

Reprogrammierung von humanen Fibroblasten mit unmodifizierten mRNA-Molekülen

Dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

eingereichte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Diplombiologin Antje Arnold

geboren am 18.02.1979 in Wurzen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Tilman Grune
Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke
Arthur-Scheunert-Allee 114-116
14558 Nuthetal
2. Prof. Dr. Ina Bergheim
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Institut für Ernährungswissenschaften
Dornburger Str. 29
07743 Jena
3. PD Dr. Jarek Maciaczyk
Universitätsklinikum Düsseldorf
Funktionelle Neurochirurgie und Stereotaxie
Moorenstr. 5
40225 Düsseldorf

Tag der Disputation: 23. September 2015

Above all, don't fear difficult moments.

The best comes from them.

Rita Levi-Montalcini (1909-2012)

I Inhaltsverzeichnis

<u>I Inhaltsverzeichnis</u>	I
<u>II Abbildungsverzeichnis</u>	VII
<u>III Tabellenverzeichnis</u>	IX
<u>IV Abkürzungsverzeichnis</u>	XI
<u>1 Zusammenfassung/Summary</u>	1
1.1 Zusammenfassung.....	1
1.2 Summary.....	3
<u>2 Einleitung</u>	6
2.1 Stammzellen – Grundlage für die regenerative Medizin.....	6
2.2 Allgemeine Klassifizierung von Stammzellen.....	7
2.2.1 Totipotente Stammzellen.....	7
2.2.2 Pluripotente Stammzellen.....	7
2.2.3 Multipotente Stammzellen.....	8
2.2.4 Unipotente Stammzellen.....	8
2.3 Pluripotente Stammzellen.....	8
2.3.1 Embryonale Stammzellen.....	8
2.3.2 Induzierte pluripotente Stammzellen.....	10
2.3.3 Vor- und Nachteile induzierter pluripotenter Stammzellen gegenüber embryonalen Stammzellen.....	13
2.4 Reprogrammierungsmethoden zur Generierung induzierter pluripotenter Stammzellen.....	14
2.4.1 Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen durch Retrovirale Partikel.....	14
2.4.2 Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen durch lentivirale Partikel.....	15
2.5 Transfektionsmethoden.....	15
2.5.1 mRNA Transfektionen.....	18
2.5.2 Zytotoxische Effekte durch <i>in vitro</i> transkribierte-mRNA bei Transfektion.....	19
2.5.2 Zytotoxische Effekte durch <i>in vitro</i> transkribierte-mRNA bei Transfektion.....	19
2.6 Optionen zur Zelltherapie der Huntington'schen Erkrankung mit Hilfe von mRNA-iPS-Zellen.....	19
2.7 Zielstellung.....	21
<u>3 Methoden</u>	22
3.1 Zellbiologische Methoden.....	22
3.1.1 Allgemeine zellbiologische Methoden.....	22
3.1.1.1 Kultivierung von Zelllinien und primäre Zellen.....	22
3.1.1.2 Kryokonservierung und Revitalisierung von eukaryotischen Zellen.....	22
3.1.1.3 Zellzählung.....	23
3.1.2 Zellkultur von humanen pluripotenten Stammzellen.....	23

I Inhaltsverzeichnis

3.1.2.1	Zellquellen und Ethikvoten.....	23
3.1.2.2	Fibroblasten für die humane iPS-Zellkultur.....	24
3.1.2.2.1	Präparation von primären humanen Fibroblasten aus Vorhautbiopsien.....	24
3.1.2.1.2	Isolierung von primären murinen Fibroblasten.....	24
3.1.2.3	Mitotische Inaktivierung von Fibroblasten.....	25
3.1.2.3.1	Mitotische Inaktivierung von humanen Fibroblasten durch γ -Bestrahlung.....	25
3.1.2.3.2	Mitotische Inaktivierung von humanen Fibroblasten durch Mitomycin C.....	25
3.1.3	Generierung von humanen iPS-Zellen.....	25
3.1.3.1	Generierung von iPS-Zellen durch retrovirale Transduktion.....	25
3.1.3.2	Herstellung von iPS-Zellen durch mRNA-Transfektion.....	26
3.1.3.2.1	Transfektion von mRNA durch Elektroporation.....	26
3.1.3.2.2	mRNA Transfektion mit FuGENE [®] HD, PEI – Exgene 500 und <i>TransIT[®]-mRNA Transfection Kit</i>	27
3.1.4	Humane iPS-Zellkultur.....	29
3.1.4.1	Vorbereitung von Feederzellschalen für die Kultivierung von humanen iPS-Zellen.....	29
3.1.4.2	Entfernung von differenzierten Kolonien oder differenzierten Zelle innerhalb von iPS-Kolonien.....	29
3.1.4.3	Passagieren humaner iPS-Zellen.....	29
3.1.4.3.1	Manuelles Passagieren von iPS-Kolonien.....	30
3.1.4.3.2	Enzymatisches Passagieren von iPS-Zellen mit Kollagenase IV.....	30
3.1.5	Zellbiologische Analysemethoden.....	30
3.1.5.1	Multikeimblattdifferenzierung humaner iPS-Zellen durch spontane EB-Formierung.....	30
3.1.5.2	Direkte <i>in vitro</i> Differenzierung humaner iPS-Zellen als Zellrasen.....	31
3.1.6	MTT-Test.....	31
3.1.6.1	Prinzip des MTT-Tests.....	31
3.1.6.2	Durchführung des MTT-Tests.....	32
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	32
3.2.1	Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien.....	32
3.2.2	Transformation von chemisch kompetenten Bakterien.....	32
3.2.3	Kryokonservierung von Bakterien.....	33
3.2.4	Plasmidpräparation.....	33
3.2.5	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	33
3.2.6	<i>In vitro</i> -Transkription.....	34
3.2.7	Isolierung von Gesamt-RNA durch Phenol-Chloroform Fällung.....	34
3.2.8	Isolierung von genomischer DNA durch Phenol-Chloroform Fällung.....	34
3.2.9	DNase I-Verdau und cDNA-Synthese.....	34
3.2.10	PCR und qPCR.....	35
3.2.10.1	PCR.....	35

I Inhaltsverzeichnis

3.2.10.2	qPCR.....	35
3.2.11	Aufreinigung von PCR-Produkten und linearisierten Plasmiden.....	35
3.3	Analytische Methoden.....	35
3.3.1	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen und Integritätsprüfung.....	35
3.3.2	Qualitätsüberprüfung der <i>in vitro</i> transkribierten mRNA.....	36
3.3.3	Gelelektrophorese.....	36
3.3.4	Histochemischer Nachweis endogener alkalischer Phosphataseaktivität.....	37
3.3.5	Immunzytochemische Färbungen.....	37
3.3.5.1	Fixierung und Färbung von Zellen in Zellkulturplatten.....	37
3.3.6	Durchflusszytometrie.....	37
3.3.6.1	Immunfluoreszenzfärbung für die durchflusszytometrische Analyse.....	38
3.3.7	Teratombildung.....	38
3.3.8	Karyotypisierung.....	38
3.3.9	Bestimmung der Telomeraseaktivität und Telomerlängen durch qPCR.....	39
3.3.9.1	Quantifizierung der Telomeraseaktivität.....	39
3.3.9.2	Quantifizierung der Telomerlängen.....	40
3.3.10	Genexpressionsanalyse mit Hilfe von Gene-Chips.....	41
3.3.11	ELISA.....	42
3.4	Statistische Analysen.....	42
4	<u>Ergebnisse</u>	43
4.1	Etablierung von Methoden zur Kultivierung humaner pluripotenter Stammzellen.....	43
4.1.1	Generelle Methoden zur pluripotenten Stammzellkultivierung und Einfluss der Feederzellen.....	43
4.1.2	Passagieren von humanen iPS-Zellen.....	43
4.2	Herstellung von humanen viralen iPS-Zellen.....	45
4.3	Pluripotenzcharakterisierung.....	48
4.3.1	Nachweis der alkalischen Phosphataseaktivität.....	48
4.3.2	Immunzytochemischer Nachweis der Pluripotenz.....	49
4.3.3	Direkte Differenzierung von viralen iPS-Zellen in alle drei Keimblätter.....	50
4.4	Herstellung von iPS-Zellen über gerichtete mRNA-Transfektion.....	52
4.4.1	Konstruktion der Plasmidvektoren für die <i>in vitro</i> -Transkription.....	52
4.4.2	Herstellung der Templates für die <i>in vitro</i> -Transkription.....	53
4.4.3	<i>In vitro</i> -Transkription.....	55
4.4.4	Überprüfung der Qualität der <i>in vitro</i> -transkribierten mRNA.....	55
4.4.5	mRNA Transfektion zur Generierung von mRNA-iPS-Zellen.....	57
4.5	Pluripotenzüberprüfung der mRNA-iPS-Zellen.....	60
4.5.1	Nachweis der alkalischen Phosphataseaktivität in mRNA-iPS-Kolonien.....	60

I Inhaltsverzeichnis

4.5.2	Immunzytochemischer Nachweis von Pluripotenzmarkern.....	61
4.5.3	Spontane Differenzierung in Embryoid Bodies.....	62
4.5.4	Direkte Differenzierung in alle drei Keimblätter.....	64
4.5.5	Teratomnachweis.....	65
4.5.6	Karyotypanalyse von viral und mRNA hergestellten humanen iPS-Zellen.....	66
4.5.7	qPCR auf Pluripotenzmarker.....	67
4.5.8	Bestimmung von Telomerlängen.....	71
4.5.9	Bestimmung der Telomeraseaktivität.....	73
4.5.10	Genearray.....	74
4.6	Alternative Transfektionsreagenzien für nachfolgende mRNA- Reprogrammierungsexperimente.....	78
4.6.1	Primäre Zellschäden durch transfizierte IVT-mRNA.....	79
4.6.2	Nachweis der Pluripotenzproteine direkt nach mRNA-Transfektionen.....	80
4.6.3	Vergleich der Zelltoxizität bezogen auf die Transfektionsreagenzien.....	82
4.6.4	Detektion von Interferon β nach mRNA-Transfektion.....	83
<u>5 Diskussion.....</u>		86
5.1	Fragestellungen der Arbeit.....	86
5.2	Kritische Beurteilungen zur Etablierung der humanen pluripotenten Stammzellkultur.....	86
5.2.1	Etablierung der humanen pluripotenten Stammzellkultur.....	87
5.2.2	Etablierung der humanen pluripotenten Stammzellkultivierung.....	87
5.2.2.1	Passagierung.....	87
5.2.2.2	Anforderungen an die allgemeinen Kultivierungsbedingungen.....	88
5.3	Generierung von humanen viralen iPS-Zellen.....	89
5.3.1	Etablierung von neuen Reprogrammierungsprotokollen für virale iPS-Zellen aus Fibroblasten von Huntingtonpatienten.....	89
5.3.1.1	Retrovirale Transduktion.....	89
5.3.1.2	Einfluss der Faktoren Oct4, Sox2, Klf4, Nanog, cMyc und hTERT auf die Reprogrammierungszeit.....	90
5.3.1.3	Nicht-pluripotente Zellarten während der Etablierungsphase zur stabilen viralen iPS-Zelllinie.....	91
5.4	Virale iPS-Zellen zeigen Charakteristika der Pluripotenz.....	92
5.4.1	Alkalische Phosphataseaktivität in viralen iPS-Zellen.....	92
5.4.2	Expression von Pluripotenzproteinen in viralen iPS-Zellen.....	93
5.4.3	Direkte Differenzierung von viralen iPS-Zellen in alle drei Keimblätter.....	93
5.4.4	Einflüsse auf die Differenzierungseffizienz viraler iPS-Zellen.....	94
5.5	Gerichtete mRNA-Transfektionen zur Herstellung von mRNA-iPS-Zellen.....	95
5.5.1	Etablierung des mRNA-Transfektionsprotokolls.....	97
5.5.2	Einfluss der Faktorenkombination auf die Entstehung potenzieller mRNA-iPS- Kolonien.....	99

I Inhaltsverzeichnis

5.6	Beurteilung der potenziellen mRNA-iPS-Zellen auf Pluripotenz.....	100
5.7	Partiell reprogrammierte mRNA-iPS-Zellen im direkten Vergleich zu viralen iPS-Zellen.....	103
5.7.1	Pluripotenzanalyse mittels qPCR.....	103
5.7.2	Genearray-Analyse von stammzellspezifischen Genen.....	104
5.7.3	Telomerlängen und Telomraseaktivität.....	107
5.8	Kritische Beurteilung zu nicht-integrierenden Reprogrammierungsmethoden.....	109
5.8.1	Episomale Vektoren.....	109
5.8.2	Direkte Proteintransfektion.....	109
5.8.3	Sendai-Virus.....	110
5.8.4	mRNA-Transfektionen mit modifizierten mRNA-Molekülen.....	110
5.9	Optimierungen der mRNA-Transfektionsbedingungen für folgende Projekte.....	111
5.9.1	Auswirkungen der einzelnen Reprogrammierungsfaktoren auf das Zellwachstum.....	111
5.9.2	Proteinstabilität von analysierten Pluripotenzfaktoren.....	112
5.9.3	Alternative Transfektionsmittel im Vergleich.....	113
5.9.4	Einfluss der mRNA-Transfektion auf die angeborene Immunantwort.....	114
5.10	Schlussfolgerung.....	114
5.11	Ausblick.....	116
	<u>6 Literaturangaben</u>	117
	<u>7 Anhang</u>	XV
7.1	Technische Ausstattung und Zubehör.....	XV
7.2	Verbrauchsmaterial und Hilfsmittel.....	XVI
7.3	Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Lösungen.....	XVII
7.3.1	Zusammensetzung von Puffern und Lösungen.....	XVIII
7.4	Standards und Farbstoffe.....	XX
7.5	Zellen und Kulturmedien.....	XX
7.5.1	Zellen und Bakterien.....	XX
7.5.2	Medien und Zusätze.....	XXI
7.5.3	Zusammensetzung von Kultivierungsmedien und Induktionsmedien.....	XXII
7.6	Plasmide.....	XXIII
7.7	Kits.....	XXIV
7.8	Enzyme.....	XXV
7.9	Antikörper.....	XXV
7.10	Oligonukleotide.....	XXVI
7.11	Darstellung von Vorlagen für die <i>in vitro</i> -Transkription.....	XXVII
7.11.1	Linearisierung von IVT_Plasmiden als Vorlage für die IVT.....	XXVII
7.11.2	PCR-Produkt als Vorlage für die IVT.....	XXVII
7.12	DNase I-Verdau und RT-PCR.....	XXVIII

I Inhaltsverzeichnis

7.12.1	DNase I-Verdau.....	XXVIII
7.12.2	RT-PCR.....	XXVIII
7.13	qPCR zur Expressionsbestimmung der Pluripotenzfaktoren.....	XXIX
7.14	Telomeraseaktivitätsbestimmung mittels qPCR.....	XXX
7.15	Telomerlängenbestimmung mittels qPCR.....	XXX
7.16	Gene-Array-Daten des Dreiklassenvergleichs.....	XXXII
7.17	Wissenschaftlicher Werdegang.....	L
7.18	Eigenständigkeitserklärung.....	LIII
7.19	Danksagung.....	LIV

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1:	Hierarchische Entwicklung von humanen Stammzellen.....	7
Abb. 2.2:	Spontane Differenzierung von pluripotenten Stammzellen in differenzierte Zellen.....	9
Abb. 2.3:	Molekularer Kreislauf während des Reprogrammierungsprozesses.....	15
Abb. 4.1:	Virale iPS-Zellen während der Etablierung von Kultivierungsbedingungen.....	44
Abb. 4.2:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Transduktionseffizienzen in humanen Vorhautfibroblasten.....	45
Abb. 4.3:	Vergleich der Fibroblastenmorphologie und iPS-Zellmorphologie.....	46
Abb. 4.4:	Morphologische Veränderungen in der Etablierungsphase von humanen viralen iPS-Zellen.....	47
Abb. 4.5:	Morphologische Veränderungen innerhalb der pluripotenten Stammzellkultur während der Entwicklung zu einer stabilen viralen iPS-Zelllinie.....	48
Abb. 4.6:	Nachweis der alkalischen Phosphataseaktivität in humanen viralen iPS-Zellen.....	48
Abb. 4.7:	Immunzytochemische Pluripotenzcharakterisierung von viralen iPS-Zellen....	49
Abb. 4.8:	Immunzytochemische Charakterisierung von proliferierenden humanen adulten Fibroblasten auf Pluripotenzmarker.....	50
Abb. 4.9:	Immunzytochemische Charakterisierung nach direkter Differenzierung von viralen iPS-Zellen in alle drei Keimblätter.....	51
Abb. 4.10:	Klonierungsschema für den IVT-Vektor pcDNA3_hTERT.....	52
Abb. 4.11:	1%iges analytisches Agarosegelbild zur Überprüfung der Linearisierung der Plasmide für die IVT und deren ungeschnittene Ausgangsformen.....	53
Abb. 4.12:	Schema zur PCR-Amplifikation von hTERT einschließlich T7-RNA-Promotor.....	54
Abb. 4.13:	1%iges analytisches Agarosegelbild der PCR zur Vervielfältigung des Transgens hTERT.....	54
Abb. 4.14:	Elektropherogramme zur Qualitätsüberprüfung der IVT-mRNA am Bioanalyser.....	56
Abb. 4.15:	Fluoreszenz- und durchlichtmikroskopische Aufnahmen zur Bestimmung der Transfektionseffizienzen.....	57
Abb. 4.16:	Ablauf des mRNA-Transfektionsprozesses.....	58
Abb. 4.17:	Durchlichtmikroskopische Aufnahmen zur Beurteilung mRNA-iPS-Zellmorphologie auf unterschiedlichen Passagestufen.....	59
Abb. 4.18:	Auszählung von potenziellen mRNA-iPS-Kolonien nach dem ersten Passagieren von mRNA transfizierten Zellen auf Feederzellen.....	60
Abb. 4.19:	Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von AP-gefärbten mRNA-iPS-Kolonien auf humanen Feederzellen zur Überprüfung der Pluripotenz.....	61
Abb. 4.20:	Immunfluoreszenzmikroskopische Pluripotenzcharakterisierung von generiert mRNA-iPS-Kolonien generiert aus humanen adulten Fibroblasten...	61
Abb. 4.21:	Spontane Differenzierung in EBs von potenziellen mRNA-iPS-Zellen generiert aus humanen adulten Fibroblasten.....	63

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.22:	Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse nach direkter Differenzierung von mRNA-iPS-Zellen in alle drei Keimblätter.....	65
Abb. 4.23:	G-Bänderung zur Karyotypanalyse von viralen und potenziellen mRNA-iPS-Zellen.....	66
Abb. 4.24:	Expression von Oct4 nach mRNA-Transfektionen und viraler Transduktion....	67
Abb. 4.25:	Expression von Nanog nach mRNA-Transfektionen und viraler Transduktion.....	68
Abb. 4.26:	Expression von Sox2 nach mRNA-Transfektionen und viraler Transduktion...	69
Abb. 4.27:	Expression von Klf4 nach mRNA-Transfektionen und viraler Transduktion.....	70
Abb. 4.28:	Expression von cMyc nach mRNA-Transfektionen und viraler Transduktion...	71
Abb. 4.29:	Telomerlängenanalyse nach mRNA-Transfektionen und viraler Transduktion.....	72
Abb. 4.30:	Bestimmung der Telomeraseaktivität.....	73
Abb. 4.31:	Genearray-Expressionsanalyse.....	74
Abb. 4.32:	Dreiklassenvergleich zwischen Fibroblasten des Huntingtonpatienten, den daraus abgeleiteten, potenziellen mRNA-iPS-Zellen und humanen ES-Zellen.....	75
Abb. 4.33:	Ermittlung der optimalen mRNA-Transfektionsbedingungen für den <i>TransIT[®]-mRNA Transfection Kit</i>	79
Abb. 4.34:	Auswirkungen von mRNA-Transfektionen einzelner Reprogrammierungsfaktoren auf das Zellwachstum von Vorhautfibroblasten.....	80
Abb. 4.35:	Ermittlung der optimalen mRNA-Transfektionsbedingungen für PEI – Exgene 500 Kit.....	82
Abb. 4.36:	Bestimmung der Zellvitalität nach mRNA-Transfektionen mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien.....	83
Abb. 4.37:	Detektion INF β in Medienüberständen nach mRNA-Transfektionen.....	84
Abb. 5.1:	Schematische Darstellung des mRNA-Transfektionsablaufs und mögliche endogene transkriptionelle Veränderung der Spenderzellen hin zu iPS-Zellen.....	98
Abb. 5.2:	Formierung von dreidimensionalen Aggregaten aus potenziellen mRNA-iPS-Zellen aus Vorhautfibroblasten.....	102

III Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Übersicht über die derzeit wichtigsten Transfektionsmethoden.....	16
Tab. 3.1:	Übersicht über die Transfektionsprozesse mit IVT-mRNA.....	28
Tab. 4.1:	Auswahl von hochregulierten Genen in potenziellen mRNA-iPS-Zellen im Vergleich zu ihren Spenderfibroblasten.....	76
Tab. 4.2:	Auswahl von hochregulierten Genen in potenziellen mRNA-iPS-Zellen im Vergleich zu humanen ES-Zellen.....	77
Tab. 4.3:	Proteinexpression der mit mRNA-kodierenden Reprogrammierungsfaktoren transfizierten humanen Vorhautfibroblasten.....	81
Tab. 7.1:	Technische Ausstattung und Zubehör.....	XV
Tab. 7.2:	Material und Hilfsmittel.....	XVI
Tab. 7.3:	Chemikalien und Reagenzien.....	XVII
Tab. 7.4:	Zusammensetzung von Puffern und Lösungen.....	XVIII
Tab. 7.5:	Standards und Farbstoffe.....	XX
Tab. 7.6:	Zellen und Bakterien.....	XX
Tab. 7.7:	Medien und Zusätze.....	XXI
Tab. 7.8:	Zusammensetzung von Kultivierungsmedien und Induktionsmedien.....	XXII
Tab. 7.9:	Plasmide.....	XXIII
Tab. 7.10:	Kits.....	XXIV
Tab. 7.11:	Transfektionsreagenzien und Transfektionskits.....	XXIV
Tab. 7.12:	<i>In Vitro</i> Transkriptions Kits.....	XXIV
Tab. 7.13:	Enzyme.....	XXV
Tab. 7.14:	Antikörper.....	XXV
Tab. 7.15:	Primer.....	XXVI
Tab. 7.16:	Restriktionsverdaubedingungen zur Linearisierung der IVT_Plasmide.....	XXVII
Tab. 7.17:	Allgemeines Pipettierschema zum Restriktionsverdau der IVT_Plasmide.....	XXVII
Tab. 7.18:	PCR-Pipettierschema zur Amplifikation des PCR-Produktes hTERT.....	XXVII
Tab. 7.19:	PCR-Reaktionsbedingungen für die Amplifikation von hTERT.....	XXVIII
Tab. 7.20:	Pipettierschema des DNase I Verdaus.....	XXVIII
Tab. 7.21:	Pipettierschema der Prä-Annealing RT-PCR-Reaktion.....	XXVIII
Tab. 7.22:	Pipettierschema der RT-PCR.....	XXIX
Tab. 7.23:	Pipettierschema für die qPCR.....	XXIX
Tab. 7.24:	qPCR-Reaktionsbedingungen.....	XXIX
Tab. 7.25:	Pipettierschema für Telomeraseaktivitätsbestimmung mit Hilfe der qPCR.....	XXX
Tab. 7.26:	qPCR-Reaktionsbedingungen zur Ermittlung der Telomeraseaktivität.....	XXX
Tab. 7.27:	Pipettierschema zur Telomerlängenbestimmung mit Hilfe einer qPCR.....	XXX
Tab. 7.28:	qPCR-Reaktionsbedingungen für die Telomerlängenbestimmung mittels qPCR.....	XXXI
Tab. 7.29:	Pipettierschema für humanes 36B4 als Referenzgen zur Telomerlängenbestimmung.....	XXXI
Tab. 7.30:	PCR-Bedingung für humanes 36B4 als Referenzgen zur Telomerlängenbestimmung.....	XXXI

III Tabellenverzeichnis

Tab. 7.31:	Daten des Dreiklassenvergleichs der potenziellen mRNA- iPS-Zellen zu den Fibroblasten des männlichen Huntingtonpatienten.....	XXXII
Tab. 7.32:	Daten des Dreiklassenvergleichs potenzieller mRNA-iPS-Zellen zu humanen ES-Zellen.....	XL

IV Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AFP	alpha-Fetoprotein
ANOVA	engl. <i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
AP	alkalische Phosphatase
ARCA	engl. <i>anti-reverse cap analog</i>
bFGF2	engl. <i>basic Fibroblast Growth Factor 2</i> , basischer Fibroblastenwachstumsfaktor 2
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CF TM -1	Carworth Farm-1 Mausstamm
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlendioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dipl.	Diplom
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNAse I	Deoxyribonuclease I
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Dr.	Doktor
dsRNA	engl. <i>double stranded RNA</i> , doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EB	engl. <i>embryoid body</i> , embryonales Körperchen
EBNA1	nukleäre Antigen von EBV
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch

IV Abkürzungsverzeichnis

ES-Zellen	embryonale Stammzellen
et al.	et alii
FACS	engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i> , Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
fdr	engl. <i>false discovery rate</i> , falsch-negativ-Rate
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
G	franz. <i>Gauge</i> , Maßeinheit zur Größenangabe bei Kanülen
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	engl. <i>glial fibrillary acidic protein</i> , saures Gliafaserprotein
eGFP	engl. <i>enhanced green fluorescent protein</i> , verstärktes grün fluoreszierendes Protein
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Gy	Gray
h	Stunden
HD	engl. <i>huntington's disease</i> , Huntington'sche Erkrankung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
ICA	engl. <i>independent component analysis</i> , Unabhängigkeitsanalyse
IFN- α	Alpha-Interferon
IFN- β	Beta-Interferon
IL	Interleukin
iPS-Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen
IVF	<i>in vitro</i> Fertilisation
IVT	<i>in vitro</i> Transkription
IZBI	Interdisziplinäres Zentrum für Bioinformatik
IZKF	Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung
Kb	kilobase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
Klf4	engl. <i>krueppel-like factor 4</i>

IV Abkürzungsverzeichnis

LIF	engl. <i>leukemia inhibitory factor</i> , Leukämieinhibierender Faktor
LFC	engl. <i>log fold changes</i>
max.	Maximum
MEF	murine embryonale Fibroblasten
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min.	Minimum
ml	Milliliter
MoMLV	Moloney-Murines-Leukämie-Virus
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
MW	Mittelwert
NEAA	engl. <i>non essential amino acid</i> , nicht-essentielle Aminosäure
NFκB	engl. <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	nanogramm
NIH	engl. <i>National Institutes of Health</i> , Nationales Gesundheitsinstitut
nt	Nukleotide
O ₂	Sauerstoff
Oct4	engl. <i>octamer-binding transcription factor 4</i>
ORF	engl. <i>open reading frame</i> , offenes Leseraster
p	Passagestufe
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PD	Privatdozent
PEI	Polyethylenimin
PS-Zellen	pluripotente Stammzellen
qPCR	quantitative PCR
RKI	Robert-Koch-Institut, Berlin
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	engl. <i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR

IV Abkürzungsverzeichnis

SeV	Sendai-Virus
sog.	sogenannte
Sox2	engl. <i>sex determining region Y-box 2</i>
SSEA3	engl. <i>stage specific embryonic antigen</i> , embryonal-spezifisches Stufenantigen 3
SSEA4	engl. <i>stage specific embryonic antigen</i> , embryonal-spezifisches Stufenantigen 4
ssRNA	engl. <i>single-stranded</i> RNA, einzelsträngige RNA
Tab.	Tabelle
Tfp	Transformationspuffer
TLR	Toll- <i>like</i> -Rezeptoren
Tra-1-60	keratin-sulfatassoziiertes Antigen
u.a.	unter anderem
USA	engl. <i>United States of America</i> , Vereinigte Staaten von Amerika
UTR	engl. <i>Untranslated Region</i> , untranslatierter Bereich
UV	ultraviolettes Licht
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen in Volumen
w/v	Masse in Volumen
z. B.	zum Beispiel
µm	Mikrometer
µg	Mikrogramm
°C	Grad Celsius
Ø	Durchschnitt, durchschnittlich

1 Zusammenfassung/Abstract

1.1 Zusammenfassung

Die Ursache für die Huntington'sche Erkrankung ist die Degeneration eines spezifischen neuronalen Zelltyps, welche mit zunehmenden motorischen Störungen einhergeht und schließlich zum Tode führt. Die immer größer werdenden Fortschritte in der regenerativen Medizin in Hinblick auf Zellersatztherapien erlauben berechtigte Hoffnungen, dass unter anderem diese Erkrankung durch Zelltransplantationen kausal therapiert werden könnte. Eines der Hauptprobleme dieser Therapieform ist der inadäquate Zugang zu geeigneten primären Zellen. Eine vielversprechende Zellquelle stellen humane embryonale Stammzellen (ES-Zellen) dar, da diese in alle drei Keimblätter differenzieren können. Die Isolierung der humanen ES-Zellen aus *in vitro* befruchteten Eizellen wird jedoch aus ethischen Gründen als schwierig erachtet. Durch die Erzeugung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen), welche die Charakteristika von ES-Zellen aufweisen, könnte dieses Problem umgangen und differenzierte Derivate von iPS-Zellen für therapeutische Anwendungen zur Verfügung gestellt werden. Durch die dazu etablierte, retrovirale Reprogrammierung wird aber ein zusätzliches kanzerogenes Risiko in iPS-Zellen beziehungsweise deren differenzierte Derivate erzeugt. Mit der Generierung von iPS-Zellen durch Methoden, welche das Wirtsgenom nicht dauerhaft beeinflussen, wäre diese Gefährdung unterbunden oder zumindest stark reduziert.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch mRNA-Transfektionen iPS-Zellen zu entwickeln, wobei die aus mRNA-iPS-Kolonien differenzierten Zellen perspektivisch für den klinischen Einsatz geeignet wären. Um gleichzeitig ein *in vitro* Modellsystem für die Huntington'sche Erkrankung zu etablieren, wurden Fibroblasten von Patienten mit dieser neuronalen Degenerationskrankheit mit dem Ziel reprogrammiert, diese dann in reife Neurone auszudifferenzieren. Daraus ergaben sich die folgenden Fragestellungen:

- (1) Führt die Verwendung der Reprogrammierungsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4, Nanog, cMyc und hTERT (zusammenfassend: OSKNMT) bei der virusinduzierten Herstellung von iPS-Zellen aus Fibroblasten von Huntingtonpatienten zu einer Verkürzung der Reprogrammierungszeit?
- (2) Führen wiederholte mRNA-Transfektionen der Spenderzellen mit unterschiedlichen Zusammenstellungen von Pluripotenzfaktoren zur Entstehung von mRNA-iPS-Kolonien?
- (3) Ist es möglich, bei der mRNA-Reprogrammierung von Fibroblasten von Huntingtonpatienten auf die Onkogene Klf4, cMyc und hTERT zu verzichten?
- (4) Weisen die mRNA-iPS-Zellkolonien alle Charakteristika der Pluripotenz auf?

1 Zusammenfassung/Summary

Die selbstständige stabile Etablierung einer humanen pluripotenten Stammzellkultur war erfolgreich. Sie erfolgte parallel mit der Generierung eigener iPS-Zelllinien als Kontrollzellen, da aus regulatorischen Gründen keine anderweitigen humanen pluripotenten Stammzellen zur Verfügung standen. Zu diesem Zweck wurde mit einer neuen Zusammenstellung von Reprogrammierungsfaktoren (OSKNMT) virale iPS-Zellen aus Fibroblasten von Huntingtonpatienten erzeugt. Die Generierung von viralen iPS-Zelllinien war erfolgreich, allerdings gelang es nicht, die Reprogrammierungszeit von humanen Fibroblasten mit diesem Faktorengemisch zu verkürzen (Fragestellung 1).

Zur Überprüfung der Pluripotenz wurden in der vorliegenden Studie verschiedene Charakterisierungsmethoden etabliert und erfolgreich angewendet. Dazu gehörten unter anderem immunzytologische Färbungen und qPCR zum Nachweis von Pluripotenzmarker (z. B. Oct4, Sox2, Nanog), sowie die *in vitro* Differenzierung. Die analysierten viralen iPS-Zellen zeigten ausnahmslos Anzeichen der Pluripotenz. So wurden in viralen iPS-Kolonien unter anderem Pluripotenzproteine, die alkalische Phosphataseaktivität und die erfolgreiche *in vitro* Differenzierung in alle drei Keimblätter nachgewiesen.

Nachdem Kontrollzellen in Form von viralen iPS-Zellen vorlagen, wurde begonnen das mRNA-Transfektionsprotokoll (Fragestellung 2) für den Reprogrammierungsprozess zu generieren. Dazu wurden unmodifizierte mRNA-Moleküle, die für OSKNMT kodieren, *in vitro* transkribiert. Zur Reprogrammierung durch mRNA-Transfektionen kamen unterschiedliche Faktorkombinationen zum Einsatz: OSK, ONT, ONK, ONM, ONS und OSKNMT. Nach mehrmaligen Transfektionen dieser mRNA-Gemische wurden Veränderungen der Fibroblastenmorphologie innerhalb von drei Wochen sichtbar. Diese Kolonien wurden entsprechend den an viralen iPS-Zellen ausgetesteten Bedingungen kultiviert und charakterisiert. Es stellte sich jedoch frühzeitig heraus, dass ohne die Onkogene Klf4, cMyc und hTERT keine mRNA-iPS-Kolonien stabil etabliert werden konnten (Fragestellung 3).

Für die mittels mRNA generierten iPS-Zellen konnte die alkalische Phosphataseaktivität als Pluripotenzmarker nachgewiesen werden. Hingegen wurde die Expression von Pluripotenzproteinen in potenziellen mRNA-iPS-Zellen durch immunzytologische Färbungen nicht sicher belegt. Weiterhin konnten spezifische Differenzierungsmarker nach versuchter *in vitro* Differenzierung in alle drei Keimblätter nicht sicher bestätigt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei den potenziellen mRNA-iPS-Zellen um partiell reprogrammierte Zellen, jedoch keine vollwertigen iPS-Zellen handelte (Fragestellung 4).

Im Folgenden sollte zusätzlich die Frage beantwortet werden, warum keine vollständige Reprogrammierung mit mRNA-Transfektionen möglich war. Es konnte gezeigt werden, dass es durch wiederholtes Einbringen von mRNA-Gemischen zu einer Veränderung des

1 Zusammenfassung/Summary

transkriptionellen Genoms kommt. In den transfizierten Zellen wurden wichtige Pluripotenzfaktoren exprimiert. Die charakteristische Expressionssignatur von Pluripotenzfaktoren, wie sie in viralen iPS- oder ES-Zellen anzutreffen ist, wurde aber durch mRNA-Transfektion nicht erreicht. Dieses Ergebnis wurde mittels qPCR und Genearray verifiziert. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Telomerase in den partiell reprogrammierten Zellen nicht aktiviert wurde, weshalb auch keine Verlängerung der Telomere nachweisbar war. Die endogene Pluripotenzschleife konnte durch die wiederholten mRNA-Transfektionen nicht aktiviert werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es möglich war, mit einer neuen Kombination an Reprogrammierungsfaktoren virale iPS-Zelllinien aus Fibroblasten von Huntingtonpatienten zu generieren und diese für weiterführende Analysen, wie Differenzierungen in GABAerge Neurone, zur Verfügung stehen. Mit unmodifizierten mRNA-Molekülen, welche in verschiedenen mRNA-Gemischen angewendet wurden, konnten keine vollreprogrammierten iPS-Zellen aus Fibroblasten generiert werden. Ein direkter Vergleich mit humanen ES-Zellen als Kontrollzellen, wäre für zukünftige Studien im Sinne der Methodenvollständigkeit zu fordern.

Wenn auch die Reprogrammierung mit unmodifizierten mRNA-Molekülen nicht zu eindeutig vollreprogrammierten iPS-Zellen führte, so tragen die gezeigten Ergebnisse wesentlich zum Verständnis der Reprogrammierung bei. Auf Grundlage dieser und anderer Studien können weitere Optimierungen im mRNA-Transfektionsprozess durchgeführt werden. Somit können die Daten dieser Studie einen entscheidenden Beitrag für die Generierung von klinisch relevanten iPS-Zellen und deren differenzierten Zellen leisten, die dann in der regenerativen Medizin Anwendung finden können.

1.2 Summary

Huntington's disease is attributable to the degeneration of a specific neuronal population within the brain, which results in increasing signs of motor neuron dysfunction, and ultimately, causes death. Recent advances in regenerative medicine, particularly the achievements reported regarding cell replacement therapies, raise the hope that this disease, among others, could be routinely treated in the future. However, the isolation of human ES cells from *in vitro* fertilized oocytes raises ethical concerns. This problem may be solved by recently discovered techniques that enable the generation of induced pluripotent stem cells (iPS cells). This can be achieved by reprogramming somatic cells with so-called pluripotency factors. Fibroblasts have been identified as readily 'reprogrammable'; they are easy to obtain from various sources, such as skin biopsies, and are therefore, primary sources. Per definition, iPS cells exhibit the same capabilities as ES cells and may theoretically be used for therapeutic applications. But, in practice, the well-established

1 Zusammenfassung/Summary

retroviral reprogramming methods that are available to generate iPS cells through a permanent alteration of the genome come with a carcinogenic risk in iPS cells or iPS-differentiated cells, preventing these cells from clinical application. With the development of iPS cell generation methods, which only transiently affect the host genome, this particular risk might be avoided or at least strongly reduced. The aim of this study was to generate iPS cells by mRNA-transfection, thus establishing a transient reprogramming approach that could be used for clinical applications. In addition, iPS cells were obtained from fibroblasts donated by patients suffering from Huntington's disease in order to differentiate these iPS cells into mature neurons and to establish an *in vivo* model system for the disease. To achieve this aim, the following questions had to be answered:

- (1) Does the use of Oct4, Sox2, Klf4, Nanog, cMyc, and hTERT (summary: OSKNMT) as retroviral reprogramming factors lead to a shortened reprogramming time for fibroblasts donated by Huntington patients?
- (2) Can mRNA-iPS colonies be established after repeated mRNA transfection with different combinations of reprogramming factors with these kinds of donor cells?
- (3) Is successful reprogramming possible without using potential oncogenes, such as Klf4, cMyc, and hTERT?
- (4) Do mRNA-iPS-colonies exhibit all the characteristics of pluripotency?

We have successfully established a stable human pluripotent stem cell culture. This was performed in parallel with the generation of viral iPS cells for control purposes, since no alternative human pluripotent stem cells could be made available for administrative reasons. Human viral iPS cell lines were derived from Huntington patient fibroblasts, using a new combination of reprogramming factors (OSKNMT). This approach was similarly effective; however, there was no reduction in reprogramming time (question 1).

In this study, the validation of pluripotency was achieved with different characterization methods, which were first established before being applied successfully. Pluripotency was shown for all viral iPS by immunocytochemistry, qPCR (e.g., Oct4, Sox2, Nanog), and *in vitro* differentiation. In viral iPS cells, pluripotency proteins and alkaline phosphatase were detected, and the differentiation into all three germ layers was successful.

Development of the mRNA-transfection protocol was conducted (question 2) subsequently. For this, unmodified mRNA molecules encoding pluripotency factors were used for *in vitro* transcription. Different reprogramming factor combinations were investigated: OSK, ONT, ONK, ONM, ONS and OSKNMT. Four mRNA-transfections were performed every 72 h with the aforementioned combinations of reprogramming factors for two weeks; significant changes in fibroblast morphology were observed, including smaller cells in formation of

1 Zusammenfassung/Summary

colonies. Colonies exhibiting this phenotype were further cultured and characterized according to the paradigms established for viral-induced iPS cells. No stable mRNA iPS colonies could be established without the oncogenes Klf4, cMyc, and hTERT (question 3).

mRNA-derived iPS cells stained positive for alkaline phosphatase, an important pluripotency marker. However, no expression of other pluripotency proteins was clearly demonstrated by immunocytochemistry staining. Moreover, the expression of lineage-specific differentiation markers could not be confirmed reliably after *in vitro* differentiation into all three germ layers. These results suggest that the derived cells may represent “potential” or “partially reprogrammed” mRNA iPS cells. According to established paradigms, no iPS cells could be obtained using the described methods (question 4).

Additional investigations would help to provide a possible answer to the question of why complete reprogramming with mRNA-transfection could not be achieved. Through repeated introduction of mRNA-mixtures, a change in genomic transcription was detected. Although, important pluripotency factors were expressed in the transfected cells, the characteristic expression signature normally observed in viral iPS or ES cells was not observed. This result was verified by a qPCR and gene array. Furthermore, it could be shown that the telomerase was not activated in the “partially reprogrammed” cells. Thus, the endogenous pluripotency loop was not activated through repeated mRNA transfection.

In summary, it was possible to derive viral iPS cell lines from fibroblasts donated by Huntington patients, and this was achieved with a new combination of reprogramming factors. The derived iPS cell line can be used for further experiments, such as differentiation toward mature GABAergic neurons, and for subsequent pharmacological testing. For the sake of method and characterization completion, further studies of the particular lines generated must be compared to established viral-derived iPS cell lines and human ES cells as positive control cells.

Although it was not possible to derive fully reprogrammed iPS cells using unmodified mRNA molecules, we did observe a partial reprogramming of iPS cells. Nevertheless, the obtained results may contribute to a deeper understanding of the reprogramming process itself. Reprogramming based on mRNA-transfection protocols still requires significant methodological improvements, which can be achieved based on the results of this and other studies. Thus, this study may have a valuable impact on the generation of clinically relevant iPS cells and iPS differentiated cells, which can be used in the field of regenerative and restorative stem cell therapy.

2 Einleitung

2.1 Stammzellen – Grundlage für die regenerative Medizin

Neurodegenerative Erkrankungen treten meist im hohen Lebensalter auf. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde berechnet, dass die Zahl der an der Alzheimer'schen Erkrankung leidenden über 65jährigen in den USA sich bis zum Jahr 2050 verdreifachen wird¹. Eine ähnlich starke Zunahme ist für den europäischen Raum anzunehmen. Für die meisten neurodegenerativen Erkrankungen, wie die erwähnte Alzheimer'sche, oder auch die Parkinson'sche und die Huntington'sche Erkrankung, gibt es zurzeit keine kausale Therapiemöglichkeit, sondern nur symptomatische Behandlungsoptionen. In der medizinischen Forschung liegt seit einigen Jahren der Fokus unter anderem auf Zellersatztherapien. Es gibt berechtigte Hoffnung, dass durch diese Therapieformen der regenerativen Medizin sich neue kausale Behandlungsmöglichkeiten für neurologische Erkrankungen eröffnen. Die Ziele der regenerativen Medizin sind nach Mason und Dunnill wie folgt definiert²:

„Die regenerative Medizin ersetzt oder regeneriert humane Zellen, Gewebe oder Organe, um deren normale Funktionen wiederherzustellen oder zu etablieren.“

Bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen ist nur ein spezifischer Zelltyp betroffen, der durch eine Zelltherapie ersetzt werden müsste. So degenerieren bei der Parkinson'schen Erkrankung die dopaminergen Neurone in der *Substantia nigra*. Bei der Huntington'sche Erkrankung kommt es zur selektiven Degeneration der striatalen GABAergen Neuronen. Die Transplantation von autologen^a oder HLA^b-kompatiblen Zellen im Rahmen einer Zellersatztherapie wäre eine attraktive Option für die aufgeführten Erkrankungen. Es würde das Risiko der Abstoßungsreaktion umgehen. Die obligatorische, lebenslange Einnahme von immunsuppressiven Medikamenten nach einer Transplantation würde entfallen.

Ein vorrangiges Problem der regenerativen Medizin liegt im inadäquaten Zugang zu ausreichend qualitativ hochwertigem, gesundem Zellmaterial, welches zur Zelltransplantation benötigt wird. Darüber hinaus unterliegen primäre Zellen der zellulären Seneszenz^{3,4}, die je nach Alter des Spenders unterschiedlich ausgeprägt ist⁵. Einen Ausweg aus dieser Problematik stellt die Verwendung von Stammzellen dar.

^a autolog = Spender und Empfänger sind identisch

^b HLA = humanes Leukozytenantigen

2.2 Allgemeine Klassifizierung von Stammzellen

Im folgenden Abschnitt sollen therapeutisch relevante Stammzellen näher erörtert werden. Entsprechend ihres jeweiligen spezifischen Entwicklungspotentials lassen sich Stammzellen folgendermaßen klassifizieren (vgl. Abb. 2.1):

2.2.1 Totipotente Stammzellen

Totipotente Stammzellen haben die Fähigkeit, sich in alle embryonalen und extra-embryonalen Zelltypen zu differenzieren. Daraus kann sich ein kompletter und vitaler Organismus entwickeln. Bei Säugetieren kann man nur in der Zygote beziehungsweise im zwei- und vier-Zellstadium der Blastozyste totipotente Zellen finden^{6,7}.

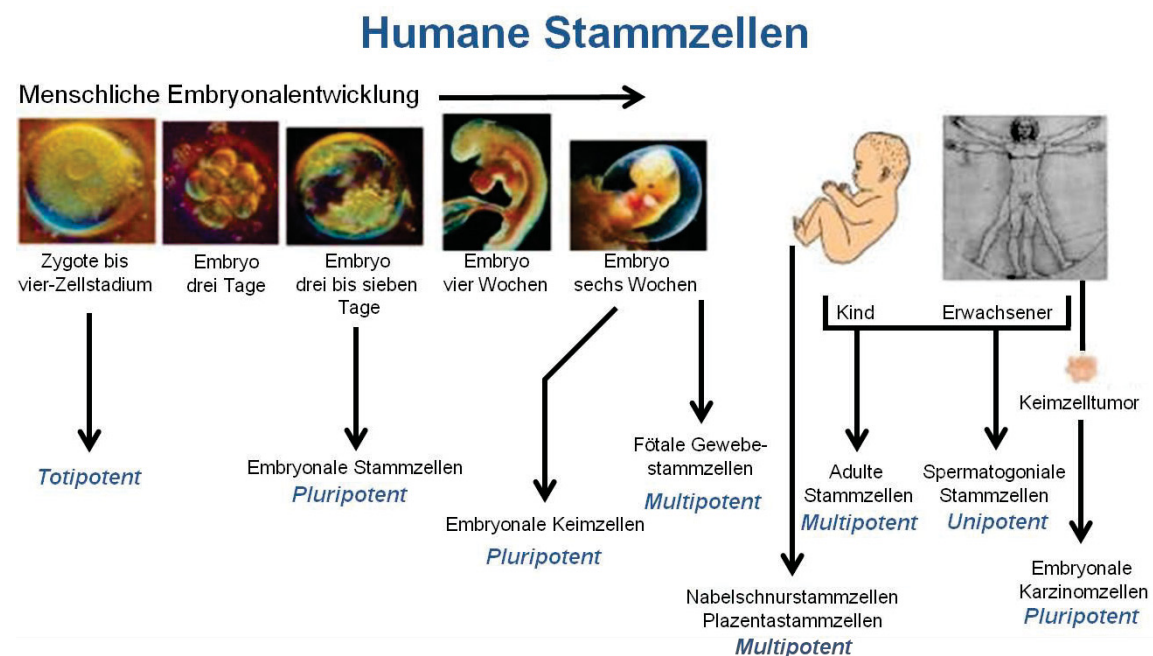


Abb. 2.1: Hierarchische Entwicklung von humanen Stammzellen. Aus einer Zygote beziehungsweise bis zum vier-Zellstadium der Blastozyste können totipotente Zellen gewonnen werden. Nach drei bis sieben Tagen Reifung entsteht in der Blastozyste die innere Zellmasse, aus der die pluripotenten embryonalen Stammzellen entnommen werden und als stabile Zelllinien *in vitro* kultiviert werden können. Im weiteren Entwicklungsverlauf können dem Embryo, dem Kind und dem Erwachsenen weitere pluripotente und multipotente Stammzellen unterschiedlichen Ursprungs und Qualitäten entnommen werden. Wobei es sich bei den isolierten Zellen des Kindes und Erwachsenen um Zellen pathologischen Ursprungs handelt. Eine Besonderheit stellen die unipotenten Stammzellen dar, die aus dem Erwachsenen isoliert werden können (modifiziert nach www.stemcellresearch.org^c).

2.2.2 Pluripotente Stammzellen

Pluripotente Stammzellen (PS-Zellen) haben das Potential, alle Zelltypen des Embryos zu formen, aber nicht mehr die Fähigkeit, eine Plazenta zu bilden. Pluripotente Zellen befinden sich im späten Blastomer, in den Zellen der inneren Zellmasse, der Blastozyste und dem

^c <http://www.stemcellresearch.org/testimony/20040929prentice.htm>

2. Einleitung

Epiblast, welcher aus der inneren Zellmasse entsteht. Unter geeigneten Zellkulturbedingungen kann man aus der inneren Zellmasse entnommene Zellen als pluripotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen) in Form von stabilen Zelllinien kultivieren. Weiterhin können zusätzlich pluripotente Zelltypen aus unterschiedlichen Geweben und Stadien der Entwicklung *in vitro* vermehrt beziehungsweise erzeugt werden, z. B. embryonale Karzinomzellen und embryonale Keimzellen⁷. Die pluripotenten ES-Zellen werden im späteren Verlauf näher beschrieben, da sie den Schwerpunkt der vorliegenden Studie darstellen (vgl. Kapitel 2.3).

2.2.3 Multipotente Stammzellen

Zu den multipotenten Stammzellen gehören die meisten adulten Stammzellen, wie etwa dermale, neurale, hämatopoetische, mesenchymale und intestinale Stammzellen⁸⁻¹¹. Sie haben eine deutlich eingeschränkte Differenzierungskapazität im Vergleich zu den oben aufgeführten Stammzelltypen. Trotzdem verfügen multipotente Stammzellen über die Fähigkeit, sich in unterschiedliche Zelltypen innerhalb ihres Keimblattes zu differenzieren^{12,13}. Beispielsweise lassen sich die unter anderem aus dem Knochenmark gewonnenen mesenchymalen Stammzellen *in vitro* gezielt durch Induktionsmedien in Osteozyten, Chondrozyten und Adipozyten differenzieren. Multipotente Stammzellen sind Teil des körpereigenen Reparaturmechanismus, wobei sie unter anderem erkrankte Zellen ersetzen. Wie eingangs erwähnt (vgl. Kapitel 2.1), ist auch die Anzahl autologer Stammzellen begrenzt und unterliegt der zellulären Seneszenz^{14,15}.

2.2.4 Unipotente Stammzellen

Hingegen sind unipotente Stammzellen, beispielsweise die spermatogoniale Stammzellen, nur fähig, sich in einen Zelltyp oder eine Zelllinie zu entwickeln. Die erwähnten spermatogoniale Stammzellen differenzieren nur in Spermien¹⁶.

Die unter Kapitel 2.2.2 beschriebenen PS-Zellen stellen vermutlich die Zellen mit dem größten Potential für eine Zellersatztherapie dar. Aus diesem Grund wird im folgenden Abschnitt näher auf diese Zellen eingegangen.

2.3 Pluripotente Stammzellen

2.3.1 Embryonale Stammzellen

ES-Zellen können sich als PS-Zellen in alle drei Keimblätter und somit in alle Zellen des Körpers entwickeln. Durch dieses charakteristische Merkmal besteht ein enormes Potential für mögliche Anwendungen in der klinischen Praxis.

Im Jahre 1981 konnten die ersten ES-Zellen der Maus erfolgreich aus der inneren Zellmasse der Blastozyste isoliert und *in vitro* als stabile Zelllinie kultiviert werden^{17,18}. Erst 1998 war es möglich, humane ES-Zelllinien aus humanen Blastozysten zu isolieren¹⁹. Die dafür

2. Einleitung

verwendeten, frühen menschlichen Embryonen wurden im Rahmen einer *in vitro*-Fertilisation (IVF) erzeugt, aber nicht mehr zum Herbeiführen einer Schwangerschaft benötigt (sogenannte überzählige IVF-Embryonen). Die humanen wie auch die murinen ES-Zelllinien konnten *in vitro* nur unter spezialisierten Kultivierungsbedingungen stabil in einem undifferenzierten Stadium erhalten bleiben. So ist unter anderem bei murinen ES-Zelllinien die Verwendung des Leukämieinhibierenden Faktors (LIF, engl. *Leukemia Inhibitory Factor*) notwendig, wohingegen bei humanen ES-Zellen der undifferenzierte Status durch die Zugabe des humanen basischen Fibroblastenwachstumsfaktors 2 (bFGF2, engl. *basic Fibroblast Growth Factor*) erhalten wird²⁰⁻²². Durch Entzug der entsprechenden Zytokine und Überführung in Suspensionskultur entwickeln sich aus den ES-Zellen komplexe, dreidimensionale Aggregate, die sogenannten *Embryoid Bodies* (engl., EBs). Diese EBs weisen eine runde oder tropfenähnliche Gestalt auf. Je nach Kultivierungsdauer können in den EBs spezifische Gewebe aller drei Keimblätter nachgewiesen werden (Abb. 2.2).

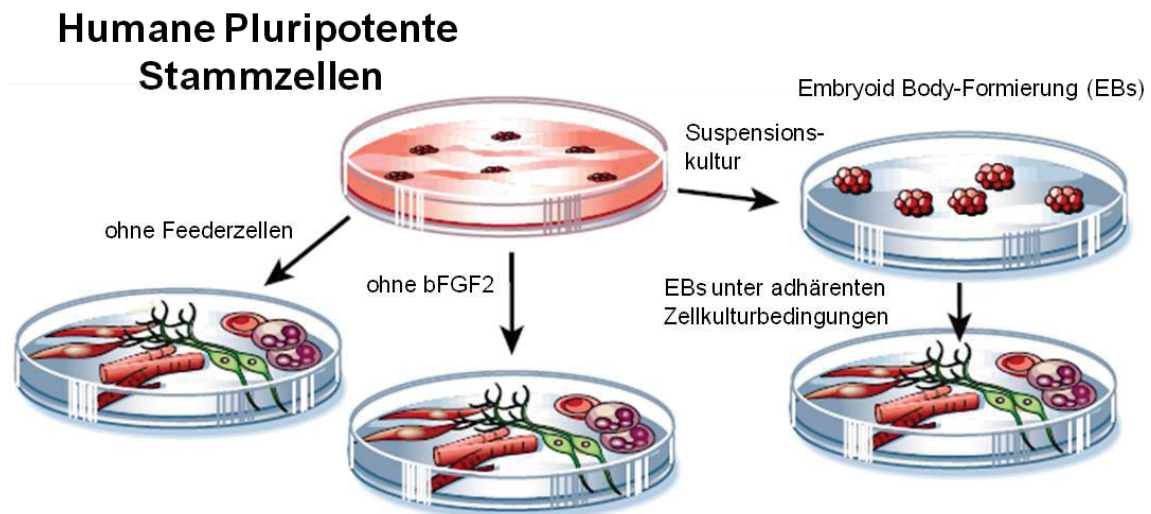


Abb. 2.2: Spontane Differenzierung von pluripotenten Stammzellen in differenzierte Zellen. Die spontane Differenzierung von PS-Zellen in alle drei Keimblätter kann auf unterschiedlichen Wegen induziert werden. Dies kann durch die Separierung von Feederzellen, Entzug von Zytokinen oder als Suspensionskultur durch Formierung von EBs erfolgen. So können unter anderem Blut-, Herz-, Nerven- oder Muskelzellen, aber auch Chondrozyten oder Hautzellen entstehen (modifiziert nach Donovan, 2001²³).

ES-Zellen haben drei definierte Eigenschaften: Selbsterneuerung, Pluripotenz und Formierung von keimbahnkompetenten Chimären. **Selbsterneuerung** beschreibt die Eigenschaft von Stammzellen, durch mitotische Zellteilung *in vitro* unbegrenzt zu proliferieren. Die zelluläre Identität bleibt erhalten. **Pluripotenz** ist die Fähigkeit der Differenzierung in alle drei Keimblätter und Keimzellen. Die Pluripotenz von ES-Zellen wird unter anderem durch innere und äußere Faktoren und durch ein ausbalanciertes Netzwerk an Pluripotenzfaktoren reguliert. Zu diesen gehören die Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog als essentielle Regulatoren der frühen Entwicklung und ES-Zellidentität. Sie sind verantwortlich für die

2. Einleitung

Selbsterneuerung und Pluripotenz. Diese Trias der Transkriptionsfaktoren wird durch ein autoregulatorisches Netzwerk und durch äußere Faktoren beeinflusst und gesteuert. Weiterhin wird durch die Transkription dieser Gene die Differenzierung der ES-Zellen in spezialisierte Zellen blockiert. Die Pluripotenz humaner und muriner ES-Zellen kann durch spezifische Pluripotenztestungen, beispielsweise mittels immunzytologischen Färbungen, nachgewiesen werden. Als „Goldstandard“ besonders für humane ES-Zellen dient die Fähigkeit zur Formierung von Teratomen in immundefizienten Mäusen, die sich durch subkutanes Injizieren von ES-Zellen innerhalb von einigen Wochen entwickeln²⁴. Teratome enthalten definitionsgemäß alle Elemente der drei Keimblätter. Diese Methode stellt den stringentesten Nachweis für Pluripotenz humaner PS-Zellen dar²⁵. Für murine PS-Zellen gilt darüber hinaus die Formierung von **keimbahnkompetenten Chimären** als „Goldstandard“ zur Überprüfung der Pluripotenz. Dies wird durch die Injektion von PS-Zellen in die Blastozyste erreicht^{26,27}. Nachdem die PS-Zellen des Spenders in die diploide Blastozyste injiziert wurden, verschmelzen einige dieser Zellen mit der inneren Zellmasse der Wirtsblastozyste. Durch Transplantation der Blastozyste in ein Leihmuttertier werden sich die injizierten PS-Zellen analog der normalen Entwicklung einer Maus differenzieren und in die entsprechenden Organe integrieren. Für humane PS-Zellen ist diese Vorgehensweise ethisch nicht vertretbar.

2.3.2 Induzierte pluripotente Stammzellen

Resultierend aus der Tatsache, dass humane ES-Zelllinien in der Regel aus überzähligen IVF-Embryonen isoliert werden, wird in einigen Ländern, einschließlich Deutschland, stetig eine ethische Debatte hinsichtlich der Verwendung von humanen ES-Zellen in der klinischen Forschung geführt. Um diese ethischen Bedenken zu umgehen, wird seit Jahren nach alternativen pluripotenten Zellquellen geforscht. Eine vielversprechende Alternative stellte die Isolierung von ES-Zellen aus befruchteten IVT-Embryonen dar, ohne die Embryonen bei der Entnahme zu zerstören (Patentantrag: DE 19756864, Prof. Dr. Brüstle). Dadurch wäre der ethische Konflikt umgangen worden, aber der Patentantrag wurde zeitweilig vom Europäischen Patentamt stillgelegt (Stand: 12.04.2013). Dies zeigt, wie dringend notwendig alternative Verfahren zur Generierung von PS-Zellen etabliert werden müssen.

Erste Reprogrammierungserfolge mit differenzierten somatischen Zellen konnten bei Mäusen durch den somatischen Zellkerntransfer in Oozyten^{28,29} und die Fusionierung mit ES-Zellen^{30,31} erzielt werden. Diese Experimente implizierten, dass vermutlich mit spezifischen Faktoren eine Reprogrammierung von somatischen Zellen in PS-Zellen möglich ist. Der bahnbrechende Nachweis gelang im Jahre 2006 den Forschern Takahashi und Yamanaka. Die Wissenschaftler „reprogrammieren“ murine Fibroblasten direkt in PS-Zellen³². Aus einer Gesamtheit von potenziellen Reprogrammierungsfaktoren konnten hierbei Oct4, Sox2, Klf4 und cMyc (OSKM) als die Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die für eine erfolgreiche

2. Einleitung

Reprogrammierung in die sogenannten „induzierten pluripotente Stammzellen“ (iPS-Zellen) erforderlich sind. In Anerkennung dieser wissenschaftlichen Leistung wurde Prof. Dr. Yamanaka 2012 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

Oct4 (engl. *Octamer-binding transcription factor 4*) wurde als dominanter Regulator in ES-Zellen nachgewiesen^{33,34}. Weiterhin ist dieser Transkriptionsfaktor in unbefruchteten Oozyten und primordialen Keimzellen exprimiert³⁵⁻³⁸. Murine Embryonen, die kein Oct4 exprimieren, sterben im Blastozystenstadium³⁵. Von entscheidender Bedeutung für den Erhalt der Pluripotenz ist das optimale Expressionslevel von Oct4. Bei einer Reduzierung der Oct4-Expression kommt es zu einer Differenzierung in das Trophektoderm. Bei einer stark erhöhten Expression wird hingegen eine Differenzierung in primitives Endoderm gefördert³⁹. Der Transkriptionsfaktor **Sox2** (engl. *SRY sex determining region Y-box 2*) konnte in ES-Zellen, Stammzellen des Trophoblasten, neuralen Stamm- und Vorläuferzellen nachgewiesen werden⁴⁰⁻⁴². Eine der Hauptfunktionen von Sox2 ist die Erhaltung der Pluripotenz, indem der Transkriptionsfaktor durch Wechselwirkungen mit Oct4 dessen Expression auf einem geeigneten Niveau hält⁴¹. **cMyc** ist ubiquitär exprimiert und spielt eine Rolle bei der Proliferation, Regulation des Zellzyklus sowie der Differenzierung und wird nur schwach oder gar nicht in ruhenden Zellen exprimiert⁴³⁻⁴⁸. Zusätzlich reguliert cMyc Chromatinmodifizierungen hin zu globalen Chromatinstrukturveränderungen, so dass andere, wichtige Gene für den Reprogrammierungsprozess effektiv aktiviert werden können⁴⁹⁻⁵². Der *Krüppel-like factor 4* (engl., **Klf4**) ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Überexpression in ES-Zellen die Differenzierung blockieren kann und die Selbsterneuerung unterstützt^{53,54}. Wie cMyc wird Klf4 eine Funktion als Onkogen zugeschrieben⁵⁵.

Innerhalb eines Jahres nach der ersten Veröffentlichung zu murinen iPS-Zellen wurden humane Fibroblasten erfolgreich reprogrammiert. Einmal konnte gezeigt werden, dass dies mit den gleichen Reprogrammierungsfaktoren gelingt⁵⁶ und ebenso mit alternativen Reprogrammierungsfaktoren der pluripotente Status aus humanen Fibroblasten erzielt werden kann⁵⁷. Die Arbeitsgruppe um Yu und Kollegen⁵⁷ verwendete die gleichen Transkriptionsfaktoren Oct4 und Sox2 wie Takahashi und Kollegen^{32,56}, ersetzten aber Klf4 und cMyc durch Nanog und Lin28. Die Verwendung von **Nanog** als Reprogrammierungsfaktor war ein logischer Schritt, da Nanog wie Oct4 überwiegend in Zellen der inneren Zellmasse und ES-Zellen exprimiert wird. Durch detaillierte Untersuchungen konnte belegt werden, dass Nanog wie Oct4 und Sox2 zu einem pluripotenten transkriptionellen Netzwerk gehört⁵⁸⁻⁶⁰. Jeder dieser drei Transkriptionsfaktoren hat für die jeweilig anderen eine Promotorbindungsstelle. Aus diesem Grund wurde eine autoregulatorische Schleife postuliert, die die Pluripotenz aufrecht erhält und die Aktivierung von Genen unterdrückt, die für die Differenzierung verantwortlich sind⁶¹. Mit der Etablierung von Nanog-defizienten murinen ES-Zellen konnte gezeigt werden, dass ein pluripotenter Status

2. Einleitung

ohne Nanog-Expression zwar prinzipiell beibehalten werden kann, Nanog-defiziente ES-Zellen aber zur Differenzierung tendieren⁶². Somit kann Nanog eher eine Rolle zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz zugeschrieben werden. Interessant ist, dass in etablierten ES-Zellen das Expressionslevel von Nanog im Vergleich zu den homogen exprimierten Genen Oct4 und Sox2 sehr heterogen ist⁶³.

Lin28 ist ein RNA-Bindungsprotein und heterochronisches Gen der Embryonalentwicklung⁶⁴, welches nach der Differenzierung von humanen ES-Zellen nicht mehr exprimiert wird⁶⁵. Yu und Kollegen⁵⁷ konnten zeigen, dass ohne exogenes Einbringen von Oct4 und Sox2 keine Reprogrammierung von humanen mesenchymalen Zellen gelingt, aber ohne Nanog beziehungsweise Lin28 iPS-Zellen generiert werden können (wenn auch mit geringer beziehungsweise deutlich geringerer Effizienz). Lin28 ist nicht zwingend notwendig, um eine Reprogrammierung zu erreichen⁵⁷. Yu und Kollegen gelang es aber, mit den Faktoren Oct4, Sox2, Nanog und Lin28 die Reprogrammierungszeit von 25 Tagen⁵⁶ auf 12 Tage zu verkürzen.

Während der Reprogrammierung ist das stöchiometrische Verhältnis der einzelnen Reprogrammierungsfaktoren für das Entstehen vollreprogrammierter iPS-Zellen von entscheidender Bedeutung⁶⁶. Wie Papapetrou und Kollegen⁶⁶ zeigen konnten, ist eine deutliche Effizienzsteigerung im Entstehen der iPS-Zellkolonien zu verzeichnen, wenn dreimal mehr Oct4 im Vergleich zu den anderen Reprogrammierungsfaktoren eingesetzt wird. Einen entscheidenden Einfluss auf die Veränderung des epigenetischen Methylierungsmusters hat während der frühen Reprogrammierungsphase eine Überexpression von Oct4 und Klf4 im Vergleich zu Sox2 und cMyc⁶⁷.

Die beschriebene Zusammenstellung von Reprogrammierungsfaktoren (Oct4, Sox2, Klf4, cMyc) stellt in Hinblick auf die Verwendung von iPS-Zellen beziehungsweise von ihnen differenzierten Zellen ein mögliches therapeutisches Risiko dar. So könnten z. B. die viral integrierten Onkogene Klf4 und cMyc reaktiviert werden, wenn Patienten aus iPS-Zellen differenzierte Zellen transplantiert werden. Eine Vermeidung der Verwendung dieser onkogenen Reprogrammierungsfaktoren wäre durch die Auswahl der optimalen Spenderzellen^d gegeben. In früheren Arbeiten konnte unter anderem gezeigt werden, dass bei der Verwendung von humanen Keratinozyten zur Herstellung von iPS-Zellen auf exogen eingebrachtes cMyc verzichtet werden kann⁶⁸. Keratinozyten exprimieren cMyc endogen auf hohem Niveau.

^d Spenderzellen = die zu reprogrammierenden Zellen

2.3.3 Vor- und Nachteile induzierter pluripotenter Stammzellen gegenüber embryonalen Stammzellen

Ein wesentlicher Vorteil von humanen iPS-Zellen gegenüber humanen ES-Zellen ist die Möglichkeit zur Generierung von autologen iPS-Zelllinien und deren differenzierten Derivaten. Bei der Transplantation von Fremdgewebe in den Patienten besteht lebenslänglich die Gefahr einer Abstoßungsreaktion. Daher ist der Patient ständig auf die Einnahme von Immunsuppressiva angewiesen, was wiederum eine Tumorentstehung fördern kann. Es besteht die Hoffnung, dass nach einer Transplantation von differenzierten Zellen aus patienteneigenen iPS-Zellen das Immunsystem des Patienten die Transplantate nicht abstößt. Dies würde einen großen Schritt Richtung personalisierter regenerativer Medizin bedeuten. Die routinemäßige Herstellung von patientenspezifischen iPS-Zellen stellt einen immensen zeitlichen Aufwand dar. Bis eine stabile iPS-Zelllinie generiert und vollständig charakterisiert ist, werden mindestens vier Monate benötigt²⁵. Die Differenzierung von PS-Zellen und deren Charakterisierung wird in Abhängigkeit vom gewünschten Zelltyp erneut einige Monate in Anspruch nehmen. Für viele Krankheitsformen ist das inakzeptabel. Weiterhin ist die Erzeugung patientenspezifischer iPS-Zelllinien mit einem extrem hohen Kostenaufwand verbunden, der in der Praxis derzeit nicht zu realisieren ist. Eine hervorragende Alternative ist die Etablierung von iPS-Stammzellbanken, um die gängigen HLA-Typen in der Bevölkerung abzudecken. In einer Studie zum Aufbau einer iPS-Stammzellbank in Großbritannien wurde berechnet, dass mit 150 iPS-Zelllinien 93 % der in der Bevölkerung vorkommenden HLA-Konstellationen abgedeckt werden könnten⁶⁹. Diese Daten müssten für andere Länder beziehungsweise Kontinente, wie Asien, mit heterogeneren ethnischen Hintergründen angepasst werden. Im Rahmen einer Stammzellbank könnten auch standardisierte Vorgaben für die Spenderzellen erstellt werden, um qualitativ hochwertige iPS-Zelllinien zu generieren. Primäre Zellen unterliegen, wie eingangs erwähnt, besonders im höheren Alter der Spender oder Patienten einer schnelleren zellulären Seneszenz⁵. Studien belegen, dass das entwicklungsbiologische Alter von iPS-Zellen nach der Reprogrammierung dem von humanen ES-Zellen gleicht⁷⁰. Vermutlich kann aber das zelluläre Alter nicht vollständig auf das Niveau der embryonalen Zellen „zurückgesetzt“ werden, was unter anderem bei der Differenzierung der iPS-Zellen deutlich werden kann⁷¹.

