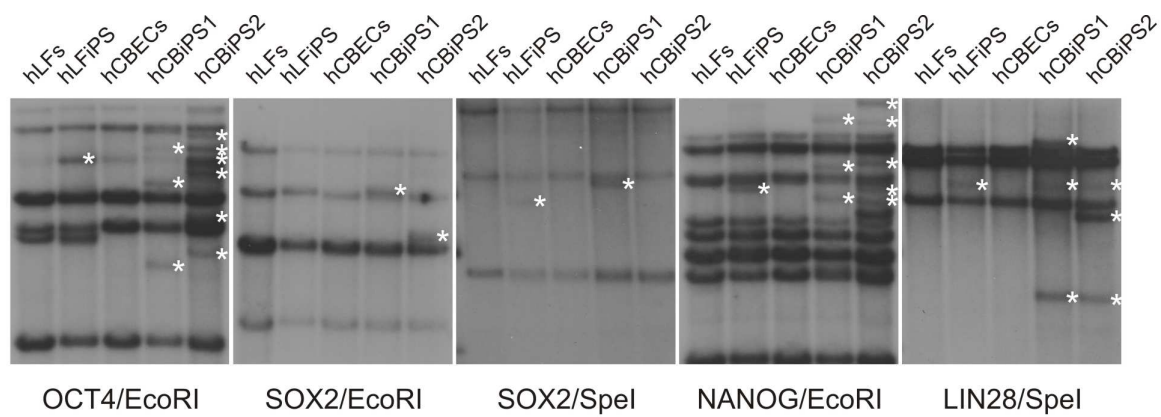
**Abb. 29: CD31-Expression vor und nach der Reprogrammierung von hCBEC zu hCBiPS.** Die Immunzytologische Anfärbung und FACS-Analyse zeigt die Expression von CD31 auf den Ausgangszellen, während die reprogrammierten Zellen diese nicht mehr aufweisen. Dargestellt in grau sind die korrespondierenden Isotypenkontrollen.

### 3.2.6. Transgen-Integrationsanalyse mittels Southern Blot

Um die Zahl der Transgenintegrationen in den untersuchten IPS-Zellklonen zu bestimmen, wurden Southern Blot Analysen von hCBiPS1, hCBiPS2 und hLFiPS und den entsprechenden Ausgangszellen angefertigt.

Bei der lentiviralen Transduktion integrieren Kopien der Transgene zufällig in das Genom der Zielzellen. Handelt es sich nach der durch Transduktion ausgelösten Reprogrammierung um unterschiedliche, in den Wells entstandene Klone, sollten sich bei diesen an unterschiedlichen Stellen im Genom die integrierten Transgene bzw. unterschiedliche Anzahlen von Kopien nachweisen lassen. Bei gleichem Integrationsmuster, muss im Fall von mehreren entstandenen Kolonien nach der Reprogrammierung davon ausgegangen werden, dass alle Kolonien aus einem identischen Zellklon entstanden sind, welcher sich nach Teilung in mehrere Kolonien aufgespalten hat.

Die hier in Kooperation mit der Abteilung für Experimentelle Hämatologie, MHH von Dr. Johann Meyer durchgeführten Southern Blots, demonstrieren unterschiedliche Kopienzahlen und Integrationsorte der Transgene OCT4, SOX2, NANOG und LIN28 in den hiPS-Zellen (Abb. 29). Für hLFiPS konnte jeweils eine Kopie der vier Transgene nachgewiesen werden. Die Southern Blots von hCBiPS1 zeigten drei Integrationsstellen vom OCT4-Transgen, eine von SOX2, drei von NANOG, sowie drei Integrationen von LIN28. Im Gegensatz dazu konnten bei hCBiPS2 mehr als sechs OCT4-, eine SOX2-, fünf NANOG-, sowie drei LIN28-Integrationen detektiert werden (Tabelle 5). Bei der Analyse von SOX2-Integrationen wichen die Ergebnisse nach enzymatischem Verdau der genomischen DNA mit *EcoRI* teilweise von denen nach Verdau mit *SpeI* ab. Diese Tatsache könnte auf die unterschiedliche Maskierung von einzelnen Integrationsstellen zurückzuführen sein. Die ebenfalls untersuchten Ausgangszellen hLF und hCBEC zeigten wie erwartet keine Transgenintegrationen. Die bei den Klonen differierende Anzahl von Integrationsstellen gab Hinweis darauf, dass es sich bei den etablierten Zellen um unabhängige Zellklone handelt.



**Abb. 30: Lentivirale Integrationsstellen in hLFiPS- und hCBiPS-Zellen.** Die Southern Blot Analyse demonstriert eine unterschiedliche Anzahl der einzelnen Transgene in hLFiPS-, hCBiPS1- und hCBiPS2-Zellen. Die genomische DNA wurde mit EcoRI bzw. SpeI verdaut. Die Blots wurden mit den folgenden Sonden hybridisiert: für OCT4 ein Eco81I-Fragment von pSIN-EF2-Oct4-Pur, für SOX2 ein PstI/NcoI-Fragment von pSIN-EF2-Sox2-Pur, für NANOG ein NcoI-Fragment von pSIN-EF2-Nanog-Pur und für LIN28 ein SmaI/NdeI-Fragment von pSIN-EF2-LIN28-Pur. Die Sternmarkierungen bezeichnen Transgen-Integrationsbanden.

**Tabelle 5: Lentivirale Integrationen in hLFiPS- und hCBiPS-Zellen**

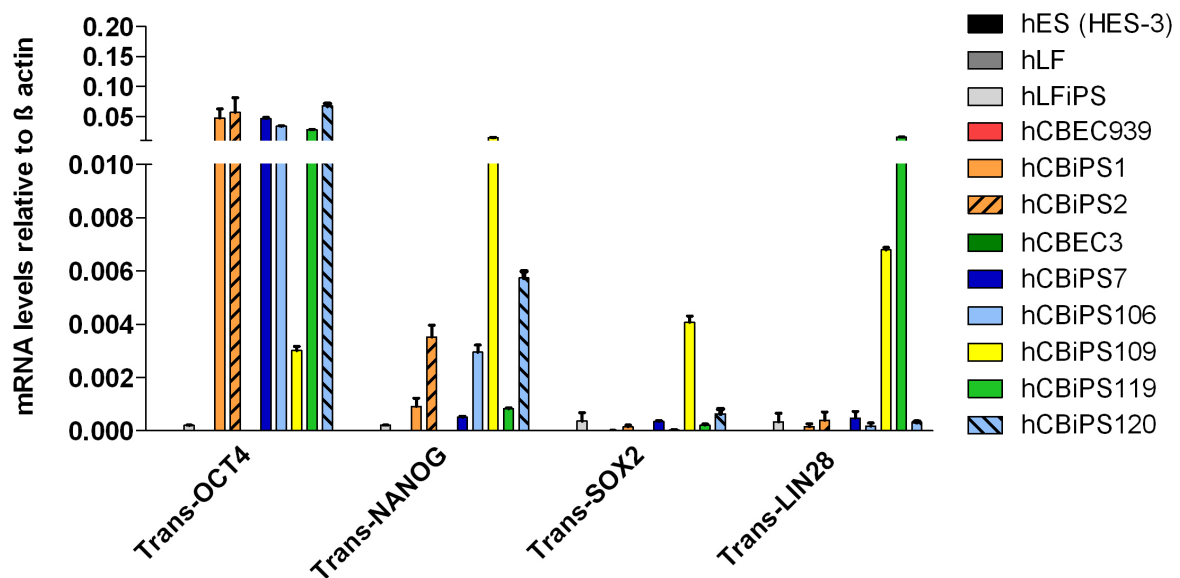
Lentivirale Integrationen in hLFiPS- und hCBiPS-Zellen				
Transgene	Enzym zum Verdau der gDNA	hLFiPS	hCBiPS1	hCBiPS2
OCT4	EcoRI	1	3	≥6
SOX2	EcoRI	0	1	1
	SpeI	1	1	0
NANOG	EcoRI	1	3	5
LIN28	SpeI	1	3	3

### 3.2.7. Analyse der Expression von Transgenen und Endogenen über Realtime PCR

Zur Analyse der Expression von transgenen und endogenen Reprogrammierungsfaktoren OCT4, SOX2, NANOG und LIN28 wurden quantitative Realtime-PCR-Analysen von undifferenzierten hLFiPS und hCBiPS und den korrespondierenden Ausgangszellen hLF und hCBEC gemacht. Als Kontrolle wurden humane ES-Zellen mitgeführt.

Anhand der Analyse der Transgenexpression kann der Grad des sogenannten lentiviralen „gene silencing“ abgeschätzt werden. „Gene silencing“ wird durch transaktive Faktoren verursacht, die an die viralen Promotoren in den LTR-Bereichen binden oder durch Methylation des integrierten viralen Genoms und den flankierenden Wirts- DNA-Sequenzen.

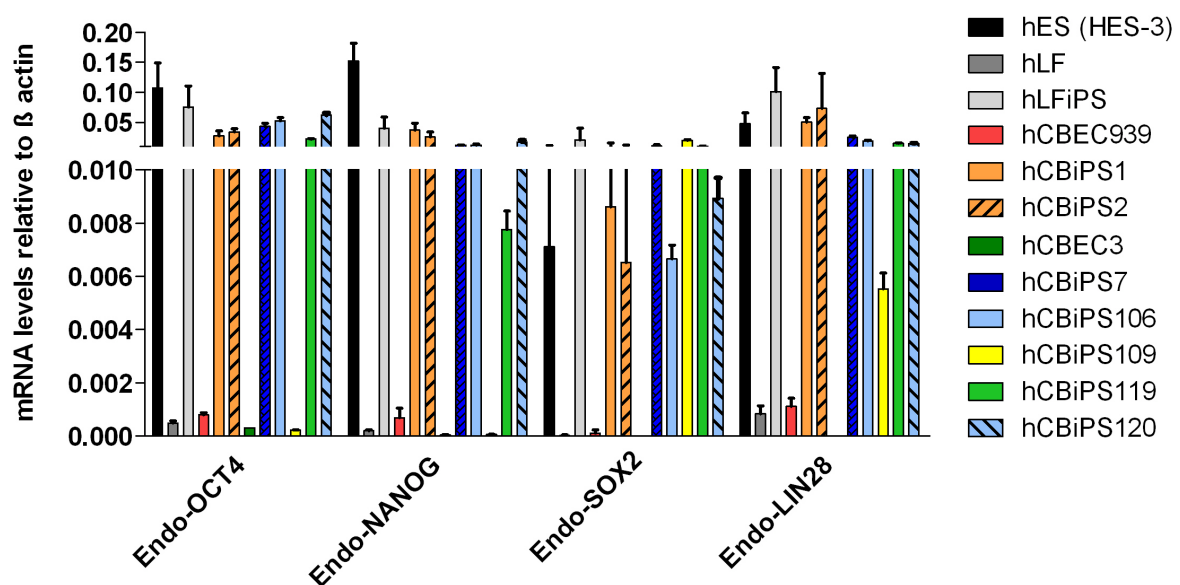
Beim transkriptionellen „gene silencing“ kommt es zu keiner signifikanten Expression der im Virus enthaltenen Gene [118, 119]. Das Level des „gene silencing“ variierte zwischen den unterschiedlichen Klonen und Transgenen. Während man bei den Ausgangszellen, wie erwartet, kaum messbare Werte für transgenes OCT4, NANOG, SOX2 und LIN28 finden konnte, wurde bei den daraus generierten hiPS-Zellen eine unterschiedlich hohe Transgenexpression gemessen. Das OCT4-Transgen wurde in hCBiPS-Zellen weiterhin in einem, mit der endogenen Expression in humanen ES-Zellen vergleichbarem Level (ca. 0.10) exprimiert, während es in hLFiPS fast vollständig in den Ruhezustand versetzt wurde. Weiterhin konnte im Fall von NANOG in allen Klonen (mit Ausnahme von Klon hCBiPS119) nur eine moderate Expressionshöhe von 0,002 bis 0,015 detektiert werden. Eine signifikante Expression von SOX2 von 0,004 konnte nur für hCBiPS Klon 109 gezeigt werden. LIN28 wurde ausschließlich von Klon 109 und Klon 119 in mit der endogenen Expression vergleichbarem Level von 0,007–0,016 gemessen (Abb. 30).



**Abb. 31: Quantitative Realtime PCR-Analyse der Transgen-Expression.** Dargestellt sind die Genexpressionshöhen relativ zu β-Actin. Die Expression der Transgene variiert zwischen verschiedenen Transgenen und Zellsorten.

