

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Leiterin: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Marianne Jochum)

Induzierbare Genexpression in humanen mesenchymalen Stammzellen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Marei Drechsel
aus München

München 2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. M. Jochum
2. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. F. T. Kolligs
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. P. Nelson
	Prof. Dr. O. Steinlein
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. P. Neth
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	08.05.2008

INHALTSVERZEICHNIS

A ZUSAMMENFASSUNG	1
B EINLEITUNG	2
B1 Stammzellen	3
B1.1 Definition	3
B1.2 Stammzellendifferenzierung	4
B1.3 Adulte Stammzellen	5
B1.4 Embryonale Stammzellen	6
B1.5 Therapeutische Ansätze	7
B2 Transfektion von humanen mesenchymalen Stammzellen	8
B2.1 Liposomaler Gentransfer	8
B2.2 Transiente Transfektion	8
B2.3 Kotransfektion	9
B2.4 Stabile Transfektion	9
B2.5 Transfektion von Reporterplasmiden in hMSC	10
B3 Induzierbare Genexpression	11
B3.1 Tetracyclin-abhängige Genregulation	11
B3.2 Weiterentwicklung der induzierbaren Genexpression	13
B4 Der Transkriptionsfaktor POU5F1	15
B4.1 Eukaryotische Genregulation	15
B4.2 Genomische Struktur des Transkriptionsfaktors POU5F1	15
B4.3 Proteinstruktur und Bindungseigenschaften des Transkriptionsfaktors POU5F1	16
B4.4 POU5F1 als zentraler Regulator der Pluripotenz?	18
B5 Aufgabenstellung	19

C MATERIAL UND METHODEN	20
C1 Materialien	20
C1.1 Geräte.....	20
C1.2 Materialien und Substanzen.....	21
C1.2.1 Allgemeine Materialien.....	21
C1.2.2 Substanzen für die Zellkultur.....	22
C1.2.3 Zelllinien.....	22
C1.2.4 Chemikalien für die Molekularbiologie.....	23
C1.2.5 Bakterienstämme und Nährmedien	24
C1.2.6 Oligonukleotide	25
C1.2.7 Plasmide	25
C2 Methoden	31
C2.1 Molekularbiologie	31
C2.1.1 Anzucht und Stammhaltung von <i>Escherichia coli</i>	31
C2.1.2 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen	31
C2.1.3 Elektroporation.....	32
C2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA	33
C2.1.5 Reinigung, Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	34
C2.1.6 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	35
C2.1.7 Agarose-Gel-Elektrophorese zur Trennung von DNA-Fragmenten	36
C2.1.8 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen.....	36
C2.1.9 Ligierung von DNA-Fragmenten	36
C2.1.10 Auffüllreaktion mit DNA-Polymerase I (Klenow).....	37
C2.1.11 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	37
C2.1.12 PCR-Amplifikation von DNA.....	38
C2.1.13 Topo-TA-Klonierung	38
C2.1.14 DNA-Sequenzierung.....	39
C2.1.15 RNA-Isolation.....	39
C2.1.16 cDNA-Synthese für die quantitative RT-PCR	39
C2.1.17 Quantitative RT-PCR	40
C2.2 Zellbiologie	41
C2.2.1 Kultivierung und Konservierung von hMSC.....	41
C2.2.2 Transfektion.....	43
C2.2.3 Toxizitätsanalysen von Geneticin und Doxycyclin.....	45
C2.2.4 Proliferationsstudien mit CyQuant®	46
C2.2.5 Luziferase-Aktivitätsbestimmung.....	46
C2.2.6 CHO-Zellen als Kontrolle für das Tet-On-System.....	47
C2.3 Statistische Analyse	47

D	ERGEBNISSE	48
D1	Toxizitätsanalysen.....	48
	D1.1 Doxycyclin.....	48
	D1.2 Dosis-Wirkungskurven von Geneticin bei hMSC.....	48
D2	Generierung und Transfektion von Plasmiden mit Reporter Genen.....	49
	D2.1 Generierung von Plasmiden mit Reporter Genen	49
	D2.1.1 pEGFPLuc-IRESneo2.....	49
	D2.1.2 pLucEGFP.....	50
	D2.2 Transiente Transfektion von Plasmiden mit Reporter Genen	51
	D2.2.1 Optimierung über EGFP-Fluoreszenz.....	51
	D2.2.2 Verifizierung über Luziferase-Aktivität.....	52
D3	Induzierbare Genexpression mittels des Tet-On-Systems	53
	D3.1 Validierung an CHO-Zellen	53
	D3.2 FBS-Untersuchung	54
	D3.3 Plasmid-Generierung zur regulierbaren Genexpression.....	54
	D3.3.1 pTRE2hyg-EGFP.....	55
	D3.3.2 pTRE2hyg-POU5F1_iA bzw. -POU5F1_iB.....	55
	D3.4 Transiente Transfektionen	56
	D3.4.1 Optimierung der Transfektion von pTet-On.....	56
	D3.4.2 Kotransfektion von pTet-On und pTRE2hyg-Luc.....	58
	D3.4.3 Kotransfektion von pTet-On und pTRE2hyg-EGFP	59
	D3.5 Stabile Transfektion von pTet-On.....	60
	D3.5.1 Transfektion und Selektion von pTet-On stabil transfizierten hMSC	61
	D3.5.2 Klonale Expansion und selektive Trypsinierung.....	61
	D3.5.3 Test auf Expression bzw. Funktionalität des Transaktivators rtTA	62
	D3.5.4 Kryokonservierung und Subkultivierung von pTet-On stabilen hMSC	63

D4 Induzierbare Genexpression mit p2in1	64
D4.1 Generierung des Vektors p2in1	64
D4.1.1 Generierung von pTet-On-P _{minhCMV}	66
D4.1.2 Generierung von pCR2.1-TOPO-P _{minhCMV} -rtTA-polyA	66
D4.1.3 Generierung von pTRE2hyg- Δ XhoI 5392	67
D4.1.4 Generierung von p2in1	68
D4.1.5 Generierung von p2in1-Luc	69
D4.2 Transiente Transfektion von p2in1-Luc	70
D5 Expression des Transkriptionsfaktors POU5F1_iA	72
D5.1 Generierung von Plasmiden	72
D5.1.1 Generierung von p-POU5F1_iA bzw. POU5F1_iB-IRES-neo2	72
D5.1.2 Generierung von pcDNA3.1-POU5F1_iA bzw. POU5F1_iB	72
D5.1.3 Generierung von p-POU5F1_iA- bzw. POU5F1_iB-IRES-EGFP	73
D5.2 Transiente Transfektion	74
D5.2.1 Optimierung der Transfektion	74
D5.2.2 Expressionskontrolle über quantitative RT-PCR	74
D5.2.3 Proliferationsverhalten von POU5F1_iA-transfizierten hMSC	76

E DISKUSSION	77
E1 Transfektion in hMSC	77
E1.1 Liposomaler Gentransfer	77
E1.2 Transiente Transfektion	79
E1.3 Stabile Transfektion.....	82
E1.4 Einsatz bicistronischer Vektoren	84
E2 Induzierbare Genexpression	85
E2.1 Angewandte Methoden zur Geninduktion in hMSC.....	85
E2.1.1 Induzierbare Genexpression in hMSC mittels transienter Kotransfektion	85
E2.1.2 Induzierbare Genexpression in pTet-On stabil transfizierten hMSC	85
E2.1.3 Induzierbare Genexpression in hMSC mit p2in1	86
E2.2 Vergleich der angewandten Methoden für induzierbare Genexpression.....	88
E2.2.1 Unspezifische Aktivität.....	88
E2.2.2 Maximale Induktion	90
E2.2.3 Tetracyclin als Induktor der Genexpression	91
E2.2.4 Dosisabhängige Luziferase-Expression.....	92
E2.2.5 Effekte des Transaktivators	93
E2.2.6 Verhältnis des Transaktivators zu TRE	93
E2.2.7 Folgerungen	94
E3 Expression des Transkriptionsfaktors POU5F1_{iA} in hMSC	95
E3.1 Basale Expression des Transkriptionsfaktors POU5F1 in hMSC.....	96
E3.2 Auswirkungen der Transfektion des Transkriptionsfaktors POU5F1 in hMSC	97
E3.3 Die Interaktion von POU5F1 mit anderen Faktoren.....	97
F AUSBLICK	98
G LITERATURVERZEICHNIS	99
DANKSAGUNG	115
LEBENS LAUF	116

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5'-UTR	5'-untranslatierte Region
Amp	Ampicillin-Resistenz-Gen (β -Lactamase)
APH	Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase
AS	Aminosäure(n)
BD	Bindedomäne(n)
bp	Basenpaar(e)
BSA	Serumalbumin vom Rind (<i>bovine serum albumin</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CHO	Tumorzelllinie aus Ovarien chinesischer Hamsterweibchen (<i>chinese hamster ovary</i>)
CMV	Cytomegalovirus
ColE1 ori	<i>E. coli</i> Plasmid Replikationsursprung
C-terminal	carboxyterminal
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	doppelsträngige DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , verstärkte Variante von GFP
ES-Zellen	embryonale Stammzellen (<i>embryonic stem cells</i>)
f1 ori	<i>single strand origin of replication</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	fötales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
GAPDH	Glycinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , »grün fluoreszierendes Protein«
H. simplex	Herpes simplex
HEK	humane embryonale Nierenzelllinie (<i>human embryonic kidney</i>)
HeLa-Zellen	humane Zervixkarzinom-Zelllinie
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen (<i>human mesenchymal stem cells</i>)
HSC	hämatopoetischen Stammzellen (<i>hematopoietic stem cells</i>)
ICM	innere Zellmasse (<i>inner cell mass</i>)
IE	<i>immediate early</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaar(e)
lacZ	β -Galaktosidase-Gen aus <i>E. coli</i>
MAPC	<i>multipotent adult progenitor cells</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>

MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex-Locus (<i>major histocompatibility complex</i>)
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MSC	mesenchymale Stammzellen (<i>mesenchymal stem cells</i>)
Neo	Neomycin
NT (ES-Zellen)	<i>nuclear transfer</i> (ES-Zellen)
N-terminal	aminoterminal
Oct	Oktamer-Bindeprotein (<i>octamer binding protein</i>)
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ori	<i>origin of replication</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
P _{hCMV}	humaner Cytomegalovirus <i>immediate early</i> Promotor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
P _{hCMV⁻¹}	Promotor bestehend aus P _{minhCMV} und TRE
PI-FDA	Propidiumiodid/Fluoresceindiacetat
P _{minhCMV}	Minimalversion des P _{hCMV}
PolyA	Polyadenylatkette
POU	Pit-2, Oct-1 oder Oct-2, Unc86
POUh	POU-Homöodomäne
POUs	POU-spezifische Domäne
POU5F1	Oktamer-Bindeprotein 4 (<i>octamer binding protein 4</i>), OCT-3, OCT-4, OCT-3/4, OTF3, OTF4, OTF3-RS7, OTF3G, NF-A3
pUC ori	<i>E. coli</i> Plasmid-Replikationsursprung
RE	Restriktionsendonuklease(n)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	<i>real time</i> -PCR bzw. Reverse Transkriptase-PCR
rtTA	revers Tetracyclin-abhängiger Transaktivator
SOX2	<i>SRY-box containing gene 2</i>
SV40	Simian Virus 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
tetO	TetR-spezifischer Operator
TetR	Tetracyclin-empfindlicher Repressor
TRE	<i>tet response element</i>
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminoethan
tRNA	transfer RNA
tTA	Tetracyclin-abhängiger Transaktivator
tTS	Tetracyclin-abhängiger Repressor
v/v	Volumen pro Volumen
VP16	Transaktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus
x	Verdau mit Restriktionsenzymen
X-Gal	X-Galactose
ZNS	Zentrales Nervensystem

A ZUSAMMENFASSUNG

Die genetische Modifikation von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) – wie z. B. die in der vorliegenden Promotionsarbeit beschriebene induzierbare Genexpression – gilt als viel versprechendes Mittel, um komplexe molekulare Steuerungsmechanismen zu verstehen. Zudem könnte sie genutzt werden, die begrenzten Stammzelleigenschaften von hMSC hinsichtlich des Differenzierungspotentials sowie der Selbsterneuerung zu erweitern.

Für die praktische Durchführung des Forschungsprojektes wurden zunächst Reporterplasmide mit »grün fluoreszierendem Protein« (GFP) und Luziferase generiert, um anschließend durch Variation der DNA- und Transfektionsreagenzkonzentrationen die optimalen Bedingungen für die transiente und stabile Transfektion durch liposomalen Gentransfer zu ermitteln. Mittels Toxizitätsanalysen wurden die Antibiotika-Konzentrationen bestimmt, die für eine Selektion von stabil genetisch veränderten hMSC vonnöten waren.

Für die induzierbare Genexpression wurde das Tet-On-System herangezogen. Das übliche Protokoll sieht dafür zwei aufeinander folgende stabile Transfektionen mit den Plasmiden pTET-On und pTRE2hyg-Luc, jeweils gefolgt von klonaler Expansion, vor. Nach der ersten liposomalen Transfektion von pTet-On mit Expansion und funktioneller Testung des Transaktivators erwies sich ein weiteres Vorgehen analog des Protokolls aufgrund der begrenzten Proliferationseigenschaften von hMSC als äußerst schwierig. Deshalb wurden in dieser Arbeit zwei Alternativstrategien entwickelt:

Zum einen konnten mit einer transienten Kotransfektion der o. g. Plasmide gute Regulations-eigenschaften erzielt werden. Zum anderen wurde das Plasmid p2in1 generiert, welches die zentralen Elemente der beiden o. g. Plasmide auf einem Vektorsystem vereinigt. Durch die Transfektion dieses Plasmids wurde die induzierbare Genexpression in hMSC wesentlich vereinfacht. Die Prüfung des Plasmids p2in1 mittels des Luziferase-Reportergens zeigte, dass in hMSC grundsätzlich eine induzierbare Genexpression möglich ist, die zudem durch die Konzentration des Induktors Doxycyclin dynamisch reguliert werden kann.

Im letzten Teil der Arbeit wurde die Funktion des Transkriptionsfaktors POU5F1 in hMSC untersucht. POU5F1 gilt als zentraler Vermittler von Pluripotenz in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen), und auch in adulten Stammzellpopulationen konnte seine Expression mit der Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters assoziiert werden. Somit könnte das Feinjustieren der POU5F1-Expression durch ein regulierbares Genexpressionssystem dazu beitragen, in *ex vivo* expandierten hMSC das Stammzellpotential länger aufrecht zu erhalten bzw. zu erweitern. Erste Expressionstests von POU5F1 bestätigen die Wichtigkeit dieses Transkriptionsfaktors hinsichtlich des Proliferationsverhaltens von hMSC.

Zusammenfassend weisen die erzielten Ergebnisse darauf hin, dass die genetische Modifikation von hMSC – insbesondere durch regulierbare Genexpressionssysteme – zum langfristigen Ziel beitragen könnte, Patienten-spezifischen Zell- und Gewebeersatz zu generieren.

B EINLEITUNG

Der nachfolgend beschriebenen Promotionsarbeit liegt die langfristige Zielvorstellung eines weiterführenden Forschungsprojektes zugrunde, durch genetische Modifikationen von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) mittels regulierbarer Genexpression letztlich einen Patienten-spezifischen Zell- und Gewebeersatz generieren zu können.

In diesem Kontext werden daher zunächst einige wesentliche Grundlagen dargestellt hinsichtlich der Charakteristika und möglichen therapeutischen Anwendungen von Stammzellen sowie von effizienten Transfektions- und Genexpressionssystemen einschließlich des für unser Forschungsvorhaben zentralen Zielparameters der Transgenexpression, nämlich des Transkriptionsfaktors POU5F1, eines putativen Vermittlers der Pluripotenz von embryonalen Stammzellen.

B1 STAMMZELLEN

B1.1 Definition

Die Definition des Begriffes »Stammzelle« erfolgt in der Literatur nicht einheitlich. Die beiden wichtigsten Kriterien, die jedoch allen Begriffsbestimmungen zugrunde liegen, sind die Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie die Differenzierung in mindestens einen spezialisierten Zelltyp (Grafi and Avivi, 2004; Smith, 2006). Des Weiteren wird gefordert, dass Stammzellen in der Lage sein müssen, ein Gewebe *in vivo* funktionell zu rekonstituieren (Lakshmipathy and Verfaillie, 2005). Solche Stammzellen finden sich in vielen Organen des adulten Körpers. Sie dienen sowohl der Gewebekomöostase im gesunden Organismus als auch der Regeneration von defektem Gewebe (Mimeault and Batra, 2006). Handelt es sich dabei um Stammzellen, welche lediglich in einen Zelltyp differenzieren, werden diese als unipotent bezeichnet. Hier-von abgegrenzt werden multipotente Stammzellen, die in der Lage sind, mehrere Zelltypen hervorzubringen. Diese Zellen können aus den verschiedensten adulten Geweben isoliert werden. Pluripotente Stammzellen hingegen, welche die Fähigkeit besitzen, in alle drei Keim-blätter zu differenzieren (Tab. 1) und damit die über 200 Zelltypen des Körpers zu bilden, können nicht aus adultem Gewebe isoliert werden, sie sind vielmehr embryonalen Ursprungs (Thomson et al., 1998). Als totipotent wird eine befruchtete Eizelle bezeichnet, aus der sowohl alle Zellen des Körpers als auch der Trophoblast hervorgehen. Letzterer ist für die Nidation und somit für das Überleben des sich entwickelnden Embryos unabdingbar (Lakshmipathy and Verfaillie, 2005).

Tab. 1 Die drei Keimblätter des Säugetierorganismus und die sich daraus entwickelnden Strukturen (verändert nach www.embryology.ch).

Entoderm	Mesoderm	Ektoderm
Verdauungstrakt	Knochen	Haut
Leber	Skelettmuskulatur	Nervensystem
Pankreas	Bindegewebe	Sinnesorgane
Schilddrüse	glatte Muskulatur der Eingeweide	
Thymus	Herz	
Atmungstrakt	Blutgefäße, Blutkörperchen	
Harnblase	Milz	
Harnröhre	Lymphknoten, Lymphgefäße	
	Nieren	
	Keimdrüsen, inneres Genital	

B1.2 Stammzellendifferenzierung

Bisher galt das klassische Paradigma der Stammzellendifferenzierung [(1) in Abb. 1], dessen Vorbild das hämatopoetische System ist: Aus einer undifferenzierten Stammzelle, die sich selbst erneuert, gehen multipotente Progenitorzellen hervor, daraus weitere – in ihrer Potenz eingeschränkte – Vorläuferzellen, aus denen schließlich die entsprechende terminal differenzierte Zelle entsteht (Bryder et al., 2006). Mit der Entdeckung der keimblattübergreifenden Differenzierung von Stammzellen wurde dieses hierarchische System revolutioniert (Blau et al., 2001). Diskutiert werden in der aktuellen Literatur vier alternative Wege, die diese Plastizität erklären könnten (Martin-Rendon and Watt, 2003) (Abb. 1):

Die Transdetermination (2) beschreibt einen Prozess, bei der eine Stamm- bzw. Vorläuferzelle zu einer anderen Stammzelle umprogrammiert wird und deren Fähigkeit zur Bildung anderer Vorläuferzellen annimmt. Bei der Transdifferenzierung (3) kann eine schon differenzierte Zelle den Phänotyp einer anderen differenzierten Zelle erhalten. Ein *in vitro* gut untersuchtes Beispiel dafür ist die Differenzierung von Pankreas- in Leberzellen (Tosh et al., 2002). Die Dedifferenzierung (4) stellt eine weitere Möglichkeit der Zelldifferenzierung dar. Dabei verliert eine Vorläuferzelle zunächst ihren ursprünglichen Differenzierungsstatus, woraufhin sie in eine andere Vorläuferzelle differenziert. So wurde z. B. gezeigt, dass die Zellen des Knochenmarks sich schrittweise zu Vorläufern von Muskelzellen, sog. Satellitenzellen, und anschließend zu mehrkernigen Muskelfasern differenzieren können (LaBarge and Blau, 2002). Die letzte Möglichkeit besteht in der Fusion einer Stammzelle mit einer ausdifferenzierten Zelle (5), woraus ebenfalls differenzierte Zelltypen – allerdings mit verändertem Karyotyp – entstehen können. Dies konnte sowohl *in vitro* (Terada et al., 2002; Song and Tuan, 2004) als auch *in vivo* nachgewiesen werden (Wang et al., 2003).