Bezüglich der Differenzierungseffizienz von iPS-Zellen hat sich gezeigt, dass diese dem epigenetischen Gedächtnis der Spenderzellen unterliegt⁷². Das bedeutet, dass iPS-Zellen aus pankreatischen Spenderzellen sich besser in pankreatische Zellen differenzieren lassen als iPS-Zellen, die beispielsweise aus Fibroblasten generiert wurden⁷³. Erstaunlich ist hierbei, dass die Differenzierungseffizienz von pankreatischen iPS-Zellen deutlich besser war als aus humanen ES-Zellen. Das epigenetische Gedächtnis von iPS-Zellen könnte sich

für die Differenzierung in funktionelle Zellen als Vorteil erweisen, wenn, wie in der Studie von Bar-Nur und Kollegen,⁷³ Spenderzellen und zu differenzierende Zellen identisch sind. iPS-Zellen könnten als Zwischenschritt zur Generierung von adäquaten Zellmengen für die Zellersatztherapie genutzt werden, um dann in die Zielzellen zu differenzieren (vgl. Kapitel 2.1).

iPS-Zellen stellen für die Entwicklung von neuen Medikamenten eine erfolgsversprechende Option dar. Theoretisch können für jede Erkrankung spezifische iPS-Zelllinien generiert werden, wohingegen von humanen ES-Zelllinien nur einige krankheitsspezifische Modellsysteme zur Verfügung stehen. Letztere tragen in der Regel einen monogenetischen Defekt, wodurch die Auswahl an zu untersuchenden Krankheitsbildern stark eingeschränkt ist. Es würden somit neue Zellmodelle für die Forschung mit krankheitsspezifischen iPS-Zelllinien zur Verfügung stehen, womit auf lange Sicht neue Medikamente entwickelt und getestet werden könnten.

Eine eindeutige Beantwortung der Frage, ob iPS-Zellen einen Ersatz für die ethisch bedenklichen humanen ES-Zellen darstellen, ist zum jetzigen Zeitpunkt der Forschung nicht mit Sicherheit möglich. Das Forschungsfeld der iPS-Zellen ist sehr jung und noch nicht vollständig erschlossen und viele Fragen im Hinblick auf deren Sicherheit sind noch unbeantwortet. Ein hohes Sicherheitsrisiko für die Translation der differenzierten Zellen in die Klinik stellen beispielsweise die Herstellungsmethoden der iPS-Zelllinien dar. Im nachfolgenden Abschnitt sollen einige Meilensteine bezüglich der Generierungsmethoden von iPS-Zellen genauer beleuchtet und auf assoziierte Risiken eingegangen werden. Es werden dabei nur die Generierungsmethoden von iPS-Zellen betrachtet, die zu Beginn der hier vorliegenden Studie (April 2008) publiziert waren.

2.4 Reprogrammierungsmethoden zur Generierung induzierter pluripotenter Stammzellen

2.4.1 Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen durch retrovirale Partikel

Die Reprogrammierung von somatischen Zellen in iPS-Zellen wurde in ersten Arbeiten durch retrovirale Transduktion der Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4 und cMyc (OSKM) in murine oder humane Fibroblasten durchgeführt^{56,68,74-77}. Dazu wurden virale Partikel verwendet, die auf dem Moloney-Murines-Leukämie-Virus (MoMLV) basierten. Die eingesetzten retroviralen Vektoren bedingen eine Integration der Transgene in das Wirtsgenom teilungsaktiver Zellen. Wie frühe retrovirale Transduktionsstudien in ES-Zellen belegen, sind genomintegrierte Transgene in unreifen Zellen, wie ES-Zellen, im Allgemeinen inaktiviert, da sie von der Zielzelle methyliert werden⁷⁸. Aus diesem Grund sind vollreprogrammierte retrovirale iPS-Zellen dadurch gekennzeichnet, dass die exogen eingebrachten Reprogrammierungs-

2. Einleitung

faktoren stillgelegt sind und nur Gene des endogenen Pluripotenznetzwerkes über die autoregulatorische Schleife exprimiert werden (vgl. Abb. 2.3)⁷⁹. Eine Aktivierung der stillgelegten exogen eingebrachten retroviralen Transkriptionsfaktoren im Differenzierungsverlauf kann nicht ausgeschlossen werden.

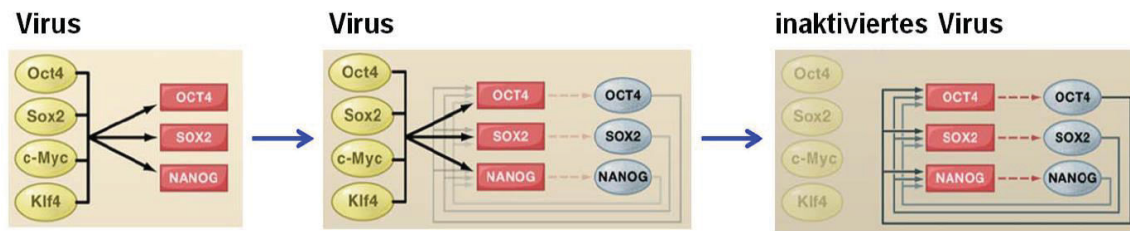


Abb. 2.3: Molekularer Kreislauf während des Reprogrammierungsprozesses. Die transduzierten viralen Pluripotenzfaktoren Oct4, Sox2, Klf4 und cMyc (OSKM) werden in der Zielzelle in Transkriptionsfaktoren translatiert. Diese können an die spezifischen Promotorbindungsstellen der endogenen Pluripotenzgene Oct4, Nanog und Sox2 binden und aktivieren. Dadurch wird im weiteren Verlauf graduell die autoregulatorische Pluripotenzschleife angeschaltet und so ein endogenes Expressionsniveau der Pluripotenzgene gewährleistet. Durch verschiedene *de novo* Methyltransferasen werden die ins Wirtsgenom viral integrierten Pluripotenzfaktoren stillgelegt. Die Pluripotenz wird nun durch die endogen exprimierten Pluripotenzfaktoren Oct4, Nanog und Sox2 aufrecht gehalten (modifiziert nach Jaenisch und Young, 2008⁶¹).

2.4.2 Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen durch lentivirale Partikel

Eine Alternative zu den MoMLV-abgeleiteten Retroviren stellen die von Lentiviren, meist vom humanen Immundefizienzvirus (HIV) abgeleiteten Vektoren dar^{57,80}. Der entscheidende Vorteil von lentiviralen gegenüber retroviralen MoMLV-Vektoren besteht in der Infektion sowohl ruhender als auch proliferierender Zielzellen, was zu einer höheren Transduktionseffizienz führt. Als nachteilig hat sich eine nicht vollständige Stilllegung der Transgene erwiesen^{79,81}, was zu chromosomalen Veränderungen führen kann⁸². Die virale Transduktion ist zur Generierung von iPS-Zelllinien hocheffizient und reproduzierbar, besitzt aber deutliche Sicherheitsrisiken für die Verwendung in der klinischen Praxis (z. B. Insertionsmutagenese, Genominstabilität, unkontrollierte Expression der exogen eingebrachten Onkogene Klf4 und cMyc im Verlauf der Differenzierung, Tumorformierung). Die Verwendung von genom-integrierenden viralen Partikeln stellt per se ein Sicherheitsrisiko für jegliche Therapieformen dar. Es ist nicht vorhersagbar, ob transplantierte transduzierte Zellen sich in einigen Patienten in kanzerogene Zellen verändern⁸³.

2.5 Transfektionsmethoden

Voraussetzung für die Reprogrammierung von somatischen Zellen in iPS-Zellen ist der effiziente exogene Transfer von Pluripotenzfaktoren in die Zielzelle durch Transfektion. Hierbei werden biologische, chemische und physikalische Methoden zur Einführung von Nukleinsäuren in die Zielzellen unterschieden. In Tabelle 2.1 sind die derzeit wichtigsten Transfektionsmethoden zusammengefasst.

2. Einleitung

Tab. 2.1 : Übersicht über die derzeit wichtigsten Transfektionsmethoden. Die dargestellten Methoden werden für die Transfektion von Nucleinsäuren eingesetzt. Alle Transfektionsmethoden können für die meisten immortalisierten, primären Zellen und Stammzellen mit unterschiedlichen Transfektionseffizienzen eingesetzt werden. Diese können in einem Bereich von wenig transfizierten Zellen bis zu einer fast 100%igen Transfektionseffizienz je nach Zellart und Transfektionsmethode liegen. Eine Testung von mehreren Transfektionsarten für die gewünschten Zielzellen ist eine grundlegende experimentelle Vorgehensweise, um die beste Transfektionseffizienz zu ermitteln. Neben den hier aufgeführten Methoden gibt es noch weitere Transfektionsarten, die jedoch nur eine untergeordnete Rolle spielen und hier nicht betrachtet werden sollen. Dabei handelt es sich um die Kalziumphosphat-Präzipitation, Mikroinjektion, Genkanone, Magnetofektion, Sonofektion, Transferrinfektion, sowie um die Antikörper-vermittelte Transfektion.

Transfektionsverfahren	Methode	Einschleusen der Nucleinsäuren in die Zielzellen	Zellen
Lipofektion	chemisch: - u. a. kationische Lipide mit amphiphilen Charakter	<ul style="list-style-type: none"> - positiv geladene Kopfgruppe interagiert spontan mit negativ geladenen Nucleinsäuren - Bildung von Lipoplexe und Integration der Nucleinsäuren^{84,85} - negativ geladene Zellmembran absorbiert positiv geladene Lipoplexe - Transport von Lipoplexen in die Zellen⁸⁵ - Freigabe der Nucleinsäuren 	<ul style="list-style-type: none"> - immortalisierte Zelllinien - primäre Zellen - Stammzellen
Kationische Polymere	chemisch: - kationische Polymere, wie Diethylaminoethyl-Dextran, Poly-L-Lysin oder Polyethylenimin (PEI) - PEI gilt als „Goldstandard“, liegt linear oder verzweigt vor - besteht aus einer Polymerkette repetitiven Ethylenimin-Gruppen mit protonierbaren Stickstoffatomen - lineares PEI: hauptsächlich sekundäre Aminogruppen substituiert - verzweigtes PEI: primäre, sekundäre und tertiäre Aminogruppen substituiert	<ul style="list-style-type: none"> - protonierbare Stickstoffatome verursachen hohe elektrostatische Bindung zu negativ geladenen Nucleinsäuren - effiziente Komplexierung der Nucleinsäuren im entstehenden Polyplex⁸⁸ - Adsorption der kationischen Polyplexe an die Zellmembran - Komplexe durch Endozytose von der Zelle aufgenommen (Schutz vor Degradation der Nucleinsäuremoleküle) - Einströmen von Chloridionen und Wasser in die Endosomen - Erhöhung des osmotischen Drucks - Ruptur der Endosomen - PEI/Nucleinsäurekomplexe werden ins Zytosol freigegeben⁸⁷ - PEI begünstigt den Transport von Nuclein- 	<ul style="list-style-type: none"> - immortalisierte Zelllinien - primäre Zellen - Stammzellen

2. Einleitung

		<p>säuren in den Nukleolus von Säugetierzellen⁸⁸ und bedingt dadurch eine sehr gute Transfektionseffizienz <i>In vitro</i>^{89,90} und <i>in vivo</i>^{91,92}</p>	
<p>Elektroporation</p>	<p>Physikalisch</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Zellmembran wird durch kurze elektrische Impulse reversibel perforiert - Pulsgeneratoren liefern konstante Spannungen über einen bestimmten Zeitraum 	<ul style="list-style-type: none"> - immortalisierte Zelllinien - primäre Zellen - Stammzellen - <i>in vivo</i> Transfektion möglich⁹³ - oft hoher primärer Zellschaden, aber sehr gute Transfektionseffizienzen selbst bei schlecht zu transfizierenden Zellen (z. B. dendritische Zellen)

2.5.1 mRNA Transfektionen

In der bahnbrechenden Arbeit von Malone und Kollegen im Jahre 1989 wurden erstmalig Zellen unterschiedlichen Ursprungs und Spezies (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila*, *Xenopus*) erfolgreich mit *in vitro*-transkribierter Boten-Ribonukleinsäure (mRNA, engl. *messenger Ribonucleic acid*) transfiziert⁹⁴. Abhängig vom Zelltyp waren die Transfektionseffizienzen auf Basis von kationischen Lipiden durchgeführten Transfektionen recht unterschiedlich. Eine ausführliche Untersuchung zur mRNA-Transfektion belegte, dass sich auch ruhende Zellen mit mRNA transfizieren lassen, wohingegen Plasmid-Desoxyribonukleinsäure (DNA, engl. *Deoxyribonucleic acid*) Transfektionen nicht mehr erfolgreich durchgeführt werden konnten⁹⁵. Im Verhältnis zur Plasmid-DNA-Transfektion ist die mRNA-Transfektion eine bis heute eher selten verwendete Methode. Die offensichtlichen Nachteile sind die schnelle Degradierung der mRNA durch RNasen, die unabhängig von Kofaktoren aktiv und ubiquitär verbreitet sind. Demgegenüber stehen deutliche Vorteile der mRNA-Transfektion. Die exogen eingebrachte mRNA wird direkt im Zytoplasma transkribiert und muss nicht, wie eine transfizierte Plasmid-DNA, erst in den Zellkern gelangen. Somit ist eine Integration in das Wirtsgenom nach dem jetzigen Forschungsstand weitestgehend ausgeschlossen und eine Insertionsmutagenese mit deren potenziellen Auswirkungen (z. B. Anschaltung von Protoonkogenen, Veränderung des natürlichen Expressionsmusters in der Zelle) außerordentlich unwahrscheinlich. Weiterhin können mit einer mRNA-Transfektion mehrere Transgene erfolgreich in die Zielzelle eingebracht und translatiert werden, wohingegen bei der Plasmid-DNA-Transfektion nur ein oder wenige Transgen(e) erfolgreich von der Zielzelle umgeschrieben werden. Schließlich können post-mitotische und auch langsam proliferierende Zellen mit mRNA effizient transfiziert werden. Eine Grundvoraussetzung für eine Plasmid-DNA-Transfektion ist hingegen, dass die Zellen proliferieren. Dies eröffnet ein hohes therapeutisches Potential für mRNA-Transfektionen. So lassen sich humane dendritische Zellen, die sich nur schlecht mit Plasmid-DNA transfizieren lassen, erfolgreich mit mRNA transfizieren, und exprimieren daraufhin therapeutisch relevante Proteine^{96,97}.

Die Vorteile der mRNA-Transfektion gegenüber der Plasmid-DNA-Transfektion lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- hohe Transfektionseffizienz auch in schlecht zu transfizierenden Zellen
- schnelle und hohe Proteinexpression nach Transfektion (Zeitvorteil)
- auch post-mitotische und langsam proliferierende Zellen können effizient transfiziert werden
- keine genomische Integration (nach jetzigem wissenschaftlichen Erkenntnisstand)
- keine Insertionsmutagenese der exogen eingebrachten Gene

- keine Entartung der transfizierten Zellen in Krebszellen aufgrund der Transfektionsmethode

2.5.2 Zytotoxische Effekte durch *in vitro*-transkribierte mRNA bei Transfektion

Durch virale Transduktionen von dsRNA^e- oder ssRNA^f-Viren in humane Zellen konnten Signalwege identifiziert werden, die eine Typ-I-Interferon (IFN)-Immunantwort auslösen. So aktiviert unter anderem virale dsRNA durch Toll-*like*-Rezeptoren (TLR) den NFκB-Signalweg⁹⁸. Dabei wird die angeborene Immunantwort durch IFN-α und IFN-β sowie andere Zytokine wie IL-6 und IL-12 aktiviert. Virale ssRNA und synthetische RNA werden durch den TLR 7 erkannt⁹⁹. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das 5'-Triphosphat von *in vitro*-transkribierter mRNA bei der Transfektion mit Lipofectamine[™] 2000 eine IFN-Immunantwort auslöst¹⁰⁰. In Monozyten kam es zu einer Sezernierung von IFN-α und in murinen embryonalen Fibroblasten von IFN-β¹⁰⁰. Die einzelsträngigen *in vitro*-transkribierten mRNA-Moleküle können basenabhängige Sekundärstrukturen ausbilden, die in den mRNA-transfizierten Spenderzellen potenziell ebenfalls eine Immunantwort auslösen¹⁰¹. Durch die Induktion einer Immunantwort in der Ausgangszellpopulation nach mRNA-Transfektionen, werden diese Zellen zusätzlich unter zytotoxischen Stress gesetzt.

2.6 Optionen zur Zelltherapie der Huntington'schen Erkrankung mit Hilfe von mRNA-iPS-Zellen

Die Huntington'sche Erkrankung ist eine autosomal dominante, chronische Erkrankung, die auf zellulären Dysfunktionen beruht und bei der es zur spezifischen Degeneration GABAerger Neuronen im zerebralen Kortex und im Striatum kommt¹⁰². Genetisch betrachtet handelt es sich bei der Huntington'schen Erkrankung um eine trinukleotidrepetierende Erkrankungen, welche durch Mutation des Basentriplets CAG im Huntingtin-Gen ausgelöst wird. Da das Basentriplett CAG für Glutamin kodiert, manifestieren sich die krankheitsauslösenden Mutationen in 36 bis 250 Glutaminwiederholungen im Huntingtin-Protein^{103,104}. Die natürliche Form des Huntingtin-Proteins weist hingegen nur 15 bis 35 Glutaminwiederholungen auf. Die physiologische Funktion des Huntingtin-Proteins ist bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt¹⁰⁵.

Symptome der Erkrankung sind unter anderem psychische Auswirkungen, fortschreitende Demenz und unkontrollierte Bewegungen (= Chorea). Die Erkrankung führt durchschnittlich innerhalb von 17 Jahren nach Ausbruch zum Tod. Wie auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen (z. B. der Alzheimer'schen und Parkinson'schen Erkrankung) kommt es bei der Huntington'schen Erkrankung zur Bildung amyloider, extrazellulärer

^e dsRNA = doppelstränge RNA (engl. *double stranded RNA*)

^f ssRNA = einzelsträngige RNA (engl. *single stranded RNA*)

2. Einleitung

Plaques, die durch Fehlfaltung von Proteinen verursacht werden. Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass der Prozess der Aggregatbildung an sich und nicht die reifen Plaques als solche toxisch sind¹⁰⁶. Essentieller Auslöser für die neuronale Degeneration scheint die Kernlokalisation des mutierten Huntingtin-Proteins zu sein^{107,108}. Bis zum jetzigen Zeitpunkt existiert keine effektive kausale Therapie für die Huntington'sche Erkrankung, lediglich die Symptome werden behandelt¹⁰⁹.

Erste Transplantationsversuche mit humanem fetalem Gewebe wurden in den 1990ern bei Patienten der Parkinson'schen¹¹⁰ wie auch der Huntington'sche Erkrankung¹¹¹ durchgeführt. Bei beiden Erkrankungen konnten bei den transplantierten Patienten eine deutliche Verbesserung der klinischen Symptome innerhalb der ersten Jahre festgestellt werden, welche durch post-mortem Analysen der transplantierten Gehirnabschnitte verifiziert wurden^{110,111}. Dieser optimistische Transplantationsverlauf konnte in Langzeitstudien nicht reproduziert werden. Nach mehr als zehn Jahren wiesen die transplantierten Gehirnregionen massive krankheitsspezifische, neurodegenerative Merkmale in beiden Krankheitsfällen auf¹¹²⁻¹¹⁴.

Die Verwendung von humanen fetalen oder neuralen Stammzellen als Grundlage für die Zellersatztherapie führte, wie bei den humanen ES-Zellen, zu einer ethischen Debatte um deren Ursprung. Weiterhin werden große Mengen an zu transplantierenden Zellen benötigt¹¹⁵, wobei ein ausreichender Zugang an erforderlichen Ausgangszellmaterial nicht gewährleistet werden kann. Aus diesen Gründen sind iPS-Zellen eine vielversprechende Alternative für eine Stammzellersatztherapie.

In vivo Studien belegen erste Erfolge mit aus iPS-Zellen differenzierten Neuronen, welche in Rattenmodelle der Parkinson'schen Erkrankung transplantiert wurden¹¹⁶. Die transplantierten Zellen integrierten sich funktionell in die untersuchten Gehirnregionen. Weiterhin war eine bemerkenswerte Verbesserung der Symptomatik beobachtet worden. Diese Studie gibt Hoffnung, dass es auch für andere neurodegenerative Erkrankungen, wie die Huntington'sche Erkrankung, mit Hilfe von differenzierten neuralen Vorläuferzellen aus iPS-Zellen eine erfolgsversprechende Therapieform geben könnte. Die Herstellungsmethoden der iPS-Zellen sind ein kritischer Punkt für eine mögliche klinische Verwendung der iPS-Zellen beziehungsweise deren differenzierte Derivate. Die hier dargelegte Studie soll die Grundlage bereiten, damit differenzierte Zellen aus iPS-Zellen zur klinischen Anwendung kommen können.

2.7 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine nicht-integrierende Methode zur Herstellung humaner, gesunder und patientenspezifischer iPS-Zellen zu entwickeln. Durch die Methodik der mRNA-Transfektion mit unmodifizierten mRNA-Molekülen der Reprogrammierungsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4, Nanog, cMyc und hTERT (zusammenfassend OSKNMT) sollten vollreprogrammierte iPS-Zellen generiert werden. Um die Methode der Reprogrammierung für das eigene Forschungslabor zu etablieren, sollte zunächst das aus der Literatur bekannte Reprogrammierungsverfahren der retroviralen Transduktion als Vergleichsmethodik durchgeführt werden. Dabei sollte auch hier erstmalig die Faktorenkombination OSKNMT zur Anwendung kommen. Durch diese Zusammenstellung von Reprogrammierungsfaktoren sollte es zu einer Verkürzung der Reprogrammierungszeit von humanen Fibroblasten in iPS-Zellen kommen können. Die erhaltenen praktischen Erfahrungen während der frühen Phase der viralen Reprogrammierung sind wichtige Voraussetzungen zur Etablierung und Beurteilung von neuen nicht-integrierenden Reprogrammierungsverfahren (u. a. Beurteilung der morphologischen Veränderungen der Spenderzellen hin zu iPS-Zellen). Aus diesem Grund wurden eigene virale iPS-Zelllinien aus humanen Fibroblasten generiert.

Bei Beginn dieser Arbeit standen für die Transfektion von mRNA keine standardisierten Protokolle zur Verfügung. Aus diesem Grund sollten verschiedene Transfektionsmethoden vergleichend analysiert werden. Es sollten mRNA-iPS-Zelllinien von Fibroblasten aus gesunden Spendern und Huntington-Patienten generiert werden. Weiterhin sollte überprüft werden, ob es möglich ist, mRNA-iPS-Zelllinien ohne die Verwendung potentieller Onkogene wie Klf4, cMyc und hTERT zu generieren.

Daraus ergeben sich zusammenfassend folgenden Fragestellungen für diese Doktorarbeit:

- (1) Führt die Verwendung der Reprogrammierungsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4, Nanog, cMyc und hTERT (zusammenfassend: OSKNMT) bei der virusinduzierten Herstellung von iPS-Zellen aus Fibroblasten von Huntingtonpatienten zu einer Verkürzung der Reprogrammierungszeit?
- (2) Führen wiederholte mRNA-Transfektionen der Spenderzellen mit unterschiedlichen Zusammenstellungen von Pluripotenzfaktoren zur Entstehung von mRNA-iPS-Kolonien?
- (3) Ist es möglich, bei der mRNA-Reprogrammierung von Fibroblasten von Huntingtonpatienten auf die Onkogene Klf4, cMyc und hTERT zu verzichten?
- (4) Weisen die mRNA-iPS-Zellkolonien alle Charakteristika der Pluripotenz auf?

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Allgemeine zellbiologische Methoden

3.1.1.1 Kultivierung von Zelllinien und primären Zellen

Die *in vitro* Kultivierung von Zelllinien und primären Zellen erforderte einen Austausch des Wachstumsmediums aller zwei bis drei Tage und ein regelmäßiges Ausdünnen der proliferierenden Zellen. Beim Passagieren der adhärennten Zellen wurde das verbrauchte Wachstumsmedium abgesaugt, die Zellen mit einfach phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, engl. *phosphate buffered saline*) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und enzymatisch mit einer 0,025%igen Trypsinlösung von der Wachstumsoberfläche abgelöst. Für eine optimale enzymatische Reaktion wurden die Zellen für 5 min im Zellinkubator (37 °C/21 % O_2 /5 % CO_2 /95 % Luftfeuchte) inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von Wachstumsmedium, welches 10%iges fetales Kälberserum (FKS) enthielt, gestoppt. Dafür wurden die Zellen in diesem Medium suspendiert, in entsprechende Polypropylen-Röhrchen (PP-Röhrchen) überführt und durch Zentrifugation bei 200 x g für 5 min bei Raumtemperatur (RT) pelletiert. Der Mediumüberstand wurde vollständig abgesaugt und das Zellpellet in frischem Wachstumsmedium suspendiert. Die Zellen wurden entsprechend der Zellart 1:3 bis 1:10 ausgedünnt und in neue Zellkulturflaschen eingesät. Detaillierte Angaben zu den verwendeten Wachstumsmedien der entsprechenden Zellen sind im Anhang unter Kapitel 7.5.3 angegeben. Zu Beginn der zellbiologischen Arbeiten wurden alle Medien, Puffer und enzymatische Lösungen, wenn nicht anderes angegeben, vor dem Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 durchgeführt. Die Zellen wurden in Zellinkubatoren bei 37°C, 5 % CO_2 und einer humiden Umgebung kultiviert. Die routinemäßige Zellkultivierung fand bei einer 21%igen Sauerstoffkonzentration statt. Die Sauerstoffkonzentration wurde auf 5 % reduziert beim Reprogrammierungsprozess in iPS-Zellen und deren Erhaltungskultivierung.

3.1.1.2 Kryokonservierung und Revitalisierung von eukaryotischen Zellen

Durch die Verwendung eines Kryoprotektants wie z. B. Dimethylsulfoxid (DMSO) können eukaryotische Zellen über einen längeren Zeitraum in der Gasphase eines Stickstofftanks gelagert werden. Zur Kryokonservierung wurden die adhärennten Zellen, wie in Kapitel 3.1.1.1 beschrieben, abgelöst. Nach der Zellzahlbestimmung (siehe Kapitel 3.1.1.3) wurden die Zellzahlen auf $1-5 \times 10^6$ Zellen pro ml Einfriermedium (90 % FKS/10 % DMSO v/v) eingestellt. Anschließend wurde jeweils 1 ml Zellsuspension in entsprechende Einfriergefäße pipettiert und in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter (*Nalgene® Mr. Frosty*) mit einer

Kühlungsrate von 1 °C/min auf -80 °C eingefroren und über Nacht gelagert. Am Folgetag wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in die Gasphase des Stickstofftanks überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen zügig aus dem Stickstofftank entnommen und für 3 min in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt. Anschließend wurde das aufgetaute Zellgemisch in vorgewärmtes Wachstumsmedium suspendiert, in ein mit 10 ml Wachstumsmedium befülltes PP-Röhrchen überführt und durch Zentrifugation pelletiert. Die Zellen wurden wie unter 3.1.1.1 beschrieben in Zellkulturflaschen eingesät.

3.1.1.3 Zellzählung

Die Zellzahlbestimmung wurde mit Hilfe der Neubauerzählkammer durchgeführt. Durch eine Vitalfärbung mit Trypanblau können lebende von geschädigten Zellen unterschieden werden. Zur Bestimmung der Zellzahlen wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblaulösung gemischt und in einer Neubauerzählkammer analysiert.

3.1.2 Zellkultur von humanen pluripotenten Stammzellen

Da keine Erfahrung mit der Kultivierung und Herstellung von humanen pluripotenten Stammzellen vorlag, wurden alle Methoden zur Herstellung und Analyse der pluripotenten Stammzellen während dieser Doktorarbeit etabliert. Diese werden bezüglich ihrer Resultate im Ergebnisteil als Vorversuche näher beschrieben.

3.1.2.1 Zellquellen und Ethikvoten

Zur Generierung von humanen Vorhautfibroblasten wurde die Möglichkeit der Isolierung aus Vorhautbiopsien gewählt. Patienten mit einer diagnostizierten Phimose, die an der Universitätskinderklinik Leipzig operiert wurden, dienten als Spender. Die Eltern der Patienten wurden gründlich über die weitere Verwendung der Biopsien informiert. Nach deren Unterzeichnung des Aufklärungsbogens wurden die Proben dem Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie (Fraunhofer IZI) in Leipzig zur Verfügung gestellt. Ein entsprechendes positives Votum der Ethikkommission der Universität Leipzig lag vor (Nr.: 054-09/09032). Humane Vorhautfibroblasten wurden für die Kultivierung von humanen iPS-Zellen als Ammenzellen, sogenannte Feederzellen, verwendet. Die Gewinnung (und Kultivierung) von adulten humanen Fibroblasten als Feederzellen sowie die Generierung von iPS-Zellen von Huntingtonpatienten wurde auf Basis des Ethikvotums der Universitätsklinik Freiburg durchgeführt. Die Isolierung der Fibroblasten fand im Labor von Prof. Dr. Nikkhah und Dr. Piroth (Universitätsklinikum Freiburg, Institut für stereotaktische Neurochirurgie) statt. Dem Fraunhofer IZI wurden gefrorene Zellaliquots von zwei Spendern (max. Passage zwei) zur Verfügung gestellt. Eine entsprechende Materialüberlassungsvereinbarung lag vor. Im Tierantrag (Nr.: T98/08) wurden alle Arbeiten an murinen primären Zellen genehmigt.

3.1.2.2 Fibroblasten für die humane iPS-Zellkultur

3.1.2.2.1 Präparation von primären humanen Fibroblasten aus Vorhautbiopsien

Zur Isolierung der humanen Fibroblasten wurden die entnommenen Vorhautbiopsien direkt nach der Operation in PBS, welches eine 1%ige Penicillin/Streptomycinlösung enthielt, überführt und bei 4 °C gelagert. Die Aufarbeitung erfolgte grundsätzlich am Tag des Eingriffs. Die Biopsien wurden dafür erneut unter sterilen Bedingungen im Labor in PBS (mit 1%ige Penicillin/Streptomycinlösung) gewaschen und direkt auf einer Zellkulturplatte (Wachstumsfläche = 145 mm²) mit einem sterilen Skalpell in gleichmäßige Stücke zerkleinert (ca. 5 mm Größe). Diese Hautstücke wurden für 15 min unter der Sterilbank mit einem laminaren Luftstrom angetrocknet und dann mit 25 ml vorgewärmten Fibroblastenmedium vorsichtig überschichtet. Am folgenden Tag wurden die Kulturen auf eine mögliche Bakterien- und/oder Pilzkontamination kontrolliert und das Medium gewechselt. Innerhalb von fünf bis sieben Tagen wuchsen aus den Hautbiopsien adhärente primäre Fibroblasten aus. Die verbliebenen Hautstücke wurden mit einer Pinzette aus der Wachstumskultur entfernt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die humanen Fibroblasten entweder kryokonserviert (vgl. Kapitel 3.1.1.2) oder weiter kultiviert. Humane Fibroblasten wurden zur Reprogrammierung in iPS-Zellen (bis Passage vier) oder als Feederzellen (bis Passage zehn) verwendet.

3.1.2.1.2 Isolierung von primären murinen Fibroblasten

Zur Isolierung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) wurde der Mausstamm C57/BL6 verwendet. Am 13,5 Tag *post coitum* wurden die Feten aus den trächtigen Muttertieren entnommen. Dazu wurden die toten Muttertiere rasiert, durch Absprühen mit 70%igem Ethanol sterilisiert und der Bauchraum eröffnet. Die Uterushörner wurden herausgetrennt und in eine mit PBS gefüllte Petrischale überführt. Unter der Sterilbank wurden anschließend die Embryonen aus den Uterushörnern präpariert und die Reste der Plazenta sorgfältig entfernt. Die Embryonen wurden dekapitiert und die sogenannten roten Gewebe (Milz, Leber, Herz) entfernt. Nach Überführung der Präparate in eine zweite Petrischale wurde das verbliebene Gewebe mit einem Skalpell zerkleinert und anschließend durch 20-minütige Inkubation in einer 0,25%igen Trypsinlösung bei 37 °C dissoziiert. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt, die enzymatische Reaktion mit FKS-haltigem Fibroblastenmedium gestoppt und die Zellsuspension zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Fibroblastenmedium suspendiert, Zellen von fünf Embryonen in eine 145 mm² Petrischale in Fibroblastenmedium ausgesät und im Zellinkubator über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Kulturen auf eine mögliche Bakterien- und/oder Pilzkontamination kontrolliert. Weiterhin wurde ein Medienwechsel durchgeführt, um die in der Suspension befindliche Erythrozyten zu entfernen. Die MEFs wurden bis Passage zwei kryokonserviert oder bis Passage drei zur mitotischen Inaktivierung weiter kultiviert (Kapitel 3.1.2.3).

3.1.2.3 Mitotische Inaktivierung von Fibroblasten

Pluripotente Stammzellen sind auf die Kokultivierung mit mitotisch inaktivierten murinen oder humanen Fibroblasten als Feederzellen zur Erhaltung der Pluripotenz angewiesen. Eine mitotische Inaktivierung ist erforderlich, da sonst die Fibroblasten die pluripotente Stammzellkultur überwuchern würden.

3.1.2.3.1 Mitotische Inaktivierung von humanen Fibroblasten durch γ -Bestrahlung

Humane Vorhautfibroblasten wurden bis Passage zehn nach γ -Bestrahlung zur Herstellung von humanen Feederzellen verwendet. Hierzu wurden die Zellen trypsinisiert, in frischem Fibroblastenmedium suspendiert, ausgezählt und in 50 ml PP-Röhrchen überführt. Zur mitotischen Inaktivierung wurden die humanen Fibroblasten mit 25 Gy für 10 min röntgenbestrahlt. Die Bestrahlung fand am Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Leipzig in einem IBL437C Bestrahlungsgerät statt. In ersten Experimenten wurde der Erfolg der Inaktivierung mittels Wachstumsüberprüfung festgestellt.

3.1.2.3.2 Mitotische Inaktivierung von humanen Fibroblasten durch Mitomycin C

Eine weitere Möglichkeit der mitotischen Inaktivierung von eukaryotischen Zellen ist die Behandlung mit Mitomycin C. Dazu wurden die Fibroblasten in einer Dichte von $1,8 \times 10^4$ Zellen/cm² ausplattiert. Nach einer zweistündigen Inkubation im Zellinkubator konnte mit der Inaktivierung begonnen werden, da Fibroblasten nach diesem Zeitraum adhärent sind. Zur Inaktivierung wurde das Medium abgesaugt und durch frisches Fibroblastenmedium, welches mit 10 μ g/ml Mitomycin C versetzt war, ersetzt. Es folgte eine zweieinhalbstündige Inkubation zur Proliferationshemmung mit anschließendem dreimaligem Waschen in PBS. Die Zellen wurden für eine Langzeitlagerung bis zur Verwendung als Feederzellen kryokonserviert.

3.1.3 Generierung von humanen iPS-Zellen

3.1.3.1 Generierung von iPS-Zellen durch retrovirale Transduktion

Zur Reprogrammierung von humanen Fibroblasten in iPS-Zellen wurden die Plasmide pMXs-hOct3/4, pMXs-Sox2, pMXs-Klf4, pMXs-hNanog, pBabe-hygro-hTERT und pBabe-c-myc-zeo verwendet. Als Positivkontrolle zur Überprüfung der Transduktionseffizienz diente das pRVH1-eGFP-Plasmid (eGFP, engl. für *enhanced green fluorescent protein*, freundlicherweise von Dr. Brinckmann vom Institut für Virologie des Universitätsklinikums Leipzig zur Verfügung gestellt) genutzt. Im weiteren Abschnitt werden diese Plasmide als Transfervektoren bezeichnet.

3. Methoden

In der Phoenix-GP-Zelllinie (freundlicherweise von Dr. Brinckmann vom Institut für Virologie des Universitätsklinikums Leipzig zur Verfügung gestellt) ist der *gag-pol*-Bereich⁹ des MoMLV stabil integriert. Durch die Kotransfektion der Transfervektoren mit einem Pseudotypingplasmid (pHIT G), welches die Proteinsequenzen des vesikulären Stomatitis-virusproteins G (VSV-G) exprimiert, können retrovirale Partikel in der Phoenix-GP-Zelllinie produziert werden. Phoenix-GP-Zellen wurden am Vortag der Kotransfektion in einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen/cm² ausplattiert. Zur Komplexbildung wurden pro cm² Wachstumsfläche 0,75 µl Lipofectamin™ 2000, 1,8 µg Transfervektor und 1 µg Pseudotypingvektor in 100 µl OptiMem® I suspendiert und für 20 min bei RT inkubiert. In der Inkubationszeit wurde das Wachstumsmedium von den Phoenix-GP-Zellen entfernt, die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und mit 250 µl OptiMem® I/cm² für die Transfektion überschichtet. Der Transfektionskomplex wurde tropfenweise zu den Phoenix-GP-Zellen pipettiert. Die Phoenix-GP-Zellen wurden für 4 h im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde nährstoffärmeres Medium (DMEM: Glukosegehalt 1 g/l, 5 % FKS) eingesetzt zu 0,2 ml/cm². Nach 48 h wurden die Überstände mit den Viruspartikeln für die einzelnen Reprogrammierungsfaktoren abgenommen, zu gleichen Verhältnissen gemischt und durch einen 0,45 µm Zellulose-Acetat-Filter in ein geeignetes PP-Röhrchen gefiltert. In das PP-Röhrchen wurde entsprechend der Gesamtmenge des Virusüberstandes Polybrene in einer Endkonzentration von 4 µg/ml zugefügt und anschließend suspendiert. Die zu transduzierenden Spenderzellen (= humane Fibroblasten) wurden 24 h vor dem Tag der Transduktion in einer Menge von 1×10^5 Zellen pro Well (Well, engl. für Schale, Vertiefung) einer 6-Well-Platte ausplattiert. Am Tag der Transduktion sollten die Spenderzellen eine Konfluenz von 50-90 % aufweisen. Die Virusüberstände mit dem zugesetzten Polybrene wurden vorsichtig auf die Spenderzellpopulation pipettiert. Anschließend wurden die 6-Well-Platten zur Erhöhung der Transduktionseffizienz zentrifugiert (200 x g/1,5 h/22 °C). Danach wurden die Viruspartikel von den Zellen entfernt und durch frisches Fibroblastenmedium ersetzt. Nach 48 h Inkubationszeit wurden die transduzierten Zellen auf mitoseinhibierte humane Feederzellen passagiert (von 9,6 cm² auf 58 cm² Wachstumsfläche) und das Fibroblastenmedium durch iPS-Zellmedium ersetzt. Nach dem Passagieren wurden die transduzierten Zellen in einen Zellinkubator mit 5 % O₂ überführt und weiter kultiviert.

3.1.3.2 Herstellung von iPS-Zellen durch mRNA-Transfektion

3.1.3.2.1 Transfektion von mRNA durch Elektroporation

Bei der elektroporetischen Transfektion kam die Nucleofector®-Technologie (Lonza) zum Einsatz. Mit Hilfe des Elektroporationsgeräts Nucleofector® I können verschiedene Primär-

⁹ *gag* kodiert für das Kapsidprotein, *pol* kodiert für die reverse Transkriptase

und Stammzellen transfiziert werden. Für die Elektroporation mit *in vitro*-transkribierter mRNA (IVT-mRNA) wurden proliferierende humane Fibroblasten bis Passage vier verwendet. Am Tag der Transfektion wurden die adhärent wachsenden Zellen wie in Kapitel 3.1.1.1 beschrieben vom Zellkulturboden abgelöst, zweimal mit PBS gewaschen und gezählt. Pro Elektroporation wurden 8×10^5 Zellen eingesetzt und in 100 μ l Nucleofector®-Lösung suspendiert. Die Nucleofector®-Lösung wurde vor Gebrauch auf RT äquilibriert. Die auf Eis gelagerte IVT-mRNA wurde in einer Gesamtkonzentration von 5 μ g zügig zu der Zellsuspension pipettiert.

Für die Elektroporation existieren verschiedene Voreinstellungen und Protokolle. Laut Hersteller erzielt das Elektroporationsprogramm U-23 eine hohe Transfektionseffizienz für humane Fibroblasten, dies hat aber hohe primäre Zellschäden zur Folge. Mit dem Elektroporationsprogramm P-22 ist die Überlebensrate der Zellen höher, es wird aber nur eine geringere Transfektionseffizienz erzielt. In dieser Arbeit wurde mit dem Elektroporationsprogramm U-23 gearbeitet, um eine möglichst hohe Transfektionseffizienz zu erzielen. Nach der Elektroporation wurde die Zellsuspension (ca. 8×10^5 Zellen) auf eine Wachstumsfläche von 19 cm² ausplattiert (entspricht zwei Wells einer 6-Well-Platte) und in Fibroblastenmedium kultiviert. Nach einer vierstündigen Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit neuem Fibroblastenmedium überschichtet. Anschließend wurden die mRNA-transfizierten Zellen bei 5 % O₂ kultiviert.

3.1.3.2.2 mRNA Transfektion mit FuGENE® HD, PEI – Exgene 500 und *TransIT®-mRNA Transfection Kit*

Die Transfektionsreagenz FuGENE® HD, ein nichtliposomales Transfektionsreagenz, wurde zu Beginn der experimentellen Arbeiten von Roche bezogen. Es wurden jedoch auch andere Transfektionsreagenzien auf ihre Eignung zur IVT-mRNA-Transfektion getestet. Das PEI-Exgene 500 Reagenz (Thermo Scientific) basiert auf einem 22 kDA großen, linearisierten Polyethylenimine-Molekül (PEI). Weiterhin wurde mit dem *TransIT®-mRNA Transfection Kit* der Firma Mirus gearbeitet. Im Vorfeld wurden alle Lösungen nach Herstellerprotokollen auf RT äquilibriert. Alle verwendeten Labormaterialien waren RNase/DNase-frei. Zur Übersicht wurden die Abläufe der mRNA-Transfektionen mit den oben aufgeführten Transfektionsreagenzien in Tabelle 3.1 dargestellt.

3. Methoden

Tab. 3.1: Übersicht über die Transfektionsprozesse mit IVT-mRNA. Es wurden zur mRNA-Transfektion die Transfektionsreagenzien FuGENE® HD, PEI - Exgene500 in vitro Transfection Reagent-Kit und TransIT®-mRNA Transfection Kit verwendet.

	FuGENE® HD	PEI - Exgene 500	TransIT®-mRNA Transfection Kit
Konfluenz der humanen Fibroblasten	- 60-90 %	- 80-90 %	- 80-90 %
Vorbereitung für Transfektion	- Entfernung des Wachstumsmediums - Waschen mit PBS - Zugabe von 0,21 ml/cm ² OptiMem® I	- Entfernung des Wachstumsmediums - Waschen mit PBS - Zugabe von 0,26 ml/cm ² OptiMem® I	- Entfernung des Wachstumsmediums - Waschen mit PBS - Zugabe von 0,26 ml/cm ² OptiMem® I
Transfektionskomplexbildung	- 10,53 µl/cm ² OptiMem® I in Reaktionsgefäß vorlegen - Zugabe von 0,84 µl/cm ² FuGENE® HD, kurz vortexen - Zugabe von 0,21 µg/cm ² mRNA, mischen - 15 min bei RT inkubiert	- 52,63 µl/cm ² 150 mM NaCl in Reaktionsgefäß vorlegen - Zugabe von 0,84 µl/cm ² PEI, kurz vortexen - Zugabe von 0,53 µg/cm ² mRNA, mischen - 10 min bei RT inkubiert	- 26,32 µl/cm ² OptiMem® I in Reaktionsgefäß vorlegen - Zugabe von 0,26 µg/cm ² mRNA, mischen - Zugabe von 0,53 µl/cm ² mRNA-Boost Reagenz und 1,05 µl/cm ² TransIT-mRNA Reagenz - 5 min bei RT inkubiert
Auftrag des Transfektionskomplexes	- tropfenweise Zugabe zu den Zielzellen		
Inkubationszeit im Zellinkubator	- 4 h		
Entfernung des Transfektionskomplexes	<ul style="list-style-type: none"> - Absaugen des Medium - Waschen mit PBS - Ersetzen mit iPS-Medium 		

3.1.4 Humane iPS-Zellkultur

3.1.4.1 Vorbereitung von Feederzellschalen für die Kultivierung von humanen iPS-Zellen

Zur Vorbereitung der Aussaat von Feederzellen wurden Zellkulturschalen (\varnothing 6 cm oder 3,5 cm) mit 0,1%iger Gelatine in PBS ($120 \mu\text{l}/\text{cm}^2$) beschichtet und für 30 bis 60 min im Zellbrutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde die 0,1%ige Gelatine abgesaugt und mitose-inhibierte Feederzellen (siehe Kapitel 3.1.2.3) ausplattiert. Auf Basis von Ergebnissen aus Optimierungsversuchen (Daten nicht gezeigt) wurden pro cm^2 Wachstumsfläche 1×10^4 humane Fibroblasten als Feederzellen in Fibroblastenmedium eingesät. Innerhalb von 24 h wurden diese Feederzellschalen für die Passagierung von iPS-Zellen verwendet.

3.1.4.2 Entfernung von differenzierten Kolonien oder differenzierten Zellen innerhalb von iPS-Kolonien

Auch unter optimalen Kultivierungsbedingungen (u. a. abhängig von der Variabilität der Feederzellen) weisen pluripotente Stammzellen eine gewisse Rate an Spontandifferenzierung auf. Befinden sich in einer Kultur differenzierte Zellen, so müssen diese manuell entfernt werden.

Zur Entfernung von Kolonien differenzierter Zellen oder einzelnen differenzierten Zellen wurde mit Hilfe eines Mikroskops (Leica, Vergrößerung 1,25 x oder 5 x) unter einer sterilen Werkbank gearbeitet. Die differenzierten Kolonien und/oder Zellen wurden mit einer 27 G Kanüle aus dem Feederzellrasen ausgeschnitten und mit einer $100 \mu\text{l}$ Mikroliterpipette aus der iPS-Kultur entfernt. Auf diese Weise konnten auch einzelne Bereiche in den iPS-Kolonien vorsichtig entfernt werden. Die iPS-Zellkulturen wurden mikroskopisch täglich auf differenzierte Bereiche innerhalb der iPS-Zellkultur inspiziert.

3.1.4.3 Passagieren humaner iPS-Zellen

Humane iPS-Zellen sollten äquivalent zu humanen ES-Zellen in kleinen Zellverbänden kultiviert und passagiert werden. Dadurch wird die Rate der Spontandifferenzierung verringert (vgl. Kapitel 3.1.4.2). Zum Passagieren von Zelllinien wird routinemäßig Trypsin/EDTA verwendet, was aber bei humanen PS-Zellen zu Veränderungen der Chromosomenstabilität führen kann¹¹⁷. Die humanen PS-Zellen können mit Kollagenase IV oder Dispase auf enzymatischem Weg dissoziiert und von dem Feederzellrasen abgelöst werden. Die zeitaufwändigere Methode des manuellen Passagierens wird aber als überlegene Methode im Hinblick auf die Reduktion von spontanen Differenzierungen angesehen. Studien belegten außerdem, dass ein weiterer Vorteil des mechanischen Passagierens die Erhöhung der Chromosomenstabilität ist^{117,118}. Darüber hinaus konnte in diesen Studien gezeigt werden, dass eine Stabilität des Karyotyps in frühen und späten Passagen von humanen ES-Zellen nur unter mechanischem Passagieren erreicht wird. Bei der Generierung von iPS-Zellen sollte in den ersten Wochen völlig auf enzymatisches

3. Methoden

Passagieren verzichtet werden, da sich die Zellen noch in der Etablierungsbeziehungsweise Postreprogrammierungsphase (vgl. Kapitel 3.4.10) befinden. Erst ab Passage zehn kann eine abwechselnde mechanische und enzymatische Passagierung der humanen iPS-Zellen erfolgen (persönliche Mitteilungen: Dr. Schröder, Translationszentrum für Regenerative Medizin, Leipzig; Dr. Kim, Stem Cell Core Facility, Johns Hopkins University, Baltimore, USA). Eine Unterscheidung in „Erhaltungskultur“ (= kleine Anzahl von Kolonien unter rein mechanischem Passagieren) und „Arbeitskultur“ (= Expandieren der Koloniezahlen durch enzymatisches Passagieren für die erforderlichen Experimente) ist eine zeiteffiziente und gleichzeitig sichere Kultivierungsstrategie.

3.1.4.3.1 Manuelles Passagieren von iPS-Kolonien

Das Wachstumsmedium für humane iPS-Zellen wurde täglich erneuert. Humane iPS-Zellen wurden in Abständen von fünf Tagen passagiert. Gegebenenfalls wurden zunächst differenzierte iPS-Zellen (vgl. Kapitel 3.1.4.2) aus der iPS-Zellkultur manuell entfernt. Im Anschluss wurde das verbrauchte iPS-Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurde frisches iPS-Medium auf die Zellen pipettiert. Unter dem Mikroskop wurde mit einer 27 G Kanüle oder sterilisierten Rasierklinge die Kolonien in rechteckige, gleichmäßige Kolonieteile zerkleinert. Mit Hilfe einer 100 µl Mikroliterpipette wurden die vereinzelt Kolonieteile von den Feederzellen abgelöst und auf eine neue Feederzellschale (vgl. Kapitel 3.1.2.3) überführt. Von den neuen Feederzellschalen war vor dem Passagieren das Fibroblastenmedium entfernt, die Feederzellen mit PBS gewaschen und durch iPS-Medium ersetzt worden.

3.1.4.3.2 Enzymatisches Passagieren von iPS-Zellen mit Kollagenase IV

Zur enzymatischen Passagierung von humanen iPS-Zellen wurde das iPS-Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde eine Kollagenase IV-Lösung (1 mg/ml Kollagenase IV in DMEM/F12) zu den iPS-Zellen pipettiert und diese bei 37 °C für 10 min inkubiert. Sobald die Kolonien sich von den Feederzellen zu lösen begannen, wurde die Enzymlösung vorsichtig entfernt und iPS-Medium auf die Wachstumsschale pipettiert. Die iPS-Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren suspendiert und in ein mit 10 ml iPS-Medium gefülltes 15 ml PP-Röhrchen überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in iPS-Medium suspendiert.

3.1.5 Zellbiologische Analysemethoden

3.1.5.1 Multikeimblattdifferenzierung humaner iPS-Zellen durch spontane EB-Formierung

Für die spontane Differenzierung *in vitro* mussten die humanen iPS-Zellen von den Feederzellen separiert werden. Um feederzellfreie iPS-Zellen zu erhalten, wurden die Kulturen mit Kollagenase IV-Lösung passagiert (vgl. Kapitel 3.1.4.3.2) und auf gelatine-

beschichtete Schalen überführt. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37 °C adhären die Feederzellen und die iPS-Zellen verbleiben in Suspension. Im Anschluss wurde das Medium mit den iPS-Zellen abgenommen, in ein PP-Röhrchen überführt und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in EB-Medium suspendiert und in Bakterienchalen überführt. Die Zellen verbleiben in Suspension, da Bakterienchalen über keine Beschichtung zum Anheften von Zellen verfügen. Die Kultivierung zur spontanen Differenzierung wurde in Zellinkubatoren mit 21 % O₂ weitergeführt. Jeden zweiten Tag wurden das EB-Medium ersetzt und im Medium schwimmende Aggregate in ein PP-Röhrchen überführt. Die Aggregate wurden so lange bei RT inkubiert, bis sie durch die Gravitationskraft abgesunken waren. Das EB-Medium wurde dann vorsichtig abgenommen, durch frisches Medium ersetzt und die EBs fünfmal schonend suspendiert, um keine Aggregate zu zerstören. Anschließend wurden die EBs in eine neue Bakterienchale überführt. Die spontane Differenzierung wurde für neun Tage durchgeführt.

3.1.5.2 Direkte *in vitro* Differenzierung humaner iPS-Zellen als Zellrasen

Die Zellzahl feederfreier iPS-Zellen wurde bestimmt (vgl. Kapitel 3.1.1.3) und 1×10^4 Zellen/cm² in gelatinebeschichtete Zellkulturschalen ausgesät. Entsprechend der Differenzierungsansätze wurde die Zellen für 14 Tage in spezifischen Induktionsmedien zur Differenzierung in chondrale, hepale und neurale Vorläuferzellen kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte aller zwei Tage. Im Verlauf der hepalen Differenzierung wurde für sieben Tage das hepale Vorläuferinduktionsmedium I verwendet, welches für danach für weitere sieben Tage durch das hepale Vorläuferinduktionsmedium II ersetzt wurde. Im Gegensatz zur iPS-Zellkultivierung wurden die zu differenzierenden Zellen in einem Zellinkubator mit einem 21%igen O₂-Gehalt kultiviert. Eine detaillierte Beschreibung der Induktionsmedien ist unter 7.5.3 dargestellt. Die Etablierung der Differenzierungsprotokolle wurde von Frau Mandy Berndt (Fraunhofer IZI) im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt. Die Betreuung der Diplomarbeit von Frau Berndt war Teil dieser Dissertation.

3.1.6 MTT-Test

3.1.6.1 Prinzip des MTT-Test

Die Anzahl an vitalen Zellen kann nach einer experimentellen Behandlung mit einer Chemikalie oder nach einer Transfektion mit einem Zytotoxizitätstest bestimmt werden. Mit Hilfe des kolorimetrischen MTT-Tests werden die zu untersuchenden Zellen mit dem wasserlöslichen gelben Tetrazoliumsalz MTT behandelt. In lebenden Zellen kommt es durch membrangebundene, mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen zu einer Umsetzung in blau-violette, wasserunlösliche Formazankristalle. Diese werden in einem weiteren Schritt solubilisiert und mit Hilfe eines Spektrophotometers vermessen.

3.1.6.2 Durchführung des MTT-Test

Zur Vitalitätsbestimmung von Fibroblasten nach mehrmaliger mRNA-Transfektion wurde das Fibroblastenmedium abgesaugt und durch frisches Medium (500 µl) mit 50 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS, vgl. Kapitel 7.3.1) ersetzt. Es folgte eine vierstündige Inkubation bei 37 °C. Im Anschluss wurde das Medium erneut abgesaugt, 500 µl MTT-Stopp-Lösung (vgl. Kapitel 7.3.1) zugegeben und unter Schütteln für 30 min bei RT inkubiert. Die Absorption des gebildeten Formazans in den Wells wurde mit Hilfe eines Plattenphotometers (Tecan Infinite®-Photometer) bei einer Testwellenlänge von 550 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm bestimmt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien

Bakterien haben die natürliche Fähigkeit zur Aufnahme von Plasmid-DNA. Zur Herstellung der chemisch kompetenten *Escherichia coli* XL-10Gold Bakterien (XL-10Gold Bakterien) diente ein modifiziertes Protokoll nach Hanahan¹¹⁹. Die Bakterien wurden durch die in den in den Puffern Tfp I und Tfp II enthaltenden überschüssigen Ionen transformationskompetent gemacht. Es wurde eine Übernachtskultur in 5 ml LB-Medium (= Luria Bertani Medium) ohne Antibiotika angelegt. Die Bakterien wurden dafür bei 37 °C und 220 rpm im Bakterien-schüttler kultiviert. Von dieser Vorkultur wurden am folgenden Tag 1 ml Bakteriensuspension in 100 ml frisches LB-Medium ohne Antibiotika überführt. Die Überprüfung der Wachstumsgeschwindigkeit wurde am Spektrophotometer kontrolliert. Die optimale Wachstumsphase war bei einer OD₅₉₅ von 0,2 bis 0,3 erreicht. Im Folgenden wurden die Bakterien zügig bei 690 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Während der nächsten experimentellen Schritte wurden die Bakterien konsequent auf Eis gelagert. Das LB-Medium wurde nach dem Zentrifugationsschritt verworfen und das Bakterienpellet in 40 ml eiskaltem Puffer Tfp I suspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren (1.370 x g/4 °C/10 min) wurde das Bakterienpellet in 4 ml eiskaltem Puffer Tfp II suspendiert. Es folgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis. Die Bakteriensuspension wurde anschließend zu je 25 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien

Zur Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente XL-10Gold Bakterien (vgl. Kapitel 3.2.1) wurde 100 ng Plasmid-DNA mit 25 µl aufgetaute Bakterien vermengt und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte eine Hitzeschockbehandlung, zu der die Zellen bei 42 °C für 45 s im Thermoblock inkubiert wurden. Nach einer einminütigen Inkubation auf Eis wurde 300 µl vorgewärmtes SOC-Medium zur Bakteriensuspension hinzugegeben und das Gemisch bei 300 rpm/ 37 °C für 60 min inkubiert. Im Anschluss an diese Regenerations- und Wachstumsphase wurden die Bakterien zur Selektion auf LB-

Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Bakterieninkubator kultiviert. Durch die Transformation mit Plasmid-DNA, welche u. a. für Antibiotikaresistenzen kodiert, wuchsen nur erfolgreich transformierte Bakterien.

3.2.3 Kryokonservierung von Bakterien

Wie auch eukaryotische Zellen lassen sich Bakterien mittels Kryoprotektans dauerhaft lagern. Dazu wurden die transformierten Bakterien in LB-Medium im Verhältnis 1:2 mit 87%igem Glycerin gemischt, zügig bei -80 °C eingefroren und anschließend gelagert.

3.2.4 Plasmidpräparation

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden die transformierten Bakterien vermehrt. Durch alkalische Lyse und Bindungsfähigkeit der Plasmid-DNA an Silika-Säulen können hochreine Plasmide aus Bakterien gewonnen werden.

Zur Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde entweder mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel) oder mit dem GenElute™ HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kit (Sigma) gearbeitet. Zur Plasmidpräparation mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit wurden Bakterien in 5 ml antibiotikahaltigem LB-Medium über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgter Plasmid-DNA-Isolierung wurde die DNA in 30 µl TE-Puffer eluiert. Für die Präparation der Plasmid-DNA mit dem GenElute™ HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kit wurden die Bakterien in 200 ml antibiotikahaltigem LB-Medium über Nacht bei 37 °C kultiviert. Nach der Plasmidpräparation wurde die Plasmid-DNA mit 3 ml endotoxinfreiem Wasser eluiert. Es wurde stets gemäß Herstellerangaben gearbeitet.

3.2.5 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Für einen Restriktionsverdau wurden Restriktionsenzyme vom Typ II verwendet. Zum Schneiden von dsDNA mit Restriktionsenzymen muss eine spezifische Erkennungssequenz in der dsDNA vorhanden sein. Es wurden immer Restriktionsenzyme verwendet, die einen 5'-Überhang entstehen lassen.

Zur Linearisierung von Plasmiden oder Klonierung von Transgenen in Zielvektoren wurden 5 µg Plasmid für einen 50 µl Restriktionsansatz verwendet und analog den Herstellerangaben der Restriktionsenzyme 5 µl Restriktionsenzym (10 U/µl) und 5 µl 10-fach Puffer zu dem Restriktionsansatz hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde mit der angemessenen Menge DEPC-Wasser auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. Der Restriktionsansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgte eine Hitzeinaktivierung bei 65 oder 80 °C für 20 min entsprechend des verwendeten Restriktionsenzym (die verwendeten Restriktionsenzyme sind bitte Kapitel 7.11.1 zu entnehmen). Die Kontrolle der Linearisierung erfolgte durch eine Auftrennung der Plasmid-DNA im Agarosegel (siehe Kapitel 3.3.3).

3.2.6 *In vitro*-Transkription

Die *in vitro*-Transkription (IVT) wurde nach Herstellerangaben mit dem *mMESSAGE mMACHINE*[®] T7-Kit (Life Technologies) und dem dazugehörigen Poly(A) *Tailing* Kit (Life Technologies) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Vorlage wurde entweder aufgereinigtes linearisiertes Plasmid oder PCR-Produkt in einer Konzentration von 500 ng eingesetzt. Die IVT-Reaktion fand für 2 h bei 37 °C statt. Nach der IVT wurden die DNA-Moleküle durch einen DNase-Verdau (TURBO DNase, Life Technologies) für 15 min bei 37 °C entfernt. Es folgte direkt im Anschluss die Poly(A)-Reaktion. Die Aufreinigung der amplifizierten IVT-mRNA erfolgte mit dem MEGAclean[™] Kit (Life Technologies) gemäß der Herstellerangaben.

3.2.7 Isolierung von Gesamt-RNA durch Phenol-Chloroform Fällung

Die Zellen wurden je nach Zellzahl in 500-1000 µl TriFAST[™]-Lösung (Peqlab) durch Auf- und Abpipettieren lysiert. Durch das in der TriFAST[™]-Lösung enthaltene Guanidin-isothiozyanat werden Proteine in den Proben denaturiert. Die Methode beruht auf der Flüssigphasentrennung mit Phenol und Chloroform. Die Gesamt-RNA befindet sich in der entstehenden wässrigen Phase nach der Zentrifugation. Die Interphase und die organische Phase wurden für eine weitere Präparation von genomischer DNA (gDNA) bei 4 °C zwischengelagert (vgl. Kapitel 3.2.8). Die aufgereinigte, getrocknete RNA wurde in 30-50 µl DEPC-Wasser gelöst, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach Herstellerangaben.

3.2.8 Isolierung von genomischer DNA durch Phenol-Chloroform Fällung

Zur Isolierung von gDNA aus Zellen wurde die TriFAST[™]-Methode angewendet. Nach der Phasentrennung muss die wässrige Phase (RNA-Phase) vollständig entfernt werden. Nach zusätzlicher Entfernung der Phenol- und Chloroformrückständen durch Natriumazetat und wiederholenden Waschschritten mit 70%igem Ethanol wurde die gDNA getrocknet und in 8 mM Natriumhydroxidlösung, deren pH-Wert mit einer 0,1 M HEPES-Lösung auf pH 7,5 eingestellt war, bei 4 °C gelagert.

3.2.9 DNase I-Verdau und cDNA-Synthese

1 µg der isolierten Gesamt-RNA (vgl. Kapitel 3.2.7) wurde durch einen Deoxyribonuclease I-Verdau (DNase I, Amplification Grade, Life Technologies) von möglichen gDNA-Verunreinigungen befreit (vgl. Kapitel 3.2.8). Durch die Verwendung dieser DNase I konnte ohne zusätzliche Aufreinigung des Reaktionsansatzes direkt mit der Umschreibung in komplementäre DNA (cDNA, engl. *complementary DNA*) begonnen werden. Die Umschreibung mittels reverser Transkriptions-PCR (RT-PCR) erfolgte mit Oligo(dT)18-Primer und der SuperScript[®]III Reversen Transkriptase (Life Technologies; methodische

Details sind bitte Kapitel 7.12 zu entnehmen). Für die Amplifikation der cDNA mit der PCR oder qPCR wurde diese im Vorfeld 1:10 mit DEPC-Wasser verdünnt.

3.2.10 PCR und qPCR

3.2.10.1 PCR

Zur Amplifikation von großen PCR-Produkten wurde mit der *LongAmp® Taq DNA Polymerase* (NEB) gearbeitet. Ein Standardpipettierschema und die PCR-Bedingungen sind im Anhang (Kapitel 7.11.2) aufgeführt. Die Auftrennung der PCR-Produkte fand mit einer Agarosegelelektrophorese (vgl. Kapitel 3.3.3) statt.

3.2.10.2 qPCR

Zur Bestimmung der Expression von mRNA in Zellen wurde eine quantitative *real-time* PCR (qPCR) Mit dem LightCycler® 480 (Roche) durchgeführt. Die wird über den Einbau des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR®-GreenER™ während der PCR ermöglicht. SYBR®-GreenER™ bindet an der großen Furche der entstehenden dsDNA. Es wurde der SYBR®-GreenER™ qPCR SuperMix Universal (Life Technologies) verwendet. Pipettierschema und qPCR-Reaktionsbedingungen sind im Kapitel 7.13 aufgeführt. Modifizierungen ergaben sich für die Primer-*Annealing*-Temperaturen, da diese von den thermodynamischen Eigenschaften der jeweils verwendeten Primersequenzen abhängig sind. Als interne Positivkontrollen der qPCR diente ein Plasmidstandard für das jeweilige zu analysierende Gen und dem Referenzgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Dafür wurde eine Konzentrationsreihe von 1×10^6 bis 1×10 Molekülen/ μ l in DEPC-Wasser angefertigt. Von Proben und Standardreihen wurden drei technische Replikate auf eine 96-Well-Platte des LightCycler® 480 pipettiert. Die Auswertung fand mittels LightCycler® 480 Software statt.

3.2.11 Aufreinigung von PCR-Produkten und linearisierten Plasmiden

Nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau sind in den Reaktionsansätzen noch Enzyme, Salze, Nukleotide sowie Puffer enthalten, welche eine nachfolgende Reaktion (z. B. eine IVT) stören oder inhibieren könnten. Aus diesem Grund wurden die entstehenden Reaktionsansätze mit dem GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma) gereinigt, welches für Produktgrößen von 100 bp bis 10 kbp geeignet ist. Es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet.

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen und Integritätsprüfung

Die DNA- und RNA-Konzentrationen wurde mittels UV/Vis-Spektralphotometer (NanoDrop ND-1000, Peglab) bestimmt. Es wurde 1 μ l der jeweiligen Nukleinsäure zur Konzentrationsmessung verwendet. Die Messung erfolgte über die Bestimmung der Absorption bei einer

Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}). Eine Kontamination der DNA- bzw. RNA-Proben mit Proteinen wurde über das Absorptionsverhältnis von $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ ermittelt. Der Wert für das $OD_{260/280}$ – Verhältnis für reine Nukleinsäuren sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Durch die Messung des Absorptionsquotienten A_{260}/A_{230} konnte auch eine mögliche Kontamination mit organischen Lösungsmitteln ermittelt werden. Bei reinen Proben liegt der Wert zwischen 2,0 und 2,2.

3.3.2 Qualitätsüberprüfung der *in vitro* transkribierten mRNA

Mit dem Bioanalyser 2100 (Agilent) kann die Konzentration und die Qualität von RNA gemessen werden. Da bei der mRNA-iPS Herstellung die Qualität der IVT-mRNA von entscheidender Bedeutung ist, wurden die IVT-mRNA routinemäßig überprüft.

Für die Qualitätsüberprüfung der IVT-mRNA wurden jeweils ≤ 500 ng verwendet. Vor jeder Messung wurde ein Agilent-RNA-6000-Chip frisch mit luftblasenfreiem Gel, Farbstoff und RNA-Leiter nach Herstellerangaben beladen und pro zu analysierender RNA Probe 1 μ l Gemisch aufgetragen. Über Elektropherogramme wurde die Qualität der IVT-mRNA bestimmt. Beispielsweise wird degradierte RNA durch kleinere Peaks oder einen auslaufenden Peak erkennbar.