Die Induktion der endogenen Pluripotenz-assoziierten Faktoren OCT4, SOX2, NANOG, LIN28 konnte anhand der Analyse der Expression der endogenen Faktoren bestimmt werden. Die Expression der endogenen Faktoren ist bei den Ausgangszellen, wie erwartet, nur in geringem Maße detektierbar. Die, durch die Reprogrammierung der Ausgangszellen ausgelöste, induzierte endogene Expression von OCT4 (0,022–0,075), NANOG (0,008–0,04),

SOX2 (0,007–0,021) und LIN28 (0,006–0,101), ist in allen hiPS-Klonen sehr viel höher als in den korrespondierenden Ausgangszellen (OCT4: 0,0003–0,0005; NANOG: 0,00003–0,0004, SOX2: 0–0,001, LIN28: 0–0,001) und vergleichbar mit den Expressionslevels in humanen ES-Zellen (Oct4: 0,107, NANOG: 0,152, SOX2: 0,007, LIN28: 0,048) (Abb. 31). Auch bei dieser Analyse differierte Klon 109 von den anderen Zellklonen durch minimale Expression von endogenem OCT4 und NANOG. Bei allen anderen Klonen konnte die Induktion der endogenen Faktoren nach der Reprogrammierung der Ausgangszellen nachgewiesen werden.



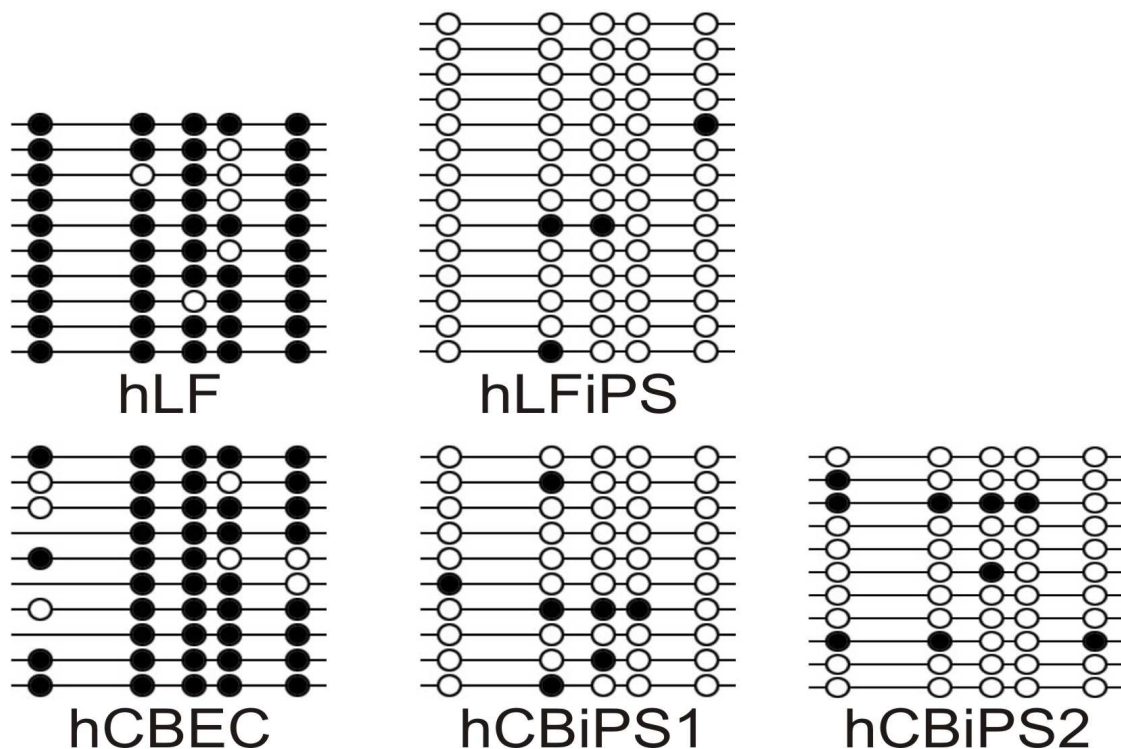
**Abb. 32: Quantitative Realtime PCR-Analyse der Endogen-Expression.** Dargestellt sind die Genexpressionshöhen relativ zu β-Aktin. Die induzierte endogene Expression von OCT4, NANOG, SOX2 und LIN28 liegt in den hiPS-Klonen über dem Level der Ausgangszellen und ist vergleichbar mit humanen ES-Zellen.

### 3.2.8. Bisulfit Sequenzanalyse von Promotorregionen

Durch die Bisulfit Sequenzanalyse kann der Methylierungsgrad von Genen analysiert werden. Bei der DNA-Methylierung wird eine Methylgruppe auf eine DNA-Base transferiert. Typischerweise wird die Methylgruppe auf ein Cytosin-Molekül in einer CpG-Sequenz der DNA übertragen. In terminal differenzierten Zellen behindert die ausgedehnte Methylierung bestimmter Gene deren Expression durch Verhinderung der Aktivität von Expressionsproteinen und -Enzymen. Durch die Methylierung wird die Transkription der Gene unterbunden und sie sind effektiv *gesilenced*. In iPS-Zellen sollten die Promotor-Regionen von Pluripotenz-assoziierten Genen wie OCT4 und NANOG demethyliert sein, um



deren Aktivität und damit die Expression der Pluripotenz-assoziierten Gene zu gewährleisten. Um die epigenetische Reprogrammierung nachzuweisen, wurden in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut in Münster von Dong Wook Han Bisulfit Sequenzanalysen von den im Rahmen der Arbeit generierten iPS-Zellen und den korrespondierenden Ausgangszellen gemacht. Beispielhaft ist hier die Analyse der Promotorregion vom OCT4-Gen dargestellt (Abb. 32). In den somatischen Ausgangszellen (hLF und hCBEC) sind die Promotorregionen stark methyliert, während diese sich in den hLFiPS- und hCBiPS-Zellen, wie bei ES-Zellen, signifikant demethyliert darstellen. Die Analyse des NANOG-Promotors konnte diese Ergebnisse bestätigen (nicht gezeigt).



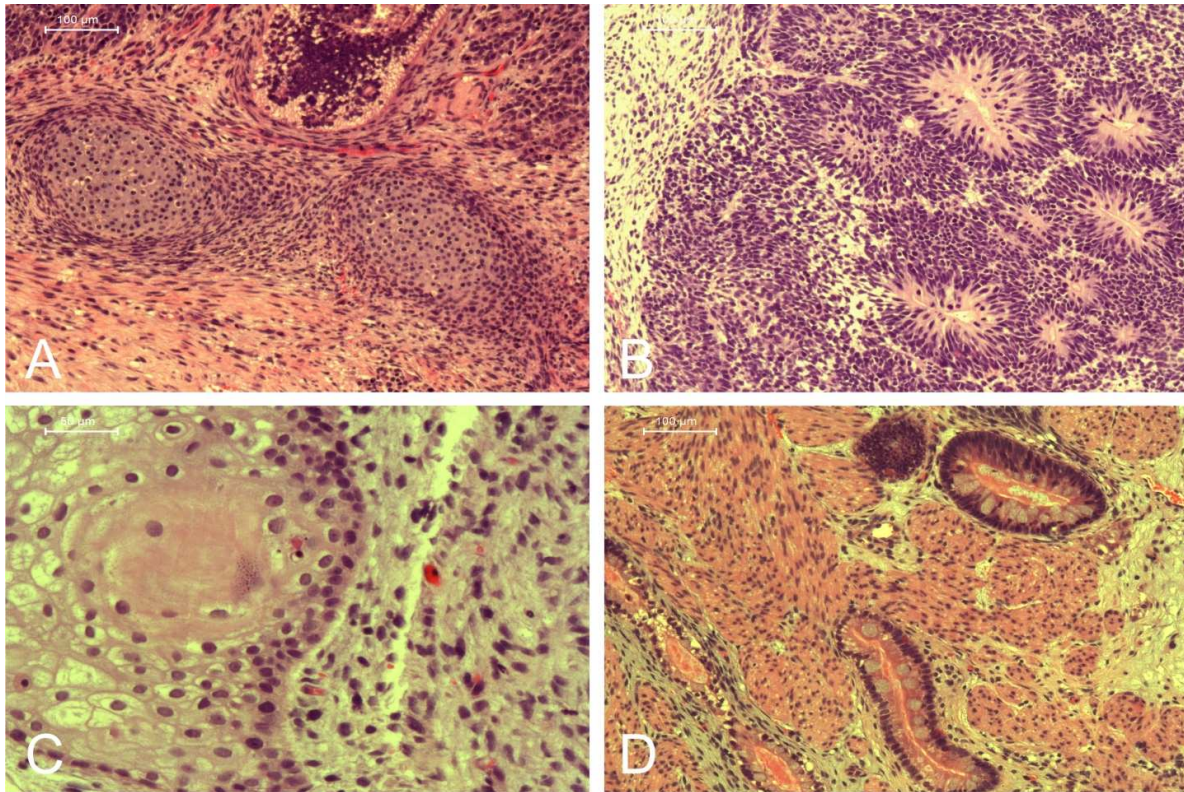
**Abb. 33: Bisulfit Sequenzanalyse der OCT4-Promotorregion von hLF, hCBEC, hLFiPS, hCBiPS1 und hCBiPS2.** Die epigenetische Reprogrammierung wird durch eine starke Methylierung der OCT4-Promotoregion der Ausgangszellen und die Demethylierung bei den entstandenen iPS-Zellen herausgestellt.

### **3.3. Differenzierung von hiPS**

Alle Versuche zur *in vitro*-Differenzierung von humanen iPS-Zellen wurden in Zusammenarbeit Dr. Kristin Schwanke und Dr. Ruth Olmer aus der Arbeitsgruppe durchgeführt. Experimente, die in der *in vivo*-Differenzierung zur Bildung von Teratomen in SCID-beige Mäusen führen sollten, wurden mit freundlicher Unterstützung von Biolaborant Christian Rathert durchgeführt.

#### **3.3.1. Bestimmung der *in vivo* Differenzierungskapazität von hiPS anhand von Teratomen**

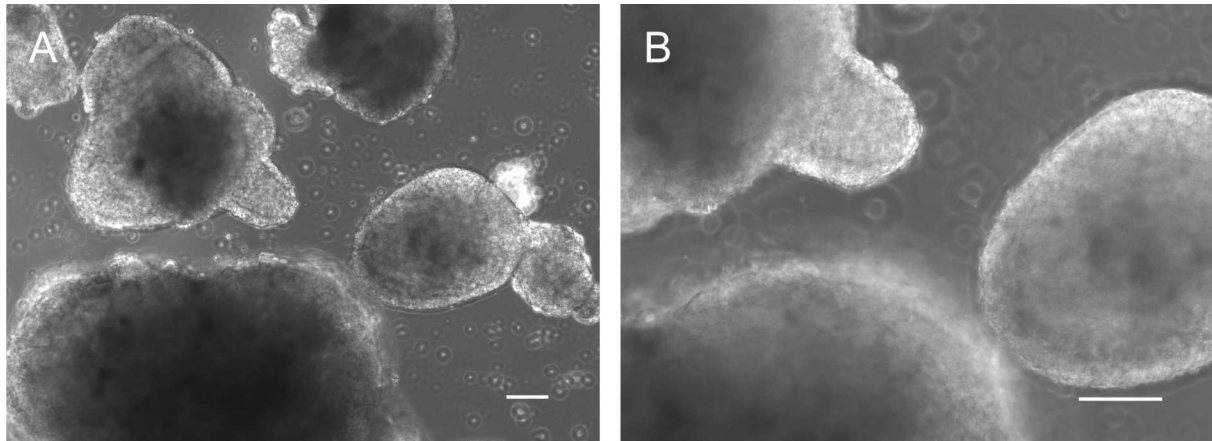
Pluripotenz ist definiert als die Differenzierbarkeit in Zellen aller drei Keimblätter: Endoderm, Mesoderm und Ektoderm. Pluripotenz wird durch Injektion von Zellen in immundefekte Mäuse nachgewiesen. Diese bilden spontan Teratome (Keimzelltumore) aus, welche Zellen aus allen drei Keimblättern enthalten und somit die Pluripotenz der injizierten Zellen belegen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Teratom-Nachweise für die generierten hiPS-Zellen hergestellt. 8–10 Wochen nach Injektion der hiPS-Zellsuspension in die Nierenkapsel und den hinteren Oberschenkelmuskel von SCID-Beige-Mäusen, bildeten sich bei acht Tieren Teratome. Diese wurden explantiert und nach Fixierung geschnitten und mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung charakterisiert (Abb. 33). In den Schnitten der Teratome konnten Zellen aller drei Keimblätter nachgewiesen werden. Als mesodermale Derivate konnten Knorpelzellen (Abb. 33 A) und Muskelgewebe (Abb. 33 D) nachgewiesen werden. Ektodermale Derivate wurden durch Färbung von unreifem neuronalem Gewebe, das Neuralrohr-ähnliche Strukturen bildet (Abb. 33 B), sowie durch in der Keratinisierung befindliche Zellen, die von Sebaceousdrüsen umgeben waren, möglich (Abb. 33 C). Die Bildung von Endoderm wurde durch Mucus-produzierenden Epithelzellen repräsentiert (Abb. 33 D).