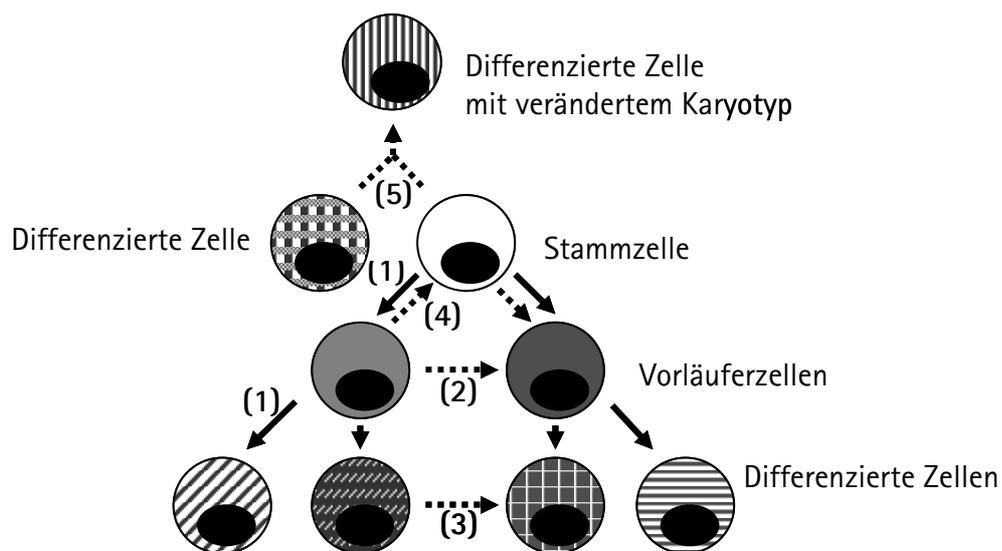


Abb. 1 Das klassische, auch als hierarchisch bezeichnete Modell (1, durchgezogene Pfeile) der Differenzierung adulter Stammzellen und alternative Modelle (gestrichelte Pfeile) der Stammzellendifferenzierung. (2) Transdetermination; (3) Transdifferenzierung; (4) Dedifferenzierung; (5) Zellfusion.

B1.3 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen kommen in den verschiedensten Geweben und Organen des Säugetierkörpers vor und vermitteln dort die gewebespezifische Organregeneration (Korbling and Estrov, 2003). Die sicherlich am besten charakterisierte Stammzellpopulation bilden die hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSC). Ihre Fähigkeit zur Erythro-, Leuko- und Trombopoese ist seit der Entdeckung der HSC (Siminovitch et al., 1963; Wu et al., 1968) bis heute Gegenstand intensiver Forschung (Bryder et al., 2006). Das Knochenmark, welches als Nische der HSC dient (Zhang et al., 2003), beinhaltet darüber hinaus weitere Stammzell- und Progenitorpopulationen (Herzog et al., 2003) wie z. B. endotheliale Progenitorzellen (*endothelial progenitor cells*, EPC) und deren Vorläufer, die sog. Hämangioblasten (Bailey et al., 2004).

Außerdem finden sich hier die mesenchymalen Stammzellen (*marrow stromal cells* oder *mesenchymal stem cells*, MSC) und eine Untergruppe, die sog. *multipotent adult progenitor cells* (MAPC). Die Entdeckung letzterer trug wesentlich zur oben beschriebenen Revision des klassischen Modells der Stammzellendifferenzierung bei. So kann diese adulte Stammzellpopulation sowohl in mesodermale und neuroektodermale als auch in entodermale Zelltypen, d. h. keimblattübergreifend differenzieren (Jiang et al., 2002a). Diese Eigenschaft wird auch als Plastizität bezeichnet.

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) wurden erstmals vor über 30 Jahren beschrieben (Friedenstein et al., 1976). Eine wesentliche Erkenntnis dieser Arbeit bestand darin, dass eine kleine Fraktion von Stammzellen aus dem Knochenmark über die selektive Adhärenz an Plastik aufgereinigt und expandiert werden kann. Inzwischen wurden hMSC auch aus Fettgewebe (Zuk et al., 2002) und fetaler Lunge (in't Anker et al., 2003) isoliert. Ferner wurde nachgewiesen, dass sich diese Zellen *in vitro* und *in vivo* in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten differenzieren lassen (Friedenstein et al., 1987; Pittenger et al., 1999). Außerdem kann sich diese Stammzellpopulation in Muskelgewebe differenzieren (Ferrari et al., 1998). Entsprechend finden sich hMSC nach Infusion *in vivo* in vielen Geweben wieder (Devine et al., 2003).

hMSC grenzen sich von hämatopoetischen Stammzellen durch die Abwesenheit der hämatopoetischen Stammzellmarker CD 45 und CD 34 ab. Sie sind positiv für CD 90 (Thy-1), CD 105 (Endoglin, SH2), CD 106 (VCAM-1), SH3 und STRO-1 (Pittenger et al., 1999).

Wenngleich zwar eine Differenzierung der hMSC in verschiedene mesodermale Richtungen initiiert werden kann, so sind weder die hMSC selbst als Ausgangspunkt der Differenzierung noch die molekularen Mechanismen, die diese Differenzierung steuern, ausreichend charakterisiert (Vaananen, 2005). Somit sind grundlegende Untersuchungen vor dem therapeutischen Einsatz unerlässlich (Polak and Bishop, 2006).

B1.4 Embryonale Stammzellen

Wie in Abschnitt B1.1 beschrieben zeichnen sich embryonale Stammzellen (*embryonic stem cells*, ES-Zellen) durch das Potential aus, alle Zelltypen des Körpers hervorzubringen. Diese Zellen und daraus abgeleitete diverse Gewebe auch *in vitro* durch entsprechende Bedingungen wie z. B. durch Zugabe von Zytokinen herzustellen, ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen. Ein prominentes Beispiel hierfür stellt die Generierung von Eizellen und Spermien aus ES-Zellen dar (Surani, 2004; Ko and Scholer, 2006).

Die ersten murinen ES-Zellen wurden vor über 25 Jahren aus der inneren Zellmasse einer Blastozyste gewonnen (Evans and Kaufman, 1981). Humane ES-Zellen wurden im Jahr 1998 zum ersten Mal isoliert (Thomson et al., 1998) und stehen seitdem in der öffentlichen Diskussion (Gruen and Gabel, 2006). Um Individuen-spezifische ES-Zellen zu generieren, gibt es derzeit im Tiermodell die Möglichkeit des Kerntransfers (*nucleus transfer technique*). Dafür wird einer entkernten Eizelle der Kern einer Körperzelle injiziert, und anschließend werden aus der sich entwickelnden Blastozyste die ES-Zellen gewonnen. Derartige embryonale Stammzellen werden als *nuclear transfer* (NT) ES-Zellen bezeichnet (Meissner and Jaenisch, 2006). Großes Aufsehen (Phimister and Drazan, 2004; Kennedy, 2004) erregte die Behauptung der Gewinnung humaner NT ES-Zellen (Hwang et al., 2004; Hwang et al., 2005), die ein halbes Jahr später widerrufen wurde (Kennedy, 2006). Eine weitere Ressource von ES-Zellen ergibt sich aus überzähligen Embryonen nach *in vitro*-Fertilisation sowie aus Embryonen, die gezielt zur Durchführung einer Präimplantationsdiagnostik hergestellt worden sind. Dabei lässt man das befruchtete Ei *in vitro* bis zum Achtzellstadium heranreifen. Bisher wurde dann eine dieser acht Zellen entnommen, ohne dabei den Embryo zu schädigen, um diese auf genetische Prädispositionen zu untersuchen. Dieselbe Strategie kann jetzt auch dazu verwendet werden, um aus einer Zelle eine genetisch identische Blastozyste und daraus wiederum eine embryonale Stammzelllinie zu generieren (Chung et al., 2006).

Dem therapeutischen Potential von humanen ES-Zellen stehen neben ethischen auch soziale, juristische, medizinische und finanzielle Bedenken gegenüber (Gruen and Gabel, 2006; Daley et al., 2007). Ohne Zweifel aber führte und führt die Forschung an ES-Zellen zu wichtigen Erkenntnissen im Hinblick auf die Charakterisierung der Stammzellen und insbesondere der molekularen Regulationsmechanismen, die der Selbsterneuerung und der Differenzierung zugrunde liegen. So konnte z. B. durch die Identifikation von Faktoren, die den Stammzellcharakter aufrechterhalten, die bislang aufwändige Kultivierung von ES-Zellen vereinfacht werden (Ying et al., 2003) (s. B4 und E3). Darüber hinaus sollen diese Erkenntnisse grundlegende Prinzipien aufdecken, die vor allem für die Entwicklung von Therapien von Interesse sind (Polak and Bishop, 2006). ES-Zellen gelten somit als individuell maßgeschneidertes Allheilmittel mit bisher ungeahnten Möglichkeiten. Seit Jahren schwelt der unversöhnliche Konflikt um den schmalen Grat zwischen ethischen Bedenken und wissenschaftlichem Fortschritt, um die Grenzen der Machbarkeit und den Beginn menschlichen Daseins – ohne Aussicht auf eine baldige Lösung (Schelp, 2007).

B1.5 Therapeutische Ansätze

Der Einsatz hämatopoetischer Stammzellen im Rahmen von Knochenmarkstransplantationen ist seit langem als Therapieform vieler maligner und nicht-maligner Erkrankungen des Blutsystems etabliert. Wie viele experimentelle Studien zeigen, birgt auch die Anwendung anderer Stammzellen ein hohes therapeutisches Potential, vor allem im Hinblick auf die Geweberekonstruktion, dem sog. *tissue engineering* (Mimeault and Batra, 2006). Prinzipiell unterscheidet man hier die Mobilisation körpereigener Zellen von der systemischen Injektion oder Transplantation von Stammzellen. Die beiden letztgenannten Methoden können in Kombination mit einem Gentransfer eingesetzt werden, um z. B. genetische Erkrankungen zu heilen (Krebsbach et al., 2003). Eine neue Möglichkeit der Heilung von Gendefekten konnte die Arbeitsgruppe von R. Jänisch im Mausmodell zeigen. Dafür wird der Kern einer somatischen Zelle in eine entkernte Eizelle gebracht, um daraus Individuen-spezifische ES-Zellen zu generieren. In diesen wird der Gendefekt via Gentransfer repariert, anschließend werden die Zellen entsprechend differenziert und reimplantiert (Rideout et al., 2002).

Insbesondere hMSC geraten zunehmend in den Fokus vieler Grundlagen- und Anwendungsorientierter Forschungsanstrengungen. Vor allem ihre Differenzierungsfähigkeit, gepaart mit der ethisch unbedenklichen Gewinnung aus dem Knochenmark machen hMSC zu einem großen Hoffnungsträger im klinischen Einsatz. Hierbei gewinnt die therapeutische Geweberekonstruktion, welche unter anderem die Herstellung von Knochen- und Knorpelgewebe umfasst, immer mehr an Bedeutung (Bianco and Robey, 2001).

In der Kardiologie führte die Transplantation autologer Stammzellen des Knochenmarks, die nach Myokardinfarkt intrakoronar oder infarktnah appliziert wurden, in einer Phase I-Studie zu einer Verbesserung klinisch messbarer Parameter (Strauer et al., 2002; Stamm et al., 2003). Allerdings ist umstritten, ob diese positiven Effekte auf eine tatsächliche Differenzierung von Stammzellen aus dem Knochenmark (wie z. B. HSC) in Kardiomyozyten zurückzuführen sind (Balsam et al., 2004; Murry et al., 2004). Ausgehend von diesen Ergebnissen wird – nicht nur im Zusammenhang mit dem Einsatz von Stammzellen bei Myokardinfarkt – vor zu frühen Hoffnungen auf eine verbesserte Patientenversorgung gewarnt (Chien, 2004).

Ein weiteres Anwendungsgebiet von Wissen um die Stammzellbiologie liegt in der Übertragbarkeit auf die Tumorbologie. Das tiefere Verständnis der molekularen Steuerungsmechanismen zeigt immer deutlichere Zusammenhänge zwischen Tumorzellen und Stammzellen (Jordan et al., 2006). Die Möglichkeit der Transformation von Stammzellen in sog. Tumorstammzellen wurde unlängst als eine der wesentlichen Ursachen für die Resistenz gegen Tumorthapien erkannt. Dabei stellen genetische bzw. epigenetische Veränderungen die Grundlage für unbegrenzte Proliferation, abweichende Differenzierung und fehlende Apoptose dar (Mimeault and Batra, 2006). Neue Therapieoptionen beabsichtigen, Schlüssel-moleküle in Signaltransduktionskaskaden zu inhibieren, welche bei der Transformation von Stammzellen in Tumor(stamm)zellen beteiligt sind. Hierbei kommt der therapeutischen Einflussnahme des WNT/ β -Catenin-Weges eine besondere Bedeutung zu (Reya and Clevers, 2005; Neth et al., 2006).

B2 TRANSFEKTION VON HUMANEN MESENCHYMALEN STAMMZELLEN

B2.1 Liposomaler Gentransfer

Transfektion beschreibt die Methode, zellfremde DNA in eukaryotische Zielzellen auf physikalischem (z. B. Elektroporation) oder chemischem (z. B. Calciumphosphat-Präzipitation, Lipofektion) Weg einzubringen. Die konstitutive oder induzierbare Expression erfolgt entweder zur Produktion großer Mengen von rekombinanten Proteinen, zur Charakterisierung einzelner Genfunktionen bzw. -mutationen im Hinblick auf den Zellmetabolismus sowie zur transienten oder permanenten Veränderung des zellulären Phänotyps (Colosimo et al., 2000). Die Transfektion ist eine wichtige Alternative zur viralen Gentransduktion (Glover et al., 2005), die zwar häufig mit einer höheren Effizienz (McMahon et al., 2006) einhergeht, aber eine Immunantwort induzieren kann (Stilwell and Samulski, 2004). Außerdem kann das Transgen durch Methylierung inaktiviert werden (Verma, 2003) und dessen Größe ist limitiert (Papapetrou et al., 2005). Ein weiteres Problem besteht darin, dass retrovirale Vektoren vor allem in aktiv transkribierte Bereiche des Genoms der transduzierten Zelle integrieren (Wu et al., 2003) und dadurch zur Mutagenese führen (Hacein-Bey-Abina et al., 2003a; Hacein-Bey-Abina et al., 2003b). Gegenstand vieler aktueller Untersuchungen ist eine neue Methode des nicht-viralen Gentransfers, die Nukleofektion, die elektrische Parameter und spezifische Puffer kombiniert, um die Nukleinsäuren (Plasmide, siRNA) direkt in den Kern einzubringen (Aluigi et al., 2006).

In meiner Arbeit wurde das Prinzip der Lipofektion angewandt, bei der die Permeabilisierung der Zellmembran durch DNA-enthaltende Liposomen vermittelt wird. Hierbei kommt es zunächst zur Komplexbildung aus kationischem Lipid und anionischer DNA. Diese Komplexe können nun mit der Zellmembran interagieren, und die DNA kann in den Zellkern gelangen (Felgner et al., 1987).

B2.2 Transiente Transfektion

Bei der transienten Transfektion besteht das Ziel darin, das von Vektoren kodierte Zielgen temporär in eukaryotische Zellen einzuschleusen. Dabei wird die DNA nicht in das Wirtsgenom integriert, sondern liegt in meist hoher Kopienzahl im Zellkern episomal vor. Dadurch findet die Expression des Transgens in hohem Maße statt. Allerdings wird die episomal vorliegende Plasmid-DNA in einem Zeitraum von wenigen Tagen durch zelluläre Nukleasen abgebaut. Dieser Abbau bewirkt, dass die Expression der transfizierten DNA nur vorübergehend, also transient stattfindet. Die transiente Expression ist immer dann das Mittel der Wahl, wenn die Wirkung des Transgens ausschließlich über einen kurzen Zeitraum (innerhalb von 12 – 72 Stunden) untersucht werden soll (Li and Huang, 2000).

B2.3 Kotransfektion

Die Transfektion zweier oder mehrerer Vektoren für eine gemeinsame Inkorporation in die Zielzellen wird als Kotransfektion bezeichnet. Zu diesem Zweck können in ein und demselben Ansatz mindestens zwei unterschiedliche Nukleinsäuren (DNA und/oder RNA) transfiziert werden. Üblich sind Kotransfektionen von zusätzlichen Marker- und Selektionsgenen insbesondere bei retroviralem Gentransfer (Sambrook, 2001), wenn die transduzierten Vektoren die limitierende Größe des Transgens überschreiten würden. So wird z. B. linearisierte DNA für Selektionsmarker bestehend aus dem Gen, Promotor und Polyadenylierungssignal für einen effizienteren Gentransfer angeboten (www.clontech.de). In der Gentherapie bietet die Kotransfektion von siRNA und Plasmid-DNA (Tseng et al., 1997; Elbashir et al., 2002; Hoelters et al., 2005) die Möglichkeit, gleichzeitig das defekte Gen auszuschalten und ein intaktes Gen zu transferieren (Chamberlain et al., 2004).

B2.4 Stabile Transfektion

Um eine permanente Expression des Transgens in der Wirtszelle zu erreichen, muss das Zielgen dauerhaft in die chromosomale DNA integriert werden (Sambrook, 2001). Durch die Integration in das Wirtschromosom ist das Transgen zudem vom Abbau durch Nukleasen geschützt. Demgegenüber ist die Expression des Transgens aber vom chromosomalen Integrationsort abhängig (Lindemann et al., 2002; Rosenqvist et al., 2002). Zumeist ist die Effizienz dieses stabilen Gentransfers ein bis drei 10er Potenzen niedriger als die der transienten Transfektion. Die Unterscheidung zwischen transientem und stabilem Transfektionsereignis gelingt durch den Einsatz von Selektionsmarkern. Hierbei erfolgt ein Selektionsdruck mittels eines Antibiotikums, der über einen bestimmten Zeitraum auf die Zellen ausgeübt wird. Dazu ist auf den Vektoren eine Antibiotikaresistenz kodiert, die den stabil transfizierten Zellen einen Selektionsvorteil gegenüber lediglich temporär oder nicht-transfizierten Zellen verleiht. Nach Beendigung der Selektion müssen die Kultivierungsbedingungen so gewählt werden, dass die Zellen wieder expandieren können, um auf diese Weise stabil genetisch modifizierte Zellen in ausreichender Menge zu erhalten.

B2.5 Transfektion von Reporterplasmiden in hMSC

Die Transfektion des Reporters »grün fluoreszierendes Protein« (GFP) dient nicht nur zur Bestimmung der Transfektionseffizienz, sondern erlaubt die nicht-invasive Analyse seiner Expression sowohl *in vitro* in der Zellkultur als auch bei der Untersuchung der Zellmigration in Zellverbänden sowie in Organismen *in vivo*, wenn die Tiere GFP-markierte Zellen erhalten haben (Gerdes and Kaether, 1996). Zudem bietet GFP die Möglichkeit, neben Zellen auch einzelne Proteine zu markieren, um so deren Verhalten innerhalb der Zelle zu verfolgen (Wiedenmann and Nienhaus, 2006).

Im Hinblick auf die Anwendung von GFP-markierten hMSC *in vivo* stellte sich zusätzlich die Frage, ob GFP-positive hMSC ihre Differenzierungsfähigkeit beibehalten, was durch Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Dr. P. Neth bejaht werden konnte. hMSC lassen sich nach liposomalem Gentransfer parallel zur GFP-Expression nach wie vor in die adipogene, chondrogene und osteogene Richtung differenzieren (Hoelters et al., 2005). Dagegen wird die Frage nach der Toxizität des GFP noch kontrovers diskutiert. Eine hohe GFP-Expression soll mit einer erhöhten Zytotoxizität einhergehen und auch *in vivo* zu Veränderungen führen (Huang et al., 2000; Martinez-Serrano et al., 2000; Torbett, 2002). Dennoch existieren transgene, konstitutiv GFP-exprimierende Tiere, ohne offensichtliche Nebenwirkungen zu zeigen (Plautz et al., 1996; Okabe et al., 1997; Hadjantonakis et al., 1998; Chan et al., 2001). Auch die Arbeitsgruppe von Dr. P. Neth hält aufgrund ihrer zellexperimentellen Erfahrungen mit transfizierten hMSC eine maßgebliche Toxizität von GFP für eher unwahrscheinlich (Hoelters et al., 2005).

Neben GFP gilt auch die Luziferase als wichtiges Reporterogen. Interessant erscheint die Transfektion der Luziferase-Plasmide insbesondere vor dem Hintergrund der sog. »Molekularen Bildgebung«, die eine nicht-invasive, quantitative und wiederholte Darstellung von Makromolekülen und biologischen Prozessen in lebenden Organismen ermöglicht (Herschman, 2003). Dabei wird die Expression der Luziferase im Tiermodell nicht-invasiv und zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe einer CCD-Kamera (*cooled charged-coupled device*) nach Infusion von D-Luciferin beobachtet. Voraussetzung hierfür ist die vorherige genetische Modifikation mit Luziferase-Genen, entweder durch Herstellung eines transgenen Organismus (Contag, 2002) oder durch Transplantation von transfizierten Zellen (Cao et al., 2006).

Diese neue Methode fand Eingang in die Entwicklung von Medikamenten (Maggi et al., 2004), von Gentherapien bei genetischen Defekten (Bertoni et al., 2006) und in die Krebsforschung (Edinger et al., 2002; Edinger et al., 2003). Inzwischen findet sie auch Verwendung im *tissue engineering* (de Boer et al., 2006) nach Transfektion von hMSC, wobei die Fähigkeit zur Differenzierung – was eine essentielle Stammzeleigenschaft darstellt – erhalten bleibt (Wolbank et al., 2007). Eine toxische Wirkung der Luziferase wurde bislang nicht nachgewiesen.