3.3.3 Gelelektrophorese

Nukleinsäuren können mit der Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Agarosekonzentration für die Anfertigung des Gels wurde entsprechend der zu erwartenden Fragmentgröße gewählt. So wurde bei einer zu erwartenden Fragmentgröße von < 100 bp eine 3%ige (m/v) und bei > 700 bp eine 1%ige (m/v) Agaroselösung hergestellt. Vor Beginn einer RNA-Fragmentauftrennung wurde die benötigten Materialien mit 70%igem Ethanol und RNaseAway gereinigt. Die Pufferlösungen wurden mit RNase-freien Reagenzien angesetzt. Durch mehrmaliges Aufkochen der Agarose in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE, 1x) wurde diese gelöst. Nach Abkühlen auf 50 °C wurde dem noch flüssigen Agarosegel zur Visualisierung der Nukleinsäuren Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 μ g/ml hinzugefügt. Ethidiumbromid interkaliert in dsDNA und emittiert unter UV-Bestrahlung ($\lambda = 256$ nm) sichtbares Licht. Nach Erstarren der Gele in den Gelkammern wurden diese in die Laufkammern mit TAE als Laufpuffer überführt. Die Probenbeladung fand im Verhältnis 1:6 mit sechsfach Ladepuffer statt. Zusätzlich wurde ein DNA-Standard (*GeneRuler™ Ladder Mix*, Thermo Scientific) aufgetragen, der Nukleinsäurefragmente definierter Größe enthielt. Die Nukleinsäuren wurden für 45-60 min bei 100 V aufgetrennt. Nach dem Lauf erfolgte die Visualisierung der Nukleinsäurefragmente unter UV-Licht am Geldokumentationssystem Gel Logic 1500 (Kodak).

3.3.4 Histochemischer Nachweis endogener alkalischer Phosphataseaktivität

Für jede Färbung wurden die iPS-Zellen auf Feederzellen ausplattiert und nach vier bis fünf Tagen Wachstumszeit analysiert.

Für die Aktivitätsanalyse der alkalischen Phosphatase wurden die iPS-Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 70%igem Ethanol fixiert, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation in alkalischem Phosphatasepuffer bei RT (genaue Angaben der verwendeten Puffer sind bitte Kapitel 7.3.1 zu entnehmen). Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde der Puffer abgesaugt und durch PBS ersetzt. Die Zellen wurden mikroskopisch fotografiert.

3.3.5 Immunzytochemische Färbungen

Zum Nachweis von Proteinen in Zellen oder auf Gewebeschnittpräparaten diente ein indirekter Immunfluoreszenztest. Dabei erfolgt eine spezifische Bindung von Primärantikörpern an spezifische Proteinepitope in oder auf den zu analysierenden Zellen. Im darauffolgenden Schritt bindet ein mit einem Fluorochrom markierten Sekundärantikörper gegen den kovalenten Teil des Primärantikörpers. Mit einem Fluoreszenzmikroskop wird das Fluorochrom angeregt und die Proteine werden somit indirekt nachgewiesen.

3.3.5.1 Fixierung und Färbung von Zellen in Zellkulturplatten

Für die immunzytochemische Färbung von adhärennten Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit einer 4%igen Paraformaldehydlösung (PFA) für 20 min bei 4 °C fixiert. Daraufhin wurde die fixierte Kultur dreimal mit PBS gewaschen. Im folgenden Schritt wurden die Zellen für 1 h bei RT in 0,1%iger Triton-X100/PBS-Lösung permeabilisiert. Durch das enthaltene 20%ige FKS wurden gleichzeitig unspezifische Bindungen blockiert. Nach einem dreimaligen Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit dem Primärantikörper für 1 h bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem, dreimaligem Waschen mit PBS wurde der Sekundärantikörper und der DNA-Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) in einer Konzentration von 0,2 µg/ml auf die Zellen pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C für 1 h. Die zur immunzytochemischen Färbung verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und die verwendeten Verdünnungen sind im Anhang in Tabelle 7.14 aufgeführt. Die gefärbten Zellen wurden abschließend dreimal mit PBS gewaschen, lichtgeschützt bei 4 °C in 500 µl PBS gelagert und mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMI 400B) fotografiert und anschließend analysiert.

3.3.6 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie können die Eigenschaften von Zellen in Suspension bestimmt werden. Die vereinzelt Zellen werden dazu in einen Salzpuffer überführt, durch eine Kapillare angesaugt und über einen Flüssigkeitsstrom einzeln an einem Laserstrahl im Sensormodul des Durchflusszytometers (FACS, engl. *fluorescence activated cell sorting*) vorbeigeführt. Durch die Streuung des Laserlichts können Aussagen zu Zellgröße,

Granularität und intrazellulären Bestandteilen getroffen werden. Zusätzlich können Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und deren Exzitation an Photodetektoren gemessen werden. Dazu werden die Zellproben im Vorfeld mit unterschiedlichen Primärantikörpern und fluoreszenzkonjugierten Sekundärantikörpern inkubiert (siehe 3.3.5).

3.3.6.1 Immunfluoreszenzfärbung für die durchflusszytometrische Analyse

Die Färbung der Zellen in Suspension fand gemäß dem Protokoll zur Immunfluoreszenzfärbung statt (vgl. Kapitel 3.3.5.1). Die Zellen wurden in Suspension überführt, die Zellzahl bestimmt und mit 5×10^5 Zellen pro zu untersuchender Probe weitergearbeitet. Zu jeder Probe wurde eine entsprechende Isotypenkontrolle mitgeführt. Die Zellen wurden in 200 μ l PBS als Einzelzellen suspendiert und in 4%igem PFA für 20 min bei 4 °C fixiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift mit 300 μ l PBS bei 4 °C für 5 min und 250 x g. Die Zellen wurden mit 0,5%iger Saponinlösung permeabilisiert und mit 20%igem Rinderserum Albumin (BSA, engl. *bovine serum albumin*) in PBS für 30 min bei RT geblockt. In den folgenden Waschschriften wurde immer eine 0,5%ige Saponinlösung verwendet, da Saponin nur zu einer reversiblen Permeabilisierung der Zellmembran führt. Die Primärantikörper wurden gemäß Tabelle 7.14 in Saponinpuffer verdünnt. Im Folgenden wurden die Zellen mit den Primärantikörpern für 1 h bei 4 °C inkubiert. Nach der Entfernung des Primärantikörpers durch dreimaliges Waschen wurden die Zellen mit den entsprechenden Sekundärantikörpern für 1 h bei 4 °C inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit PBS wurde der Sekundärantikörper entfernt, die Zellen in 500 ml PBS suspendiert und sofort analysiert.

3.3.7 Teratomformierung

Für die Bildung von Teratomen wurden Zellkulturschalen mit proliferierenden iPS-Zellen und Feederzellen der Firma EPO-Berlin GmbH (Berlin) übergeben, welcher alle weiteren Arbeiten oblagen. Die Zellen wurden trypsiniert, mit PBS gewaschen und subkutan in NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ Mäuse (NOD scid gamma Mäuse) injiziert. Gewicht und äußere Erscheinung der Tiere wurde regelmäßig kontrolliert, da ein Gewichtsverlust und/oder eine Veränderung der Fellbeschaffenheit auf das Entstehen von Teratomen hindeuten können. Nach 12 Wochen wurde das Experiment beendet.

3.3.8 Karyotypisierung

5×10^5 feederzellfreie iPS-Zellen wurden auf mit 0,1%iger Gelatine beschichtete Zellkulturschalen ausgesät. Die Kultivierung fand für vier Tage in FGF-freiem iPS-Medium statt, wobei ein Erhalt der Pluripotenz für die Analyse des Karyotyps nicht erforderlich ist. Bei Erreichen von Subkonfluenz wurden die mitotische Zellteilung gestoppt. Dafür wurden die Zellen für 2 h bei 37 °C mit 0,14 μ g/ml Colcemid FGF-freiem iPS-Medium behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen trypsiniert und mit FKS-haltigem Fibroblastenmedium in einem 15 ml PP-Röhrchen gewaschen. Der Überstand wurde fast vollständig abgesaugt. Das

3. Methoden

Zellpellet wurde in den wenigen, noch im Röhrchen verbliebenen Medientropfen suspendiert. Es folgte eine tropfenweise Zugabe von 5 ml einer hypotonischen (0,56%igen) KCl-Lösung. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wurden die Zellen bei 300 x g pelletiert, der Überstand verworfen und drei Tropfen einer Fixativlösung (75 % Methanol/25 % Eisessig v/v) hinzugegeben. Zur Fixierung wurden die Zellen in der Lösung suspendiert und anschließend durch Zentrifugation bei 1.000 x g für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und dieser Ablauf dreimal wiederholt. Es folgte schließlich eine Suspendierung der Zellen in 200 µl Fixativlösung und eine tropfenweise Auftragung auf einen Objektträger. Nachdem die Präparate an der Luft getrocknet wurden, wurden diese entweder für zehn Tage bei RT oder bei 80 °C für 1,5 h inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit erfolgte eine Visualisierung der Chromosomen mittels G-Bänderung. Dafür wurden die Präparate in einer 0,025%igen Trypsinlösung für 10 s bei RT inkubiert, mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen und mit Giemsa-Lösung für 5 min gefärbt. Das Bläuen der Präparate erfolgte unter fließendem Leitungswasser. Nachdem die Präparate an der Luft getrocknet waren, konnten diese mittels DPX Lösung eingedeckelt werden. In enger Zusammenarbeit mit Dr. Federova (Fraunhofer IZI, Leipzig) und Dr. Holland (Universitätsklinikum Leipzig) erfolgte die Chromosomenpräparation sowie die Analyse und Auswertung der Chromosomen am Leica DMR/DM Mikroskop unter Zuhilfenahme der Software Ikaros (MetaSystems).

3.3.9 Bestimmung der Telomeraseaktivität und Telomerlängen durch qPCR

Ein Merkmal von PS-Zellen ist ihre hohe und kontinuierliche Telomeraseaktivität, wodurch die Telomerlängen an den Chromosomenenden stabil gehalten werden. Im Gegensatz dazu kommt es in somatischen Zellen bei jeder Zellteilung zu einer Verkürzung der Telomerlängen, da in differenzierten Zellen keine oder eine zu niedrige Telomeraseaktivität vorhanden ist, um die Telomerlängen konstant zu halten. Während der iPS-Zellreprogrammierung wird die Telomeraseaktivität induziert. Über mehrere Kultivierungswochen von iPS-Zellen kommt es dann zu einer stetigen Verlängerung der Telomere - man spricht hier von einem Postreprogrammierungseffekt.

3.3.9.1 Quantifizierung der Telomeraseaktivität

Die Quantifizierung der Telomeraseaktivität fand nach einem modifizierten Protokoll von Wege und Kollegen mit Hilfe der qPCR statt¹²⁰. Dazu wurde zuerst die Zahl feederzellfreier iPS-Zellen nach Waschen in PBS bestimmt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das PBS dann abgenommen und das Zellpellet in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Es wurde entweder sofort weitergearbeitet oder das Zellpellet über Nacht bei -80 °C gelagert.

Für je 1 x 10⁶ eingefrorene Zellen wurden 200 µl Lysepuffer eingesetzt und die Zellen durch Vortexen suspendiert. Es folgte ein 30-minütiger Inkubationsschritt auf Eis. Anschließend wurden die lysierten Zellen bei 12.000 x g für 30 min bei 4 °C pelletiert. Für die Telomeraseaktivitätsmessung wurden 90 % des Überstandes zur weiteren Analyse

abgenommen. Das Zellpellet darf dabei nicht in die nachfolgenden Analyseschritte gelangen, da dies die qPCR inhibieren könnte. Der proteinhaltige Überstand kann optional aliquotiert und bei -80 °C bis zur Analyse gelagert werden.

In den nächsten experimentellen Schritten wurde der Überstand konsequent auf Eis gelagert. Die Proteinbestimmung erfolgte mittels Qubit™ Fluorometer (Life Technologies) gemäß den Herstellerangaben. Dazu wurde für jeden Ansatz eine Standardkurve erzeugt. Dafür wurden 10 µl einer Quant-iT™-Proteinkonzentrationsstandardlösung (0 ng/µl, 200 ng/µl oder 400 ng/µl) in vorbereitete Qubit®-Reaktionsgefäße mit 190 µl Qubit™-Arbeitslösung pipettiert. Parallel dazu wurde 1 µl Probe in 199 µl Qubit™-Arbeitslösung verdünnt, und die Reaktionsansätze für 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Standardkurve im Qubit™-Fluorometer bestimmt, anhand derer die Proteinkonzentration in den Proben berechnet werden konnte.

Für die Ermittlung der Telomeraseaktivität mit Hilfe der qPCR wurde 1 µg Protein pro PCR-Reaktion eingesetzt. Die Proben wurden entsprechend in Lysispuffer verdünnt. Als Positivkontrolle und gleichzeitig als Standard wurde ein aus HeLa-Zellen gewonnenes Proteinlysate verwendet. Dazu wurde 1 µg HeLa-Zelllysate in Verdünnungsstufen von 1:10 (10 % Telomeraseaktivität), 1:100 (1 % Telomeraseaktivität) und 1:1000 (0,1 % Telomeraseaktivität) eingesetzt. Als Negativkontrollen diente erstens die immer in einer PCR mitzuführende Wasserkontrolle und zweitens eine Proteinprobe, die hitzeinaktiviert wurde. Zur Hitzeinaktivierung wurden 50 µl HeLa-Zelllysate für 15 min bei 85 °C inkubiert. Im Folgenden wurde ein 19 µl PCR-Master-Mix (SYBR®-GreenER™ qPCR SuperMix Universal, Life Technologies) einschließlich Telomeraseprimer (ACX- und TS-Primer) und jeweils 1 µl der Proteinlysateproben bzw. Positiv- oder Negativkontrollen in die Wells einer 96-Well-LightCycler® 480 -Platte pipettiert (Pipettierschema vgl. Kapitel 7.14). Im Anschluss wurde die PCR-Platte für 30 min bei 22 °C auf einem Heizblock inkubiert. Während dieses Inkubationsschrittes verlängert die endogene Telomerase die TS-Primer. Nach diesem Inkubationsschritt fand die Bestimmung der Telomeraseaktivität im LightCycler® 480 (Roche) statt (Reaktionsprotokoll ist bitte Kapitel 7.14 zu entnehmen). Alle Proben wurden in technischen Triplikaten analysiert. Die Analyse fand mittels LightCycler® 480 Software statt.

3.3.9.2 Quantifizierung der Telomerlängen

Die Telomerlängenanalyse mit Hilfe der qPCR wurde nach einem modifizierten Protokoll in Anlehnung an R. Cawthon (2009) durchgeführt¹²¹. Die gDNA wurde wie in Kapitel 3.2.8 beschrieben isoliert und nach der Konzentrationsbestimmung am Nanodrop1000 auf 14 ng/µl in TE-Puffer eingestellt. Zur Quantifizierung wurde eine Standardreihe von gDNA, welche aus HeLa-Zellen isoliert wurde, mitgeführt. Für die Standardkurven wurden 1,7-fache Verdünnungsstufen von 35 ng/µl bis 1,45 ng/µl gDNA in TE-Puffer angefertigt und getrennte qPCR-Läufe für die Telomerlängenamplifikation und für das Referenzgen humanes 36B4

entsprechend der qPCR-Bedingungen durchgeführt. Pipettierschema und Reaktionsabläufe für die Telomerlängenbestimmung sind unter 7.14 dargestellt.

3.3.10 Genexpressionsanalyse mit Hilfe von Genearray

Die Gesamt-RNA wurde aus den zu untersuchenden Proben nach der TriFAST™-Methode isoliert (vgl. Kapitel 3.2.7). Zur Ermittlung der Genexpressionsanalyse mit Hilfe der Microarray-(Chip)-Technologie wurde die Gesamt-RNA der Core Unit für DNA-Technologien am Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF, Leipzig, unter Leitung von PD Dr. Krohn) übergeben, welche die weiteren Arbeitsschritte durchführte. Die RNA-Qualität wurde mit dem Agilent RNA 6000 Nano Assay im Agilent 2100 Bioanalyser nach Angaben des Herstellers überprüft. Dazu wurde 1 µg der Gesamt-RNA in die weiteren Durchführungen der Microarray-Technologie eingesetzt, gefolgt von der Hybridierung der Proben auf einem humanengenomspezifischen 1.0 ST Array (Human Genome 1.0 ST Array, Affymetrix®). Alle Genearrays wurden mit dem GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix®) auf Fluoreszenzsignale überprüft.

Die Auswertung der Genearray-Daten wurde von Dr. Wirth und PD Dr. Binder vom Interdisziplinären Zentrum für Bioinformatik (IZBI, Universität Leipzig) durchgeführt. Die Daten der Genearrays wurden nach der *Hook*-Methode kalibriert¹²² und zur Expressionsanalyse von unterschiedlich exprimierten Genen die *weighted average difference* Methode (WAD)¹²³ verwendet. Die WAD-Methode ist ein *fold-change* (engl. für Expressionsveränderung) basierter Algorithmus zur Erstellung einer Rangfolge von unterschiedlich exprimierten Genen. Dieses Vorgehen wurde als effizient beschrieben, um Analysen in einer kleinen Anzahl von Arrays durchzuführen¹²⁴. Zur Bestimmung von unterschiedlich exprimierten Genen wurde dazu ein Dreiklassenvergleich der zu analysierenden Proben durchgeführt (A gegen B gegen C; z. B. humane Fibroblasten gegen humane iPS-Zellen gegen humane ES-Zellen). Weiterhin wurde eine Unabhängigkeitsanalyse (ICA, engl. *Independent Component Analysis*) sowie eine hierarchische Clusteranalyse zwischen zwei unterschiedlichen Gruppen von Genen durchgeführt, um ähnliche Genexpressionen zwischen den Proben zu veranschaulichen. Die Ergebnisse wurden als Zweikomponenten-ICA-Diagramme und *cluster heatmap* dargestellt. Darüber hinaus kam eine *Gene Set Enrichment* Analyse (GSEA)¹²⁵ in Verbindung mit der *gene set averaging* Methode zur Beurteilung der Relevanz von Gengruppen, die zu einem bestimmten biologischen Kontext gehören¹²⁶, zum Einsatz. Das Prinzip dieser Analysemethode von vorher definierten Gensets liegt in der Korrelation von Genexpressionsunterschieden in unterschiedlichen Zellphäno-

typen bzw. der Erkennung ähnlicher Genexpressionen in gleichen Zellphänotypen. Die funktionellen Gensets wurden der GSEA Internetseite^h entnommen.

3.3.11 ELISA

Der Gehalt an sezerniertem humanem IFN- β in Medienüberständen wurde mittels indirektem ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) unter Einsatz des IFN- β -Mini-ELISA-*Development*-Kit ermittelt. Zur Durchführung des ELISAs wurde eine hochbindende 96-Well-Platte mit der ersten Antikörperlösung (Kaninchen anti-human IFN- β 1 μ g/ml in PBS) über Nacht beschichtet. Um eine Verdunstung der Lösung zu verhindern, wurde die 96-Well-Platte mit Parafilm abgedeckt. Am folgenden Tag wurde die 96-Well-Platte viermal mit Waschpuffer gewaschen und eine Stunde in Blockpuffer inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurden die Proben beziehungsweise der Standard aufgetragen und für zwei Stunden inkubiert. Nach Entfernung der Proben und wiederholtem Waschen wurde die zweite Antikörperlösung (biotinylierter Antikörper: anti-human IFN- β , 1 μ g/ml in PBS) aufgetragen. Nach einer zweistündigen Inkubation wurde die Antikörperlösung entfernt und die Platte erneut gewaschen. Danach wurde Avidin-Meerrettich-peroxidase-Konjugationslösung für 30 min aufgetragen, die Lösung anschließend entfernt und die Platte erneut viermal gewaschen. Alle beschriebenen Arbeitsschritte wurden bei RT ausgeführt. Im letzten Schritt wurde die Substratlösung (ABTS = 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure-Lösung) aufgetragen. Nach einem 20-minütigen Inkubationsschritt erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte im Plattenphotometer bei einer Wellenlänge $\lambda = 405$ nm und einer Referenzwellenlänge $\lambda = 650$ nm. Für die Standardkurve wurde das rekombinante humane IFN- β gemäß Herstellerangaben gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die zu untersuchenden Medienüberstände wurden zentrifugiert (10.000 x g/5 min/4 °C), der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Die ELISA-Messung fand in technischen Triplikaten statt.

3.4 Statistische Analysen

Zur Bestimmung von signifikanten Unterschieden zwischen den Behandlungsgruppen wurde ANOVA genutzt (Sigma Plot Version 11.0). Vor der Analyse wurden die Daten auf eine Normalverteilung und Varianzhomogenität überprüft. Eine einfache Varianzanalyse wurde mittels *One-Way-ANOVA*-Test durchgeführt. Zeigten sich signifikante Unterschiede, so wurde der Holm-Sidak-Post-Hoc-Test als paarweiser multipler Vergleichstest angewendet. Eine Wahrscheinlichkeit von * $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant, ** $p \leq 0,01$ als sehr signifikant und *** $p \leq 0,001$ als höchst signifikant definiert. Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt.

^h www.broadinstitute.org/gsea

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung von Methoden zur Kultivierung humaner pluripotenter Stammzellen

4.1.1 Generelle Methoden zur pluripotenten Stammzellkultivierung und Einfluss der Feederzellen

Um neue Generierungsverfahren für humane iPS-Zellen zu entwickeln, musste zunächst die noch nicht standardisierte Kultivierung von humanen PS-Zellen für das eigene Forschungslabor etabliert werden. Der kontinuierliche Erhalt der Pluripotenz steht dabei im Vordergrund. Humane ES-Zellen beziehungsweise humane iPS-Zellen weisen eine hohe Tendenz zur Spontandifferenzierung auf. Für die Erhaltung der Pluripotenz der viralen iPS-Zellkultur erwiesen sich die Qualität, die Dichte und die Herkunft der Feederzellen als entscheidend. In den ersten Experimenten wurde mit MEFs des zur Verfügung stehenden C57BL/6-Mausstamm gearbeitet. Mit diesen Feederzellen konnten keine iPS-Zellen generiert werden. Zeitgleich wurde das Ethikvotum für die Verwendung von humanen Vorhautfibroblasten aus Patienten mit diagnostizierter Phimose von der Universitätsklinik Leipzig positiv bewertet. Für die Etablierung von humanen viralen iPS-Zellen und später der mRNA-iPS-Zellen wurde ausschließlich mit humanen Vorhautfibroblasten als Feederzellen gearbeitet. Als Grundlage wurden veröffentlichte Studien zur Kultivierung von humanen ES- und iPS-Zellen¹²⁷⁻¹³⁰ herangezogen. Diese belegen unter anderem, dass humane Fibroblasten nur bis Passage zehn als Feederzellen für die humane PS-Zellkultur Anwendung finden sollten. Die präparierten humanen Vorhautfibroblasten (vgl. Kapitel 3.1.2.2.1) wurden entweder durch Mitomycin C oder γ -Bestrahlung mitotisch inaktiviert (vgl. Kapitel 3.1.2.3). Es wurde kein Qualitätsunterschied für die Kultivierung der humanen iPS-Zellen bei diesen beiden Inaktivierungsmethoden festgestellt. Aus Zeit- und Kostengründen wurde die γ -Bestrahlung für die weiteren Experimente gewählt. Um Variabilitäten der Spenderfibroblasten zu minimieren, wurden von mindestens fünf Spendern die isolierten Fibroblasten in einem Zellgemisch zusammengefasst.

4.1.2 Passagieren von humanen iPS-Zellen

Das korrekte Passagieren von humanen iPS-Zelllinien ist ein wichtiger Faktor für die Stabilität der Pluripotenz innerhalb der iPS-Zellkultur. Wird zu lang mit dem Passagieren gewartet, differenzieren die iPS-Zellen spontan aus. Die humanen viralen iPS-Zellen wurden aller drei bis vier Tage auf neue, gelatinebeschichtete Feederzellschalen passagiert. Für die Erhaltungskultivierung wurde ausschließlich mechanisch passagiert. Da es sich um eine zeitaufwendige Methode handelt, wurde versucht, die Methode zu optimieren. Wie in Abbildung 4.1 dargestellt, wurden unterschiedliche Techniken angewendet.

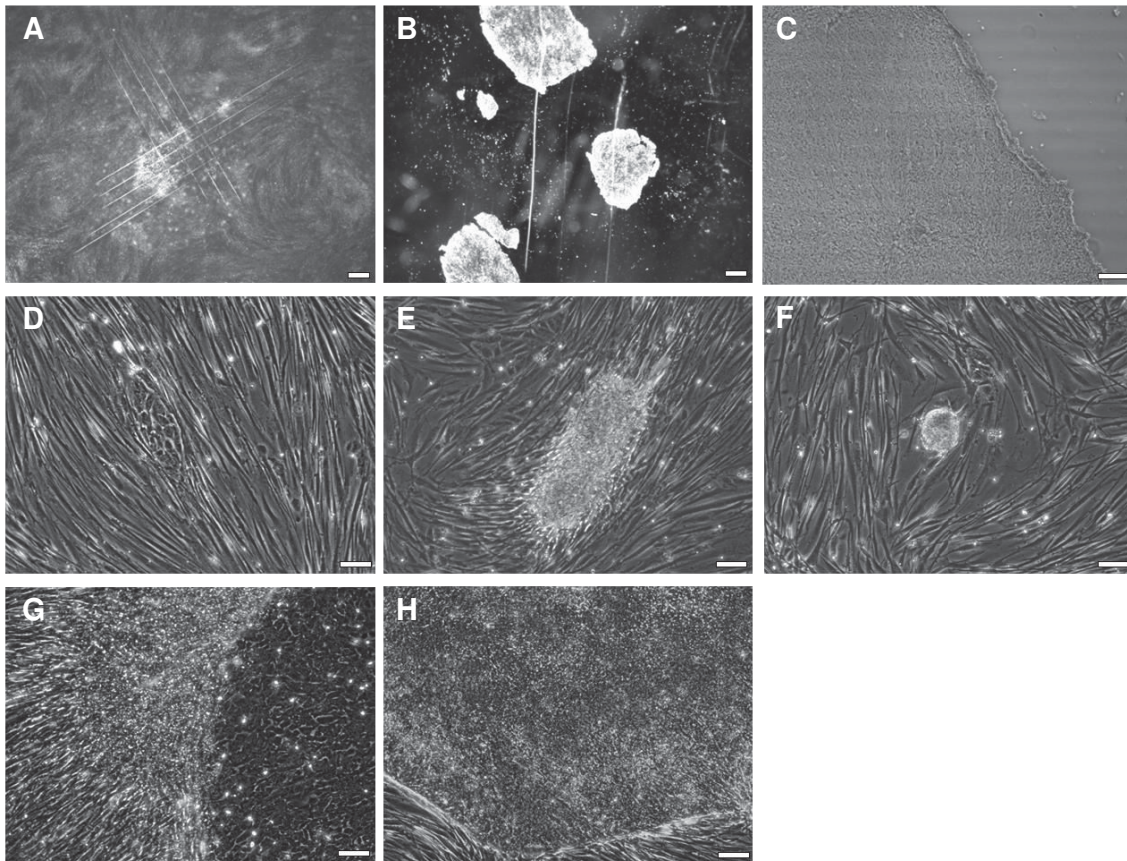


Abb. 4.1: Virale iPS-Zellen während der Etablierung von Kultivierungsbedingungen. (A) Durchlichtmikroskopische Aufnahme von einer iPS-Zellkolonie, die manuell mit der Rasierklinge in gleichmäßige Zellverbände zerkleinert wurde (Messbalken = 500 μm). In (B und C) sind intakte iPS-Kolonien dargestellt, von denen die Feederzellen manuell entfernt wurden (B Messbalken = 500 μm ; C Messbalken = 200 μm). In (D) ist eine undifferenzierte virale iPS-Kolonie 24 h nach Passagierung abgebildet. In (E und F) zeigen die passagierten iPS-Zellen Anzeichen von spontaner Differenzierung auf. (G) iPS-Kolonie, die für fünf Tage kultiviert wurde. Der Kolonierand weist spontan differenzierte Zellen auf (im mittleren Bereich der Abbildung). (H) iPS-Zellkolonie mit definierten Kolonierand zu den Feederzellen. (Messbalken = 100 μm)

In Abbildung 4.1A ist dargestellt, wie eine iPS-Kolonie mit Hilfe einer sterilen Rasierklinge in gleichmäßige Zellverbände geteilt wurde. Die einzelnen Zellstücke wurden anschließend mit einer Pipettenspitze auf neue Feederzellschalen zur weiteren Kultivierung überführt. Ein alternatives Vorgehen war das mechanische Entfernen der Feederzellen zu Beginn der Passagierung durch Absaugen mit einer Mikroliterpipette. Im Anschluss wurden die iPS-Kolonien in gleichmäßige Stücke geteilt. Wie in Abbildung 4.1B und C dargestellt, konnten mit diesem Vorgehen die Feederzellen entfernt werden, ohne die undifferenzierten iPS-Kolonien zu beeinträchtigen. Gleichzeitig wurden spontan differenzierte iPS-Zellen entfernt. Es blieb eine klare Begrenzung der undifferenzierten iPS-Kolonie bestehen (siehe Abb. 4.1C). Dieses Vorgehen war aber für den regelmäßigen Gebrauch zu zeitintensiv.

Die Entfernung von spontan differenzierten iPS-Zellen vor dem Passagieren und während der Kultivierungsdauer von den iPS-Zellen war unumgänglich. Wie in Abbildung 4.1D - F dargestellt, weisen iPS-Zellen 24 h nach der Passagierung unterschiedliche morphologische

4. Ergebnisse

Veränderungen auf. In Abbildung 4.1D ist eine typische undifferenzierte iPS-Kolonie 24 h nach Passagierung dargestellt. Diese weist die charakteristische, deutliche Abgrenzung der pluripotenten Kolonie zu den humanen Feederzellen auf. Abbildungen 4.1E und F stellen exemplarisch spontan differenzierte iPS-Kolonien 24 h nach Passagierung dar. Mit Hilfe einer 27 G Kanüle wurden solche differenzierte Kolonien entfernt. In Abbildung 4.1G ist eine virale iPS-Kolonie dargestellt, die fünf Tage kultiviert wurde. Die Feederzellen wurden von der proliferierenden iPS-Kolonie stark verdrängt. Da es zur spontanen Differenzierung der iPS-Zellen am Kolonierand kam, war keine klare Begrenzung zu den Feederzellen mehr gegeben. Im Gegensatz dazu zeigt die Abbildung 4.1H eine iPS-Kolonie, die einen deutlichen Kolonierand zu den Feederzellen aufweist und optimale Eigenschaften für das Passagieren hat. Als eindeutige Hinweise, dass iPS-Zellen gesplittet werden müssen, gelten unter anderem eine sehr dicht gepackte Zellstruktur innerhalb der Kolonie, die Koloniegröße und beginnende spontane Differenzierung innerhalb der Kolonie.

4.2 Herstellung von humanen viralen iPS-Zellen

Da für die vorliegende Studie keine etablierten humanen PS-Zellen zur Verfügung standen, wurde in parallel die Etablierung der humanen PS-Zellkultur und die Generierung von viralen iPS-Zellen durchgeführt. Wie unter Kapitel 3.1.3.1 beschrieben, wurden humane Fibroblasten durch retrovirale Transduktion mit einem MoMLV-basierenden Virussystem reprogrammiert. Die Erzeugung von viralen iPS-Zellen erfolgte mit den Reprogrammierungsfaktoren: Oct4, Sox2, Klf4, Nanog, cMyc und hTERT (zusammenfassend: OSKNMT). Als Positivkontrolle für die Transduktion wurden eGFP-exprimierende Viruspartikel generiert. Im Verlauf dieser Arbeit wurden humane virale iPS-Zelllinien aus Vorhautfibroblasten, adulten Fibroblasten und adulten Spenderfibroblasten von Huntingtonpatienten generiert.

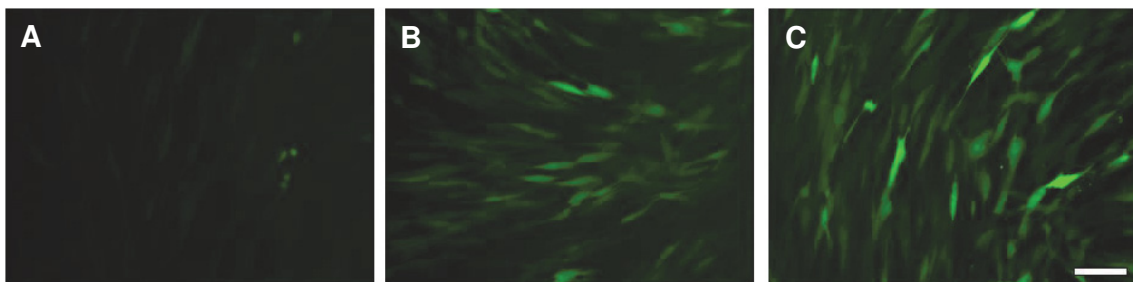


Abb. 4.2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Transduktionseffizienzen in humanen Vorhautfibroblasten. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden 48 h nach Transduktionen von unterschiedlichen Verdünnungsstufen mit eGFP-exprimierenden MoMLV-Viruspartikel der Spenderzellen angefertigt. (A) Viruspartikelüberstand: 1:4 verdünnt (B) Viruspartikelüberstand: 1:2 verdünnt (C) Viruspartikelüberstand: unverdünnt. (Messbalken = 100 μ m)

Wie angenommen war die Transduktionseffizienz für humane Fibroblasten von der Verdünnung des Viruspartikelüberstandes abhängig. Wie die obenstehende Abbildung 4.2 illustriert, hatte eine Verdünnung des eingesetzten Viruspartikelüberstandes von 1:4 die niedrigste Transduktionseffizienz (Abb. 4.2A). Die Transduktionseffizienz stieg bei einer Ver-

4. Ergebnisse

dünnung von 1:2 deutlich an (Abb. 4.2B) und war am höchsten bei einem unverdünnten Viruspartikelüberstand (Abb. 4.2C). Die Konzentration des viralen Partikelüberstandes hatte keine Auswirkung auf die Qualität der transduzierten humanen Spenderfibroblasten. Nachdem überprüft worden war, ob das vorliegende Transduktionsprotokoll effektiv für humane Fibroblasten angewendet werden kann, wurde mit der viralen Reprogrammierung begonnen. Innerhalb von ca. drei Wochen nach Transduktion der Spenderfibroblasten mit den Reprogrammierungsfaktoren OSKNMT konnten morphologische Veränderungen innerhalb des Feederzellrasens beobachtet werden. Eine morphologische Unterscheidung zwischen transduzierten Fibroblasten und Feederzellen war bis dahin nicht möglich. Die phänotypischen Veränderungen sind in Abbildung 4.3 dargestellt. Aus einer klassischen humanen Fibroblastenmorphologie (Abb. 4.3A) wurden iPS-Zellkolonien mit folgenden Charakteristika generiert: Koloniebildung mit einer sehr dicht gepackten Struktur, innerhalb der Kolonien befinden sich kleine runde Zellen mit einem hohen Verhältnis von Zellkern zu Zytoplasma und einem deutlich abgegrenzten Kolonierand zu den Feederzellen (Abb. 4.3B).

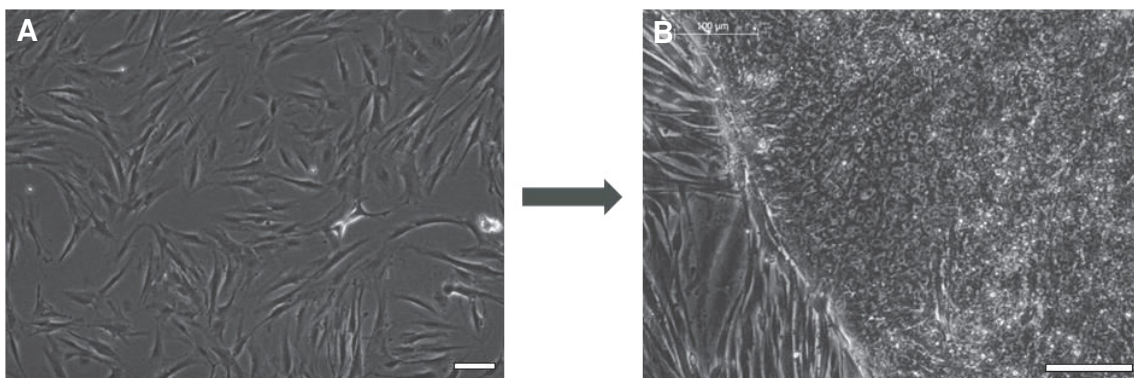


Abb. 4.3: Vergleich der Fibroblastenmorphologie und iPS-Zellmorphologie. Durchlichtmikroskopische Aufnahme einer humanen Fibroblastenkultur (A) und einer humanen viralen iPS-Zellkolonie mit humanen Feederzellen (B). (Messbalken = 100 μ m)

Um klonale iPS-Zelllinien zu gewinnen, wurde jeweils eine potenzielle iPS-Kolonie zur klonalen Selektion in ein Well einer 24-Well-Platte überführt. Während der Etablierungsphase zu stabilen viralen iPS-Zelllinien konnten unterschiedliche Morphologietypen identifiziert werden (Abb. 4.4). So wurden 26 Tage nach Transduktion mit retroviralen Partikeln für OSKNMT beispielhaft folgende Kolonietypen erkannt: kleine kompakte Kolonien, die einen beginnenden abgegrenzten Kolonierand zu den Feederzellen aufweisen (Abb. 4.4A) und eher lockere Kolonieverbände von kleineren Zellen, die einen ausgefransten Kolonierand besitzen (Abb. 4.4B). Die Zellen in beiden Kolonievarianten weisen einen dominanten Zellkern auf.

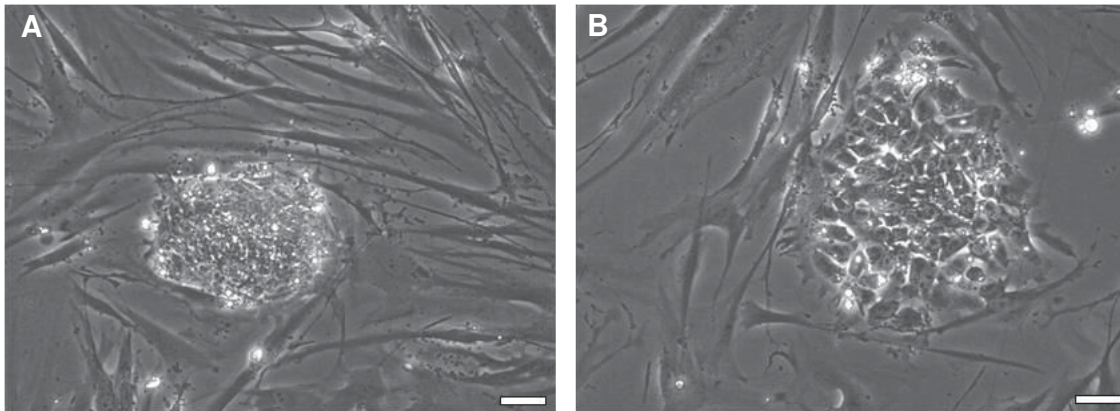


Abb. 4.4: Morphologische Veränderungen in der Etablierungsphase von humanen viralen iPS-Zellen. Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von morphologischen Veränderungen am Tag 26 nach Reprogrammierungsbeginn mit den Faktoren OSKNMT von humanen Fibroblasten des männlichen Huntingtonpatienten. (A) Aufnahme einer iPS-Kolonie mit definiertem Kolonierand zu den Feederzellen. (B) Aufnahme einer iPS-Kolonie ohne den charakteristisch abgegrenzten Kolonierand zu den Feederzellen. (Messbalken = 50 μm)

Zu Beginn der Reprogrammierungsarbeiten wurden alle potenziellen iPS-Kolonien unterschiedlicher Morphologietypen zur klonalen Selektion weiterkultiviert. Es stellte sich heraus, dass stabile virale iPS-Zelllinien aus der Morphologie in Abbildung 4.4A entstehen. Daraufhin wurde auf die klonale Selektion und Kultivierung anderer Morphologietypen verzichtet. Innerhalb der nächsten Kultivierungswochen wurden aus den anfänglich instabilen iPS-Kolonien stabile iPS-Zelllinien, was durchschnittlich ab Passage fünf eintrat (Abb. 4.5F und G). Trotz sorgfältiger Auslese zu Beginn der klonalen Selektion wurden während der anschließenden Kultivierung weitere Veränderungen in der Morphologie, der transduzierten Zellen identifiziert (Abb. 4.5A - D). Die meisten dieser transduzierten Zellen wuchsen als kleine Zellverbände auf den Feederzellen, überwucherten rasch den Feederzellrasen und die iPS-Zellen. Diese Zellen wurden aus der iPS-Zellkultur mechanisch entfernt.

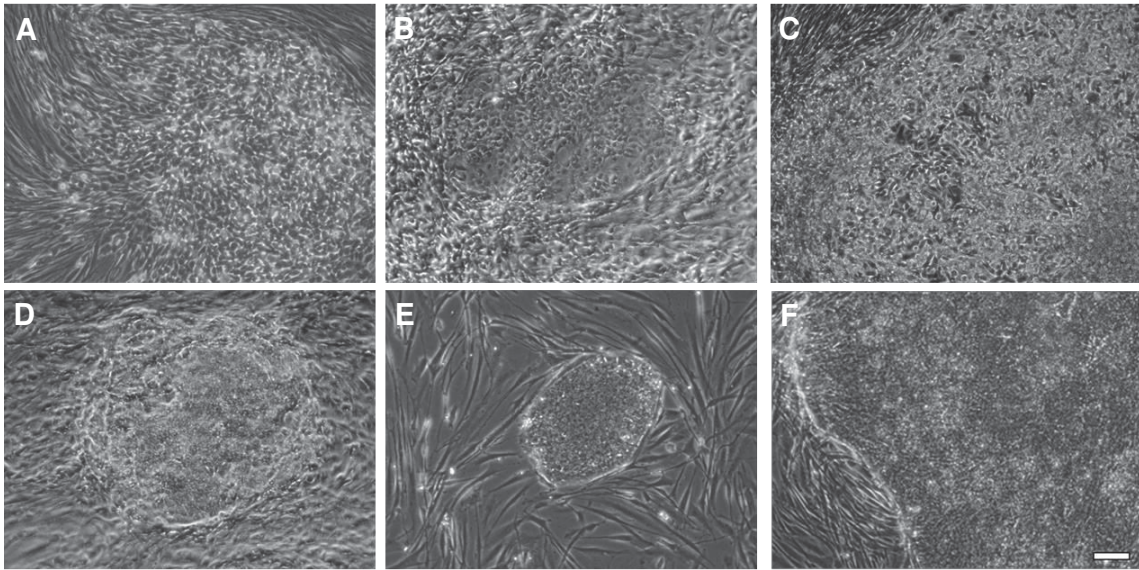


Abb. 4.5: Morphologische Veränderungen innerhalb der pluripotenten Stammzellkultur während der Entwicklung zu einer stabilen viralen iPS-Zelllinie. (A-D) Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von transduzierten Fibroblasten, die eine untypische pluripotente Zellmorphologie aufweisen. (E) Durchlichtmikroskopische Aufnahme einer iPS-Kolonie aus der sich eine stabile Zelllinie entwickelt. (F) Etablierte virale iPS-Zelllinie auf Passagestufe zwölf. (Messbalken = 100 μm)

4.3 Pluripotenzcharakterisierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche humane virale iPS-Zelllinien generiert. Ab der Passagestufe fünf wurde begonnen, die stabil wachsenden viralen iPS-Zellen hinsichtlich ihrer Pluripotenz und Stabilität des Karyotyps zu charakterisieren.

4.3.1 Nachweis der alkalischen Phosphataseaktivität

Die alkalische Phosphataseaktivität (AP-Aktivität) kann als Pluripotenzmarker herangezogen werden, da sie in humanen PS-Zellen nur bei Koexpression der Pluripotenzmarker Oct4, Nanog, SSEA3, SSEA4, Tra-1-60 und Tra-1-81 exprimiert wird^{131,132}. Der Verlust der AP-Aktivität ist ein früher Marker für eine beginnende spontane Differenzierung innerhalb von ES- und iPS-Zellkulturen¹³¹.

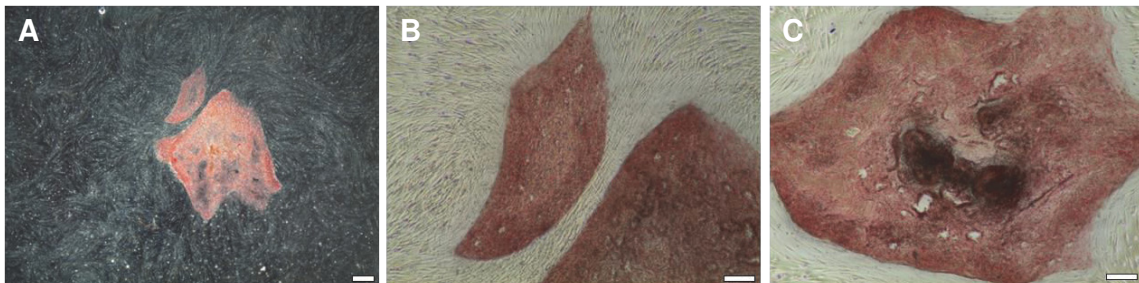


Abb. 4.6: Nachweis der alkalischen Phosphataseaktivität in humanen viralen iPS-Zellen. (A-C) Mikroskopische Aufnahmen von iPS-Zellkolonien, die nach Färbung der AP-Aktivität rot erscheinen. Die humanen Feederzellen besitzen keine AP-Aktivität und wurden nicht gefärbt. (Messbalken: A = 500 μm , B = 200 μm , C = 200 μm)

In der Abbildung 4.6 ist eine deutlich positive, rote AP-Färbung viral gewonnener iPS-Zellen zu erkennen. Gleichzeitig kann man in Abbildung 4.6B und C registrieren, dass einige Areale

4. Ergebnisse

in den vorhandenen iPS-Kolonien weniger intensiv angefärbt wurden. Weiterhin ist im Zentrum der Kolonie in Abbildung 4.6C eine verstärkte AP-Aktivität auszumachen, welche durch eine intensivere Rotfärbung gekennzeichnet ist. Fibroblasten haben keine AP-Aktivität. Die humanen Feederzellen konnten somit als Negativkontrolle innerhalb des Färbeversuchs dienen und zeigten keine Rotfärbung, wie in Abbildung 4.6 dargestellt.

4.3.2 Immunzytochemischer Nachweis der Pluripotenz

Ein weiterer Nachweis der Pluripotenz kann durch die immunzytochemische Darstellung der Expression von spezifischen humanen pluripotenten Proteinen erfolgen. Hierzu gehören die Transkriptionsfaktoren Oct4, Nanog und Sox2 und die embryonalspezifischen Stufenantigene 3 und 4 (SSEA3, SSEA4, engl. *stage specific embryonic antigen*) sowie das keratin-sulfatassoziierte Antigen Tra-1-60. SSEA3, SSEA4 und Tra-1-60 werden auf der Oberfläche von undifferenzierten humanen pluripotenten Stammzellen exprimiert.

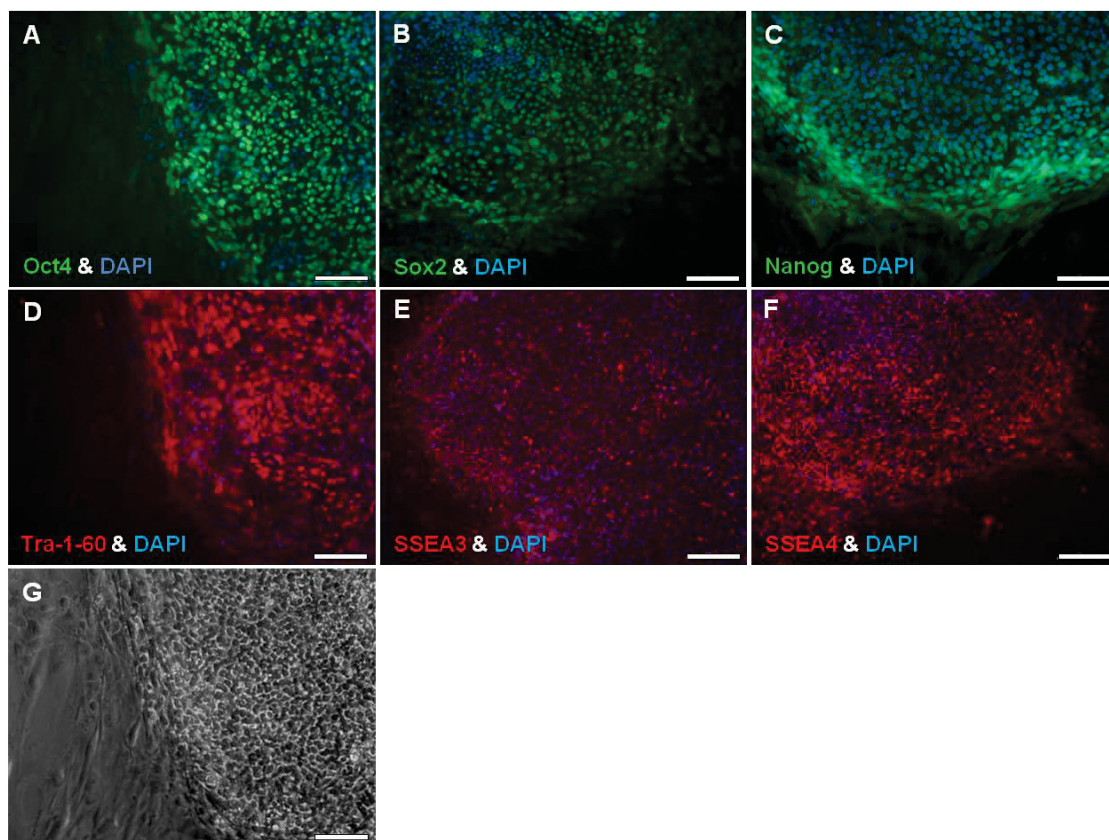


Abb. 4.7: Immunzytochemische Pluripotenzcharakterisierung von viralen iPS-Zellen. Dargestellt sind die Färbungen der Transkriptionsfaktoren Oct4 (A), Sox2 (B) und Nanog (C). Es folgen die Färbungen der spezifischen Oberflächenmarker Tra-1-60 (D), SSEA3 (E) und SSEA4 (F). Die DNA-Färbungen erfolgten im Zellkern mit DAPI (blau) und sind als Überlagerung mit den Pluripotenzmarkern gezeigt. In (G) ist eine durchlichtmikroskopische Aufnahme einer viralen iPS-Kolonie dargestellt. (Messbalken = 100 μ m)

Wie in Abbildung 4.7 illustriert, wurden die viralen iPS-Zellen positiv für alle getesteten Pluripotenzmarker gefärbt. In den Abbildungen 4.7 A, B und C ist deutlich zu erkennen, dass die gefärbten pluripotenzspezifischen Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog im

4. Ergebnisse

Zellkern lokalisiert sind, was für aktivierte Transkriptionsfaktoren typisch ist. Hingegen konnten die Oberflächenmarker Tra-1-60, SSEA3 und SSEA4 (in Abb. 4.7D, E und F dargestellt) membranständig detektiert werden. Als Negativkontrollen dienten die humanen Feederzellen, auf denen die iPS-Zellen wuchsen. Zusätzlich wurden immunzytochemische Pluripotenzfärbungen auf proliferierenden humanen adulten und Vorhautfibroblasten durchgeführt. Die immunzytochemischen Färbungen für die pluripotenzspezifischen Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog sowie die Oberflächenmarker Tra-1-60, SSEA3 und SSEA4 sind in den Abbildung 4.8A - C und D - F exemplarisch für humane adulte Fibroblasten dargestellt. Es wurden immunzytochemisch keine Pluripotenzmarker detektiert.

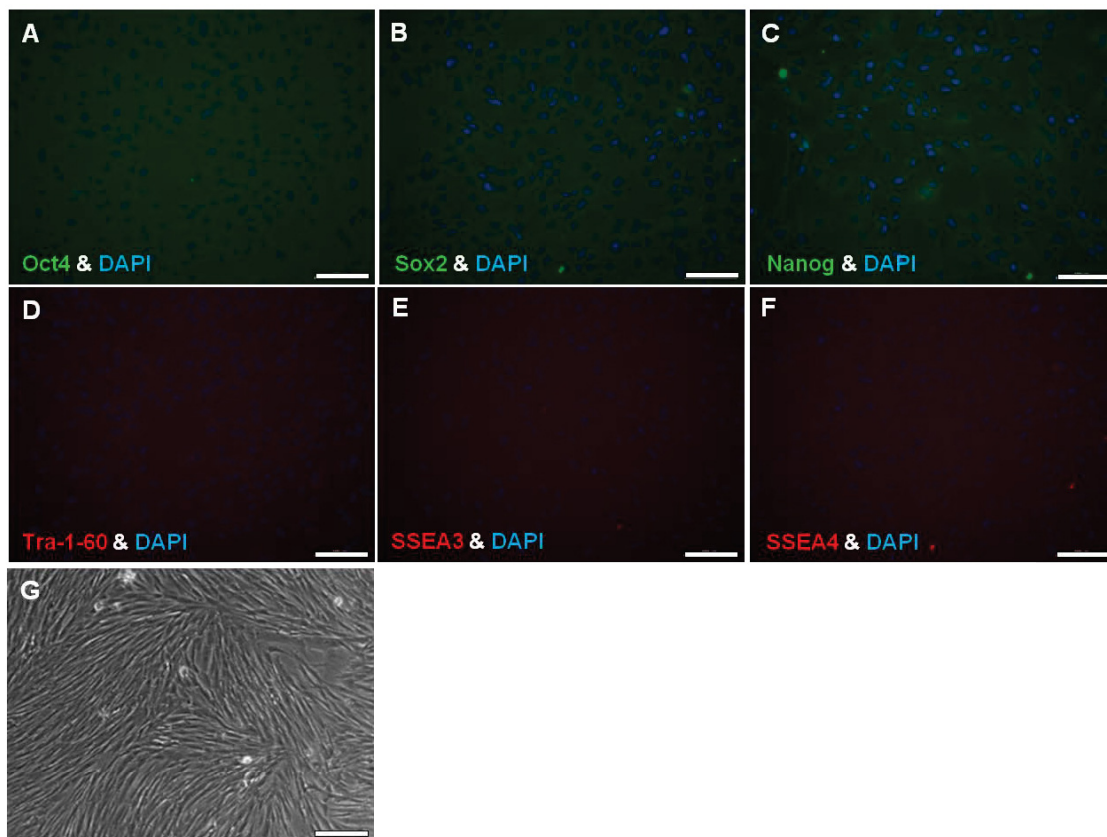


Abb. 4.8: Immunzytochemische Charakterisierung von proliferierenden humanen adulten Fibroblasten auf Pluripotenzmarker. Dargestellt sind die Färbungen der Transkriptionsfaktoren Oct4 (A), Nanog (B) und Sox2 (C). Weiterhin sind die spezifischen Oberflächenmarker für humane pluripotente Stammzellen Tra-1-60 (D), SSEA3 (E) und SSEA4 (F) gezeigt. Dargestellt werden in jeder Abbildung zusätzlich die DNA-Färbungen im Zellkern mit DAPI (blau) als Überlagerung. In (G) ist eine durchlichtmikroskopische Aufnahme von humanen Fibroblasten gezeigt. (Messbalken = 100 µm)

4.3.3 Direkte Differenzierung von viralen iPS-Zellen in alle drei Keimblätter

Unter Verwendung von etablierten Protokollen zur Differenzierung in alle drei Keimblätter wurden feederfreie iPS-Zellen als Zellrasen in Mesoderm, Endoderm und Ektoderm differenziert. Die Differenzierung in den entsprechenden Induktionsmedien erfolgte für zwei Wochen unter normoxischen Bedingungen (21 % O₂).

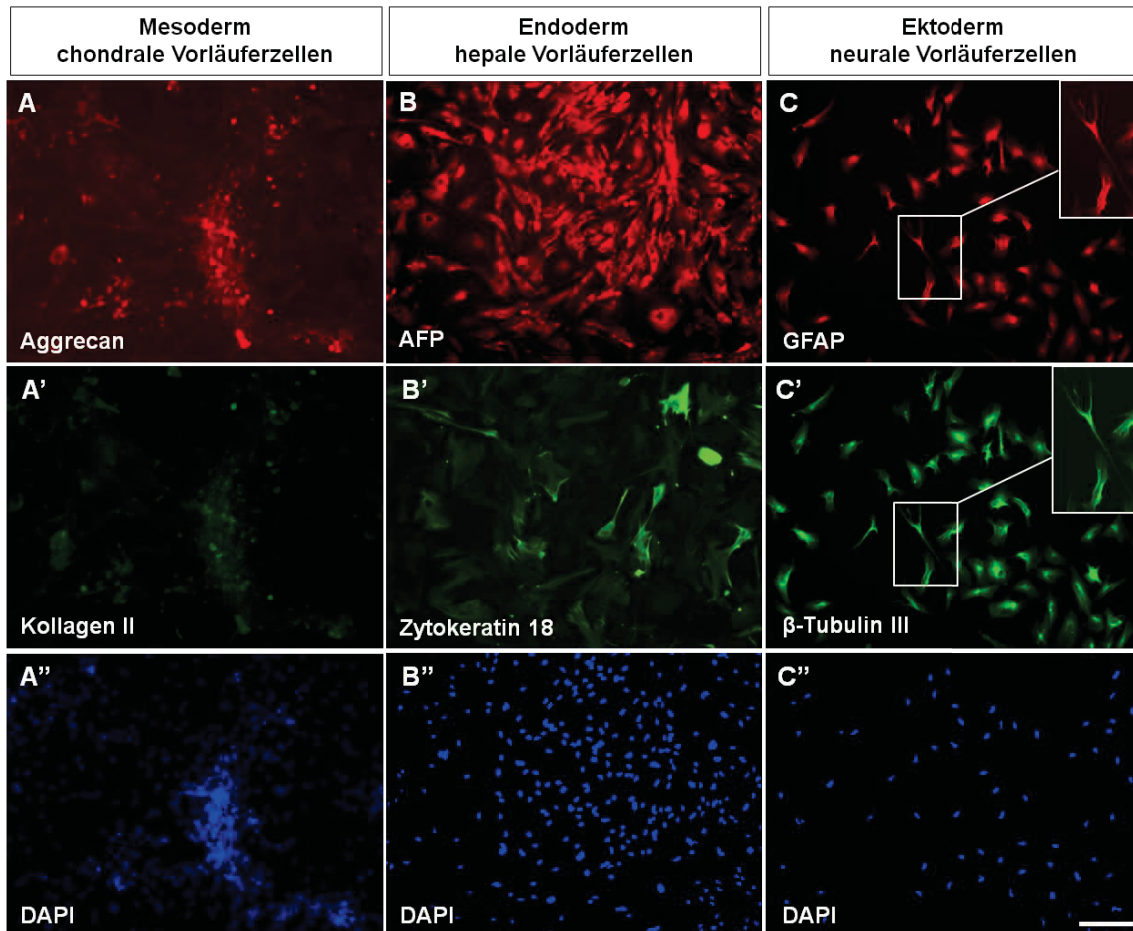


Abb. 4.9: Immunzytochemische Charakterisierung nach direkter Differenzierung von viralen iPS-Zellen in alle drei Keimblätter. Die 14-tägigen Differenzierungen resultierten in chondralen (A und A'), hepalen (B und B') und neuralen Vorläuferzellen (C und C'), was durch die Anwesenheit der dargestellten Marker nachgewiesen wurde. Die DNA im Zellkern wurde mit DAPI gegengefärbt. (A'', B'' und C'', Messbalken = 100 μ m)

Für die mesodermale Keimblattdifferenzierung wurden chondralen Vorläuferzellen induziert. Nach 14-tägiger Kultivierung in Chondrozytenmedium konnten die chondralen Marker Aggrecan (Abb. 4.9A) und Kollagen II (Abb. 4.9A') nachgewiesen werden. Die endodermale Differenzierung erfolgte in hepale Vorläuferzellen. Hepalen Vorläuferzellen wurden durch die Detektion der Keimblattmarker α -Fetoprotein (AFP, Abb. 4.9B) und Zytokeratin 18 (Abb. 4.9B') nachgewiesen. Die differenzierten hepalen Vorläuferzellen zeigten für AFP ein hohes Expressionsniveau. Für Zytokeratin 18 wurde ein sehr heterogenes Proteinexpressionsmuster innerhalb der differenzierten Zellpopulation detektiert, was im rechten Teil der Abbildung 4.9B' erkennbar ist. Die Differenzierung in neurale Vorläuferzellen diente als Nachweis der ektodermalen Keimbahnlinie. Nach einer 14-tägigen Differenzierung wurde das Experiment beendet. Es konnten sowohl neurale Marker als auch beginnende morphologische Veränderungen zu neuronalen Zellen nachgewiesen werden. In den differenzierten neuralen Vorläuferzellen konnte das saure Gliafaserprotein (GFAP, engl. *glial*

fibrillary acidic protein), welches in Abbildung 4.9C dargestellt ist, und der frühe neuronale Marker β -Tubulin III (Abb. 4.9C') nachgewiesen werden.

Im Rahmen der Betreuungsleistung zu der Diplomarbeit von Mandy Berndt (Fraunhofer IZI) wurden die notwendigen Etablierungsversuche zu den betreffenden Primär- und Sekundärantikörpern durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Im Folgenden werden weitere Analysen und Charakterisierungen zur Pluripotenz viraler iPS-Zellen im direkten Vergleich zu potenziellen humanen mRNA-iPS-Zellen dargestellt (ab Kapitel 4.5.6).

4.4 Herstellung von iPS-Zellen über gerichtete mRNA-Transfektion

Die Generierung von iPS-Zellen mit nicht-genomintegrierenden Methoden sollte in der vorliegenden Studie über die Transfektion von *in vitro*-transkribierter-mRNA (IVT-mRNA) erfolgen. Da zum Zeitpunkt des Beginns der Transfektionsexperimente keine Plasmide für eine *in vitro*-Transkription (IVT) der einzelnen Reprogrammierungsfaktoren OSKNMT zur Verfügung standen, wurden diese in entsprechende Vektoren kloniert.

4.4.1 Konstruktion der Plasmidvektoren für die *in vitro* Transkription

Die Klonierungen der einzelnen Reprogrammierungsfaktoren OSKNMT in Plasmide zur IVT wurden von Dr. Fabian (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Leipzig) durchgeführt. Ein beispielhaftes Klonierungsschema ist für das Transgen hTERT in den pcDNA3-Vektor in Abbildung 4.10 dargestellt.

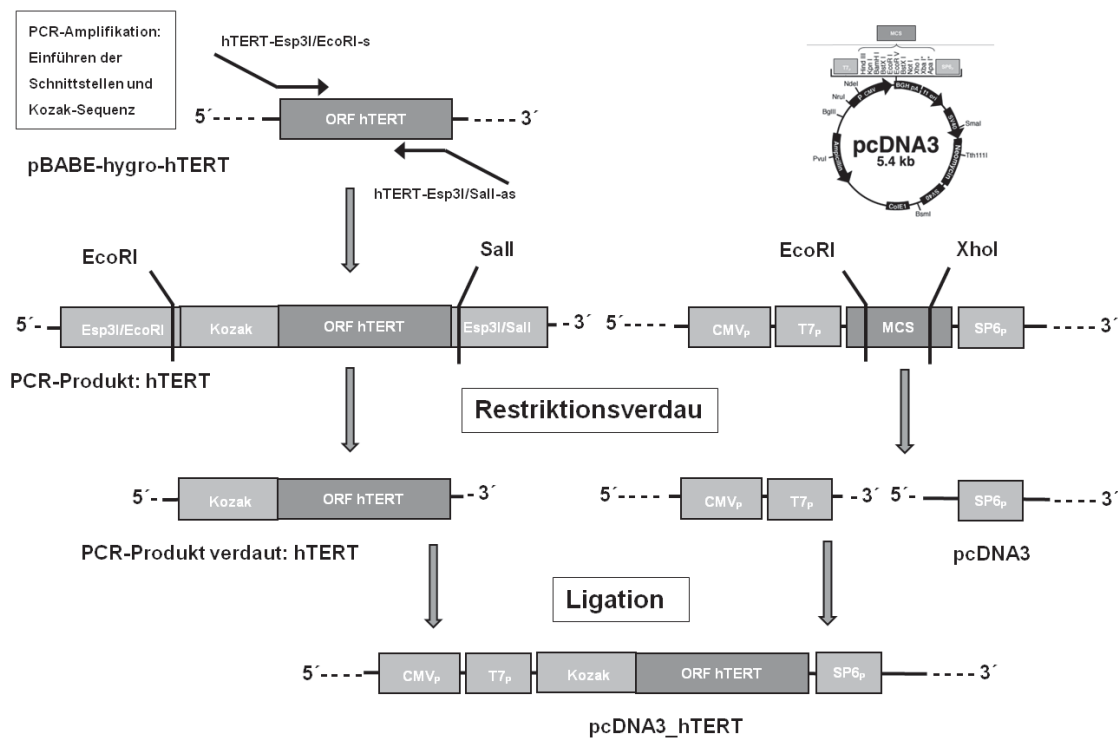


Abb. 4.10: Klonierungsschema für den IVT-Vektor pcDNA3_hTERT. Das Transgen hTERT wurde durch PCR vervielfältigt. Gleichzeitig wurden über die verwendeten Primer neue Schnittstellen und zusätzlich vor dem Transgen in 5'-Orientierung eine Kozak-Sequenz eingeführt. Das PCR-Produkt

hTERT und der Vektor pcDNA3 wurden vor der Ligation mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Sall bzw. EcoRI und XhoI verdaut. Da Sall und XhoI die gleichen Erkennungssequenzen besitzen, konnte eine gerichtete Ligation mit den PCR-Produkten und linearisierten Plasmiden durchgeführt werden. (CMV_P = Cytomegalievirus Promotor, T7_P = T7 RNA-Polymerase-Promotor, ORF = *open reading frame*, SP6_P = SP6 RNA-Polymerase-Promotor)

Im Anschluss an entsprechende Kontrollanalysen, wie z. B. Sequenzierungen der klonierten Plasmide am Institut für Virologie, wurden die Plasmide dem Fraunhofer IZI für die vorliegende wissenschaftliche Studie zur Verfügung gestellt.

4.4.2 Herstellung der Templates für die *in vitro*-Transkription

Die klonierten IVT-Plasmide wurden als Grundlage für eine IVT mit entsprechenden Restriktionsenzymen linearisiert. Neben linearisierten Plasmiden können PCR-Produkte als Ausgangspunkt für eine IVT dienen. Durch die Methode der PCR-Amplifikation könnten Mutationen in der Zielsequenz entstehen. Aus diesem Grund wurde die Linearisierung der Plasmide durch Restriktionsenzyme bevorzugt.

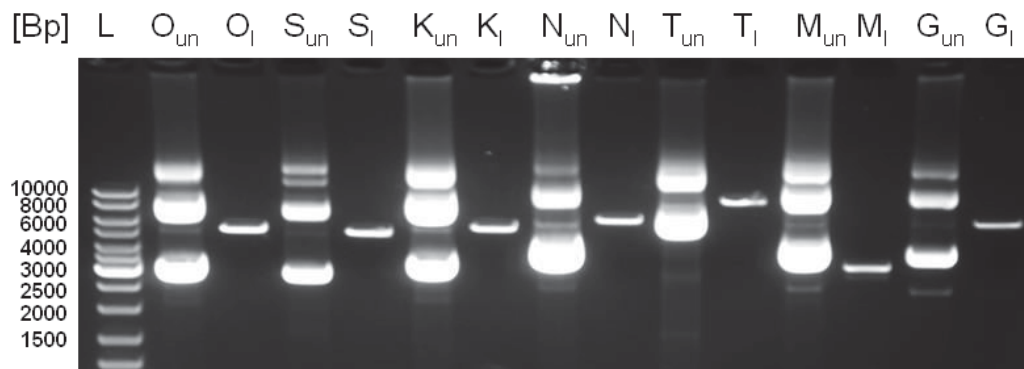


Abb. 4.11: 1%iges analytisches Agarosegelbild zur Überprüfung der Linearisierung der Plasmide für die IVT und deren ungeschnittene Ausgangsformen. Es wurden die Plasmide pcR11_hOct4, pcR11_hSox2, pcR11_hKlf4, pcDNA3_hNanog, pcDNA3_hTERT, pcDNA3_hcMyc und pcDNA3_eGFP in ungeschnittener Form und linearisierter Form aufgetragen. (O_{un} = Oct4 ungeschnitten, O_l = Oct4 linearisiert; S_{un} = Sox2 ungeschnitten, S_l = Sox2 linearisiert; K_{un} = Klf4 ungeschnitten, K_l = Klf4 linearisiert; N_{un} = Nanog ungeschnitten, N_l = Nanog linearisiert; T_{un} = hTERT ungeschnitten, T_l = hTERT linearisiert; M_{un} = c-Myc ungeschnitten, M_l = c-Myc linearisiert; G_{un} = eGFP ungeschnitten, G_l = eGFP linearisiert; L = Längenstandard, Bp = Basenpaare)

Die Linearisierung der IVT-Plasmide mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (vgl. Tab. 7.16) erwies sich als robuste Methode, die ausnahmslos funktioniert hat. In Abbildung 4.11 ist ein exemplarisches Agarosegel dargestellt, welches im Vergleich die IVT-Ausgangsplasmide in der geschlossenen, ringförmigen (engl. *supercoiled*) Form und die dazugehörigen linearisierten Plasmide veranschaulicht. Bei der Auftrennung von supercoiled Plasmid-DNA im Agarosegel kann es zum Nachweis von unterschiedlichen Größen kommen, wie auch in Abbildung 4.11 gut zu erkennen ist. Eine vollständige Linearisierung nach einem Restriktionsverdau ist dadurch gekennzeichnet, dass bei der Auftrennung der linearisierten Plasmid-DNA keine supercoiled Formen nachgewiesen werden können.