**Abb. 34:** Die Injektion von undifferenzierten hiPS-Zellen in immundefiziente SCID-beige Mäuse führte zur Bildung von Teratomen, die Zellen aller drei Keimblätter enthielten (A-D). Zwei Bereiche aus Chondrozyten repräsentieren die Bildung von Mesoderm (A). Sich teilendes unreifes neuronales Gewebe repräsentiert die frühe Entstehung von Neuralrohr-ähnlichen Strukturen (B). Eine Zelle mit beginnender Keratinisierung (durch die basophil-reagierende Keratohyalin granula im Zytoplasma gekennzeichnet) ist von Sebaceous Drüsen-ähnlichen Strukturen umgeben (C). B und C zeigen die Differenzierung in ektodermales Gewebe. Endodermales Epithel mit prominenten Mucus-produzierenden Zellen und Muskelgewebe, repräsentieren die Entstehung von Endoderm- und Mesoderm (D). Skalierung: 50 o. 100 µm wie beschriftet.

### 3.3.2. Bestimmung der *in vitro*-Differenzierungskapazität von hLFiPS-Zellen und hCBiPS-Zellen in *embryoid bodies* (EBs)

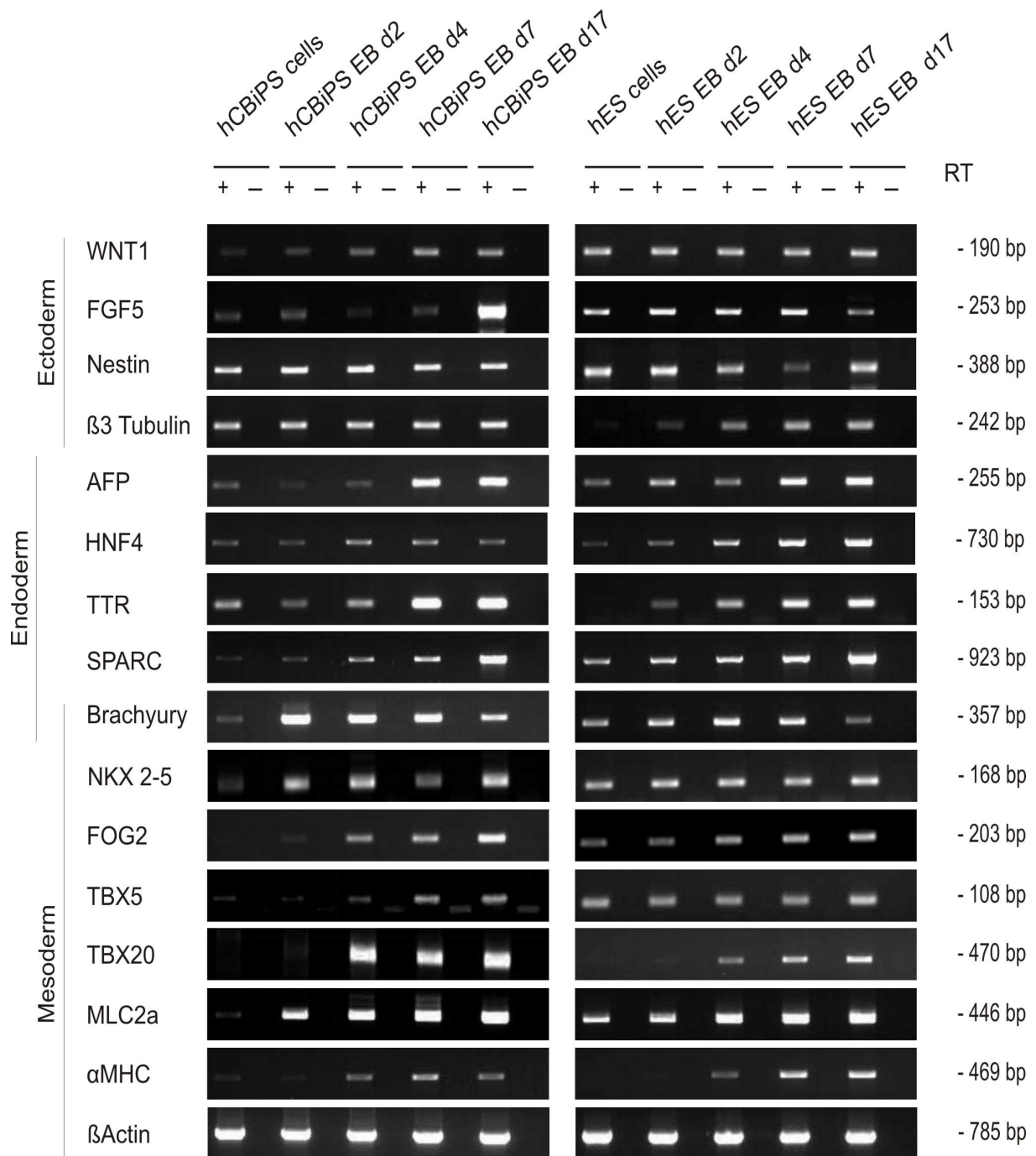
Als weiterer Nachweis für die Pluripotenz der generierten hiPS-Zellen wurde die *in vitro*-Differenzierungskapazität der Zellen in *embryoid bodies* (EB's) getestet. hES-Zellen bilden bei Differenzierung spontan rundliche embryoartige Strukturen, sogenannte „*embryoid bodies*“, die einen Kern aus mitotisch aktiven und differenzierenden ES-Zellen und eine Peripherie aus terminal differenzierten Zellen aller drei Keimblätter enthalten. Alle im Rahmen dieser Arbeit generierten hLFiPS- und hCBiPS-Klone bildeten bei Anwendung typischer ES-Zell-Differenzierungsprotokolle EB's (Abb. 34).



**Abb. 35: Morphologie von Embryoid Bodies an Tag 7 der Differenzierung.** Gezeigt sind EB's die bei der Differenzierung von hCBiPS2 -Zellen (Passage 8) entstanden sind. Skalierung: 100  $\mu$ m.

### 3.3.2.1. Expressionsanalyse typischer Marker von Zellen aller drei Keimblätter über semiquantitative PCR

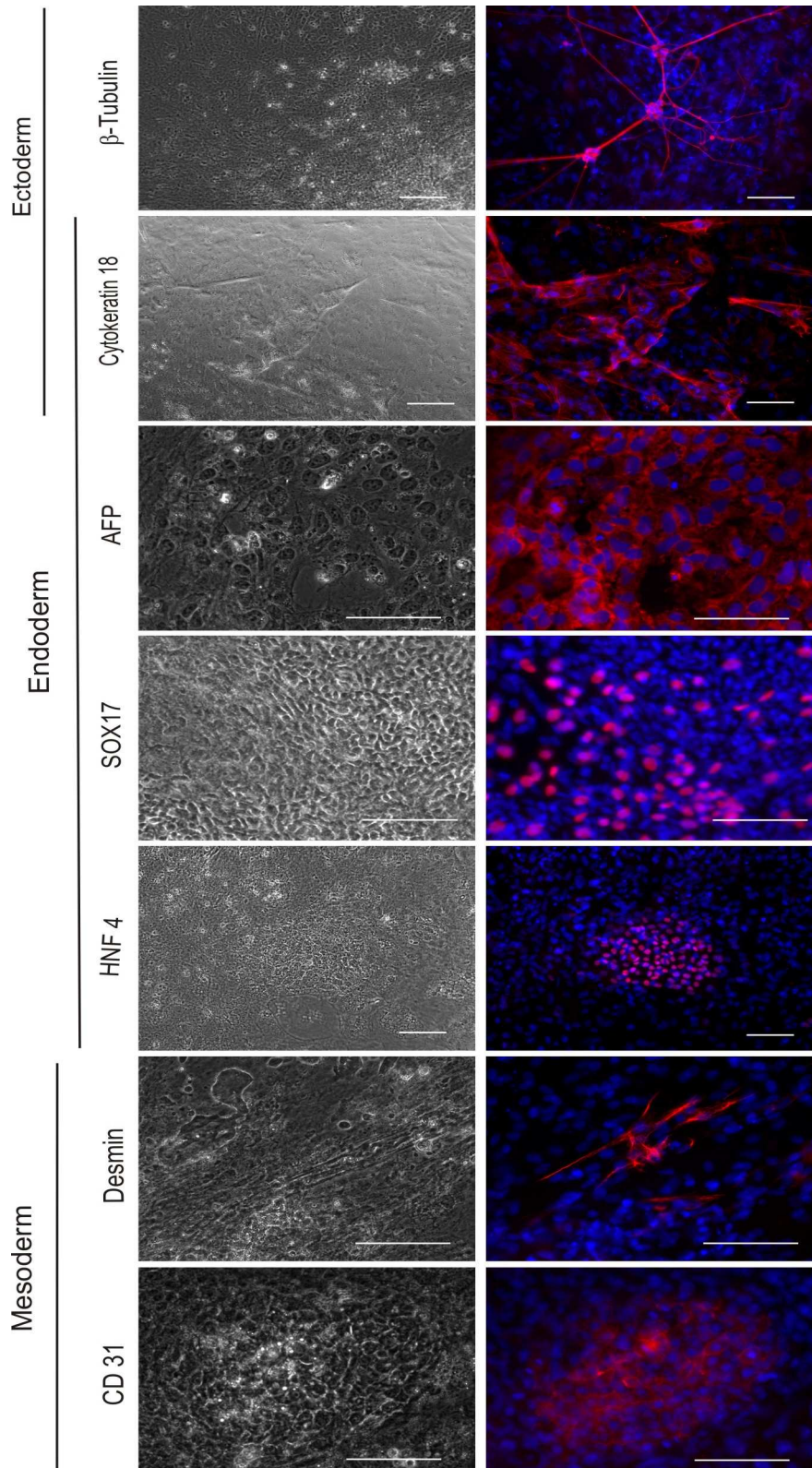
Bei der *invitro*-Differenzierung von hCBiPS in EB's wurden für alle weiteren Analysen RNA-Proben an Tag 0, Tag 2, Tag 7 und Tag 17 der Differenzierung hergestellt. Um die Differenzierung in Zellen aller drei Keimblätter im zeitlichen Verlauf nachzuweisen, wurde die RNA anhand von semiquantitativer PCR auf Keimblatt-spezifische Marker getestet. Als Positivkontrolle wurden Proben der Differenzierung von humanen ES-Zellen mitgeführt. Im Allgemeinen konnte ein, mit ES-Zellen vergleichbarer, Anstieg der Expression der Marker von allen drei Keimblättern während der Differenzierung nachgewiesen werden (Abb. 35). Die ektodermalen Marker WNT1, FGF5, NESTIN und  $\beta$ 3-Tubulin wurden während der Differenzierung hochreguliert, konnten allerdings auch in ES- und iPS-Zell-Expansionskulturen detektiert werden. HNF4A, TTR, SPARC and AFP, Marker für Endoderm, wurden zwischen Tag 4 und Tag 7 der Differenzierung hochreguliert. Für den Mesodermmarker Brachyury konnte zwischen Tag 2 und Tag 7 eine starke transiente Steigerung der Expression gezeigt werden.



**Abb. 36: Differenzierte Derivate von hCBiPS-Zellen exprimieren ektodermale, endodermale und mesodermale Marker.** Gezeigt wurde die semiquantitative PCR-Analyse von undifferenzierten Zellen und Zellen an verschiedenen Tagen nach Einleitung der Differenzierung. Im Allgemeinen konnte ein, mit ES-Zellen vergleichbarer Anstieg der Expression während der Differenzierung nachgewiesen werden. Um falschpositive Ergebnisse aufgrund von kontaminierender, genomischer DNA auszuschließen, wurden Kontrollen ohne RT (-) gemacht. Auf der rechten Seite sind die Größen der amplifizierten PCR-Produkte aufgeführt.

### **3.3.2.2. Nachweis endo-, meso- und ektodermaler Zellen über Immunfluoreszenzfärbung**

Zur Bestätigung der RT-PCR-Ergebnisse wurde von Dr. Ruth Olmer eine immunzytologische Analyse auf Marker für Zellen aller drei Keimblätter durchgeführt. Differenzierte Derivate der Zellen zeigten eine positive Immunreaktivität auf Antikörper gegen  $\beta$ 3-Tubulin (Neuronen), Cytokeratin 18 (Ektoderm, Epithel), AFP, Sox17 and HNF4 (Endoderm), Desmin und CD31 (Mesoderm). Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten die für die einzelnen Marker typischen Färbemuster (Abb. 36).