B3 INDUZIERBARE GENEXPRESSION

B3.1 Tetracyclin-abhängige Genregulation

PRINZIP

Bekanntestes Beispiel einer prokaryotischen Genregulation ist das Lactose-Operon (Jacob and Monod, 1961). Dieses ist definiert als eine Funktionseinheit auf einem DNA-Abschnitt, bestehend aus einem Promotor als Bindungsregion für die RNA-Polymerase, aus dem Operator, der als Ansatzstelle für das Regulatorprotein fungiert, und den zu exprimierenden Genen. Auch für die Tetracyclin-abhängige Genexpression dient ein Operon aus *E. coli* als Modell, das dort die Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum vermittelt. In diesem Fall bindet das Regulationsprotein TetR, ein konstitutiv exprimierter Repressor, an den Operator tetO. In Gegenwart von Tetracyclin bzw. seines Derivates Doxycyclin bindet dieses an den TetR und induziert damit eine allosterische Veränderung, die wiederum eine Ablösung des TetR bewirkt. Dies führt zur Expression eines Kanalproteins, das Tetracyclin (Doxycyclin) im Austausch gegen Protonen aus der Zelle transportiert und somit für die Resistenz der Bakterien verantwortlich ist (Hillen and Berens, 1994).

Dieses Modell wurde in eukaryotische Zellen übertragen, woraus verschiedene Tetracyclin-abhängige Systeme generiert wurden. Zwei, Tet-Off und Tet-On, wurden für diverse Anwendungen eingesetzt und sind in Abb. 2 detailliert dargestellt. Für das Tet-Off-System wurde der optimierte Promotor $P_{hCMV^{-1}}$ verwendet, welcher aus einer Minimalsequenz des humanen CMV-Promotors ($P_{minhCMV}$) (Boshart et al., 1985) und sieben Kopien des Operators tetO (tetO₇) – auch als *tet response element* (TRE) bezeichnet – besteht. Durch die Fusion mit der Transaktivierungsdomäne VP16 des H. simplex Virus wird aus dem Repressor TetR ein Tetracyclin-abhängiger Transaktivator (tTA), der in Abwesenheit von Tetracyclin (Doxycyclin) an die Operatorsequenz TRE bindet und so die Transgenexpression aktiviert. Zugabe von Tetracyclin (Doxycyclin) löst den Transaktivator ab und verhindert die Expression (Gossen and Bujard, 1992).

Durch Punktmutation in der Repressor-Domäne TetR des Transaktivators tTA wurde eine im Phänotyp des Aktivators invertierte Variante, der sog. revers Tetracyclin-abhängige Transaktivator (rtTA) für das Tet-On-System, hergestellt. In Abwesenheit von Tetracyclin (Doxycyclin) nimmt rtTA eine Konformation ein, die eine Interaktion mit den Operatorsequenzen des $P_{hCMV^{-1}}$ verhindert. Erst nach Bindung von Tetracyclin kann rtTA an den Operator binden und dadurch die Transkription induzieren (Gossen et al., 1995). Doxycyclin hat sich – unter anderen Tetracyclin-Derivaten – als die effektivste Substanz im Tet-On-System erwiesen (Freundlieb et al., 1997).

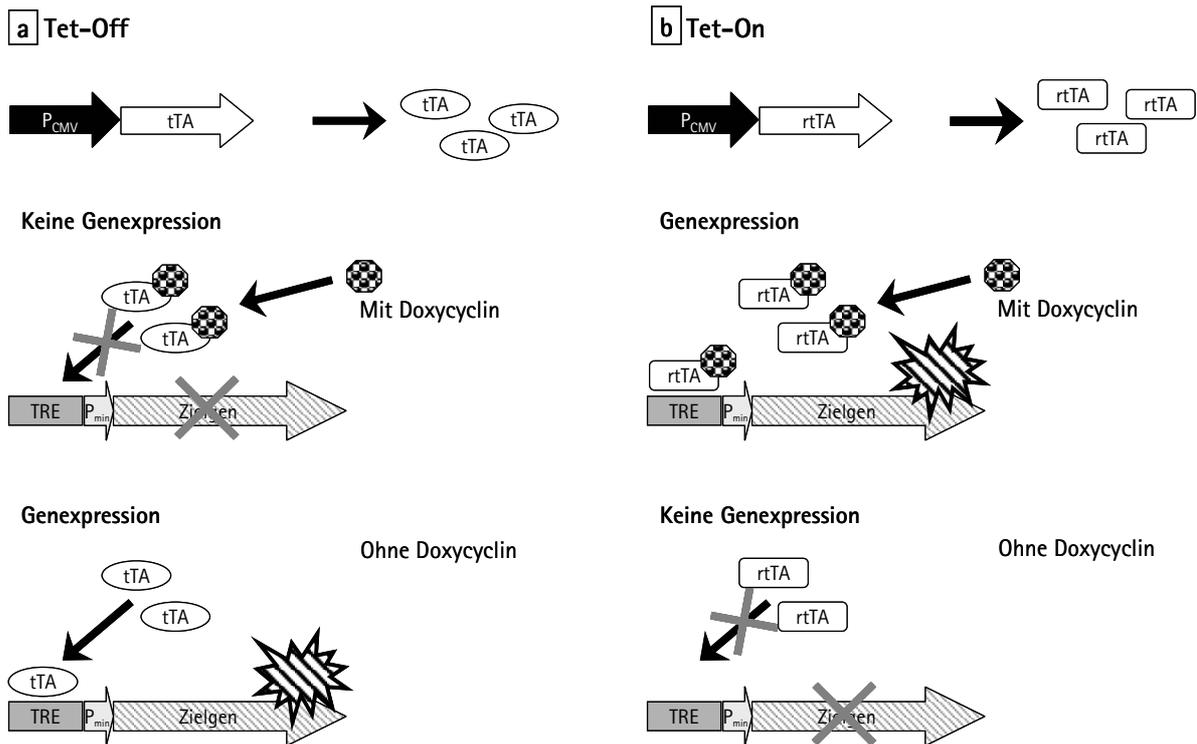


Abb. 2 Schematische Darstellung der Tetracyclin- (Doxycyclin-) abhängigen Genexpression.
a Tet-Off. Während bei Anwesenheit von Doxycyclin die Genexpression reprimiert wird, kann der Transaktivator tTA ohne Doxycyclin an die Operatorsequenzen (TRE) binden und die Genexpression aktivieren.
b Tet-On. Durch Zugabe von Doxycyclin wird die Genexpression induziert, während ohne Doxycyclin rtTA nicht binden kann und die Expression verhindert wird.

ANWENDUNG DER TETRACYCLIN-ABHÄNGIGEN GENEXPRESSION

Die Tetracyclin-abhängige Expression ist das am häufigsten verwendete Regulationssystem, das Eingang in verschiedenste Bereiche gefunden hat (www.tetsystems.com). Die breite Anwendung zeigt sich in der umfangreichen Palette von Organismen, in denen die Tetracyclin-abhängige Genexpression eingesetzt wird. Sie umfasst Einzeller wie *Plasmodium falciparum* (Meissner et al., 2005), Insekten wie z. B. *Drosophila melanogaster* (Wang et al., 2005) und Pflanzen wie Tabak (Weingartner et al., 2003). Die bedeutendsten Ergebnisse erhielt man bei Untersuchungen mit transgenen Mäusen, deren Generierung durch verschiedene verfügbare Mauslinien vereinfacht ist. Beispielsweise wurden Mauslinien beschrieben, die den Transaktivator tTA bzw. rtTA – je nach Fragestellung auch unter der Kontrolle eines Gewebespezifischen Promotors – in den entsprechenden Organen stabil exprimierten. Gleichzeitig wurden Mauslinien generiert, welche die zu untersuchenden Gene unter der Kontrolle des Promotors $P_{hCMV^{-1}}$ enthielten. Durch Kreuzung von Mäusen aus beiden Gruppen entstanden doppelt-transgene Tiere, die das zu untersuchende Gen Tetracyclin-abhängig in dem entsprechenden Gewebe exprimieren konnten (Baron and Bujard, 2000; Gawlik and Quaggin, 2005). Die Applikation des Doxycyclins erfolgte dabei durch das Trinkwasser (Kistner et al., 1996). So ergibt sich die Möglichkeit einer zeitlichen wie auch räumlichen Kontrolle zur Aktivierung des Transgens.

Die Kombination mit den neuen Technologien der »Molekularen Bildgebung« (s. B2.5) erlaubt die *in vivo*-Analyse von Genfunktionen und Signalwegen im Hinblick auf Entwicklungs- und Krankheitsprozesse (Hasan et al., 2001). Des Weiteren ermöglicht die induzierbare Expression einer Rekombinase die Deletion eines entsprechend präparierten Gens zu einem genau definierten Zeitpunkt (Gawlik and Quaggin, 2005).

Auch in der medizinischen Forschung eröffnen sich hierdurch neue Perspektiven für bessere Krankheitsmodelle, um das Entstehen, die Progression und die potentielle Reversibilität bzw. die therapeutischen Beeinflussbarkeit zu untersuchen. Im Rahmen von Gentherapien wurde der Einsatz von Tetracyclin-abhängigen Systemen zur Behandlung von verschiedenen Erkrankungen gezeigt. So führte z. B. in einer Studie die induzierte Interferon α -Expression zur Inhibition der Virusreplikation in einem Hepatitis C-Modell in der Maus (Auricchio et al., 2005). Einen aktualisierten Überblick über klinische Studien mit Gentherapien findet sich unter <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>. Auch im Bereich des *tissue engineering* (Sanchez-Bustamante et al., 2006) und in der Aufklärung des Stammzellcharakters auf genomischer Ebene (Ivanova et al., 2006) ist diese Technologie von Interesse.

B3.2 Weiterentwicklung der induzierbaren Genexpression

Das in B3.1 beschriebene Prinzip wurde Modell für weitere Genregulationssysteme basierend auf anderen prokaryotischen Antibiotika-Resistenz-Operons wie z. B. der Makrolidresistenz von *E. coli* (E-ON und E-OFF: Weber et al., 2002a) oder der Streptograminresistenz von *Streptomyces pristinaespiralis* (Fussenegger et al., 2000; PIP-OFF und PIP-ON: Weber et al., 2002b).

Andere Genexpressionssysteme wie z. B. die Ecdyson-abhängige Genregulation orientieren sich an der endogenen Steroidhormonregulation (Yao et al., 1993) unter der Verwendung modifizierter intrazellulärer Rezeptoren. Eine weitere Möglichkeit für Genexpressionskontrolle beruht auf dem Prinzip der Protein-induzierten Dimerisierung. So führt z. B. erst die Zugabe des Induktors Rapamycin zu funktionsfähigen Proteinen, die als Transaktivator oder Translationsfaktor dienen (Rivera et al., 1996; Schlatter et al., 2003). Darüber hinaus kann durch andere Systeme eine proteinfreie Translationskontrolle erreicht werden, wie dies z. B. für die aus *Schistosoma mansoni* isolierten Ribozymen gezeigt wurde (Yen et al., 2004).

Während die beschriebenen Systeme zur Expression eines einzelnen Transgens in der Grundlagenforschung und auch im Tiermodell bereits routinemäßig Anwendung finden, geht die Forschung an Kontrollsystemen der zweiten Generation weiter (Weber and Fussenegger, 2006). Sie sollen die gleichzeitige Expression mehrerer Transgene erlauben. Für die unabhängige Regulation zweier Transgene lassen sich o. g. Induktionssysteme kombinieren. Dafür wird ein Vektor mit den Transaktivatoren und ein zweiter Vektor mit Zielgenen hinter den entsprechenden Promotoren transfiziert (Moser et al., 2001).

Eine Studie zeigte, wie Myoblasten – nach Transfektion zweier unabhängig voneinander regulierten Proteinen (*msx* und *myoD*) und deren Transaktivatoren – je nach induziertem Proteinstmuster in verschiedene Phänotypen differenzierten. Die gleichzeitige Expression beider Faktoren führte zu Adipozyten, die alleinige Expression von *msx* zu Osteoblasten und die von *myoD* zu Muskelzellen (Fux et al., 2004).

Die Verknüpfung der beschriebenen Regulationssysteme ist auf mannigfaltige Weise vorstellbar. Es wurden höhergradige Schaltkreise und synthetische Gennetzwerke entworfen, die komplexere Signale verarbeiten konnten. Parallel- oder Serienschaltungen sowie Konstruktionen von Promotoren, die die Operatorsequenzen verschiedener Systeme beinhalten, waren Mittel zum Aufbau logischer Module basierend auf dem Vorbild der Booleschen Operationen (Kramer et al., 2004a). Durch entsprechende Kombination verschiedener Antibiotika konnte über eine Regulationskaskade aus »Alles-oder-Nichts«-Signalen (Zugabe oder keine Zugabe des Antibiotikums) eine graduierte Expression des Transgens erreicht werden (Kramer et al., 2003). Aktuelle Fortschritte beschrieben Netzwerke mit intrinsischer Speicherfunktion (Kramer and Fussenegger, 2005) und die Möglichkeit des epigenetischen Umschaltens. So konnte durch einmalige transiente Zugabe eines Antibiotikums die Transgenexpression dauerhaft an- bzw. abgeschaltet werden (Kramer et al., 2004b).

Eine neue Generation an Systemen zieht für die optimale therapeutische Dosierung der Transgenexpression auch die endogene physiologische Situation in Betracht. Die Hypoxie-induzierte Transgenexpression, die aus dem physiologischen Hypoxie-induziertem Faktor alpha (*HIF-1 α*) und dessen Bindungssequenz (*hypoxie response element*) abgeleitet wurde, kann zur Krebstherapie genutzt werden, da im Zentrum von soliden Tumoren meist ein reduzierter Sauerstoffpartialdruck vorliegt. Gerade diese Tumorzellen sind resistent gegenüber Chemo- und Radiotherapie (Brown and Wilson, 2004), so dass sich hier die durch Hypoxie-induzierte Expression von toxischen Proteinen anbietet (Ozawa et al., 2005). Um bei dieser physiologischen Induktion auch Einfluss auf die Genexpression zu nehmen, wurde der Transaktivator des Tet-Off-Systems unter die Kontrolle des Hypoxie-induzierbaren Promotors gestellt, um letztlich – unter hypoxischen Bedingungen – die Genexpression durch Tetracyclin zu kontrollieren (Payen et al., 2001).

B4 DER TRANSKRIPTIONSFAKTOR POU5F1

B4.1 Eukaryotische Genregulation

Während die in B3 beschriebenen prokaryotischen Bauprinzipien der Regulationssysteme kopiert wurden, um Gene von außen regulierbar zu exprimieren, handelt es sich bei dem Transkriptionsfaktor POU5F1 um einen endogenen eukaryotischen Regulator der Transkription. Eukaryotische Transkriptionsfaktoren binden an bestimmte DNA-Sequenzen in Zielgenen und stimulieren oder hemmen dadurch die Transkription. Man spricht auch von »transaktivierenden« Proteinen, die an »cis-aktivierende« Sequenzen binden können. Dabei unterscheidet man die Promotorregion von den Enhancersequenzen, an welche die basalen Transkriptionsfaktoren bzw. die Zell- und Gewebe-spezifische Transkriptionsfaktoren binden. Letztere werden – im Gegensatz zu den basalen Transkriptionsfaktoren – nicht in allen Zellen exprimiert, sondern nur in bestimmten Gewebe- bzw. Zelltypen und zwar zu ganz bestimmten Zeitpunkten. Jedoch erst die Kombination mit weiteren Faktoren bewirkt die Spezifität der Transkription oder Repression des entsprechenden Gens (Villard, 2004), da es in Eukaryoten weit weniger Transkriptionsfaktoren als Gene (20.000 bis 25.000) gibt (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Denn insgesamt kodieren in Säugern etwa 5 bis 10 % aller Gene für an der Transkription beteiligte Proteine (Wegner, 2005), wobei speziell in humanen embryonalen Stammzellen dieses Verhältnis zugunsten letzterer verschoben ist (Boiani and Scholer, 2005).

Transkriptionsfaktoren besitzen mindestens zwei wichtige Domänen, um ihre Funktion ausüben zu können. Eine Domäne ist die Transaktivierungsdomäne, welche die Transkription des Gens, an dessen Promotor oder Enhancer der Transkriptionsfaktor gebunden hat, aktiviert oder vermindert. Zudem ist eine DNA-Bindedomäne (DNA-BD) entscheidend, die eine bestimmte, meist spezifische DNA-Sequenz erkennen und daran binden kann (Herr and Cleary, 1995). Aufgrund der DNA-BD werden die Transkriptionsfaktoren in verschiedene Familien eingeteilt. Zu der Familie der Homöodomänen-Proteine zählen neben Hox-, LIM- oder Pax-Proteine auch die POU-Proteine.

B4.2 Genomische Struktur des Transkriptionsfaktors POU5F1

Das Gen POU5F1, auch bekannt als *octamer binding protein 4* (Oktamer-Bindeprotein 4, OCT-3, OCT-4, OCT-3/4, OTF3, OTF4, OTF3-RS7, OTF3G, NF-A3; genomisch: NM_007592; POU5F1_iA-mRNA: NM_002701.4; POU5F1_iB-mRNA: NM_203289) kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der zur POU-Familie (Pit-Oct-Unc) gehört (Scholer et al., 1990b). Der Name POU ist von den drei Säuger-Transkriptionsfaktoren Pit (Bodner et al., 1988), Oct-1 (Sturm et al., 1988) bzw. Oct-2 (Clerc et al., 1988) sowie von Unc-86 aus *Caenorhabditis elegans* (Finney and Ruvkun, 1990) abgeleitet (Andersen and Rosenfeld, 2001). Sie sind durch ein nur in diesen Faktoren vorkommendes DNA-Bindungsmotiv, die POU-Domäne, charakterisiert (Herr et al., 1988).

Bei Mensch und Maus ist die chromosomale Umgebung des POU5F1-Genortes hoch konserviert; auch ist die Syntenie mit dem Haupt-Histokompatibilitätskomplex-Locus (*major histocompatibility complex*, MHC) erhalten. Bei der Maus liegt das Gen auf Chromosom 17 (Scholer et al., 1990a) und beim Menschen auf Chromosom 6 (Takeda et al., 1992; Guillaudeux et al., 1993), beide jeweils innerhalb oder benachbart zum MHC-Locus. Die POU5F1-Expression ist reguliert durch eine Kombination von cis-Elementen, Transkriptionsfaktoren und epigenetischen Modifikationen (Gu et al., 2006).

Durch die Analyse von lacZ-Reportergenen unter der Kontrolle von verschiedenen genomischen POU5F1-Fragmenten der Maus konnten regulatorische Regionen identifiziert werden, die für die POU5F1-Expression in verschiedenen Zelltypen des frühen Mausembryos notwendig sind (Yeom et al., 1996). Mehrfache Untersuchungen zeigten den Zusammenhang zwischen der Methylierung der regulatorischen Region von POU5F1 und der transkriptionellen Aktivität (Ben Shushan et al., 1993; Gidekel and Bergman, 2002; Hattori et al., 2004; Simonsson and Gurdon, 2004; Taranger et al., 2005; Yamazaki et al., 2006). In Abb. 3a ist die genomische Struktur des POU5F1-Gens dargestellt.

B4.3 Proteinstruktur und Bindungseigenschaften des Transkriptionsfaktors POU5F1

Im Gegensatz zur Maus kodiert das menschliche POU5F1 Gen für zwei Protein-Isoformen – genannt POU5F1_iA und POU5F1_iB – die durch alternatives Spleißen entstehen (Abb. 3b). POU5F1_iA und POU5F1_iB bestehen aus 360 bzw. 265 Aminosäuren (AS), wovon 225 identisch sind. Diese entsprechen der POU-Domäne und der C-terminale Transaktivierungsdomäne (Takeda et al., 1992) (Abb. 3c).

Die POU-Domäne umfasst 150 bis 160 Aminosäuren (Herr et al., 1988). Sie besteht aus einer variablen, C-terminal gelegenen POU-Homöodomäne (POU_h) von 60 AS, die über einen nicht-konservierten Linker von 15 bis 56 AS mit einer hoch konservierten POU-spezifischen Domäne (POU_s) aus 74 bis 82 AS verbunden ist (Verrijzer and van der Vliet, 1993; Wegner et al., 1993; Ryan and Rosenfeld, 1997) (Abb. 3c). Sog. Oktamer-bindende Proteine (*octamer-binding*, Oct), von denen die meisten zur Familie der POU-Proteine gehören, binden an eine Oktamersequenz (ATGCAAAT) und können dadurch die betreffenden Zielgene aktivieren (Verrijzer et al., 1990; Verrijzer et al., 1992; Klemm et al., 1994). Die POU-Domäne ist flankiert von zwei Transaktivierungsdomänen. Während die N-terminale Domäne in einer Vielzahl von Zellen aktiv ist, hängt die Aktivität der C-terminalen Domäne vom Zelltyp ab (Brehm et al., 1997).

Bisher waren nur wenige Zielgene von POU5F1 bekannt. Diese waren vornehmlich mit subtraktiver Hybridisierung identifiziert worden (Diatchenko et al., 1996; Diatchenko et al., 1999). Kürzlich konnten aber zwei Arbeitsgruppen die Bindungsstellen von POU5F1 und zwei weiteren Transkriptionsfaktoren, nämlich *SRY-box containing gene 2* (SOX2) und Nanog, im gesamten Genom identifizieren (Boyer et al., 2005; Loh et al., 2006) (s. E3.3).