4. Ergebnisse

Obwohl alle IVT-Plasmide stets vollständig linearisiert werden konnten, schlug die IVT-Reaktion für das pcDNA3_hTERT Plasmid fehl. Auch nach Optimierungsversuchen der IVT-Reaktionen, wie Verlängerung der Inkubationszeiten oder Erhöhung der Enzymkonzentrationen wurde keine hTERT-mRNA amplifiziert. Durch die Umstellung auf Vorlage eines hTERT-PCR-Produktes für die IVT konnte hTERT-mRNA sporadisch produziert werden. Zur PCR-Amplifikation von hTERT mit T7-RNA-Promotor wurde die *LongAmp[®] Taq* DNA Polymerase mit Korrekturlese-Funktion verwendet (Schema zur Amplifikation von hTERT mit T7-Promotor siehe Abb. 4.12).

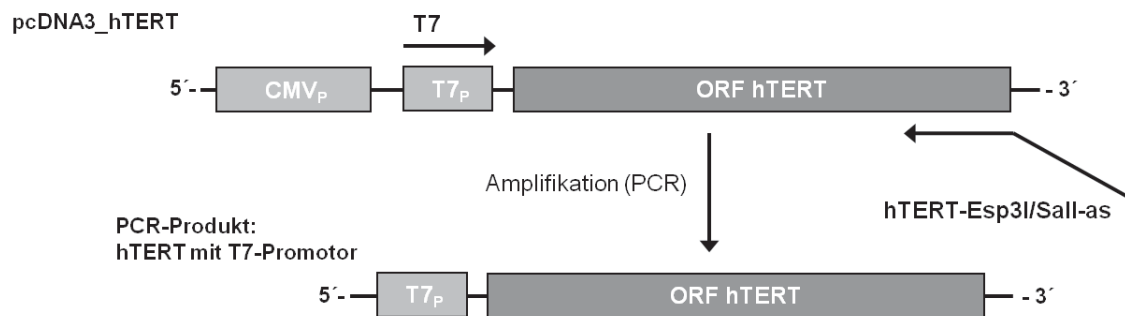


Abb. 4.12: Schema zur PCR-Amplifikation von hTERT einschließlich T7-RNA-Promotor. Die Vervielfältigung von hTERT mit T7-RNA-Promotor wurde mit den Primern T7 und hTERT-Esp3I/Sall-as durchgeführt. (CMV_P = Cytomegalievirus Promotor, T7_P = T7 RNA-Polymerase-Promotor, ORF = *open reading frame*)

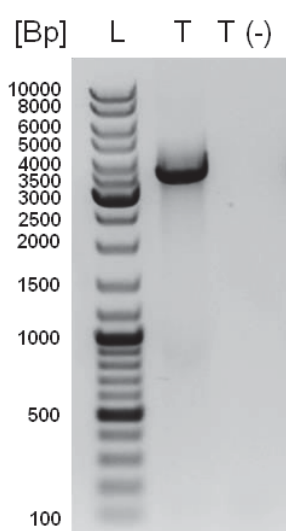


Abb. 4.13: 1%iges analytisches Agarosegelbild der PCR zur Vervielfältigung des Transgens hTERT. Es ist das PCR-Produkt des Transgens hTERT mit T7-Promotor (T) aus dem Vektor pcDNA3_hTERT mit dazugehöriger Negativkontrolle (T (-)) dargestellt. In die Negativkontrolle wurde DEPC-H₂O statt Plasmid pipettiert. Es wurden 25 µl von einer 50 µl PCR-Reaktion für die Agarosegelelektrophorese eingesetzt. (L = Längenstandard, Bp = Basenpaare)

Für das PCR-Produkt des vervielfältigten Transgens hTERT mit T7-RNA-Promotor wurde eine Größe von ca. 3.500 bp erwartet. Die erfolgreiche Amplifizierung des gewünschten PCR-Produktes konnte durch das analytische Agarosegelbild der oben stehenden Abbildung 4.13 bestätigt werden. Das Fehlen eines Produktes in der Negativkontrolle (T (-)) sicherte die kontaminationsfreie Durchführung der Reaktion. Zur Entfernung von Puffer,

Enzym und weiteren störenden Bestandteilen der PCR-Amplifizierungsreaktion wurde der verbliebene Teil des PCR-Ansatzes aufgereinigt.

4.4.3 *In vitro*-Transkription

Die IVT-mRNAs zur Herstellung von potenziellen mRNA-iPS-Kolonien wurden mit dem *mMESSAGE mMACHINE*[®] T7-Kit und dem dazugehörigen *Poly(A) Tailing* Kit generiert. Nach jeder IVT wurden die erzeugten IVT-mRNAs auf ihre Qualität hin überprüft. Obwohl stets mit äußerster Sorgfalt unter RNase-/DNase-freien Bedingungen gearbeitet wurde, konnte keine 100%ige Ausbeute qualitativ hochwertiger IVT-mRNA erzeugt werden. Besonders die Amplifikation von ausreichenden Mengen an hTERT-mRNA war extrem schwierig.

4.4.4 Überprüfung der Qualität der *in vitro*-transkribierten mRNA

Zur Qualitätsüberprüfung der IVT-mRNA wurde eine automatisierte Kapillarelektrophorese mit *Lab-on-Chip*-Technologie durchgeführt. Mit dem 2100 Bioanalyser wurden die einzelnen Fraktionen der IVT-mRNA nach Größe aufgetrennt, visualisiert und in einem Elektropherogramm dargestellt.

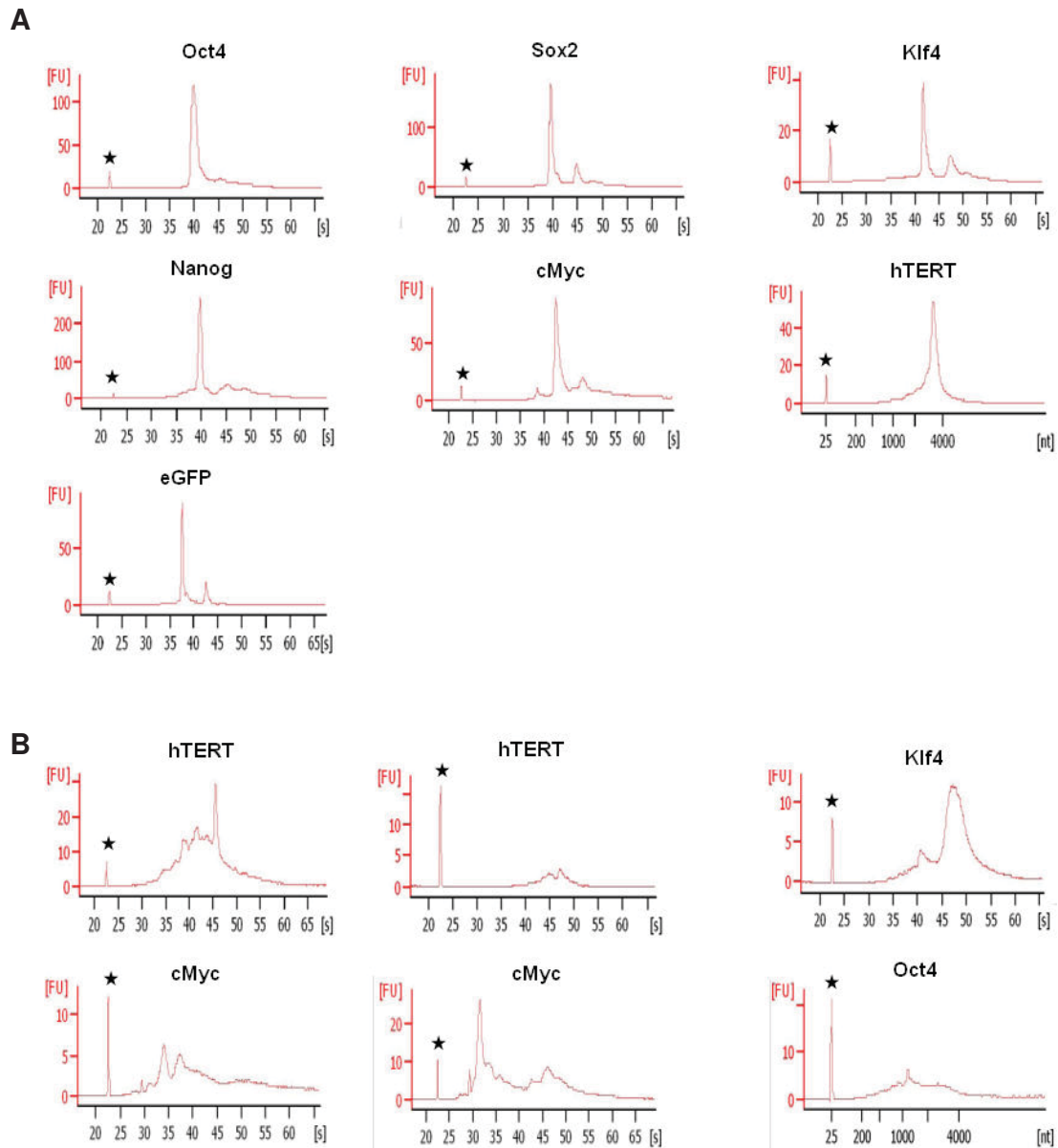


Abb. 4.14: Elektropherogramme zur Qualitätsüberprüfung der IVT-mRNA am Bioanalyzer. (A) Es wurden von den Reprogrammierungsfaktoren OSKNMT und von eGFP exemplarische Elektropherogramme dargestellt. Die jeweiligen IVT-mRNAs sind von sehr guter Qualität. In (B) sind zum Vergleich die Elektropherogramme von degradierten IVT-mRNA-Proben dargestellt. ★-markierte Peaks identifizieren den aufgetragenen RNA-Marker.

Die in Abbildung 4.14A dargestellten Elektropherogramme von OSKNMT und eGFP veranschaulichen qualitativ hochwertige mRNAs als Ergebnis der einzelnen IVT-Reaktionen. Ein spitz zulaufender Hauptpeak veranschaulicht nicht degradierte IVT-mRNA. Einzelne kleinere Nebenpeaks können toleriert werden, da der Poly(A)-Schwanz keine definierte Größe nach der Poly(A)-Reaktion aufweist (vgl. Abb. 4.14 Sox2, Klf4 und eGFP). In Abbildung 4.14B ist im Vergleich IVT-mRNA von deutlich schlechterer Qualität gezeigt. Wurden mehrere oder ausschweifende Peaks im Elektropherogramm festgestellt, wurden

4. Ergebnisse

diese IVT-mRNAs nicht für die nachfolgenden Experimente eingesetzt. Die RNA-Konzentration kann in Bezug auf die Peakfläche der mRNA zu dem RNA-Markerpeak berechnet werden. In der hier dargestellten Abbildung 4.14A hat die Nanog-mRNA eine deutlich höhere Konzentration als die in der IVT-mRNA-Probe für Klf4-RNA.

4.4.5 mRNA Transfektion zur Generierung von mRNA-iPS-Zellen

Zur Gewinnung von mRNA-iPS-Zelllinien mit Hilfe von mRNA-Transfektionen wurden humane Fibroblasten von mehreren Spendern verwendet. Es wurden Fibroblasten mit unterschiedlichen Faktorenkombinationen transfiziert.

Als Ausgangspunkt wurde die Elektroporationstechnik der Nucleofector™-Technologie verwendet. Es wurde dabei mit dem Programm U-23 gearbeitet, was die höchsten Transfektionseffizienzen erzielte (Abb. 4.15A). In der gleichen Teilabbildung wurden zum Vergleich die Transfektionseffizienzen der Elektroporationsprogramme P-22 und A-23 dargestellt. Mit diesen beiden Programmen ist nach der Elektroporation eine hohe Überlebensrate im Vergleich zu Programm U-23 erzielt worden. Die ermittelten Transfektionseffizienzen waren bei den Programmen P-22 und A-23 etwas niedriger bis deutlich niedriger ausgeprägt. Eine ähnlich hohe Transfektionseffizienz im Vergleich zum Elektroporationsprogramm U-23 konnte mit der Lipofektionsreagenz FuGENE® HD erzielt werden (Abb. 4.15B).

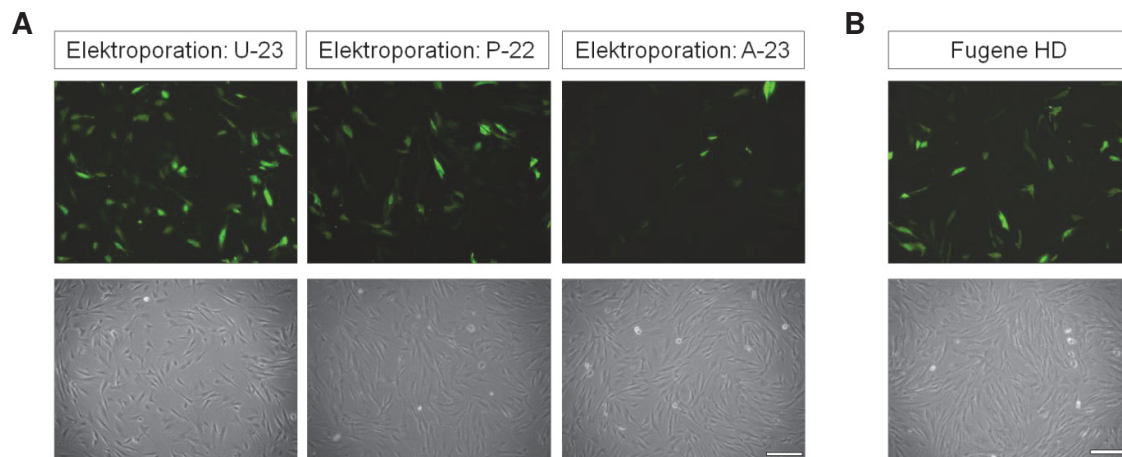


Abb. 4.15: Fluoreszenz- und durchlichtmikroskopische Aufnahmen zur Bestimmung der Transfektionseffizienzen. Die eGFP-mRNA Transfektionen wurden mit der Nucleofector™ Technologie und FuGENE® HD durchgeführt (A). Humane Fibroblasten wurden mit unterschiedlichen Elektroporationsprogrammen mit eGFP-mRNA transfiziert. (B) Als Vergleich wurden die gleichen Spenderfibroblasten mit FuGENE® HD und eGFP-mRNA transfiziert. (Messbalken = 100 µm)

Für die Reprogrammierung in mRNA-iPS-Zellen wurde ein experimentelles Design gewählt, dass mit einer Elektroporation begann, an welche sich wiederholende Transfektionen der adhärennten Zellen mittels Lipofektion anschloss. Das Protokoll der Elektroporation ist unter Kapitel 3.1.3.2.1 beschrieben. Da sich gezeigt hatte, dass exogen eingebrachte eGFP-mRNA nach 72 h einen deutlichen Abfall der Proteinexpression zeigt¹³³, wurde ein

4. Ergebnisse

Transfektionsintervall von 72 h für sich wiederholende Transfektionen mit FuGENE® HD gewählt. Entsprechend der Überlebensrate der transfizierten Zellen wurde mindestens dreimal in 72-stündigen Intervallen transfiziert. Dies ergab ein Transfektionsprotokoll über zehn Tage (vgl. schematisches Diagramm zum Reprogrammierungsprozess Abb. 4.16). Zu Beginn der Transfektionsprozedur wurden die Zellen in Fibroblastenreprogrammierungsmedium kultiviert. Am siebten Tag wurde auf iPS-Medium umgestellt (vgl. Medienzusammensetzungen unter Kapitel 7.5.2).

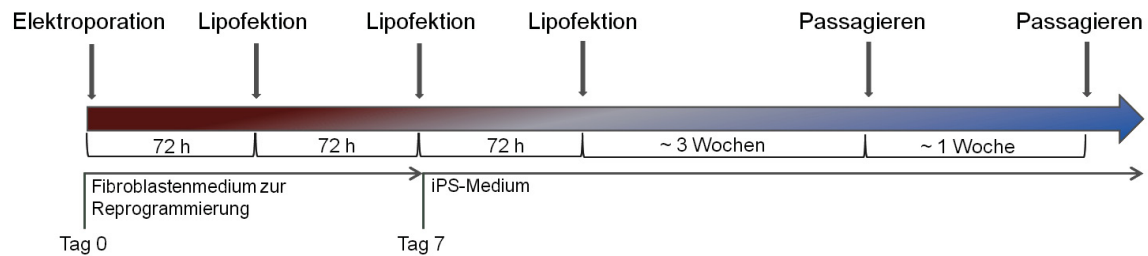


Abb. 4.16.: Ablauf des mRNA-Transfektionsprozesses. Die humanen Fibroblasten wurden zu Beginn mit Hilfe einer Elektroporation mit IVT-mRNA transfiziert. Nach 72 h wurde die mRNA-Transfektion in gleichbleibenden Zeitintervallen dreimal durch liposomale Transfektionen fortgesetzt. Innerhalb der folgenden drei Wochen wurden die transfizierten Zellen auf gelatinebeschichtete Feederzellschalen überführt. Es kam zu einer Veränderung der Morphologie der transfizierten Fibroblasten.

Drei Wochen nach Transfektion wurden morphologische Veränderungen der Zellen beobachtet. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen mechanisch zerkleinert und auf gelatinebeschichtete Feederzellschalen (58 cm² Wachstumsfläche) überführt. Nach dem Passagieren wuchsen die transfizierten Zellen in kleinen Zellverbänden (Abb. 4.17, Passage 1).

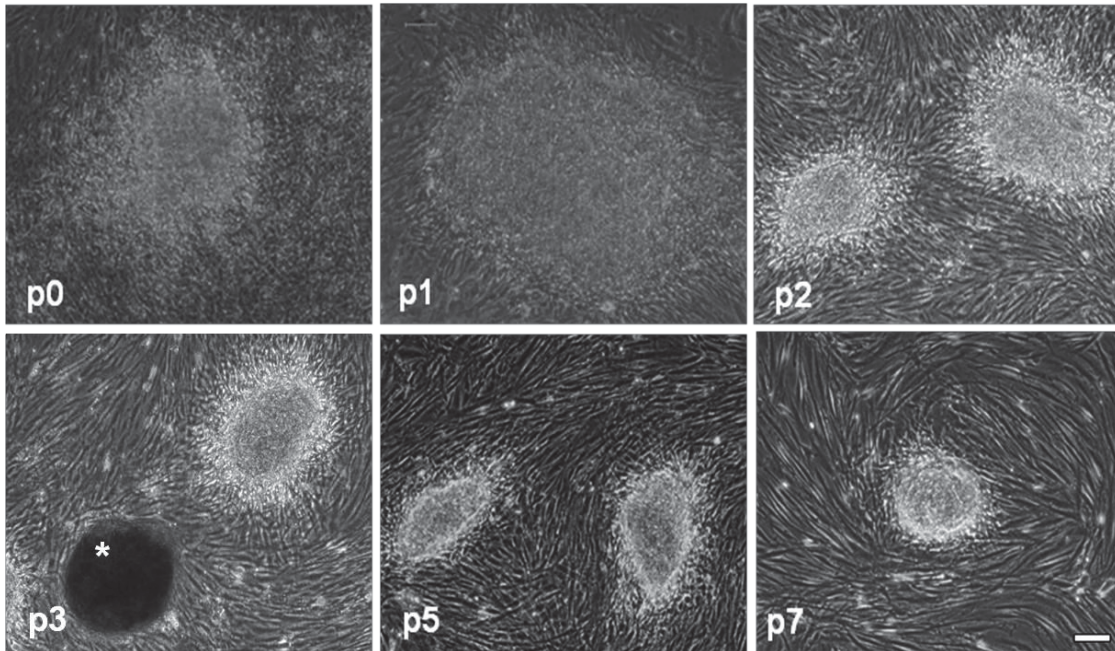


Abb. 4.17: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen zur Beurteilung mRNA-iPS-Zellmorphologie auf unterschiedlichen Passagestufen. Die Morphologie der potenziellen mRNA-iPS-Kolonien änderte sich während der Kultivierung. Zu Beginn weist die Morphologie von potenziellen mRNA-iPS-Zellen einen lockeren Zellverband auf (Passage 0-1), der sich im weiteren Verlauf der Kultivierung zu kleineren kompakteren Kolonien entwickeln (Passage 2-7). Mit einem (*) ist in Teilabbildung von Passage 3 eine spontan differenzierte Kolonie markiert. (p = Passage; Messbalken = 100 μ m)

Die entstandenen Kolonien (Abb. 4.17) wurden wie die viralen iPS-Zellkolonien passagiert und kultiviert. Im Vergleich zu den viralen iPS-Kolonien wiesen die potenziellen mRNA-iPS-Zellen kleinere Koloniegrößen und kompaktere Kolonien auf. Die in der Teilabbildung 4.17 p3 durch einen Stern (*) dargestellte, spontan differenzierte mRNA-iPS-Kolonie weist die typische morphologische Struktur eines EBs auf. Diese spontan differenzierten Kolonien wurden mechanisch aus der Kultur entfernt.

Für die Etablierung von stabilen mRNA-iPS-Zelllinien wurden unterschiedliche Faktorenkombinationen an Reprogrammierungsfaktoren getestet (OSK, ONT, ONK, ONM, ONS und OSKNMT), der Hauptpluripotenzfaktor Oct4 wurde in allen Kombinationen verwendet^{33,34}. Die entstandenen Zellverbände wurden abhängig von der Faktorenkombination gezählt und verglichen (Abb. 4.18).

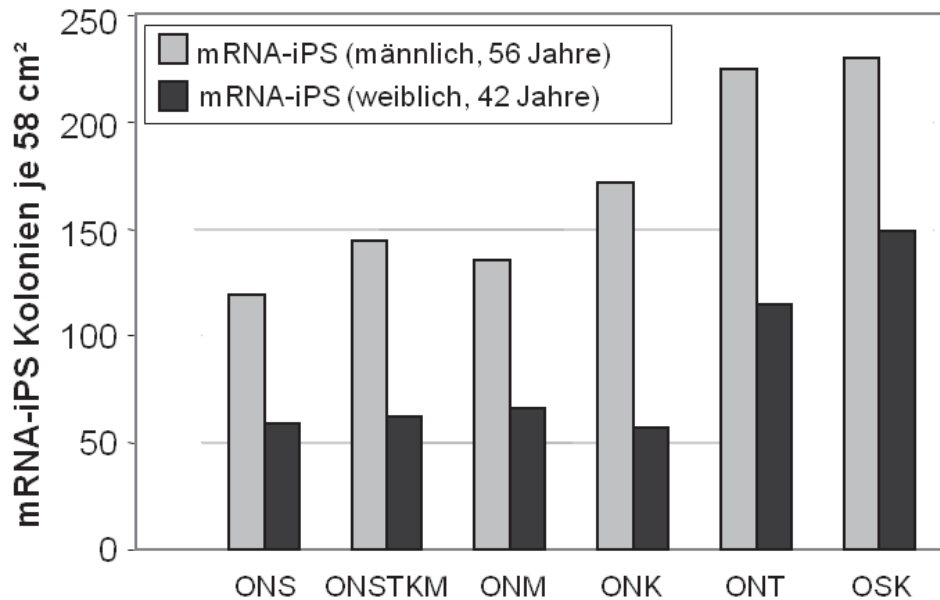


Abb. 4.18: Auszählung von potenziellen mRNA-iPS-Kolonien nach dem ersten Passagieren auf Feederzellen. Es wurden humane Spenderfibroblasten von zwei Huntingtonpatienten (männlich, 56 Jahre und weiblich, 42 Jahre) mit den Faktorenkombinationen ONS, OSKNMT, ONM, ONK, ONT und OSK transfiziert. Die entstandenen Kolonien wurden in 10 cm² Zellkulturschale (58 cm²) gezählt.

Dieses Experiment konnte nur einmal mit transfizierten Fibroblasten von Huntingtonpatienten (Huntingtonpatienten: weiblich, 42 Jahre und männlich, 56 Jahre) durchgeführt werden. Wie in Abbildung 4.18 deutlich zu erkennen, ergab die mRNA-Transfektion von Fibroblasten der jüngeren, weiblichen Huntingtonpatientin in allen verwendeten Faktorenkombinationen weniger potenzielle mRNA-iPS-Kolonien. Es zeigte sich, dass für beide Spenderfibroblasten der Huntingtonpatienten mit den Faktorenkombinationen ONT und OSK die meisten mRNA-iPS-Kolonien generiert wurden. Zu diesem Zeitpunkt wurden deutlich weniger Kolonien mit den anderen Faktorenkombinationen erzielt. Bei längerer Kultivierung über mehrere Passagen zeigte sich aber, dass mit den Faktorenkombinationen OSKNMT und OSK stabilere potenzielle mRNA-iPS-Zelllinien generiert werden konnten. Mit allen Faktorenkombinationen konnten Kolonien bis Passage fünf identifiziert werden. Nach dieser Passagiestufe wurde keine Proliferation für die Faktorenkombinationen ONS, ONM, ONK und ONT festgestellt.

4.5 Pluripotenzüberprüfung der potenziellen mRNA-iPS-Zellen

4.5.1 Nachweis der alkalischen Phosphataseaktivität in mRNA-iPS-Kolonien

Um zu analysieren, ob die entstandenen, potenziellen mRNA-iPS-Kolonien auf Passagiestufe eins pluripotent sind, wurde eine Färbung der AP-Aktivität durchgeführt. Wie in Kapitel 4.3.1 besprochen, ist gerade die AP-Färbung zu Beginn der Etablierung einer stabilen iPS-Zelllinie eine einfache und schnelle Methode zum Nachweis der Pluripotenz.

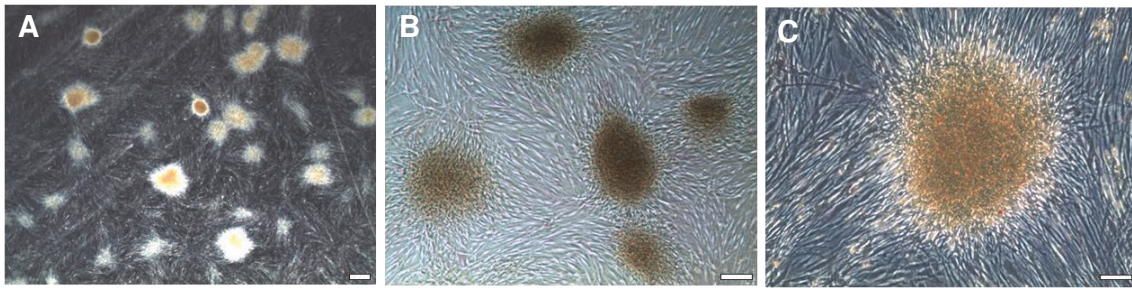


Abb. 4.19: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von AP-gefärbten mRNA-iPS-Kolonien auf humanen Feederzellen zur Überprüfung der Pluripotenz. (A-C) Pluripotente Zellen erscheinen nach Zugabe des AP-Substrats rot. Die humanen Feederzellen hingegen können das AP-Substrat nicht umsetzen und dienen gleichzeitig als Negativkontrolle. In Teilabbildungen (A und B) sind die heterogenen Verteilungen der Pluripotenz innerhalb verschiedener mRNA-iPS-Kolonien dargestellt. (Passagestufe 1; Messbalken: A = 500 μm , B = 200 μm , C = 100 μm)

In den entstandenen potenziellen mRNA-iPS-Kolonien konnte die AP-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 4.19 A-C). Die potenziellen mRNA-iPS-Kolonien sind rot gefärbt. Weiterhin ist in der oben aufgeführten Abbildung zu erkennen, dass die mRNA-iPS-Kolonien unterschiedliche Farbintensitäten aufweisen. Die somit unterschiedliche AP-Aktivität kann einen zusätzlichen Hinweis auf den Status der Reprogrammierung geben. Zu diesem Zeitpunkt sind die mRNA-iPS-Kolonien nicht stabil. In der folgenden Passagierung wurden die morphologischen Gegebenheiten von stärker angefärbten mRNA-iPS-Kolonien berücksichtigt und nur diese mRNA-iPS-Kolonien passagiert.

4.5.2 Immunzytochemischer Nachweis von Pluripotenzmarkern

Die potenziellen mRNA-iPS-Zellen wurden analog zu den viralen iPS-Zellen immunzytochemisch auf die Proteinexpression von humanen Pluripotenzmarkern hin analysiert (siehe Kapitel 4.3.2).

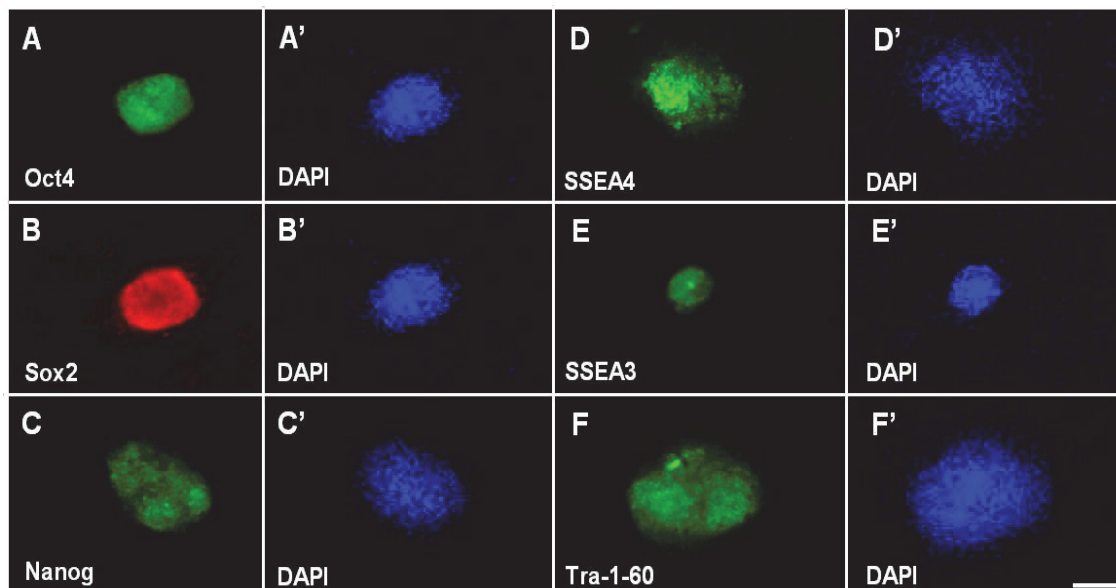


Abb. 4.20: Immunfluoreszenzmikroskopische Pluripotenzcharakterisierung von generierten mRNA-iPS-Kolonien aus humanen adulten Fibroblasten. Die potenziellen mRNA-iPS-Kolonien

4. Ergebnisse

wurden auf humanen Feederzellen kultiviert. Dargestellt sind die Immunfluoreszenzfärbungen der pluripotenten Transkriptionsfaktoren Oct4 (A), Nanog (B) und Sox2 (C). Es folgen die spezifischen Oberflächenmarker für humane pluripotente Stammzellen SSEA 4 (D), SSEA3 (E) und Tra-1 60 (F). Die DNA-Färbung im Zellkern erfolgte mit DAPI (A', B', C', D', E', F'). (Messbalken = 100 µm)

Wie in der obenstehenden Abbildung 4.20 dargestellt, konnten die pluripotenten Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog (Abb. 4.20 A-C) nicht im Zellkern der einzelnen Zellen innerhalb der Kolonien nachgewiesen werden. Es konnten zwar iPS-Kolonieformen identifiziert werden, aber eine Detektion im Zellkern, wie es für aktivierte Transkriptionsfaktoren üblich ist, konnten nicht beobachtet werden. Die membranständigen Pluripotenzmarker SSEA3, SSEA4 und Tra-1-60 wurden auf der Oberfläche der iPS-Kolonien nachgewiesen (Abb. 4.20 D-F). Hier ist aber eher davon auszugehen, dass es sich um eine unspezifische Färbung handelt. Die analysierten mRNA-Kolonien zeigten in der immunzytochemischen Charakterisierung somit kein typisches Proteinexpressionsmuster von humanen pluripotenten Stammzellen.

4.5.3 Spontane Differenzierung in Embryoid Bodies

Zum Nachweis der spontanen Differenzierung in alle drei Keimblätter, als weiteres Kriterium für Pluripotenz, wurden die potenziellen mRNA-iPS-Zellen als Suspensionskultur unter Normoxiebedingungen (21 % O₂) kultiviert. Trotz Überführung der feederfreien Einzelzellen in Schalen mit geringer Anheftungsoberfläche für adhärente Zellen hatten die entstandenen dreidimensionalen Aggregate (mögliche Embryoid Bodies, EBs) die Neigung, sich auf der Schalenoberfläche anzuheften. Um einem adhären Wachstum entgegenzuwirken, wurden die Zellaggregate durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in Suspension überführt. Um zu überprüfen, ob sich die potenziellen mRNA-iPS-Zellen spontan in EBs differenziert haben, wurden an Tag neun der Induktion die Morphologie und die Proteinexpression von spezifischen Differenzierungsmarkern für alle drei Keimblätter analysiert.

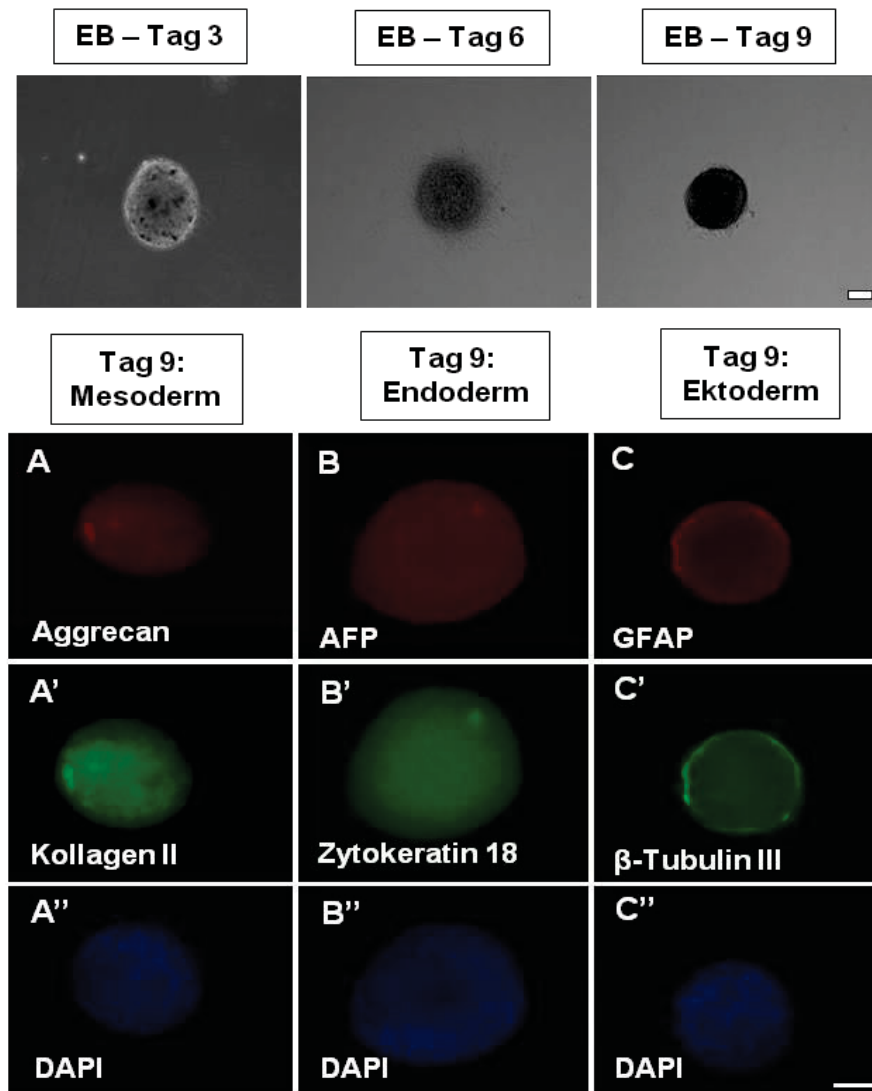


Abb. 4.21: Spontane Differenzierung in EBs von potenziellen mRNA-iPS-Zellen generiert aus humanen adulten Fibroblasten. Dargestellt sind im oberen Teil der Abbildung die durchlichtmikroskopischen Aufnahmen der Entwicklung spontan differenzierter EBs von Tag 3, 6 und 9. Im unteren Teil der Abbildung ist die immunfluoreszenzmikroskopische Charakterisierung der Proteinexpression aller drei Keimblätter am Tag 9 nach Induktion der spontanen Differenzierung dargestellt. Nachweis der Differenzierung in die mesodermale Richtung durch Anfärbung mit Aggrecan (A) und Kollagen II (A'), endodermale Richtung durch Anfärbung mit AFP (B) und Zytokeratin 18 (B') und ektodermale Richtung durch Anfärbung von GFAP (C) und β -Tubulin III (C'). Dargestellt ist weiterhin die DNA-Färbung im Zellkern mit DAPI (A'', B'', C''). (Messbalken = 100 μ m)

Im Verlauf der spontanen Differenzierungszeit haben sich die morphologischen Charakteristika der dreidimensionalen Aggregate verändert. Wie die durchlichtmikroskopischen Aufnahmen im oberen Teil der Abbildung 4.21 belegen, wurde die Struktur der EBs über die Kultivierungsdauer von neun Tagen kompakter. Am Anfang der Kultivierung in Suspension erwiesen sich die EBs als lockere Zellkörper (Tag drei), die sich zu immer dichteren Zellhaufen entwickelten (Tag neun).

Wie im oberen Teil der Abbildung 4.21 dargestellt, formierten die mRNA-iPS-Zellen dreidimensionale Aggregate, bei denen es sich um EBs handeln könnte. Die Aggregate

4. Ergebnisse

wurden auf die Proteinexpression von mesodermalen, endodermalen und ektodermalen Markern immunzytochemisch hin untersucht. In den spontan gebildeten dreidimensionalen Aggregaten konnten nach neuntägiger Suspensionskultur die Chondrozytenmarker Aggrecan und Kollagen II nicht detektiert werden (Abb. 4.21 A und A'). Der Nachweis der mesodermalen Differenzierung konnte somit nicht erbracht werden. Weiterhin wurden die potenziellen EBs auf Zellen des endodermalen Ursprungs mit den Markern AFP und Zytokeratin 18 (Abb. 4.21 B und B') hin analysiert. Die immunzytochemische Färbung erbrachte keinen Nachweis auf Zellen, die AFP und Zytokeratin 18 exprimieren. Ebenso wenig konnte der Nachweis der Proteinexpression von GFAP und β -Tubulin III für Zellen ektodermalen Ursprungs erbracht werden (Abb. 4.21 C und C'). Die stärkeren Färbintensitäten am Rand der dreidimensionalen Aggregate sind vermutlich eher auf Auto-fluoreszenz zurückzuführen als auf spezifische Färbesignale.

4.5.4 Direkte Differenzierung in alle drei Keimblätter

Neben der spontanen Differenzierung in alle drei Keimblätter durch die EB-Formierung stellt die direkte *in vitro* Differenzierung eine weitere Anforderung für die Charakterisierung pluripotenter Stammzellen dar. Für die humanen potenziellen mRNA-iPS-Zellen wurden die gleichen Differenzierungsprotokolle wie für die humanen viralen iPS-Zellen angewendet. Für alle drei Keimblätter wurden die zu differenzierenden Zellen für 14 Tage in den entsprechenden Induktionsmedien unter normoxischen Bedingungen (21 % O₂) kultiviert.

4. Ergebnisse

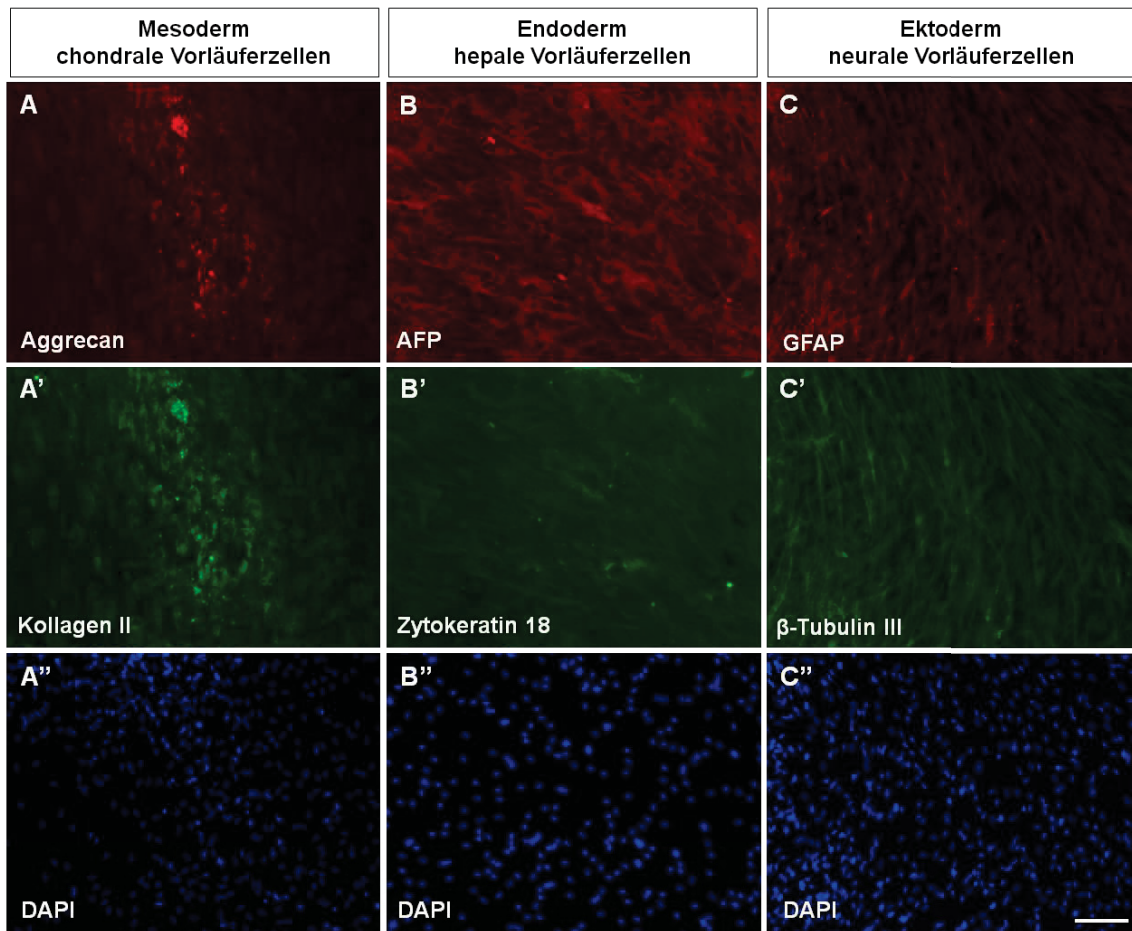


Abb. 4.22: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse nach direkter Differenzierung von mRNA-iPS-Zellen in alle drei Keimblätter. Nach 14-tägiger Induktion in entsprechenden Differenzierungsmedien sind die Färbungen zur Detektion von chondralen (A und A'), hepalen (B und B') und neuralen Markern (C und C') dargestellt. Die DNA im Zellkern wurde mit DAPI sichtbar gemacht (A'', B'' und C''). (Messbalken = 100 μ m)

In Abbildung 4.22 sind die Ergebnisse der direkten Differenzierungen in alle drei Keimblätter nach 14-tägiger Induktion von möglichen mRNA-iPS-Zellen dargestellt. In der analysierten mesodermalen Differenzierung in chondrale Vorläuferzellen konnte die Expression der Proteine Aggrecan und Kollagen II (Abb. 4.22A und A') immunfluoreszenzmikroskopisch nicht detektiert werden. Weiterhin konnten die Proteine AFP und Zytokeratin 18 (Abb. 4.22B und B') für hepale Vorläuferzellen und die Marker GFAP und β -Tubulin III (Abb. 4.22C und C') für neurale Vorläuferzellen nicht nachgewiesen werden. Es konnte somit kein Nachweis der *in vitro* Differenzierung in alle drei Keimblätter der potenziellen mRNA-iPS-Zellen erbracht werden.

4.5.5 Teratomnachweis

Als Goldstandard für die Pluripotenzüberprüfung von humanen PS-Zellen wird die Teratomformierung in immundefizienten Mäusen durchgeführt. Proliferierende potenzielle mRNA-iPS-Zellen wurden der Epo GmbH (Berlin) zur Injektion in NOD scid gamma Mäuse

übergeben. Zwölf Wochen nach Zellinjektion wurde das Experiment beendet. Makroskopisch konnten keine Veränderungen bei den Mäusen festgestellt werden. Muskelgewebe aus den Bereichen der Injektionsstellen wurden entfernt und auf mögliche Teratomformierungen untersucht. Es wurden keine Veränderungen festgestellt.

4.5.6 Karyotypanalyse von viral und mRNA hergestellten humanen iPS-Zellen

Durch den Vorgang der Reprogrammierung kommt es häufig zu Veränderungen der Chromosomen¹³⁴. Um diese möglichen Veränderungen auszuschließen, wurde eine Karyotypanalyse durchgeführt (Abb. 4.23). Nur iPS-Kolonien ab Passage fünf sind in der Karyotypanalyse untersucht worden.

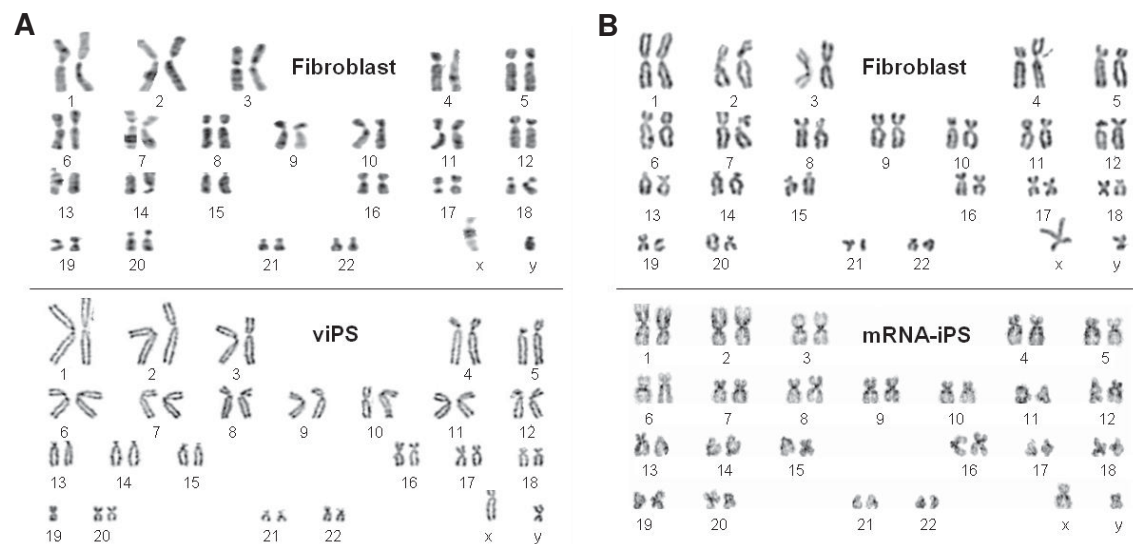


Abb. 4.23: G-Bänderung zur Karyotypanalyse von viralen und potenziellen mRNA-iPS-Zellen. In Teilabbildung (A) sind die Ideogramme von adulten humanen Fibroblasten und durch virale Transduktion generierten iPS-Zellen (viPS) dargestellt. In Teilabbildung (B) sind die Ideogramme von humanen Vorhautfibroblasten und über mRNA-Transfektionen gewonnenen Kolonien dargestellt.

Im oberen Teil der Abbildungen 4.23A und B sind die entsprechenden humanen Spenderfibroblasten dargestellt, die für die jeweilige Reprogrammierungsmethode verwendet wurden. Die durch Reprogrammierung mit Hilfe viraler Transduktion beziehungsweise mRNA-Transfektionen entstandenen Kolonien sind im unteren Teil der Abbildung 4.23A bzw. B dargestellt. Es wurde weder nach viraler Transduktion bzw. mRNA-Transfektionen in den generierten Kolonien Chromosomenabnormalitäten festgestellt. Die in Abbildung 4.23 exemplarisch dargestellten Karyogramme zeigen einen normalen 44 XY Karyotyp. Die Bandenstruktur wurde durch Giemsa-Färbung (G-Bänderung) sichtbar gemacht. Die Ideogramme wurden unter fachlicher Anweisung von Dr. Federova (Fraunhofer IZI, Leipzig) erstellt.

4.5.7 qPCR auf Pluripotenzmarker

Mit Hilfe der qPCR sollten Expressionsunterschiede auf mRNA-Ebene für pluripotenzrelevante Gene untersucht werden. Dazu wurden die Genexpressionen von Fibroblasten des männlichen Huntingtonpatienten, potenziellen mRNA-iPS-Zellen und mRNA-transfizierten Fibroblasten ohne Koloniebildung untersucht. Diese wurden mit den Faktorenkombinationen OSK, ONT, ONM, ONS, ONK sowie OSKNMT generiert. Weiterhin wurden virale iPS-Zellen der Faktorenkombination OSKNMT des gleichen Huntingtonpatienten analysiert. Dieses Experiment konnte nur einmal mit potenziellen mRNA-iPS-Kolonien des männlichen Huntingtonpatienten durchgeführt werden, da nicht ausreichend Zellmaterial von potenziellen mRNA-iPS-Kolonien zur Verfügung stand. Von Vorhautfibroblasten konnte nur mit der Faktorenkombination OSK genügend Zellmaterial nach mRNA-Transfektionen generiert werden. Es wurden technische Replikate der einzelnen Proben analysiert. Von der humanen ES-Zelllinie H9 stand mRNA für dieses Experiment als Positivkontrolle zur Verfügung¹.

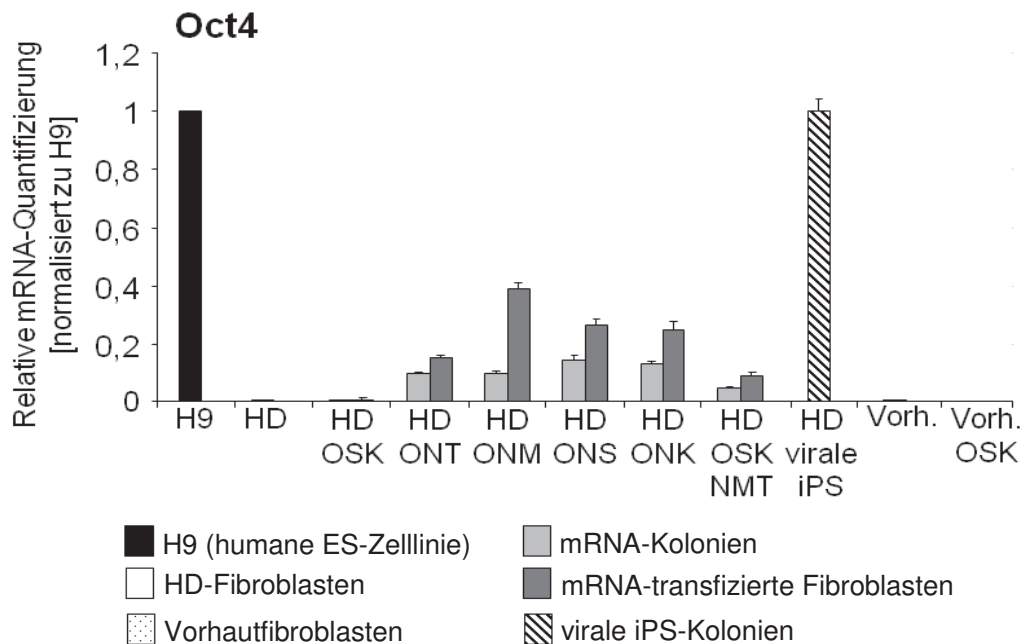


Abb. 4.24: Expression von Oct4 nach mRNA-Transfektionen und viraler Transduktion. Die Expression von Oct4 ist in viralen iPS-Zellen auf einem gleichen Niveau wie in H9-Zellen. Mit den Faktorenkombinationen ONT, ONM, ONS, ONK und OSKNMT wurden in mRNA-transfizierten Fibroblasten und potenziellen mRNA-iPS-Kolonien Oct4-Expressionen detektiert. Diese Expressionen waren im Vergleich zu H9-Zellen geringer, wobei die mRNA-transfizierten Zellen immer mehr Oct4 exprimierten als potenzielle mRNA-iPS-Kolonien. Oct4 wurde nicht in den mRNA-transfizierten Fibroblasten und potenziellen mRNA-iPS-Kolonien der Faktorenkombination OSK sowie den jeweiligen Spenderfibroblasten nachgewiesen. Es wurden die jeweiligen Mittelwerte und \pm Standardabweichungen grafisch dargestellt. Diese wurden auf H9-Zellen zu 1 normiert. (HD, engl. *Huntington's disease*, Vorh. = Vorhaut)

¹ mRNA der H9-Zelllinie von Dr. Armstrong freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Newcastle University, Newcastle upon Tyne, UK)

4. Ergebnisse

In Abbildung 4.24 ist die Expression des pluripotenzspezifischen Transkriptionsfaktors Oct4 dargestellt. Die viralen iPS-Zellen exprimieren Oct4 gleich stark wie die Positivkontrolle H9. Die potenziellen mRNA-iPS-Zellen und mRNA-transfizierten Fibroblasten zeigen in allen analysierten Faktorenkombinationen eine deutlich geringere Oct4-Expression im Vergleich zu den H9-Zellen. Bei den analysierten Proben der Faktorenkombination OSK wurde kein Oct4 detektiert. Dies gilt sowohl für potenzielle mRNA-iPS-Kolonien und mRNA-transfizierte Fibroblasten, die aus Vorhautfibroblasten und Fibroblasten des Huntingtonpatienten generiert wurden. Auffällig ist, dass die mRNA-transfizierten Fibroblasten eine höhere Oct4-mRNA-Expression aufweisen als die potenziellen mRNA-iPS-Kolonien. Im Vergleich zu den Fibroblasten des Huntingtonpatienten wurde ein ca. 0,18 erhöhtes Expressionsniveau in potenziellen mRNA-iPS-Kolonien der Faktorenkombination ONS detektiert. Dies war die höchste nachgewiesene Oct4-Expression in koloniebildenden Zellen. In ONM-mRNA-transfizierten Fibroblasten des Huntingtonpatienten wurde eine 0,4-fach erhöhte Oct4-Expression im Vergleich zu den Spenderfibroblasten detektiert. Es war die höchste detektierte Oct4-Expression in Zellen, die mit Oct4-mRNA transfiziert wurden.

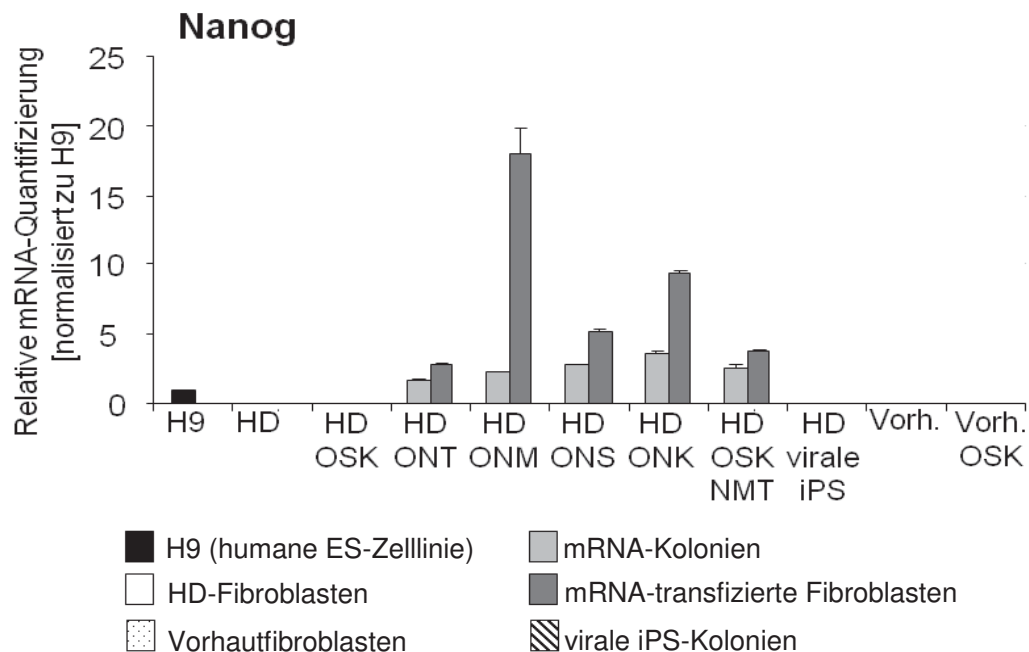


Abb. 4.25: Expression von Nanog nach mRNA-Transfektionen und viraler Transduktion. Es wurde eine Nanog-Expression in potenziellen mRNA-iPS-Kolonien und mRNA-transfizierten Fibroblasten der Faktorenkombinationen ONT, ONM, ONS, ONK und OSKNMT nachgewiesen. Die potenziellen mRNA-iPS-Zellen und transfizierten Fibroblasten der Faktorenkombination OSK exprimierten kein Nanog. Es wurde keine Expression von Nanog in viralen iPS-Zellen und den jeweiligen Spenderfibroblasten nachgewiesen. Die jeweiligen Mittelwerte und \pm Standardabweichungen sind grafisch dargestellt. Diese wurden auf H9-Zellen zu 1 normiert. (HD, engl. *Huntington's disease*, Vorh. = Vorhautfibroblasten)

Die mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors Nanog ist in Abbildung 4.25 dargestellt. In potenziellen mRNA-iPS-Zellen und transfizierten Fibroblasten, die mit den Faktorenkombinationen ONT, ONM, ONS, ONK und OSKNMT generiert wurden, wurde eine höhere

4. Ergebnisse

Nanog-Expression im Vergleich zu den H9-Zellen nachgewiesen. Die Nanog-Expression in mRNA-transfizierten Fibroblasten war stets höher als in den potenziellen mRNA-iPS-Kolonien dieser analysierten Proben. ONM-transfizierte Fibroblasten hatten eine 20-fach erhöhte Expression. Dies war die höchste ermittelte Nanog-Expression in den analysierten Proben. Potenzielle mRNA-iPS-Kolonien, die mit der Faktorkombination ONM generiert wurden, weisen eine 3-fach erhöhte Nanog-Expression auf. Die mit der Faktorkombination OSK transfizierten Zellen exprimierten kein Nanog, wie auch die entsprechenden Spenderfibroblasten. Erstaunlich ist, dass in den viralen iPS-Zellen keine Nanog-Expression detektiert wurde.

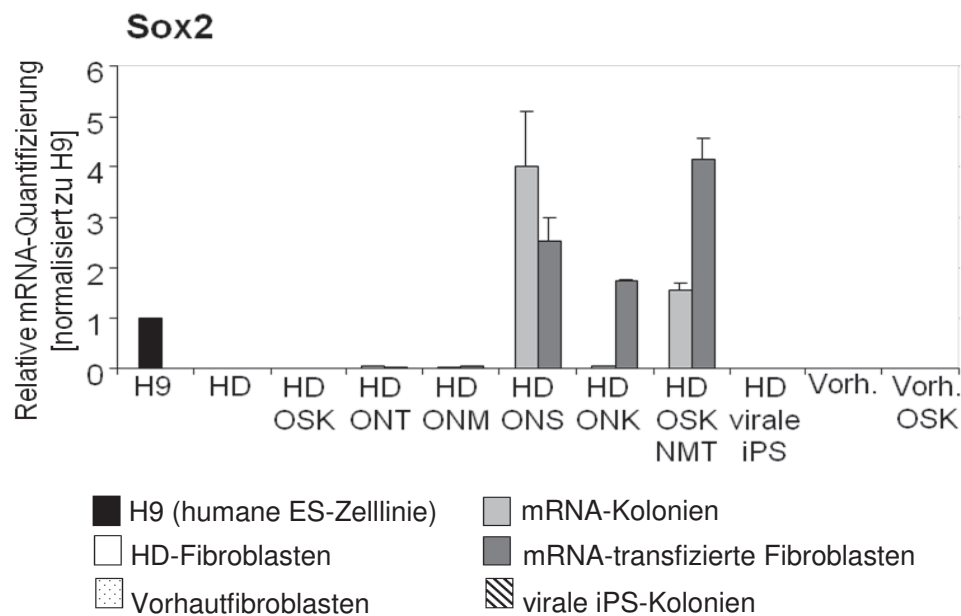


Abb. 4.26: Expression von Sox2 nach mRNA-Transfektionen und viraler Transduktion. In transfizierten Fibroblasten, die mit den Faktorkombinationen ONS, ONK und ONSTKM generiert wurden, wurde eine erhöhte Sox2-Expression nachgewiesen. Eine Expression von Sox2 konnte mit den Faktorkombinationen ONS und OSKNMT in potenziellen mRNA-iPS-Kolonien detektiert werden. Grafisch dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte und \pm Standardabweichungen. Diese wurden auf H9-Zellen zu 1 normiert. (HD, engl. *Huntington's disease*, Vorh. = Vorhautfibroblasten)

In Abbildung 4.26 wird die mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors Sox2 dargestellt. Es wurde eine erhöhte Sox2-Expression in mRNA-transfizierten Fibroblasten der Faktorkombinationen ONS, ONK und OSKNMT detektiert. Die höchste mRNA-Expression wurde in den OSKNMT-transfizierten Fibroblasten nachgewiesen. Im Vergleich zu H9-Zellen wiesen sie eine 4-fach erhöhte Sox2-Expression auf. In den potenziellen mRNA-iPS-Kolonien wurden bei den Faktorkombinationen ONS eine 4-fache und bei OSKNMT eine 1,5-fach höhere Sox2-Expression im Vergleich zu den H9-Zellen ermittelt. Alle weiteren untersuchten Proben zeigten keine Sox2-Expression.

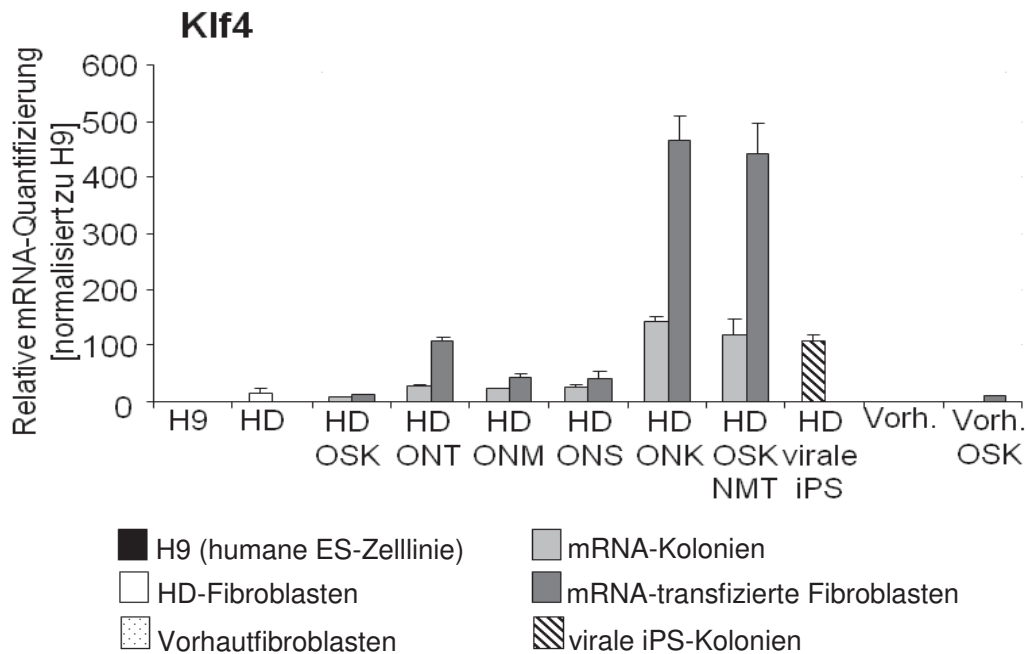


Abb. 4.27: Expression von Klf4 nach mRNA-Transfektionen und viraler Transduktion. Eine Klf4-Expression wurde in allen mRNA-transfizierten Fibroblasten, potenziellen mRNA-iPS-Kolonien, viralen iPS-Zellen und jeweiligen Spenderfibroblasten detektiert. Die jeweiligen Mittelwerte und \pm Standardabweichungen sind grafisch dargestellt. Diese wurden auf H9-Zellen zu 1 normiert. (HD, engl. *Huntington's disease*, Vorh. = Vorhautfibroblasten)

Wie in Abbildung 4.27 dargestellt, konnte in allen analysierten Proben eine Klf4-Expression nachgewiesen werden. In den Fibroblasten des Huntingtonpatienten ist eine 10-fach höhere endogene Klf4-Expression detektiert worden als in den H9-Zellen. Bei den transfizierten Fibroblasten der Faktorkombinationen ONK und OSKNMT wurde eine 500-fach erhöhte Klf4-Expression im Vergleich zu H9-Zellen ermittelt. Potenzielle mRNA-iPS-Zellen, die mit den gleichen Faktoren generiert worden sind, weisen eine ca. 150-fache erhöhte Klf4-Expression im Vergleich zu den humanen ES-Zellen H9 auf. In den mit OSK generierten potenziellen mRNA-iPS-Zellen und transfizierten Fibroblasten des Huntingtonpatienten wurden im Vergleich zu den entsprechenden Spenderfibroblasten weniger Klf4 detektiert. Die viralen iPS-Kolonien zeigten eine 120-fache höhere Klf4-Expression als die Positivkontrolle.