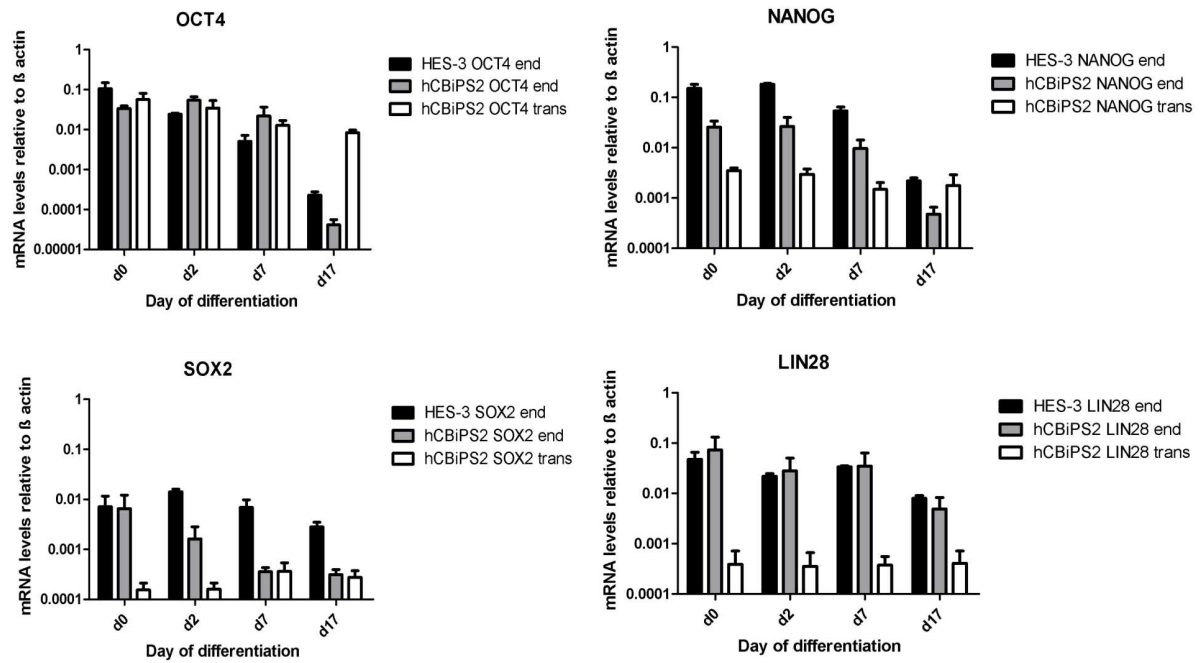


**Abb. 37: Immunfluoreszenzfärbungen von hCBiPS-Zellen zur Darstellung typischer Marker aller drei Keimblätter.** hCBiPS2-Derivate zeigten an Tag 21 der Differenzierung eine positive Immunreaktivität für ektodermale ( $\beta$ -Tubulin, Cytokeratin 18), endodermale (AFP, SOX 17 und HNF4) und mesodermale (CD31 und Desmin) Marker (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) dargestellt. Skalierung: 100 $\mu$ m.

### **3.3.2.3. Realtime-PCR-Analyse von Transgen- und Endogenexpression im zeitlichen Verlauf der Differenzierung**

Zur Analyse der Transgen- und Endogenexpression während der Differenzierung, wurden quantitative Realtime-PCR's von RNA-Proben, die zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung genommen wurden, durchgeführt. Humane ES-Zellen wurden im direkten Vergleich untersucht. Wie erwartet, kam es während des Differenzierungsverlaufes bei den hiPS-Zellen zu einem starken Abfall der endogenen OCT4-, SOX2-, NANOG- und LIN28-Expression, ähnlich wie bei der hES-Zellkontrolle (Abb. 37). Die endogene OCT4-Expression bei hCBiPS2-Zellen verminderte sich während der Differenzierung um den Faktor 815. Bei hES-Zellen wurde ein Abfall der Expression um den Faktor 102 ermittelt. Bei hCBiPS2-Zellen konnte eine 21-fache Reduktion der SOX2-Expression, bei hES eine 6-fache Reduktion während des Differenzierungsverlaufes bestimmt werden. Für NANOG wurde bei hCBiPS2-Zellen eine Abnahme der Expression um den Faktor 54 beobachtet, während bei hES-Zellen eine 15-fache Abnahme detektiert wurde. Die LIN28-Expression nahm bei hCBiPS2-Zellen um das 15-fache ab, bei hES-Zellen war eine 1,5-fach niedrigere Genexpression zu beobachten. Interessanterweise führte die Differenzierung ebenfalls zu einer Verminderung der transgenen OCT4-Expression, allerdings nur um das 7-fache. Für die schon in dem verwendeten iPS-Klon im undifferenzierten Zustand niedrige bis sehr niedrige Expression von transgenem NANOG, SOX2 und LIN28, konnte während der Differenzierung kein weiterer Abfall nachgewiesen werden.





**Abb. 38: Transgen- und Endogen-Analyse von OCT4, NANOG, SOX2 und LIN28 während der Differenzierung über quantitative Realtime-PCR.** Die Expression wurde während der Differenzierung an verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0, Tag 2, Tag 7 und Tag 17) von hCBiPS2- und hES-Zellen genommenen RNA-Proben bestimmt.

### 3.3.3. Kardiale Differenzierung von hCBiPSC

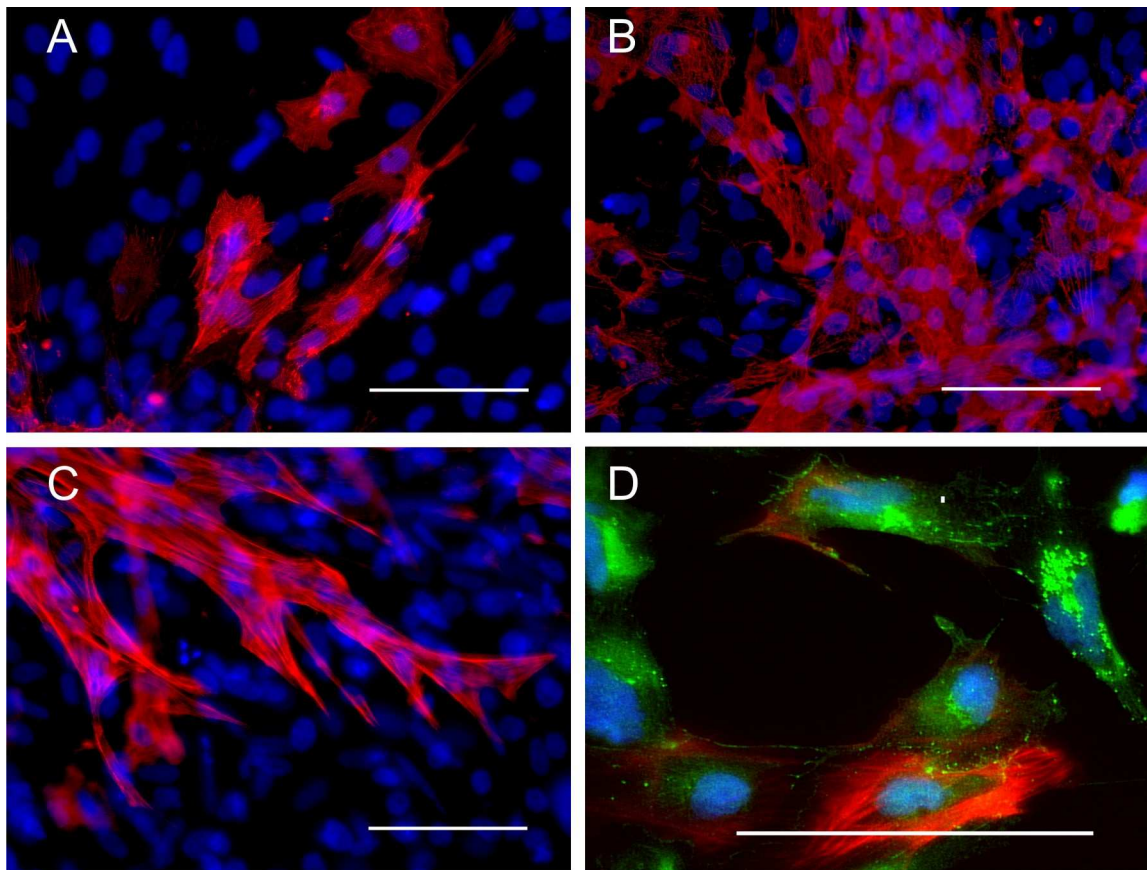
Als Nachweis der Pluripotenz von iPS-Zellen ist deren Differenzierung in spontan kontrahierende Kardiomyozyten beschrieben [85, 86]. Auch mit den im Rahmen dieser Arbeit aus somatischen Zellen generierten humanen iPS-Zellen, war eine EB-basierte kardiale Differenzierung mit im Endergebnis spontan kontrahierenden Kardiomyozyten möglich. Die Differenzierung wurde mit den in der Arbeitsgruppe etablierten Versuchsprotokollen von Dr. Kristin Schwanke durchgeführt. Eine detailliertere Analyse wurde mit hCBiPS2-Zellen durchgeführt. Die ersten kontrahierenden Areale erschienen an Tag 9 der Differenzierung, während der Differenzierung wurde ein weiterer Anstieg auf ca. 12% kontrahierende EB's beobachtet.

### **3.3.3.1. Analyse der Expression mesodermaler und kardialer Marker im Differenzierungsverlauf über semiquantitative RT-PCR**

Zur Charakterisierung des kardialen Differenzierungspotentials der generierten iPS-Zellen wurde eine Analyse der Differenzierungskulturen im Zeitverlauf über semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Eine Reihe von Markergenen wurde in die Analyse mit einbezogen: *Brachyury* wurde als früher mesodermaler Marker ausgewählt. FOG2, NKX2-5, TBX5 und TBX20 wurden miteinbezogen um die Induktion von kardialem Mesoderm zu verfolgen. Zusätzlich dienten MLC2 $\alpha$  und  $\alpha$ MHC als Marker für reife Kardiomyozyten. Alle untersuchten Marker konnten auf sehr niedrigem Niveau auch schon in den eigentlich undifferenzierte iPS- und im Speziellen in undifferenzierten hES-Zellen der Linie HES-3 nachgewiesen werden. Auch wenn quantitative Aussagen, basierend auf konventioneller RT-PCR, unter Vorbehalt getroffen werden müssen, deuten die Ergebnisse auf eine Hochregulierung aller getesteten Marker für Mesoderm, kardiales Mesoderm und Kardiomyozyten während der Differenzierung hin. Eine erhöhte Expression der mesodermalen Markergene NKX2-5 und FOG2, konnte in den differenzierenden iPS-Zellen erstmalig zwischen Tag 2 und Tag 4 der Differenzierung detektiert werden. Das Expressionsmuster von TBX5 und TBX20 in den iPS-Derivaten war sehr ähnlich dem von hES-Zellen, mit signifikanten Transkriptraten an Tag 4 der Differenzierung. Ebenfalls an Tag 4 der Differenzierung konnten erwähnenswerte Transkriptraten von  $\alpha$ MHC detektiert werden. Die MLC2 $\alpha$ -Expression stieg ab Tag 2 der Differenzierung stetig an (Abb. 35).

### **3.3.3.2. Charakterisierung iPS-abgeleiteter Kardiomyozyten über Immunfluoreszenzfärbung**

Zur Darstellung von aus hiPS generierten Kardiomyozyten und kardiomyozytenspezifischen Proteinen wurde eine immunzytologische Untersuchung von kontrahierenden Arealen nach deren Fixierung durchgeführt. Dabei konnten gut darstellbare quergestreifte Myozyten angefärbt werden. In den Zellen konnten typische sarkomere Proteine wie sarkomeres  $\alpha$ -Aktinin oder kardiales Troponin T nachgewiesen werden. Das Vorhandensein des *Gap Junction*-Proteins Connexin 43 (CX43) zwischen aus iPS-Zellen differenzierten Troponin T positiven Kardiomyozyten, weist auf eine funktionelle Kopplung der Myozyten untereinander hin und kann als erster Beleg für die Funktionalität dieser Zellen gelten.



**Abb. 39:** Darstellung von typischen Kardiomyozyten-Proteinen in hCBiPS2-Differenzierungen durch Immunfluoreszenzfärbung an Tag 21 der Differenzierung. Die Zellen wurden mit anti- $\alpha$ -Aktinin (rot; A, B), anti-Troponin T (rot; C, D) und anti-CX43 (grün, D) gefärbt. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) dargestellt.