Auch über Interaktionspartner herrscht weitgehend Unklarheit. Näher erforscht sind hier vor allem die Wechselbeziehungen mit SOX2, dessen Bindungsstelle häufig in unmittelbarer

Nachbarschaft des cis-Elementes von POU5F1 liegt (Remenyi et al., 2003; Boyer et al., 2005; Wissmuller et al., 2006). Durch Bildung eines Heterodimers aktivieren die beiden Transkriptionsfaktoren z. B. die Expression des *fibroblast growth factor 4* (FGF4) (Feldman et al., 1995; Yuan et al., 1995; Ambrosetti et al., 1997). Als Koaktivatoren wurden außerdem virale Onkoproteine wie das adenovirale E1A (Scholer et al., 1991) und das Tumorprotein EWS des Ewing-Sarkoms (Lee et al., 2005a) identifiziert. Zudem wurden in der Maus weitere assoziierte Proteine von POU5F1 bestimmt (Wang et al., 2006).

Offensichtlich ist, dass POU5F1 eine Vielzahl an Mechanismen nützt, um Gene zu regulieren. Neben der beschriebenen Aktivierung bzw. Koaktivierung kann POU5F1 auch als Repressor wirken (Pan et al., 2002).

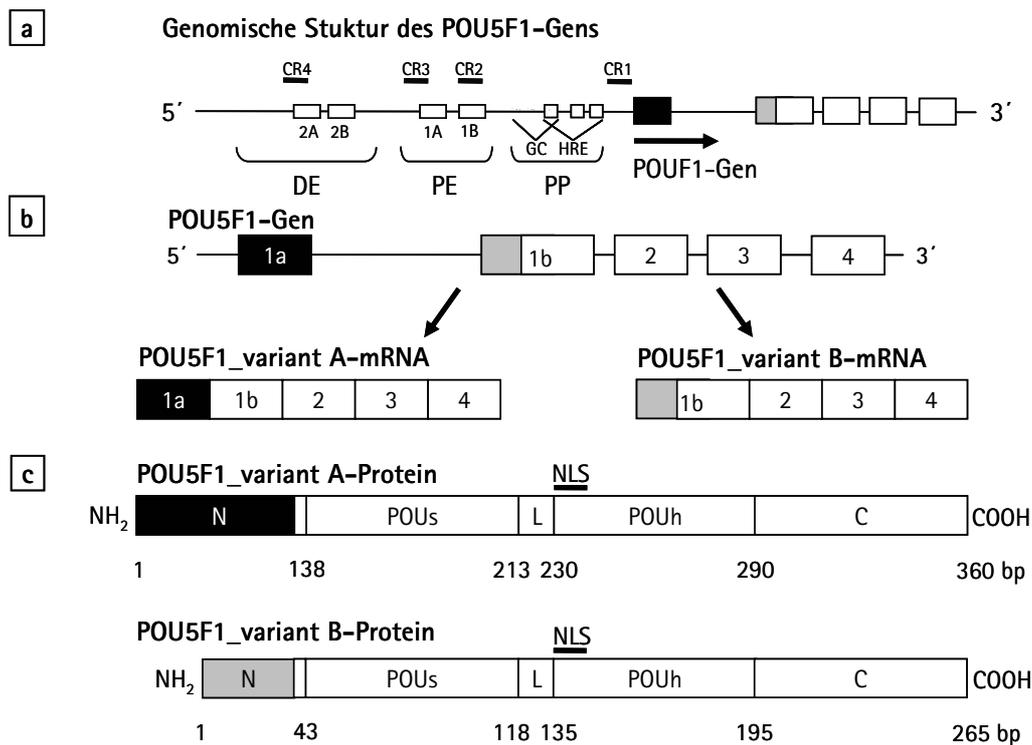


Abb. 3 Struktur von POU5F1_{iA} und POU5F1_{iB}.

a Genomische Struktur des POU5F1-Gens. Der ~24 kb lange Abschnitt beinhaltet regulatorische Elemente, wie den proximalen Promotor (PP) mit den *hormone response elements* (HRE) und der *GC-Box* (Sylvester and Scholer, 1994; Schoorlemmer et al., 1994), den proximalen Enhancer (PE) mit den cis-aktiven Elementen 1A und 1B (Okazawa et al., 1991) und den distalen Enhancer (DE) mit den cis-aktiven Elementen 2A und 2B (Minucci et al., 1996; Okumura-Nakanishi et al., 2005). Das Gen selbst ist in fünf Exons unterteilt (modifiziert nach Ovitt and Scholer, 1998). Der Vergleich der stromaufwärts liegenden Sequenzen bei Mensch, Rind und Maus ergab vier konservierte Regionen (*conserved regions*, CR) von CR1 bis CR4, wobei CR2 und CR3 im PE und CR4 im DE liegen. CR1 befindet sich direkt vor Exon 1 (Nordhoff et al., 2001; Yang et al., 2005).

b Alternatives Spleißen des POU5F1-Gens generiert zwei Varianten, genannt POU5F1_{variant A} und POU5F1_{variant B}. Diese mRNAs kodieren für die Isoformen POU5F1_{iA} und POU5F1_{iB}, die sich in der Aminosäuresequenz am N-terminalen Ende unterscheiden (modifiziert nach Takeda et al., 1992).

c Die Isoformen POU5F1_{iA} und POU5F1_{iB} bestehen aus 360 bzw. 265 Aminosäuren, wobei die C-terminalen 225 identisch sind. Während die N-terminale Aktivierungsdomäne sich unterscheidet, sind die POU-spezifische Domäne (POUs), die Linker-Region (L), die POU-Homöodomäne (POU_h) und die C-terminale Transaktivierungsdomäne identisch. Beide enthalten eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) am Beginn von POU_h (modifiziert nach Cauffman et al., 2006).

B4.4 POU5F1 als zentraler Regulator der Pluripotenz?

Lange Zeit galt der Transkriptionsfaktor POU5F1 als einziger Schlüsselfaktor der Pluripotenz, der Selbsterneuerung und der Differenzierung (Pesce and Scholer, 2000; Pesca and Scholer, 2001). Er wurde von drei unabhängigen Forschergruppen zunächst in Extrakten von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) bzw. embryonalen Karzinom-Zellen entdeckt (Scholer et al., 1989; Okamoto et al., 1990; Rosner et al., 1990), was zu der Vermutung führte, dass POU5F1 in der frühen embryonalen Entwicklung eine Rolle spielen könnte. Die zugesprochene Funktion als zentraler Regulator beruht primär auf Untersuchungen der POU5F1-Expression in der Maus (Palmieri et al., 1994; Yeom et al., 1996; Ovitt and Scholer, 1998), da die orthologen Gene hoch konserviert sind (Cauffman et al., 2005). Große Bedeutung erlangte dabei eine Studie, bei der POU5F1-defiziente Mausembryonen zwar das Blastozystenstadium erreichten, deren innere Zellmasse (*inner cell mass*, ICM) aber nicht mehr pluripotent war, sondern Trophoektoderm-spezifisches Protein exprimierte (Nichols et al., 1998). Auch für das Überleben der Keimbahnzellen scheint POU5F1 essentiell zu sein, denn eine Keimzell-spezifische Deletion von POU5F1 führt zur Apoptose dieser Zellen (Kehler et al., 2004).

Während Untersuchungen in der Maus auf dem Nachweis der Transkription beruhten (Abdel-Rahman et al., 1995; Hansis et al., 2001), wurde die Expression des Transkriptionsfaktors POU5F1 in der menschlichen Entwicklung 2005 auf Proteinebene mittels Immunhistochemie analysiert (Cauffman et al.). Dabei zeigten sich große Diskrepanzen, die POU5F1 als zentralen Regulator in Frage stellen. So ist vor allem dessen Expression im Zytoplasma vor Bildung der Morula wahrscheinlich auf andere Funktionen als Transkriptionsregulation zurückzuführen (Cauffman et al., 2005; Cauffman et al., 2006). Auch in der Morula wurde eine gleichstarke Expression auf Proteinebene gezeigt, während hier bisher eine starke Abnahme der Expression im Trophektoderm gegenüber der ICM auf mRNA-Ebene nachgewiesen wurde (Hansis et al., 2000; Huntriss et al., 2004).

B5 AUFGABENSTELLUNG

Die genetische Modifikation von hMSC mittels induzierbarer Genexpression erscheint als ein viel versprechendes Mittel, um komplexe molekulare Steuerungsmechanismen zu untersuchen. Zudem könnte sie dazu genutzt werden, die begrenzten Stammzeleigenschaften von hMSC hinsichtlich des Differenzierungspotentials und der Selbsterneuerung zu erweitern, damit letztlich ein Patienten-spezifischer Gewebeersatz generiert werden kann.

In meiner Promotionsarbeit sollten zunächst Plasmide mit den Reportern EGFP und Luziferase in hMSC transient und stabil mit liposomalem Gentransfer eingebracht werden, um die Zellen zu markieren und die Gen-Expression des Reportergens zu quantifizieren. Ein weiteres Ziel stellte die Etablierung des Tet-On-Systems mittels liposomalen Gentransfers dar. Dabei sollten auch Alternativstrategien zu diesem System entwickelt werden. Schließlich sollte in diese regulierbaren Expressionsplasmide der Transkriptionsfaktor POU5F1, der in embryonalen Stammzellen für deren Pluripotenzeigenschaften mitverantwortlich ist, kloniert werden, um dessen Wirkung in hMSC zu untersuchen.

Im Einzelnen sollten dabei folgende Fragestellungen geklärt werden:

- Was sind die optimalen Bedingungen zur transienten und stabilen nicht-viralen Transfektion von verschiedenen Reporterplasmiden in hMSC?
- Ist die Etablierung des Genregulationssystems Tet-On in hMSC mit nicht-viralem Gentransfer möglich?
- Mit welchen Alternativen bzw. genetischen Modifikationen lassen sich die Probleme lösen, die sich aus dem üblichen Vorgehen zur Etablierung des Tet-On-Systems in verschiedenen Zellsystemen ergeben?
- Kann durch die quantitativ regulierbare Expression des Transkriptionsfaktors POU5F1 das Stammzellpotential von hMSC beeinflusst werden?

C MATERIAL UND METHODEN**C1 MATERIALIEN****C1.1 Geräte**

Airflow, Typ 2-454-FBND	Köttermann, Ütze-Hänigsen
Backschrank, Modell 600	Memmert, Schwabach
Bio Assay Reader, HTS 7000	Perkin Elmer, USA
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank, Typ BE40	Memmert, Schwabach
CO ₂ -Zellkulturbrutschrank, Typ IG150	Jouan, Unterhaching
Digital pH-Meter	Bachhofer, Reutlingen
Digital Still Kamera, MPEG Movie EX	Sony, Köln
Eismaschine	Tritec, Hannover
Elektrische Präzisionswaage, Kern 770-12	Kern&Sohn, Frommern
Elektroporationsapparat, Tap Gene Pulser	Bio-Rad, München
Flachbett-Gelelektrophorese-Apparatur, Modell B1	PeqLab, Erlangen
Gasbrenner, Gasprofi 1	Wartewig, Göttingen
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (-80 °C)	GFL, Burgwedel
Geldokumentationssystem, Image Master VDS	Pharmacia Biotech, USA
Heizblock, HLC, BT 130-2	Medax Nagel GmbH, Kiel
Inkubationsschüttler, Typ Certomat R	Sartorius, Göttingen
Inkubationsschüttler, Typ Unimax 1010	Heidolph, Schwabach
Inverses Fluoreszenzmikroskop IX50	Olympus, München
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlzentrifuge, Typ BR4i	Jouan, Unterhaching
Kühlzentrifuge, Typ CT422	Jouan, Unterhaching
LightCycler II	Roche, Mannheim
Luminometer Mikrolumat LB 96P	Eg&G Berthold, Australia
Magnetrührer	Uni-Equip, Martinsried
Megafuge, Typ 1.0 R	Heraeus Instruments, Hanau
Mikrowellengerät (900 Watt) HF22024	Siemens, Fürth
MRX Microplate Reader	Dynex, Denkendorf
Neubauer-Zählkammer	Plazotta, München
PCR-Multicycler PT-200	Biozym, Oldendorf
Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Routinemikroskop, Axiovert Typ S100	Zeiss, Jena
Schüttler, Rotamax 120	Heidolph, Schwabach
Sicherheitswerkbank, HeraSafe, Typ HS12/2	Heraeus Instruments, Mannheim
Spannungsquelle, Consort E132	PeqLab, Erlangen
Sterilwerkbank, Typ Antares 72	Biohit Antares, USA

Tischzentrifuge, Eppendorf Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge, Typ CT 4.22	Jouan, Unterhaching
UV-Leuchtschirm, Typ TFX-35.M	Vilber Lourmat, Frankreich
Vakuum-Zentrifuge, Typ RC 10.9	Jouan, Unterhaching
Varioklav Dampfsterilisator Typ 300	H&P, Oberschleißheim
Varipipetten, Gilson, Pipetman	Abimed, Langenfeld
Vortex-Genie, Typ G560E	Scientific Industries, USA
Wasserbad, Typ 1012	GFL, Burgwedel
Werkbank, Typ Biocap RNA, DNA	Erlab, Köln

C1.2 Materialien und Substanzen

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, in der Reinheitsstufe »z. A.« von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

Für molekularbiologische Ansätze wurde »Aqua ad injectabilia« der Fa. Braun (Melsungen) verwendet. Wässrige Lösungen wurden mit Aqua dest. sowie Reinstwasser aus dem Reinstwassersystem der Wasseraufbereitung GmbH, Barsbüttel hergestellt.

C1.2.1 Allgemeine Materialien

0,2 ml Eppendorf PCR Gefäße	Eppendorf, Hamburg
1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnberg
2 ml Safe Lock Gefäße	Eppendorf, Hamburg
Acryl-Küvetten	Sarstedt, Nürnberg
BCA-Mikrotiterplatten (farblos)	Nunc, USA
Cloning Discs, Ø 3 bzw. 5 mm	Sigma, Deisenhofen
CyQuant-Messplatten (schwarz)	Corning Costar, USA
Elektroporationsküvetten, 1 bzw. 2 mm	PeqLab, Erlangen
Falkonröhrchen, 15 bzw. 50 ml	Sarstedt, Nürnberg
Kryokonservierungs-Röhrchen	Nalgene, USA
LightCycler Kapillaren	Roche, Mannheim
Mikrotiterplatten für Luziferase-Bestimmung (weiß)	Nunc, USA
Pasteurpipetten	VWR International, Darmstadt
Petrischalen (Ø 92 mm)	Sarstedt, Nürnberg
Polystyrol-Röhrchen, 5 ml	BD Falcon, USA
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nürnberg
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Sterilfiltereinheiten	Nalgene, USA
UV-Küvetten	Eppendorf, Hamburg
Zellkultur Petrischalen, Ø 10 mm	BD Falcon, USA
Zellkulturflaschen, 75 cm ² bzw. 25 cm ²	Nunc, USA
Zellkulturplatten, 6-, 12-, 24- und 48-Kavitäten	Nunc, USA
Zentrifugenbecher	Heraeus Instruments, Hanau

C1.2.2 Substanzen für die Zellkultur

Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
Doxycyclin-free FBS	BD Biosciences, USA
Doxycyclin	BD Biosciences, USA
Fötale Kälberserum (FBS)	Gibco, USA
Geneticin (G418)	Gibco, USA
Hygromycin B	BD Biosciences, USA
L-Glutamin	Cambrex, USA
<i>Lipofectamine 2000</i>	Invitrogen, USA
MSC-Basalmedium	Cambrex, USA
MSC-Growth Supplement	Cambrex, USA
Penicillin/Streptomycin	Cambrex, USA bzw. Gibco, USA
Phosphat Buffered Saline Solution (PBS)	Gibco, USA
ProLong AntiFade Kit	Molecular Probes, USA
Serumalbumin vom Rind (Fraktion V) (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Serum-freies Medium, DMEM	Gibco, USA
TET-System geprüftes FBS	BD Biosciences, USA
Trypanblau	Gibco, USA
Trypsin/EDTA (0,5 % Trypsin, 5,3 mM EDTA)	Gibco, USA

C1.2.3 Zelllinien

HUMANE MESENCHYMALE STAMMZELLEN

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) wurden von der Fa. Cambrex, USA bezogen. Die Zellen wurden mittels einer Knochenmarksbiopsie des posterioren Beckenkamms isoliert und durch Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Ihre Abtrennung von hämatopoetischen Zellen erfolgte durch selektive Adhärenz an Plastik. Die Firma garantiert einen negativen Befund auf HIV, Hepatitis-B und -C, Mycoplasmen, Bakterien und Pilzen sowie die Differenzierungsfähigkeit dieser Zellen in drei mesodermale Richtungen (adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierung). In dieser Arbeit wurden hMSC einer 19-jährigen Spenderin (Kaukasierin) verwendet. Die Spenderin war laut Firmenangabe normalgewichtig und zeigte keine Anzeichen für Herzerkrankungen, Diabetes, Krebs, Epilepsie, andere Organerkrankungen bzw. für virale oder bakterielle Infektionen. Während der Experimente erfolgte in regelmäßigen Abschnitten die Überprüfung der hMSC auf eine Mycoplasmen-Kontamination mit Hilfe des Mycoplasmen-PCR-Kits.

CHO-AA8-LUC TET-OFF KONTROLL-ZELLINIE

Von der Fa. BD Biosciences, USA wurde die Tumorzelllinie CHO-AA8 aus Ovarien chinesischer Hamsterweibchen bezogen und als Kontrolle für Tetracyclin-abhängige Genregulation verwendet (s. C2.2.6). Diese Zelllinie ist doppelt stabil mit den Vektoren pTet-Off und pTRE2hyg-Luc transfiziert.

C1.2.4 Chemikalien für die Molekularbiologie

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Ampicillin, Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen
AMV-cDNA-Synthese Kit	Roche, Mannheim
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Agar	BD Biosciences, USA
Bacto-Hefe-Extrakt	BD Biosciences, USA
Bacto-Trypton	BD Biosciences, USA
CyQuant Cell Proliferation Assay Kit	Molecular Probes, USA
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	R&D Systems, Wiesbaden
DNA-Auftragspuffer (10 \times)	Invitrogen, USA
DNA-Längenstandard 100 bp-Stufen	Invitrogen, USA
DNA-Längenstandard 250 bp-Stufen	Invitrogen, USA
DNA-Längenstandard 50 bp-Stufen	Invitrogen, USA
DNA-Längenstandard, Nr. VII	Roche, Mannheim
DNA-Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	New England Biolabs, Schwalbach
DNase Set	Qiagen, Hilden
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Fluoresceindiacetat	Fluka, Schweiz
Glycerin »ultrapure«	Sigma, Deisenhofen
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Humane cDNA von Testis, Ovar und Pankreas	BD Biosciences, USA
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
LC-Primer Sets	Search-LC, Heidelberg
LC-SybrGreen Kit	Roche, Mannheim
Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity	Roche, Mannheim
N,N-Dimethylformamid	Sigma, Deisenhofen
Natronlauge, 10 M	Apotheke Klinikum Innenstadt, München
NucleoBond Plasmid Maxi EF Kit	Macherey-Nagel, Düren
Pancreatic Ribonuclease A	Sigma, Deisenhofen
Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity	Qiagen, Hilden
Propidiumiodid	Merck, Darmstadt
QIAquick Gel-Extraktions-Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsendonukleasen Typ II	New England Biolabs, Schwalbach, bzw. Roche, Mannheim
Reverse Transkriptase	R&D Systems, Wiesbaden
RNeasy Midi Kit	Qiagen, Hilden
Salzsäure, 2 M	Apotheke Klinikum Innenstadt, München
SeaKem GTG Agarose	FMC BioProducts, USA
SeaKem LE Agarose	FMC BioProducts, USA
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
Topo-TA Cloning Kit pCR2.1-Topo-Vektor	Invitrogen, USA
VenorGeM, PCR Mycoplasmen-Diagnostik Kit	Minerva Biolabs, Berlin
X-Galactose (X-Gal)	Sigma, Deisenhofen

C1.2.5 Bakterienstämme und Nährmedien

BAKTERIENSTÄMME

E. coli TOP10 (Invitrogen, USA)

F⁻, mcrA, Δ(mrr⁻, hsdRMS⁻, mcrBC), Φ80lacZ ΔM15, lacX74, recA1, deoR, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, (StrR), endA1, nupG

E. coli TOP10 F['] (Invitrogen, USA)

F[']{lacIq Tn10 (TetR)}, mcrA, Δ(mrr⁻, hsdRMS⁻, mcrBC), Φ80lacZΔM15, lacX74, recA1, deoR, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, (StrR), endA1, nupG

E. coli XL1-Blue (Stratagene, USA)

recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F['] proAB lacIqZΔM15 Tn10 (TetR)]

E. coli XL1-Blue MR (Stratagene, USA)

Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB⁻, hsdSMR⁻, mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac

NÄHRMEDIEN

Die Nährmedien wurden für die Dauer von 20 Minuten bei 121 °C unter einem Druck von $1,2 \times 10^5$ Pa autoklaviert. Hitzeinstabile Lösungen wurden durch Filtration (0,2 µm Porengröße) sterilisiert und den auf < 50 °C abgekühlten Nährmedien nach dem Autoklavieren zugesetzt. Zur Herstellung fester Nährmedien (Agarplatten) wurde den Medien vor dem Autoklavieren 15 g/l Bacto-Agar zugesetzt.