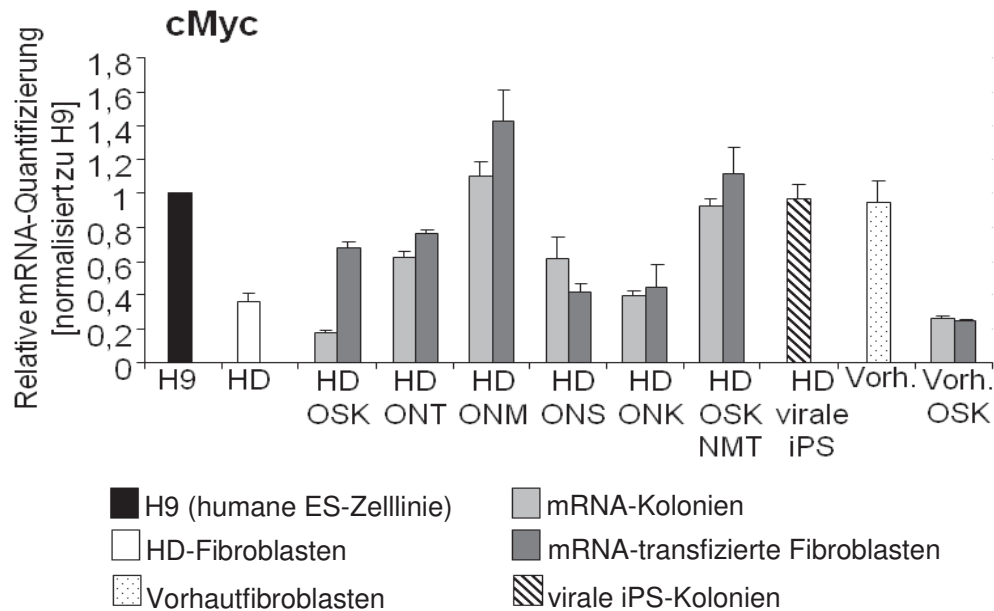


Abb. 4.28: Expression von cMyc nach mRNA-Transfektionen und viraler Transduktion. Das cMyc-Expressionsniveau in virale iPS-Zellen, Vorhautfibroblasten sowie potenzielle mRNA-iPS-Zellen der Faktorkombination OSKNMT ist etwa gleich hoch wie in H9-Zellen. Ein höheres Expressionslevel wurde in transfizierten Fibroblasten mit den Faktorkombinationen ONM und OSKNMT sowie in potenziellen ONM-mRNA-iPS-Zellen ermittelt. Alle weiteren Proben wiesen niedere cMyc-Expressionsniveaus im Vergleich zu H9-Zellen auf. Es wurden die jeweiligen Mittelwerte und \pm Standardabweichungen grafisch dargestellt. Diese wurden auf H9-Zellen zu 1 normiert. (HD, engl. *Huntington's disease*, Vorh. = Vorhautfibroblasten)

Mittels qPCR konnte eine cMyc-Expression bei allen mRNA-transfizierten Fibroblasten, potenziellen mRNA-iPS-Zellen, viralen iPS-Zellen und den entsprechenden Spenderfibroblasten detektiert werden (Abb. 4.28). In den Vorhautfibroblasten wurde eine gleich hohe cMyc-Expression nachgewiesen wie in den H9-Zellen. Diese Expressionsstärke wurde auch für die viralen iPS-Zellen und die potenziellen mRNA-iPS-Zellen der Faktorkombination OSKNMT ermittelt. Die Spenderfibroblasten des Huntingtonpatienten zeigen eine um ca. 0,6 niedrigere Expressionsstärke als die H9-Zellen. Im Vergleich zu den H9-Zellen wiesen die OSKNMT transfizierten Fibroblasten eine leicht höhere cMyc-Expressionsstärke auf. Die potenziellen mRNA-iPS-Kolonien, die mit der Faktorkombination ONM generiert wurden, wiesen eine 1,2-fach höhere cMyc-Expression auf. Die mit der gleichen Faktorkombination transfizierten Fibroblasten exprimierten cMyc 1,4-fach höher als die H9-Zellen. Alle übrigen Faktorkombinationen hatten im Vergleich zu den H9-Zellen eine geringere Expressionsstärke.

4.5.8. Bestimmung von Telomerlängen

Die Telomerlängen in PS-Zellen werden aufgrund der hohen endogenen Telomeraseaktivität stetig verlängert, wodurch diese auf einem kontinuierlich gleichbleibenden Niveau gehalten werden. Dies führt zu einer theoretisch unendlichen Teilungskapazität von diesen Stammzellen. Die Telomerlängen in somatischen beziehungsweise differenzierten Zellen verkürzen

4. Ergebnisse

sich während jeder Zellteilung. Die Unterscheidung der Telomerlängen der Spenderzellpopulation und nach einer Reprogrammierung in potenzielle iPS-Zellen kann als weiteres Charakteristikum zur Pluripotenzbestimmung herangezogen werden.

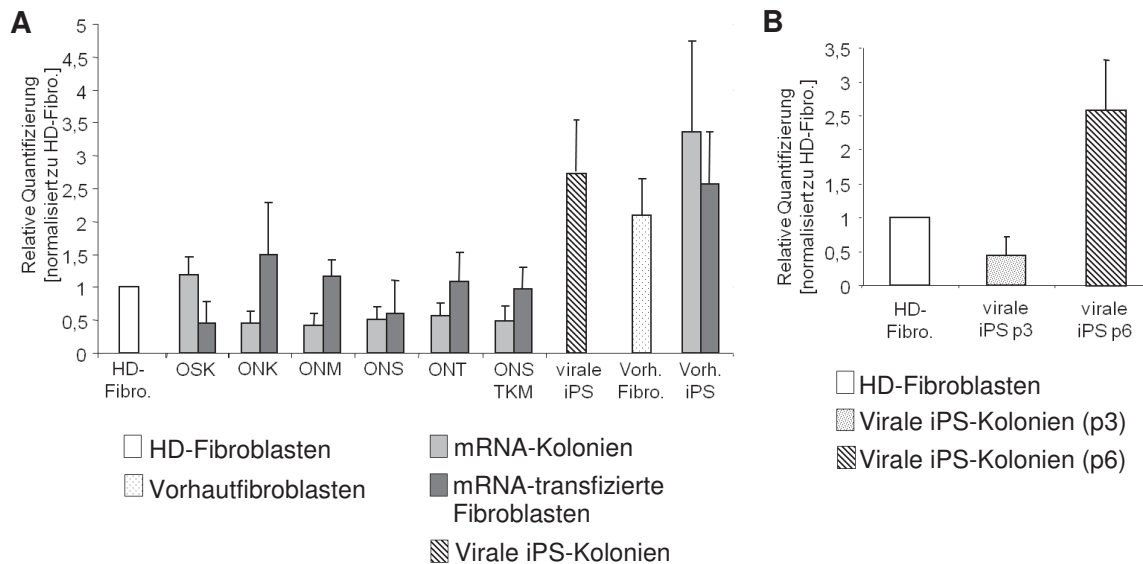


Abb. 4.29: Telomerlängenanalyse nach mRNA-Transfektionen und viraler Transduktion. In (A) ist gezeigt, dass die viralen iPS-Zellen zu den entsprechenden Fibroblasten des Huntingtonpatienten (HD-Fibro.) eine Verlängerung der Telomere aufweisen. Die Vorhautfibroblasten haben im Vergleich zu den Fibroblasten des Huntingtonpatienten längere Telomere. Die Telomerlängen der aus Vorhautfibroblasten generierten potenziellen mRNA-iPS-Zellen und mRNA-transfizierten Fibroblasten weisen durch die hohe Standardabweichung keine wirkliche Verlängerung der Telomere auf. In (B) wurden virale iPS-Zellen auf unterschiedlichen Passagestufen untersucht. Virale iPS-Zellen auf Passagestufe 3 zeigen eine Verkürzung und auf Passage 6 eine Verlängerung der Telomere im Vergleich zu den Spenderfibroblasten. Es wurden die jeweiligen Mittelwerte und \pm Standardabweichungen grafisch dargestellt. Diese wurden auf die Spenderfibroblasten des Huntingtonpatienten zu 1 normiert. (HD, engl. *Huntington's disease*, Fibro. = Fibroblasten, Vorh. = Vorhautfibroblasten, p = Passage)

In Abbildung 4.29A wurden die Telomerlängen mit Hilfe der qPCR bestimmt. Potenzielle mRNA-iPS-Zellen, die mit den Faktorenkombinationen ONK, ONT, ONM, ONS und OSKNMT generiert wurden, zeigen im Vergleich zu den Fibroblasten des Huntingtonpatienten eine Verkürzung der Telomere. Bei den potenziellen OSK-mRNA-iPS-Kolonien wurde eine leichte Verlängerung der Telomere nachgewiesen. Aufgrund der hohen Standardabweichung der potenziellen mRNA-iPS-Zellen aus Vorhautfibroblasten kann keine Telomerverlängerung festgestellt werden. Die Standardabweichungen in den mRNA-transfizierten Fibroblasten des Huntingtonpatienten ist ebenfalls sehr hoch, so dass keine Aussage getroffen werden kann, ob es zu einer Verlängerung (Faktoren: ONK, ONM, ONT, OSKNMT) oder zu einer Verkürzung (Faktoren: OSK, ONS) der Telomere kam. Transfizierte Vorhautfibroblasten weisen ebenso eine hohe Standardabweichung auf.

Das Phänomen der verkürzten Telomere kurz nach dem Reprogrammierungsprozess wird besonders in Abbildung 4.29B deutlich. Die Telomerlängen der viralen iPS-Zellen auf

Passagestufe drei sind im Vergleich zu den Fibroblasten des Huntingtonpatienten verkürzt. Bis Passage sechs kam es zu einer Verdopplung der Telomerlängen in Bezug auf die Spenderfibroblasten.

4.5.9 Bestimmung der Telomeraseaktivität

Die Enzymaktivität der Telomerase ist nur in PS-Zellen und Krebszellen ausreichend stark, um für beide Zelltypen eine theoretisch unendliche Teilungskapazität und gleichbleibend lange Telomerenden zu ermöglichen. In differenzierten Zellen ist keine oder wenig Telomeraseaktivität vorhanden, was in einer graduellen Verkürzung der Telomerlängen in somatischen Zellen während der Zellteilung resultiert.

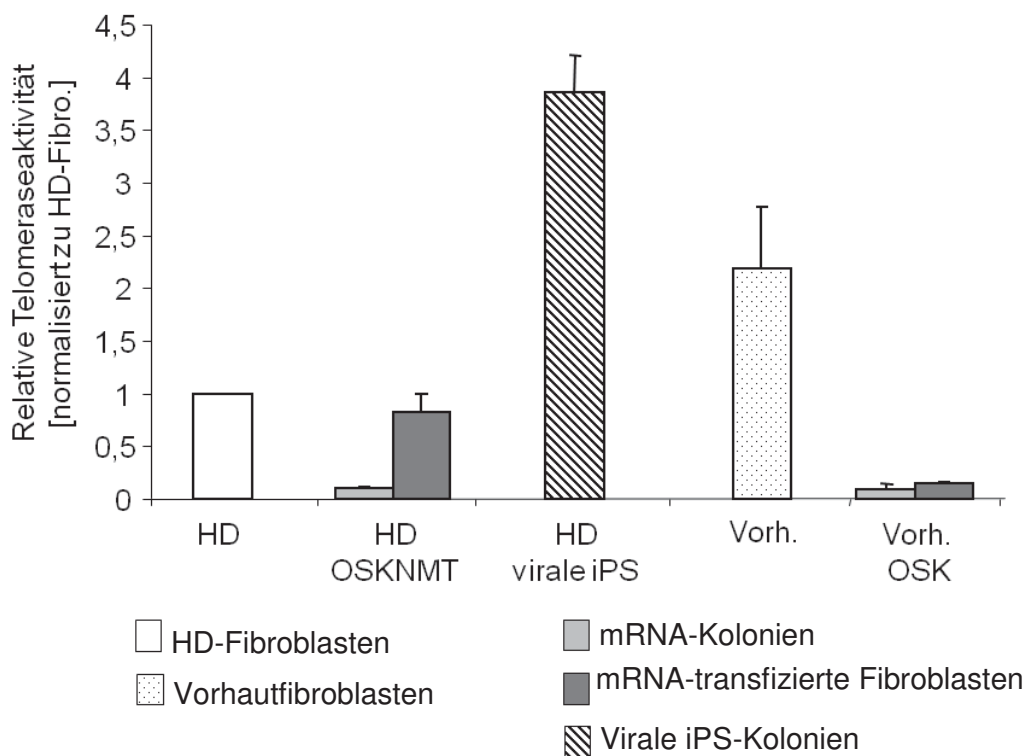


Abb. 4.30: Bestimmung der Telomeraseaktivität. Die Telomeraseaktivität stieg in den viralen iPS-Zellen im Vergleich zu den Fibroblasten des Huntingtonpatienten deutlich an. Potenzielle mRNA-iPS-Zellen und mRNA-transfizierte Fibroblasten zeigen zu den entsprechenden Spenderfibroblasten weniger Telomeraseaktivität. Es wurden die jeweiligen Mittelwerte und \pm Standardabweichungen grafisch dargestellt. Diese wurden auf die Fibroblasten des Huntingtonpatienten zu 1 normiert. (HD, engl. *Huntington's disease*, Fibro. = Fibroblasten, Vorh. = Vorhautfibroblasten)

Wie in Abbildung 4.30 dargestellt, kam es zu einer deutlichen Verringerung der Telomeraseaktivität in potentiellen mRNA-iPS-Zellen im Vergleich zu den jeweiligen Spenderfibroblasten. In den mRNA-transfizierten Zellen wurde eine leichte Verringerung der Telomeraseaktivität in Bezug auf die Fibroblasten des Huntingtonpatienten detektiert. Die Telomeraseaktivität in den viralen iPS-Zellen ist 4-fach erhöht im Vergleich zu den Fibroblasten des Huntingtonpatienten. In den Vorhautfibroblasten wurde eine 2,5-fach erhöhte

Telomeraseaktivität im Vergleich zu Spenderfibroblasten des Huntingtonpatienten beobachtet.

4.5.10 Genearray

Um eine genomweite Charakterisierung der transkriptionellen Aktivität von potenziellen mRNA-iPS-Zellen vorzunehmen, wurde eine *Affymetrix GeneChip*[®] Expressionsanalyse durchgeführt. Folgende Proben gingen in die Analyse ein: potenzielle mRNA-iPS-Kolonien (Faktorenkombination: OSK) und deren Vorhautspenderfibroblasten, Spenderfibroblasten des männlichen Huntingtonpatienten und aus diesen hergestellte potenzielle mRNA-iPS-Kolonien (Faktorenkombination: OSKNMT) sowie virale iPS-Zellen (Faktorenkombination: OSKNMT, ebenfalls aus Spenderfibroblasten des Huntingtonpatienten generiert). Die humane ES-Zelllinie H9 diente als Vergleichsmaterial und wurde in zwei biologischen Replikaten mitgeführt. Es wurde ein paarweiser Vergleich zwischen Spenderfibroblasten zu potenziellen mRNA-iPS-Zellen und der humanen ES-Zelllinie H9 durchgeführt.

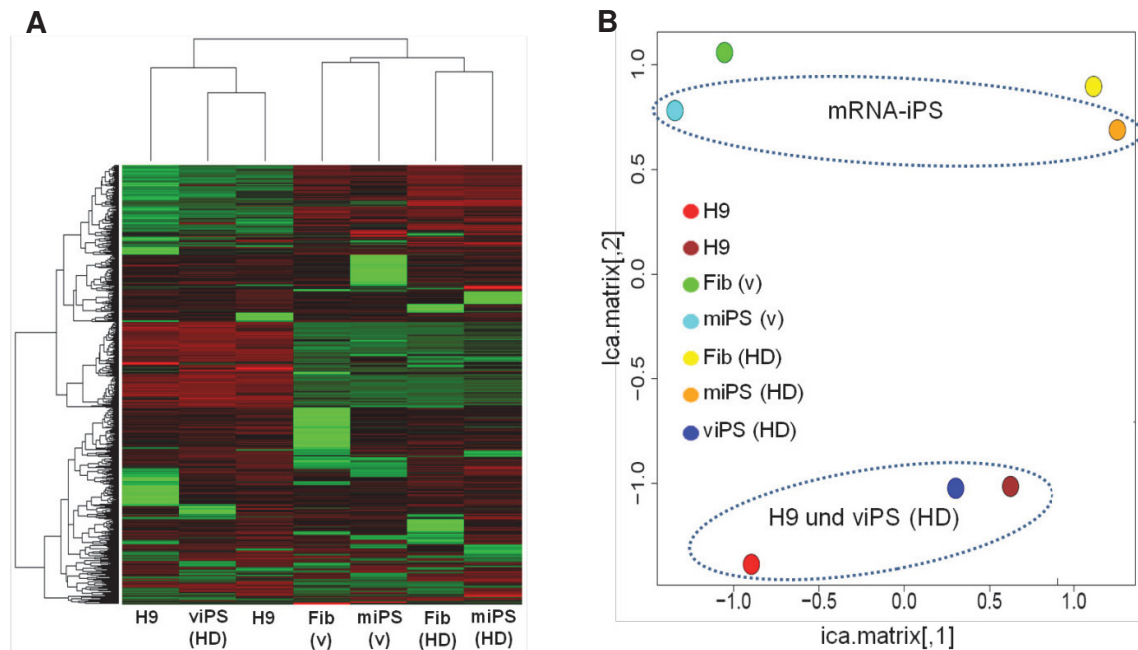


Abb. 4.31: Genearray-Expressionsanalyse. Die hierarchische Clusteranalyse ist als *heatmap* (A) und die Unabhängigkeitsanalyse als Diagramm (B, ICA-Plot) dargestellt. Die analysierten Gene resultierten aus einem Zweiklassenvergleich: Fibroblasten des Huntingtonpatienten gegen iPS-Zellen aus diesen Spenderfibroblasten generiert (571 Gene) und humanen ES-Zellen gegen diese iPS-Zellen (2084 Gene). Die Daten verdeutlichen die Ähnlichkeit der transkriptionellen Genexpression zwischen humanen ES-Zellen (H9-Zellen) und den viralen iPS-Zellen. Weiterhin wurden kaum Expressionsunterschiede zwischen den potenziellen mRNA-iPS-Zellen und den jeweiligen Spenderfibroblasten detektiert. Als Proben gingen in die Analyse ein: H9 = humane ES-Zellen, Fib (HD) = Fibroblasten des Huntingtonpatienten, Fib (v) = Vorhautfibroblasten, miPS (HD) = potenzielle mRNA-iPS-Zellen aus Fibroblasten des Huntingtonpatienten generiert, miPS (v) = potenzielle mRNA-iPS-Zellen generiert aus Vorhautfibroblasten sowie viPS (HD) = virale iPS-Zellen generiert aus Fibroblasten des Huntingtonpatienten. (ICA, engl. *Independent component analysis*, HD, engl. *Huntington's disease*)

4. Ergebnisse

In der hierarchischen Clusteranalyse (Abb. 4.31A) und der Unabhängigkeitsanalyse (Abb. 4.31B) wird deutlich, wie ähnlich die transkriptionellen Gesamtexpressionsprofile von viralen iPS-Zellen aus Fibroblasten des männlichen Huntingtonpatienten und den H9-Zellen sind. Demgegenüber unterscheidet sich das Gesamtexpressionsprofil nach der Reprogrammierung in virale iPS-Zellen zu den Spenderfibroblasten deutlich. Die analysierten, potenziellen mRNA-iPS-Zellen (generiert aus Fibroblasten des Huntingtonpatienten und Vorhautfibroblasten) zeigen zwar eine Veränderung des Gesamtexpressionsprofils im Vergleich zu den Spenderfibroblasten, aber wie besonders in der Unabhängigkeitsanalyse offensichtlich wird (vgl. Abb. 4.31B), sind sie ihren Spenderfibroblasten erkennbar ähnlicher als den humanen ES-Zellen oder den generierten viralen iPS-Zellen. Zur Berechnung der hierarchischen Cluster- und Unabhängigkeitsanalyse flossen 2665 Gene ein.

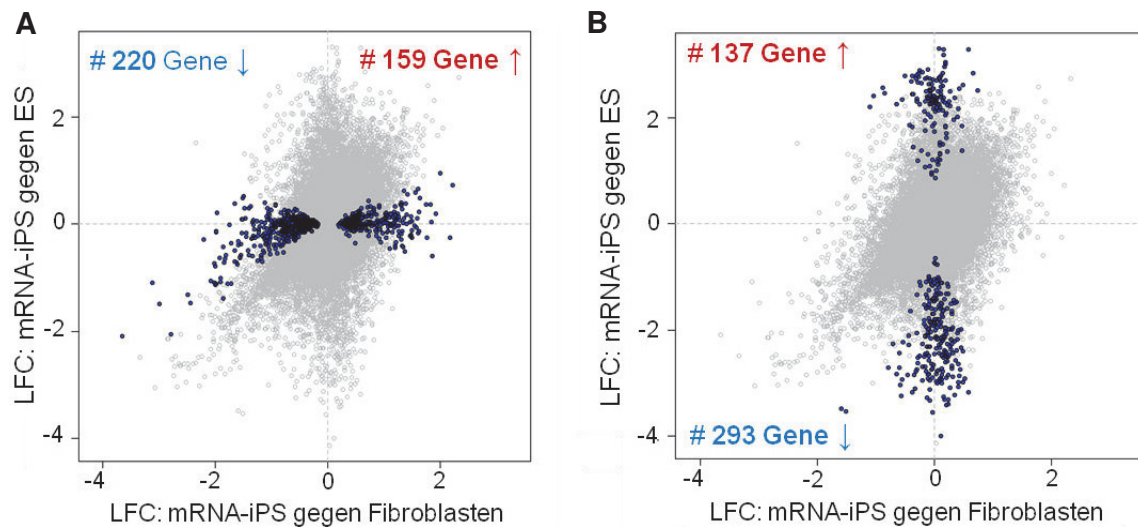


Abb. 4.32: Dreiklassenvergleich zwischen Fibroblasten des Huntingtonpatienten, den daraus abgeleiteten, potenziellen mRNA-iPS-Zellen und humanen ES-Zellen. Als schwarze Punkte sind in (A) die Gene hervorgehoben, die differenziell in potenziellen mRNA-iPS-Zellen im Vergleich zu den Spenderfibroblasten des Huntingtonpatienten exprimiert sind. In (B) sind die Gene durch schwarze Punkte hervorgehoben, die in potenziellen mRNA-iPS-Zellen im Vergleich zu den humanen ES-Zellen unterschiedlich exprimiert sind. Die hellgrauen Punkte beziehen sich auf alle Gene, welche in ihren Expressionsunterschieden unter der signifikanten Höhe lagen. (Signifikanzkriterium für differenzielle Expression: $p < 0,05$; LFC, engl. *Log Fold Changes*)

Im Folgenden wurde nach sogenannten stammzellspezifischen Genen gesucht. Dadurch sollte eine detaillierte Beurteilung von Expressionsunterschieden oder -gemeinsamkeiten ermöglicht werden. Es wurden gezielt Gene analysiert, die entweder unterschiedlich in den Spenderfibroblasten und daraus generierten mRNA-Kolonien (Abb. 4.32A) oder unterschiedlich in den potenziellen mRNA-iPS-Zellen gegenüber den humanen ES-Zellen (Abb. 4.32B) exprimiert sind.

Die Dreiklassenvergleichsanalyse ergab für das transkriptionelle, stammzellspezifische Genprofil signifikante Unterschiede bei 379 Genen im Vergleich von Spenderfibroblasten des

4. Ergebnisse

Huntingtonpatienten und daraus generierten mRNA-Kolonien (Abb. 4.32A). Dabei sind in den potenziellen mRNA-iPS-Zellen im Vergleich zu den Spenderfibroblasten 159 Gene signifikant stärker und 220 Gene schwächer exprimiert. Beispiele für stärker exprimierte Gene sind in Tabelle 4.1 angegeben.

Tab. 4.1: Auswahl von hochregulierten Genen in potenziellen mRNA-iPS-Zellen im Vergleich zu ihren Spenderfibroblasten. In der Liste sind insgesamt 159 Gene signifikant ($p < 0,05$) hochreguliert. Davon sind 25 % falschpositiv detektiert wurden. ($fdr = 0,25$, engl. *false discovery rate*, falsch-negativ-Rate; vollständige Datenliste ist bitte Tab. 7.31 zu entnehmen)

Gen	Expressionsänderung	Name und Funktion
IGF2R	3,1	Rezeptor des insulinähnlichen Wachstumsfaktors 2; essentielle Rolle in der fetalen Organogenese, Tumorsuppressor
TAS2R49	82,3	Geschmacksrezeptor von Typ 2, Mitglied 49; G-Proteingekoppelte Rezeptor, der mit dem Geschmackssystem assoziiert ist, neurosensorisches System
MLL5	2,6	Myeloid/Lymphoid Protein 5 oder <i>mixed-lineage leukemia protein 5</i> (engl.); Histon-Lysin N-Methyltransferase, Schlüsselregulator in der Hämatopoese, involviert in das Methylierungsmuster der myeloiden Differenzierungen, Zell-Zyklus-Regulator, assoziiert in aggressiven Formen von Leukämien
IRS1	12,1	Insulinrezeptor-Substrat-1; assoziiert mit dem Wachstum von Neuriten, bindet Insulin
IKZF2	30,1	Zinkfingerprotein Helios; spezifischer Transkriptionsfaktor in der Hämatopoese (z. B. Lymozytenentwicklung)
CLCA2	33,3	Regulator des kalziumaktivierten Chloridkanals 2; hauptsächlich exprimiert im Lungengewebe
BMP4	62,0	Knochenbildungsanregendes Protein 4; Angiogenese; embryonale Morphogenese (u. a. Herz-, Erythrozyten, Lungen- und Prosencephalonentwicklung), positiver Regulator in Osteoblastendifferenzierung und Knochenmineralisierung, negativer Regulator der Myoblastendifferenzierung und Zellproliferation
HOXC5	39,8	Homöobox-Protein Hox-C5; Transkriptionsfaktor in der Morphogenese
FGF9	84,5	Fibroblastenwachstumsfaktor 9 (glia-aktivierender Faktor); Aktivierung und Proliferation von Gliazellen im Gehirn, Angiogenese, Osteoblasten- und Chondrozytendifferenzierung, positiver Regulator in der Proliferation mesenchymaler Zellen
GNAQ	3,3	guaninnukleotidbindendes G Protein, Untereinheit α , q Polypeptid; Entwicklung des Skelettsystem, des Herzens und des Prosencephalons, Remodulierung von Neuronen

In Abbildung 4.32B sind die unterschiedlichen stammzellspezifischen Genexpressionen in humanen ES-Zellen und potenziellen mRNA-Kolonien dargestellt. Gleichzeitig werden ähnliche Genexpressionen der potenziellen mRNA-iPS-Zellen zu den jeweiligen Spenderfibroblasten darstellt. Es wurden 430 Gene detektiert, die in potenziellen mRNA-iPS-Kolonien

4. Ergebnisse

und humanen ES-Zellen signifikant unterschiedlich exprimiert werden. Von diesen 430 Genen sind in mRNA-Kolonien gegenüber den humanen ES-Zellen 137 Gene höher und 293 Gene niedriger exprimiert. In Tabelle 4.2 sind Beispiele für stärker exprimierte Gene aufgezählt.

Tab. 4.2: Auswahl von hochregulierten Genen in potenziellen mRNA-iPS-Zellen im Vergleich zu humanen ES-Zellen. Von einer Gesamtzahl an 137 signifikant hochregulierten Genen ($p < 0,05$) sind 25 % falschpositiv detektiert wurden. ($fdr = 0,25$, engl. *false discovery rate*, falsch-negativ-Rate; vollständige Datenliste ist bitte Tab. 7.32 zu entnehmen)

Gen	Expressionsänderung	Name und Funktion
Sema 6a	1720,2	Semaphorin 6a; neuronaler Rezeptor zur axonalen Wegfindung u. a. in der Embryonalentwicklung
Lin28	3478,8	Lin28; reguliert Selbsterneuerung in ES-Zellen
DPPA4	3814,4	Pluripotenz assoziiertes Gen 4; blockt Differenzierung in primitives Ektoderm
Oct4	318,0	Oct4; Pluripotenztranskriptionsfaktor, gehört zur Trias der Kernpluripotenzgene, Aufrechterhaltung der Pluripotenz und Induktion der Pluripotenz bei der Reprogrammierung in iPS-Zellen
TERF1	20,5	telomerer Bindungsfaktor 1; Telomeraseinhibitor, limitiert Telomerverlängerung
TDGF1	1243,1	teratokarzinomabgeleiteter Wachstumsfaktor 1; essentielle Rolle in Embryonalentwicklung und Tumorstadium
KRT8	981,3	Keratin 8; intrazelluläres Intermediärfilament in epithelialen Zellen, assoziiert in zellulärer Differenzierung, in unterschiedlichen Krebsarten und Metastasierung
KDR	1650,9	Rezeptor der intrazellulären Kinasedomäne; u. a. Differenzierung in endotheliale Zellen
GDF15	571,2	Wachstumsdifferenzierungsfaktor 15; reguliert Gewebedifferenzierung und Erhaltung, assoziiert mit Inflammationsregulierung und apoptotischen Signalwegen in geschädigtem Gewebe
EPCAM	1375,4	epitheliales Zelladhäsionsmolekül; kodiert ein krebsassoziiertes Antigen, Zellsignalgebung, Proliferation, Differenzierung, exprimiert in Epithel
DNMT3B	3152,3	DNA (Cytosin-5-)-Methyltransferase 3 beta; DNA Methyltransferase, essential für die <i>de novo</i> Methylierung, hauptsächlich exprimiert in der frühen Embryonalentwicklung
APOE	822, 1	Apolipoprotein E; vorrangig in der Leber exprimiert, weiterhin in Astrozyten und Makrophagen, involviert in Protein-Fett-Stoffwechsel, an diversen pathologischen und physiologischen Prozesse beteiligt, z.B. Entstehung der Alzheimer'schen Erkrankung, Immunregulation, Kognition
ACTA1	107,6	Aktin alpha-1; in Skelettmuskeln exprimiert
SPP1	1483,9	sezerniertes Phosphoprotein1 oder auch Osteopontin; verantwortlich für den Erhalt der Knochensubstanz, involviert in einige Immunprozesse (z. B. Inflammation)

Als Grundlage für diesen Dreiklassenvergleich wurde ein Genset verwendet, welches von Bhattacharya und Kollegen¹³⁵ veröffentlicht wurden ist, um die Genexpression in undifferenzierten humanen ES-Zellen zu beurteilen. Es wurde die *maxmean* Statistik angewendet¹³⁶. Diese Statistik wird verwendet, um sehr große Expressionsveränderungen beurteilen zu können. Bei 25 % der Gene sind falschpositive Signale detektiert wurden. Das analysierte stammzellspezifische Genset ist in mRNA-Kolonien im Vergleich zu ihren Spenderfibroblasten stärker exprimiert ($p < 0,03$).

Die beispielhaft ausgewählten Gene zeigen, dass es durch die mRNA-Transfektion des Faktorengemisches OSKNMT zu einer transkriptionellen Expressionsveränderungen im Vergleich zu den Spenderfibroblasten (Tab. 4.1) gekommen ist. Es wurden unter anderem Gene in den potenziellen mRNA-iPS-Zellen stärker exprimiert, die jeweils in einem der drei Keimblätter exprimiert sind. Im Vergleich von potenziellen mRNA-iPS-Zellen zu humanen ES-Zellen (Tab. 4.2) wird dies bestätigt. Weiterhin wurde detektiert, dass der Kernpluripotenzfaktor Oct4 und Lin28, als embryonales Gen, im Vergleich zu humanen ES-Zellen signifikant stärker exprimiert (Tab. 4.2) war. Die Expression der Methyltransferase DNMT3B, welche ebenfalls hauptsächlich in ES-Zellen oder in der frühen Embryonalentwicklung exprimiert wird, war in den potenziellen mRNA-iPS-Zellen signifikant erhöht. Andererseits war ein Telomeraseinhibitor (TERF1) in den potenziellen mRNA-iPS-Zellen im Vergleich zu den ES-Zellen stärker exprimiert (Tab. 4.2).

4.6 Alternative Transfektionsreagenzien für nachfolgende mRNA-Reprogrammierungsexperimente

Das Gebiet der iPS-Reprogrammierung einschließlich dazu eingesetzter Methoden zur Generierung von klinisch relevanten iPS-Zellen ist ständigen Neuerungen und Fortschritten unterworfen.

Alle Ergebnisse zu potenziellen mRNA-iPS-Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit mit dem Transfektionsreagenz Fugene[®] HD (Roche) nach dem Transfektionsschema in Abbildung 4.16 generiert. Das Transfektionsreagenz wird aber vom Hersteller nicht weiter produziert. Das alternative Transfektionsreagenz Fugene[®] HD (Promega) ergab nach mehrmaligen Testungen keine oder kaum eGFP-positive Zellen. Chargenunterschiede der Transfektionsreagenz wurden durch wiederholte Testungen ausgeschlossen. Es wurden mit diesem Transfektionsmittel keine weiteren Experimente durchgeführt. Da in den letzten Jahren mRNA-Transfektionen für die klinische Anwendung immer mehr an Bedeutung gewonnen haben, können seit einiger Zeit kommerzielle mRNA-Transfektions-Kits erworben werden.

4.6.1 Primäre Zellschäden durch transfizierte IVT-mRNA

Es sollte mit dem *TransIT[®]-mRNA Transfection Kit* analysiert werden, ob die einzelnen Reprogrammierungsfaktoren unterschiedliche Auswirkungen auf die transfizierten Fibroblasten haben. Dies diente der Optimierung des bis dahin verwendeten Transfektionsprotokolls. Im Vorfeld wurden die optimalen Transfektionsbedingungen bestimmt (Abb. 4.33).

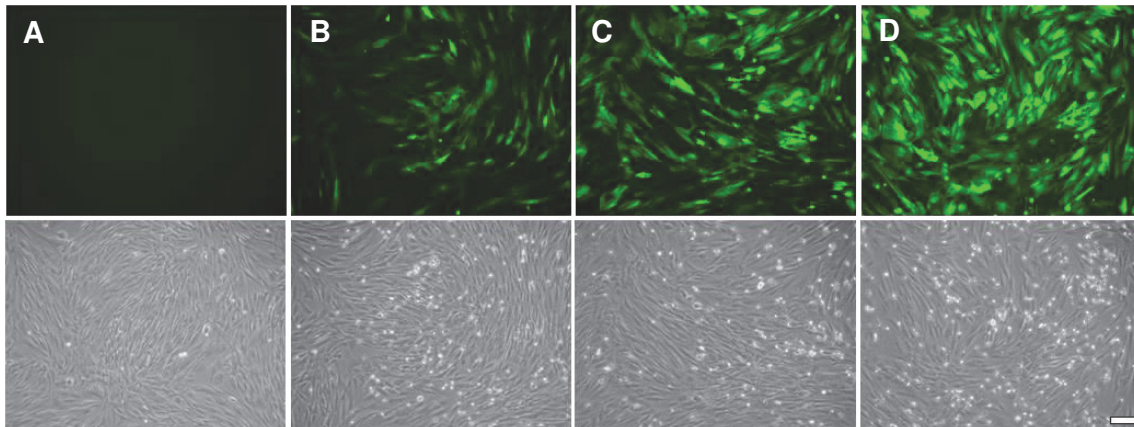


Abb. 4.33: Ermittlung der optimalen mRNA-Transfektionsbedingungen für den *TransIT[®]-mRNA Transfection Kit*. Vorhautfibroblasten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von mRNA und *TransIT[®]-mRNA* Reagenzien transfiziert. Nach 48 h wurden die eGFP-Proteinexpressionen mittels fluoreszenzmikroskopischer Analyse bestimmt. Dargestellt sind die Verhältnisse von *TransIT[®]* Reagenz:Boost Reagenz:mRNA: (A) 0,5 µl:0,5 µl:0,5 µg, (B) 1 µl:0,5 µl:0,5 µg, (C) 2 µl:1 µl:0,5 µg und (D) 3 µl:1 µl:0,5 µg. Die dazugehörigen phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen sind entsprechend dargestellt. (Messbalken = 100 µm)

Wie in Abbildung 4.33 deutlich zu erkennen ist, ergaben die in den Teilabbildungen 4.33C und D dargestellten Transfektionsbedingungen die höchsten Effizienzen für die Transfektion von eGFP-mRNA in humane Vorhautfibroblasten. Es wurde mit dem Verhältnis von 3 µl:1 µl:0,5 µg (*TransIT[®]* Reagenz:Boost Reagenz:mRNA) weitergearbeitet.

Im Folgenden wurden humane Vorhautfibroblasten von zwei Spendern einzeln mit Oct4-, Sox2-, Klf4-, Nanog- und cMyc-mRNA transfiziert. eGFP-mRNA diente als Transfektionskontrolle. Es war nicht möglich, den Einfluss von hTERT-mRNA auf die Spenderfibroblasten zu bestimmen, da nicht ausreichend hTERT-mRNA in guter Qualität amplifiziert werden konnte. Es wurden nach 24, 48 und 72 h mikroskopische Analysen durchgeführt, die Zellzahlen bestimmt und die Proteinexpression der exogen eingebrachten IVT-mRNAs mittels FACS überprüft. In Ermangelung an zur Verfügung stehenden frischen humanen Vorhautfibroblasten konnten nur von zwei Spendern die Untersuchungen durchgeführt werden.

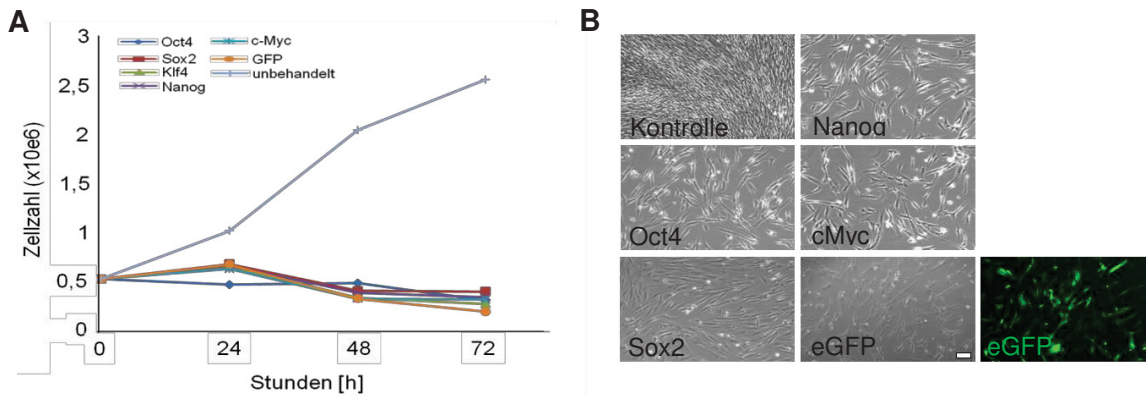


Abb. 4.34: Auswirkungen von mRNA-Transfektionen einzelner Reprogrammierungsfaktoren auf das Zellwachstum von Vorhautfibroblasten. Die Spenderfibroblasten wurden einzeln mit Oct4-, Sox2-, Nanog-, cMyc-, Klf4- und eGFP-mRNA transfiziert. (A) Die Zellzahlen wurden 24, 48 und 72 h nach Transfektion bestimmt. Im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle kommt es bei allen transfizierten IVT-mRNAs zu einer Verringerung der Zellzahl im untersuchten Zeitraum. Von den zwei Spendern sind die Mittelwerte der Zellzahlen dargestellt. In (B) sind für die einzelnen Bedingungen exemplarische mikroskopische Aufnahmen der humanen Vorhautfibroblasten 72 h nach mRNA-Transfektionen dargestellt. (eGFP-mRNA Transfektion: fluoreszenz- und durchlichtmikroskopische Aufnahmen; Messbalken = 100 μm)

In Abbildung 4.34A ist deutlich der negative Effekt von mRNA-Transfektionen mit dem *TransIT[®]-mRNA Transfection* Kit der einzelnen Reprogrammierungsfaktoren und eGFP auf die Vitalität von humanen Fibroblasten zu erkennen. Im analysierten Zeitraum von 72 h wurden bei allen Reprogrammierungsfaktoren entweder deutlich weniger Zellen (eGFP-mRNA, Klf4-mRNA, Oct4-mRNA) oder eine ähnlich hohe Zellzahl (Sox2-mRNA) wie zu Beginn der mRNA-Transfektion bestimmt. Innerhalb von 24 h nach den mRNA-Transfektionen gab es einen leichten Anstieg der Proliferationsrate bei den transfizierten IVT-mRNAs kodierend für Sox2, Nanog, Klf4, cMyc und eGFP. Die Zellzahl bei den Oct4-mRNA transfizierten Zellen fiel schon nach 24 h ab. Innerhalb von 72 h kam es bei keiner analysierten mRNA-Transfektion zu einer Zunahme der Zellzahlen der humanen Fibroblasten. Die mikroskopischen Aufnahmen 72 h nach mRNA-Transfektionen (Abb. 4.34B) bestätigen, dass es zu keinem vergleichbaren Zellzuwachs wie bei der untransfizierten Kontrolle kam. Dieses Ergebnis ist keine optimale Grundlage für nach-folgende, notwendige mRNA-Transfektionen zur Reprogrammierung von humanen Fibroblasten mit IVT-mRNA.

4.6.2 Nachweis der Pluripotenzproteine direkt nach mRNA-Transfektionen

Um weitere Optimierungen am mRNA-Transfektionsprotokoll durchführen zu können, wurden nach erfolgten mRNA-Transfektionen die Proteinexpression der Reprogrammierungsfaktoren in humanen Fibroblasten detektiert. Die untransfizierten Zellen mit entsprechenden Antikörperfärbungen wurden auf 0 und die weiteren Messwerte darauf normiert. Bedingt durch die zur Verfügung stehenden Vorhautfibroblasten wurde der Versuch an zwei Spendern einmal mit den gleichen Transfektionsansätzen durchgeführt.

Tab. 4.3: Proteinexpression der mit mRNA-kodierenden Reprogrammierungsfaktoren transfizierten humanen Vorhautfibroblasten. Dargestellt sind die Ergebnisse für zwei unabhängige Spender nach 24, 48 und 72 h. Die Normierung fand auf untransfizierte Ausgangszellpopulationen statt und wurde auf 0 gesetzt.

Expression der transfizierten mRNA		Spender	
Proteinexpression	nach Stunden	ffLE 27	ffLE 30
Oct4	24 h	19,93 %	25,82 %
	48 h	12,70 %	6,53 %
	72 h	0,00 %	3,16 %
Sox2	24 h	43,50 %	56,55 %
	48 h	40,89 %	27,83 %
	72 h	20,40 %	12,98 %
Klf4	24 h	5,96 %	30,11 %
	48 h	28,57 %	27,19 %
	72 h	16,70 %	29,36 %
Nanog	24 h	23,13 %	43,40 %
	48 h	59,54 %	59,28 %
	72 h	33,21 %	43,28 %
cMyc	24 h	0,04 %	31,95 %
	48 h	3,30 %	30,69 %
	72 h	3,49 %	32,11 %
eGFP	24 h	70,59 %	44,95 %
	48 h	71,04 %	61,86 %
	72 h	79,16 %	74,90 %

Die Proteinexpressionen von den zu untersuchenden, mRNA-kodierenden Reprogrammierungsfaktoren sind in Tabelle 4.3 für zwei unabhängige Spender dargestellt. Im untersuchten Zeitraum von 72 h fällt die Oct4- und Sox2-Proteinexpression in beiden Spendern kontinuierlich ab. Das Proteinexpressionsmaximum war nach 48 h für den Transkriptionsfaktor Nanog erreicht. In den analysierten 72 h kam es zu einem stetigen eGFP-Expressionsanstieg in beiden Spendern. Dies lässt vermuten, dass das Expressionsmaximum im analysierten Zeitraum nicht erreicht war. Die Klf4-Proteinexpression war innerhalb der verwendeten Spenderfibroblasten sehr heterogen. Für den Spender ffLE 27 wurde ein Klf4-Expressionsmaximum nach 48 h detektiert. In Spender ffLE 30 fiel die Expression nach 24 h ab und stieg nach 48 h wieder an. Für die cMyc-Proteinexpression wurde ein ähnliches Ergebnis nachgewiesen. Es kann sich dabei um natürliche Analyse-schwankungen handeln, was auf eine konstante Proteinexpression von Klf4 und cMyc über 72 h hindeutet.

4.6.3 Vergleich der Zelltoxizität bezogen auf die Transfektionsreagenzien

Um weniger primäre Zellschäden durch mRNA-Transfektion auszulösen (vgl. Abb. 4.34), wurde ein weiteres alternatives Transfektionsreagenz getestet. Das polykationische Transfektionsreagenz PEI - Exgene 500 zeigte sehr gute Transfektionsraten mit eGFP-mRNA, allerdings musste im Vergleich zum *TransIT[®]-mRNA Transfection Kit* die doppelte Menge an mRNA eingesetzt werden.

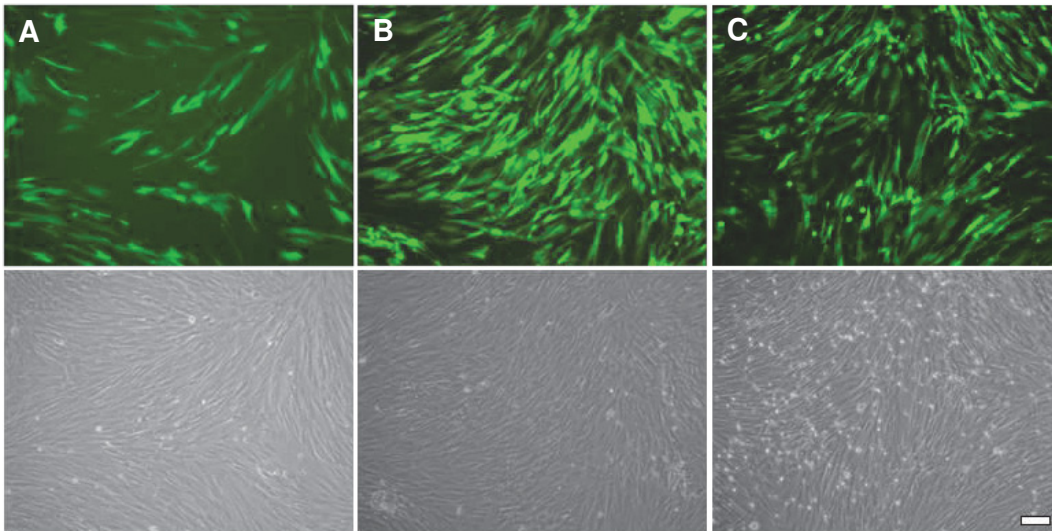


Abb. 4.35: Ermittlung der optimalen mRNA-Transfektionsbedingungen für PEI – Exgene 500 Kit. Vorhautfibroblasten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von PEI – Exgene 500 und mRNA transfiziert. Nach 48 h wurden die eGFP-Proteinexpressionen mittels fluoreszenzmikroskopischer Analyse bestimmt. Dargestellt sind die Verhältnisse von PEI – Exgene 500:mRNA: (A) 3,3 μ l:0,5 μ g, (B) 3,3 μ l:1 μ g und (C) 3,84 μ l:1 μ g. Die dazugehörigen phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen sind entsprechend dargestellt. (Messbalken = 100 μ m)

In Abbildung 4.35 sind die Transfektionseffizienzen 48 h nach eGFP-mRNA-Transfektion mit dem PEI – Exgene 500 Kit dargestellt. Es wurde bei dem Verhältnis von 3,3 μ l PEI – Exgene 500 Reagenz zu 1 μ g eGFP-mRNA, welche in Teilabbildung 4.35B dargestellt ist, die höchste eGFP-Proteinexpression bestimmt.

Um die Überlebensrate der transfizierten humanen Vorhautfibroblasten zu analysieren, wurden drei unabhängige Spender dreimal mit unterschiedlichen PEI – Exgene 500 und *TransIT[®]-mRNA Transfection Kit*-Bedingungen transfiziert. Zur erfolgreichen Reprogrammierung mit IVT-mRNA in iPS-Zellen sind vermutlich wiederholende Transfektionen notwendig. Aus diesem Grund wurden die verwendeten Spenderfibroblasten wiederholt mit eGFP-mRNA transfiziert. 24 h nach der letzten Transfektion wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt (Abb. 4.36).

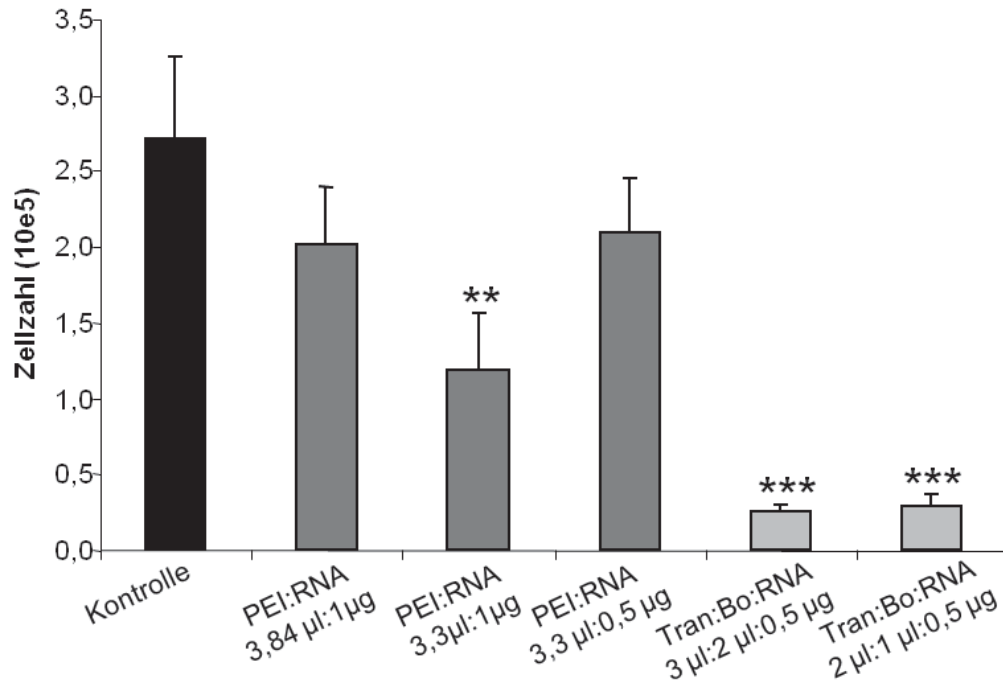


Abb. 4.36: Bestimmung der Zellvitalität nach mRNA-Transfektionen mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien. Die Transfektion mit eGFP-mRNA und den Transfektionsreagenzien PEI - Exgene 500 und *TransIT[®]-mRNA Transfection Kit* fanden in unterschiedlichen Verhältnissen statt. Die Zellvitalitäten wurden mit dem MTT-Test bestimmt. Es sind die Mittelwerte der einzelnen Spender dargestellt (n = 3). Es wurde eine *One-Way-Anova* mit nachfolgendem Holm-Sidak-Test mit Bezug zur nicht transfizierten Kontrolle durchgeführt. (**p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001; Tran = *TransIT[®]* Reagenz, Bo = *Boost* Reagenz)

Die MTT-Bestimmung ergab, dass nach dreimaligen eGFP-mRNA-Transfektionen mit der PEI – Exgene 500 Reagenz deutlich mehr Zellen überleben als mit dem mRNA spezifischen *TransIT[®]-mRNA Transfection Kit* (Abb. 4.36). Die wenigsten Zellen überlebten eine dreimalige Transfektion mit eGFP-mRNA und dem *TransIT[®]-mRNA Transfection Kit* von 3 µl:2 µl:0,5 µg. Dieser Unterschied war zur untransfizierten Kontrolle signifikant (**p ≤ 0,001). Bei der Verwendung von PEI – Exgene 500 Reagenz im Verhältnis zu eGFP-mRNA von 3,3 µl:1 µg wurde ein signifikanter Unterschied zur untransfizierten Kontrolle detektiert (**p ≤ 0,01). Die mRNA-Transfektionen im Verhältnis von PEI – Exgene 500 zu mRNA-Konzentrationen von 3,84 µl:1 µg beziehungsweise 3,3 µl:0,5 µg zeigen einen negativen Effekt auf das Zellwachstum der Fibroblasten, aber dieses Ergebnis war statistisch nicht signifikant. Nach dieser Analyse scheinen die beiden beschriebenen Bedingungen für das PEI-Exgene 500 Reagenz bei wiederholten mRNA-Transfektionen gute Voraussetzungen für eine Reprogrammierung mit IVT-mRNA zu bieten.

4.6.4 Detektion von beta-Interferon nach mRNA-Transfektion

Das Einbringen von exogener mRNA kann eine Immunantwort in den Zielzellen auslösen (vgl. Kapitel 2.5.2). Es zeigte sich, dass in humanen Fibroblasten durch die Transfektion mit modifizierter IVT-mRNA eine Interferonantwort ausgelöst wird¹³⁷. Aus diesem Grund wurden

4. Ergebnisse

Medienüberstände nach unterschiedlichen Transfektionsbedingungen auf eine mögliche IFN- β -Sezernierung getestet. Dazu wurden zwei Spenderfibroblasten mit eGFP-mRNA transfiziert. Der IFN- β -Gehalt in den Medienüberständen wurde 24 und 48 h nach der GFP-mRNA-Transfektion durch eine ELISA-Messung verifiziert. Als Medien wurden das für mRNA-Transfektionen optimierte Pluriton Medium und ein Medium mit einem Serumersatz (KSR-Medium, engl. *knockout serum replacment medium*) verwendet. Sollte eine IFN- β -Sezernierung nach mRNA-Transfektion ausgelöst werden, kann diese durch den IFN-Blocker B18R unterdrückt werden¹³⁷.

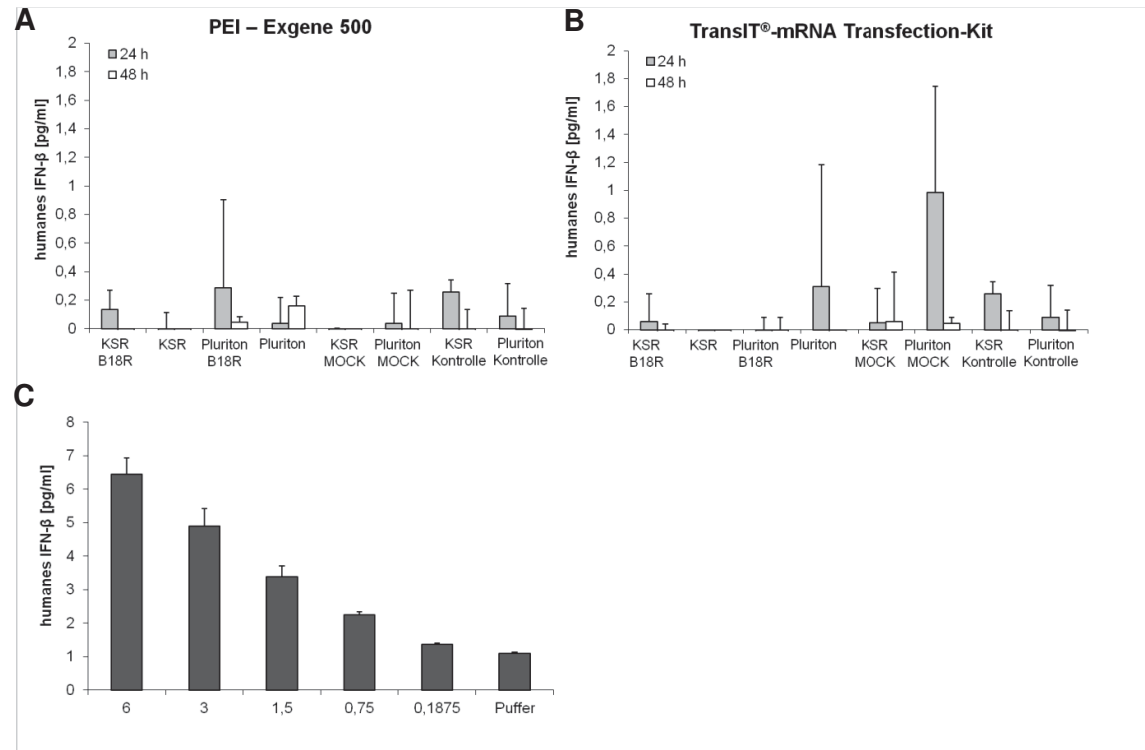


Abb. 4.37: Detektion INF- β in Medienüberständen nach mRNA-Transfektionen. Humane Vorhautfibroblasten von zwei unabhängigen Spendern wurden mit GFP-mRNA transfiziert. Die Transfektionen wurden mit der PEI – Exgene 500 Reagenz (A) und dem *TransIT®-mRNA Transfection Kit* (B) durchgeführt. Die Fibroblasten wurden entweder in KSR- oder Pluriton Medium kultiviert. Die Medienüberstände wurden nach 24 und 48 h auf ihren Gehalt an IFN- β analysiert. Ein möglicher Einfluss des Interferon-Blockers B18R sollte verifiziert werden. In (C) ist als Vergleich und Positivkontrolle die Standardkurve des IFN- β -ELISAs dargestellt. (Mock = Transfektionsreagenz ohne mRNA; KSR = *KnockOut™ Serum Replacement Medium*)

Die Abbildungen 4.37A und B belegen, dass in den Medienüberständen der mRNA-transfizierten humanen Vorhautfibroblasten nach 24 und 48 h wenig beziehungsweise kein IFN- β nachgewiesen werden kann. Alle detektierten IFN- β -Werte mittels INF- β -ELISA liegen unter 1 pg/ml. Diese Messergebnisse sind Schwankungen um den Nullwert. Zur besseren Veranschaulichung dieser niedrigen IFN- β -Werte wurde die verwendete Standardkurve als Vergleich mit in Abbildung (Abb. 4.37C) eingegliedert. Somit ergaben die Austestungen zwischen den unterschiedlichen Medien und Transfektionsreagenzien keine Unterschiede. Ein Effekt des INF-Blockers B18R konnte aus diesen Gründen nicht ermittelt werden. Einen

4. Ergebnisse

potenziellen IFN- β Anstieg kann bei der MOCK Transfektion unter Verwendung des *TransIT[®]-mRNA Transfection* Kit in Pluriton Medienüberständen verzeichnet werden. Dieser Wert weist aber eine sehr hohe Standardabweichung auf. Die Mock Transfektion wurde ohne mRNA durchgeführt.

5 Diskussion

5.1 Fragestellungen der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beantwortung folgender Fragestellungen:

- (1) Führt die Verwendung der Reprogrammierungsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4, Nanog, cMyc und hTERT (zusammenfassend: OSKNMT) bei der virusinduzierten Herstellung von iPS-Zellen aus Fibroblasten von Huntingtonpatienten zu einer Verkürzung der Reprogrammierungszeit?
- (2) Führen wiederholte mRNA-Transfektionen der Spenderzellen mit unterschiedlichen Zusammenstellungen von Pluripotenzfaktoren zur Entstehung von mRNA-iPS-Kolonien?
- (3) Ist es möglich, bei der mRNA-Reprogrammierung von Fibroblasten von Huntingtonpatienten auf die Onkogene Klf4, cMyc und hTERT zu verzichten?
- (4) Weisen die mRNA-iPS-Zellkolonien alle Charakteristika der Pluripotenz auf?

Bevor mit der Bearbeitung der obenstehenden Fragen begonnen werden konnte, musste die humane pluripotente Stammzellkultur in parallel mit der viralen iPS-Zellgenerierung etabliert werden. Es standen für diese Arbeit keine alternativen humanen PS-Zellen zur Verfügung. Dies wird ausführlich in Kapitel 5.2 diskutiert.

5.2 Kritische Beurteilungen der Etablierung der humanen pluripotenten Stammzellkultur

Durch die Generierung von humanen iPS-Zellen könnte es prinzipiell möglich sein, die ethisch bedenklichen ES-Zellen zu ersetzen. Bezüglich der Charakteristika der Pluripotenz (vgl. Kapitel 2.2.2 und 2.3.) stellt die Verwendung humaner ES-Zellen den „Goldstandard“ dar. Alle generierten PS-Zellen sollten daher mit diesen Zellen verglichen werden. Diese Notwendigkeit machte unter anderem Dr. Collins (Direktor des *National Institutes of Health*, NIH, USA) im Jahre 2010 in seiner Ansprache vor dem US-Senat deutlich^j; in Deutschland ist dieses Prinzip in der Novellierung zum Stammzellgesetz (2008) zur Betrachtung der Verwendung von iPS-Zellen in der Stammzellforschung niedergeschrieben^k. In der Bundesrepublik Deutschland ist das Arbeiten an humanen ES-Zellen zwar erlaubt, aber durch das Stammzellgesetz auf die Verwendung von Zelllinien, die vor dem 01.05.2007 etabliert wurden, eingeschränkt (Stammzellgesetz-StZG vom 01.07.2002, novelliert am

^j Ansprache Dr. Collins, Direktor des NHI vor US-Senat „*The promise of Human Embryonic Stem cell research*“ 16.09.2010

^k Bundesministerium für Bildung und Forschung, www.bmbf.de/de/2657.php/

21.08.2008). Für das Arbeiten an humanen ES-Zellen muss beim Robert-Koch-Institut (RKI, Berlin) ein entsprechender Antrag gestellt werden. Die zuständige Abteilung des Fraunhofer IZI erhielt erst nach dem experimentellen Abschluss der vorliegenden Studie die Genehmigung vom RKI. Die Tatsache, dass keine humanen ES-Zellen als direkte Kontrolle für die hier präsentierte Dissertationsschrift zur Verfügung standen, hatte auf alle Bereiche dieser Arbeit einen unmittelbaren Einfluss. Ohne Vorliegen von adäquaten Vergleichszellen und das Vorhandensein von praktischen Erfahrungen wurde die Kultivierung, Generierung und Charakterisierung von iPS-Zellen anhand von publizierten Studien und ohne direkten Vergleich zu humanen ES-Zellen für das eigene Forschungslabor etabliert.

5.2.1 Etablierung der humanen pluripotenten Stammzellkultur

Eine Auswirkung der fehlenden humanen ES-Zellen war unter anderem die damit notwendig gewordene, parallele Etablierung der eigenen humanen PS-Zellkultur und die Generierung von viralen iPS-Zellen, bevor mit der eigentlichen Bearbeitung der Fragestellungen unter 5.1 begonnen werden konnte. Es wurde bewusst die robuste Methode der retroviralen Transduktion von Takahashi und Yamanaka (2006)³² gewählt, damit so zeit-effektiv wie möglich gearbeitet werden konnte.

5.2.2 Etablierung der humanen pluripotenten Stammzellkultivierung

Die humane PS-Kultivierung im Allgemeinen ist nur als suboptimal zu betrachten, da entsprechende Kulturen nachweislich zur spontanen Differenzierung neigen^{19,138,139}. Bis zum jetzigen Zeitpunkt können die *in vivo*-Verhältnisse der ES-Zellen *in vitro* nicht vollständig imitiert werden. Je höher der Anteil an differenzierten Zellen in der Stammzellkultur ist, desto weniger standardisiert ist die Zelllinie und umso weniger reproduzierbar sind die resultierenden Ergebnisse, insbesondere in Hinblick auf eine Pluripotenzanalyse oder nachfolgende Differenzierungsexperimente.

Um die humane pluripotente Stammzellkultur etablieren zu können, wurde auf anerkannte Zellkulturbedingungen zurückgegriffen (z. B. Verwendung von Feederzellen und FKS)^{19,20,56,57,140-142}, welche mit neueren Erkenntnissen zur humanen ES-Zellkultur (z. B. Reduzierung der Sauerstoffkonzentration)¹⁴³ kombiniert wurden. Wichtige Aspekte sollen in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

5.2.2.1 Passagierung

In der vorliegenden Studie wurden die generierten iPS-Zelllinien routinemäßig mechanisch passagiert (Abb. 4.1A). Dadurch sollen die Zell-Zell-Interaktionen der PS-Zellen erhalten bleiben, die das Überleben sowie die Selbsterneuerungskapazität dieser Zellen *in vitro* positiv beeinflussen^{19,20,138} und ihre hohe Anfälligkeit gegenüber Apoptose¹³⁸ beziehungs-

weise Anoikis^l verringern. Trotzdem konnte auch mit diesem Verfahren die spontane Differenzierung nicht vollständig verhindert werden (vgl. Abb. 4.1.E und F). Diese beginnt meist am Kolonierand, wodurch die charakteristische Abgrenzung zu den Feederzellen nicht mehr möglich ist (vgl. spontan differenzierte Kolonie in Abb. 4.1.G zu Morphologie einer undifferenzierten Kolonie Abb. 4.1.H). Dieses Ergebnis stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Verläufen überein¹⁴⁴. Da das mechanische Passagieren sehr zeitintensiv ist, wurden andere mechanische Verfahren versucht, um die Kultivierung zu optimieren (Abb. 4.1B). Leider stellten sich alle weiteren Versuche als noch aufwendiger heraus und wurden daher nicht weiter verfolgt.

Ein Vorteil des mechanischen Passagierens ist, dass dadurch chromosomale Aberrationen weitestgehend verhindert werden^{117,118}. Ein zentrales Risiko für chromosomale Veränderungen stellt der Reprogrammierungsprozess an sich dar^{134,145,146}, welcher naturgemäß massiv in die physiologischen und biochemischen Prozesse in der Zelle eingreift. Da dieser Prozess keine natürlich vorkommenden Äquivalente kennt, existieren auch keine entsprechenden Reparaturmechanismen in den Zellen. Selbst innerhalb der etablierten humanen ES-Zelllinien werden aneuploide Veränderungen der Chromosomen nach längeren Kultivierungszeiträumen nachgewiesen¹⁴⁷. Innerhalb der untersuchten reprogrammierten Zellen und Spenderfibroblasten wurden in dieser Studie jedoch keine chromosomalen Anomalitäten beobachtet (Abb. 4.23).

5.2.2.2 Anforderungen an die allgemeinen Kultivierungsbedingungen

Humane ES-Zellen werden traditionell auf murinen embryonale Fibroblasten (MEFs) als Feederzellen kultiviert^{19,20,140}. Aus diesem Grund wurde die iPS-Zellkultur auf mitotisch inaktivierten Feederzellen etabliert. Für die hier präsentierte Studie stand nur der C57BL/6-Mausstamm zur MEF-Isolierung zur Verfügung. Es gelang jedoch nicht, auf diesen Feederzellen iPS-Zellen zu generieren. Vermutlich wäre die Etablierung mit Fibroblasten des CFTM-1 Mausstamm erfolgreicher gewesen, da dieser üblicherweise zur Generierung von Feederzellen für humane PS-Zellen verwendet wird¹⁴⁰. Durch die positive Begutachtung der Ethikkommission der Universität Leipzig zur Verwendung von humanen Vorhautfibroblasten im Rahmen dieser Studie (vgl. Kapitel 3.1.2.1), konnten jedoch humane Fibroblasten als Feederzellen verwendet werden. Um individuelle Variationen zu minimieren, wurde das Zellmaterial von mindestens fünf Spendern gemischt. Ein entscheidender Vorteil gegenüber der Verwendung von MEFs ist dabei, dass humane Fibroblasten wichtige Signalfaktoren zur Erhaltung der Pluripotenz, beispielsweise endogenes humanes bFGF2 sezernieren¹⁴⁸. Für bFGF2 wurden differenzierungshemmende Eigenschaften und eine anti-apoptotische

^l Anoikis = durch Kontaktverlust induzierte Apoptose

Wirkung in der humanen ES-Zellkultur nachgewiesen^{149,150}. Die sezernierte humane bFGF2-Konzentration ist allerdings stark vom Spender abhängig¹⁴⁸. Literaturangaben zur optimalen Konzentration von humanem bFGF2 im iPS-Medium in den PS-Zellkulturen schwanken zwischen 4-100 ng/ml^{20,56,57,151}. In dieser Studie wurde mit einer bFGF2-Konzentration von 10 ng/ml gearbeitet. Dies lag im unteren möglichen Konzentrationsbereich, aber wie unter anderem in einem ausführlichen Konzept zur humanen PS-Zellkultur aus dem Jahre 2011 belegt ist, werden bFGF2-Konzentrationen zwischen 4 und 10 ng/ml empfohlen¹⁴².

Wie alle Primärzellen unterliegen humane Vorhautfibroblasten der replikativen Seneszenz beziehungsweise dem Hayflick-Limit^{3,4}. Eine längere *in vitro*-Kultivierung von primären Zellen erhöht das Risiko von chromosomalen Schäden, die sich in den iPS-Zellen widerspiegeln würden. Aus diesem Grund wurden die Vorhautfibroblasten nur bis Passage zehn für die Feederzell-Generierung verwendet¹²⁷.