## 4. DISKUSSION

### ***4.1. Induktion von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen)***

Die Herstellung von humanen iPS-Zellen [41, 42, 78] und die neuesten Entwicklungen im Bereich der Erzeugung von iPS-Zellen sogar ohne integrierende Vektoren [61, 62, 64, 69, 120], eröffnet neue Möglichkeiten für die Entwicklung von klinisch relevanten autologen Stammzelllinien. Die meisten der bisher publizierten humanen iPS-Zellen wurden über Reprogrammierung von adulten Fibroblasten gewonnen. Das dafür benötigte Bindegewebe wird, falls nicht im Rahmen eines sowieso stattfindenden operativen Eingriffes möglich, über eine Hautbiopsie gewonnen. Im Gegensatz dazu würde Blut eine wesentlich einfacher zugängliche Zellquelle für die iPS-Generierung darstellen. Erste Experimente zur Reprogrammierung von adulten Lymphozyten des peripheren Blutes, zum damaligen Zeitpunkt noch aus der Maus [75], deuteten jedoch darauf hin, dass sich die Reprogrammierung menschlicher Blutzellen, wenn überhaupt möglich, schwierig gestalten dürfte. Die augenscheinlich schlechte Reprogrammierbarkeit dieser Zellen dürfte in erster Linie darin begründet liegen, dass entsprechende Zellen nicht in adhärenter Kultur wachsen oder in Kultur nicht oder kaum proliferieren. Mit diesem Hintergrund wurden für die vorliegende Arbeit Endothelzellen des Nabelschnurblutes, welche im Gegensatz zu Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten des Blutes nicht nur adhärent kultivierbar sind, sondern auch in Kultur gut proliferieren, als potentielle Zellquelle für die Generierung von iPS-Zellen ausgewählt. Neben diesen wichtigen biologischen Eigenschaften stellte die breite Verfügbarkeit autologer und allogener Zellpräparate, welche in öffentlichen und kommerziellen Banken eingelagert sind, ein weiteres wichtiges Argument für die Auswahl von Endothelzellen des Nabelschnurblutes als klinisch hochrelevante juvenile Zellquelle für die iPS-Generierung dar.

Um spezielle Versuchsparameter wie die Bedingungen der lentiviralen Transduktion, die Kultivierungsbedingungen nach der Transduktion der Ausgangszellen und nach deren Reprogrammierung zu iPS-Zellen auszutesten, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit

zunächst Vorversuche mit zur Verfügung stehenden humanen Lungenfibroblasten durchgeführt.

Obwohl bei der hier in einem ersten Vorversuch gezeigten Induktion von induzierten pluripotenten Zellen aus humanen Lungenfibroblasten zunächst keine ES-zellartigen Kolonien erzeugt wurden, konnten bereits im zweiten Versuchsansatz reprogrammierte Zellen generiert werden. Unter Berücksichtigung von nicht optimalen Bedingungen bei den Vorversuchen, wie nicht optimaler Ausgangszellzahl, unbekanntem viralen Titer und direkter enzymatischer Passagierung am Tag nach der Transduktion, ist es eher erstaunlich, dass vergleichsweise schnell Kolonien erzeugt werden konnten. Mehrere Studien zeigen, dass sowohl der Zeitraum der Transgenexpression als auch die Stöchiometrie der integrierten Reprogrammierungsfaktoren bei der Reprogrammierungseffizienz eine Rolle spielen und der Vorgang der Reprogrammierung ein mehr oder weniger stochastischer Prozess ist [94, 121-124]. Es spricht für die generell gute Reproduzierbarkeit der Methode, dass hier trotzdem vergleichsweise schnell iPSC-Zellen erzeugt werden konnten.

Wie auch schon von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [15, 94, 124], konnten während der Reprogrammierungen von hLF, sogenannte Phase1-Kolonien beobachtet werden. Hierbei handelte es sich sehr wahrscheinlich um unvollständig oder nur teilweise reprogrammierte Intermediate. Diese könnten in der weiteren Wachstumsphase von der normalen Reprogrammierung abweichenden Prozessen unterworfen gewesen sein, weshalb eine weitere Kultivierung infolge von möglichen Differenzierungs- und/oder Apoptoseprozessen der Intermediatzellen hier nicht möglich war. Das Auftreten solcher Phase1-Intermediate ist offenbar ein generelles Merkmal in der Frühphase der Reprogrammierung von somatischen Zellen.

In den Vorversuchen mit humanen Lungenfibroblasten wurden vergleichsweise geringe Reprogrammierungseffizienzen erreicht. Hier spielten vermutlich mehrere Faktoren eine Rolle. Die Effizienz der Reprogrammierung ist unter anderem von der zu reprogrammierenden Zellsorte abhängig. Bei den hier eingesetzten Lungenfibroblasten handelte es sich um terminal differenzierte Primärzellen von älteren Patienten. Die geringeren Effizienzen unterstreichen die Vermutungen bezüglich der besseren Reprogrammierbarkeit von juvenilen Zellquellen gegenüber terminal differenzierten

Zellsorten. Auch andere Studien geben Hinweis darauf. Bei Li *et al.* wird beschrieben, dass in differenzierten Zellen durch Expression des *Ink/Arf*-Genortes die Reprogrammierung erschwert ist und sich dieser Effekt durch den Alterungsprozess durch Hochregulation von *Ink/Arf* noch verstärkt. In iPS- und ES-Zellen dagegen ist der *Ink/Arf*-Genort komplett *gesilenced*. Möglicherweise stellt jedoch ganz einfach die mangelnde Routine den Hauptgrund für die geringen Reprogrammierungseffizienzen während der ersten Reprogrammierungsexperimente dar, welche noch nicht unter optimalen Versuchsbedingungen durchgeführt werden konnten.

Im weiteren Verlauf der Arbeit konnten die für die Reprogrammierung von Lungenfibroblasten etablierten Protokolle erfolgreich auf die eigentlich ausgewählten Zellquelle –Nabelschnurblut-Endothelzellen (hCBEC)– übertragen werden. Die Kultivierungsbedingungen der aus hCBEC generierten iPS-Zellen entsprachen weitestgehend den in der Arbeitsgruppe etablierten Protokollen für die Kultivierung von Primaten-ES-Zellen. Ein Unterschied in der Kultivierung betraf die Menge des basic fibroblast growth factors bFGF im Kultivierungsmedium. Es wurde die doppelte Menge bFGF eingesetzt. Auch bei Yu *et al.* [42] wird eine größere Menge bFGF (25 fach) im Vergleich zur Kultivierung von ES-Zellen eingesetzt. Ob die Zellen tatsächlich einen höheren Bedarf an bFGF aufweisen, bleibt noch zu untersuchen.

Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmte Effizienz der Induktion von iPS-Zellen aus Nabelschnurblut-Endothelzellen von ca. 0,0005–0,03% bewegt sich in Bereichen wie in der Literatur für die lentivirale Transduktion der Ausgangszellen beschrieben [72], ist aber geringer als in Ansätzen in denen klassische onkoretrovirale Vektoren eingesetzt wurden [71, 78]. Zukünftige Studien sind nötig um zu klären, ob dies von der Überexpression einer anderen Kombination von Reprogrammierungsfaktoren (Thomson-Faktoren) in dieser Arbeit, vom Einsatz von lentiviralen Vektoren im Allgemeinen oder von den Expressionscharakteristika des humanen EF1 $\alpha$ -Promotors abhängig ist. Zwar werden mit klassischen onkoretroviralen Vektoren nach der „Yamanaka-Methode“ [41], bei der Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc als Reprogrammierungsfaktoren eingesetzt werden, höhere Reprogrammierungseffizienzen (gemessen an Kolonienanzahl pro Ausgangszellzahl) erreicht als bei der lentiviralen Transduktion mit den „Thomson-Faktoren“ (Oct4, Sox2, Nanog und LIN28) [42], aber der Anteil an tatsächlich vollständig reprogrammierten Kolonien scheint bei

der auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten „Thomson-Methode“ wesentlich höher zu sein. Im Hinblick auf die therapeutische Anwendung von iPS-Zellen spricht alles dafür, die geringere Effizienz der gewählten Methode für die höhere Qualität der Reprogrammierung zu tolerieren.

Durch die Resultate einer Transduktion mit einem korrespondierenden GFP-exprimierenden Vektor wurde angedeutet, dass die die EF1 $\alpha$ -ausgelöste Transgenexpression, obwohl stark in ES-Zellen, eher schwach in terminal differenzierten Zellen wie Fibroblasten und Endothelzellen ist. Gleiche Beobachtungen, in der Mehrheit von getesteten differenzierten Zelltypen (in der Arbeitsgruppe gemachte Beobachtungen, unpubliziert), weisen darauf hin, dass der EF1 $\alpha$ -Promotor nicht ideal für die Reprogrammierung von somatischen Zellen ist.

Interessanterweise korrelierte die Reprogrammierungseffizienz von hCBEC-Zellen mit den Proliferationsraten der verschiedenen Isolate. Nur hCBEC-Isolate mit einer Verdopplung pro Tag von mehr als 0,7, wiesen höhere Reprogrammierungseffizienzen auf. Diese Beobachtungen verdeutlichen, wie wichtig die Teilungsfähigkeit der Zellen für deren Reprogrammierung ist.

Obwohl eine hohe Myc-Expression in allen hCBEC-Isolaten gemessen werden konnte, waren keine signifikanten Unterschiede zwischen gut reprogrammierbaren, sich schnell teilenden und weniger gut reprogrammierbaren, eher langsam wachsenden Isolaten zu finden. Diese Erkenntnis deutet darauf hin, dass andere Zellzyklusregulatoren als Myc an den hohen Proliferations- und Reprogrammierungsraten von hCBEC3 und hCBEC8 beteiligt sind. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Reprogrammierungseffizienz für die unterschiedlichen hCBEC-Isolate von dem Vorhandensein einer spezifischen Subpopulation, mit einem Progenitor-ähnlichen Phänotyp abhängig ist.

#### **4.2. Charakterisierung von hiPS**

Genauso wie humane iPS-Zellen, die aus Fibroblasten [41, 42, 78], mesenchymalen Stammzellen [125], Keratinozyten [71, 72], Hepatozyten [62, 96] und neuronalen Stammzellen [54] hergestellt wurden, zeigen die hier erzeugten hLFiPS- und hCBiPS-Zellen typische Charakteristika von hES-Zellen.

Für die Charakterisierung der hiPS-Zellen wurden zelluläre und biologische Eigenschaften wie Morphologie, genetische Stabilität, Expression von Pluripotenz-assoziierten Genen und

stammzell-spezifischen Markern, epigenetische Eigenschaften wie Promotor-Demethylierung sowie die Fähigkeit zur Teratombildung und die *in vitro*-Differenzierbarkeit in Zellen aller drei Keimblätter untersucht.

Die Beurteilung von Zell- und Koloniemorphologie ergab keine generellen Unterschiede zwischen den hier erzeugten hiPS-Zellen und humanen / Rhesus-Affen ES-Zellen.

Der Nachweis der Expression von endogenem OCT4, SOX2, NANOG und LIN28 durch semiquantitative RT-PCR und Realtime-PCR, die positive Immunreaktivität auf Antikörper gegen SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, OCT4, SOX2, NANOG, und LIN28 sowie der Verlust der CD31-Expression, wiesen auf eine Reprogrammierung der Nabelschnurblut-Endothelzell-basierenden iPS-Zellen und deren pluripotenten Status hin.

Interessanterweise zeigte die Analyse der Expression der Transgene OCT4, NANOG, SOX2 und LIN28 über Realtime-PCR, dass die Expression der lentiviral übertragenen Transgene in den einzelnen Klonen in unterschiedlichem Maße noch aktiviert ist. Dies steht im Widerspruch zu dem ursprünglich formulierten Postulat, dass das komplette „*Silencing*“ der Transgene, wie üblicherweise unter Verwendung onkoretroviraler Vektoren zu beobachten, eine Grundvoraussetzung für die Induktion pluripotenter Stammzellen sei. Für lentivirale Vektoren ist ursprünglich beschrieben, dass sie im Gegensatz zu klassischen onkoretroviralen Vektoren das „*Silencing*“ in pluripotenten Zellen, wie ES-Zellen umgehen [119]. Tatsächlich sind sie in ES-Zellen aber oft komplett „*gesilenced*“ [126, 127] oder man findet variable Anteile von genetisch identischen Zellen, die die Vektorgene entweder exprimieren oder in denen sie „*gesilenced*“ sind [127, 128]. Auch in anderen Studien konnten, ähnlich wie bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Arbeiten, lentivirale Vektoren erfolgreich zur Induktion von murinen und humanen iPS-Zellen eingesetzt werden, obwohl die Expression der übertragenen Transgene nicht inaktiviert werden konnte [39, 42]. Trotz der offensichtlich nicht komplett abgeschalteten Expression der Pluripotenz-assoziierten Transgene OCT4 und NANOG, war eine Differenzierung der Klone in Zellen aller drei Keimblätter möglich (siehe 3.3 und 4.3).

Mittels Southern Blot Analyse konnte der genetisch unabhängige Ursprung der hiPS-Zellklone nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung von SOX2-Integrationen wichen die Ergebnisse nach enzymatischem Verdau der genomischen DNA mit *EcoRI* teilweise von denen nach Verdau mit *SpeI* ab. Diese Tatsache könnte auf die unterschiedliche Maskierung von einzelnen Integrationsstellen zurückzuführen sein.