2 × YT-Medium	16 g/l	Bacto-Trypton (Casein-Pepton, tryptisch verdaut)
	10 g/l	Bacto-Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl

LB-Medium	10 g/l	Bacto-Trypton (Casein-Pepton, tryptisch verdaut)
	5 g/l	Bacto-Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl

SOC-Medium	20 g/l	Bacto-Trypton (Casein-Pepton, tryptisch verdaut)
	10 g/l	Bacto-Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl
	1,2 g/l	MgSO ₄
	0,95 g/l	MgCl ₂
	20 g/l	D(+)-Glukose

Die beiden Antibiotika Ampicillin (200 mg/ml in 70 % Ethanol) und Kanamycin (50 mg/ml in H₂O) wurden als Stammlösungen aliquotiert bei -20 °C aufbewahrt. Die Zugabe zu den Nährmedien erfolgte bei einer Temperatur < 50 °C. Hierbei betrug die Endkonzentration des Ampicillins 200 µg/ml, die des Kanamycins 50 µg/ml.

C1.2.6 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Fa. MWG Biotech, Ebersberg hergestellt:

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
EcoRI-Luc-f-1369	GGA ATT CAT GGA AGA CGC CAA AAA CAT AAA GAA AGG C
BamHI-Luc-r-3015	CGG ATT CCA CGG CGA TCT TTC CGC CCT TC
F-XhoI-MD9	ATT ACT CGA GCC GAA TTG GGT CGA GGT AGG
R-XhoI-MD9	CGT ACT CGA GAA GCT TGG TCG AGC TGA TAC TT
M13 forward (-20)	GTA AAA CGA CGG CCA G
M13 reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC

C1.2.7 Plasmide

pEGFP-N3

Das Plasmid pEGFP-N3 (Abb. 4) der Fa. Clontech, USA beinhaltet die kodierende Sequenz einer weiterentwickelten Variante des Markerproteins *green fluorescent protein* (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria*. Neben zwei Aminosäuresubstitutionen enthält es 190 stumme Basenaustausche, was eine Verstärkung der Expression dieser GFP-Variante und damit einhergehend der Fluoreszenz bewirkt. Daher resultiert der Name *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) (Cheng et al., 1996; Zhang et al., 1996). Sein Exzitationsmaximum liegt bei 488 nm, sein Emissionsmaximum bei 507 nm. Das EGFP steht unter der transkriptionellen Kontrolle des *immediate early* Promotors des Cytomegalievirus (CMV). Dieser weist eine hohe und konstitutive Aktivität auf und wird in einer Vielzahl von eukaryotischen Zellen abgelesen. Stromabwärts des EGFP befindet sich das Polyadenylierungssignal des Simian Virus 40 (SV40), das für die korrekte Prozessierung der EGFP-mRNA an ihrem 3'-Ende verantwortlich ist.

Zwischen dem CMV-Promotor P_{hCMV} und der EGFP-Sequenz befindet sich eine sog. *multiple cloning site* (MCS). Darin sind mehrere singuläre Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen lokalisiert, wodurch gewährleistet ist, dass die Konstruktion eines Plasmids mit Hilfe dort schneidender Restriktionsendonukleasen spezifisch erfolgt. Gene, die in diese MCS kloniert werden, werden als N-terminales Fusionsprotein mit EGFP exprimiert.

Zur Selektion prokaryotischer wie auch eukaryotischer Zellen dient das Resistenzgen Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase (APH) (Colbere-Garapin et al., 1981). Es phosphoryliert Aminoglykoside wie Kanamycin (Kan), Neomycin (Neo) oder das Neomycin-Analogon G418 (auch bekannt unter dem Namen Geneticin). Ihr gemeinsames Wirkprinzip beruht auf der Interaktion mit den Untereinheiten der Ribosomen (prokaryotisch: 70 S, eukaryotisch: 80 S). Durch den Einbau falscher Aminosäuren kommt es zu Translationsfehlern in der Proteinbiosynthese, wodurch sog. *nonsense*-Proteine gebildet werden. Die Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase wird hier als Kan/Neo-Resistenzgen bezeichnet, da die APH sowohl unter der Kontrolle eines eukaryotischen Promotors (SV40 *early promotor*) als auch eines prokaryotischen Promotors steht. Somit wird die Resistenz in Bakterien sowie in Säugerzellen von derselben cDNA vermittelt.

Das Plasmid pEGFP-N3 dient zum einen zur Überprüfung der Transfektionseffizienz und zum anderen zur Herstellung von stabil EGFP-exprimierenden Zelllinien mit Hilfe des Selektionsantibiotikums Geneticin. Zusätzlich vereinfacht es die Generierung von N-terminalen Fusionsproteinen und erlaubt so deren subzelluläre Lokalisation in den jeweiligen Zellkompartimenten.

Der pUC-Replikationsursprung gewährleistet eine hohe Kopienzahl in *E. coli*, ein SV40 ori die Replikation in Eukaryoten und ein f1 ori die Replikation von einzelsträngiger DNA.

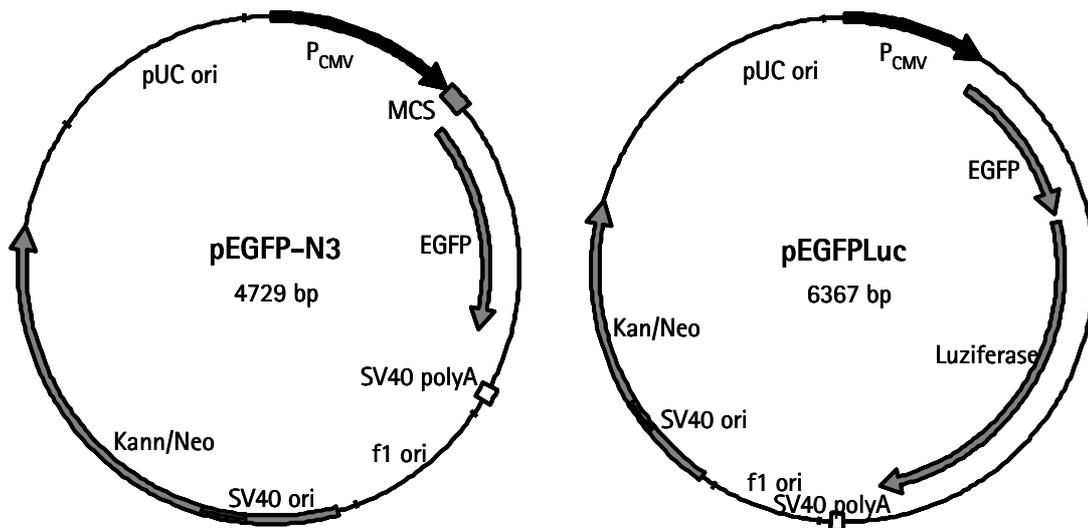


Abb. 4 Vektorkarten von pEGFP-N3 und pEGFPLuc.

P_{CMV} : Cytomegalovirus *immediate early* Promotor; EGFP: *enhanced green fluorescent protein*; SV40 polyA: Simian Virus 40-Polyadenylierungssignal; f1 ori: Einzelstrang-Replikationsursprung; SV40 ori: SV 40 origin of replication; Kan/Neo: Kanamycin/Neomycin Resistenz-Kassette; pUC ori: Plasmid-Replikationsursprung.

pEGFPLuc

Das Plasmid pEGFPLuc (Clontech, USA) (Abb. 4) kodiert eine Fusion des *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) mit dem Enzym Luziferase des Glühwürmchens *Photinus pyralis*, wobei die Luziferase an den C-terminalen Teil des EGFP ligiert ist. Die transkriptionelle Kontrolle und die 3'-Prozessierung werden auch hier durch den Promotor des Cytomegalievirus bzw. das Polyadenylierungssignal des Simian Virus 40 vermittelt. Die Kan/Neo-Resistenzkassette erlaubt, wie oben bereits beschrieben, die Selektion in prokaryotischen und eukaryotischen Organismen.

Das Plasmid pEGFPLuc ist ein Markerplasmid, das sowohl die Bestimmung der Transfektionseffizienz durch die Fluoreszenz des EGFP als auch eine Quantifizierung der Luziferase-Expression durch herkömmliche Luziferase-Assays ermöglicht.

pIRES2-EGFP

Bei dem Plasmid pIRES2-EGFP der Fa. Clontech, USA handelt es sich um ein Konstrukt, das eine interne Bindungsstelle für Ribosomen, kurz IRES (*internal ribosomal entry site*) genannt, des Enzephalomyokarditis-Virus enthält (Abb. 5). Diese Sequenz erlaubt die Translation zweier offener Leserahmen von einer mRNA. Die Transkription dieser einen mRNA wird dabei durch den *immediate early* (IE) Promotor des Cytomegalievirus initiiert. Die korrekte Prozessierung am 3'-Ende wird durch das Polyadenylierungssignal des Simian Virus 40 gesteuert. Die vollständig prozessierte mRNA enthält nun – beginnend an ihrem 5'-Ende – eine Cap-Struktur, darauf folgend das Zielgen, die IRES-Sequenz und das EGFP sowie eine Poly-A-Sequenz.

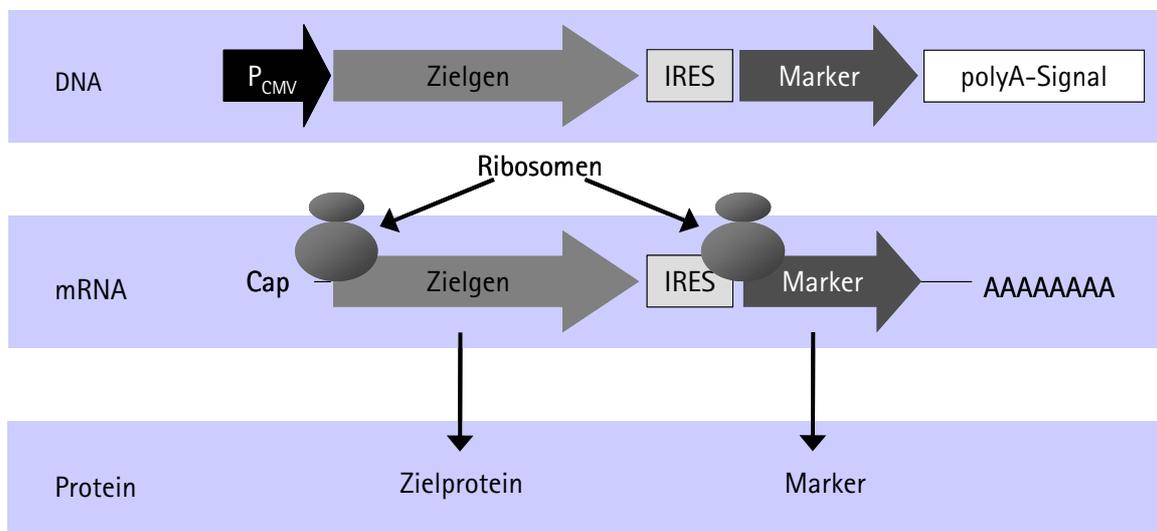


Abb. 5 Prinzip der IRES-vermittelten Translation (IRES: *internal ribosomal entry site*).

Die 30S-Untereinheiten der Ribosomen können nun sowohl an das Cap am 5'-Ende der mRNA als auch an die IRES-Sequenz binden und die Proteinsynthese am jeweiligen Start-Codon (AUG) beginnen. Zwei voneinander unabhängige Gene werden so gemeinsam transkribiert, aber wieder unabhängig voneinander translatiert. Zur Selektion in Bakterienkulturen oder in Säugerzellen enthält dieses Plasmid (Abb. 6) die für die APH kodierende Kan/Neo-Kassette. Mit dem Plasmid pIRES2-EGFP kann somit sowohl die Transfektionseffizienz über Fluoreszenzmikroskopie (EGFP) bestimmt als auch eine Selektion derjenigen Zellpopulation mittels FACS vorgenommen werden, die das gewünschte Gen gemeinsam mit EGFP exprimiert.

pIRESneo2

Auch das Plasmid pIRESneo2 (Abb. 6), Fa. Clontech, USA enthält eine IRES-Sequenz. Sie befindet sich stromaufwärts der cDNA der Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase. Am 5'-Ende der IRES-Sequenz ist wiederum eine MCS lokalisiert, in welche die gewünschten cDNA-Sequenzen ligiert werden können. Zusätzlich befindet sich zwischen der MCS und der IRES-Sequenz ein synthetisches Intron oder IVS (*intervening sequence*), das zur Stabilisierung der unprozessierten mRNA dient. Letztere steht unter der transkriptionellen Kontrolle des IE-Promotors des Cytomegalievirus. Das Polyadenylierungssignal stromabwärts der APH, welches für die korrekte Prozessierung des 3'-Endes der mRNA verantwortlich ist, stammt vom Wachstumshormon (GH) des Rinds. Eine für das β -Lactamase-Gen kodierende Kasette sorgt für die Möglichkeit der Selektion in prokaryoten Organismen. Das Plasmid pIRESneo2 erlaubt die Selektion von Zellen, die das Resistenz-Gen gegen Geneticin tragen und damit einhergehend auch das inserierte Fremd-Gen exprimieren.

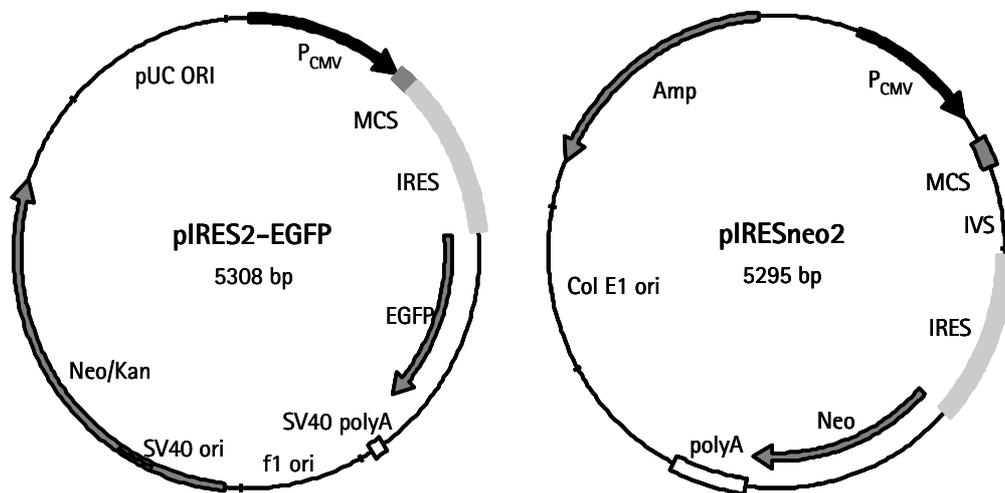
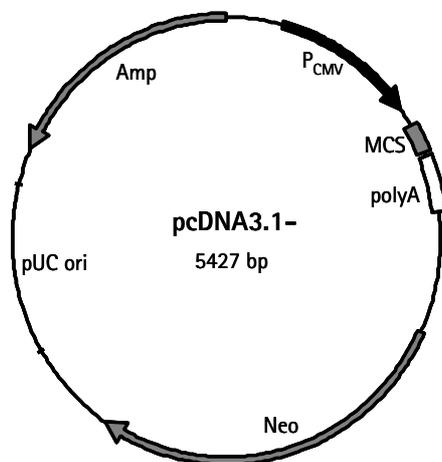


Abb. 6 Vektorkarten von pIRES-EGFP und pIRESneo2.
ColE1 ori: *E. coli* Plasmid Replikationsursprung; Amp: Ampicillin-Resistenz-Gen (β -Lactamase).

pcDNA3.1-



Einen einfachen eukaryotischen Expressionsvektor stellt pcDNA3.1- von der Fa. Invitrogen, USA dar (Abb. 7). Für eine hohe, konstitutive Expression sorgt der IE-Promotor des Cytomegalievirus, für die richtige Polyadenylierung das Signal des Wachstumshormons (GH) des Rinds. Für die Selektion in Bakterien besitzt dieser Vektor ein Ampicillin-Resistenz-Gen, für die in Eukaryoten eine Neomycin-Resistenz-Kasette.

Abb. 7 Vektorkarte von pcDNA3.1-.

Plasmide des Tet-On-System

Für das Tet-On-System, Fa. BD Biosciences, USA sind folgende zwei Vektoren von grundlegender Bedeutung (Abb. 8).

Zum einen benötigt man den Vektor pTet-On, der den reversen Transaktivator (rtTA) unter der Kontrolle des IE-Promotors des Cytomegalievirus konstitutiv und stark exprimiert. rtTA wurde durch vier Aminosäure-Austausche aus tTA generiert, der den Transaktivator im Tet-Off-System darstellt. Dieser wiederum ist ein Fusionsprodukt aus dem *tet repressor* (TetR), der in dieser Form bei Tetracyclin-resistenten Bakterien vorkommt, und der C-terminalen Aktivierungsdomäne des VP16-Proteins des H. simplex Virus. Auch dieser Vektor besitzt ein Ampicillin-Resistenz-Gen für die Selektion in Bakterien, für die in Eukaryoten eine Neomycin-Resistenz-Kassette. Das Polyadenylierungssignal stammt von Simian Virus 40.

In den Vektor pTRE2hyg wird in die MCS das zu regulierende Gen ligiert. Direkt vor der MCS liegt ein Tetracyclin-sensitiver Promotor, wobei durch Zugabe von Tetracyclin die Expression des Transgens gesteuert werden kann. Dieser Promotor besteht aus einer minimierten Version des *immediate early* Promotor des Cytomegalievirus, dem die Enhancer-Sequenz fehlt. Zusätzlich beinhaltet dieser Promotor das *tet response element* (TRE), das aus sieben Kopien der 19 bp langen Sequenzen des tet Operators (*tetO*) aufgebaut ist. Zur korrekten Polyadenylierung verhilft das Polyadenylierungssignal des β -Globins. Das Hygromycin-Resistenz-Gen kodiert für eine Phosphorylase, die Hygromycin B inaktiviert. Hygromycin B stellt einen weiteren Vertreter der Aminoglykoside dar, der sich zur Selektion von stabil transfizierten eukaryotischen Zellen eignet. Durch das Ampicillin-Resistenz-Gen ist ebenso eine Selektionierung in Bakterien möglich. Für den Vektor pTRE2hyg-Luc, Fa. BD Biosciences, USA wurde in die MCS die Luziferase eingefügt, d. h. in diesem Fall kann die Luziferase-Expression durch Tetracyclin gesteuert werden.

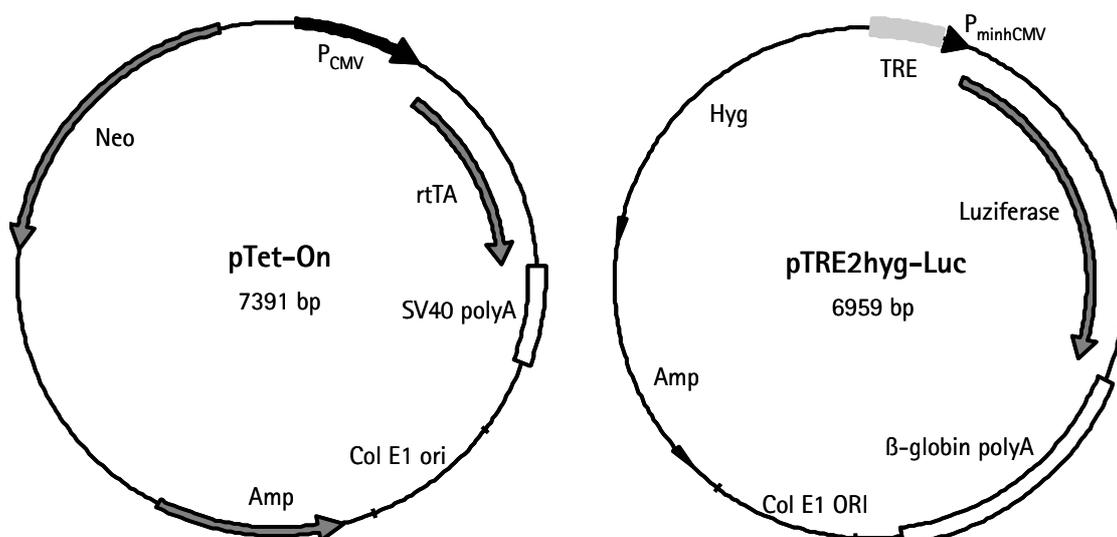


Abb. 8 Vektorkarten von pTet-On und pTRE2hyg-Luc.
rtTA: reverser Transaktivator; P_{minhCMV}: minimierter humaner Cytomegalovirus *immediate early* Promotor;
TRE: *tet response element*; Hyg: Hygromycin-Resistenz-Kassette.

pCR2.1-TOPO

Der Vektor pCR2.1-TOPO (Abb. 9) der Fa. Invitrogen, USA erlaubt die sog. TOPO-TA-Klonierung, bei der durch Taq-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte in den o. g. Vektor ligiert werden können. Das Prinzip der TOPO-TA-Klonierung beruht auf der Tatsache, dass die Taq-Polymerase einerseits eine matrizenunabhängige terminale Transferaseaktivität besitzt, wodurch einzelne Desoxyadenosin-Moleküle an die 3'-Enden der PCR-Produkte angefügt werden. Andererseits besitzt der lineare Vektor an seinen 5'-Enden überhängende Desoxythymidin-Moleküle. Die somit kompatiblen Enden können nun mittels einer an die 3'-Phosphatreste des linearen Vektors gebundenen Topoisomerase effizient und zeitsparend (5 Minuten) ligiert werden. Stromauf- und abwärts der in den Vektor ligierten Sequenz befinden sich zahlreiche Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen, die diverse Möglichkeiten bieten, das PCR-Amplifikat wieder aus dem Vektor zu schneiden und in andere Vektoren zu ligieren. Ebenfalls flankierend befinden sich Standard-Nukleotidsequenzen, die eine Sequenzierung der klonierten Fragmente mit sog. Standard-Primern (M13 Forward und Reverse) zulassen.