Die in dieser Arbeit generierten humanen iPS-Zellen wurden routinemäßig unter reduzierten Sauerstoffbedingungen (5 % O₂) kultiviert, da dadurch die Spontandifferenzierung in der PS-Kultur reduziert werden kann^{139,143,152}. Einige Hypoxie-induzierte Faktoren wurden sogar als direkte Regulatoren von Oct4, Sox2 und Nanog unter reduzierten Sauerstoffkonzentrationen nachgewiesen^{139,153}. Dadurch ist es nicht verwunderlich, dass es unter diesen Bedingungen zu einer Effizienzsteigerung bei der Generierung von iPS-Zellen kommen kann¹⁵⁴. Die reduzierten Sauerstoffkonzentrationen haben vermutlich auch einen synergistischen Effekt im Verlauf des Reprogrammierungsprozesses, insbesondere bei der Aktivierung der endogenen Pluripotenzgene. Da die Generierung von iPS-Zelllinien einen extremen zeitlichen Aufwand darstellt, wurden keine vergleichenden experimentellen Analysen vorgenommen, da das primäre Ziel der vorliegenden Studie die Generierung von nicht-integrierenden iPS-Zelllinien war. Dafür wurden aus Ermangelung an alternativen humanen PS-Zellen zuerst eigene virale iPS-Zelllinien als Vergleichszellen generiert.

5.3 Generierung von humanen viralen iPS-Zellen

5.3.1 Etablierung von neuen Reprogrammierungsprotokollen für virale iPS-Zellen aus Fibroblasten von Huntingtonpatienten

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass mit einer neuen Kombination von Reprogrammierungsfaktoren humane virale iPS-Zellen generiert werden können. Die Kombination von den sechs Reprogrammierungsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4, Nanog, cMyc sowie hTERT (zusammenfassend: OSKNMT) wurde bis jetzt nicht in der Literatur beschrieben.

5.3.1.1 Retrovirale Transduktion

Das verwendete Transduktionsprotokoll kam erstmals bei humanen primären Fibroblasten von Huntingtonpatienten zum Einsatz. Um zu überprüfen, welchen Einfluss die Verdünnung von viralen Partikeln auf die Transduktionseffizienz bei humanen primären Fibroblasten hat,

wurden eGFP-exprimierende Viruspartikel in unterschiedlichen Verdünnungsstufen zur Transduktion eingesetzt. In der Studie wurde dieses Virion als Positivkontrolle verwendet, da die einzelnen Plasmide für die Reprogrammierungsfaktoren auf Grund des möglichst gering zu haltenden Gemomumfangs keine Kodierung für leicht identifizierbare Marker (wie fluoreszierende Proteine) enthielten. Wie vermutet, konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Transduktionseffizienz und Verdünnungsstufe der viralen Partikel nach 48 h beobachtet werden (Abb. 4.2). Schon eine vierfache Verdünnung des viralen Überstandes resultierte kaum noch in eGFP-positiven humanen Fibroblasten. Trotzdem konnten in dieser Arbeit mit sechs Reprogrammierungsfaktoren, die in gleichen Anteilen zueinander vorlagen und somit jeweils 1:6 verdünnt waren, effektiv humane virale iPSC-Zellen generiert werden (Abb. 4.3). Neuere, eigene Transduktionsdaten, die im Anschluss an diese Dissertationsschrift an der Johns Hopkins Universität, Baltimore, USA mit dem gleichen Transduktionsprotokoll erarbeitet wurden, zeigten keine Transduktionsunterschiede zwischen einem unverdünnten und einem 1:4 verdünnten Virusüberstand. In allen verwendeten Verdünnungsstufen wurde eine 100%ige Transduktionseffizienz bei neuronalen Stammzellen als Spenderzellen ermittelt. Dies weist darauf hin, dass die Herkunft und Art der primären Spenderzellen eine entscheidende Rolle für die Transduktionseffizienz spielt.

5.3.1.2 Einfluss der Faktoren Oct4, Sox2, Klf4, Nanog, cMyc und hTERT auf die Reprogrammierungszeit

Nach einem etwa zwei- bis dreiwöchigen Reprogrammierungsprozess konnten morphologische Unterschiede zwischen Fibroblasten und reprogrammierten Zellen beobachtet werden (Abb. 4.3.). Für die Methode der retroviralen Reprogrammierung sind in der Literatur Reprogrammierungszeiträume von zwei-¹⁵⁵ bis dreieinhalb Wochen⁵⁶ für humane Fibroblasten als Ausgangsmaterial beschrieben. Die im Rahmen dieser Dissertation erhobenen Ergebnisse bestätigen die Literaturdaten. Mit der Faktorenkombination OSKNMT kommt es zu keiner Verkürzung der Reprogrammierungszeit humaner Fibroblasten (Fragestellung 1). Die Ursache kann darin begründet sein, dass der Reprogrammierungsprozess in diesen Spenderzellen mindestens zwei Wochen benötigt, bis Gen- und Proteinexpression sowie epigenetische oder morphologische Veränderungen vollzogen sind - und zwar möglicherweise unabhängig von den eingesetzten Faktoren, sofern diese hinreichend für die Reprogrammierung sind. Hinweise darauf geben unterschiedliche Studien, die den Reprogrammierungsprozess als einen hochkomplexen und stochastischen, aber insgesamt progressiven Vorgang beschreiben^{156,157}. Nach Transduktion der Reprogrammierungsfaktoren kommt es innerhalb der ersten drei Tage zur Expression von frühen endogenen Pluripotenzgenen¹⁵⁷. Erst am 16. Tag werden die Hauptpluripotenzmarker Oct4 und Nanog endogen aktiviert¹⁵⁷. Diese sind jedoch entscheidend für die Aktivierung der endogenen autoregulatorischen Pluripotenzschleife⁶¹. Aus diesen Gründen kann vermutlich die Reprogram-

mierungszeit von humanen Fibroblasten als Spenderzellen nicht wesentlich verkürzt werden. Eine Reduzierung der Reprogrammierungszeit mit dieser Faktorenkombination könnte aber bei alternativen Spenderzellen, wie z. B. adulte Stammzellen, durchaus möglich sein.

Das erste deutliche Charakteristikum reprogrammierter Zellen ist die Morphologieveränderung²⁵. Im Rahmen dieser Arbeit wurde beobachtet, dass die reprogrammierten Fibroblasten die charakteristische Morphologie von iPS-Zellen annahmen (Abb. 4.1H): kleine, runde Zellsomata bei gleichzeitiger Erhöhung des Chromatin-Zytoplasma-Verhältnisses. Dies lässt auf mitotisch hochaktive Zellen schließen. Nach wiederholten Experimenten konnte festgestellt werden, dass sich bevorzugt kleine, kompakte Kolonien mit einem von Beginn an gut abgrenzbaren Kolonierand später in stabile iPS-Zelllinien entwickeln (Abb. 4.4). Bei den anderen Kolonieförmungen (kleine Zellen mit einer Erhöhung des Chromatin-Zytoplasma-Verhältnisses, aber ohne definierten Kolonierand) handelt es sich vermutlich um partiell reprogrammierte Zellen^{158,159}. Partiiell reprogrammierte Zellen sind natürlich vorkommende Zwischenstadien im Reprogrammierungsprozess, wobei die meisten Zellen in diesen inkompletten Zelltyp verbleiben und einige pluripotente Charakteristika aufweisen¹⁶⁰. Zur Beschreibung der Reprogrammierungsphase wurden drei Stadien von Zelltypen definiert¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Diese Stadien werden als Typ I bis III bezeichnet, wobei es sich bei Typ I um teilreprogrammierte Zellen mit den wenigsten pluripotenten Charakteristika und Typ III um vollreprogrammierte iPS-Zellen handelt¹⁵⁸. Interessant ist die Beobachtung, dass von teilreprogrammierten iPS-Zellen eine erfolgreiche Differenzierung in neurale Stammzellen nachgewiesen werden konnte¹⁶¹. Vier Tage nach Transduktion der Pluripotenzfaktoren konnten die transduzierten Fibroblasten, wie für neurale Stammzellen charakteristisch, als Neurosphären kultiviert werden.

5.3.1.3 Nicht-pluripotente Zellarten während der Etablierungsphase zur stabilen viralen iPS-Zelllinie

Obwohl die Kolonien am Anfang der klonalen Selektion nach strikten Kriterien (kleine, runde Zellmorphologie, kompakte Kolonien mit deutlich abgrenzbarem Kolonierand zum Feederzellrasen) ausgewählt wurden, konnten bereits nach wenigen Tagen innerhalb der klonalen Selektionskultur unterschiedliche Morphologietypen beobachtet werden. Besonders häufig entstanden, wie in Teilabbildung 4.5 A-D dargestellt, kleine Zellen, die entweder separat von den iPS-Kolonien in der Kulturschale zu finden waren oder sich in der Peripherie einer iPS-Kolonie befanden. Diese Zellen wiesen eine extrem hohe Expansionsgeschwindigkeit bei gleichzeitigem Fehlen einer typischen Kolonieförmung auf. Da in der vorliegenden Arbeit das hTERT als Reprogrammierungsfaktor verwendet wurde, lässt sich nicht ausschließen, dass es sich bei diesen Zellen um immortalisierte Zellen handelt. Primäre Zellen werden in der Tat routinemäßig im Zellkulturlabor durch virale Transduktion von hTERT in immortalisierte Zelllinien überführt¹⁶². Die Zellen mit diesen eher untypischen PS-Zellcharakteristika wurden

aus der Zellkultur mechanisch entfernt, unter anderem auch deshalb, weil eine Belassung dieser Subpopulation zu einer Überwucherung der iPS-Zellkultur führte. Trotz des Risikos der Zellimmortalisierung wurde hTERT als Reprogrammierungsfaktor verwendet, weil es durch exogen eingebrachtes hTERT zu einer effizienten Aktivierung der endogenen Telomerase kommen kann¹⁵⁵. Eine hohe Telomeraseaktivität ist unter anderem ein Charakteristikum von PS-Zellen²⁰. Aus diesem Grund wurde hTERT mit den „traditionellen Faktoren“ Oct4, Sox2, Klf4 und cMyc aus der Arbeit von Takahashi und Kollegen^{32,56} und Nanog gemäß den Erkenntnissen von Yu und Kollegen⁵⁷ kombiniert, um eine mögliche Reduzierung der Reprogrammierungszeit zu erreichen (Fragestellung 1). Da jedoch in der vorliegenden Dissertationsschrift keine zeitliche Einsparung nachgewiesen werden konnte, sollte für zukünftige virale iPS-Zellgenerierungen überlegt werden, ob nicht auf hTERT als viralem Reprogrammierungsfaktor verzichtet werden sollte. Somit kann festgehalten werden, dass mit der neuen Faktorkombination aus Fibroblasten von Huntingtonpatienten virale iPS-Zellen generiert werden konnten. Diese PS-Zellen stellen ein adäquates Kontrollmaterial für diese Dissertationsschrift dar. Eine Verkürzung der Reprogrammierungszeit wurde nicht erzielt (Fragestellung 1).

5.4 Virale iPS-Zellen zeigen Charakteristika der Pluripotenz

Um zu überprüfen, ob die etablierten viralen iPS-Zellen als Kontrollzellen für die hier präsentierte Studie dienen können, wurden sie mit unterschiedlichen Methoden auf ihre Pluripotenz überprüft. Es gibt derzeit keinen Test, der für sich allein aussagekräftig genug wäre, um eine Pluripotenz zu verifizieren. Mittlerweile sind unterschiedliche Richtlinien²⁵ und Konzepte^{142,144} publiziert worden, nach welchen Methoden am besten iPS-Zellen auf ihre pluripotenten Eigenschaften analysiert werden sollen. Bezüglich der möglichen Assays gibt es allerdings Kontroversen, inwieweit die einzelnen Tests oder Marker hinreichend zur Charakterisierung von pluripotenten Zellen sind¹³². Diese Probleme werden nachfolgend im Zusammenhang mit den betreffenden Nachweismethoden diskutiert.

5.4.1 Alkalische Phosphataseaktivität in viralen iPS-Zellen

Als Pluripotenzmarker wird die alkalische Phosphatase (AP) am dritten Tag der Reprogrammierung exprimiert^{61,157}. In dieser Studie wurde der Nachweis erbracht, dass die generierten humanen viralen iPS-Zellen eine AP-Aktivität aufweisen (Abb. 4.6). Innerhalb der iPS-Kolonien kam es zu einer heterogenen Aktivität der AP (Abb. 4.6C). Im Zentrum und am Rand dieser dargestellten Kolonie weisen die Zellen deutlich mehr AP-Aktivität auf als in den anderen Bereichen der Kolonie. Es ist einerseits möglich, dass es sich dabei um eine natürliche Varianz in der Expressionsstärke der AP handelt. Andererseits ist es ebenso denkbar, dass die stärkere Farbintensität ein Hinweis auf eine beginnende Differenzierung ist. Die AP wird ebenfalls in Osteoblasten exprimiert, weshalb diese Färbung eine

routinemäßige Nachweismethode von differenzierten Osteoblasten darstellt¹⁶³⁻¹⁶⁶. Spontane Differenzierungen in PS-Kulturen beginnen meist im Zentrum und/oder in der äußeren Peripherie der Kolonie (vgl. Abb. 4.1G), also in dem Bereich, in dem die erhöhte AP-Aktivität unter anderem in der dargestellten Kolonie detektiert wurde (Abb. 4.6C). Gegen eine spontane Differenzierung der iPS-Zellen spricht, dass der Kolonierand zu den Feederzellen definiert abgegrenzt ist. Insgesamt stellt der Nachweis der AP-Aktivität einen ersten Hinweis auf die Pluripotenz von iPS-Zellen dar, da gezeigt wurde, dass AP-Aktivität mit den weiteren Pluripotenzmarkern korreliert¹³¹. Mit neueren Nachweismethoden ist es beispielsweise möglich, bei nicht fixierten iPS-Zellen Doppelfärbungen für AP und andere Pluripotenzmarker durchzuführen¹⁶⁷. Dies erlaubt eine sichere Auswahl von reprogrammierten iPS-Kolonien für die klonale Selektion.

5.4.2 Expression von Pluripotenzproteinen in viralen iPS-Zellen

Um die pluripotenten Eigenschaften der viralen iPS-Zellen weiter zu verifizieren, wurden diese Zellen auf die Expression von spezifischen Pluripotenzmarkern, wie die Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog, sowie die Oberflächenmarker Tra-1-60, SSEA3 und SSEA4 überprüft (vgl. Abb. 4.7). Die viralen iPS-Zellen exprimierten in hohem Maße Oct4, weniger stark exprimiert sind Nanog und Sox2. Literaturdaten zeigen, dass Nanog in humanen ES-Zellen sehr variabel exprimiert wird⁶³. Für alle aktivierten Transkriptionsfaktoren konnte die typische Kernlokalisation durch eine Doppelfärbung mit dem DNA-Farbstoff DAPI bestätigt werden. Die Oberflächenmarker SSEA3, SSEA4 und Tra-1-60 wurden erwartungsgemäß auf den zellulären Oberflächen lokalisiert. Dabei zeigte sich, dass SSEA3 die schwächste Expression im Vergleich zu Tra-1-60 und SSEA4 aufweist. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der umfangreichen Studie der internationalen Stammzellinitiative¹³². In dieser Studie wurden 59 humane ES-Zelllinien in 17 Laboratorien weltweit auf charakteristische Pluripotenzmarker analysiert. Für die durchgeführten Immunfluoreszenzanalysen konnten hohe Expressionen von SSEA4 und Tra-1-60 auf Proteinebene hochreproduzierbar detektiert werden. Hingegen ist die Expression des Oberflächenmarkers SSEA3 sehr heterogen.

Humane Fibroblasten, und damit auch die mitotisch inaktiven Feederzellen, exprimieren jedoch keine Pluripotenzmarker (vgl. Abb. 4.8), was eine gute Unterscheidbarkeit gewährleistet.

5.4.3 Direkte Differenzierung von viralen iPS-Zellen in alle drei Keimblätter

Die Differenzierung der iPS-Zellen in alle drei Keimblätter dient als zentraler Nachweis der Pluripotenz. Eine Möglichkeit, dies zu erreichen, ist die direkte Differenzierung von PS-Zellen als Zellrasen in alle drei Keimblätter¹⁶⁸⁻¹⁷⁰. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die eigenständig etablierten viralen iPS-Zellen in Vorläuferzellen des Mesoderms differenzieren.

Dies wurde durch den Nachweis der chondralen Marker Aggrecan und Kollagen II (siehe Abb. 4.9A und A') erbracht. Dass humane ES-Zellen binnen zwei Wochen in Chondrozyten differenziert werden können, wurde bereits durch Oldershaw und Kollegen gezeigt¹⁶⁹.

In der vorliegenden Studie wurde innerhalb des differenzierten Chondrozytenzellrasens eine heterogene Expression von Aggrecan und Kollagen II beobachtet. Somit differenzierte nur ein Teil der iPS-Zellen in chondrale Vorläuferzellen. Die Intensität der Expressionsstärke innerhalb der positiv getesteten Zellen ist für beide Marker homogen.

Weiterhin wurde der Nachweis erbracht, dass die etablierten viralen iPS-Zellen innerhalb von zwei Wochen in hepale Zellen differenzieren können. Die hepale Differenzierung wurde mit AFP (Abb. 4.9B), als Marker für hepale Vorläuferzellen, und Zytokeratin 18 (Abb. 4.9B') als Hepatozytenmarker erbracht. Durch das sehr einheitliche Expressionsprofil des frühen hepalen Markers AFP, belegen die Ergebnisse dieser Studie, dass die meisten viralen iPS-Zellen unter den verwendeten Differenzierungsbedingungen in hepale Vorläuferzellen differenzierten. Einige Zellen sind hingegen schon in Hepatozyten differenziert, wie das heterogene Expressionsmuster für Zytokeratin 18 zeigte. Ob es sich dabei tatsächlich um reife Hepatozyten handelt, könnte in nachfolgenden Experimenten durch die Albuminexpression überprüft werden.

Die Differenzierungsfähigkeit der viralen iPS-Zellen in neurale Zellen wurde mit den Markern GFAP und β -Tubulin III nachgewiesen (Abb. 4.9C und C'). GFAP wird in Astrozyten exprimiert, während β -Tubulin III als früher ektodermaler Marker und als charakteristisch für junge neuronale Zellen gilt. In den analysierten Zellen zeigen die beiden Marker eine vergleichbare Expressionsstärke und ein homogenes Verteilungsmuster. Damit wurde der Beweis erbracht, dass die viralen iPS-Zellen in alle drei Keimblätter differenzieren können.

Um aussagekräftigere Beurteilungen zur Lokalisierung von Proteinen treffen zu können, sollten ausgewählte Aufnahmen besser an einem konfokalen Mikroskop durchgeführt werden. Gerade in Bezug auf die vergleichende Darstellung von Oberflächenproteinen zu zytoplasmatischen Proteinexpressionen, wie am Beispiel von AFP und Zytokeratin 18 (Abb. 4.9B und B'), könnten konfokale Aufnahmen eindeutig belegen, dass AFP auf der Zelloberfläche exprimiert wird und Zytokeratin 18 innerhalb der Zelle. Weiterhin würde die relativ hohe Hintergrundfluoreszenz, wie in den hier vorliegenden Abbildungen, reduziert werden.

5.4.4 Einflüsse auf die Differenzierungseffizienz viraler iPS-Zellen

Wie in Kapitel 5.2 diskutiert, standen aus regulatorischen Gründen in der vorliegenden Dissertationsschrift humane ES-Zellen als Kontrollzellen für die humanen iPS-Zellen nicht zur Verfügung. Besonders in Hinblick auf die Etablierung der Differenzierungsprotokolle und Beurteilung der Differenzierungskapazität der vorgestellten iPS-Zelllinien stellte dies einen

schwerwiegenden Nachteil dar, was stellvertretend am Beispiel der Chondrozyten-differenzierung ausführlicher diskutiert werden soll.

Wie eingangs gezeigt, war die Expression der Chondrozytenmarker heterogen verteilt (vgl. Abb. 4.9.A und A'). Es kann in dieser Dissertationsschrift keine Aussage getroffen werden, ob diese Varianz auf das Induktionsmedium oder auf die Qualität der iPS-Zellen zurückzuführen ist, da der direkte Vergleich zu humanen ES-Zellen fehlt. Differenzierungseffizienzen werden häufig zur Beurteilung der Qualität von iPS-Zellen und zur Beantwortung der Frage herangezogen, ob iPS-Zellen perspektivisch humane ES-Zellen ersetzen könnten. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde demonstriert, dass zahlreiche etablierte iPS-Zelllinien eine epigenetische Signatur der Spenderzellen aufweisen, die eine erfolgreiche Differenzierung hemmen kann^{72,73,171}. Da aber Fibroblasten und Chondrozyten der mesodermalen Keimblattlinie angehören, ist weiterhin anzunehmen, dass ein epigenetisches Gedächtnis der Spenderfibroblasten in dieser iPS-Zelllinie keine ausschlaggebende Rolle gespielt haben sollte. Dies könnte jedoch bei einer ektodermalen beziehungsweise endodermalen Differenzierung einen Einfluss haben. Allerdings weisen selbst iPS-Zelllinien, die aus den gleichen Spenderzellen generiert wurden, ein hochvariables Differenzierungsverhalten auf¹⁷².

Eine weitere denkbare Ursache für die heterogene Expression der Chondrozytenmarker in dieser Studie ist eine mögliche Reaktivierung der viralen Transgene in den einzelnen Zellen. In iPS-Zellen sind die genomintegrierten viralen Pluripotenzgene durch Methylierung stillgelegt⁷⁹, könnten aber im Verlauf der Differenzierung durch erneute Demethylierung reaktiviert werden und so eine effiziente Differenzierung hemmen. Hu und Kollegen wiesen bei der Differenzierung in neuronalen Zellen Differenzierungseffizienzen zwischen 15 bis 70 % nach¹⁷³. Diese extreme Varianz war eindeutig auf die viralen Generierungsmethoden zurückzuführen. Möglich wäre auch, dass es sich bei den vorgestellten Ergebnissen um eine natürliche Expressionsverteilung der Chondrozytenmarker handelt, wenn nach zwei Wochen die *in vitro*-Differenzierung beendet wird. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der vergleichenden Analysen dieser etablierten viralen iPS-Zellen mit humanen ES-Zellen für nachfolgende Projekte.

Anhand der bis hier diskutierten Ergebnisse konnte aber die vorläufige Aussage getroffen werden, dass es sich bei den generierten viralen iPS-Zellen aus Fibroblasten von dem männlichen Huntingtonpatienten um potenziell vollreprogrammierte iPS-Zellen handeln.

5.5 Gerichtete mRNA-Transfektionen zur Herstellung von mRNA-iPS-Zellen

Im Mittelpunkt der hier präsentierten Dissertationsschrift stand die Beantwortung der Frage, ob es möglich ist, durch mRNA-Transfektionen humane Fibroblasten in iPS-Zellen zu reprogrammieren (Fragestellung 2). Dazu wurden die Reprogrammierungsfaktoren OSKNMT in Plasmide kloniert, die eine *in vitro* Transkription (IVT) ermöglichen. Alle Klonierungen

5. Diskussion

wurden vor Beginn beziehungsweise während der vorliegenden Studie von Dr. Fabian (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Leipzig) durchgeführt.

Die T7-RNA-Polymerase ist ein sehr effizientes, promotorspezifisches Enzym, welches die mRNA wirksam von linearisierten Plasmiden oder PCR-Produkten als Vorlagen amplifiziert. In der vorliegenden Studie wurde die Priorität auf die Verwendung linearisierter Plasmide gelegt, weil es im Rahmen einer PCR-Amplifikation zu möglichen Punktmutationen in der Zielsequenz kommen kann. Bei einem unvollständiger Verdau von zirkulären Plasmiden als Grundlage der IVT würden heterogene mRNA-Transkripte entstehen. Daher wurde die Linearisierung routinemäßig über ein analytisches Agarosegel kontrolliert (Abb. 4.11).

Die zur IVT verwendeten Zielgene lagen in einem Größenbereich von 500 bis 3.500 Bp, was dem optimalen Amplifikationsbereich (300 bis 5.000 Bp) des verwendeten *mMESSAGE mMACHINE® T7 Ultra* Kit entspricht. Trotz erfolgreicher Linearisierung des IVT-Plasmides pcDNA3_hTERT konnte keine hTERT-mRNA amplifiziert werden. Hier wurde auf die Alternative der PCR-Amplifikation zurückgegriffen (Abb. 4.12 und Abb. 4.13). Allerdings stellte auch die IVT des PCR-Produkts keine zufriedenstellende Lösung dar, da sehr häufig keine bzw. degradierte hTERT-mRNA nachgewiesen wurde (vgl. Elektropherogramme der IVT-mRNA Abb. 4.14B). Optimierungsversuche sowie die Verwendung von alternativen IVT-Kits waren ebenfalls erfolglos.

Die wesentlichen Strukturelemente einer endogenen mRNA, die 5'-Kappe und der 3'-Poly(A)-Schwanz, wurden synthetisiert. Der verwendete IVT-Kit enthielt ein Analog der 5'-Kappe, das *anti-reverse cap analog* (engl., ARCA). Durch die synthetisierte ARCA-Struktur kann die T7-RNA-Polymerase das Zielgen nur in eine Richtung amplifizieren. Mockey und Kollegen konnten zeigen, dass durch die Verwendung der ARCA-Struktur eine 15 bis 20-fache Steigerung der Translationeffizienz im Vergleich zur unmodifizierten Struktur der 5'-Kappe möglich ist¹⁷⁴. Der Poly(A)-Schwanz wurde enzymatisch polyadenyliert, da keine Poly(A)-Sequenz im IVT-Plasmid vorlag. Wie Holtkamp und Kollegen belegen konnten, resultieren kodierte Poly(A)-Sequenzen im Plasmid in einem reproduzierbaren exakt definierten Poly(A)-Schwanz, was mit der enzymatischen Amplifikation auch unter optimalen Bedingungen nicht möglich ist¹⁷⁵. In der vorliegenden Studie wurden, wie in der Arbeit von Holtkamp und Kollegen beschrieben, die IVT-mRNAs mittels Bioanalyzer über Elektropherogramme analysiert (vgl. Abb. 4.14). Analog zu der zitierten Studie konnte gezeigt werden, dass nach der enzymatischen Polyadenylierung ein relativ breiter Peak im Elektropherogramm zu beobachten ist, was auf eine heterogene Gruppe an Poly(A)-Schwänzen zurückzuführen ist¹⁷⁵. Es wurde ein signifikanter Anstieg von Proteinexpressionen detektiert, wenn die transfizierte mRNA einen definierten Poly(A)-Schwanz von 100 Adeninen anstatt nur 64 hatte¹⁷⁴. Interessant ist die Beobachtung, dass eine Kotransfektion von IVT-mRNAs (mit synthetisierter ARCA-Struktur und 100 nt Adenininschwänzen)

und zusätzlich freien Poly(A)-Schwänzen zu einem Anstieg in der Proteinexpression führte. Mockey und Kollegen vermuten, dass die freien Poly(A)-Schwänze die exogen eingebrachten IVT-mRNAs stabilisieren¹⁷⁴. Diese Literaturdaten belegen, welchen hohen Einfluss erstens die Stellung eines definierten Poly(A)-Schwanzes und zweitens die Konzentration der IVT-mRNAs zu Poly(A)-Schwänzen auf die exprimierte Protein-konzentration haben.

5.5.1 Etablierung des mRNA-Transfektionsprotokolls

Zu Beginn dieser Dissertationsschrift standen keine Informationen über das Expressionsmaximum der translatierten, transfizierten mRNAs der Reprogrammierungsfaktoren zur Verfügung (Fragestellung 2). Die Studie von Van Tendeloo und Kollegen belegte, dass ein translatiertes Proteinmaximum von exogen eingebrachter IVT-mRNA nach 48 h erreicht ist, während bereits nach 72 h ein leichter Abfall zu verzeichnen ist¹³³. Genetische Analysen des Reprogrammierungsprozesses in iPS-Zellen haben gezeigt, dass exogen eingebrachte Pluripotenzfaktoren in der Zielzelle für 10 bis 15 Tagen konstitutiv exprimiert werden müssen, damit es überhaupt zu einer erfolgreichen Reprogrammierung kommt⁶¹. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde die Hypothese aufgestellt, dass mehrere mRNA-Transfektionen über einen Zeitraum von mindestens 14 Tagen notwendig sind. In diesem Zeitfenster sollte das endogene Netzwerk der Pluripotenzfaktoren aktiviert werden. Die Zellen wurden aller 72 h mit mRNA transfiziert, um ein ausgewogenes Verhältnis zwischen der Regenerationszeit der Zellen nach der zelltoxischen Transfektion und der zellbiologischen Umstellung durch die Expression der translatierten Reprogrammierungsfaktoren zu gewährleisten. Innerhalb von zwei Wochen wurden die Zellen mindestens viermal transfiziert. Zur Generation von mRNA-iPS-Zellen wurde die erste mRNA-Transfektion jeweils durch Elektroporation durchgeführt, gefolgt von mindestens drei Lipofektionen der adhärennten Zellen. Gerade bei schwierig zu transfizierenden primären Zellen können mit der Elektroporationstechnik die besten Ergebnisse erzielt werden^{176,177}. Da die Reprogrammierungsfaktoren keine Fluoreszenzmarkierung aufwiesen, wurde der Transfektionserfolg in Parallelansätzen mittels transfizierter eGFP-mRNA überprüft. Die Elektroporation mit der Nucleofector[®]-Technologie bietet entscheidende Vorteile:

1. spenderzellabhängige Transfektionskits (z. B. primäre humane Fibroblasten) und
2. unterschiedliche Elektroporationsprogramme mit dem Fokus auf entweder hoher Transfektionseffizienz oder hoher Überlebensrate der zu transfizierenden Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Schwerpunkt auf eine hohe Transfektionsrate gelegt. Dies geschah auf Basis der Überlegung, dass die überlebenden Zellen äußerst robust sein werden und damit den Transfektionsprozess besser überleben sollten. Nach 24 h konnte mit dem Programm U-23 der Nucleofector[®]-Technologie die höchste Transfektionseffizienz nachgewiesen werden (Abb. 4.15A). Alle weiteren verwendeten Programme erzielten eine

5. Diskussion

deutlich geringere Effizienz. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die eGFP-Expression in primären humanen Fibroblasten insgesamt sehr heterogen ist. Einzelne Zellen weisen eine sehr schwache eGFP-Expression auf, andere Zellen wiederum exprimieren das Protein ungewöhnlich stark. Möglicherweise hat in den Zielzellen ein unterschiedlich starker Abbau der exogen eingebrachten mRNA stattgefunden, der unter anderem auf die unterschiedlichen Längen der Poly(A)-Schwänze zurückzuführen sein kann. Wie in Kapitel 5.5 diskutiert, wurden enzymatische Poly(A)-Schwänze synthetisiert, die aber keine definierte Längen hatten, was wiederum zu einer heterogenen Proteinexpression führen kann¹⁷⁵. Es ist weiterhin möglich, dass unterschiedliche Mengen an mRNAs in die einzelnen Fibroblasten eingebracht wurden. Mit dem Transfektionsreagenz FuGENE[®] HD konnten annähernd die gleichen Transfektionseffizienzen wie mit der Nucleofector[®]-Technologie erzielt werden (Abb. 4.15B). Weitere getestete Transfektionsreagenzien (wie Lipofectamine[™] 2000) ergaben keine vergleichbar hohen Transfektionseffizienzen. Im Zeitraum der Bearbeitung dieser Dissertation wurden jedoch neue, kommerziell erhältliche Transfektionsreagenzien entwickelt, die speziell auf mRNA-Transfektionen ausgerichtet sind. Auf diese wird in Abschnitt 5.9.3 der Diskussion näher eingegangen.

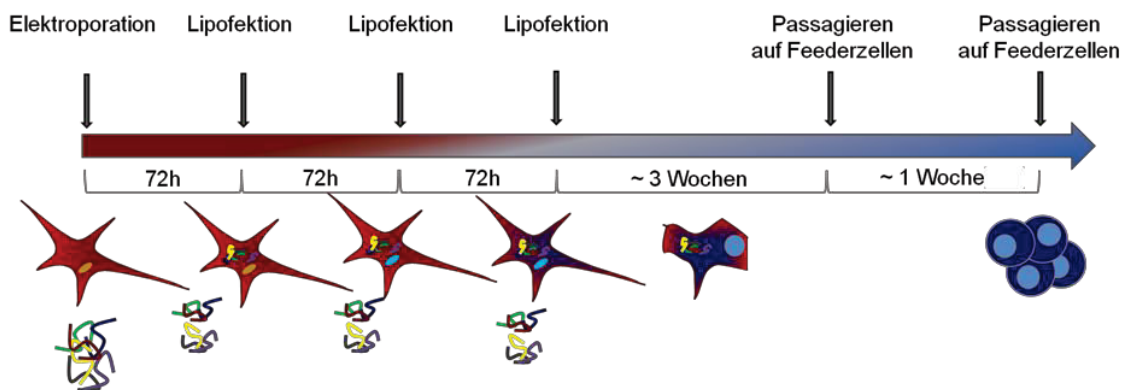


Abb. 5.1: Schematische Darstellung des mRNA-Transfektionsablaufs und mögliche endogene transkriptionelle Veränderung der Spenderzellen hin zu iPS-Zellen. Am Tag Null werden die humanen Fibroblasten (\leq Passage vier) mittels Elektroporation mit mRNAs, welche für die Pluripotenzfaktoren kodieren, transfiziert. Es schloss sich eine mRNA-Transfektion der adhären humanen Fibroblasten durch Lipofektion aller 72 h an. In dieser Zeit ändert sich das endogene transkriptionelle Expressionsprofil der erfolgreich transfizierten humanen Fibroblasten. Das erste Anzeichen einer erfolgreichen Reprogrammierung wird durch morphologische Veränderung der Spenderzellen hin zu in kleineren, runden Zellen mit einem dominanten Zellkern deutlich.

In Abbildung 5.1 ist der in dieser Dissertationsschrift angewendete zeitliche Ablauf der Generierung von mRNA-iPS Zellen aus humanen Fibroblasten durch mRNA-Transfektion schematisch dargestellt. Es wurden ausschließlich humane Fibroblasten bis Passage vier verwendet, um nur „junge“ Spenderzellen (d. h. niedrige Passagezahl) zu transfizieren¹⁷⁸. Beginnend mit der ersten mRNA-Transfektion der Reprogrammierungsfaktoren sollte der stochastische Reprogrammierungsprozess einsetzen. In Anlehnung an Studien zu

stochastischen Ereignissen während der Reprogrammierung^{61,156,157} wurden die zellulären Veränderungen in Abbildung 5.1 dargestellt. Dazu zählt, dass zuerst die exogen eingebrachten mRNA-Moleküle im Zytoplasma in Proteine translatiert werden und diese als aktivierte Transkriptionsfaktoren in den Zellkern diffundieren. Durch epigenetische Veränderungen können die endogenen Pluripotenzfaktoren aktiviert werden. Das Expressionsmuster der Zelle verändert sich kontinuierlich in das einer pluripotenten Zelle (illustriert durch den Farbwechsel des Zellkerns von orange zu blau in Abb. 5.1). Den längsten Umwandlungsprozess benötigt vermutlich die morphologische Veränderung von einer fibroblastoiden Struktur zu einer Morphologie pluripotenter Zellen, die sich als runde Zellen (im Diagramm blau) mit einem dominanten (hellblauen) Zellkern und deutlich reduziertem zytoplasmatischen Anteil darstellten. Der Reprogrammierungsprozess bleibt für die meisten Zellen inkomplett (partiell reprogrammierte Zellen)¹⁶⁰, wie in Kapitel 5.3.1.2 diskutiert. Dem stochastischen Reprogrammierungsprozess ist es geschuldet, dass zu Beginn der Reprogrammierung mit mRNA die transfizierten Zellen in Reprogrammierungsfibroblastenmedium kultiviert und erst ab dem siebten Tag auf iPS-Medium umgestellt werden können. Die ersten endogenen Pluripotenzmarker, etwa die Alkalische Phosphatase, werden innerhalb dieses Zeitraums exprimiert, die späten Marker wie Oct4 und Nanog erst nach ca. 14 Tagen^{61,179}. Die Kultivierungsbedingungen für die Generierung von potenziellen mRNA-iPS-Zellen wurden von denen zur Erzeugung viraler iPS-Zellen adaptiert.

In der vorliegenden Studie wurde innerhalb von etwa drei Wochen nach den mRNA-Transfektionen morphologische Veränderungen im Zellrasen der transfizierten Fibroblasten beobachtet. Die Zellgröße verkleinerte sich und die Zellen wuchsen als Kolonien. Diese Zellen wurden mechanisch in gleichmäßige Zellverbände geteilt und auf neue Feederzellschalen überführt (vgl. Morphologie Abb. 4.17 p0 und p1). In Kapitel 5.1.1 wurde ausführlich darauf eingegangen, warum eine mechanische Passagierung einer enzymatischen vorgezogen werden sollte, insbesondere, wenn es sich um die Entwicklungsphase der iPS-Kolonien handelt.

5.5.2 Einfluss der Faktorenkombination auf die Entstehung potenzieller mRNA-iPS-Kolonien

Nach dem derzeitigen wissenschaftlichen Erkenntnisstand kommt es zu keiner genomischen Integration von exogen eingebrachten mRNAs in den Zielzellen. Aus diesem Grund wird durch diese Reprogrammierungsmethode das onkogene Potential im Vergleich zu genomintegrierenden Methoden erheblich gesenkt. Es besteht dennoch weiterhin die hypothetische Möglichkeit, dass es durch ein ungünstiges Verhältnis der exogen eingebrachten Onkogene Klf4, cMyc und hTERT zu einer Transformation der Zellen kommen könnte. Somit wären auch mRNA-iPS-Zellen beziehungsweise aus diesen differenzierte Zellen für die Anwendung in der Klinik nicht geeignet.

5. Diskussion

Es existieren kontroverse Ansichten über die onkogenen Eigenschaften von hTERT^{180,181}. In der vorliegenden Arbeit wird es als Onkogen definiert, da es zur Immortalisierung von primären Zellen führen kann.

Es sollte daher versucht werden, mit unterschiedlichen Faktorenkombinationen mRNA-iPS-Zellen zu generieren, wobei die Priorität auf einem Verzicht von Klf4, cMyc und hTERT lag (Fragestellung 3). Der Hauptpluripotenzfaktor Oct4 war in allen Kombinationen vertreten^{33,37}. Es sollten die Kombinationen: OSK, ONM, ONK, ONT, ONS und OSKNMT getestet werden. Bei der Verwendung von Fibroblasten von Huntingtonpatienten kam es in allen oben genannten Faktorenkombinationen zur Koloniebildung (Abb. 4.18). Bei beiden Spendern wurden nach der mRNA-Transfektion mit dem Faktorengemisch ONT und OSK die meisten Kolonien erzeugt. Im Verlauf der iPS-Zellkultivierung zeigte sich jedoch, dass unter den getesteten Kombinationen nur die Faktorenkombination OSKNMT eine stabile Zellkultivierung (über Passage fünf hinaus) ermöglichte. Dies zeigt, dass auf die Onkogene bei diesen Spenderfibroblasten nicht verzichtet werden kann. Um die Anzahl notwendiger Reprogrammierungsfaktoren bei einer mRNA-Transfektion zu verringern, könnten alternative primäre Zelltypen beziehungsweise multipotente Stammzellen, wie z. B. humane neurale Stammzellen, als Spenderzellen zur Generierung von mRNA-iPS-Zellen eingesetzt werden. Multipotente Stammzellen exprimieren endogen selektive Pluripotenzgene. Somit müssten weniger mRNA-kodierende Pluripotenzfaktoren in die Spenderzellen transfiziert werden. Es konnte in der Tat gezeigt werden, dass der Hauptpluripotenzfaktor Oct4 ausreichend ist, um humane neurale Stammzellen in iPS-Zellen zu reprogrammieren¹⁸². Mit diesem Zelltyp als Spenderzellen könnte vermutlich auf die Onkogene Klf4, cMyc und hTERT bei der mRNA-Reprogrammierung verzichtet werden. Weiterhin wurde in dieser Arbeit ein Einfluss des Spenders auf die Entstehung von mRNA-Kolonien gezeigt (Abb. 4.18). Die entstandenen Kolonieanzahlen waren mit allen verwendeten Faktorengemischen bei dem männlichen, älteren Spender (56 Jahre) höher als bei der weiblichen, jüngeren Huntingtonpatientin (42 Jahre). Es konnten keine Kolonien des weiblichen Spenders längerfristig kultiviert werden. Kolonien vom männlichen Spender, die durch die mRNA-Transfektion des Faktorengemischs OSKNMT entstanden sind, konnten über Passage fünf hinaus kultiviert werden.

In vielen Studien zur Generierung von iPS-Zellen werden Aussagen zur Reprogrammierungseffizienz getroffen. Diese Aussagen sind mit Skepsis zu betrachten, da von einer definierten Zellzahl zu Beginn des Reprogrammierungsexperimentes ausgegangen wird. Jedoch sterben bei der Methode der wiederholten mRNA-Transfektionen viele Zellen ab. Hinzu kommt, dass sich die Zellen im Verlauf der Reprogrammierung teilen. Somit entspricht die Ausgangszellzahl nicht der wirklichen Zellzahl, die reprogrammiert wird. Wie auch die hier präsentierte Studie belegt, ist es entscheidender, welche Faktorenkombination die höchste Stabilität und Uniformität der entstanden iPS-Kolonien gewährleistet, und weniger,

welche die größte Zahl iPS-Kolonien zu Beginn der Reprogrammierung hervorbringt. Im Falle der Reprogrammierung aus weiblichen Spenderzellen ist die Überprüfung der Reaktivierung beider X-Chromosome in den generierten Kolonien eine interessante zusätzliche Charakterisierungsmethode auf vollreprogrammierte iPS-Zellen^{183,184}.

5.6 Beurteilung der potenziellen mRNA-iPS-Zellen auf Pluripotenz

Pluripotenzanalysen sollten Aufschluss über die Charakteristika der mRNA-iPS-Zelllinien geben (Fragestellung 4). Die potenziellen mRNA-iPS-Zellen wurden den gleichen beziehungsweise sogar zusätzlichen Pluripotenztests unterzogen wie die viralen iPS-Zellen. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bei den potenziellen mRNA-iPS-Zellen der Nachweis der AP-Aktivität gelang (Passage eins, Abb. 4.19). Hingegen konnte kein Nachweis der Expressionen der Pluripotenzmarker Oct4, Sox2, Nanog, SSEA3, SSEA4 und Tra-1-60 auf Proteinebene erbracht werden (Abb. 4.20). Eine spontane (Abb. 4.21) und direkte Differenzierung (Abb. 4.22) in alle drei Keimblätter schlug fehl. Bei der spontanen Differenzierung in EBs kann sogar davon ausgegangen werden, dass die Zellen im EB vermutlich nekrotisch oder apoptotisch waren, da kein spezifisches DAPI-Signal in den Zellen detektiert werden konnte (Abb. 4.21A'', B'' und C''). Zum Vergleich ist in Abbildung 5.2 ein EB dargestellt, in dem ein starkes DAPI-Signal am Rand des dreidimensionalen Aggregates und kein DAPI im Zentrum detektiert wurde. Es ist anzunehmen, dass es bei einigen dreidimensionalen Aggregaten zu einem Diffusionsproblem der Antikörper gekommen ist.

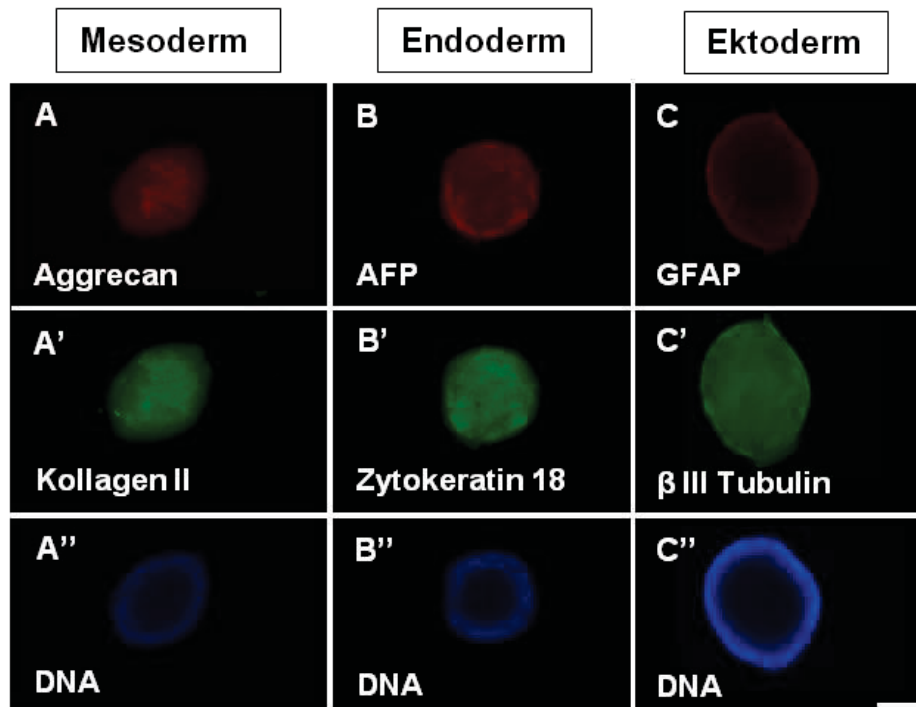


Abb. 5.2: Formierung von dreidimensionalen Aggregaten aus potenziellen mRNA-iPS-Zellen aus Vorhautfibroblasten. Nach neun Tagen in Suspension wurden die Aggregate mittels

Immunfluoreszenz auf spezifische Marker aller drei Keimblätter überprüft. Es wurde keine eindeutigen Proteinexpression detektiert. Die DNA im Zellkern wurde durch DAPI-Färbung sichtbar gemacht (A", B", C"; Messbalken = 100 µm).

Es ist daher denkbar, dass es sich bei den in der vorliegenden Studie generierten mRNA-iPS-Zellen, um partiell reprogrammierte Zellen handelt. Weiterhin schlug der entscheidende Pluripotenztest für humane PS-Zellen, die Teratomformierung, fehl. Dies stellt einen starken Hinweis auf das Vorliegen einer unvollständigen Reprogrammierung der analysierten mRNA-Kolonien dar. Es muss aber darauf hingewiesen werden, dass auch bei der Teratomformierung keine 100%ige Erfolgsrate zu verzeichnen ist. Studien, wie die von Armstrong und Kollegen¹⁸⁵ oder die groß angelegte Studie der internationalen Stammzellinitiative¹³² zeigen, dass nicht alle applizierten humanen ES-Zellen Teratome ausbilden. Gründe dafür sind vermutlich unterschiedliche Applikationsmethoden oder - was wahrscheinlicher ist - die zu geringe Sensitivität des Testsystems. In der Arbeit von Gropp und Kollegen konnte die Sensitivität deutlich erhöht werden²⁴. Da die Teratomformierung von der Firma EPO-Berlin GmbH (Berlin) durchgeführt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass das negative Ergebnis auf eine partielle Reprogrammierung zurückzuführen ist.

Um nähere Aussagen treffen zu können, aus welchen Gründen es zu keiner vollständigen Reprogrammierung kam, wurden weitere Analysen durchgeführt.

5.7 Partiiell reprogrammierte mRNA-iPS-Zellen im direkten Vergleich zu viralen iPS-Zellen

Die bisher diskutierten Ergebnisse aus Pluripotenzanalysen deuten drauf hin, dass es zu keiner vollständigen Reprogrammierung durch mRNA-Transfektionen gekommen ist. Im weiteren Verlauf sollte daraufhin die zusätzliche Frage beantwortet werden, warum keine vollständige Reprogrammierung durch mRNA-Transfektionen möglich war.

5.7.1 Pluripotenzanalyse mittels qPCR

Unter anderem sollten Untersuchungen auf mRNA-Expressionsebene im Vergleich zu humanen ES-Zellen (H9-Zellen) Hinweise auf transkriptionelle Unterschiede geben. So war ein Ziel dieser Untersuchungen, mögliche Unterschiede in den Expressionsniveaus der partiell reprogrammierten mRNA-iPS-Kolonien im Vergleich zu viralen iPS-Zellen zu identifizieren. Daraus sollten Erklärungen für die Beobachtung abgeleitet werden, dass mit der mRNA-Transfektion keine stabilen Linien etabliert werden konnten. Auf Grund der Schwierigkeiten bei der Beschaffung des entsprechenden Ausgangsmaterials konnte dieses Experiment nur einmal erfolgreich mit Fibroblasten eines männlichen Huntingtonpatienten (vgl. Kapitel 5.4.2) durchgeführt werden. Daher war keine sinnvolle statistische Betrachtung der Ergebnisse möglich. Um den Sachverhalt der partiell reprogrammierten mRNA-iPS-Zellen dennoch etwas besser deuten zu können, wurde das Expressionsprofil der mRNA-transfizierten Fibroblasten, viralen iPS-Zellen und H9-Zellen in die Analyse mit einbezogen.

5. Diskussion

Die in dieser Studie generierten viralen iPS-Zelllinien zeigen ein ähnliches Expressionsniveau von Oct4 und cMyc wie H9-Zellen und eine 100-fach erhöhte Expression von Klf4. Hingegen konnte keine Expression von Nanog und Sox2 detektiert werden. Auf einer höheren Passagestufe derselben iPS-Zelllinie fand die Genearray-Analyse statt. Diese Analyse belegte, wie in Kapitel 5.7.2 diskutiert wird, dass diese virale iPS-Zelllinie in ihrem Gesamtexpressionsprofil den H9-Zellen sehr ähnlich ist. Da dies mit der qPCR nicht eindeutig gezeigt werden konnte, legt dies die Vermutung nahe, dass sich die viralen iPS-Zellen zum Zeitpunkt der qPCR-Analyse noch in der Übergangsphase zu vollreprogrammierten iPS-Zellen befanden.

Die Oct4-mRNA-Expression war bei allen partiell reprogrammierten mRNA-iPS-Zellen und mRNA-transfizierten Fibroblasten auf einem deutlich geringeren Niveau (max. 20 %) als bei den H9-Kontrollzellen (Abb. 4.24). Dies könnte eine mögliche Ursache für eine unvollständige Reprogrammierung darstellen, da Oct4 zur Trias der Kernpluripotenzfaktoren gehört. Als weiterer Kernpluripotenzfaktor wurde Nanog analysiert (Abb. 4.25). In Zellen, die mit Nanog-mRNA transfiziert wurden, wurde eine überraschend starke Nanog-Expression detektiert. Die höchste Nanog-Expression wies die Faktorenkombination ONM in den mRNA-transfizierten Fibroblasten auf (18-fach höher als in H9). Dieses Ergebnis zeigt, wie wichtig das richtige stöchiometrische Verhältnis der einzelnen Pluripotenzfaktoren zueinander ist, um die ausbalancierte endogene Pluripotenzschleife⁶¹ zu aktivieren. Als weiterer wichtiger Pluripotenzfaktor wurde Sox2 auf den zur Verfügung stehenden Proben analysiert (Abb. 4.26). Zellen, die mit den Faktoren ONS transfiziert wurden, wiesen die höchsten Sox2-Expressionen auf. Im direkten Vergleich der beiden Faktorenkombinationen OSKNMT und ONS wurde bei ONS-mRNA-transfizierten Fibroblasten die höchste Sox2-Expression detektiert. Die Expression war vierfach höher als bei den analysierten humanen ES-Zellen. Bei den Faktorenkombinationen ONS und OSKNMT kam es zwar zu einer erhöhten Expression von Sox2 und Nanog, aber der entscheidende Pluripotenzmarker Oct4 wurde vermutlich auf einem zu niedrigen Expressionslevel exprimiert, um eine vollständige Reprogrammierung in mRNA-iPS-Zellen zu gewährleisten. Es konnte in dieser Studie festgestellt werden, dass die Expressionsmuster der Kernpluripotenzgene Oct4, Sox2 und Nanog stark von den verwendeten Faktorenkombinationen abhängen. Deutlich wurde weiterhin, dass ein optimales stöchiometrisches Verhältnis der Pluripotenzfaktoren zueinander einen entscheidenden Einfluss auf den Reprogrammierungserfolg besitzt. Diese Schlussfolgerung wird durch aktuelle Publikationen gestützt, in denen dargelegt wird, dass der Reprogrammierungserfolg vom stöchiometrischen Verhältnis der eingebrachten Faktoren bei der Reprogrammierung beeinflusst wird⁶⁶ und sich auf die epigenetische und biologische Vielfalt⁶⁷ auswirkt. Damit wird deutlich, wie schwierig es ist, eine mRNA-Reprogrammierung im Gegensatz zu einer viralen Reprogrammierung durchzuführen. Durch die virale

genomische Integration werden die Pluripotenzfaktoren konstitutiv bis zur vollständigen Reprogrammierung in iPS-Zellen exprimiert. Bei den wiederholten Transfektionen mit einem Gemisch an Reprogrammierungsfaktoren kann nicht gewährleistet werden, dass bei jeder Transfektion die gleichen Zellen erneut ausreichend transfiziert werden. Augenscheinlich haben aber die mRNA-Transfektionen zu einer transkriptionellen Veränderung der Spenderfibroblasten geführt.

Zusätzlich zu den Kernpluripotenzfaktoren ONS wurden weiterhin die Expressionsmuster von Klf4 und cMyc, bekannt als potenzielle Onkogene¹⁸⁶, auf ihr Expressionsmuster hin analysiert. Für beide Faktoren ist in der Literatur beschrieben, dass auch ohne Klf4 beziehungsweise cMyc eine Reprogrammierung prinzipiell erfolgreich durchgeführt werden kann, wobei jedoch der Reprogrammierungserfolg vergleichsweise gering ist⁶⁸. Anhand der Klf4-Expression (Abb. 4.27) wurde deutlich, dass bei der Transfektion von Klf4-mRNA eine erhöhte Expression in den resultierenden mRNA-iPS-Kolonien, wie auch in den transfizierten Fibroblasten ohne Koloniebildung auftritt. Dies konnte für die Faktorenkombination OSK nicht erreicht werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten mRNA-iPS-Kolonien cMyc exprimieren. Interessant ist, dass das Expressionsniveau der humanen Vorhautfibroblasten ähnlich hoch ist wie in humanen ES-Zellen, jedoch nach der Reprogrammierung in mRNA-iPS-Zellen mit der verwendeten Faktorenkombination OSK für die Vorhaut-iPS-Zellen stark abfällt. Ein ähnliches cMyc-Expressionsniveau wurde bei den mRNA-iPS-Zellen des männlichen Huntingtonpatienten mit der gleichen Faktorenkombination festgestellt. Auch hier kommt es nach der Reprogrammierung im Vergleich zu den Spenderfibroblasten zu einem Abfall. Durch die potenzielle Gefahr, die der Verwendung von Onkogenen während der Reprogrammierung zugrunde liegt, wurde große Hoffnung in die Faktorenkombination ONS gelegt. Leider konnten auch mit dieser Faktorenkombination keine vollreprogrammierten mRNA-iPS-Zellen generiert werden.

Zusätzlich ist es anhand einer humanen ES-Zelllinie als Positivkontrolle schwierig, einen validierten Vergleich zu erbringen, insbesondere, da diese H9-Linie in einem anderen Labor kultiviert wurde. Es gibt zahlreiche Belege dafür, dass es bei den gleichen humanen ES und iPS-Zelllinien hohe transkriptionelle Unterschiede innerhalb der weltweit kultivierenden Laboratorien gibt¹⁸⁷⁻¹⁹⁰. Genexpressionen von ES- und iPS-Zelllinien desselben Laboratoriums sind hingegen deutlich homogener. Dies trifft auch auf die am häufigsten publizierte humane ES-Zelllinie H9 zu^m. Die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen, Verfahren zur Passagierung, Unterschiede in den Feederzellen oder feederzellfreie Kultivierung haben einen entscheidenden Einfluss auf die transkriptionelle Genexpression¹⁸⁷.

^m www.umassmed.edu/ischr/hESCusage.aspx

5.7.2 Genearray-Analyse von stammzellspezifischen Genen

Mit der Überprüfung des vollständigen genomischen Expressionsprofils der potenziellen iPS-Zellen im Vergleich zu humanen ES-Zellen sollten die Expressionsunterschiede genauer analysiert werden können. Die mRNA-Proben wurden zur Microarrayanalyse dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) in Leipzig übergeben und die Datenauswertung wurde von Dr. Wirth und PD Dr. Binder am Interdisziplinären Zentrum für Bioinformatik (IZBI) in Leipzig durchgeführt.

Durch die funktionelle Clusterung von Genexpressionsdaten wird es ermöglicht, ähnlich exprimierte Gene in Gruppen einzuteilen und bestimmte Muster in der Expression zu erkennen. Durch die Zuordnung der Gene in Fraktionen lassen sich Homologien und die gemeinsame Regulation bestimmter Gene ermitteln und ebenso regulatorische Unterschiede anhand von Transkriptionsprofilen beobachten. Die hierarchische Clusteranalyse wurde als *cluster heatmap* (Abb. 4.31A) und die Unabhängigkeitsanalyse als Diagramm (Abb. 4.31B) dargestellt. Dabei wurden ein spezifisches Genset analysiert, welches den pluripotenten Stammzeleigenschaften im Vorfeld zugeordnet worden ist (persönliche Mitteilung PD Dr. Binder und Dr. Wirth). Die hierarchische Clusteranalyse und die Unabhängigkeitsanalyse machen deutlich, dass die analysierte humane ES-Zelllinie H9 und die humanen Fibroblasten sehr unterschiedliche Genexpressionsmuster zeigen. Diese unterschiedlichen Expressionsergebnisse der Kontrollen waren zu erwarten. Interessant ist aber, dass auch in den duplikativ analysierten humanen H9-Zellen unterschiedliche Genexpressionen bezüglich des untersuchten Stammzellgensets nachgewiesen wurden. Dass humane ES-Zelllinien starke Schwankungen bezüglich des vollständigen genomischen Expressionsprofils aufweisen können, wurde von unterschiedlichen Arbeitsgruppen gezeigt^{132,189,191}. In dieser Studie stammen die analysierten Proben der humanen ES-Zelllinie aus einem Labor (freundlicherweise von Dr. Armstrong zur Verfügung gestellt). Somit kann weitestgehend ausgeschlossen werden, dass unterschiedliche Kultivierungsmethoden für die Schwankungen in der Genexpressionsanalyse verantwortlich sind. Es könnte auch vermutet werden, dass diese Genexpressionsunterschiede auch innerhalb der gleichen Zelllinie normal sind. Durch eine replikative Untersuchung einer Vielzahl von Proben könnte diese Frage geklärt werden.

Besonders in der Unabhängigkeitsanalyse (Abb. 4.31B) fällt auf, dass die untersuchte humane virale iPS-Zelllinie, die aus Fibroblasten des Huntingtonpatienten generiert wurde, den humanen ES-Zellproben ähnlich ist. Die hierarchische Clusteranalyse macht deutlich, dass die partiell reprogrammierten mRNA-iPS-Zellen unterschiedliche Expressionsprofile im Vergleich zu ihren Spenderfibroblasten (Fibroblasten des Huntingtonpatienten beziehungsweise Vorhautfibroblasten) aufweisen und anscheinend einige wenige Pluripotenzgene

5. Diskussion

exprimieren (vgl. Abb. 4.31B). Allerdings weisen sie nicht die gleichen Genexpressionsprofile wie die analysierten humanen ES-Zellen oder die etablierten viralen iPS-Zellen auf.

Die Dreiklassenvergleichsanalyse (Abb. 4.32) ergab für das untersuchte stammzell-spezifische Genprofil 379 Gene, die in Fibroblasten des Huntingtonpatienten und den daraus generierten potenziellen mRNA-iPS-Zellen (Faktorengemisch: OSKNMT) signifikant unterschiedlich exprimiert werden (Abb. 4.32A). Davon sind in den potenziellen mRNA-iPS-Zellen im Vergleich zu ihren Spenderfibroblasten 159 Gene stärker und 220 Gene schwächer exprimiert. Da es sich bei einer Vielzahl der stärker exprimierten Gene um spezifische Gene für die jeweiligen drei Keimblätter handelt (vgl. Tab. 4.1), lässt sich vermuten, dass möglicherweise die Transfektion des mRNA-Gemisches zur Reprogrammierung einiger pluripotenten Zellen zu Beginn des Kultivierungsprozesses führte, welche in alle drei Keimblätter differenzierten. Es ist weniger wahrscheinlich, dass durch die mRNA-Transfektionen der Pluripotenzfaktoren OSKNMT eine Transdifferenzierung der Spenderfibroblasten in die jeweiligen nachgewiesenen Keimblätter ausgelöst wurde. Es ist anzunehmen, dass der pluripotente Status in den potenziellen mRNA-iPS-Zellen unter den verwendeten Kultivierungs- und Reprogrammierungsbedingungen nicht erhalten geblieben ist und zum analysierten Zeitpunkt eine spontane Differenzierung stattgefunden hatte.

In Abbildung 4.32B sind diejenigen Gene dargestellt, die in humanen ES-Zellen (H9-Zellen) und den potenziellen mRNA-iPS-Zellen unterschiedlich exprimiert wurden. Für 430 Gene wurden signifikante Expressionsunterschiede detektiert. In den potenziellen mRNA-iPS-Zellen waren im Vergleich zu den humanen ES-Zellen 137 Gene stärker und 293 Gene schwächer exprimiert. Bis auf Oct4 und Lin28 sind in den potenziellen mRNA-iPS-Zellen keine Pluripotenzfaktoren signifikant stärker exprimiert als in den humanen ES-Zellen. Interessant ist weiterhin, dass sich eine Methyltransferase (DNTM3), die spezifisch in pluripotenten Stammzellen exprimiert wird, in den potenziellen mRNA-iPS-Zellen signifikant stärker darstellte (vgl. Tab. 4.2). Diese Ergebnisse belegen, dass durch die Transfektion des mRNA-Gemisches OSKNMT vermutlich eine transkriptionelle Expressionsveränderung ähnlich zu pluripotenten Zellen, nicht jedoch aber eine vollständige Reprogrammierung stattgefunden hat. Die signifikant erhöhten Expressionen einiger wenige Gene wie Oct4, Lin28 und DNTM3 reichen nicht aus, um den Pluripotenzstatus sicher zu belegen. Weiterhin führt eine Überexpression von Oct4 zur Differenzierung³⁶. Es muss darauf hingewiesen werden, dass bei 25 % der Gene falschpositive Signale detektiert wurden, welche durch die durchgeführten Analysen nicht charakterisiert werden können (persönliche Mitteilung: PD Dr. Binder). Weitere ausgewählte Beispiele in Tabelle 4.2 belegen, dass Gene aller drei Keimblätter in den potenziellen mRNA-iPS-Zellen im Vergleich zu humanen ES-Zellen signifikant verstärkt exprimiert wurden. Diese Ergebnisse bestätigen die Erkenntnisse der Vergleichsanalyse potenzieller mRNA-iPS-Zellen zu ihren Spenderfibroblasten (Tab. 4.1).

Bemerkenswert ist weiterhin, dass in den potenziellen mRNA-iPS-Zellen ein Telomerase-inhibitor (TERF1) im Vergleich zu den humanen ES-Zellen stärker exprimiert ist. Die Analysen zur Telomeraseaktivität (vgl. Abb. 4.30) und Telomerlänge (Abb. 4.29) bestätigen dieses Ergebnis. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch die Transfektion des mRNA-Gemisches OSKNMT einige wenige pluripotente Gene in den potenziellen mRNA-iPS-Zellen signifikant stärker exprimiert wurden. Jedoch gehört die Mehrheit der nachgewiesenen stärker exprimierten Gene zu einem der jeweiligen drei Keimblätter. Damit lagen zum analysierten Zeitpunkt keine vollreprogrammierten mRNA-iPS-Zellen vor. Die Existenz von einigen pluripotenten Zellen zu einem früheren Zeitpunkt ist jedoch nicht ganz auszuschließen.

5.7.3 Telomerlängen und Telomeraseaktivität

Ein weiteres Kriterium von PS-Zellen ist deren unbegrenzte Teilungsfähigkeit aufgrund ihrer hohen Telomeraseaktivität¹⁹², welche zu stabilen Telomerlängen während der Zellteilung führt¹⁹³. In einigen Studien wird bei der Charakterisierung von iPS-Zellen im Vergleich zu ES-Zellen auf deren Telomerlängen und weiterführend den Zusammenhang zur Telomeraseaktivität eingegangen^{70,159,194-196}. Die Verlängerung der Telomere durch die Aktivierung der Telomerase wird auch als Postreprogrammierungseffekt bezeichnet, da bei humanen iPS-Zellen erst ab Passage fünf vergleichbare Telomerlängen wie bei humanen ES-Zellen nachgewiesen wurden¹⁹⁵. In dieser Studie konnte die Verlängerung der Telomere bei den humanen viralen iPS-Zellen bestätigt werden (Abb. 4.29). Die mit den Reprogrammierungsfaktoren OSKNMT erzeugten viralen iPS-Zellen des Huntingtonpatienten zeigten eine deutliche Verlängerung der Telomerlänge zwischen den Passagezahlen drei und sechs im Vergleich zu den Spenderfibroblasten. Interessanterweise war die Telomerlänge auf Passagestufe drei sogar kürzer als bei den Spenderfibroblasten (Abb. 4.29B). Vermutlich hat die Telomeraseaktivität bis zur Passagestufe drei nicht ausgereicht, um die Telomere zu verlängern. Vielmehr kam es bei jedem Zellteilungsvorgang zu einer Verkürzung derselben. Im Verlauf der Kultivierung erhöhte sich die Telomeraseaktivität der viralen iPS-Zellen. Im Vergleich zu den Spenderfibroblasten war sie in Passage sechs um das 3,5-fache erhöht. Die Telomerlängen der partiell reprogrammierten mRNA-iPS-Zellen und mRNA-transfizierten Fibroblasten wurden bei allen Faktorenkombinationen (OSK, ONK, ONM, ONS, ONT und OSKNMT) analysiert. Die partiell reprogrammierten mRNA-iPS-Zellen aller Faktorenkombinationen wurden nach der fünften Passage analysiert. Bemerkenswert war eine geringfügige Verlängerung der Telomere bei der Faktorenkombination OSK gegenüber den Spenderfibroblasten des Huntingtonpatienten. Bei allen anderen verwendeten Faktorenkombinationen hat bis zur Passage fünf der partiell reprogrammierten mRNA-iPS-Zellen keine Telomerverlängerung stattgefunden. Vielmehr waren die Telomersequenzen bei den potenziellen mRNA-iPS-Kolonien kürzer als bei den Spenderfibroblasten. Diese Ergebnisse

werden durch den Dreiklassenvergleich gestützt, indem ein Telomeraseinhibitor in den potenziellen mRNA-iPS-Zellen im Vergleich zu den humanen ES-Zellen signifikant stärker exprimiert war (vgl. Tab. 4.2) und es somit zu keiner Verlängerung der Telomere kommen kann. Die mRNA-transfizierten Fibroblasten ergaben ein sehr heterogenes Bild. Es kann keine klare Aussage über eine mögliche Verlängerung getroffen werden, da die Proben eine hohe Standardabweichung aufwiesen. Dies gilt auch für die potenziellen mRNA-iPS-Zellen, die aus Vorhautfibroblasten generiert wurden.

Für den Telomeraseaktivitätsnachweis stand nur von den potenziellen mRNA-iPS-Zellen der Faktorenkombinationen OSKNMT (Huntington-Spenderfibroblasten) und OSK (Vorhautfibroblasten) genügend Zellmaterial zur Verfügung (vgl. Abb. 4.30). Bei den jeweiligen potenziellen mRNA-iPS-Zellen war sogar weniger Aktivität zu verzeichnen als in den entsprechenden Spenderfibroblasten. Im Vergleich zu den Spenderfibroblasten deutet dies auf eine „Alterung“ der Zellen hin, was durch die Analyse der Telomerlängen bestätigt wurde (Abb. 4.29A). Die Transfektion von hTERT-mRNA hatte keinen direkten Effekt auf die Aktivierung der Telomerase. Im Vergleich zu den übrigen verwendeten Reprogrammierungsfaktoren ist die hTERT-mRNA mit 3.500 Bp ungewöhnlich lang. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es während der Transfektion oder in den transfizierten Zellen zu einem schnellen Abbau der fragilen und langen hTERT-mRNA gekommen ist.

Die nachweislich nicht aktivierte Telomerase in mRNA-transfizierten Fibroblasten beziehungsweise potenziellen mRNA-iPS-Kolonien ist insgesamt vermutlich auf die fehlende Aktivierung der autologen Pluripotenzschleife zurückzuführen.