Ein entscheidender Aspekt für eine potentielle klinische Applikation von iPS-Zellderivaten ist die genetische Integrität der zu transplantierenden Zellderivate. Im Gegensatz zu den getesteten hCBiPS-Klonen, welche einen normalen Karyotyp aufwiesen, wurde bei der Analyse von hLFiPS-Zellen eine Trisomie 20 diagnostiziert. Diese konnte in den primären Lugenfibroblasten nicht nachgewiesen werden. Trisomie 20 ist eine häufig in der Zellkultur vorkommende chromosomale Abnormalität [129, 130], so dass nicht unbedingt davon ausgegangen werden kann, dass deren Entstehung in hLFiPS-Zellen ursächlich mit dem Prozess der Reprogrammierung verknüpft ist, wahrscheinlicher ist, dass die Trisomie im Zusammenhang mit der ausgedehnten Zellexpansion entstanden ist. Generell weist dieser Befund jedoch auf eine kritische Problematik für die Herstellung klinisch anzuwendender Zellpräparate hin. Hier müssen zukünftig nicht nur Kulturprotokolle entwickelt werden, welche die genetischen Stabilität der expandierten Zellen bestmöglich gewährleisten, sondern auch Analysemethoden angewendet werden, die in der Lage sind, nicht nur chromosomale Abnormalitäten, sondern auch Veränderungen auf Nukleotidebene zu detektieren.

### **4.3. Differenzierung von hiPS-Zellen**

Obwohl in den hCBiPS-Zellen noch eine anhaltende Transgenexpression gemessen werden konnte (siehe auch 3.2.7. und 4.2), differenzierten die im Rahmen der Arbeit generierten hiPS-Zellen relativ effizient in Derivate aller drei Keimblätter. Interessanterweise wurde die Differenzierung der hCBiPS-Klone nicht durch die beträchtlichen Level der transgenen OCT4- und NANOG-Expression inhibiert. Stattdessen verringerte sich die OCT4-Expression während der Differenzierung von hCBiPS2 in dem hier angewendeten EB-basierten Differenzierungsprotokoll kontinuierlich um das 7-fache. Wahrscheinlich repräsentiert diese Abnahme von transgenem OCT4 nicht den eigentlichen Mechanismus, sondern eher einen sekundären Effekt der Differenzierung und könnte das typische „*Silencing*“ des EF1 $\alpha$ -Promotors während der Differenzierung von Zellen widerspiegeln (Beobachtungen der Arbeitsgruppe, unpubliziert).

Da die kardiale Differenzierung pluripotenter Stammzellen mit dem Ziel der Entwicklung zellulärer Therapien ein Schwerpunktthema der eigenen Abteilung darstellt, wurde die

kardiale Differenzierung der generierten iPS-Zellen eingehender untersucht. Während der Differenzierung zeigten die hCBiPS-Zellderivate eine mit humanen ES-Zellen vergleichbare Hochregulation von verschiedenen kardialen Markergenen. Dabei konnte sowohl bei undifferenzierten iPS-, als auch bei undifferenzierten ES-Zellen eine detektierbare Expression von unterschiedlichen ektodermalen, endodermalen, mesodermalen und kardialen Markern beobachtet werden. Diese Beobachtung korrespondiert mit vorherigen Ergebnissen mit variablen Anteilen von mehr oder weniger differenzierten Derivaten in eigentlich „undifferenzierten“ ES-Zellkulturen (z.B. [117, 131]).

In Übereinstimmung mit den entstandenen spontanen Kontraktionen, konnten geordnete sarkomere Strukturen in hCBiPS-basierenden Kardiomyozyten nachgewiesen werden, die nicht von denen von ES-Zellbasierenden Kardiomyozyten zu unterscheiden waren. Vergleichend mit für humane ES-Zellen publizierten Daten [132], führte die Differenzierung von hCBiPS-Zellen zu bis zu 12% kontrahierender EB's.

Das Vorhandensein von Connexin 43 deutete auf *Gap Junctions* zwischen den iPS-basierenden Kardiomyozyten und deren funktionelle Kopplung hin. Weitere Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe konnten diese Vermutung bestätigen. Mit der Messung von synchronisierten intrazellulären  $Ca^{2+}$  Oszillationen konnte die funktionelle Kopplung der iPS-abgeleiteten Kardiomyozyten und das Vorhandensein eines funktionellen sarkomerischen Retikulums nachgewiesen werden. Durch MEA-Analysen und Patch-Clamp-Experimente konnte darüber hinaus der Nachweis der Funktionalität weiter untermauert und ventrikuläre und Schrittmacher-ähnliche Zellen nachgewiesen werden.

Die erzielten Ergebnisse belegen, dass die im Rahmen der Arbeit generierten humanen iPS-Zellen sich in funktionelle Kardiomyozyten differenzieren lassen, die primären Kardiomyozyten und ES-zellbasierten Kardiomyozyten in nichts nachstehen.

Die Ergebnisse wurden 2009 in der Oktoberausgabe von Cell Stem Cell (Cell Stem Cell 5, 434-441, October, 2, 2009) veröffentlicht [84]

## 5. PERSPEKTIVEN

Nachdem in Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass sich aus Nabelschnurblut humane iPS-Zellen generieren lassen, und diese u.a. in funktionelle Herzmuskelzellen differenziert werden können, müssen nun sicher weitere Folgestudien durchgeführt werden, um z.B. die unterschiedlichen Reprogrammierungseffizienzen individueller Endothelzellisolate zu erklären, bzw. gezielt mit geeigneten Reprogrammierungsprotokollen adressieren zu können.

So wurde im Rahmen eines Industrie-geförderten Projektes bereits mit der systematischen Untersuchung der Reprogrammierungseffizienz verschiedener Endothelzell-Isolate aus frischen und unterschiedlich lang eingelagerten Nabelschnurblutproben begonnen. Ziel des Gesamtvorhabens ist die detaillierte Evaluation von Nabelschnurblut für die Generierung klinisch nutzbarer iPS-Zellen. Dies schließt sowohl die Optimierung und Standardisierung der Endothelzell-Isolation aus Nabelschnurblut, die Entwicklung von Protokollen unter Verwendung volldefinierter Kulturmedien als auch die Herstellung transgenfreier iPS-Zellen ein. So wird in der eigenen Arbeitsgruppe u.a. bereits an der Etablierung der iPS-Generierung mit Hilfe von nichtintegrierenden RNA-Viren gearbeitet. Des Weiteren sollen die verwendeten Reprogrammierungsprotokolle unter Verwendung weiterer Komponenten wie z.B. chemischer Zusätze oder miRNA's weiter optimiert werden

Ein weiteres wichtiges Projekt für die Zukunft betrifft die Untersuchung bzw. den Nachweis der postulierten bessere Qualität von hCBiPS-Zellen gegenüber iPS-Zellen, reprogrammiert aus Zellen älterer Spender.

Hierzu sind weitere Untersuchungen geplant, um u.a. die genomische und mitochondriale Mutationsrate über eine neue Hochdurchsatzsequenziermethode der iPS-Zellen von Spendern verschiedenen alters, im Vergleich mit hCBiPS-Zellen zu evaluieren. Untersucht werden soll auch, ob die, in iPS-Zellen von älteren Patienten zu findenden Mutationen in bestimmten Genen, z.B. in Onkogenen gehäuft vorkommen. Im Hinblick auf die vermutete Anhäufung von mitochondrialen Mutationen ist die Qualität von aus iPS-Zellderivaten differenzierten Nerven- oder Muskelzellen, die per se eine hohe Anzahl an Mitochondrien enthalten fraglich. Solche aus iPS-Zellen von älteren Spenden differenzierten Zellen sollen bezüglich ihrer Funktionalität weiter untersucht werden.

Für die klinische Verwendung humaner iPS-Zellen sind neue skalierbare Kulturmethode essenziell. Da die klassische adhärenz Kultur auf Feeder-Zellen kaum automatisierbar bzw. skalierbar erscheint, wurden innerhalb der Arbeitsgruppe unterdessen Kulturbedingungen entwickelt, welche erstmals die Expansion humaner pluripotenter Zellen in einem Suspensions-basierten System unter definierten Bedingungen erlauben. Dadurch ist der erste Schritt hin zur „Large Scale“ Produktion unter kontrollierten Prozessbedingungen gelungen und es besteht Hoffnung, dass iPS-Zellen in naher Zukunft in ausreichender Menge produziert werden können, um den Einsatz in regenerativen Therapien zu erlauben. Entscheidend in diesem Zusammenhang wird es allerdings sein, deren genetische Stabilität während der Expansion zu belegen. Für die jeweiligen klinischen Applikationen müssen außerdem geeignete Differenzierungsprotokolle entwickelt werden. Auch wenn in diesem Bereich in jüngster Vergangenheit schon große Fortschritte erzielt werden konnten, z.B. für die Differenzierung in neuronale Zelltypen oder Kardiomyozyten, ist hier in den meisten Fällen noch deutlicher Optimierungsbedarf gegeben.

Um weitere Grundlagen zur Erforschung vielfältiger medizinischer Fragestellungen wie Entwicklung von Krankheitsmodellen und pharmakologischen Screening-Systemen zu etablieren, ist zudem die Generierung von iPS-Zellen weiterer Spezies sicher von Vorteil. Hierzu gehört die Erzeugung von iPS-Zellen aus somatischen Zellen von transgenen Schweinen sowie von Rhesus- bzw. Javaneraffen, an der innerhalb der Arbeitsgruppe bereits mit Hochdruck gearbeitet wird.

Basierend auf einem der, im Rahmen der Arbeit hergestellten, hCBiPS-Klone wurde bereits eine ganze Reihe stabiler transgener Klone, welche z.B. die Selektion von Kardiomyozyten oder das *Imaging* im lebenden Tier erlauben sollen, hergestellt. Derartige Klone werden von großer Bedeutung sein, um Methoden der Zelldifferenzierung, Zellanreicherung und Zelltransplantation weiter zu optimieren. Verwendet wird der hCBiPS-Klon 2 außerdem bereits sehr erfolgreich zur Optimierung der kardialen Differenzierung.

Die Anwendung von Kardiomyozyten basierend auf murinen iPS-Zellen, konnte bei der Herstellung von kontrahierendem bioartifiziellem kardialem Gewebe (bioartificial cardiac

tissue, BCT) bereits gezeigt werden. Neuere Untersuchungen müssen nun herausstellen, ob die hier *in vitro* bereits auf ihre Funktionalität getesteten humane kardialen iPS-Zellderivate ebenfalls für diese Art des Tissue Engineering einsetzbar sind und den bisher verwendeten murinen ES-Zell-basierenden kardialen Zellen und neonatalen Rattenkardiomyozyten in nichts nachstehen.

Nachdem die erfolgreiche Differenzierung von hCBEC-iPS-Zellen in funktionelle Kardiomyozyten im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte, ist ein weiteres zukünftiges Projekt bezüglich der Differenzierbarkeit in Richtung respiratorisches Epithel der Lunge geplant. Für die Differenzierung von murinen ES-Zellen in SPC-exprimierende Zellen existieren bereits Protokolle, die für die Differenzierung von humanen iPS-Zellen angepasst werden sollen.

## 6. ABKÜRZUNGEN

°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AFP	Alpha Feto Protein
AZA	5-Azacytidin
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw	Beziehungsweise
C	Cytosin
Ca	Kalzium
CD	Cluster of Differtiation-Molekül
cDNA	complementary DNA
CEBP $\alpha$	CCAAT/Enhancer-Binding Protein Alpha
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Cre	causes recombination, Rekombination
Ct	Cycle Threshold, Schwellenwert-Zyklus
Cx 43	Connexin 43
d	day
d.h.	das heißt
d.p.c.	days post coitum
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EB	Embryoid Body
EBNA1	Epstein-Barr Nuclear Antigen 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1 $\alpha$	Elongation Factor 1-Alpha
EGF	Epidermal Growth Factor
EPC	Endothelial Progenitor Cell
ES	Embryonale Stammzellen
ESRRB	Estrogen Related Receptor Beta
FACS	Fluorescens Activated Cell Sorting
FCS	Fötale Kälber Serum (Fetal Calf Serum)
FGF	Fibroblast Growth Factor
FLK	Fetal Liver Kinase
FLT	Fms-related Tyrosin Kinase
FOG	Friend of GATA
FOXA2	Forkhead Box A2
G	Guanin

---

<b>GATA</b>	GATA binding protein
<b>GI</b>	GenInfo Identifier
<b>hCBEC</b>	humane Nabelschnurblut-Endothelzellen (human cord blood endothelial cells)
<b>hCBEPC</b>	humane Cord Blood Endothelial Progenitor Cell
<b>hES</b>	humane Embryonale Stammzellen
<b>hiPS</b>	humane induzierte pluripotente Stammzellen
<b>hLF</b>	humane Lungenfibroblasten
<b>hLFiPS</b>	induzierte pluripotente Stammzellen aus humanen Lungenfibroblasten
<b>HNF4A</b>	Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha
<b>HTTG</b>	Herz-, Thorax-, Transplantations- und Gefäßchirurgie
<b>ICM</b>	Inner Cell Mass
<b>IGF2</b>	Insulin-like Growth Factor 2
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IgM</b>	Immunglobulin M
<b>IMDM</b>	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
<b>iPS</b>	induzierte pluripotente Stammzellen
<b>KLF4</b>	Kruppel-like factor 4
<b>L</b>	Liter
<b>Let-7</b>	Lethal-7, microRNA
<b>LIF</b>	Leukemia Inhibitory Factor
<b>LIN28</b>	RNA-binding protein LIN28
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>M</b>	Molar
<b>MEF</b>	Murine embryonale Fibroblasten
<b>mESC</b>	Murine embryonale Stammzellen
<b>Mg</b>	Magnesium
<b>MHH</b>	Medizinische Hochschule Hannover
<b>min</b>	Minute(n)
<b>mIR</b>	microRNA
<b>ml</b>	Milliliter
<b>MLC2</b>	Myosin Light Chain 2
<b>mm</b>	Millimeter
<b>MOI</b>	Multiplicity of Infection
<b>mRNA</b>	messenger Ribonukleinsäure
<b>MYC</b>	Myelocytomatosis viral oncogene homolog
<b>n</b>	nano
<b>NANOG</b>	Homeobox transcription factor Nanog
<b>NSC</b>	Neural stem cells
<b>OCT4</b>	Octamer binding transcription factor 4