Eine weitere Vereinfachung der Klonierung wird dadurch ermöglicht, dass die MCS im α -Fragment des LacZ-Gens lokalisiert ist. Dies gewährleistet eine leichte Identifikation der positiven Klone nach Transformation durch die sog. »Blau-Weiß-Selektion« (s. C2.1.13). Zusätzlich befinden sich auf dem Vektor die oben bereits beschriebenen Resistenz-Gene gegen Ampicillin und Kanamycin. Der Vektor pCR2.1-TOPO dient so der einfachen und effizienten Klonierung von PCR-amplifizierten Sequenzen.

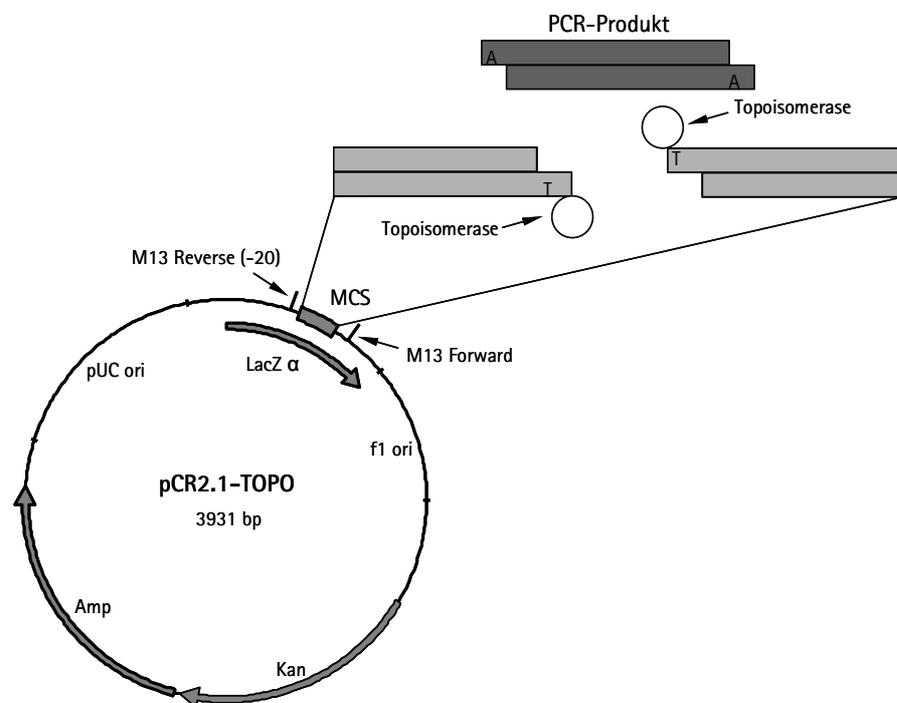


Abb. 9 Vektorkarte von pCR2.1-TOPO.

lacZ α fragment: α -Fragment des LacZ-Gens; f1 ori: *single strand origin of replication*; pUC ori: *E. coli* Plasmid-Replikationsursprung; M13 Reverse; M13 Forward: Primer-Bindungsstellen; Amp: Ampicillin-Resistenz-Gen (β -Lactamase); Kan: Kanamycin-Resistenz-Gen.

C2 METHODEN

C2.1 Molekularbiologie

C2.1.1 Anzucht und Stammhaltung von *Escherichia coli*

Der häufige Einsatz des Bakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) im Rahmen molekularbiologischer Untersuchungen beruht auf dessen einfacher Handhabung und schneller Vermehrung. Auch seine Aufnahmefähigkeit für eine Vielzahl von verschiedenen Vektoren und ein breites Spektrum von genetisch genau definierten Stämmen spielt dabei eine entscheidende Rolle. Bakterienkulturen dienen im vorliegenden Projekt der Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen in Vektoren.

Wichtig für den Einsatz von *E. coli* ist das Arbeiten unter sterilen Bedingungen, d. h. unter einem Abzug und mit sterilen evtl. abgeflammt Materialien bzw. autoklavierten Substanzen. Die Bakterien wurden entweder auf Agarplatten in Petrischalen oder in Flüssigmedien kultiviert. Bakterien auf Agarplatten, hergestellt durch einen 3-Ösen-Ausstrich oder mit Hilfe eines sterilen Drygalski-Spatels, wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C bebrütet und maximal 6 Wochen bei 4 °C aufbewahrt. Eine über diesen Zeitraum hinausgehende Konservierung erfolgte durch Ansetzen einer Glycerinstammkultur. Hierfür wurden 850 µl einer Übernacht-Kultur mit 150 µl Glycerin (c = 15 %, v/v) versetzt und bei -80 °C aufbewahrt. Kulturen in flüssigen Medien wurden entweder direkt von Platten oder aus Glycerinstammkulturen mittels einer sterilen Pipettenspitze oder einer Impföse angeimpft. Erlaubte das zu amplifizierende Plasmid die Selektion durch ein Antibiotikum, wurde dies in einer Konzentration von 200 µg/ml (Ampicillin) bzw. 50 µg/ml (Kanamycin) zugegeben. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 250 Upm geschüttelt. Die Bakterienernte erfolgte mittels Zentrifugation bei 2700 × g und 4 °C für 10 Minuten.

C2.1.2 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen

Um DNA in *E. coli*-Zellen einzuschleusen, müssen diese vorbehandelt, d. h. kompetent gemacht werden. Dies wurde nach einer vereinfachten Variante des Protokolls von Cohen et al. durchgeführt (1972). Die Transformationseffizienz der so präparierten Bakterien beträgt normalerweise 5×10^6 bis 1×10^8 transformierter Kolonien pro Mikrogramm eingesetzter Plasmid-DNA (Sambrook, 2001). Die Bakterien werden dazu in einer eiskalten Lösung aus Calciumchlorid (CaCl₂) und Magnesiumchlorid (MgCl₂) inkubiert.

Die *E. coli*-Stämme wurden hierzu auf 2 × YT-Agarplatten vereinzelt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurde mit einer Einzelkolonie in 25 ml LB-Medium eine weitere Übernachtkultur angesetzt. Am nächsten Morgen wurde diese in 250 ml vorgewärmtes LB-Medium in einem Fernbachkolben inkubiert, wobei alle 20 Minuten die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) photometrisch bestimmt wurde. Sobald die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,4 erreicht

hatte, wurden 75 ml warmes Medium dazugegeben und für weitere 30 Minuten inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden nun bei 4 °C ausgeführt. Die Zellen wurden in Zentrifugenbechern 10 Minuten bei 2700 × *g* zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgegossen. Anschließend wurde das Sediment in 87,5 ml eiskalter 100 mM MgCl₂-Lösung resuspendiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation unter obigen Bedingungen wurden die sedimentierten Bakterien in 17,5 ml einer 100 mM CaCl₂-Lösung gewaschen, wobei diesmal 20 Minuten auf Eis inkubiert wurde. Abschließend wurden die Bakterien in 3,5 ml einer Glycerol/CaCl₂-Lösung (85 % Glycerol/15 % CaCl₂) resuspendiert, à 50 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Die Methode, mit deren Hilfe exogene DNA in den Interzellulärraum von Bakterien gelangt und dort sowohl exprimiert als auch repliziert werden kann, heißt Transformation. Die kompetenten *E. coli* werden mit β-Mercaptoethanol behandelt und nach Zugabe von Plasmid-DNA kurz auf 42 °C erhitzt, wodurch die Plasmid-DNA aufgenommen werden kann.

Dazu wurden die bei -80 °C gelagerten Aliquots kompetenter *E. coli* auf Eis aufgetaut, 1 µl β-Mercaptoethanol dazu pipettiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert, wobei alle 2 Minuten durch Antippen des Reaktionsgefäßes der Ansatz gemischt wurde. Nach Zusatz von 1 ng zirkulärer Plasmid-DNA bzw. 2 – 6 µl Ligationsansatz wurde die Suspension nochmals gemischt und für weitere 30 Minuten auf Eis gestellt. Für den eigentlichen »Hitzeschock« wurde die Lösung nun 45 Sekunden in einem Wasserbad auf 42 °C erhitzt und danach sofort wieder auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 450 µl SOC-Medium (Raumtemperatur) wurde das fest verschlossene 1,5 ml Reaktionsgefäß für 1 Stunde bei 37 °C und 250 Upm geschüttelt. Dieser Ansatz wurde in zwei unterschiedlich großen Aliquots auf 2 × YT-Agar-Platten ausgestrichen, um singuläre Kolonien nach Bebrütung zu gewährleisten (50 bzw. 450 µl des Ansatzes). Die Bakterienkulturen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

C2.1.3 Elektroporation

Eine weitere Technik, um DNA in Bakterien zu bringen, ist die Elektroporation. Die Vorbereitung der Zellen ist hier sehr einfach, denn sie besteht nur in Waschsritten mit eiskaltem Wasser, um die Ionenkonzentrationen zu reduzieren.

Die Anzucht der Bakterien erfolgte wie in C2.1.2 beschrieben. Vor der Zentrifugation wurden jedoch die Zellen im Zentrifugenbecher 15 Minuten auf Eis gestellt und dann für 20 Minuten (4 °C; 2700 × *g*) zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde zweimal mit je 250 ml hochreinem eiskaltem Wasser gewaschen (resuspendieren, zentrifugieren, Überstand abgießen). Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 40 ml 10%iger Glycerinlösung und anschließend wurde in 1 ml 10%iger Glycerinlösung resuspendiert. Die so kompetent gemachten Zellen wurden à 50 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Bei der Elektroporation gelangt die DNA in den Intrazellulärraum, indem den Bakterien ein Stromstoß versetzt wird. Der Vorteil gegenüber anderen Transformationsmethoden ist, dass grundsätzlich eine höhere Effizienz erreicht wird.

Auch hier war die Vorgehensweise ähnlich der des »Hitzeschock«-Protokolls (s. C2.1.2). Nach Auftauen der *E. coli* und Zugabe der DNA wurde die Suspension vorsichtig gemischt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Nach Abtrocknen wurde sie in den Küvettenhalter des Elektroporationsapparates gestellt und einem Strompuls (Parameter: Kapazität: 25 μ F; Spannung: 2,5 kV; Widerstand: 200 Ω) ausgesetzt. Anschließend wurden sofort 450 μ l SOC-Medium (Raumtemperatur) dazugegeben. Das einstündige Schütteln der Suspension, das Ausstreichen und das weitere Vorgehen erfolgten analog der »Hitzeschock«-Transformation.

C2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA

PRINZIP

Bei der Plasmidisolierung werden die Bakterien zerstört, um die amplifizierten Plasmide zu gewinnen. Die analytische Plasmidpräparation (»Mini«-Präparation) hat zum Zweck, nach einer Transformation mehrere (6 – 12) Kolonien dahingehend zu untersuchen, ob sie das gewünschte Plasmid enthalten. Dafür werden jeweils 1,5 ml Kultur angeimpft, aus denen ca. 5 μ g DNA isoliert werden können. Bei der präparativen Plasmidpräparation (»Maxi«-Präparation) soll aus einer Einzelkolonie, die das korrekte Plasmid enthält, eine große Menge an Plasmid gewonnen werden. Dafür werden 100 ml (*high copy plasmid*) bzw. 200 ml (*low copy plasmid*) Kultivierungsmedium mit einer Bakterienkolonie angeimpft. Nach Inkubation über Nacht lassen sich hierbei bis zu 800 μ g Plasmid-DNA gewinnen.

Beide Präparationen beruhen auf dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly, (1979), gefolgt von unterschiedlichen Waschschritten. Da die »Mini«-Präparation nur für einen analytischen Verdau verwendet wurde, genügte zur Reinigung eine Ethanolfällung. Die DNA aus der »Maxi«-Präparation dagegen wurde meist zur Transfektion und zur weiteren Klonierung eingesetzt und musste deshalb hochrein sein. Da bakterielle Endotoxine, auch bekannt als Lipopolysaccharide (LPS), insbesondere die Transfektion von DNA in primären Zellen (z. B. hMSC) beeinflussen und dabei die Transfektionseffizienz herabsetzen, wurde für alle zu diesem Zweck durchgeführten Präparationen das *EndoFree Plasmid Maxi Kit* der Fa. Qiagen, Hilden verwendet.

DURCHFÜHRUNG DER »MINI«-PRÄPARATION

Für die analytische Präparation wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und durch Zentrifugation geerntet. Der Überstand wurde abgenommen und das restliche Medium auf einem Papiertuch abgeklopft. Das Sediment wurde mit 100 μ l eiskalter Lösung 1 (25 mM Tris-Cl, pH 8, 10 mM EDTA, pH 8, 50 mM Glucose) homogenisiert. Dazu wurde 200 μ l frisch hergestellte Lösung 2 (0,2 N NaOH, 1 % SDS) pipettiert, fünfmal invertiert und mit 150 μ l eiskalter Lösung 3 (3 M Kaliumacetat, pH 4,8) invertiert und 3 – 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 5 Minuten bei 14.000 $\times g$ und 4 °C zentrifugiert. Der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, in dem 800 μ l Ethanol (abs.) vorgelegt worden waren, um die DNA zu fällen.

Nach Mischen und 5 Minuten Inkubation wurde erneut unter obigen Bedingungen zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen, nochmals 2 Minuten zentrifugiert, luftgetrocknet und in 50 µl TE-Puffer (100 mM Tris-Cl, pH 8, 10 mM EDTA, pH 8), der 20 µg/ml RNase A enthielt, gelöst.

DURCHFÜHRUNG DER »MAXI«-PRÄPARATION

Die präparative Plasmidpräparation wurde mit dem *EndoFree Plasmid Maxi Kit* der Fa. Qiagen, Hilden nach Herstellerangaben durchgeführt. Das detaillierte Protokoll ist unter www.qiagen.com abrufbar, weshalb hier nur das prinzipielle Vorgehen erläutert wird: Nach der Lyse wurden die genomische DNA sowie Zellwandbestandteile durch einen Zentrifugationsschritt sedimentiert und die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA nun an ein Trägermaterial (Anionen-Austausch-Säule) gebunden. Die Zugabe eines speziellen Puffers, der Isopropanol und Polyethylenglykolykylphenylether enthält, verhindert dabei, dass im Lysat vorhandene Endotoxine an die Anionen-Austausch-Säule binden können. Durch Waschen wurden Verunreinigungen (RNA, Proteine und niedermolekulare Stoffe) entfernt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte unter Hochsalzbedingungen mit anschließender Präzipitation durch Isopropanol. Das in der gefällten DNA enthaltene Salz wurde durch Waschen mit 70%igem Ethanol entfernt.

C2.1.5 Reinigung, Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Extraktion, Reinigung und Konzentrierung von DNA z. B. aus enzymatischen Reaktionsansätzen erfolgte durch Ethanol-fällung. Hierbei wurden die DNA-haltigen Lösungen mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) versetzt und gut gemischt. Durch Zugabe von 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol (abs.) wurde die DNA präzipitiert und nach einer Inkubation von 15 Minuten bei -20 °C durch Zentrifugation (14.000 × g; 30 Minuten; 4 °C) sedimentiert. Anschließend wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut wie oben beschrieben sedimentiert.

Die Konzentrationsbestimmung Nukleinsäure-haltiger Lösungen erfolgte photometrisch. Ein Absorptionswert von 1 (gemessen bei $\lambda = 260 \text{ nm}$, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren und 1 cm Schichtdicke der Küvette; $A_{260\text{nm}}$) entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml bei doppelsträngiger (ds)DNA, 40 µg/ml bei RNA und 37 µg/ml bei einzelsträngiger DNA.

Es wurde darauf geachtet, dass die Ratio $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ zwischen 1,7 und 2,0 (bei DNA) bzw. zwischen 1,8 und 2,2 (bei RNA) lag, so dass jeweils von einer proteinfreien Lösung ausgegangen werden konnte.

Für doppelsträngige DNA gilt bei der Umrechnung von µg/µl in pmol/µl folgende Formel:

$$\text{Konzentration} \left(\frac{\text{pmol}}{\mu\text{l}} \right) = \text{Konzentration} \left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right) \times 10^6 \div \left[\text{Nukleotidlänge (bp)} \times 660 \frac{\mu\text{g}}{\text{pmol}} \right]$$

C2.1.6 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Enzyme, die spezifische, meist palindromische 6 bis 12 bp lange Sequenzen in der dsDNA erkennen und dort an definierter Position die Phosphodiesterbrücken spalten, werden Restriktionsendonukleasen (RE) genannt. Hierbei wird unterschieden zwischen Enzymen, die zu einem 5'- oder 3'-Überhang führen (*sticky end*) und solchen, deren Spaltung keinen Nukleotidüberhang generiert (*blunt end*). Die Enzymaktivität von RE wird in *Units* angegeben. Ein *Unit* ist definiert als die Menge an Enzym, die nötig ist, um 1 µg DNA des Phagen Lambda in einer Stunde unter optimalen Reaktionsbedingungen zu spalten. So berechnet sich also die Anzahl der für einen Verdau nötigen *Units* folgendermaßen, wobei der λ-Wert für jedes Enzym spezifisch ist (s. auch www.neb.com):

$$\text{Units} = \frac{\text{Größe des } \lambda\text{-Phagen (bp)}}{\text{Größe des Substrats (bp)}} \times \frac{\text{Schnittstellen im Substrat}}{\text{Schnittstellen im } \lambda\text{-Phagen}} \times \text{DNA-Menge } (\mu\text{g})$$

In dieser Arbeit wurde die Restriktion zu zwei verschiedenen Zwecken verwendet: zum einen, um Plasmid-DNA zu analysieren, und zum anderen, um präparative Spaltungsansätze durchzuführen. Letzteres bedeutet, dass hier die entstandenen DNA-Fragmente zur weiteren Klonierung eingesetzt wurden.

Bei einem partiellen Verdau geht es darum, dass ein Enzym, das mehrere Spaltstellen in der Zielsequenz erkennt, nur eine davon restringieren soll. Da die Enzymaktivität abhängig ist von der Enzymmenge und der Zeit, kann man diese beiden Parameter variieren, um einen unvollständigen Verdau zu erhalten, welcher anschließend mittels Agarose-Gel-Elektrophorese analysiert wird.

Die Kreuzrestriktion ist eine Variante des präparativen Verdau. Es ist bekannt, dass RE schlechter schneiden, wenn die Erkennungssequenzen für zwei RE an Enden von DNA-Sequenzen oder sehr nahe beieinander liegen. Wenn man einen Vektor in der MCS mit zwei verschiedenen RE schneidet, kann auf dem Gel nicht überprüft werden, ob die Restriktion vollständig war. Deshalb wird an dieser Stelle ein Verdau »über Kreuz« empfohlen, bei dem der Vektor zunächst mit der einen RE, und nach einer Ethanol-fällung mit der anderen RE geschnitten wird. In einem zweiten Ansatz geschieht dasselbe, nur dass hier die Reihenfolge der Enzyme vertauscht wird. Zur Kontrolle des ersten Verdau wurden 5 % des Restriktionsansatzes nach Ablauf der Inkubation entnommen und auf ein analytisches Gel aufgetragen, um die Spaltungseffizienz der jeweiligen RE zu überprüfen.

Restriktionen wurden unter den von den Herstellern der Enzyme (Roche, Mannheim bzw. New England Biolabs, USA) empfohlenen Pufferbedingungen und optimalen Temperaturen durchgeführt. Für den analytischen Verdau wurden 1 µg DNA eingesetzt und 1 – 2 Stunden verdaut, beim präparativen 2,5 pmol DNA und die Inkubationszeit mit der RE entsprechend verlängert (2 – 12 Stunden). Die Anzahl der benötigten *Units* des Restriktionsenzym wurde nach obiger Formel errechnet und nach Zugabe des jeweiligen Puffers ebenfalls der Reaktion zugegeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Enzym konservierende Glycerol nicht mehr als 10 % des Gesamtansatzes betrug. Die Reaktion konnte entweder durch Einfrieren bei -20 °C oder durch eine Ethanol-fällung (s. C2.1.5) gestoppt werden.