5.8 Kritische Beurteilung nicht-integrierender Reprogrammierungsmethoden

Während der Bearbeitung der hier präsentierten Studie wurden weitere nicht-integrierende Reprogrammierungsmethoden entwickelt. Nach jetzigem Stand der Forschung gibt es vier Methoden zu nicht-genomintegrierenden iPS-Zellen: 1. episomale Vektoren¹⁹⁷, 2. Proteintransfektion¹⁹⁸, 3. Sendai-Virus¹⁹⁹ 4. mRNA-Transfektionen mit modifizierten mRNA-Molekülen¹³⁶.

Bei kritischer Betrachtung dieser Methoden wird deutlich, dass diese meist nicht völlig unproblematisch sind.

5.8.1 Episomale Vektoren

Die episomalen Vektoren für die Reprogrammierung in iPS-Zellen basieren auf dem Epstein-Barr-Virus (= EBV-Vektor)¹⁹⁷. Diese EBV-Vektoren lagern sich durch die enthaltene EBNA-1-Sequenz an das Wirtsgenom an und werden während der Zellteilungen durch extrachromosomale Replikation an beide Tochterzellen stabil weitergegeben²⁰⁰. Dadurch wird eine Modifikation des Wirtsgenoms vorgenommen. Die Reprogrammierungseffizienz ist sehr gering, was vermutlich einerseits auf die extrem großen Plasmide zurückzuführen ist

(> 12 kb) oder alternativ der aktiven Stilllegung von Vektorsequenzen durch Methylierung in der Zielzelle geschuldet sein kann. Weiterhin kann es durch die EBNA-1-Sequenz zu einer kanzerogenen Entartung der Zellen kommen²⁰¹.

5.8.2 Direkte Proteintransfektion

Mit der Methode der direkten Proteintransfektion eröffnete sich die erste Reprogrammierungsmethode ohne jegliches Risiko einer Insertion von Transgenen in das Wirtsgenom. Dazu wurden diese Proteine mit Peptiden fusioniert, die die Transfektion in Zellen erleichtern (beispielsweise die HIV-Transaktivatoren der Transkription (Tat) und Poly-Argine)²⁰²⁻²⁰⁵. Bei diesem Verfahren fusionierten Kim und Kollegen die rekombinanten Proteine OSKM mit einer Poly-Arginin-Transduktionsdomäne²⁰⁶. Durch wiederholte Transfektionen von humanen neonatalen Fibroblasten mit OSKM-rekombinanten Proteinen konnten iPS-Kolonien generiert werden. Nachteilig stellten sich die lange Reprogrammierungszeit von ca. sechs Wochen, die geringe Effizienz und die komplexe Herstellung von rekombinanten Proteinen in den erforderlichen Mengen dar. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte nachgewiesen werden, dass bei der Proteintransfektion keine angeborenen immunologischen Abwehrmechanismen in den transfizierten Zellen ausgelöst werden, welche aber möglicherweise für eine effektive Reprogrammierung erforderlich sind²⁰⁷. Durch virale Transduktion wird TLR 3 aktiviert (vgl. Kapitel 2.5.2), wodurch es zu einer umfangreichen epigenetischen Remodelierung des Wirtsgenoms kommt. Die exogen eingeführten pluripotenten Transkriptionsfaktoren können effektiv an den endogenen Pluripotenzpromotorsequenzen binden. Diese werden aktiviert und effizient transkribiert. Bei der Reprogrammierung mit zellpermeablen Proteinen wird der TLR 3-Signalweg nicht aktiviert, was nachweislich die Ursache der ineffizienten Reprogrammierung ist²⁰⁷. Dieser Signalweg wird durch die nachfolgend beschriebenen Methoden aktiviert.

5.8.3 Sendai-Virus

Als ssRNA-Virus aktiviert das Sendai-Virus (SeV) bei einer Transduktion die angeborene Immunantwort in den Zielzellen (siehe Einleitung 2.5.2). Die SeV-Partikel werden nur im Zytoplasma der infizierten Zellen repliziert²⁰⁸. Eine Integration der exogen eingebrachten Reprogrammierungsfaktoren in das Wirtsgenom ist dadurch weitestgehend ausgeschlossen. Die viralen Partikel werden bei der Zellteilung der iPS-Zellen auf beide Tochterzellen verteilt und damit langfristig „ausgedünnt“. Ein eleganter Ansatz ist die Verwendung von temperatursensitiven SeV-Plasmiden, was die vollständige Entfernung der viralen Plasmide nach einer erfolgreichen Reprogrammierung ermöglicht²⁰⁸. Trotzdem handelt es sich bei dieser Methode weiterhin um virale Partikel, was zu Bedenken bezüglich der Verwendung der SeV-iPS-Zellen beziehungsweise deren differenzierten Derivaten in der regenerativen Medizin führen könnte.

5.8.4 mRNA-Transfektionen mit modifizierten mRNA-Molekülen

Ob die Aktivierung der angeborenen Immunantwort in den zu reprogrammierenden Zellen wirklich essentiell ist, wird anhand der Methode der direkten mRNA-Transfektion kontrovers diskutiert. Wie Lee und Kollegen darlegen, ist die Aktivierung für eine vollständige Reprogrammierung entscheidend²⁰⁷. Warren und Kollegen versuchten hingegen, durch die Verwendung von modifizierten mRNA-Molekülen und des Interferoninhibitors B18R die angeborene Immunantwort zu unterdrücken¹³⁷. Die IVT-mRNA wurde durch die Verwendung von 5-Methylcytidintriphosphat und Pseudouridintriphosphat modifiziert. Es wurde zwar eine Reduzierung, nicht jedoch eine vollständige Eliminierung der Immunantwort mit diesen Modifikationen erreicht. In einer vergleichenden Studie von Drews und Kollegen mit unmodifizierten und modifizierten mRNA-Molekülen und B18R²⁰⁹, wie sie in der Studie von Warren und Kollegen zum Einsatz kamen, wurden erstens keine mRNA-iPS-Zellen generiert und zweitens die Immunantwort nicht reduziert. Diese war sogar vergleichbar hoch wie nach dem Einsatz von unmodifizierten mRNA-Molekülen und ohne B18R.

Weitere Studien zu potenziellen mRNA-iPS-Zellen sind leider durch eine unvollständige Charakterisierung der mRNA-iPS-Zellen limitiert (z. B. keine Durchführung von Teratomformierungen oder *in vitro*-Differenzierung in alle drei Keimblätter),^{210,211} was die Beurteilung dieser iPS-Zellen sehr schwierig gestaltet. Einzig Warren und Kollegen^{137,212} scheinen mit modifizierten mRNA-Molekülen der Faktorenkombination OSKNM und Lin28 mRNA-iPS-Zellen generieren zu können^{136,209}. Bemerkenswert ist, dass bisher mit dem seit 2011 kommerziell erhältlichen mRNA-Reprogrammierungskit (Stemgent) basierend auf der Studie von Warren und Kollegen¹³⁷ keine weiteren Arbeitsgruppen neue mRNA-iPS-Zelllinien publiziert haben. Dies legt den Schluss nahe, dass die Methode sehr anspruchsvoll ist. Optimierte mRNA-Transfektionsprotokolle sind daher dringend notwendig.

5.9 Optimierungen der mRNA-Transfektionsbedingungen für folgende Projekte

Wie Tavernier und Kollegen darlegten, können mit unmodifizierten mRNA-Molekülen mRNA-iPS-Zellen aus MEFs generiert werden²¹¹. Allerdings lässt sich deren Qualität anhand der publizierten Ergebnisse nicht zweifelsfrei einschätzen. Die Parallelstudie der Kollaborationspartner Drews et al. zeigt unter Verwendung identischer mRNA-Moleküle, dass keine mRNA-iPS-Zellen aus humanen Fibroblasten generiert werden konnten²⁰⁹. Diese Parallelstudien wurden erst nach Beendigung der experimentellen Arbeit der vorliegenden Dissertation veröffentlicht, bestätigen aber deren Erkenntnis, dass es unter Einsatz unmodifizierter mRNA-Moleküle nicht zu einer vollständigen Reprogrammierung aus humanen Fibroblasten zu iPS-Zellen kommt. Trotzdem ist nicht widerlegt, dass eine vollständige Reprogrammierung mit unmodifizierten mRNA-Molekülen möglich ist. Dazu sind weitere, möglicherweise erhebliche Optimierungen notwendig. Um in dieser Studie einen wichtigen Schritt

Richtung erfolgreicher mRNA-Reprogrammierung mit unmodifizierten mRNA-Molekülen zu leisten, wurden weitere Optimierungsexperimente durchgeführt.

Zum Ende der vorliegenden Dissertationsschrift stellte Roche die Produktion des Transfektionsreagens FuGENE® HD ein. Ein direkter Vergleich zu den weiteren durchgeführten Optimierungsexperimenten, wie die Verwendung von neuen spezifischen mRNA-Transfektionskits und einem mRNA-Reprogrammierungsmedium (Pluriton™ mit B18R) war aus diesem Grund nicht möglich. Die ermittelten eGFP-mRNA Transfektionseffizienzen waren mit dem für mRNA spezifischen *TransIT®-mRNA Transfection* Kit (vgl. Abb. 4.33) höher als die durch Fugene HD oder Elektroporation erzielten (vgl. Abb. 4.15). Dies stellt eine gute Grundlage für eine erfolgreiche mRNA-Reprogrammierung dar.

5.9.1 Auswirkungen der einzelnen Reprogrammierungsfaktoren auf das Zellwachstum

Um zu analysieren, welchen individuellen Effekt die Reprogrammierungsfaktoren auf die transfizierten Fibroblasten haben, wurden die Zellzahlen nach einer einmaligen mRNA-Transfektion mit dem *TransIT®-mRNA Transfection* Kit über drei Tage bestimmt. Bei einer einmaligen Transfektion der einzelnen Reprogrammierungsfaktoren mit unmodifizierten mRNA-Molekülen kommt es innerhalb von drei Tagen zu keiner Zunahme der Zellzahlen (Abb. 4.34). Im Vergleich zur Ausgangszellzahl wurde bei allen analysierten Faktoren eher eine leichte Abnahme detektiert. Eine wiederholende mRNA-Transfektion unter den analysierten Bedingungen würde vermutlich in einer weiteren Verringerung der Zellzahlen resultieren. Wie in der Studie von Drews und Kollegen zeigt, führte eine tägliche Transfektion des OSKM-mRNA-Gemisches zu einem vollständigen Absterben der Zellen nach sieben Tagen, wobei das eingesetzte mRNA-Transfektionsprotokoll vermutlich auf den Arbeiten von Warren und Kollegen basierte¹³⁷. Eine tägliche mRNA-Transfektion mit modifizierten mRNA-Molekülen führte bei Warren et al. zu einem kontinuierlichen Zellwachstum und einer Etablierung von iPS-Zellen¹³⁷.

5.9.2 Proteinstabilität von analysierten Pluripotenzfaktoren

Um eine tägliche Transfektion mit unmodifizierten mRNA-Molekülen zu vermeiden, sollten die Proteinexpressionen von Oct4, Sox2, Nanog, Klf4 und cMyc untersucht werden. Da es sich bei diesen Proteinen um Transkriptionsfaktoren handelt, ist eine effektive endogene Degradierung in den Zellen notwendig. Als Kontrolle für den Transfektionserfolg wurde eGFP-mRNA verwendet. Zum Zeitpunkt des Experiments standen frische Vorhautfibroblasten von zwei Spendern zur Verfügung.

Innerhalb von 24 h nach einer Oct4-mRNA-Transfektion kam es zu einer schnellen Protein-degradierung in den transfizierten Fibroblasten (Tab. 4.3). Warren und Kollegen haben eine ähnliche Degradierung mit modifizierten mRNA-Molekülen festgestellt¹³⁷. Es kann daher angenommen werden, dass das Maximum der Proteinexpression von Oct4 vor dem ersten

ermittelten Datenpunkt (24 h) lag. Für Sox2 könnte eine ähnliche Situation eingetreten sein. Hingegen zeigen die Ergebnisse für Nanog-Proteinexpression deutlich, dass das Expressionsmaximum bei 48 h erreicht war. Für Klf4 und cMyc sind die Daten sehr heterogen. Da bereits eine hohe endogene Proteinexpression für diese beiden Transkriptionsfaktoren nachgewiesen wurden ist, kam es vermutlich zu keinem sicher nachweisbaren Anstieg der Expression. Die Ergebnisse deuten vielmehr auf eine Varianz der Proteinexpression hin. Die ermittelten Ergebnisse zur eGFP-Proteinexpression zeigen einen stetigen Anstieg bis 72 h nach der eGFP-mRNA-Transfektion. Ob das Expressionsmaximum nach 72 h erreicht ist, kann aus den Ergebnissen nicht geschlossen werden. In bisher publizierten Ergebnissen zu einer eGFP-mRNA-Transfektion verringert sich die eGFP-Proteinexpression nach 12 h¹³⁷. Im Gegensatz zu der von Warren und Kollegen¹³⁷ eingesetzten eGFP-mRNA, enthielt die in dieser Dissertationsschrift verwendete mRNA keine Modifikationen der einzelnen mRNA-Nukleotide (vgl. mRNA-Modifikationen Kapitel 5.4.7). Somit kann zumindest für eGFP vergleichend festgehalten werden, dass mRNA, die aus unmodifizierten mRNA-Nukleotiden synthetisiert wurde, eine längere Expressionsdauer der translatierten Proteine aufweist als mRNA aus modifizierten Nukleotiden¹³⁷. Die Ergebnisse zur Proteinexpression können keiner sinnvollen statistischen Auswertung unterzogen werden, da dieses Experiment nur an zwei Spendern durchgeführt werden konnte. Es kann aber als Vorarbeiten für zukünftige Projekte dienen. Die hier präsentierten Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine tägliche Oct4- und Sox2-mRNA-Transfektion notwendig ist. Die Transfektion von Nanog-mRNA könnte hingegen reduziert werden, beispielsweise auf eine Behandlung aller zwei Tage.

5.9.3 Alternative Transfektionsmittel im Vergleich

Um zu analysieren, inwieweit unterschiedliche Transfektionsmittel nach mehrmaliger mRNA-Transfektion Einfluss auf die Überlebensrate der Spenderzellen haben, wurden die Proliferationsraten von Fibroblasten nach dreimaliger Transfektion mit eGFP-mRNA und unterschiedlichen Transfektionsmitteln analysiert. Als neue Transfektionsmittel zur Generierung von mRNA-iPS-Zellen wurden das *TransIT[®]-mRNA Transfection Kit* und das PEI-Transfektionsreagenz aus dem PEI - Exgene 500 Transfektionskit verwendet. Die ermittelten Transfektionseffizienzen nach eGFP-mRNA Transfektionen waren für beide verwendete Methoden ähnlich hoch (vgl. Abb. 4.33 und Abb. 4.35). Bei einer dreimaligen Transfektion wurden zwischen den getesteten Transfektionsmitteln und mRNA-Konzentrationen große Unterschiede in den Überlebensraten der transfizierten Fibroblasten festgestellt (Abb. 4.36). Bei der Verwendung des *TransIT[®]-mRNA Transfection Kits* überlebten signifikant weniger Fibroblasten die mehrmaligen mRNA-Transfektionen. Im Vergleich dazu hatten mRNA-Transfektionen mit dem PEI - Exgene 500 Transfektionskit weniger toxische Auswirkungen auf die Fibroblasten, wobei auch hier signifikante Unterschiede in den PEI-Transfektionsansätzen bezüglich mRNA- und PEI-Konzentrationen festgestellt

wurden. Die dreimalige Transfektionsprozedur mit 1 µg eGFP-mRNA überlebten signifikant weniger Fibroblasten als eine vergleichbares Prozedere mit 0,5 µg. Die PEI-Konzentration war in beiden Fällen gleich. Erstaunlich war, dass bei Erhöhung der PEI-Konzentration und Verwendung von 1 µg eGFP-mRNA ebenfalls keine signifikant toxischen Auswirkungen der Transfektionsprozedur bei den Fibroblasten nachgewiesen werden konnten. Vermutlich wurden bei der erhöhten PEI-Konzentration alle mRNA-Moleküle komplexiert. Dies bedeutet, dass sowohl die Konzentration des PEI-Transfektionsreagenzes als auch die (freie) mRNA-Konzentration Einfluss auf das Überleben der transfizierten Fibroblasten haben. Zusammenfassend stellt das PEI-Transfektionsreagenz im Vergleich zum *TransIT[®]-mRNA Transfection* Kit eine deutlich weniger toxische Alternative dar. Es wäre denkbar, dass durch die Verwendung der PEI-Transfektionsreagenz mehrmalige mRNA-Transfektionen möglich sind.

5.9.4 Einfluss der mRNA-Transfektion auf die angeborene Immunantwort

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass es bei einer Transfektion mit nicht modifizierten mRNA-Molekülen zu keiner Immunantwort der transfizierten humanen Fibroblasten kommt (Abb. 4.37). Die nachgewiesenen INF-β-Konzentrationen sind der in der Negativkontrolle (= Puffer: ohne Fibroblasten und rekombinantes IFN-β) vergleichbar. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu anderen Studien^{137,209}. Es könnte aber auch eine Erklärung dafür sein, warum es zu keiner vollständigen Reprogrammierung in iPS-Zellen gekommen ist. Wie Lee und Kollegen zeigten, muss die angeborene Immunantwort einsetzen, damit iPS-Zellen generiert werden können²⁰⁷. Durch die Aktivierung des TLR 3 wird der NFκB-Signalweg und der Interferonregulator 3 aktiviert. Der NFκB-Signalweg führt zur Induktion und Blockierung von essentiellen, epigenetisch genommodellierenden Enzymen, die eine ähnliche Expressionssignatur in pluripotenten Stammzellen aufweisen (z. B. Induktion von Histonacetyltransferase und Histonmethyltransferase, sowie Blockierung der Expression z. B. von Histondeacetylasen, H3K4 Histonmethyltransferase sowie H3K79 Histonmethyltransferase)²¹³. Durch die so ausgelösten, genomweiten epigenetischen Modifikationen werden vermutlich wichtige Pluripotenzpromotorbindungsstellen demethyliert und es könnte zu einer unterstützenden endogenen Aktivierung der Pluripotenzgene kommen. Der aktivierte Interferonregulator 3 induziert die IFN-β-Produktion in Zellen. Unter den analysierten Bedingungen konnte nach mRNA-Transfektionen kein IFN-β in den Medienüberständen der transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Somit ist anzunehmen, dass der TLR 3 und der Interferonregulator 3 nicht aktiviert wurden. Bei der traditionellen retroviralen Reprogrammierungsmethode⁵⁶, basierend auf MoMLV (= ssRNA-Virus), wird die angeborene Immunantwort aktiviert^{207,214}.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine zu starke Immunantwort zu einem Absterben der Spenderzellen bei einer wiederholten Induktion durch mRNA-Transfektionen

führt. Die Datenlage dieser Schrift und die anderer Arbeiten^{207,214} deutet aber darauf hin, dass eine moderate Immunantwort in den Spenderzellen für eine erfolgreiche iPS-Zellreprogrammierung notwendig ist^{204,211}. Selbst bei modifizierten mRNA-Molekülen und der Verwendung des Interferonblockers B18R wird immer noch eine Expression von immunitätsregulierenden Genen nachgewiesen¹³⁷. Eine moderate Induktion der Immunantwort während des Reprogrammierungsprozesses bei nicht modifizierten mRNA-Molekülen mit Poly-Inosin:Poly-Cytidyl-Säure, könnte vermutlich zum Erfolg der Reprogrammierung in mRNA-iPS-Zellen beitragen²⁰⁷.

5.10 Schlussfolgerung

Obwohl in dieser Studie die Etablierung von mRNA-iPS-Zellen nicht vollständig gelang, können deren Erkenntnisse in Kombination mit zwischenzeitlich veröffentlichten Studien zu mRNA-Reprogrammierungen dennoch einen wichtigen Beitrag zur erfolgreichen Etablierung von mRNA-iPS-Zellen aus unmodifizierten mRNA-Molekülen leisten. Wie schwierig es ist, mRNA-iPS-Zellen zu generieren, belegt unter anderem die Negativstudie von Drews und Kollegen²⁰⁹. Vieles spricht auch für ein noch nicht vollständiges Wissen hinsichtlich des Transfektionsprotokoll mit modifizierten mRNA-Molekülen, da seit 2010 nur Warren und Kollegen stabile mRNA-iPS-Zellen generieren konnten^{137,212}. Um die Methode der mRNA-Reprogrammierung erfolgreich weiterzuentwickeln, sollten einige Modifizierungen durchgeführt werden.

So sollte ein Fokus auf die Stabilität der zu transfizierenden mRNA-Moleküle gelegt werden. Je länger die eingebrachten mRNA-Moleküle in den Spenderzellen translatiert werden können, umso weniger Transfektionen sind notwendig und umso mehr Zellen überleben den Reprogrammierungsprozess. Die kürzlich publizierte Studie von Hayashi und Kollegen zeigt eindrucksvoll, welchen Einfluss eine zusätzliche 3'-UTR stabilisierende Sequenz aus dem venezuelanischen Pferdeenzephalitisvirus in den IVT-Plasmiden auf die Stabilität der IVT-mRNA besitzt²¹⁵. Weiterhin wäre eine Klonierung eines definierten Poly(A)-Schwanzes in das IVT-Plasmid im Hinblick auf qualitativ hochwertige, reproduzierbare mRNA-Moleküle vorteilhaft. Die Halbwertszeit der mRNA-Moleküle wäre darüber hinaus besser prognostizierbar. Eine noch höhere Proteinexpression könnte durch eine Kotransfektion mit freien Poly(A)-Schwänzen erreicht werden. Natürlich bleibt weiterhin das Problem bestehen, dass die translatierten Proteine auch nach Optimierungen eine unterschiedliche Halbwertszeit in den Zielzellen besitzen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Hauptpluripotenzfaktor Oct4 am kürzesten exprimiert wird. Basierend auf den hier präsentierten Halbwertszeitstudien der translatierten Proteine könnte das mRNA-Reprogrammierungsprotokoll so modifiziert werden, dass zu bestimmten Zeitpunkten nur spezifische mRNAs von Reprogrammierungsfaktoren transfiziert werden. Wie Warren und Kollegen zeigen, kann auch die Erhöhung der Oct4-mRNA-Konzentration im Vergleich zu den übrigen Reprogrammierungsfaktoren zum

Reprogrammierungserfolg beitragen¹³⁷. Basierend auf der eben zitierten Studie wäre es weiterhin möglich, dass nur mit der Faktorenkombination OSKN mit Lin28 mRNA-iPS-Zellen generiert werden können. Eine Erweiterung des Faktorengemisches wäre somit erforderlich. Eine tägliche Transfektion mit nicht modifizierten mRNA-Molekülen scheint zumindest auf Basis der jetzigen Datenlage nicht gut möglich zu sein, da diese Strategie umfangreiche primäre Zellschäden mit sich bringt²⁰⁹. Dies könnte durch stabilisierte Pluripotenzfaktoren umgangen werden. Die Verwendung von alternativen Spenderzellen, wie humane neurale Stammzellen, eröffnet weiterhin die Möglichkeit, weniger pluripotenzrelevante Faktoren transfizieren zu müssen. Eine moderate Aktivierung der angeborenen Immunantwort der Spenderzellen während des Reprogrammierungsvorganges scheint notwendig zu sein. Im Grunde muss die Qualität des fertigen „Produktes“ – die mRNA-iPS-Zelle - zeigen, welche Modifikationen der IVT-Plasmide oder Reprogrammierungsprotokolle zu einheitlichen und stabilen Ergebnissen führen.

5.11 Ausblick

Die Möglichkeit der Generierung von mRNA-iPS-Zellen und somit einer nicht-integrierenden und zeiteffizienten Methode zur Herstellung von iPS-Zellen eröffnet perspektivisch eine realistische Aussicht auf die Applikation von differenzierten Zielzellen in der regenerativen Medizin. Weiterhin stellen die nicht dauerhaft genommodifizierenden mRNA-iPS-Zellen für die Etablierung von optimierten Differenzierungsprotokollen von iPS-Zellen ein attraktives Forschungsobjekt dar, da integrierende Reprogrammierungsfaktoren einen starken Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit von iPS-Zellen besitzen¹⁷³.

Ein enger Bezug dieser Dissertationsschrift zur Klinik wurde durch die Reprogrammierung von Fibroblasten von Huntingtonpatienten in potenzielle mRNA-iPS-Zellen hergestellt. Die Erforschung der Differenzierungsfähigkeit von Patienten-iPS-Zellen im Vergleich zu gesunden Spendern ergibt sich als logischer Schritt in Hinblick auf zukünftige, anwendungsorientierte Projekte. Ein weiteres herausforderndes Ziel der Stammzellforschung ist die Differenzierung in reife somatische Zellen, beispielsweise Motoneurone, dopaminerge Interneurone oder Kardiomyozyten. Dass eine Differenzierung z. B. in dopaminerge Neurone aus PS-Zellen erfolgreich durchgeführt werden kann, konnte in vielen Studien gezeigt werden. Es gibt aber im menschlichen Körper eine Vielzahl dopaminergere Neurone, wobei der Verlust nur eines spezifischen Typs für die Parkinson'sche Erkrankung verantwortlich ist. Dem diffizilen Unterschied *in vivo* gleichermaßen durch *in vitro*-Differenzierungen Rechnung zu tragen, stellt eine der größten aktuellen Herausforderungen der Stammzellforschung dar. Auch hier liegt eine mögliche Anwendung von mRNA-Transfektionen. Durch mRNA-Transfektionen von zielzellspezifischen Genen, wie z. B. Transkriptionsfaktoren für die Aktivierung von dopaminergen Neuronen, in Kombination mit effektiven Induktionsmedien,

5. Diskussion

könnten diese entscheidenden Unterschiede in den Differenzierungsprotokollen zur Reifung therapierrelevanter Zellen führen.

Zusammenfassend zeigt sich, dass das Feld der mRNA-basierten iPS-Zellherstellung und ihrer Differenzierung eine Vielzahl neuer und spannender Möglichkeiten sowohl für die Grundlagenforschung als auch für den Bereich anwendungsbezogener Forschungsvorhaben der regenerativen Medizin bietet. Die Ergebnisse der hier präsentierten Arbeit leisten einen Beitrag auf dem Weg zur erfolgreichen mRNA-iPS-Zellreprogrammierung.

6 Literaturangaben

- 1 Hebert, L. E., Weuve, J., Scherr, P. A. & Evans, D. A. Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology*, doi:WNL.0b013e31828726f5 [pii]10.1212/WNL.0b013e31828726f5 (2013).
- 2 Mason, C. & Dunnill, P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med* **3**, 1-5, doi:10.2217/17460751.3.1.1 (2008).
- 3 Hayflick, L. & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**, 585-621 (1961).
- 4 Hayflick, L. Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Experimental Cell Research* **37**, 614-& (1965).
- 5 Schneider, E. L. & Mitsui, Y. The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 3584-3588 (1976).
- 6 Amabile, G. & Meissner, A. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol Med* **15**, 59-68, doi:DOI 10.1016/j.molmed.2008.12.003 (2009).
- 7 Hochedlinger, K. & Plath, K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* **136**, 509-523, doi:Doi 10.1242/Dev.020867 (2009).
- 8 Orkin, S. H. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* **1**, 57-64 (2000).
- 9 Orkin, S. H. & Zon, L. I. Hematopoiesis: An evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* **132**, 631-644, doi:DOI 10.1016/j.cell.2008.01.025 (2008).
- 10 Orkin, S. H. & Zon, L. I. SnapShot: Hematopoiesis. *Cell* **132**, 712-U717, doi:DOI 10.1016/j.cell.2008.02.013 (2008).
- 11 van der Flier, L. G. & Clevers, H. Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annu Rev Physiol* **71**, 241-260, doi:DOI 10.1146/annurev.physiol.010908.163145 (2009).
- 12 Godin, I. & Cumano, A. The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race. *Nat Rev Immunol* **2**, 593-604, doi:10.1038/nri857nri857 [pii] (2002).
- 13 Orkin, S. H. Stem cell alchemy. *Nat Med* **6**, 1212-1213 (2000).
- 14 Sethe, S., Scutt, A. & Stolzing, A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev* **5**, 91-116, doi:S1568-1637(05)00049-8 [pii]10.1016/j.arr.2005.10.001 (2006).
- 15 Ferron, S. R. *et al.* Telomere shortening in neural stem cells disrupts neuronal differentiation and neurogenesis. *J Neurosci* **29**, 14394-14407, doi:10.1523/JNEUROSCI.3836-09.200929/46/14394 [pii] (2009).
- 16 Guan, K. *et al.* Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* **440**, 1199-1203, doi:Doi 10.1038/Nature04697 (2006).
- 17 Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos. *Nature* **292**, 154-156 (1981).
- 18 Martin, G. R. Isolation of a Pluripotent Cell-Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem-Cells. *P Natl Acad Sci-Biol* **78**, 7634-7638 (1981).
- 19 Thomson, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147 (1998).
- 20 Amit, M. *et al.* Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Developmental Biology* **227**, 271-278, doi:10.1006/dbio.2000.9912S0012-1606(00)99912-3 [pii] (2000).
- 21 Smith, A. G. *et al.* Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**, 688-690, doi:10.1038/336688a0 (1988).
- 22 Williams, R. L. *et al.* Myeloid-Leukemia Inhibitory Factor Maintains the Developmental Potential of Embryonic Stem-Cells. *Nature* **336**, 684-687 (1988).
- 23 Donovan, P. J. & Gearhart, J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* **414**, 92-97, doi:10.1038/3510215435102154 [pii] (2001).
- 24 Gropp, M. *et al.* Standardization of the Teratoma Assay for Analysis of Pluripotency of Human ES Cells and Biosafety of Their Differentiated Progeny. *PLoS One* **7**, e45532, doi:10.1371/journal.pone.0045532PONE-D-12-11612 [pii] (2012).
- 25 Maherali, N. & Hochedlinger, K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **3**, 595-605, doi:S1934-5909(08)00579-1 [pii]10.1016/j.stem.2008.11.008 (2008).
- 26 Gardner, R. L. Mouse chimeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. *Nature* **220**, 596-597 (1968).
- 27 Rossant, J., Gardner, R. L. & Alexandre, H. L. Investigation of the Potency of Cells from the Postimplantation Mouse Embryo by Blastocyst Injection - Preliminary-Report. *J Embryol Exp Morph* **48**, 239-247 (1978).
- 28 Wakayama, T. *et al.* Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* **292**, 740-743, doi:10.1126/science.1059399292/5517/740 [pii] (2001).
- 29 Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. & Campbell, K. H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**, 810-813, doi:10.1038/385810a0 (1997).
- 30 Cowan, C. A., Atienza, J., Melton, D. A. & Eggan, K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* **309**, 1369-1373, doi:309/5739/1369 [pii]10.1126/science.1116447 (2005).

- 31 Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N. & Tada, T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* **11**, 1553-1558, doi:S0960-9822(01)00459-6 [pii] (2001).
- 32 Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676 (2006).
- 33 Scholer, H. R., Dressler, G. R., Balling, R., Rohdewohld, H. & Gruss, P. Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J* **9**, 2185-2195 (1990).
- 34 Scholer, H. R., Ruppert, S., Suzuki, N., Chowdhury, K. & Gruss, P. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* **344**, 435-439, doi:10.1038/344435a0 (1990).
- 35 Nichols, J. *et al.* Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95**, 379-391 (1998).
- 36 Okamoto, K. *et al.* A Novel Octamer Binding Transcription Factor Is Differentially Expressed in Mouse Embryonic-Cells. *Cell* **60**, 461-472 (1990).
- 37 Scholer, H. R., Balling, R., Hatzopoulos, A. K., Suzuki, N. & Gruss, P. Octamer Binding-Proteins Confer Transcriptional Activity in Early Mouse Embryogenesis. *Embo Journal* **8**, 2551-2557 (1989).
- 38 Scholer, H. R., Hatzopoulos, A. K., Balling, R., Suzuki, N. & Gruss, P. A Family of Octamer-Specific Proteins Present during Mouse Embryogenesis - Evidence for Germline-Specific Expression of an Oct Factor. *Embo Journal* **8**, 2543-2550 (1989).
- 39 Niwa, H., Miyazaki, J. & Smith, A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* **24**, 372-376, doi:10.1038/74199 (2000).
- 40 Avilion, A. A. *et al.* Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Gene Dev* **17**, 126-140, doi:DOI 10.1101/Gad.224503 (2003).
- 41 Masui, S. *et al.* Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* **9**, 625-U626, doi:DOI 10.1038/Ncb1589 (2007).
- 42 Pevny, L. & Placzek, M. SOX genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol* **15**, 7-13, doi:DOI 10.1016/j.conb.2005.01.016 (2005).
- 43 Kastan, M. B., Slamon, D. J. & Civin, C. I. Expression of protooncogene c-myc in normal human hematopoietic cells. *Blood* **73**, 1444-1451 (1989).
- 44 Kastan, M. B., Stone, K. D. & Civin, C. I. Nuclear Oncoprotein Expression as a Function of Lineage, Differentiation Stage, and Proliferative Status of Normal Human Hematopoietic-Cells. *Blood* **74**, 1517-1524 (1989).
- 45 Laurenti, E. *et al.* Hematopoietic Stem Cell Function and Survival Depend on c-Myc and N-Myc Activity. *Cell Stem Cell* **3**, 611-624, doi:DOI 10.1016/j.stem.2008.09.005 (2008).
- 46 Murphy, M. J., Wilson, A. & Trumpp, A. More than just proliferation: Myc function in stem cells. *Trends Cell Biol* **15**, 128-137, doi:DOI 10.1016/j.tcb.2005.01.008 (2005).
- 47 Schmidt, E. V. The role of c-myc in cellular growth control. *Oncogene* **18**, 2988-2996 (1999).
- 48 Wilson, A. *et al.* Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair. *Cell* **135**, 1118-1129, doi:DOI 10.1016/j.cell.2008.10.048 (2008).
- 49 Fernandez, P. C. *et al.* Genomic targets of the human c-Myc protein. *Gene Dev* **17**, 1115-1129, doi:DOI 10.1101/Gad.1067003 (2003).
- 50 Frank, S. R. *et al.* MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *Embo Rep* **4**, 575-580, doi:DOI 10.1038/sj.embor.embor861 (2003).
- 51 Li, Z. R. *et al.* A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *P Natl Acad Sci USA* **100**, 8164-8169, doi:DOI 10.1073/pnas.1332764100 (2003).
- 52 Knoepfler, P. S. *et al.* Myc influences global chromatin structure. *EMBO J* **25**, 2723-2734, doi:7601152 [pii]10.1038/sj.emboj.7601152 (2006).
- 53 Jiang, J. *et al.* A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nature Cell Biology* **10**, 353-360, doi:ncb1698 [pii]10.1038/ncb1698 (2008).
- 54 Li, Y. *et al.* Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* **105**, 635-637, doi:DOI 10.1182/blood-2004.07.2681 (2005).
- 55 McConnell, B. B. & Yang, V. W. Mammalian Kruppel-like factors in health and diseases. *Physiol Rev* **90**, 1337-1381, doi:90/4/1337 [pii]10.1152/physrev.00058.2009 (2010).
- 56 Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872, doi:DOI 10.1016/j.cell.2007.11.019 (2007).
- 57 Yu, J. Y. *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-1920, doi:DOI 10.1126/science.1151526 (2007).
- 58 Boyer, L. A. *et al.* Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**, 947-956 (2005).
- 59 Loh, Y. H. *et al.* The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* **38**, 431-440, doi:ng1760 [pii]10.1038/ng1760 (2006).
- 60 Lee, T. I. *et al.* Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* **125**, 301-313, doi:S0092-8674(06)00384-9 [pii]10.1016/j.cell.2006.02.043 (2006).
- 61 Jaenisch, R. & Young, R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* **132**, 567-582, doi:S0092-8674(08)00115-3 [pii]10.1016/j.cell.2008.01.015 (2008).
- 62 Chambers, I. *et al.* Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* **450**, 1230-1234, doi:nature06403 [pii]10.1038/nature06403 (2007).
- 63 Silva, J. & Smith, A. Capturing pluripotency. *Cell* **132**, 532-536, doi:S0092-8674(08)00207-9 [pii]10.1016/j.cell.2008.02.006 (2008).

- 64 Moss, E. G. & Tang, L. Conservation of the heterochronic regulator Lin-28, its developmental expression and microRNA complementary sites. *Developmental Biology* **258**, 432-442, doi:S001216060300126X [pii] (2003).
- 65 Richards, M., Tan, S. P., Tan, J. H., Chan, W. K. & Bongso, A. The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells* **22**, 51-64, doi:10.1634/stemcells.22-1-51 (2004).
- 66 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* **106**, 12759-12764, doi:0904825106 [pii]10.1073/pnas.0904825106 (2009).
- 67 Carey, B. W. *et al.* Reprogramming Factor Stoichiometry Influences the Epigenetic State and Biological Properties of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* **9**, 588-598, doi:DOI 10.1016/j.stem.2011.11.003 (2011).
- 68 Aasen, T. *et al.* Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* **26**, 1276-1284, doi:Doi 10.1038/Nbt.1503 (2008).
- 69 Taylor, C. J., Peacock, S., Chaudhry, A. N., Bradley, J. A. & Bolton, E. M. Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient HLA types. *Cell Stem Cell* **11**, 147-152, doi:10.1016/j.stem.2012.07.014S1934-5909(12)00429-8 [pii] (2012).
- 70 Vaziri, H. *et al.* Spontaneous reversal of the developmental aging of normal human cells following transcriptional reprogramming. *Regen Med* **5**, 345-363, doi:Doi 10.2217/Rme.10.21 (2010).
- 71 Feng, Q. *et al.* Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. *Stem Cells* **28**, 704-712, doi:10.1002/stem.321 (2010).
- 72 Kim, K. *et al.* Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* **467**, 285-290, doi:nature09342 [pii]10.1038/nature09342 (2010).
- 73 Bar-Nur, O., Russ, H. A., Efrat, S. & Benvenisty, N. Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell Stem Cell* **9**, 17-23, doi:S1934-5909(11)00293-1 [pii]10.1016/j.stem.2011.06.007 (2011).
- 74 Kitamura, T. *et al.* Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: Powerful tools in functional genomics. *Exp Hematol* **31**, 1007-1014, doi:DOI 10.1016/j.exphem.2003.07.005 (2003).
- 75 Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nature Protocols* **2**, 3081-3089, doi:DOI 10.1038/nprot.2007.418 (2007).
- 76 Wernig, M. *et al.* In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* **448**, 318-U312, doi:Doi 10.1038/Nature05944 (2007).
- 77 Hawley, R. G., Lieu, F. H. L., Fong, A. Z. C. & Hawley, T. S. Versatile Retroviral Vectors for Potential Use in Gene-Therapy. *Gene Ther* **1**, 136-138 (1994).
- 78 Jahner, D. *et al.* Denovo Methylation and Expression of Retroviral Genomes during Mouse Embryogenesis. *Nature* **298**, 623-628 (1982).
- 79 Hotta, A. & Ellis, J. Retroviral Vector Silencing During iPS Cell Induction: An Epigenetic Beacon that Signals Distinct Pluripotent States. *J Cell Biochem* **105**, 940-948, doi:Doi 10.1002/Jcb21912 (2008).
- 80 Blelloch, R., Venere, M., Yen, J. & Ramalho-Santos, M. Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell Stem Cell* **1**, 245-247, doi:DOI 10.1016/j.stem.2007.08.008 (2007).
- 81 Yao, S. Y. *et al.* Retrovirus silencing, variegation, extinction, and memory are controlled by a dynamic interplay of multiple epigenetic modifications. *Mol Ther* **10**, 27-36, doi:DOI 10.1016/j.ymthe.2004.04.007 (2004).
- 82 Ramos-Mejia, V., Munoz-Lopez, M., Garcia-Perez, J. L. & Menendez, P. iPSC lines that do not silence the expression of the ectopic reprogramming factors may display enhanced propensity to genomic instability. *Cell Res* **20**, 1092-1095, doi:10.1038/cr.2010.125cr2010125 [pii] (2010).
- 83 Woods, N. B., Bottero, V., Schmidt, M., von Kalle, C. & Verma, I. M. Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma. *Nature* **440**, 1123, doi:4401123a [pii]10.1038/4401123a (2006).
- 84 Marshall, J. *et al.* Cationic lipid structure and formulation considerations for optimal gene transfection of the lung. *J Drug Target* **7**, 453-469, doi:10.3109/10611860009102219 (2000).
- 85 Felgner, P. L. *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7413-7417 (1987).
- 86 Boussif, O. *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7297-7301 (1995).
- 87 Boussif, O., Zanta, M. A. & Behr, J. P. Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. *Gene Ther* **3**, 1074-1080 (1996).
- 88 Pollard, H. *et al.* Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem* **273**, 7507-7511 (1998).
- 89 Kopatz, I., Remy, J. S. & Behr, J. P. A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. *J Gene Med* **6**, 769-776, doi:10.1002/jgm.558 (2004).
- 90 Erbacher, P. *et al.* Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI). *Journal of Gene Medicine* **1**, 210-222 (1999).
- 91 Park, M. R. *et al.* Highly efficient gene transfer with degradable poly(ester amine) based on poly(ethylene glycol) diacrylate and polyethylenimine in vitro and in vivo. *J Gene Med* **10**, 198-207, doi:10.1002/jgm.1139 (2008).
- 92 Zhang, X. Q., Intra, J. & Salem, A. K. Comparative study of poly (lactic-co-glycolic acid)-poly ethyleneimine-plasmid DNA microparticles prepared using double emulsion methods. *J Microencapsul* **25**, 1-12, doi:783540301 [pii]10.1080/02652040701659347 (2008).

- 93 Titomirov, A. V., Sukharev, S. & Kistanova, E. In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochim Biophys Acta* **1088**, 131-134, doi:0167-4781(91)90162-F [pii] (1991).
- 94 Malone, R. W., Felgner, P. L. & Verma, I. M. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6077-6081 (1989).
- 95 Bettinger, T., Carlisle, R. C., Read, M. L., Ogris, M. & Seymour, L. W. Peptide-mediated RNA delivery: a novel approach for enhanced transfection of primary and post-mitotic cells. *Nucleic Acids Res* **29**, 3882-3891 (2001).
- 96 Strobel, I. *et al.* Human dendritic cells transfected with either RNA or DNA encoding influenza matrix protein M1 differ in their ability to stimulate cytotoxic T lymphocytes. *Gene Ther* **7**, 2028-2035, doi:10.1038/sj.gt.3301326 (2000).
- 97 Mitchell, D. A. & Nair, S. K. RNA-transfected dendritic cells in cancer immunotherapy. *J Clin Invest* **106**, 1065-1069, doi:10.1172/JCI11405 (2000).
- 98 Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-738, doi:10.1038/3509956035099560 [pii] (2001).
- 99 Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529-1531, doi:10.1126/science.10936161093616 [pii] (2004).
- 100 Hornung, V. *et al.* 5'-triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994-997, doi:DOI 10.1126/science.1132505 (2006).
- 101 Schmidt, A. *et al.* 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12067-12072, doi:0900971106 [pii]10.1073/pnas.0900971106 (2009).
- 102 Vonsattel, J. P. *et al.* Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **44**, 559-577 (1985).
- 103 Nance, M. A., Mathias-Hagen, V., Breningstall, G., Wick, M. J. & McGlennen, R. C. Analysis of a very large trinucleotide repeat in a patient with juvenile Huntington's disease. *Neurology* **52**, 392-394 (1999).
- 104 A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* **72**, 971-983, doi:0092-8674(93)90585-E [pii] (1993).
- 105 Bano, D., Zanetti, F., Mende, Y. & Nicotera, P. Neurodegenerative processes in Huntington's disease. *Cell Death Dis* **2**, e228, doi:cddis2011112 [pii]10.1038/cddis.2011.112 (2011).
- 106 Yamamoto, A., Lucas, J. J. & Hen, R. Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* **101**, 57-66, doi:S0092-8674(00)80623-6 [pii]10.1016/S0092-8674(00)80623-6 (2000).
- 107 Klement, I. A. *et al.* Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell* **95**, 41-53, doi:S0092-8674(00)81781-X [pii] (1998).
- 108 Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D. & Greenberg, M. E. Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* **95**, 55-66, doi:S0092-8674(00)81782-1 [pii] (1998).
- 109 Zhang, Y. & Friedlander, R. M. Using non-coding small RNAs to develop therapies for Huntington's disease. *Gene Ther* **18**, 1139-1149, doi:Doi 10.1038/Gt.2011.170 (2011).
- 110 Kordower, J. H. *et al.* Neuropathological Evidence of Graft-Survival and Striatal Reinnervation after the Transplantation of Fetal Mesencephalic Tissue in a Patient with Parkinsons-Disease. *New Engl J Med* **332**, 1118-1124, doi:Doi 10.1056/Nejm199504273321702 (1995).
- 111 Freeman, T. B. *et al.* Transplanted fetal striatum in Huntington's disease: Phenotypic development and lack of pathology. *P Natl Acad Sci USA* **97**, 13877-13882, doi:DOI 10.1073/pnas.97.25.13877 (2000).
- 112 Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Freeman, T. B. & Olanow, C. W. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med* **14**, 504-506, doi:10.1038/nm1747nm1747 [pii] (2008).
- 113 Cicchetti, F., Soulet, D. & Freeman, T. B. Neuronal degeneration in striatal transplants and Huntington's disease: potential mechanisms and clinical implications. *Brain* **134**, 641-652, doi:10.1093/brain/awq328awq328 [pii] (2011).
- 114 Cisbani, G. *et al.* Striatal allografts in patients with Huntington's disease: impact of diminished astrocytes and vascularization on graft viability. *Brain* **136**, 433-443, doi:10.1093/brain/aws359aws359 [pii] (2013).
- 115 Gupta, N. *et al.* Neural stem cell engraftment and myelination in the human brain. *Sci Transl Med* **4**, 155ra137, doi:10.1126/scitranslmed.30043734/155/155ra137 [pii] (2012).
- 116 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* **105**, 5856-5861, doi:10.1073/pnas.08016771050801677105 [pii] (2008).
- 117 Mitalipova, M. M. *et al.* Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **23**, 19-20, doi:nbt0105-19 [pii]10.1038/nbt0105-19 (2005).
- 118 Buzzard, J. J., Gough, N. M., Crook, J. M. & Colman, A. Karyotype of human ES cells during extended culture. *Nat Biotechnol* **22**, 381-382; author reply 382, doi:10.1038/nbt0404-381nbt0404-381 [pii] (2004).
- 119 Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580 (1983).
- 120 Wege, H., Chui, M. S., Le, H. T., Tran, J. M. & Zern, M. A. SYBR Green real-time telomeric repeat amplification protocol for the rapid quantification of telomerase activity. *Nucleic Acids Res* **31**, E3-3 (2003).
- 121 Cawthon, R. M. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res* **37**, e21, doi:gkn1027 [pii]10.1093/nar/gkn1027 (2009).

- 122 Binder, H. & Preibisch, S. "Hook"-calibration of GeneChip-microarrays: Theory and algorithm. *Algorithm Mol Biol* **3**, doi:Artn 12Doi 10.1186/1748-7188-3-12 (2008).
- 123 Kadota, K., Nakai, Y. & Shimizu, K. A weighted average difference method for detecting differentially expressed genes from microarray data. *Algorithm Mol Biol* **3**, doi:Artn 8Doi 10.1186/1748-7188-3-8 (2008).
- 124 Jain, N. *et al.* Local-pooled-error test for identifying differentially expressed genes with a small number of replicated microarrays. *Bioinformatics* **19**, 1945-1951, doi:DOI 10.1093/bioinformatics/btg264 (2003).
- 125 Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15545-15550, doi:0506580102 [pii]10.1073/pnas.0506580102 (2005).
- 126 Tian, L. *et al.* Discovering statistically significant pathways in expression profiling studies. *P Natl Acad Sci USA* **102**, 13544-13549, doi:DOI 10.1073/pnas.0506577102 (2005).
- 127 Unger, C. *et al.* Immortalized human skin fibroblast feeder cells support growth and maintenance of both human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Hum Reprod* **24**, 2567-2581, doi:DOI 10.1093/humrep/dep232 (2009).
- 128 Inzunza, J. *et al.* Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells* **23**, 544-549, doi:DOI 10.1634/stemcells.2004-0201 (2005).
- 129 Tecirliglu, R. T., Nguyen, L., Koh, K., Trounson, A. O. & Michalska, A. E. Derivation and maintenance of human embryonic stem cell line on human adult skin fibroblast feeder cells in serum replacement medium. *In Vitro Cell Dev-An* **46**, 231-235, doi:DOI 10.1007/s11626-010-9278-2 (2010).
- 130 Takahashi, K., Narita, M., Yokura, M., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Human induced pluripotent stem cells on autologous feeders. *PLoS One* **4**, e8067, doi:10.1371/journal.pone.0008067 (2009).
- 131 O'Connor, M. D. *et al.* Alkaline phosphatase-positive colony formation is a sensitive, specific, and quantitative indicator of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells* **26**, 1109-1116, doi:DOI 10.1634/stemcells.2007-0801 (2008).
- 132 Adewumi, O. *et al.* Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* **25**, 803-816, doi:Doi 10.1038/Nbt1318 (2007).
- 133 Van Tendeloo, V. F. *et al.* Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood* **98**, 49-56 (2001).
- 134 Gore, A. *et al.* Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* **471**, 63-67, doi:nature09805 [pii]10.1038/nature09805 (2011).
- 135 Bhattacharya, B. *et al.* Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature. *Blood* **103**, 2956-2964, doi:10.1182/blood-2003-09-3314 (2004).
- 136 Efron, B. & Tibshirani, R. On testing the significance of sets of genes. *Annals of Applied Statistics* **1**, 107-129 (2007).
- 137 Warren, L. *et al.* Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* **7**, 618-630, doi:S1934-5909(10)00434-0 [pii]10.1016/j.stem.2010.08.012 (2010).
- 138 Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A. & Bongso, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* **18**, 399-404, doi:10.1038/74447 (2000).
- 139 Forristal, C. E., Wright, K. L., Hanley, N. A., Oreffo, R. O. & Houghton, F. D. Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction* **139**, 85-97, doi:REP-09-0300 [pii]10.1530/REP-09-0300 (2010).
- 140 Schwartz, P. H., Brick, D. J., Nethercott, H. E. & Stover, A. E. Traditional human embryonic stem cell culture. *Methods Mol Biol* **767**, 107-123, doi:10.1007/978-1-61779-201-4_8 (2011).
- 141 Ludwig, T. E. *et al.* Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol* **24**, 185-187, doi:nbt1177 [pii]10.1038/nbt1177 (2006).
- 142 Schwartz, P. H. & Wesselschmidt, R. L. *Human pluripotent stem cells : methods and protocols.* (Humana ; Springer, 2011).
- 143 Ezashi, T., Das, P. & Roberts, R. M. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4783-4788, doi:0501283102 [pii]10.1073/pnas.0501283102 (2005).
- 144 Amit, M. & Itskovitz-Eldor, J. *Atlas of human pluripotent stem cells : derivation and culturing.* (Humana Press, 2012).
- 145 Hussein, S. M. *et al.* Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* **471**, 58-62, doi:nature09871 [pii]10.1038/nature09871 (2011).
- 146 Laurent, L. C. *et al.* Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell* **8**, 106-118, doi:S1934-5909(10)00698-3 [pii]10.1016/j.stem.2010.12.003 (2011).
- 147 Rosler, E. S. *et al.* Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev Dyn* **229**, 259-274, doi:10.1002/dvdy.10430 (2004).
- 148 Eiselleova, L. *et al.* Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells. *Int J Dev Biol* **52**, 353-363, doi:DOI 10.1387/ijdb.082590le (2008).
- 149 Lanner, F. & Rossant, J. The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Development* **137**, 3351-3360, doi:Doi 10.1242/Dev.050146 (2010).
- 150 Greber, B., Lehrach, H. & Adjaye, J. Silencing of core transcription factors in human EC cells highlights the importance of autocrine FGF signaling for self-renewal. *Bmc Dev Biol* **7**, doi:Artn 46Doi 10.1186/1471-213x-7-46 (2007).

- 151 Prigione, A., Fauler, B., Lurz, R., Lehrach, H. & Adjaye, J. The Senescence-Related Mitochondrial/Oxidative Stress Pathway is Repressed in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells* **28**, 721-733, doi:Doi 10.1002/Stem.404 (2010).
- 152 Mohyeldin, A., Garzon-Muvdi, T. & Quinones-Hinojosa, A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* **7**, 150-161, doi:S1934-5909(10)00341-3 [pii]10.1016/j.stem.2010.07.007 (2010).
- 153 Szablowska-Gadomska, I., Zayat, V. & Buzanska, L. Influence of low oxygen tensions on expression of pluripotency genes in stem cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **71**, 86-93, doi:7108 [pii] (2011).
- 154 Yoshida, Y., Takahashi, K., Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **5**, 237-241, doi:S1934-5909(09)00385-3 [pii]10.1016/j.stem.2009.08.001 (2009).
- 155 Park, I. H. *et al.* Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* **451**, 141-146, doi:nature06534 [pii]10.1038/nature06534 (2008).
- 156 Hanna, J. *et al.* Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* **462**, 595-U563, doi:Doi 10.1038/Nature08592 (2009).
- 157 Brambrink, T. *et al.* Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* **2**, 151-159, doi:DOI 10.1016/j.stem.2008.01.004 (2008).
- 158 Chan, E. M. *et al.* Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. *Nat Biotechnol* **27**, 1033-1037, doi:nbt.1580 [pii]10.1038/nbt.1580 (2009).
- 159 Mathew, R. *et al.* Robust activation of the human but not mouse telomerase gene during the induction of pluripotency. *FASEB J* **24**, 2702-2715, doi:fj.09-148973 [pii]10.1096/fj.09-148973 (2010).
- 160 Buganim, Y. *et al.* Single-Cell Expression Analyses during Cellular Reprogramming Reveal an Early Stochastic and a Late Hierarchic Phase. *Cell* **150**, 1209-1222, doi:10.1016/j.cell.2012.08.023S0092-8674(12)01021-5 [pii] (2012).
- 161 Matsui, T. *et al.* Neural Stem Cells Directly Differentiated from Partially Reprogrammed Fibroblasts Rapidly Acquire Gliogenic Competency. *Stem Cells* **30**, 1109-1119, doi:Doi 10.1002/Stem.1091 (2012).
- 162 Lee, K. M., Choi, K. H. & Ouellette, M. M. Use of exogenous hTERT to immortalize primary human cells. *Cytotechnology* **45**, 33-38, doi:Doi 10.1007/10.1007/S10616-004-5123-3 (2004).
- 163 Rawadi, G., Vayssiere, B., Dunn, F., Baron, R. & Roman-Roman, S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res* **18**, 1842-1853, doi:10.1359/jbmr.2003.18.10.1842 (2003).
- 164 Karp, J. M. *et al.* Cultivation of human embryonic stem cells without the embryoid body step enhances osteogenesis in vitro. *Stem Cells* **24**, 835-843, doi:DOI 10.1634/stemcells.2005-0383 (2006).
- 165 Stolzing, A., Jones, E., McGonagle, D. & Scutt, A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev* **129**, 163-173, doi:S0047-6374(07)00179-0 [pii]10.1016/j.mad.2007.12.002 (2008).
- 166 Dienelt, A. & zur Nieden, N. I. Hyperglycemia impairs skeletogenesis from embryonic stem cells by affecting osteoblast and osteoclast differentiation. *Stem Cells Dev* **20**, 465-474, doi:10.1089/scd.2010.0205 (2011).
- 167 Singh, U. *et al.* Novel live alkaline phosphatase substrate for identification of pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev* **8**, 1021-1029, doi:10.1007/s12015-012-9359-6 (2012).
- 168 Hay, D. C. *et al.* Direct differentiation of human embryonic stem cells to hepatocyte-like cells exhibiting functional activities. *Cloning Stem Cells* **9**, 51-62, doi:10.1089/clo.2006.0045 (2007).
- 169 Oldershaw, R. A. *et al.* Directed differentiation of human embryonic stem cells toward chondrocytes. *Nat Biotechnol* **28**, 1187-1194, doi:nbt.1683 [pii]10.1038/nbt.1683 (2010).
- 170 Shi, Y., Kirwan, P. & Livesey, F. J. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. *Nat Protoc* **7**, 1836-1846, doi:10.1038/nprot.2012.116nprot.2012.116 [pii] (2012).
- 171 Kim, K. *et al.* Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* **29**, 1117-1119, doi:Doi 10.1038/Nbt.2052 (2011).
- 172 Kajiwara, M. *et al.* Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 12538-12543, doi:10.1073/pnas.12099791091209979109 [pii] (2012).
- 173 Hu, B. Y. *et al.* Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 4335-4340, doi:0910012107 [pii]10.1073/pnas.0910012107 (2010).
- 174 Mockey, M. *et al.* mRNA transfection of dendritic cells: synergistic effect of ARCA mRNA capping with Poly(A) chains in cis and in trans for a high protein expression level. *Biochem Biophys Res Commun* **340**, 1062-1068, doi:S0006-291X(05)02863-9 [pii]10.1016/j.bbrc.2005.12.105 (2006).
- 175 Holtkamp, S. *et al.* Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood* **108**, 4009-4017, doi:DOI 10.1182/blood-2006-04-015024 (2006).
- 176 Saeboe-Larssen, S., Fossberg, E. & Gaudernack, G. mRNA-based electrotransfection of human dendritic cells and induction of cytotoxic T lymphocyte responses against the telomerase catalytic subunit (hTERT). *J Immunol Methods* **259**, 191-203, doi:S0022175901005063 [pii] (2002).
- 177 Ponsaerts, P. *et al.* Messenger RNA electroporation is highly efficient in mouse embryonic stem cells: successful FLPe- and Cre-mediated recombination. *Gene Ther* **11**, 1606-1610, doi:10.1038/sj.gt.33023423302342 [pii] (2004).

- 178 Baharvand, H. *et al.* Human-induced pluripotent stem cells: derivation, propagation, and freezing in serum- and feeder layer-free culture conditions. *Methods Mol Biol* **584**, 425-443, doi:10.1007/978-1-60761-369-5_23 (2010).
- 179 Meissner, A., Wernig, M. & Jaenisch, R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* **25**, 1177-1181, doi:nbt1335 [pii]10.1038/nbt1335 (2007).
- 180 Fan, X. *et al.* hTERT gene amplification and increased mRNA expression in central nervous system embryonal tumors. *Am J Pathol* **162**, 1763-1769, doi:S0002-9440(10)64311-8 [pii]10.1016/S0002-9440(10)64311-8 (2003).
- 181 Horikawa, I. & Barrett, J. C. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms. *Carcinogenesis* **24**, 1167-1176, doi:DOI 10.1093/carcin/bgg085 (2003).
- 182 Kim, J. B. *et al.* Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* **461**, 649-U693, doi:Doi 10.1038/Nature08436 (2009).
- 183 Lagarkova, M. A. *et al.* Induction of pluripotency in human endothelial cells resets epigenetic profile on genome scale. *Cell Cycle* **9**, 937-946 (2010).
- 184 Cheung, A. Y. L. *et al.* Isolation of MECP2-null Rett Syndrome patient hiPS cells and isogenic controls through X-chromosome inactivation. *Human Molecular Genetics* **20**, 2103-2115, doi:Doi 10.1093/Hmg/Ddr093 (2011).
- 185 Armstrong, L. *et al.* Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines Show Stress Defense Mechanisms and Mitochondrial Regulation Similar to Those of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* **28**, 661-673, doi:Doi 10.1002/Stem.307 (2010).
- 186 Yu, F. *et al.* Kruppel-like factor 4 (KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion. *Oncogene* **30**, 2161-2172, doi:Doi 10.1038/Onc.2010.591 (2011).
- 187 Allegrucci, C. & Young, L. E. Differences between human embryonic stem cell lines. *Hum Reprod Update* **13**, 103-120, doi:dml041 [pii]10.1093/humupd/dml041 (2007).
- 188 Guenther, M. G. *et al.* Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **7**, 249-257, doi:10.1016/j.stem.2010.06.015S1934-5909(10)00330-9 [pii] (2010).
- 189 Newman, A. M. & Cooper, J. B. Lab-specific gene expression signatures in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **7**, 258-262, doi:10.1016/j.stem.2010.06.016S1934-5909(10)00331-0 [pii] (2010).
- 190 Boue, S., Paramonov, I., Barrero, M. J. & Izpisua Belmonte, J. C. Analysis of human and mouse reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. What is in the plate? *PLoS One* **5**, doi:10.1371/journal.pone.0012664e12664 [pii] (2010).
- 191 Bock, C. *et al.* Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell* **144**, 439-452, doi:S0092-8674(10)01524-2 [pii]10.1016/j.cell.2010.12.032 (2011).
- 192 Shay, J. W. & Wright, W. E. Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 577-584, doi:nrd2081 [pii]10.1038/nrd2081 (2006).
- 193 Greider, C. W. & Blackburn, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* **43**, 405-413, doi:0092-8674(85)90170-9 [pii] (1985).
- 194 Marion, R. M. *et al.* Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **4**, 141-154, doi:S1934-5909(09)00002-2 [pii]10.1016/j.stem.2008.12.010 (2009).
- 195 Suhr, S. T. *et al.* Telomere dynamics in human cells reprogrammed to pluripotency. *PLoS One* **4**, e8124, doi:10.1371/journal.pone.0008124 (2009).
- 196 Yehezkel, S. *et al.* Reprogramming of telomeric regions during the generation of human induced pluripotent stem cells and subsequent differentiation into fibroblast-like derivatives. *Epigenetics-Uk* **6**, 63-75, doi:DOI 10.4161/epi.6.1.13390 (2011).
- 197 Yu, J. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences (vol 324, pg 797, 2009). *Science* **324**, 1266-1266 (2009).
- 198 Zhou, H. Y. *et al.* Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins. *Cell Stem Cell* **4**, 381-384, doi:DOI 10.1016/j.stem.2009.04.005 (2009).
- 199 Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K. & Hasegawa, M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **85**, 348-362, doi:JST.JSTAGE/pjab/85.348 [pii] (2009).
- 200 Yates, J., Warren, N., Reisman, D. & Sugden, B. A Cis-Acting Element from the Epstein-Barr Viral Genome That Permits Stable Replication of Recombinant Plasmids in Latently Infected-Cells. *P Natl Acad Sci-Biol* **81**, 3806-3810 (1984).
- 201 Sivachandran, N., Sarkari, F. & Frappier, L. Epstein-Barr nuclear antigen 1 contributes to nasopharyngeal carcinoma through disruption of PML nuclear bodies. *PLoS Pathog* **4**, e1000170, doi:10.1371/journal.ppat.1000170 (2008).
- 202 Inoue, M. *et al.* p53 protein transduction therapy: Successful targeting and inhibition of the growth of the bladder cancer cells. *Eur Urol* **49**, 161-168, doi:DOI 10.1016/j.eururo.2005.08.019 (2006).
- 203 Michiue, H. *et al.* The NH2 terminus of influenza virus hemagglutinin-2 subunit peptides enhances the antitumor potency of polyarginine-mediated p53 protein transduction. *J Biol Chem* **280**, 8285-8289, doi:DOI 10.1074/jbc.M412430200 (2005).
- 204 Wadia, J. S. & Dowdy, S. F. Protein transduction technology. *Curr Opin Biotech* **13**, 52-56 (2002).
- 205 Noguchi, H., Matsushita, M., Kobayashi, N., Levy, M. F. & Matsumoto, S. Recent Advances in Protein Transduction Technology. *Cell Transplantation* **19**, 649-654, doi:Doi 10.3727/096368910x508744 (2010).
- 206 Kim, D. *et al.* Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins. *Cell Stem Cell* **4**, 472-476, doi:DOI 10.1016/j.stem.2009.05.005 (2009).

6 Literaturangaben

- 207 Lee, J. *et al.* Activation of innate immunity is required for efficient nuclear reprogramming. *Cell* **151**, 547-558, doi:10.1016/j.cell.2012.09.034S0092-8674(12)01181-6 [pii] (2012).
- 208 Seki, T. *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell* **7**, 11-14, doi:10.1016/j.stem.2010.06.003S1934-5909(10)00285-7 [pii] (2010).
- 209 Drews, K. *et al.* The cytotoxic and immunogenic hurdles associated with non-viral mRNA-mediated reprogramming of human fibroblasts. *Biomaterials* **33**, 4059-4068, doi:S0142-9612(12)00201-3 [pii]10.1016/j.biomaterials.2012.02.025 (2012).
- 210 Yakubov, E., Rechavi, G., Rozenblatt, S. & Givol, D. Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochem Bioph Res Co* **394**, 189-193, doi:DOI 10.1016/j.bbrc.2010.02.150 (2010).
- 211 Tavernier, G. *et al.* Activation of pluripotency-associated genes in mouse embryonic fibroblasts by non-viral transfection with in vitro-derived mRNAs encoding Oct4, Sox2, Klf4 and cMyc. *Biomaterials* **33**, 412-417, doi:S0142-9612(11)01138-0 [pii]10.1016/j.biomaterials.2011.09.062 (2012).
- 212 Warren, L., Ni, Y., Wang, J. & Guo, X. Feeder-free derivation of human induced pluripotent stem cells with messenger RNA. *Sci Rep* **2**, 657, doi:10.1038/srep00657 (2012).
- 213 O'Neill, L. A. J. "Transflammation": When Innate Immunity Meets Induced Pluripotency. *Cell* **151**, 471-473, doi:DOI 10.1016/j.cell.2012.10.006 (2012).
- 214 Mah, N. *et al.* Molecular Insights into Reprogramming-Initiation Events Mediated by the OSKM Gene Regulatory Network. *PLoS One* **6**, doi:ARTN e24351DOI 10.1371/journal.pone.0024351 (2011).
- 215 Hayashi, T., Lamba, D. A., Slowik, A., Reh, T. A. & Bermingham-McDonogh, O. A Method for Stabilizing RNA for Transfection That Allows Control of Expression Duration. *Dev Dynam* **239**, 2034-2040, doi:Doi 10.1002/Dvdy.22344 (2010).
- 216 Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45 (2001).