---

	POU5F1, POU class 5 homeobox 1
<b>ori</b>	Origin of Replication (Startpunkt der Replikation)
<b>PAX5</b>	Paired Box 5
<b>PBMC</b>	periphere mononukleäre Zellen (peripheral blood mononuclear cell )
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PCR</b>	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaktion)
<b>PD</b>	Population Doubling
<b>PI</b>	Propidium Iodid
<b>qPCR</b>	quantitative Real Time PCR
<b>RESC</b>	embryonale Stammzellen des Rhesusaffen (Rhesus monkey embryonic stem cells)
<b>REX 1</b>	ZFP42, zinc finger protein 42
<b>RI</b>	Rho Kinase Inhibitor
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure (Ribonucleicacid)
<b>RT</b>	Reverse Transkriptase
<b>SAHA</b>	Suberoylanilide Hydroxamic Acid
<b>SCID</b>	Severe Combined Immunodeficiency
<b>SDS</b>	sodium dodecyl sulfat, Natriumdodecylsulfat
<b>SIN</b>	Self-inactivating
<b>SOX17</b>	SRY (sex determining region Y)-box 17
<b>SOX2</b>	SRY (sex determining region Y)-box 2
<b>SPARC</b>	Secreted protein acidic cysteine-rich
<b>SR</b>	Serum Replacement
<b>SSEA</b>	Stage specific embryonic antigene
<b>T</b>	Thymin
<b>T<sub>A</sub></b>	Annealing Temperatur
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA
<b>TBX</b>	T-box proteins
<b>TERT</b>	Telomerase
<b>TGFβ</b>	Transforming Growth Factor beta
<b>TRA</b>	Tumor Rejection Antigen
<b>TSA</b>	Trichostatin A
<b>TTR</b>	Transthyretin
<b>TUBB3</b>	Tubulin, beta 3
<b>U</b>	Units, Einheiten
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>UTF1</b>	Undifferentiated Embryonic Cell Transcription Factor 1
<b>VECad</b>	Vascular Endothelial Cadherin
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>VPA</b>	Valproinsäure
<b>vWF</b>	von Willebrand Faktor



**x g** Vielfaches der Erdbeschleunigung  
 **$\alpha$ MHC** Alpha Myosin Heavy Chain  
**z. B.** zum Beispiel

## 7. LITERATUR

1. Mountford, J.C., *Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy*. Transfus Med, 2008. **18**(1): p. 1-12.
2. Mimeault, M., R. Hauke, and S.K. Batra, *Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies*. Clin Pharmacol Ther, 2007. **82**(3): p. 252-64.
3. Lindl, *Zell- und Gewebekultur: Von den Grundlagen zur Laborbank*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2008,, 2008.
4. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
5. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
6. Bradley, A., et al., *Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines*. Nature, 1984. **309**(5965): p. 255-6.
7. Cherny, R.A., et al., *Strategies for the isolation and characterization of bovine embryonic stem cells*. Reprod Fertil Dev, 1994. **6**(5): p. 569-75.
8. Notarianni, E., et al., *Derivation of pluripotent, embryonic cell lines from the pig and sheep*. J Reprod Fertil Suppl, 1991. **43**: p. 255-60.
9. Stranzinger, G.F., *Embryonic stem-cell-like cell lines of the species rat and Bovinae*. Int J Exp Pathol, 1996. **77**(6): p. 263-7.
10. Thomson, J.A., et al., *Isolation of a primate embryonic stem cell line*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(17): p. 7844-8.
11. Suemori, H., et al., *Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI*. Dev Dyn, 2001. **222**(2): p. 273-9.
12. Thomson, J.A., et al., *Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts*. Biol Reprod, 1996. **55**(2): p. 254-9.
13. Nichols, J., et al., *Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4*. Cell, 1998. **95**(3): p. 379-91.
14. Chambers, I., et al., *Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells*. Cell, 2003. **113**(5): p. 643-55.
15. Masui, S., et al., *Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(6): p. 625-35.
16. Ben-Shushan, E., et al., *Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(4): p. 1866-78.
17. Gesundheit, B.f., *Dritter Erfahrungsbericht der Bundesregierung über die Durchführung des Stammzellgesetzes 2010*.
18. Frankel, M.S., *In search of stem cell policy*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1397.
19. Smith, A.G., *Embryo-derived stem cells: of mice and men*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 435-62.
20. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
21. Jiang, Y., et al., *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow*. Nature, 2002. **418**(6893): p. 41-9.

22. Briggs, R. and T.J. King, *Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1952. **38**(5): p. 455-63.
23. Gurdon, J.B. and J.A. Byrne, *The first half-century of nuclear transplantation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8048-52.
24. Wilmut, I., et al., *Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells*. Nature, 1997. **385**(6619): p. 810-3.
25. Wakayama, T., et al., *Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer*. Science, 2001. **292**(5517): p. 740-3.
26. ESchG, *Bundesministerium der Justiz. Embryonenschutzgesetz vom 13. Dezember 1990 (BGBl. I S. 2746), das durch Artikel 22 des Gesetzes vom 23. Oktober 2001 (BGBl. I S. 2702) geändert worden ist*". 1990.
27. Miller, R.A. and F.H. Ruddle, *Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids*. Cell, 1976. **9**(1): p. 45-55.
28. Tada, M., et al., *Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells*. Curr Biol, 2001. **11**(19): p. 1553-8.
29. Do, J.T. and H.R. Scholer, *Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells*. Stem Cells, 2004. **22**(6): p. 941-9.
30. Do, J.T. and H.R. Scholer, *Comparison of neurosphere cells with cumulus cells after fusion with embryonic stem cells: reprogramming potential*. Reprod Fertil Dev, 2005. **17**(1-2): p. 143-9.
31. Cowan, C.A., et al., *Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells*. Science, 2005. **309**(5739): p. 1369-73.
32. Yu, J., et al., *Human embryonic stem cells reprogram myeloid precursors following cell-cell fusion*. Stem Cells, 2006. **24**(1): p. 168-76.
33. Kimura, H., et al., *Histone code modifications on pluripotential nuclei of reprogrammed somatic cells*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(13): p. 5710-20.
34. Matsumura, H., et al., *Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cells*. Nat Methods, 2007. **4**(1): p. 23-5.
35. Yamanaka, S., *Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(1): p. 39-49.
36. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
37. Okita, K., T. Ichisaka, and S. Yamanaka, *Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells*. Nature, 2007. **448**(7151): p. 313-7.
38. Wernig, M., et al., *In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state*. Nature, 2007. **448**(7151): p. 318-24.
39. Blelloch, R., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(3): p. 245-7.
40. Meissner, A., M. Wernig, and R. Jaenisch, *Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(10): p. 1177-81.
41. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
42. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-20.

43. Dalla-Favera, R., et al., *Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(24): p. 7824-7.
44. Pan, G.J., et al., *Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4*. Cell Res, 2002. **12**(5-6): p. 321-9.
45. Kirchhof, N., et al., *Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species*. Biol Reprod, 2000. **63**(6): p. 1698-705.
46. Ambrosetti, D.C., C. Basilico, and L. Dailey, *Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(11): p. 6321-9.
47. Mitsui, K., et al., *The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells*. Cell, 2003. **113**(5): p. 631-42.
48. Moss, E.G. and L. Tang, *Conservation of the heterochronic regulator Lin-28, its developmental expression and microRNA complementary sites*. Dev Biol, 2003. **258**(2): p. 432-42.
49. Richards, M., et al., *The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE*. Stem Cells, 2004. **22**(1): p. 51-64.
50. Balzer, E. and E.G. Moss, *Localization of the developmental timing regulator Lin28 to mRNP complexes, P-bodies and stress granules*. RNA Biol, 2007. **4**(1): p. 16-25.
51. Poleskaya, A., et al., *Lin-28 binds IGF-2 mRNA and participates in skeletal myogenesis by increasing translation efficiency*. Genes Dev, 2007. **21**(9): p. 1125-38.
52. Viswanathan, S.R., G.Q. Daley, and R.I. Gregory, *Selective blockade of microRNA processing by Lin28*. Science, 2008. **320**(5872): p. 97-100.
53. Wernig, M., et al., *c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(1): p. 10-2.
54. Kim, J.B., et al., *Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors*. Nature, 2008.
55. Huangfu, D., et al., *Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(11): p. 1269-75.
56. Kim, J.B., et al., *Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells*. Cell, 2009. **136**(3): p. 411-9.
57. Kaji, K., et al., *Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 771-5.
58. Soldner, F., et al., *Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors*. Cell, 2009. **136**(5): p. 964-77.
59. Woltjen, K., et al., *piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 766-70.
60. Yusa, K., et al., *Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon*. Nat Methods, 2009. **6**(5): p. 363-9.
61. Okita, K., et al., *Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors*. Science, 2008. **322**(5903): p. 949-53.
62. Stadtfeld, M., et al., *Induced pluripotent stem cells generated without viral integration*. Science, 2008. **322**(5903): p. 945-9.
63. Zhou, W. and C.R. Freed, *Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells*. Stem Cells, 2009. **27**(11): p. 2667-74.

64. Fusaki, N., et al., *Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2009. **85**(8): p. 348-62.
65. Yu, J., et al., *Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences*. Science, 2009. **324**(5928): p. 797-801.
66. Lin, S.L., et al., *Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state*. Rna, 2008. **14**(10): p. 2115-24.
67. Judson, R.L., et al., *Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(5): p. 459-61.
68. Zhou, H., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(5): p. 381-4.
69. Kim, D., et al., *Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(6): p. 472-6.
70. Hochedlinger, K. and K. Plath, *Epigenetic reprogramming and induced pluripotency*. Development, 2009. **136**(4): p. 509-23.
71. Aasen, T., et al., *Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(11): p. 1276-84.
72. Maherali, N., et al., *A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(3): p. 340-5.
73. Stadtfeld, M. and K. Hochedlinger, *Without a trace? PiggyBac-ing toward pluripotency*. Nat Methods, 2009. **6**(5): p. 329-30.
74. Feng, B., et al., *Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(2): p. 197-203.
75. Hanna, J., et al., *Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency*. Cell, 2008. **133**(2): p. 250-64.
76. Marson, A., et al., *Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(2): p. 132-5.
77. Mali, P., et al., *Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts*. Stem Cells, 2008. **26**(8): p. 1998-2005.
78. Park, I.H., et al., *Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors*. Nature, 2008. **451**(7175): p. 141-6.
79. Feldman, N., et al., *G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(2): p. 188-94.
80. Feng, B., et al., *Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(4): p. 301-12.
81. Choi, K.D., et al., *Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells*. Stem Cells, 2009. **27**(3): p. 559-67.
82. Schenke-Layland, K., et al., *Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages*. Stem Cells, 2008. **26**(6): p. 1537-46.
83. Narazaki, G., et al., *Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells*. Circulation, 2008. **118**(5): p. 498-506.
84. Haase, A., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood*. Cell Stem Cell, 2009. **5**(4): p. 434-41.
85. Mauritz, C., et al., *Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells*. Circulation, 2008. **118**(5): p. 507-17.
86. Zhang, J., et al., *Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells*. Circ Res, 2009. **104**(4): p. e30-41.