C2.1.7 Agarose-Gel-Elektrophorese zur Trennung von DNA-Fragmenten

Mit der Agarose-Gel-Elektrophorese kann man DNA-Fragmente verschiedener Länge der Größe nach auftrennen. Durch einen Vergleich mit einem DNA-Gemisch definierter Fragmentlängen, die als Marker oder auch Leiter bezeichnet werden, kann so die Länge und die Menge der Proben-DNA detektiert und abgeschätzt werden. Diese Methode wird in der Molekularbiologie zur Analyse, Identifizierung und Isolierung von DNA-Fragmenten verwendet. In dieser Arbeit wurden analytische und präparative Gele verwendet. Letztere dienen dem Zweck, bestimmte DNA-Fragmente nach enzymatischen Reaktionen zu isolieren und zu reinigen, um sie zur weiteren Klonierung einsetzen zu können.

Für die Gele wurde die Agarosekonzentration zwischen 0,5 und 3 % variiert, und zwar indirekt proportional zur Fragmentgröße. Die Agarose wurde in 1 × TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, mit Eisessig auf pH 8,3 eingestellt) suspendiert, durch Kochen solubilisiert und zur Gelierung in einen Gelschlitten gegossen, in dem ein Kamm für die Auftragstaschen gesteckt war. Zur Visualisierung der Nukleinsäuren im UV-Licht wurde der Agarose-Lösung 1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die benutzten Gelvolumina betragen je nach Probenvolumen und Probenzahl 60, 80 oder 120 ml. Nach Erstarren wurde das Gel mitsamt dem Schlitten in eine Horizontal-Gel-Apparatur gestellt und mit 1 × TAE Laufpuffer bedeckt. Vor Auftrag wurden die Proben mit 1/10 Volumen 10 × Auftragspuffer versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der Nukleotide erfolgte bei einer Feldstärke von 5 bis 7 V/cm über eine Dauer von 1 – 3 Stunden. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht (302 nm) betrachtet und photographisch bzw. digital dokumentiert.

C2.1.8 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Um bestimmte DNA-Fragmente nach enzymatischen Reaktionen zu isolieren und zu reinigen, wurde eine präparative Gel-Elektrophorese durchgeführt. Nach Auftrennung der DNA erfolgte die Exzision der jeweiligen Bande unter UV-Licht mittels eines sterilen Skalpell. Die weitere Aufreinigung und Isolation der DNA aus dem Agarose-Gel wurde unter Zuhilfenahme des *QIAquick* Gelextraktions-Kits der Fa. Qiagen, Hilden durchgeführt. Dazu wurde das Gelstück zunächst verflüssigt und die darin enthaltene DNA an eine Silicamembran gebunden, auf der sie gewaschen werden konnte. Nach Elution wurde sie wie in C2.1.5 beschrieben photometrisch vermessen.

C2.1.9 Ligierung von DNA-Fragmenten

Das Ziel einer Ligation liegt darin, zwei DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden bzw. ohne Nukleotidüberhang miteinander zu verbinden. Meist handelt es sich hier um ein Vektorrückgrat, in das ein DNA-Fragment (Insert) eingefügt werden soll. Dabei wird unterschieden, ob die Enden Überhänge haben oder nicht.

Im Allgemeinen enthielt ein Ligationsansatz (Endvolumen 10 μ l) 1 μ l des vom Hersteller mitgelieferten 10 \times Puffers, 400 U T4-DNA-Ligase (400 U/ μ l) der Fa. NEB, USA und 300 ng Gesamt-DNA, wobei auf einen drei- bis fünffachen molaren Überschuss des Inserts (a in der Formel) geachtet wurde. Zur Berechnung der DNA-Mengen habe ich in dieser Arbeit folgende Formeln entwickelt:

$$\text{Menge des Inserts (ng)} = a \times \left\{ 300 \text{ ng} \div \left[\frac{\text{Größe des Vektor (bp)}}{\text{Größe des Inserts (bp)}} + a \right] \right\}$$

$$\text{Menge des Vektors (bp)} = 300 \text{ ng} - \text{Menge des Inserts (ng)}$$

Der Ansatz wurde für 16 Stunden bei 4 °C (*sticky ends*) bzw. 16 °C (*blunt ends*) inkubiert und anschließend sofort zur Transformation eingesetzt. Als Religationskontrolle wurden 300 ng des Vektors ohne Insert unter denselben Bedingungen ligiert und transformiert.

C2.1.10 Auffüllreaktion mit DNA-Polymerase I (Klenow)

Wenn zwei zu ligierende DNA-Fragmente keine kompatiblen Enden haben, weil sie mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen (s. C2.1.6) geschnitten wurden, kommt das Enzym DNA-Polymerase I (Klenow) zum Einsatz. Seine Polymerase-Aktivität wird ausgenutzt, um 5'-Überhänge aufzufüllen und sog. *blunt ends* zu generieren. So werden passende Enden für eine Ligation geschaffen. Für den Ansatz wurde die geschnittene und durch Ethanol-fällung gereinigte DNA mit 1/10 Volumen des vom Hersteller mitgelieferten 10 \times Puffers, mit 33 μ M dNTPs-Gemisch (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und 1 *Unit* Klenow-Enzym (c = 5 U/ μ l) pro μ g eingesetzter DNA für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion durch Einfrieren bei -20 °C oder Ethanol-fällung gestoppt.

C2.1.11 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Diese enzymatische Reaktion wird ausgeführt, um Religationsreaktionen zu verhindern, insbesondere bei der ungerichteten Klonierung, d. h. wenn das Insert in zwei verschiedene Richtungen eingefügt werden kann. Dabei wird die Phosphatgruppe am 5'-Ende des Vektors entfernt. Ohne diese kann der Vektor nicht mit sich selbst ligieren. Das Ligationsprodukt aus Vektor und Insert weist dadurch zwar Einzelstrangbrüche auf, kann aber trotzdem transformiert werden. Im Allgemeinen enthielt ein Dephosphorylierungsansatz durch Ethanol-fällung gereinigte DNA-Fragmente, 1/10 Volumen des vom Hersteller mitgelieferten 10 \times Puffers und 1 *Unit* Alkalische Phosphatase (c = 1 U/ μ l) pro pmol eingesetzter DNA. Die Reaktion fand bei 37 °C für 1 Stunde statt und wurde durch Einfrieren bei -20 °C beendet.

C2.1.12 PCR-Amplifikation von DNA

Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1988) wurde in dieser Arbeit genutzt, um bestimmte DNA-Abschnitte zu amplifizieren, um sie zur weiteren Klonierung zu verwenden. Dabei wurde mit modifizierten Primern gearbeitet, die zusätzlich zu der zur Matrize komplementären Sequenz einen für ein Restriktionsenzym spezifischen Abschnitt enthielten. Diese wurden von der Fa. MWG Biotech, Ebersberg bezogen und vor Gebrauch in H₂O resuspendiert und photometrisch vermessen (s. C2.1.5). Ein typischer PCR-Ansatz (50 µl) enthielt < 1,0 ng DNA-Matrize, je 0,2 µM der entsprechenden Primer, 0,2 mM dNTP-Gemisch, 2 mM MgCl₂, 5 µl 10 × PCR-Reaktionspuffer und 2,5 U Taq-DNA-Polymerase. Das gewählte Temperaturprofil wurde für die einzelnen Anwendungen optimiert. Die hergestellten PCR-Amplifikate wurden entweder über präparative Agarose-Gel-Elektrophorese (s. C2.1.7) gereinigt oder direkt zur Topo-TA-Klonierung verwendet (s. C2.1.13).

C2.1.13 Topo-TA-Klonierung

LIGATION

Das Prinzip der Topo-TA-Klonierung wurde bereits eingehend in Abschnitt C1.2.7 beschrieben. Zur Ligation wurde ein Reaktionsansatz aus 2 µl frischem PCR-Produkt, 1 µl Salzlösung, 2 µl Aqua dest. und 1 µl pCR2.1-TOPO angewandt.

Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden 2 µl des Ligationsansatzes wie in C2.1.2 beschrieben transformiert.

»BLAU-WEIß-SELEKTION«

Die »Blau-Weiß-Selektion« bietet die Möglichkeit, nach der Transformation anhand der Farbe der Kolonien die positiven Klone zu identifizieren. Sie beruht auf der Grundlage der α -Komplementation, wobei das Markerenzym β -Galactosidase gebildet wird. Die Generierung von β -Galactosidase ist nur dann möglich, wenn die zur Transformation verwendeten Bakterien den C-terminalen Bereich dieses Enzyms, das sog. ω -Fragment (*lacZ* Δ M15) auf dem bakteriellen Chromosom enthalten und auf dem transformierten Vektor das α -Fragment (*LacZ* α) kodiert ist. In dieses Gen ist die MCS eingebettet (s. Abb. 9). Das bedeutet, dass im Falle einer erfolgreichen Insertion des PCR-Produktes keine aktive Form der β -Galactosidase gebildet werden kann. Denn nur unter Erhalt eines intakten α -Fragmentes kann das Substrat X-Gal durch die β -Galactosidase hydrolysiert werden. Dabei entsteht der entsprechende Zucker und unter Sauerstoff-Einfluss eine Indigoverbindung. Dadurch sind Kolonien, die kein Insert tragen, blau gefärbt. Falls der zur Transformation eingesetzte Bakterienstamm zusätzlich den Lac Repressor exprimiert (*lacI*^q), muss durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) die β -Galaktosidase-Aktivität induziert werden. Dazu werden auf Ampicillin-haltigen 2 × YT-Agar-Platten vor Ausstreichen der transformierten Bakterien 4 µmol IPTG (200 mM) und 1,6 mg X-Gal (20 mg/ml X-Gal gelöst in Dimethylformamid) ausplattiert.

C2.1.14 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977). Die Cycle-Sequencing-Reaktion und die Analyse wurden von der Fa. Sequence Laboratories, Göttingen durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse wurde jeweils durch Abgleich mit der Originalsequenz vorgenommen.

C2.1.15 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* der Fa. Qiagen, Hilden. Zur Isolation wurden die Zellen lysiert und die RNA selektiv an eine Silica-Gel-Membran gebunden. Nach mehreren Waschschrritten wurde die Elution mittels RNase-freien Wassers durchgeführt. Für die Homogenisierung der lysierten Zellen, also die Scherung der genomischen DNA und zur Herabsetzung der Viskosität, wurde eine *QIAshredder*-Säule der Fa. Qiagen, Hilden benutzt, wobei eine gleichzeitige Inaktivierung der RNasen durch das im Lyse-Puffer enthaltene Guanidiniumisothiocyanat gewährleistet wurde. Die mit diesem Verfahren isolierten RNA-Moleküle weisen eine Länge von > 200 Nukleotiden auf. Das bedeutet, dass 5 S rRNA, 5,8 S rRNA und tRNAs, welche ca. 15 bis 20 % der Total-RNA darstellen, im Eluat nicht enthalten sind. Zusätzlich musste ausgeschlossen werden, dass im Probenansatz möglicherweise noch Plasmid-DNA enthalten war. Aus diesem Grund wurde ein DNase-Verdau des Ansatzes vorgenommen.

C2.1.16 cDNA-Synthese für die quantitative RT-PCR

Das Umschreiben der mRNA in cDNA erfolgte unter Zuhilfenahme des *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)* der Fa. Roche, Mannheim. Hierbei binden Oligo-dT-Primer spezifisch an die für mRNA charakteristische Poly-A-Sequenz an deren 3'-Ende. Dadurch wird die selektive Verwendung der mRNA als Matrize für die cDNA-Synthese gewährleistet. Andere in dem Total-RNA-Pool der durch die *RNeasy-Mini* Präparation (s. C2.1.15) enthaltenen RNA-Spezies können somit nicht in die anschließende reverse Transkription einfließen. Die Reaktion selbst wird dabei durch die Reverse Transkriptase des *Avian Myeloblastosis Virus (AMV)* vermittelt.

Als Ausgangsmaterial diente Total-RNA, die mit Hilfe des *RNeasy-Mini Kits* der Fa. Qiagen gewonnen wurde. Für die cDNA-Synthese wurden 250 ng bzw. 1 µg DNase-behandelte Total-RNA eingesetzt. Da das RNA-Volumen nur maximal 8,2 µl betragen durfte, musste es gegebenenfalls mit Hilfe einer Vakuum-Zentrifuge auf das gewünschte Volumen eingengt werden. Eine primäre 15-minütige Denaturierung der RNA-Sekundärstrukturen wurde im PCR-Multicycler bei 65 °C durchgeführt, woraufhin die Proben vor Zugabe der restlichen Komponenten 5 Minuten auf Eis inkubiert wurden. Anschließend wurden die für die cDNA-Synthese erforderlichen Komponenten wie folgt in einem Gesamtvolumen von 11,8 µl zugegeben:

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
Reaktionspuffer	2 µl	
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl	5 mM
dNTPs (je 10 mM)	2 µl	je 1 mM
Oligo-dT-Primer (0,8 µg/µl)	2 µl	0,08 µg/µl
RNase-Inhibitor (50 U/µl)	1 µl	2,5 U/µl
AMV Reverse Transkriptase	0,8 µl	≥ 1 U/µl

Die reverse Transkription erfolgte 1 Stunde bei 42 °C, nachdem zuvor eine zehninütige Inkubation bei 25 °C für das Anlagern der Oligo-dT-Primer vorangegangen war. Zum Schluss wurde die Reverse Transkriptase denaturiert (5 Minuten; 99 °C). Die so erhaltene cDNA konnte bei -20 °C für einen längeren Zeitraum ohne Qualitätsverluste aufbewahrt werden.

C2.1.17 Quantitative RT-PCR

Mit dieser Methode kann die Kopienanzahl von mRNA-Molekülen aus Zellen sehr genau bestimmt werden. Durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes, der in dsDNA interkaliert, kann während einer durchgeführten Polymerasekettenreaktion unter Zuhilfenahme eines entsprechenden Detektors die bei den einzelnen PCR-Zyklen jeweils entstandene Produktmenge quantifiziert werden. Aus diesem Grund wird diese Methode auch als quantitative *real time* (RT)-PCR bezeichnet. Die Quantifizierung der eingesetzten Matrize gelingt über die Korrelation zwischen Produktmenge und Fluoreszenz. In der vorliegenden Arbeit wurden die quantitativen DNA-Bestimmungen mittels des LightCyclers der Fa. Roche, Mannheim durchgeführt. Der verwendete fluoreszierende Farbstoff *SybrGreen I* interkaliert in die bei jedem PCR-Zyklus entstehenden dsDNA-Produkte. Mit zunehmender Zyklenzahl – und damit einhergehend steigenden Mengen an spezifischem amplifizierten Produkt – kann nun die Zunahme der Fluoreszenz mit Hilfe des *LightCycler*-Systems detektiert und aufgezeichnet werden. Gleichzeitig erfolgt die Bestimmung mehrerer Proben in unterschiedlichen Verdünnungsstufen mit genau definierter Kopienzahl. Hierdurch kann eine Standardkurve generiert werden, anhand derer die ursprüngliche Kopienzahl in der zu analysierenden Probe bestimmt werden kann. Da *SybrGreen I* nicht nur in spezifische Produkte, sondern auch in Primerdimere und doppelsträngige Nebenprodukte interkaliert, erfolgte im Anschluss an die quantitative RT-PCR ein Nachweis der Spezifität der generierten Produkte über die Schmelzkurvenanalyse. Die PCR-Bedingungen im *LightCycler* richteten sich nach den Angaben des für die RT-PCR benötigten Primerset-Herstellers Search-LC (www.search-LC.de).

Unabhängig von der Menge der für die cDNA-Synthese eingesetzten RNA (s. C2.1.16), wurde jeweils 1 µl der cDNA-Lösung mit Aqua dest. auf 10 µl aufgefüllt. Dieses Volumen wurde in die dafür vorgesehenen *LightCycler*-Glas-Kapillaren pipettiert und mit 10 µl eines PCR-Ansatzes ergänzt, was zu einem Gesamtvolumen von 20 µl pro Kapillare führte. Der PCR-Ansatz setzte sich aus 6 µl Aqua dest. jeweils 2 µl Primer Set und *Light-Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I* der Fa. Roche, Mannheim zusammen, das neben *SybrGreen I* die DNA-Polymerase, den PCR-Puffer und die dNTPs enthielt. MgCl₂ lag in allen Ansätzen in einer Endkonzentration von 1 mM vor. Abschließend wurden die Kapillaren mit einem Plastikstopfen

verschlossen und 4 Minuten bei $660 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert, um die Lösung mit einem Gesamtvolumen von $20\ \mu\text{l}$ in die Spitze der Kapillaren zu transferieren. Dann wurden die Kapillaren in das dafür vorgesehene Karussell gesteckt und in die *LightCycler*-Apparatur gestellt. Die PCR-Bedingungen blieben bei allen Experimenten unverändert. Nach einer Anfangsdenaturierung ($95\text{ }^{\circ}\text{C}$; 15 Minuten) folgte ein Zyklus bestehend aus Denaturierung ($95\text{ }^{\circ}\text{C}$; 10 Sekunden), Annealing ($68\text{ }^{\circ}\text{C}$; 10 Sekunden) und Elongation ($72\text{ }^{\circ}\text{C}$; 16 Sekunden), welcher 44-mal wiederholt wurde. In jedem *LightCycler*-Lauf wurden Kontrollen mitgeführt, wobei humane cDNA als Positiv- und Aqua dest. als Negativkontrolle dienten.

C2.2 Zellbiologie

C2.2.1 Kultivierung und Konservierung von hMSC

Die Kultivierung von hMSC gestaltet sich als wesentlich schwieriger und teurer als die von üblichen Tumorzelllinien. Das Problem liegt vor allem darin, dass Stammzellen nach einer gewissen Anzahl von Teilungen und bei einem bestimmten Konfluenzgrad (s. Abb. 25a) zu differenzieren beginnen und damit einhergehend der Zellzyklus deutlich langsamer wird. Alle Arbeiten mit hMSC, auf die eine weitere Kultivierung folgte, wurden unter sterilen Bedingungen unter der Laminar Flow durchgeführt. Die adhärennten Zellen wurden zweimal pro Woche nach Absaugen des verbrauchten Mediums mit frischem, auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperiertem Stammzellwachstumsmedium versorgt, das basierend auf dem humanen Stammzell-Basalmedium (*MSCBM*, *mesenchymal stem cell basal medium*) der Fa. Cambrex, USA folgende Zusätze enthielt: Komplettiert wurden 440 ml Basalmedium mit 50 ml fötalem Kälberserum (*fetal bovine serum*, FBS), 10 ml L-Glutamin (200 mM) und $0,5\text{ ml}$ Penicillin/Streptomycin (*MSCGM Single Quot*, Cambrex, USA). Die Inkubation erfolgte in einem CO_2 -Brutschrank ($5\text{ }\%$ CO_2) bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $90\text{ }\%$ relativer Luftfeuchtigkeit.

Hatten die Zellen einen optischen Konfluenzgrad von maximal $90\text{ }\%$ erreicht, wurden sie mittels Trypsinierung von ihrer alten Kulturfläche gelöst und für weitere Versuche ausgesät oder eingefroren. Für die Trypsinierung wurde das Medium entfernt und die Zellen mittels einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS), welches frei von Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen war, gewaschen. Das Volumen entsprach dabei der Menge des Mediums, das zur Kultivierung verwendet wurde. Zum einen wurden dadurch Mediumrückstände entfernt, die eine Inaktivierung des Trypsins zur Folge hätten. Zum anderen wurde die Anzahl zweifach positiv geladener Ionen, die in einem Chelatkomplex die Inaktivierung der in der Trypsin/EDTA-Lösung befindlichen Etyhlendiamintetraacetat-Moleküle bewirkt hätten, minimiert.

Nach Abnahme des PBS wurde dieses durch Trypsin/EDTA-Lösung ersetzt, wobei jeweils ein Fünftel der Mediummenge verwendet wurde. Die Inkubationszeit betrug maximal 8 Minuten. Durch Klopfen und zusätzliche Inkubation im CO_2 -Brutschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ konnte das Ablösen der adhärennten Zellen beschleunigt werden. Durch die Zugabe des doppelten Volumens von hMSC-Medium wurde diese Reaktion gestoppt. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden $10\ \mu\text{l}$ Zellsuspension entnommen und diesem Aliquot $5\ \mu\text{l}$ Trypanblau zugegeben. Gezählt wurde lediglich die Anzahl der

vitalen Zellen, also derer, die sich nicht mit dem Farbstoff anfärbten. Hierfür wurde die Anzahl der Zellen in den vier Feldern der Kammer bestimmt, wobei ein Feld 0,1 μl entsprach. Diese Zahl wurde mit dem Verdünnungsfaktor 1,5 multipliziert und auf 1 Milliliter hochgerechnet. Die Zellsuspension selbst wurde in der Zeit zum vollständigen Entfernen des Trypsin/EDTA-Gemischs in einem 15 ml-Falkonröhrchen zentrifugiert (5 Minuten; $600 \times g$; 20°C). Zur weiteren Kultivierung erfolgte die Aufnahme des Zellsediments in dem entsprechenden Volumen an Medium. Bei der Aussaat zur Subkultivierung wurde auf eine Zellzahl von 5000 Zellen/ cm^2 geachtet, bei der für Transfektionen auf 8000 Zellen/ cm^2 Kulturfläche der jeweiligen Kavitäten (Tab. 2).