7 Anhang

7.1 Technische Ausstattung und Zubehör

Tab. 7.1: Technische Ausstattung und Zubehör

Gerät/Zubehör	Hersteller/Bezugsquelle
Abzug	Schneider
Agarosegelelektrophorese-Zubehör (Gelschlitten, Gelkämme)	BIO-RAD
Begasungsinubator für Zellkulturen Steri-Cycle CO ₂ -Inkubator HEPA Class 100	Thermo Scientific
Bestrahlungsgerät für Zellmaterial Typ IBL 437C	CIS Bio International, Gif-sur-Yvette
Bioanalyser 2000	Agilent Technologies
Brutschrank für Bakterienkulturen	Heraeus
Durchflusszytometer FACSCaliburTM	Becton Dickinson
Einfrierbox „Mr. Frosty“	Nalgene
Filterpipettenspitzen	Greiner Bio-one
Fluoreszenzmikroskop, invers	Leica
Gelkammern 400911	peQlab
Gelkammern Mini PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad
GelLogic 1500 System	Kodak
Kühlgeräte 4 °C/-20 °C-Kombination -80 °C-Tiefkühlschrank	LIEBHERR LIEBHERR
Laborschüttler DuoMAX 1030	Heidolph
LightCycler 480	Roche
Magnetrührer und Magnetrührstäbchen	neoLab
Mikroskop, invers, für die Zellkultur	Leica
Mikrowelle	LG
Neubauer Zählkammer	Laborbedarf A. Hartenstein
PCR-Cycler, Thermocycler T Professional	Biometra
Photometer SmartSpecTM 3000 (Bakterienkulturen) Nanodrop (Nukleinsäure-Konzentration) Qubit™ -Fluorometer (Protein-Konzentration)	BIO-RAD ThermoScientific Life Technologies
Pipetten	Gilson, ABIMED
Pipettierhilfe „pipetus®-akku“	Eppendorf
Präzisionswaage	Sartorius
Reaktionsgefäßständer (diverse Größen)	Carl Roth GmbH & Co
Reinstwasseranlage „Milli-Q synthesis A10“	Millipore

Schüttelinkubator 3031	GFL
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Thermo Scientific
Stromversorgungseinheit EV231	peQlab
Tecan Infinite M1000 Plattenleser	Tecan
Thermocycler T Professional	Biometra
Vakuumpumpe	HLC
Vortexer® „Vortex-Genie 2“	Scientific Industries
Waage	Sartorius
Wärmeblock Thermomixer comfort	Eppendorf
Wasserbad	JB Series Grant
Zentrifugen Heraeus Multifuge 3SR+ (Rotor 75006445) Kühlzentrifuge 5415R (Rotor F-45-24-11) Vakuumzentrifuge Speed Vac® SPD111V	ThermoScientific Eppendorf Savant

7.2 Verbrauchsmaterial und Hilfsmittel

Tab. 7.2: Material und Hilfsmittel

Material/Hilfsmittel	Hersteller/Bezugsquelle
Agilent-RNA-6000-Chip	Agilent Technologies
Bakteriologische Schalen 10 cm	Greiner Bio-one
Elektroporationsgerät Nucleofactor I	Lonza
Gewebekulturflaschen, 25 cm ² , 75 cm ²	Greiner Bio-one
Gewebekulturschalen 3,5 cm, 6 cm, 10 cm	Falcon BD
Gewebekulturplatten 6-Well, 24-Well, 96-Well	Falcon BD
Glasflaschen (diverse Größen)	Biochrom KG Berlin
Kryoröhrchen, steril, 2 ml	Greiner Bio-one
Küvetten, Kunststoff	Laborfachhandel Dr. Ilona Schubert
Meßzylinder (diverse Größen)	BRAND
Mikrotiterplatten für ELISA (hoch bindend, Flachboden)	Nunc
Parafilm	American National Can TM
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	Greiner Bio-one
Pinzetten	A. Dumont & Fils
Pipettenspitzen (diverse Größen)	Greiner Bio-one
Pipettenspitzen mit Filter (diverse Größen)	Greiner Bio-one
Polypropylen-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-one
qPCR-Platten für LightCycler 480	Roche
Rasierklingen	Wilkinson

Reaktionsgefäße 0,5ml/1,5ml/2ml	Greiner Bio-one
Rundbodenröhrchen, Polystyrol, 5 ml (FACS-Röhrchen)	BD Biosciences
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Falcon BD
Skalpelle	Carl Roth GmbH & Co
Spritzen 25 ml, 60 ml	BD Biosciences
Spritzenvorsatzfilter, Zellulose-Acetat, 0,2 µm	Sigma Aldrich
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Greiner Bio-one
Zellkulturplatten 96-Well, 24-Well, 6-Well	Greiner Bio-one

7.3 Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Lösungen

Tab. 7.3: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenz	Hersteller/Bezugsquelle
Agar	Sigma Aldrich
AEBSF ((4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochlorid)	Sigma Aldrich
Agarose (universal electrophoresis grade)	peQLab
Alizarin Red S	Sigma-Aldrich
Ampicillin (50 mg/ml in H ₂ O)	Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich
Calciumchlorid-Dihydrat	MERCK
Chloroform	VWR
DAPI	Sigma Aldrich
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka
Dimethylformamid	Carl Roth GmbH & Co
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
Eisessig	VWR
Essigsäure	VWR
Ethanol absolut	VWR
Ethanol 96%ig vergällt	VWR
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma Aldrich
3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid (Ethidiumbromid)	Carl Roth GmbH & Co
FACS-Flow	Becton Dickinson
FACS-Rinse	Becton Dickinson
FACS-Safe	Becton Dickinson
Fast Red	Sigma Aldrich
Fetales Kälberserum (FKS)	Hyclone

Gelatine (von Schweinehaut, Typ A)	Sigma Aldrich
Glycerin (Glycerol)	Carl Roth GmbH & Co
Isopropanol	VWR
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH & Co
Kaliumchlorid	Sigma Aldrich
Kaliumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co
Kollagenase IV	Life Technologies
Ladepuffer 6fach konzentriert „6x Loading Dye Solution“	Thermo Scientific
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	MERCK
Methanol	VWR
MOPS	Sigma Aldrich
Naphthol-As-Biphosphat	Sigma Aldrich
Natriumhydroxid	Sigma Aldrich
Natriumdeoxycholat	Sigma Aldrich
Nonoxinol 40 (NP-40)	Sigma Aldrich
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH & Co
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 10-fach konzentriert, Calcium- und Magnesium-frei, steril für die Zellkultur	Life Technologies
Polybrene (Hexadimethrin Bromid)	Sigma Aldrich
Qubit™ -Arbeitslösung	Life Technologies
Rinderserum Albumin	Sigma Aldrich
RNaseZAP	Sigma Aldrich
Rubidiumchlorid	Fluka
Saponin	Sigma Aldrich
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich
Thiazylblau	Appllichem
TriFAST™	Peqlab
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co
Tween 20	Sigma Aldrich

7.3.1 Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

Tab. 7.4: Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Alkalischer Phosphatasepuffer	in PBS - 0.2 M Tris (pH 7,5) - 50 µg/mL Naphthol-As-Biphosphat

7. Anhang

	- 1 mg/mL Fast Red
Blockpuffer für ELISA	- 1 % BSA in PBS
Block- und Permeabilisierungspuffer für Immunzytochemie	in PBS - 0,1 % Triton X-100 (v/v) - 10 % FKS
Block- und Permeabilisierungspuffer für Durchflusszytometrie	in PBS - 0,5 % Saponin (w/v) - 20 % BSA (w/v)
DAPI- Lösung	- 0,2% (w/v) in 1xPBS
Elektrophorespuffer (Agarosegelelektrophorese)	- 10,0 % TAE Stammlösung (v/v)
FACS-Lyselösung	- 10,0 % (v/v) Lyselösung 10-fach
FACS-PBS	- 1,0 % FKS (v/v) in PBS
Fixativlösung (Karyotyp)	- 75 % Methanol - 25 % Eisessig
Gelatin-Lösung	- 0,1 % (w/v) Gelatine in PBS
Kollagenase IV-Lösung	- 1 mg/ml Kollagenase IV in DMEM/F12
Lysispuffer für Telomerasebestimmung	- 10 mM Tris-HCl pH 8.0 - 1 mM MgCl ₂ - 1 mM EDTA - 1 % (v/v) NP-40 - 0,25 mM Natriumdeoxycholat - 10 % (v/v) Glycerin - 150 mM NaCl - 5 mM β-Mercaptoethanol - 0,1 mM AEBSF
MTT-Lösung	- 5 mg/ml Thiazylblau in PBS
MTT-Stopp-Lösung	- 20%ige SDS-Lösung wird 1:2 mit Dimethylformamid vermischt
Natriumhydroxidlösung	- 8 mM Natriumhydroxid in H ₂ O
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	- 1 % PBS Stammlösung (v/v) für Zellkultur aus sterilem, kommerziell verfügbarem PBS (10-fach) in sterilem H ₂ O
PBS Stammlösung (10-fach konzentriert)	- 1,4 M Natriumchlorid - 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat - 0,03 M Kaliumchlorid - 0,02 M Kaliumdihydrogenphosphat
4%ige PFA-Lösung	- 10 g PFA in 400 ml H ₂ O - Zugabe von 10 Tropfen 0,1 M NaOH - lösen bei 60 °C - Zugabe 50 ml 10xPBS - auf 450 ml mit H ₂ O auffüllen - mit 0,1 M HCl auf pH 7,2 einstellen - auf 500 ml mit H ₂ O auffüllen
SDS-Lösung	- 20 % (w/v) in H ₂ O
TAE Stammlösung 50-fach konzentriert	- 2,0 M Tris - 0,1 M EDTA

	- 5,6 % Eisessig (v/v) - pH 8,5 (mit Eisessig)
Transformationspuffer I (Tfp I, Herstellung kompetenter Bakterienzellen)	- 100 mM Rubidiumchlorid - 30 mM Kaliumacetat - 10 mM Calciumchlorid-Dihydrat - 50 mM Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat - 15,0 % Glycerin (v/v) - pH 5,8 (mit Essigsäure)
Transformationspuffer II (Tfp II, Herstellung kompetenter Bakterienzellen)	- 10 mM Calciumchlorid-Dihydrat - 10 mM Rubidiumchlorid - 10 mM MOPS - 3 % Glycerin (v/v) - pH 6,5 (mit Kaliumhydroxid)
Trypsin/EDTA-Lösung	- 0,025 % (v/v) in PBS aus 0,25%iger 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung
Verdünnungspuffer von Antikörpern für ELISA	in PBS - 0,05 % Tween-20 - 0,1 % BSA
Verdünnungspuffer von Primärantikörpern für Durchflusszytochemie	- 0,5% Saponin in PBS
Waschpuffer für Durchflusszytochemie	- 0,5% Saponin in PBS
Waschpuffer für ELISA	- 0,05 % Tween-20 in PBS
Waschpuffer für Immzytochemie	- 0,1 % FKS in PBS

7.4 Standards und Farbstoffe

Tab. 7.5: Standards und Farbstoffe

Standard/Farbstoff	Hersteller/Bezugsquelle
DNA-Größenstandard „Gene Ruler™ Ladder Mix“	Thermo Scientific
Quant-iT™-Proteinkonzentrationsstandardlösung 0 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml	Life Technologies
RNA-Marker	Agilent Technologies
Trypanblau	Life Technologies

7.5 Zellen und Kulturmedien

7.5.1 Zellen und Bakterien

Tab. 7.6: Zellen und Bakterien

Zellen	Bezugsquelle
Escherichia coli XL-10Gold Bakterien	Life Technologie
Phoenix-GP-Zellen	Dr. Brinckmann, Institut für Virologie,

	Universitätsklinikum Leipzig
Fibroblasten von Huntingtonpatienten - Männlicher Spender, 56 Jahre - Weiblicher Spender, 42 Jahre	Dr. Piroth, Institut für stereotaktische Neurochirurgie, Universitätsklinikum Freiburg
Vorhautfibroblasten zur mRNA-iPS-Zellgenerierung und mRNA-Transfektionen - Patienten im Alter von 4, 5, 8 und 11 Jahre	Universitätskinderklinik Leipzig
Vorhautfibroblasten zur Feederzellgenerierung - Patienten im Alter zwischen 4 und 12 Jahren	Kinderklinik Leipzig
HeLa-Zellen	Dr. Brinckmann, Institut für Virologie, Universitätsklinikum Leipzig

7.5.2 Medien und Zusätze

Tab. 7.7: Medien und Zusätze

Medium/Zusatz	Hersteller/Bezugsquelle
B18R (rekombinantes Protein)	eBioscience
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
bFGF2 (human, rekombinantes Protein)	PeptoTECH
Dexamethason	Sigma Aldrich
DMEM mit GluaMAX™ und 1 g/l Glukose	Life Technologies
DMEM mit GluaMAX™ und 4,5 g/l Glukose	Life Technologies
DMEM/F12 mit L-Glutamin	Life Technologies
EGF	Sigma Aldrich
Fötale Kälberserum (FKS)	Hyclone
Hefeextrakt „Bacto™ Yeast Extract“	Sigma Aldrich
HEPES-Lösung 0,1 M	Life Technologies
HGF	Sigma Aldrich
ITS	Sigma Aldrich
KaryoMAX® Colcemid™ Lösung in PBS	Life Technologies
KnockOut™ DMEM	Life Technologies
Knockout™ Serum Replacement	Life Technologies
L-Ascorbinsäure	Sigma Aldrich
Linolsäure	Sigma Aldrich
Mitomycin C	AppliChem
Nicht essentielle Aminosäuren, 100x	Life Technologies
Nicotinamid	Sigma Aldrich
Oncostatin M	Sigma Aldrich
OptiMEM® I	Life Technologies

PBS 10-fach	Life Technologies
Penicillin-Streptomycin-Lösung 100-fach	Life Technologies
Pluriton™ Reprogramming Medium	Stemgent (über Miltenyi Biotec bezogen)
Retinolsäure	Sigma Aldrich
SOC-Medium	Life Technologies
TGF-β	Oncogene Sciences
Trypsin/EDTA (0,25 %)	Life Technologies

7.5.3 Zusammensetzung von Kultivierungsmedien und Induktionsmedien

Tab. 7.8: Zusammensetzung von Kultivierungsmedien und Induktionsmedien

Medium	Zusammenstellung
Chondrozyteninduktionsmedium	<ul style="list-style-type: none"> - DMEM (Glukose: 1 g/l) - 10 % FKS - 50 Units/ml Penicillin - 50 µg/ml Streptomycin - 1 % (v/v) IST - 10⁻⁷ M Dexamethason - 150 µM L-Ascorbinsäure - 20 µM Linolsäure - 0,1 ng/ml TGF-β
Fibroblastenkultivierungsmedium	<ul style="list-style-type: none"> - DMEM (4,5 g/l) - 10 % FKS - 50 Units/ml Penicillin - 50 µg/ml Streptomycin
Fibroblastenreprogrammierungsmedium	<ul style="list-style-type: none"> - DMEM (4,5 g/l) - 10 % FKS - 50 Units/ml Penicillin - 50 µg/ml Streptomycin - 1 % NEAA - 10 ng/ml bFGF2 (human)
EB-Induktionsmedium	<ul style="list-style-type: none"> - DMEM (4,5 g/l) - 10 % FKS - 50 Units/ml Penicillin - 50 µg/ml Streptomycin - 1 % NEAA - 0,1mM β-Mercaptoethanol
HeLa-Kultivierungsmedium	<ul style="list-style-type: none"> - DMEM (4,5 g/l) - 10 % FKS - 50 Units/ml Penicillin - 50 µg/ml Streptomycin
Hepales Vorläuferinduktionsmedium I	<ul style="list-style-type: none"> - DMEM (1 g/l) - 10 % FKS - 50 Units/ml Penicillin - 50 µg/ml Streptomycin - 0,61 g/l Nicotinamid - 8 ng/ml bFGF2 (human) - 20 ng/ml EGF - 10 ng/ml HGF
Hepales Vorläuferinduktionsmedium II	<ul style="list-style-type: none"> - DMEM (4,5 g/l)

	<ul style="list-style-type: none"> - 10 % FKS - 50 Units/ml Penicillin - 50 µg/ml Streptomycin - 1 % (v/v) IST - 10⁻⁸ M Dexamethason - 10 ng/ml Oncostatin M
iPS-Medium	<ul style="list-style-type: none"> - DMEM (4,5 g/l) - 10 % FKS - 50 Units/ml Penicillin - 50 µg/ml Streptomycin - 1 % NEAA - 0,1mM β-Mercaptoethanol - 10 ng/ml bFGF2 (human)
iPS Pluriton™ Medium mit B18B	<ul style="list-style-type: none"> - Pluriton™ Medium - 50 Units/ml Penicillin - 50 µg/ml Streptomycin - 200 ng/ml B18R
iPS Serumersatzmedium	<ul style="list-style-type: none"> - KnockOut™ DMEM - 20 % Knockout™ Serum Replacement - 50 Units/ml Penicillin - 50 µg/ml Streptomycin - 1 % NEAA - 0,1mM β-Mercaptoethanol - 10 ng/ml bFGF2 (human)
LB-Medium	<p>für Flüssigkulturen (in H₂O)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1,0 % Bacto-Trypton - 1,0 % Natriumchlorid - 0,5 % Hefe-Extrakt <p>für Kulturplatten</p> <ul style="list-style-type: none"> - wie Flüssigkulturen, zusätzlich 1,5 % Agar
MEF-Kultivierungsmedium	<ul style="list-style-type: none"> - DMEM (4,5 g/l) - 10 % FKS - 50 Units/ml Penicillin - 50 µg/ml Streptomycin
Neurales Vorläuferinduktionsmedium	<ul style="list-style-type: none"> - DMEM/F12 - 10 % FKS - 50 Units/ml Penicillin - 50 µg/ml Streptomycin - 1 % (v/v) IST - 10⁻⁶ M Retinolsäure - 8 ng/ml bFGF2 (human)
Phoenix-GP-Kultivierungsmedium	<ul style="list-style-type: none"> - DMEM (4,5 g/l) - 10 % FKS - 50 Units/ml Penicillin - 50 µg/ml Streptomycin

7.6 Plasmide

Tab. 7.9: Plasmide

Plasmid	Hersteller/Bezugsquelle
pBabe-c-myc-zeo	Addgene
pBabe-hygro-hTERT	Addgene

pcDNA3_eGFP	Dr. Fabian, Institut für Virologie, Leipzig
pcDNA_cMyc	Dr. Fabian, Institut für Virologie, Leipzig
pcDNA3_hTERT	Dr. Fabian, Institut für Virologie, Leipzig
pHIT G	Dr. Brinckmann, Institut für Virologie, Leipzig
pMXs-Klf4	Addgene
pMXs-hNanog	Addgene
pMXs-hOct3/4	Addgene
pMXs-Sox2	Addgene
pcR11_Oct4	Dr. Fabian, Institut für Virologie, Leipzig
pcR11_Klf4	Dr. Fabian, Institut für Virologie, Leipzig
pRVH1-eGFP	Dr. Brinckmann, Institut für Virologie, Leipzig

7.7 Kits

Tab. 7.10: Kits

Kit	Bezugsquelle
GenElute™ HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kit	Sigma
GenElute™ PCR Clean-Up Kit	Sigma
IFN- β -Mini-ELISA- <i>Development</i> -Kit	PeproTECH
NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey-Nagel
MEGAclean™ Kit	Life Technologies

Tab. 7.11: Transfektionsreagenzien und Transfektionskits

Reagenz/Kit	Bezugsquelle
Fugene® HD	Roche
Fugene® HD	Promega
Human dermal fibroblast Nucleofector® Kit	Lonza
Lipofectamin™ 2000	Life Technologies
PEI-Exgene500 in vitro Transfection Reagent Kit	Thermo Scientific
TransIT®-mRNA Transfection Kit	Mirus

Tab. 7.12: *In Vitro* Transkriptions Kits

Kit	Bezugsquelle
mMESSAGE mMACHINE T7-Kit	Life Technologies
Poly(A) Tailing Kit	Life Technologies

TURBO DNase	Life Technologies
-------------	-------------------

7.8 Enzyme

Tab. 7.13: Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
BamH1	Thermo Scientific
DNase I, Amplification Grade	Life Technologies
Eco0109I	Thermo Scientific
HindIII	Thermo Scientific
LongAmpTaqDNA Polymerase	NEB
NcoI	Thermo Scientific
SuperScript [®] III Reverse Transkriptase-Kit	Life Technologies
SYBR [®] -GreenER [™] qPCR Super Mix Universal	Life Technologies
Xba	Thermo Scientific
XhoI	Thermo Scientific

7.9 Antikörper

Tab. 7.14: Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller/Bezugsquelle
AFP, monoklonal, Maus	1:75	R&D Systems
Aggrecan, monoclonal, Maus	1:50	Acris Antibodies
β-Tubulin III, monoclonal, Maus	1:50	Serotec
Kollagen II, polyclonal, Kaninchen	1:50	Serotec
Zytokeratin 18, polyclonal, Kaninchen	1:500	Abcam
GFAP, polyclonal, Huhn	1:250	Chemicon
Nanog, polyclonal, Kaninchen	1 : 1000	Abcam
Oct4, polyclonal, Kaninchen	1 : 500	Abcam
Sox2, polyclonal, Ziege	1 : 50	Santa Cruz
SSEA3, monoclonal, Ratte	1 : 100	R&D
SSEA4, monoclonal, Maus	1 : 150	R&D
Tra-1-60, monoclonal, Maus	1 : 50	R&D
Alexa-Fluor 488 Ziege anti-Kaninchen	1:1000	Life Technologies
Alexa-Fluor 488 Esel anti-Ziege	1:1000	Life Technologies
Alexa-Fluor 488 Ziege anti-Huhn	1:1000	Life Technologies
Alexa-Fluor 488 Ziege anti-Maus	1:1000	Life Technologies

Alexa-Fluor 546 Esel anti-Maus	1:500	Life Technologies
Alexa-Fluor 546 Ziege anti-Huhn	1:500	Life Technologies
Alexa-Fluor 546 Ziege anti-Ratte	1:500	Life Technologies

7.10 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden über metabion bezogen. Primersequenzen für die qPCR wurden mittels Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>). Primereffizienzen wurden in der qPCR nach Erstellung einer Verdünnungsreihe und anschließender Auswertung nach Pfaffl²¹⁶ bestimmt. Soweit nicht anders angegeben besitzen alle verwendeten Primer eine T_m von 60°C. Die Primer für die Telomerlängenbestimmung (Telc und Telg) wurden nach R. Cawthon (2009)¹²¹ und Telomeraseprimer ACX und TC nach Wege et. al (2003)¹²⁰ verwendet. Für die RT-PCR wurden die Oligo(dT)18-Primer von Thermo Scientific bezogen.

Tab. 7.15: Primer

Primername	Sequenz (5' zu 3')	T _m
human cMyc vorwärts	CTTCTCTGAAAGGCTCTCCTTG	60 °C
human cMyc rückwärts	CGAGGTCATAGTTCCTGTTGGT	60 °C
human GAPDH vorwärts	GCAGGGGGGAGCCAAAAGGGT	60 °C
human GAPDH rückwärts	TGGGTGGCAGTGATGGCATGG	60 °C
human Klf4 vorwärts	CGGCAAACCTACACAAAGAG T	60 °C
human Klf4 rückwärts	GTCCCAGTCACAGTGGTAAGGT	60 °C
human Nanog vorwärts	AGTAAAGGCTGGGGTAGGTAGG	60 °C
human Nanog rückwärts	TCCTGAACCTCAGCTACAAACA	60 °C
human Oct4 vorwärts	GAGGATCACCTGGGATATACA	60 °C
human Oct4 rückwärts	CGATACTGGTTCGCTTTCTCTT	60 °C
human Sox2 vorwärts	CAAGATGCACAACCTCGGAGATCAG	60 °C
human Sox2 rückwärts	GGGCAGCGTGTACTTATCCTTCTTC	60 °C
human 36B4 vorwärts	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC	60 °C
human 36B4 rückwärts	CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA	60 °C
Telomeraseaktivität_ACX	GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACC	60 °C
Telomeraseaktivität_TS	AATCCGTCGAGCAGAGTT	60 °C
Telomerlänge_Telc	TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTAA CA	62 °C
Telomerlänge_Telg	ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTAGTGT	49 °C
IVT_hTERT_Esp3l/Spel- rückwärts	CGTCTCACTAGTTCAGTCCAGGATGGTCTTGAAGTCTG	60 °C
IVT_T7	TAATACGACTCACTATAGGG	60 °C

7.11 Darstellung von Vorlagen für die *in vitro* Transkription

7.11.1 Linearisierung von IVT_Plasmiden als Vorlage für die IVT

Tab. 7.16: Restriktionsverdaubedingungen zur Linearisierung der IVT_Plasמידe

Plasmid	Restriktionsenzym	Plasmidgröße	Inkubations-temperatur	Inaktivierungs-temperatur
pcDNA3_hcMyc	NcoI	6817 Bp	37 °C	65 °C
pcDNA3_eGFP	Eco0109I	6259 Bp	37 °C	65 °C
pcDNA3_hNanog	XhoI	6346 Bp	37 °C	80 °C
pcDNA3_hTERT	Xba	8831 Bp	37 °C	65 °C
pcR11_hKlf4	HindIII	5417 Bp	37 °C	80 °C
pcR11_hOct4	BamH1	5087 Bp	37 °C	80 °C
pcR11_hSox2	HindIII	4949 Bp	37 °C	80 °C

Nach folgendem allgemeinem Schema wurden die Restriktionsansätze pipettiert.

Tab. 7.17: Allgemeines Pipettierschema zum Restriktionsverdau der IVT_Plasמידe

Restriktionsverdau-Reagenz	Reaktionsansatz [50 µl]
Puffer (10x, Restriktionsenzym-spezifisch)	10 µl
Enzym (10 U/µl)	5 µl
Plasmid (2,5 µg)	X µl
DEPC-H ₂ O	auf 50 µl auffüllen

Der jeweilige Gesamtansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inaktivierung für 20 min bei der entsprechend notwendigen Temperatur (vgl. spezifische Bedingungen Tab. 7.10)

7.11.2 PCR-Produkt als Vorlage für die IVT

Als Alternative können für die IVT aufgereinigte PCR-Produkte eingesetzt werden. Die Möglichkeit der PCR-Amplifikation wurde für das IVT-Plasmid pcDNA3_hTERT gewählt. Es wurde mit der *LongAmpTaq*DNA Polymerase (NEB) gearbeitet, da diese Polymerase für sehr lange PCR-Produkte eine fehlerfreie Amplifikation gewährt.

Tab. 7.18: PCR-Pipettierschema zur Amplifikation des PCR-Produktes hTERT

PCR-Reagenz	Reaktionsansatz [50 µl]
Primer (IVT_hTERT_Esp3I/Spel rückwärtst) (10 pmol/µl)	2 µl
Primer (IVT_T7) (10 pmol/µl)	2 µl
dNTPs (10 mM jeweils)	1,5 µl
5x Puffer ohne MgSO ₄	10 µl
MgSO ₄ (100 mM)	1 µl

LongAmp <i>Taq</i> DNA Polymerase (2,5 U/ μ l)	1 μ l
Plasmid (1 ng/ μ l)	10 μ l
DEPC-H ₂ O	22,5 μ l

Tab. 7.19: PCR-Reaktionsbedingungen für die Amplifikation von hTERT

Reaktion	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Denaturierung	95 °C	60 s	1
Denaturierung	95 °C	30 s	35
Primer- <i>Annealing</i>	55 °C	30 s	
Elongation	68 °C	240 s	
Elongation	68 °C	60 s	1
Kühlung	10 °C	variabel	1

7.12 DNase I-Verdau und RT-PCR

7.12.1 DNase I-Verdau

Die isolierte Gesamt-mRNA wurde durch einen DNase I-Verdau von möglichen gDNA-Kontaminationen befreit.

Tab. 7.20: Pipettierschema des DNase I Verdau

DNase I-Reagenz	Reaktionsansatz [50 μ l]
DNase I-Puffer (10x)	1 μ l
DNase I, <i>Amplification Grade</i> (1 U/ μ l)	1 μ l
RNA (1 μ g)	X μ l
DEPC-H ₂ O	auf 10 μ l auffüllen

Der Reaktionsansatz wurde für 15 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 1 μ l EDTA (25 mM) und Inkubation für 10 min bei 65°C wurde der Reaktionsansatz inaktiviert und auf Eis gelagert für die anschließende cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase PCR (RT-PCR).

7.12.2 RT-PCR

Es wurde direkt im Anschluss an den DNase I Verdau (vgl. 7.10.1) weitergearbeitet

Tab. 7.21: Pipettierschema der Prä-Annealing RT-PCR-Reaktion

Reagenzien zur Prä-Annealing	Reaktionsansatz [13 μ l]
Oligo(dT)18-Primer	1 μ l
dNTPs	1 μ l
DNase I RNA Ansatz	10 μ l

DEPC-H ₂ O	1 µl
-----------------------	------

Der Ansatz wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert und für 1 min auf Eis gekühlt.

Tab. 7.22: Pipettierschema der RT-PCR

SuperScript™ III RT-Kit-Reagenz	Reaktionsansatz [20 µl]
Puffer (5x)	4 µl
DTT (0,1 M)	1 µl
SuperScript™ III RT (200 U/µl)	1 µl
DEPC-H ₂ O	1 µl

Im PCR-Cycler wurde der RT-Ansatz für 1 h bei 50°C Inaktivierung gefolgt von 15 min bei 70°C und bei 4 °C gelagert. Die cDNA wurde Im Folgenden wurde die cDNA für die weitere Verwendung in der qPCR 1:10 mit DEPC-H₂O verdünnt.

7.13 qPCR zur Expressionsbestimmung der Pluripotenzfaktoren

Die qPCR wurde am LightCycler 480 durchgeführt (vgl. 3.2.10.2)

Tab. 7.23: Pipettierschema für die qPCR

PCR-Reagenz	Reaktionsansatz [20 µl]
Primer (vorwärts) (10 pmol/µl)	0,5 µl
Primer (rückwärts) (10 pmol/µl)	0,5 µl
SYBR-Green-Mastermix	10 µl
cDNA-Template (1:10 verdünnt)	1 µl
DEPC-H ₂ O	8,2 µl

Tab. 7.24: qPCR-Reaktionsbedingungen

Reaktion	Temperatur	Zeit	Slope (°C/s)	Zyklenzahl
Denaturierung	95 °C	5 min	20	1
Denaturierung	95 °C	10 s	20	35
Primer-Annealing	60 °C	10 s	20	
Elongation	72 °C (eine Fluoreszenzmessung)	10 s	20	
Schmelzkurve	95 °C	30 s	20	1
	60 °C	60 s	20	
	95 C (kontinuierliche Fluoreszenzmessung)			
Kühlung	40 °C	variabel	20	1

7.14 Telomeraseaktivitätsbestimmung mittels qPCR

Die Aktivität der Telomerase wurden am LightCycler 480 bestimmt (vgl. 3.3.9.1).

Tab. 7.25: Pipettierschema für Telomeraseaktivitätsbestimmung mit Hilfe der qPCR

PCR-Reagenz	Reaktionsansatz [20 µl]
Primer (ACX) (10 pmol/µl)	0,4 µl
Primer (TS) (10 pmol/µl)	0,4 µl
SYBR-Green-Mastermix	10 µl
Proteinextrakt (1 µg)	1 µl
DEPC-H ₂ O	8,2 µl

Tab. 7.26: qPCR-Reaktionsbedingungen zur Ermittlung der Telomeraseaktivität

Reaktion	Temperatur	Zeit	Slope (°C/s)	Zyklenzahl
Denaturierung	95 °C	10 min	20	1
Denaturierung	95 °C	30 s	20	40
Primer-Annealing	60 °C	30 s	20	
Elongation	72 °C (eine Fluoreszenzmessung)	60 s	20	
Schmelzkurve	95 °C	30 s	20	1
	60 °C	60 s	20	
	95 C (kontinuierliche Fluoreszenzmessung)			
Kühlung	40 °C	variabel	20	1

7.15 Telomerlängenbestimmung mittels qPCR

Die Telomerlängen wurden am LightCycler 480 bestimmt (vgl. 3.3.9.2).

Tab. 7.27: Pipettierschema zur Telomerlängenbestimmung mit Hilfe einer qPCR

PCR-Reagenz	Reaktionsansatz [20 µl]
Primer (Telc) (10 pmol/µl)	0,4 µl
Primer (Telg) (10 pmol/µl)	0,4 µl
SYBR-Green-Mastermix	10 µl
DMSO (1%ig)	0,2 µl
gDNA (14 ng)	1 µl
DEPC-H ₂ O	8 µl

Tab. 7.28: qPCR-Reaktionsbedingungen für die Telomerlängenbestimmung mittels qPCR

Reaktion	Temperatur	Zeit	Slope (°C/s)	Zyklenzahl
Denaturierung	95 °C	15 min	20	1
<i>Annealing</i> Telg-Primer	94 °C 49 °C	15 s 15 s	20 20	2
Denaturierung Telc-Primer- <i>Annealing</i> Elongation	94 °C 62 °C 72 °C (eine Fluoreszenzmessung)	15 s 15 s 15 s	20 20 20	50
Schmelzkurve	94 °C 60 °C 95 °C (kontinuierliche Fluoreszenzmessung)	30 s 60 s	20 20	1
Kühlung	40 °C	variabel	20	1

Tab. 7.29: Pipettierschema für humanes 36B4 als Referenzgen zur Telomerlängenbestimmung

PCR-Reagenz	Reaktionsansatz [20 µl]
Primer (human 36B4 vorwärts) (10 pmol/µl)	0,4 µl
Primer human 36B4 rückwärts) (10 pmol/µl)	0,4 µl
SYBR-Green-Mastermix	10 µl
DMSO (1%ig)	0,2 µl
gDNA (14 ng)	1 µl
DEPC-H ₂ O	8 µl

Tab. 7.30: PCR-Bedingung für humanes 36B4 als Referenzgen zur Telomerlängenbestimmung

Reaktion	Temperatur	Zeit	Slope (°C/s)	Zyklenzahl
Denaturierung	95 °C	15 min	20	1
Denaturierung Primer- <i>Annealing</i> Elongation	94 °C 60 °C 72 °C (eine Fluoreszenzmessung)	15 s 15 s 15 s	20 20 20	40
Schmelzkurve	94 °C 60 °C 95 °C (kontinuierliche Fluoreszenzmessung)	30 s 60 s	20 20	1
Kühlung	40 °C	variabel	20	1

7. 16 Gene-Array-Daten des Dreiklassenvergleichs

Tab. 7.31: Daten des Dreiklassenvergleichs der potenziellen mRNA-iPS-Zellen zu den Fibroblasten des männlichen Huntingtonpatienten.

Anzahl	Expressionsänderung	Gene Symbol
1	7.6	USP53
2	3.8	SLC38A2
3	351.8	NA
4	4.4	FAT1
5	2.8	NA
6	74.5	NA
7	7.4	ALDH3A2
8	186.5	MBL1P1
9	139.6	SPRY1
10	146.6	NA
11	74.8	KCNJ2
12	84.5	FGF9
13	4.2	EIF4B
14	62.0	BMP4
15	3.9	PCDH18
16	153.6	NA
17	37.7	PLEKHG1
18	3.5	NA
19	14.6	EXPH5
20	4.6	SLC12A2
21	3.7	ATL3
22	3.8	FNIP1
23	60.6	NA
24	18.2	CLK4
25	25.3	FAM110B
26	63.2	NA
27	2.1	CSDE1
28	4.9	PRICKLE1
29	2.8	NA
30	3.2	NCOA3
31	78.4	NA
32	13.7	C5orf41
33	46.8	CASP12
34	42.4	PIK3IP1
35	90.1	C6orf155
36	55.8	WDR52
37	61.4	ANKFN1
38	3.9	NA
39	36.3	C21orf82
40	26.5	PRKG2
41	3.2	CASC4

7. Anhang

42		2.7	NA
43		27.5	CNIH3
44		56.9	FLJ23834
45		32.2	NOVA1
46		3.5	ZFP106
47		27.1	ZNF740
48		48.2	NA
49		8.6	MYLIP
50		33.2	NA
51		3.7	IDS
52		38.6	NA
53		2.6	SAR1A
54		19.3	BRCC3
55		3.0	DST
56		32.5	C19orf44
57		87.4	NA
58		5.2	SVIL
59		3.4	VAMP4
60		12.1	IRS1
61		30.1	IKZF2
62		4.7	FAM33A
63		5.3	NA
64		213.4	NA
65		4.0	GPSM2
66		33.3	CLCA2
67		74.1	LOC645106
68		1.9	NA
69		23.5	NA
70		2.6	PCNX
71		2.6	KIAA1109
72		8.0	SNX33
73		27.0	LOC401622
74		44.3	NA
75		11.5	NA
76		7.3	ADCY9
77		3.1	VPS13C
78		39.1	CLEC12B
79		26.2	TBX15
80		40.7	HOXC5
81		21.9	TRERF1
82		9.4	UNQ3028
83		31.6	SERPINA5
84		3.3	GNAQ
85		3.3	MAPRE2
86		3.2	NA
87		21.5	TET2

7. Anhang

88	5.8	SOS1
89	3.6	DOCK4
90	14.0	KIAA1009
91	9.7	SLC25A27
92	4.1	CRYBG3
93	45.5	NA
94	3.1	IGF2R
95	82.3	TAS2R49
96	37.0	TAS2R14
97	10.7	PS1TP4
98	2.6	MLL5
99	24.2	CDH10
100	2.9	DAPK1
101	15.0	BRD8
102	16.8	FAM65B
103	42.6	LVRN
104	18.6	NA
105	2.9	DOCK1
106	3.1	PREPL
107	4.0	ZNF148
108	2.5	FYN
109	7.9	SLC35E2
110	21.7	FLRT3
111	26.7	NA
112	50.9	NA
113	5.5	CLK1
114	50.4	NA
115	2.9	SLC35B4
116	35.3	NA
117	41.7	NA
118	2.3	NA
119	7.6	KIAA1377
120	27.4	YPEL2
121	11.6	C2orf67
122	2.4	HERC2P2
123	3.1	CDC42BPA
124	3.0	ZMAT3
125	2.4	MKLN1
126	2.3	NCKAP1
127	22.0	PLCL2
128	17.9	ZNF75D
129	42.6	GRIA4
130	26.4	NA
131	7.4	NBEAL1
132	2.7	USP34
133	8.3	ZBTB33

7. Anhang

134		3.4	CDC40
135		13.3	MGC24103
136		3.0	NA
137		3.7	RRAGC
138		20.2	NA
139		2.3	OGT
140		4.4	CNOT8
141		18.2	C5orf53
142		23.5	FRK
143		2.3	NA
144		19.0	TRERF1
145		4.6	NBEAL1
146		2.2	HP1BP3
147		2.4	PTPN11
148		2.7	SGK269
149		2.3	NA
150		5.9	EDA2R
151		22.3	NA
152		16.8	FLJ43080
153		2.0	SFRS5
154		18.2	SLC47A1
155		6.1	GTF2I
156		11.8	LOC400657
157		28.0	ABCA10
158		20.8	NA
159		15.9	NA
160		0.0	EGR1
161		0.0	MYC
162		0.0	TAGLN
163		0.0	TRIB1
164		0.1	ODC1
165		0.0	CXCL1
166		0.0	PDGFA
167		0.1	MT2A
168		0.0	FOS
169		0.0	ACTC1
170		0.0	FOSB
171		0.0	SLC7A5
172		0.0	NA
173		0.0	KLF10
174		0.1	SLC2A1
175		0.1	SPRY4
176		0.1	NP
177		0.1	TPM1
178		0.1	GFPT2
179		0.0	ERRFI1

7. Anhang

180		0.1	SRF
181		0.0	DUSP5
182		0.0	OLFM2
183		0.0	CDCP1
184		0.0	PLK3
185		0.0	NA
186		0.1	NA
187		0.0	NR4A1
188		0.1	NA
189		0.2	NA
190		0.1	RHOB
191		0.2	NA
192		0.0	NA
193		0.0	POM121L8P
194		0.0	DACT1
195		0.1	MIF
196		0.1	MT1X
197		0.2	SKIL
198		0.1	NA
199		0.2	PRPS1
200		0.0	EGR2
201		0.1	SNORD42B
202		0.0	NA
203		0.1	NA
204		0.1	NA
205		0.1	IER2
206		0.1	RPL18A
207		0.1	NA
208		0.0	ZC3H12A
209		0.1	PLK2
210		0.1	GADD45A
211		0.1	MT1L
212		0.0	TSPAN2
213		0.1	YRDC
214		0.3	HMGCR
215		0.0	psiTPTE22
216		0.2	CD9
217		0.0	ID1
218		0.2	DNAJB5
219		0.0	NA
220		0.2	FAM101B
221		0.1	NA
222		0.1	LRRFIP1
223		0.2	HIST1H4C
224		0.0	NA
225		0.2	NA

7. Anhang

226		0.3	TPI1
227		0.2	NA
228		0.1	PFKP
229		0.2	SNORD74
230		0.0	NA
231		0.2	NA
232		0.1	JHDM1D
233		0.2	NA
234		0.0	SIK1
235		0.1	FAM107B
236		0.0	TJP2
237		0.0	EGR3
238		0.2	SNORA67
239		0.0	VEGFA
240		0.0	JUNB
241		0.1	NET1
242		0.0	FAM27A
243		0.3	PSMD8
244		0.3	NA
245		0.3	DRAP1
246		0.1	NA
247		0.1	NA
248		0.0	NA
249		0.0	SNRPN
250		0.0	FOSL1
251		0.2	NA
252		0.1	NA
253		0.3	NA
254		0.3	P704P
255		0.0	NA
256		0.0	GP1BB
257		0.0	NA
258		0.1	DOT1L
259		0.1	NA
260		0.2	ZNF259
261		0.0	SMOX
262		0.1	PIM3
263		0.2	NA
264		0.2	TSPAN13
265		0.1	NA
266		0.2	NA
267		0.1	SNORA45
268		0.1	NA
269		0.2	SLC3A2
270		0.2	SLC20A1
271		0.0	ID3

7. Anhang

272		0.0	HBEGF
273		0.0	BCOR
274		0.0	NA
275		0.1	SLC19A2
276		0.0	SNRPN
277		0.3	NA
278		0.1	NA
279		0.0	BHLHE40
280		0.6	NA
281		0.3	TUBA1C
282		0.3	NA
283		0.2	hCG_1983332
284		0.2	RPL7A
285		0.0	NA
286		0.2	NA
287		0.1	LOC388796
288		0.3	NA
289		0.2	SNRPB
290		0.2	SNORD57
291		0.2	NA
292		0.3	NAMPT
293		0.1	NA
294		0.4	DDX21
295		0.0	SNRPN
296		0.0	SNRPN
297		0.0	SNRPN
298		0.0	SNRPN
299		0.0	AGPAT9
300		0.1	SNORD43
301		0.2	SNORD13
302		0.3	RPS26P47
303		0.2	RPS26P11
304		0.1	NA
305		0.1	NA
306		0.1	NA
307		0.2	RPS26
308		0.1	NA
309		0.3	NA
310		0.0	NA
311		0.0	NA
312		0.0	NA
313		0.0	NA
314		0.2	NA
315		0.0	NA
316		0.1	NOP16
317		0.0	SNRPN

7. Anhang

318		0.0	SNRPN
319		0.0	SNRPN
320		0.1	SLC25A33
321		0.3	NA
322		0.2	TUBB2A
323		0.3	NA
324		0.1	NA
325		0.3	HMGCS1
326		0.0	NA
327		0.0	NA
328		0.6	NA
329		0.4	TES
330		0.4	NA
331		0.1	NA
332		0.3	NA
333		0.4	SLC4A7
334		0.0	NA
335		0.1	ALDH1B1
336		0.4	NA
337		0.2	SNORA71A
338		0.2	BZW2
339		0.3	MCL1
340		0.5	WDR1
341		0.1	NA
342		0.5	RPL10A
343		0.1	NA
344		0.3	RNU1A
345		0.3	RNU1A
346		0.3	NA
347		0.3	PHLDA1
348		0.0	NA
349		0.4	SNORA70
350		0.0	SNRPN
351		0.5	NA
352		0.4	NA
353		0.0	SNORA9
354		0.2	PPRC1
355		0.3	NA
356		0.4	RAN
357		0.2	PPP1R15A
358		0.1	DAPK3
359		0.3	COX7A2
360		0.2	URB2
361		0.4	NA
362		0.2	NA
363		0.2	NA

7. Anhang

364		0.1	BAMBI
365		0.2	NA
366		0.3	DKC1
367		0.2	SNORA71B
368		0.1	RPL13
369		0.2	SNORA10
370		0.2	SNORA10
371		0.4	NA
372		0.0	HES1
373		0.0	C3orf52
374		0.2	HINT2
375		0.3	NA
376		0.3	NA
377		0.2	MT2A
378		0.3	CTPS
379		0.4	NA

Tab. 7.32: Daten des Dreiklassenvergleichs potenzieller mRNA-iPS-Zellen zu humanen ES-Zellen.

Nummer	Klasse	Expressionsänderung	Gene Symbol
1	+	42.4	SNRPN
2	+	42.1	SNRPN
3	+	83.6	SNRPN
4	+	58.8	SNRPN
5	+	180.4	SNRPN
6	+	1720.2	SEMA6A
7	+	3478.8	LIN28
8	+	3814.4	DPPA4
9	+	981.3	KRT8
10	+	3152.3	DNMT3B
11	+	1483.9	SPP1
12	+	3580.9	CD24
13	+	1484.6	CLDN6
14	+	1650.9	KDR
15	+	12.1	NA
16	+	571.2	GDF15
17	+	1561.3	NA
18	+	10.6	NA
19	+	1539.6	NA
20	+	149.6	FAM60A
21	+	271.7	SERPINB9
22	+	1427.7	SLC7A3
23	+	29.9	PHC1
24	+	1243.1	TDGF1
25	+	6.4	NA

7. Anhang

26	+		318.0	Oct4
27	+		317.6	Oct4
28	+		1088.0	POU5F1P1
29	+		28.9	PHC1
30	+		1375.4	EPCAM
31	+		9.3	NA
32	+		1207.2	CDH1
33	+		1504.8	RBM35A
34	+		2201.7	SALL4
35	+		396.1	SNRPN
36	+		1051.8	GRPR
37	+		2728.7	DSG2
38	+		1049.0	CDH3
39	+		725.6	ETV4
40	+		20.5	TERF1
41	+		1313.8	PTPRZ1
42	+		104.8	GPC4
43	+		14.7	RPS2P5
44	+		541.3	PLK1
45	+		90.1	PSAT1
46	+		246.3	POU5F1
47	+		1342.1	ZFP42
48	+		9.2	NA
49	+		1431.9	C21orf105
50	+		1280.6	NA
51	+		757.2	FAM169A
52	+		1057.7	FREM2
53	+		1374.2	ZIC3
54	+		1272.9	NA
55	+		1579.6	USP44
56	+		1192.3	NA
57	+		85.0	TOP2A
58	+		877.4	HEY2
59	+		730.5	FAM160A1
60	+		599.3	MAL2
61	+		601.7	CECR2
62	+		972.3	MACC1
63	+		750.9	CRABP1
64	+		510.4	L1TD1
65	+		594.1	BUB1
66	+		972.6	CTSL2
67	+		878.6	VSNL1
68	+		1131.4	LRAT
69	+		789.7	GCNT2
70	+		618.8	NA
71	+		501.2	SORL1

7. Anhang

72	+	1358.1	NA
73	+	15.8	CCND2
74	+	5.4	NA
75	+	567.7	KIF1A
76	+	92.4	NA
77	+	680.1	VASH2
78	+	359.5	IGF2BP3
79	+	526.5	CLDN7
80	+	20.6	NA
81	+	83.0	NA
82	+	669.6	CD200
83	+	453.4	TSPAN18
84	+	469.3	FZD3
85	+	829.7	CST1
86	+	420.0	TRIM71
87	+	1154.0	NA
88	+	556.3	OCLN
89	+	24.4	NA
90	+	471.8	FZD5
91	+	510.6	UNC5D
92	+	179.5	TPX2
93	+	355.7	CKB
94	+	8.6	NA
95	+	236.0	DLGAP5
96	+	25.5	ASNS
97	+	304.1	CRMP1
98	+	74.6	PMAIP1
99	+	577.4	IQGAP2
100	+	7.0	RPS19
101	+	304.0	TRIML2
102	+	822.1	APOE
103	+	637.6	WBSCR17
104	+	586.9	EPHA7
105	+	1007.9	ACVR2B
106	+	321.0	ITGB1BP3
107	+	588.7	KRT19
108	+	26.0	SNRPN
109	+	26.0	SNRPN
110	+	423.9	PRSS8
111	+	107.6	ACTA1
112	+	162.1	IGF2BP1
113	+	610.8	SPINT1
114	+	876.4	C13orf3
115	+	19.5	CD2AP
116	+	482.5	SILV
117	+	361.2	CYFIP2

7. Anhang

118	+		48.9	ZNF90
119	+		435.9	CORO2A
120	+		154.5	NA
121	+		445.6	DOCK3
122	+		548.7	NLRP2
123	+		453.4	HHLA1
124	+		466.6	NA
125	+		59.2	ARID3B
126	+		486.2	PLA2G2A
127	+		356.9	C15orf42
128	+		6.8	TRIM28
129	+		217.9	NA
130	+		508.9	GRB7
131	+		11.8	NA
132	+		227.9	PLP1
133	+		304.8	ATP1B2
134	+		59.6	PLA2G16
135	+		445.0	NUP210
136	+		598.6	COBL
137	+		771.3	GATM
138	-		0.0	TNC
139	-		0.0	DPT
140	-		0.0	C1S
141	-		0.0	C1R
142	-		0.0	CCDC80
143	-		0.0	CTSK
144	-		0.0	CCRL1
145	-		0.0	GREM1
146	-		0.1	THBS1
147	-		0.0	COL12A1
148	-		0.0	CYBRD1
149	-		0.0	CCL2
150	-		0.0	TNFRSF11B
151	-		0.0	LUM
152	-		0.0	COL6A3
153	-		0.0	CLDN11
154	-		0.0	TIMP3
155	-		0.0	LOX
156	-		0.0	GLIPR1
157	-		0.0	APOD
158	-		0.0	STMN2
159	-		0.0	SNAI2
160	-		0.0	RECK
161	-		0.0	FBLN5
162	-		0.1	LDHA
163	-		0.1	ANXA1

7. Anhang

164	-	0.0	AKR1C3
165	-	0.0	MMP1
166	-	0.0	PDGFRL
167	-	0.0	FRMD6
168	-	0.0	CDH11
169	-	0.0	FAP
170	-	0.0	PTX3
171	-	0.0	DKK2
172	-	0.0	PDGFRA
173	-	0.0	THBS2
174	-	0.0	DDR2
175	-	0.0	SERPINF1
176	-	0.0	ENPP2
177	-	0.0	NT5E
178	-	0.0	MOXD1
179	-	0.1	SERPINE2
180	-	0.0	SRPX2
181	-	0.0	DPP4
182	-	0.0	NRN1
183	-	0.0	AOX1
184	-	0.0	ITGBL1
185	-	0.0	AKR1C1
186	-	0.0	ADH1B
187	-	0.0	PSG5
188	-	0.1	CD59
189	-	0.1	NA
190	-	0.0	EFEMP1
191	-	0.0	GSN
192	-	0.0	PAM
193	-	0.0	PSG7
194	-	0.0	ID2
195	-	0.0	CRYAB
196	-	0.0	NRP1
197	-	0.1	CD44
198	-	0.0	FBN1
199	-	0.0	ADM
200	-	0.0	GBE1
201	-	0.0	MFAP4
202	-	0.0	PPP1R3C
203	-	0.0	AQP1
204	-	0.0	DKK3
205	-	0.0	EMP1
206	-	0.0	JAM2
207	-	0.0	FMOD
208	-	0.0	PSG4
209	-	0.0	GPNUMB

7. Anhang

210	-	0.0	LAMA4
211	-	0.0	SVEP1
212	-	0.1	TIMP1
213	-	0.0	ANPEP
214	-	0.0	AEBP1
215	-	0.0	GAS6
216	-	0.0	RCAN2
217	-	0.0	TGFBI
218	-	0.0	MMP2
219	-	0.0	NNMT
220	-	0.0	SMOC2
221	-	0.0	FIBIN
222	-	0.0	TMEM176A
223	-	0.0	S100A4
224	-	0.0	ISLR
225	-	0.0	KCNK2
226	-	0.0	DAB2
227	-	0.1	PCOLCE
228	-	0.0	MFSD1
229	-	0.0	LTBP2
230	-	0.1	HTRA1
231	-	0.1	CHN1
232	-	0.1	ASAM
233	-	0.0	FGF7
234	-	0.0	DDX3Y
235	-	0.0	SLIT2
236	-	0.0	C6orf145
237	-	0.0	PMP22
238	-	0.0	CFH
239	-	0.0	COL3A1
240	-	0.0	DPYD
241	-	0.0	LRRC15
242	-	0.0	FAM180A
243	-	0.0	NA
244	-	0.0	CAV1
245	-	0.0	COMP
246	-	0.0	PDCD1LG2
247	-	0.0	COMT
248	-	0.0	CD248
249	-	0.0	PRELP
250	-	0.0	MXRA5
251	-	0.1	NA
252	-	0.0	PODN
253	-	0.0	GBP1
254	-	0.0	CCBE1
255	-	0.0	OSMR

7. Anhang

256	-	0.0	BICC1
257	-	0.0	GLT8D2
258	-	0.0	HEG1
259	-	0.0	EHD3
260	-	0.0	LHFP
261	-	0.0	CTSA
262	-	0.1	VIM
263	-	0.1	COL1A2
264	-	0.0	IL1R1
265	-	0.0	TMEM119
266	-	0.0	EPAS1
267	-	0.0	RPS4Y1
268	-	0.0	RHOJ
269	-	0.1	LGALS1
270	-	0.1	CD99
271	-	0.1	CD99
272	-	0.0	CPXM2
273	-	0.1	PPAP2B
274	-	0.1	B2M
275	-	0.0	PDGFD
276	-	0.0	PDGFRB
277	-	0.1	NQO1
278	-	0.0	LOXL1
279	-	0.0	KIAA1199
280	-	0.0	TMEM109
281	-	0.0	C13orf15
282	-	0.0	CASP4
283	-	0.1	FST
284	-	0.0	MFAP5
285	-	0.0	LOXL4
286	-	0.0	EMP3
287	-	0.0	SQRDL
288	-	0.0	BMPER
289	-	0.0	C4orf3
290	-	0.1	NA
291	-	0.0	IFI6
292	-	0.1	COL6A2
293	-	0.0	PGCP
294	-	0.1	NA
295	-	0.0	CLIP4
296	-	0.0	SLIT3
297	-	0.1	SERPING1
298	-	0.0	PTPLAD2
299	-	0.0	NA
300	-	0.0	GSTM3
301	-	0.0	MBNL1

7. Anhang

302	-	0.0	TMEM171
303	-	0.1	LAYN
304	-	0.0	CSF1
305	-	0.0	GSTM5
306	-	0.1	SCARNA7
307	-	0.0	NEGR1
308	-	0.0	SGCD
309	-	0.0	POSTN
310	-	0.0	TNFRSF19
311	-	0.1	DRAM
312	-	0.0	ITGA11
313	-	0.0	WISP1
314	-	0.0	SRD5A2
315	-	0.0	CRYZ
316	-	0.1	PTGIS
317	-	0.0	BDKRB1
318	-	0.2	NA
319	-	0.0	EFEMP2
320	-	0.0	TWIST2
321	-	0.0	PRSS23
322	-	0.0	PRKCDBP
323	-	0.0	TGFBR3
324	-	0.1	HEXA
325	-	0.0	TACSTD2
326	-	0.0	NA
327	-	0.0	FGF5
328	-	0.0	EMP2
329	-	0.0	C7orf58
330	-	0.0	INMT
331	-	0.0	TTR
332	-	0.1	DUSP1
333	-	0.0	LBH
334	-	0.0	NA
335	-	0.0	GBA
336	-	0.0	COPZ2
337	-	0.0	AKR1C2
338	-	0.0	C11orf87
339	-	0.0	C4orf18
340	-	0.0	SEMA5A
341	-	0.0	WISP2
342	-	0.1	ANXA2
343	-	0.2	DAD1
344	-	0.0	TGFBR2
345	-	0.0	RUNX1
346	-	0.1	SBDS
347	-	0.0	NA

7. Anhang

348	-	0.1	CTSB
349	-	0.3	NA
350	-	0.1	TRAM2
351	-	0.0	XG
352	-	0.0	CFB
353	-	0.0	CCRL1
354	-	0.0	ECM1
355	-	0.0	CFB
356	-	0.0	STC1
357	-	0.0	PLSCR4
358	-	0.0	CFB
359	-	0.1	ANXA2P2
360	-	0.1	NA
361	-	0.1	HSPB1
362	-	0.1	TIMP2
363	-	0.0	SOAT1
364	-	0.0	LMO7
365	-	0.0	DOCK10
366	-	0.0	IGSF10
367	-	0.2	NA
368	-	0.1	SRPX
369	-	0.0	ARID5B
370	-	0.0	MRAS
371	-	0.0	ALPK2
372	-	0.1	TWSG1
373	-	0.0	MEIS1
374	-	0.0	SLC1A3
375	-	0.1	CXCL12
376	-	0.0	GRIA1
377	-	0.1	C12orf75
378	-	0.0	SGMS2
379	-	0.0	COLEC12
380	-	0.0	GBP3
381	-	0.0	ANGPTL2
382	-	0.0	SPON1
383	-	0.0	KDEL3
384	-	0.2	TMEM59
385	-	0.0	VGLL3
386	-	0.0	SEMA3C
387	-	0.1	ATP8B1
388	-	0.0	AKAP6
389	-	0.1	MRFAP1
390	-	0.0	NFKB1
391	-	0.0	NPAS2
392	-	0.2	ATP6V0E1
393	-	0.0	ADH1A

7. Anhang

394	-	0.0	TMEM173
395	-	0.0	C20orf43
396	-	0.0	ADH1C
397	-	0.0	GEM
398	-	0.0	APCDD1
399	-	0.0	PRRX1
400	-	0.0	XAF1
401	-	0.0	NA
402	-	0.0	ST6GALNAC6
403	-	0.0	MR1
404	-	0.0	PROS1
405	-	0.0	LMCD1
406	-	0.0	SMPD1
407	-	0.1	PARVA
408	-	0.0	PTRF
409	-	0.0	MMP3
410	-	0.0	PLA2R1
411	-	0.0	ITGA4
412	-	0.0	ITGB8
413	-	0.0	TYW3
414	-	0.0	LRP10
415	-	0.0	BHMT2
416	-	0.1	HGSNAT
417	-	0.0	VEGFC
418	-	0.0	IL7
419	-	0.0	SH2D4A
420	-	0.1	IQWD1
421	-	0.0	AQP9
422	-	0.0	TLR4
423	-	0.0	EGFR
424	-	0.1	SGCE
425	-	0.0	MSRB3
426	-	0.0	CRISPLD2
427	-	0.1	RPL10
428	-	0.1	SNX9
429	-	0.0	CTSZ
430	-	0.1	DAZAP2

7.17 Wissenschaftlicher Werdegang

Persönliche Daten

Name: Antje Arnold
Geburtsdatum: 18. Februar 1979
Geburtsort: Wurzen

Universitäre Ausbildung

Seit 06/2012 Trainee, Johns Hopkins University School of Medicine, Russell H. Morgan Department of Radiology and Radiological Science
ab 05/2008 Promotionsstudium zum Thema „Neue Methode zur Herstellung von induzierten pluripotenten Stammzellen“, Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie Leipzig
04/2006 – 02/2007 Universitätsklinikum Leipzig / Klinik für Neurologie
Diplomarbeit zum Thema „Funktion und Expression von Semaphorin 3A, Semaphorin 3E, Semaphorin 4A und Semaphorin 5A in humanen neuronalen Stammzellen“
Abschluss der Arbeit mit der Note „1,0“
10/2002 – 03/2006 Studium der Biologie an der Universität Leipzig (Abschluss: Diplom mit der Note „1,3“)
Hauptstudium mit den Fächerschwerpunkten Genetik, Mikrobiologie, Molekulare Medizin und Immunologie
Diplomprüfung mit der Note „1,4“

Beruflicher Werdegang

06/2007-04/2008 HelmholtzZentrum München / AGV Genvektoren
Wissenschaftliche Mitarbeiterin, „EBV-basierende Vektoren für die Anwendung in der Immuntherapie“
11/2007-04/2008 Sprecherin der Junior Faculty des SFB455
Organisation von wissenschaftlichen und berufsbildenden Seminaren/Weiterbildungen und Junior Retreat
03/2002 – 09/2002 Universitätskinderklinik Leipzig / Forschungslabor der AG
Diabetologie, Biologiellaborantin
03/2001 – 03/2002 Universität Leipzig / Institut für Pflanzenphysiologie
Biologiellaborantin

Berufliche Ausbildung

09/1997 – 02/2001 Universität Leipzig / Institut für Botanik
Ausbildung zur Biologiellaborantin (Abschluss mit Auszeichnung als beste Auszubildende in Sachsen)
01/1999 – 03/2002 Vorsitzende der Jugend- und Auszubildendenvertretung der Universität Leipzig

Schulische Ausbildung

09/1991 – 07/1997 Magnus-Gottfried-Lichtwer-Gymnasium in Wurzen, Abschluss: Hochschulreife)
09/1990 – 08/1991 Leistungsklasse der Goetheoberschule in Wurzen
09/1985 – 08/1990 Wilhelm-Pieck-Oberschule in Wurzen

Studentische Hilfskraftstellen

02/2007 – 04/2007 Universitätsklinikum Leipzig / Institut für Neurologie
wissenschaftliche Mitarbeiterin: Durchführung von zellbiologischen und molekularbiologischen Experimenten an humanen neuronalen Stammzellen
01/2005 – 12/2005 Universitätsklinikum Leipzig / Institut für molekulare Biochemie

01/2004 – 12/2004 Durchführung von molekularbiologischen, zellbiologischen und biochemischen Experimenten
Universitätsklinikum Leipzig / Institut für Virologie
Durchführung von molekularbiologischen und zellbiologischen Experimenten

Weiterbildung

09/2001 – 12/2001 „Fachkraft zur Molekularbiologie“; TÜV Akademie Pfalz

Originalartikel

- A. **Arnold**, Y. M. Naaldijk, C. Fabian, H. Wirth, H. Binder, G. Nikkhah, L. Armstrong, A. Stolzing. Reprogramming of human Huntington fibroblasts using mRNA. 2011. ISRN cell biology
- K. Zoldan, **A. Arnold**, A. Stolzing, J. Lehmann. Automated harvest of induced pluripotent stem cell colonies and colony fractions using the cell separation robot CellCelector™. 2010. Nature methods (Application Notes)
- K. Zoldan, **A. Arnold**, A. Stolzing, J. Lehmann. Visualizing of migration, interaction, proliferation or differentiation of cells in time lapse exposures using the cell separation robot CellCelector™. 2010. Nature methods (Application Notes).
- J. Milosevic, A. Brandt, U. Roemuss, **A. Arnold**, F. Wegner, S.C. Schwarz, A. Storch, H. Zimmermann, J. Schwarz. Uracil nucleotides stimulate human neural precursor cell proliferation and dopaminergic differentiation: involvement of MEK/ERK signalling. J Neurochem. 2006; 99(3):913-23. PMID: 17076658
- H. Römler, H.T Yu, **A. Arnold**, A. Orth, T. Schöneberg. Functional consequences of naturally occurring DRY motif variants in the mammalian chemoattractant receptor GPR33. Genomics. 2006; 87(6):724-32. PMID: 16595170

Patent:

- A. Stolzing, **A. Arnold**, J. Brown; Reprogramming cells toward a pluripotent state, US2011/0236978 A1, EP2192174

Vortrag

- A. Arnold**, A. Stolzing: *In vitro* aging of human mRNA iPS derived fibroblasts, World Conference on Regenerative Medicine.29.10.-31.10.09, Leipzig, Deutschland. (2011)

Posterpräsentationen:

- A. Arnold**, R. Martin, H.-Q. Mao, M. Janowski, J. W. M. Bulte, P. Walczak, 3D- *in vitro* assay for monitoring differentiation efficiency of iPSCs towards myelinating oligodendrocytes, 43rd annual meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, USA. (2013, Poster akzeptiert)
- A. Arnold**, A. Lyczek, J. Zhang, M. Janowski, J. W. M. Bulte, P. Walczak, Quantitative fluorescent *in vitro* assay for monitoring differentiation of pluripotent stem cells towards myelinating oligodendrocytes, International Society for Stem Cell Research 11th annual meeting, Bosten, USA. (2013)
- A. Arnold**, A. Lyczek, H.-Q. Mao, M. Janowski, J. W. M. Bulte, P. Walczak, Developing a novel *in vitro* assay for monitoring differentiation of pluripotent stem cells towards myelinating oligodendrocytes Keystone Symposia, Stem Cell Regulation in Homeostasis and Disease, Banff, Kanada. (2013)
- L. Rohani, **A. Arnold**, C. Fabian, Y. Naaldijk, A. Stolzing: Integration-free mRNA reprogramming of human fibroblasts. 7th Annual Congress of The German Society for Stem Cell Research associated with Fraunhofer Life Science Symposium 2012, Leipzig, Deutschland. (2012)
- L. Rohani, Y. Naaldijk, **A. Arnold**, C. Fabian, A. Stolzing: DNA repair capacity and mitochondrial activity analysis in human reprogrammed induced pluripotent stem cells. 7th Annual Congress of The German Society for Stem Cell Research associated with Fraunhofer Life Science Symposium, Leipzig, Deutschland. (2012)

7. Anhang

- A. Lyczek, **A. Arnold**, J. Zhang, M. Janowski, J. W. M. Bulte, P. Walczak, Induced pluripotent stem cell-derived oligodendrocytes and neurorepair: Development of non-invasive tools for monitoring engraftment and evaluation of therapeutic effects, MSCRF, 2012
- A. Arnold**, J. Wiegand, A. Stolzing: Differentiation of patient specific mRNA iPS cells into fibroblasts, Aging Congress Prevention and Intervention, 16.-18.09.11, Halle/Saale, Deutschland. (2011)
- A. Arnold**, A. Stolzing: Comparison of differentiated cells generated from iPS cells with primary somatic cells, 9th Leipziger Research Festival, Leipzig, Deutschland. (2010)
- A. Arnold**, Y. Naaldijk, C. Fabian, T. Piroth, G. Nikkhah, A. Stolzing: Huntington specific human mRNA-iPS and their potential for cellular senescence. 3rd International Congress on Stem Cells and Tissue Formation, Dresden, Deutschland. (2010)
- A. Arnold**, A. Stolzing: Development of a RNA based reprogramming system for the derivation of human iPS cells, 8th Leipziger Research Festival, Leipzig, Deutschland. (2009)
- A. Arnold**, Y. Naaldijk, C. Fabian, S. Sauerzweig, A. Stolzing: Basic assistive factors in cellular reprogramming. Human Pluripotent Stem Cells Symposium, Dublin, Ireland. (2009)
- A. Arnold**, C. Fabian, S. Sauerzweig, Y. Naaldijk, U. Brinckmann, U. G. Liebert, A. Stolzing: iPS cells as model system for human virus diseases. 19th Annual Meeting of the Society for Virology, 8. Biotechnologietag, Leipzig, Deutschland. (2009)
- A. Arnold**, A. Stolzing (2008): Reprogramming of mesenchymal stem cells and fibroblasts to induced pluripotent stem cells; 3th Fraunhofer Life Science Symposium, Leipzig, Deutschland. (2008)

Preise:

1. Posterpreis:

- A. Arnold**, A. Stolzing (2009): Development of RNA based reprogramming system for the derivation of human IPS cells, 8th Leipziger Research Festival, Leipzig, Deutschland. (2009)

7.18 Eigenständigkeitserklärung

Ich erkläre,

... dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, Literatur und persönlichen Mitteilungen angefertigt habe.

... dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

... dass ich weder die vorliegende Doktorarbeit, noch Teile dieser für eine andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe.

Antje Arnold

Chemnitz, den 25.09.2015

7.19 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau **Dr. Alexandra Stolzing**, dass sie mir die Bearbeitung dieses interessanten und aktuellen Themas ermöglicht hat. Außerdem danke ich ihr für ihre stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei der Erarbeitung der verschiedenen wissenschaftlichen Aspekte.

Herrn **Professor Dr. Tilmann Grune** danke ich für seine Bereitschaft, die Betreuung dieser Arbeit zu übernehmen und sie vor der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät zu vertreten.

Mein herzlicher Dank gilt dem Abteilungsleiter Herrn **Dr. Johannes Boltze** für seine hilfreiche Unterstützung während meiner Doktorarbeit und die vielen kleinen, wertvollen Hinweise.

Herrn Prof. U. G. Liebert, Frau Dr. U. Brinckman und Frau Dr. C. Fabian danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit und die Überlassung der Plasmide.

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Nikkhah und Herrn Dr. T. Piroth für die erfolgreiche Kooperation und Bereitstellung der Huntingtonfibroblasten, die nun als iPS-Zellen existieren.

Weiterhin danke ich PD Dr. H. Binder und Herrn Dr. H. Wirth für die Auswertung der Microarray-Daten und zahlreichen Erklärungen zu den erbrachten statistischen Analysen.

Herrn Dr. L. Armstrong danke ich für das Übersenden der lysierten H9-Zellen, die viele wertvolle Ergebnisse ermöglichten.

Mein herzlicher Dank gilt allen kleinen und großen Fibroblastenspendern, Ärzten und Krankenschwestern, die an der Bereitstellung der Biopsien beteiligt waren. Ohne Sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein weiterer Dank gilt allen ehemaligen und jetzigen **Mitgliedern** und **Studenten** des **Fraunhofer IZI** für das angenehme Arbeitsklima und die zahlreichen praktischen Hinweise. Besonderer Dank gilt hierbei Frau M. Berndt und Frau A. Placht, die im Rahmen dieser Dissertation ihre Diplomarbeit beziehungsweise Bachelorarbeit angefertigt haben.

Einen lieben Dank an meine Familie, dass sie mir den Weg durch das Studium und der Promotion ermöglichten.

Meinen Freunden danke ich, dass sie mit mir die Zeit der Promotion durchlebten, immer ein offenes Ohr für meine Sorgen hatten und mit einer unglaublichen Geduld des Öfteren diese Arbeit Korrektur gelesen haben.