87. Taura, D., et al., *Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells*. FEBS Lett, 2009. **583**(6): p. 1029-33.
88. Maehr, R., et al., *Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(37): p. 15768-73.
89. Xie, C.Q., et al., *A comparison of murine smooth muscle cells generated from embryonic versus induced pluripotent stem cells*. Stem Cells Dev, 2009. **18**(5): p. 741-8.
90. Dimos, J.T., et al., *Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons*. Science, 2008. **321**(5893): p. 1218-21.
91. Ebert, A.D., et al., *Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient*. Nature, 2009. **457**(7227): p. 277-80.
92. Raya, A., et al., *Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells*. Nature, 2009. **460**(7251): p. 53-9.
93. Ye, L., et al., *Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(24): p. 9826-30.
94. Hanna, J., et al., *Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1920-3.
95. Wernig, M., et al., *Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(15): p. 5856-61.
96. Aoi, T., et al., *Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells*. Science, 2008.
97. Eminli, S., et al., *Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression*. Stem Cells, 2008. **26**(10): p. 2467-74.
98. Shi, Y., et al., *A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(6): p. 525-8.
99. Stadtfeld, M., K. Brennand, and K. Hochedlinger, *Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells*. Curr Biol, 2008. **18**(12): p. 890-4.
100. Wernig, M., et al., *A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(8): p. 916-24.
101. Liao, J., et al., *Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(1): p. 11-5.
102. Esteban, M.A., et al., *Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig*. J Biol Chem, 2009. **284**(26): p. 17634-40.
103. Wu, Z., et al., *Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system*. J Mol Cell Biol, 2009. **1**(1): p. 46-54.
104. Liu, H., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(6): p. 587-90.
105. Ono, T., et al., *Mutation theory of aging, assessed in transgenic mice and knockout mice*. Mech Ageing Dev, 2002. **123**(12): p. 1543-52.
106. Trifunovic, A. and N.G. Larsson, *Mitochondrial dysfunction as a cause of ageing*. J Intern Med, 2008. **263**(2): p. 167-78.
107. Link, H., et al., *[Transplantation of hematopoietic stem cells. I: Definitions, principle indications, complications]*. Med Klin (Munich), 1997. **92**(8): p. 480-91, 505.

108. Murohara, T., et al., *Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization*. J Clin Invest, 2000. **105**(11): p. 1527-36.
109. Imhof, *Die Stammzelle aus der Nabelschnur-Gewinnung, Verarbeitung, Lagerung, Verwendung*. Speculum-Zeitschrift für Gynäkologie und Geburtshilfe, 2001. **19**(1): p. 13-17.
110. Rocha, V., et al., *Pediatric related and unrelated cord blood transplantation for malignant diseases*. Bone Marrow Transplant, 2009. **44**(10): p. 653-9.
111. Gluckman, E., et al., *Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling*. N Engl J Med, 1989. **321**(17): p. 1174-8.
112. Laughlin, M.J., *Umbilical cord blood for allogeneic transplantation in children and adults*. Bone Marrow Transplant, 2001. **27**(1): p. 1-6.
113. Ingram, D.A., et al., *Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2752-60.
114. Gehling, U.M., et al., *In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells*. Blood, 2000. **95**(10): p. 3106-12.
115. Stocking, C., et al., *Identification of genes involved in growth autonomy of hematopoietic cells by analysis of factor-independent mutants*. Cell, 1988. **53**(6): p. 869-79.
116. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures*. Nat Protoc, 2007. **2**(12): p. 3081-9.
117. Schwanke, K., et al., *Generation and characterization of functional cardiomyocytes from rhesus monkey embryonic stem cells*. Stem Cells, 2006. **24**(6): p. 1423-32.
118. Hotta, A. and J. Ellis, *Retroviral vector silencing during iPS cell induction: an epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states*. J Cell Biochem, 2008. **105**(4): p. 940-8.
119. Pfeifer, A., et al., *Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(4): p. 2140-5.
120. Balasubramanian, S., et al., *Non cell-autonomous reprogramming of adult ocular progenitors: generation of pluripotent stem cells without exogenous transcription factors*. Stem Cells, 2009. **27**(12): p. 3053-62.
121. Brambrink, T., et al., *Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(2): p. 151-9.
122. Jaenisch, R. and R. Young, *Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming*. Cell, 2008. **132**(4): p. 567-82.
123. Papapetrou, E.P., et al., *Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(31): p. 12759-64.
124. Stadtfeld, M., et al., *Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(3): p. 230-40.
125. Park, I.H., et al., *Disease-specific induced pluripotent stem cells*. Cell, 2008. **134**(5): p. 877-86.
126. Ellis, J., *Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors*. Hum Gene Ther, 2005. **16**(11): p. 1241-6.
127. Yao, S., et al., *Retrovirus silencing, variegation, extinction, and memory are controlled by a dynamic interplay of multiple epigenetic modifications*. Mol Ther, 2004. **10**(1): p. 27-36.

128. Swindle, C.S., H.G. Kim, and C.A. Klug, *Mutation of CpGs in the murine stem cell virus retroviral vector long terminal repeat represses silencing in embryonic stem cells.* J Biol Chem, 2004. **279**(1): p. 34-41.
129. Hsu, L.Y., et al., *Proposed guidelines for diagnosis of chromosome mosaicism in amniocytes based on data derived from chromosome mosaicism and pseudomosaicism studies.* Prenat Diagn, 1992. **12**(7): p. 555-73.
130. Imreh, M.P., et al., *In vitro culture conditions favoring selection of chromosomal abnormalities in human ES cells.* J Cell Biochem, 2006. **99**(2): p. 508-16.
131. Prasad, S.M., et al., *Continuous hypoxic culturing maintains activation of Notch and allows long-term propagation of human embryonic stem cells without spontaneous differentiation.* Cell Prolif, 2009. **42**(1): p. 63-74.
132. He, J.Q., et al., *Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization.* Circ Res, 2003. **93**(1): p. 32-9.



## LEBENS LAUF

### Zu meiner Person

Alexandra Haase  
geboren am 24.08.1975 in Göttingen  
verheiratet, 2 Kinder (2004, 2009)

### Schulischer Werdegang

1982 – 1995                      Integrierte Gesamtschule Hannover Roderbruch  
Abschluss: Abitur

### Studium

Oktober 1996 – März 2004                      Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover,  
Studium Biologie  
Abschluss: Diplombiologin  
Thema der Diplomarbeit: Herstellung lentiviraler  
Vektoren für die Transduktion von embryonalen  
Stammzellen: pLentiShuttle-hANloxCMVloxhGW und  
pLentiShuttle-Oct/SoxamerTKhGW

Oktober 2005 –                      Promotion in den Leibniz Forschungslaboratorien für  
Biotechnologie und künstliche Organe -LEBAO- der  
Medizinischen Hochschule Hannover  
Thema: Herstellung von humanen induzierten  
pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) aus  
Nabelschnurblut

## Veröffentlichungen

Publikationen:

### **Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from human cord blood**

*Alexandra Haase, Ruth Olmer, Kristin Schwanke, Stephanie Wunderlich, Sylvia Merkert, Christian Hess, Robert Zweigerdt, Johann Meyer, Stefan Wagner, Lars S Maier, Dong Wook Han, Silke Glage, Konstantin Miller, Phillip Fischer, Hans R Schöler, Ulrich Martin*  
Cell Stem Cell. 2009, Oct 2; 5(4):434-41

### **Long term expansion of undifferentiated human iPS and ES cells in suspension culture using a defined medium**

*Ruth Olmer, Alexandra Haase, Sylvia Merkert, Wei Cui, Jiri Palecek, Chen Ran, Andreas Kirschning, Thomas Scheper, Silke Glage, Konstantin Miller, Eliza C. Curnow, Eric S. Hayes, Ulrich Martin*  
Stem Cell Research in Press

Abstracts:

### **Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from adult fibroblasts and cord blood derived endothelial cells**

*A. Haase, K. Schwanke, R. Olmer, T. Schnick, J. Meyer, K. Miller, S. Schubert, J. Beier, U. Martin*  
3rd International Congress on Regenerative Biology and Medicine – BIOSTAR 2008 and 3<sup>rd</sup> Congress of the German Society of Stem Cell Research, Stuttgart

### **Human OCT3/4 promotor dependent lentiviral transgene expression for simplified monitoring of primate embryonic stem cell cultures.**

*Ruth Olmer, Alexandra Haase, Sylvia Merkert, Kristin Schwanke, Eric Hayes, Wei Cui, Ulrich Martin*  
3rd International Congress on Regenerative Biology and Medicine – BIOSTAR 2008 and 3<sup>rd</sup> Congress of the German Society of Stem Cell Research, Stuttgart

### **Differentiation of human cord blood derived induced pluripotent stem (iPS) cells into functional cardiomyocytes**

*Alexandra Haase, Kristin Schwanke, Ruth Olmer, Ina Gruh, Robert Zweigerdt, Philipp Fischer, Johann Meyer, Thomas Meyer, Dong Wook Hang, Sylvia Merkert, Christian Hess, Stefanie Wunderlich, Konstantin Miller, Tilman Schnick, Ulrich Martin*  
Dutch-German Joint Meeting of Molecular Cardiology 2009 Hamburg

### **Expansion of primate embryonic stem cells in suspension monitored by human OCT3/4 promotor dependent transgene expression**

*Ruth Olmer, Alexandra Haase, Sylvia Merkert, Kristin Schwanke, Eric Hayes, Wei Cui, Ulrich Martin*  
Dutch-German Joint Meeting of Molecular Cardiology 2009 Hamburg

**Differentiation of human cord blood derived induced pluripotent stem (iPS) cells into functional cardiomyocytes**

*Alexandra Haase, Ruth Olmer, Kristin Schwanke, Stephanie Wunderlich, Sylvia Merkert, Christian Hess, Ina Gruh, Robert Zweigerdt, Johann Meyer, Stefan Wagner, Lars S. Maier, Thomas Meyer, Dong Wook Han, Silke Glage, Konstantin Miller, Phillip Fischer, Hans R. Schöler & Ulrich Martin*

5th International Meeting of the Stem Cell Network NRW 2009, Aachen

**Expansion of undifferentiated human iPS and humane ES cells in suspension culture using a largely defined medium**

*Ruth Olmer, Alexandra Haase, Sylvia Merkert, Kristin Schwanke, Eric Hayes, Wei Cui, Ulrich Martin*

5th International Meeting of the Stem Cell Network NRW 2009, Aachen

**Differentiation of human cord blood derived induced pluripotent stem (iPS) cells into functional cardiomyocytes**

*Alexandra Haase, Kristin Schwanke, Ruth Olmer, Ina Gruh, Robert Zweigerdt, Philipp Fischer, Johann Meyer, Thomas Meyer, Dong Wook Han, Sylvia Merkert, Christian Hess, Stephanie Wunderlich, Konstantin Miller, Tilmann Schnick, Hans Schöler & Ulrich Martin*

Heart Failure Winter Meeting Les Diablerets, Schweiz 2009

**Differentiation of human cord blood-derived induced pluripotent stem (iPS) cells into functional cardiomyocytes**

*Alexandra Haase, Ruth Olmer, Kristin Schwanke, Stephanie Wunderlich, Sylvia Merkert, Christian Hess, Ina Gruh, Robert Zweigerdt, Johann Meyer, Stefan Wagner, Lars S. Maier, Thomas Meyer, Dong Wook Han, Silke Glage, Konstantin Miller, Phillip Fischer, Hans R. Schöler & Ulrich Martin*

Meeting of the International Society of Stem Cell Research, 2009, Barcelona

**Expansion of undifferentiated human iPS/ES cells in suspension culture using a largely defined medium**

*Ruth Olmer, Alexandra Haase, Sylvia Merkert, Kristin Schwanke, Robert Zweigerdt, Wei Cui, Ulrich Martin*

Meeting of the International Society of Stem Cell Research, 2009, Barcelona

## DANKSAGUNG

Ich möchte Prof. Dr. Ulrich Martin für die Vergabe des Themas dieser Arbeit, die Möglichkeit diese im LEBAO anfertigen zu können und die sehr gute Betreuung während der Promotion herzlich danken.

Bei Prof. Dr. Ngezahayo bedanke ich mich für die Übernahme der Begutachtung meiner Promotion.

Ein besonderes Dankeschön geht an Dr. Ruth Olmer, ohne deren Hilfe diese Arbeit und die zugehörige Veröffentlichung wohl nicht zustande gekommen wäre! Danke Ruth, für das ständige „in die Bresche springen“ und auch für die schöne Zeit auf Kongressen und außerhalb der Arbeitszeit.

Dr. Christian Hess, Sylvia Merkert, Dr. Kristin Schwanke und Dr. Stephanie Wunderlich danke ich für deren arbeitsintensiven Anteil an dem „Gemeinschaftspaper“ und dieser Arbeit.

Für die Unterstützung im Labor danke ich zudem noch Jenny und Sarah.

Mein Dank gilt außerdem Sandra, Ina, Sabrina, Moni, Christina, Tilman, Katherina, Susann, Julia, Anke, George, David, Ingrid, Angelica, Mirela, Ines, Karin, Sebastian, Robert und allen anderen LEBAOanern für das angenehme Arbeitsklima.

Weiterhin danke ich allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: Dr. Johann Meyer, Prof. Konstantin Miller, Dong Wook Han, Silke Glage, Christian Rathert.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie –meinem Mann Ingo und meinen Kindern Klara-Marie und Linus– für die Unterstützung danken und dafür, dass sie meine häufige Abwesenheit während der gesamten Promotionszeit, auch am Wochenende, ertragen haben. Ein großes Dankeschön geht auch an Siegfried Wahl für das Korrekturlesen der Arbeit.

**DANKESCHÖN !!!!!**

## ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation

**„Herstellung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) aus Nabelschnurblut“**

selbstständig verfasst habe und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover im Oktober 2010

-----  
Alexandra Haase