Tab. 2 Kultivierung von hMSC in Zellkulturgefäßen verschiedener Größe. Die effektive Kulturfläche der jeweiligen Kavitäten wurde vom Hersteller der Platten Nunc, USA übernommen. Die Anzahl der Zellen bei der Zellernte entspricht der zu erwartenden Zellzahl, wenn die Zellen eine 90 bis 100%ige Konfluenz erreicht haben.

Kavität	Kulturfläche [cm^2]	Zellernte [$\times 1000$]	Medium-Volumen	DMEM-Volumen zur Transfektion
Zellkulturflasche	75	1125 – 3000	10 ml	1,5 ml
Zellkulturflasche	25	375 – 1000	5 ml	0,5 ml
Zellkulturplatte mit 6 Kavitäten	9,6	144 – 384	2 ml	250 μl
Zellkulturplatte mit 12 Kavitäten	3,5	52,5 – 140	1 ml	100 μl
Zellkulturplatte mit 24 Kavitäten	1,9	28,5 – 760	500 μl	50 μl
Zellkulturplatte mit 48 Kavitäten	1,1	16,5 – 44	250 μl	25 μl

Zur Kryokonservierung erfolgte die Resuspension des Zellsediments nach Trypsinierung im Einfriermedium (5 % BSA, 10 % DMSO, 85 % Kulturmedium), wobei auf eine Konzentration von 500.000 bis 800.000 Zellen/ml geachtet wurde. Jeweils 1 ml Zellsuspension wurde in ein Einfrierröhrchen gegeben und anschließend langsam abgekühlt: Auf eine zweistündige Lagerung bei -20°C folgte eine Temperierung über Nacht bei -80°C , worauf die Ampullen dann zur endgültigen Lagerung bei -196°C in flüssigen Stickstoff gegeben wurden.

Zum Auftauen wurden die Röhrchen mit den gefrorenen Zellen aus dem Stickstofftank genommen, kurz unter der Laminar Flow geöffnet, um Stickstoffreste entweichen zu lassen, und 2 Minuten im Wasserbad bei 37°C erwärmt, bis nur noch ein kleiner Eiskern vorhanden war. Die Zellsuspension wurde in einem 15 ml-Falkonröhrchen mit 5 ml Kulturmedium verdünnt und durch Zentrifugation (5 Minuten; $600 \times g$; 20°C) von DMSO-Resten befreit. Zur Kultivierung erfolgte die Resuspension und Aussaat unter o. g. Bedingungen.

C2.2.2 Transfektion

Das Prinzip der Transfektion wurde bereits in B2.1 beschrieben. Als Transfektionsreagenz wurde *Lipofectamine 2000* verwendet.

Die Auswertung der Transfektion erfolgte je nach Art des Vektors: Zellen, die mit dem EGFP-Gen transfiziert waren, wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie bei einer Wellenlänge von 488 nm gezählt. Dabei wurde die Anzahl der fluoreszierenden Zellen bei 200-facher Vergrößerung gegen die Anzahl aller im Lichtfeld sichtbaren Zellen normiert. Weitere Auswertungen wie die Luziferase-Aktivitätsmessung (s. C2.2.5), Proliferationsassays (s. C2.2.4) und die mRNA-Quantifizierung (s. C2.1.17) sind an den genannten Stellen beschrieben.

TRANSIENTE TRANSFEKTION

Zur Transfektion der hMSC mittels *Lipofectamine 2000* wurden die Zellen so ausplattiert, dass die Konfluenz nach Adhärenz 50 % betrug. Die Transfektion selbst erfolgte an dem darauf folgenden Tag. Dazu wurde das Medium von den Zellen abgenommen und durch frisches Stammzellwachstumsmedium ersetzt. Die Menge richtete sich dabei nach dem Volumen des Kultivierungsmediums abzüglich der Menge des Serum-freien DMEM. Pro Kavität wurden nun zwei 5 ml fassende Polystyrol-Röhrchen vorbereitet und die in Tab. 2 angegebene Menge Serum-freies DMEM vorgelegt. In einem wurde die DNA verdünnt, im anderen die entsprechende Menge an *Lipofectamine 2000*. Nach maximal 5 Minuten wurden die beiden Ansätze vereint und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Innerhalb dieses Zeitraums konnten sich nun die DNA-Lipidkomplexe formieren, so dass der Ansatz im Anschluss tropfenweise auf die hMSC gegeben werden konnte. Nach 6-stündiger Inkubation (37 °C; 5 % CO₂) erfolgten die Abnahme des Transfektions-Ansatzes und die Zugabe von frischem Stammzellwachstumsmedium. Im Falle der induzierbaren Plasmide enthielten alle Medien die jeweilige Konzentration an Doxycyclin.

KOTRANSFEKTION

Im Prinzip entsprach der Ablauf der Kotransfektion dem der Transfektion. Das Protokoll wich nur in einem Punkt ab, nämlich beim Verdünnen der DNA in DMEM vor dem Vereinen mit dem Transfektionsreagenz und der Vesikelbildung. Da hier zwei verschiedene Plasmide verwendet wurden, musste zusätzlich auf das Verhältnis dieser beiden Plasmide zueinander geachtet werden, wobei die Gesamtmenge an DNA der entsprach, wie sie auch für eine normale Transfektion verwendet wurde. In Optimierungsschritten wurden die Plasmid-Verhältnisse 1:1, 1:10 und 10:1 getestet.

STABILE TRANSFEKTION UND KLONALE EXPANSION

Um stabil modifizierte Zellen zu generieren, wurden die Zellen zunächst wie oben beschrieben transfiziert. 72 Stunden nach Zugabe des Transfektions-Ansatzes wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und gemäß des für die Subkultivierung dargestellten Protokolls nach Zentrifugation und Aufnahme in einer adäquaten Menge frischen Stammzellwachstumsmediums zu gleichen Teilen in einem Verhältnis von 1:5 subkultiviert, so dass die Aussaat in einer sehr geringen Zelldichte (ca. 10 %) resultierte. Die Selektion wurde 24 Stunden später mit der geprüften Konzentration von Geneticin (200 µg/ml, s. D1.2) im Stammzellwachstumsmedium eingeleitet und über 16 Tage aufrechterhalten. Dabei erfolgte der Mediumwechsel und damit zugleich die Abnahme der toten, nicht adhärennten Zellen im 4-Tagesturnus. Als Kontrolle wurden zugleich nicht-transfizierte Zellen (im gleichen Zellkulturplattenformat und gleicher Dichte) unter Antibiotikum-Druck gestellt, um das Überleben nicht stabil transfizierter Zellen nach Ablauf des gewählten Zeitraums auszuschließen.

Durch die Behandlung der transfizierten Zellen mit dem Selektionsantibiotikum nimmt die Zellzahl in der Regel um mehr als 99 % ab. Da das Ziel der stabilen Transfektion in der Generierung einer ausreichenden Anzahl von stabil modifizierten Zellen bestand, mussten diese Zellen unter Bedingungen weiterkultiviert werden, die eine ausreichende Expansion ermöglichten. Um zudem genetisch einheitliche Zellpopulationen herzustellen, musste diese Expansion möglichst klonal geschehen. Der Begriff der klonalen Expansion bezeichnet hierbei die Generierung einer Vielzahl von Zellen ausgehend von einer Ursprungszelle. Dafür wurden die Zellen nach vollständiger Selektion mittels Trypsin/EDTA von dem Zellkulturgefäß abgenommen und in einem Verhältnis von 1:2 in Zellkulturplatten mit einem Durchmesser von 10 cm² subkultiviert. Dies resultierte in einer äußerst geringen Zelldichte (ca. 2 Zellen/cm²), so dass die Zellen in einem ausreichenden Abstand voneinander klonal expandieren konnten. Eine mögliche Expansion der Zellen wurde jeden zweiten Tag kontrolliert. Falls dies eingetreten war, wurde dieser Klon durch selektive Trypsinierung isoliert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und auf das zuvor an der Unterseite der Zellkulturplatten markierte Feld, auf dem der expandierende Zellklon lokalisiert war, mittels einer gebogenen Pinzette ein mit Trypsin getränktes *Cloning Disc* gelegt. Nach 8 Minuten wurde das *Cloning Disc* abgenommen und in eine Vertiefung einer 6-Kavitäten-Zellkulturplatte überführt, in der 2 ml frisches Stammzellmedium vorgelegt worden waren. Anschließend wurden die Zellen unter gewöhnlichen Kultivierungsbedingungen inkubiert und nach zwei Wochen zur weiteren Expansion in T25-Kulturflaschen überführt.

C2.2.3 Toxizitätsanalysen von Geneticin und Doxycyclin

In meinem Projekt wurden hMSC mit den Antibiotika Geneticin und Doxycyclin behandelt. Bei dem ersteren handelt es sich um ein eukaryotisch wirksames Aminoglykosid-Antibiotikum, das zur Selektion bei stabiler Transfektion eingesetzt wurde, bei letzterem um ein potentiell hMSC toxisches, bakteriell wirksames Tetracyclin-Derivat, das zur Induktion der Transgenexpression bei Verwendung des Tet-On-System herangezogen wurde.

DOSIS-WIRKUNGS-ANALYSEN VON GENETICIN

Geneticin blockiert die Proteinbiosynthese durch Hemmung der ribosomalen Funktion. Das Prinzip der Selektionierung bei stabiler Transfektion beruht auf folgender Grundlage: Durch Transfektion der Zellen mit Plasmiden, die unter anderem für Antibiotika-Resistenzen kodieren, können nur die Zellen, die diese dauerhaft exprimieren, überleben. Legt man den Selektionsdruck über einen bestimmten Zeitraum an, wirkt Geneticin zunehmend zytotoxisch auf transient transfizierte Zellen, da diese dem Abbau der nicht integrierten DNA und damit der Abnahme der Expression der Neomycinresistenz unterworfen sind. Zur Ermittlung der Konzentration, die nötig ist, um zwischen natürlicher und erworbener Resistenz gegen eine bestimmte Dosis von Geneticin zu diskriminieren, wurde eine Zytotoxizitätsbestimmung durchgeführt. Dies wurde über eine Vitalitätsbestimmung mittels Propidiumiodid/Fluoresceindiacetat (PI-FDA) und Zellzählung bewerkstelligt.

Dazu wurden in 12-Kavitäten-Zellkulturplatten 30.000 untransfizierte hMSC ausgesät. Einen Tag später erfolgten die Abnahme des Mediums und der Ersatz durch frisches Stammzellwachstumsmedium, dem jedoch Geneticin in einer Endkonzentration zwischen 100 µg/ml und 350 µg/ml (in 50 µg/ml-Schritten) zugegeben worden war. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 8 bzw. 11 Tagen kultiviert, wobei das Medium zweimal wöchentlich ersetzt wurde. Die Zellen wurden nach beendeter Kultivierung mit 200 µl Trypsin/EDTA abgelöst und mit dem zuvor abgenommenen Überstand der jeweiligen Kavität vermischt. Dies führte zum einen zur Neutralisierung der Trypsin-Aktivität, und zum anderen konnte so die Anzahl der im Überstand befindlichen toten Zellen mitbestimmt werden. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 Minuten; 600 × g; 20 °C) erfolgte die Aufnahme in 100 µl PBS. Zu 20 µl dieser Lösung wurden 2 µl PI (500 µg/ml Aceton) und 4 µl FDA (10 µg/ml H₂O) gegeben. Dabei färbt PI tote Zellen rot, FDA hingegen vitale Zellen grün. Die Anzahl der roten und grünen Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer durch Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Die Exzitation betrug hierbei 450 – 490 nm.

TOXIZITÄTSBESTIMMUNG VON DOXYCYCLIN

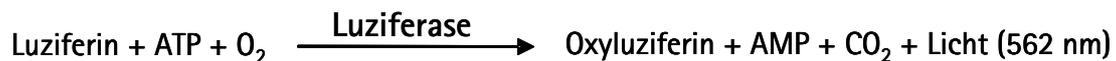
Doxycyclin greift nicht in die Proteinbiosynthese von Eukaryoten ein, wie es das bei Prokaryoten hingegen tut. Dennoch wurde kontrolliert, ob bzw. inwiefern hMSC durch die Behandlung mit Doxycyclin beeinflusst werden. Dabei wurde in analoger Weise wie oben bereits beschrieben vorgegangen. Die einzige Veränderung bestand darin, dass die Konzentrationen zwischen 0,001 und 10 µg/ml (in 10er Potenz-Schritten) lagen.

C2.2.4 Proliferationsstudien mit CyQuant®

Diese einfache Methode zur Bestimmung der Zellzahl beruht auf der Bindung eines grün fluoreszierenden Farbstoffes (CyQuant®) an die Nukleinsäuren nach Lyse der Zellen. Die hMSC wurden dafür nach Abklopfen des Mediums mit PBS gewaschen und mindestens einen Tag – noch auf Kulturplatten adhärent – bei -80 °C gelagert. Für die Messung wurde der *CyQuant Cell Proliferation Assay Kit* von Molecular Probes, USA verwendet. Die Zellen wurden hierfür wieder aufgetaut und in 200 µl eines Gemisches aus Lysepuffer und Farbstoff nach leichtem Schütteln für 5 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fluoreszenz wurde nach Transfer der Proben in schwarze Mikrotiterplatten (Corning Costar, USA) mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Lesegeräts von Perkin Elmer, USA mit einem Anregungsfilter (480 nm) und einem Emissionsfilter (520 nm) mittels des Programms *HTSoft Wizard* (HI-TECH Software LLC, USA, www.htsoft.com) gemessen.

C2.2.5 Luziferase-Aktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der Enzym-Aktivität der Luziferase aus *Phontius pyralis* ist ein äußerst sensitiver und etablierter Reporterassay zur Quantifizierung von Promotor-Aktivitäten. Die Luziferase katalysiert dabei folgende Reaktion unter grün-gelber Lichtemission:



Nach der Transfektion von hMSC mit einem für die Luziferase kodierenden Plasmid wurden die Zellen mit dem *Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity* von Roche, Mannheim weiteruntersucht. Dafür wurden nach Abnahme des Mediums die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend lysiert und bis zur Messung bei -80 °C eingefroren. Zur Messung selbst wurden die Proben in 1,5 ml Reaktionsgefäßen 1 Minute bei 15.700 × g und Raumtemperatur zentrifugiert und die Überstände in weiße Mikrotiterplatten (Nunc, USA) pipettiert. Erst kurz vor Start des Luminometers wurde der Reaktionspuffer zugegeben, der auch das Luziferin enthielt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms *WinGlow* (Berthold Technologies, Bad Herrenalb, www.berthold.com). Die Aktivität wurde dabei in *Relative Light Units* (RLU) bezogen auf die Zellzahl angegeben.

C2.2.6 CHO-Zellen als Kontrolle für das Tet-On-System

Die CHO-Tumorzelllinie diente in dieser Arbeit als Kontrolle bei der Etablierung des Tet-On-Systems und des *Luziferase Reporter Gene Assay, high sensivity*. Diese Zellen hatten durch die doppelt stabile Transfektion mit den Vektoren pTet-Off und pTRE2hyg-Luc die Fähigkeit erhalten, die Luziferase regulierbar zu exprimieren. Im Falle eines Tet-Off-Systems, wie es hier vorlag, wird die Luziferase ohne Doxycyclin ständig exprimiert, durch Zugabe von Doxycyclin hingegen abgeschaltet.

Als Tumorzelllinie sind CHO-Zellen einfacher zu handhaben als hMSC. Die Kultivierung und Anzucht entsprachen größtenteils denen der hMSC. Die Zellen sind aber wesentlich kleiner als hMSC, d. h. man arbeitet hier mit deutlich höheren Zellzahlen (Tab. 3).

Tab. 3 Kultivierung von CHO-Zellen in Zellkulturgefäßen verschiedener Größe. Die effektive Kulturfläche der jeweiligen Kavitäten wurde vom Hersteller der Platten Nunc, USA übernommen.

Kavität	Kulturfläche in [cm ²]	Zell-Aussaat [× 1000]	Zellernte [× 1000]
Zellkulturflasche	75	585	bis 24.000
Zellkulturflasche	25	195	bis 8000
Zellkulturplatte mit 6 Kavitäten	9,6	75	bis 3000

Abweichungen lagen nur im Kultivierungsmedium, das hier 90 % DMEM, 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin enthielt, und im Einfriermedium (90 % Kultivierungsmedium, 10 % DMSO). Zusätzlich wurden 0,1 mg/ml Geneticin und 0,25 mg/ml Hygromycin zugegeben, um den Selektionsdruck bezüglich der beiden Transgene aufrechtzuerhalten. Alle Zentrifugationen erfolgten bei Raumtemperatur und bei 125 × g für 10 Minuten.

C2.3 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte mit Hilfe der Programme *SigmaPlot 2001* (Systat Software GmbH, Erkrath, www.systat.com) und *Microsoft Excel, Office XP Professional* (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, www.microsoft.com). Nach Prüfung der Varianzhomogenität wurde der t-Test nach Student durchgeführt. Ein Wert von $p < 0,05$ galt als Hinweis auf einen Unterschied, $p < 0,01$ wurde als statistisch signifikant und $p < 0,001$ als hoch signifikant betrachtet.

D ERGEBNISSE

D1 TOXIZITÄTSANALYSEN

Zur Frage nach den optimalen Bedingungen zur stabilen nicht-viralen Transfektion von verschiedenen Reporterplasmiden in hMSC zählt auch die Ermittlung der optimalen Wirkkonzentration des zur Selektion verwendeten Antibiotikums Geneticin. Genauso wurde das zur Induktion verwendete Antibiotikum Doxycyclin auf Toxizität geprüft.

D1.1 Doxycyclin

Für Doxycyclin, das hier als prokaryotisches Antibiotikum zur Steuerung der regulierbaren Genexpression verwendet wurde, konnte im Konzentrationsbereich zwischen 0,001 und 100 µg/ml kein zytotoxischer Effekt auf hMSC nachgewiesen werden. Die Stammzellen zeigten dasselbe Proliferationsverhalten wie unter Standardbedingungen.

D1.2 Dosis-Wirkungskurven von Geneticin bei hMSC

Anhand des Viabilitätsassays mit Propidiumiodid und Fluoresceindiacetat konnte die genaue Geneticin-Konzentration ermittelt werden, die nötig ist, um alle eingesetzten Zellen in einem bestimmten Zeitraum abzutöten. Die Ergebnisse am Tag 8 und Tag 11 nach Beginn der Selektion sind aus Abb. 10 ersichtlich. Eine Erhöhung der Geneticin-Konzentration bewirkte eine zunehmende Steigerung der Zytotoxizität. So reichte eine Geneticin-Konzentration von 200 µg/ml für einen Zeitraum von 11 Tagen aus, um die Selektion einer hMSC-Population zu gewährleisten, die durch Expression des Transgens Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase resistent gegenüber Geneticin war.

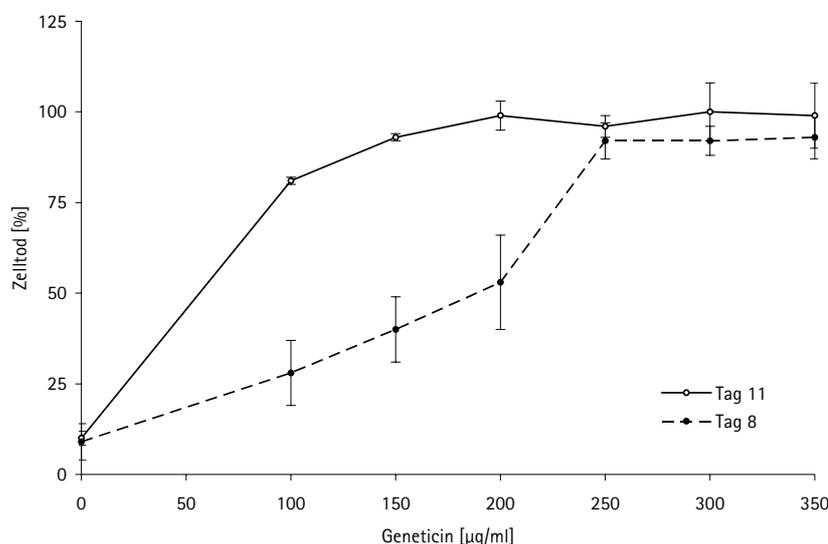


Abb. 10 Dosis-Wirkungsanalyse von Geneticin in hMSC. Zunehmende Geneticin-Konzentrationen (Abszisse) führen zu einem verstärkten Zelltod (Ordinate). Die Auswertung erfolgte 8 bzw. 11 Tage nach Zugabe von Geneticin. Die gezeigten Daten stellen die Mittelwerte +/- Standardabweichung zweier unabhängiger Experimente dar, welche jeweils in drei Ansätzen durchgeführt wurden.

D2 GENERIERUNG UND TRANSFEKTION VON PLASMIDEN MIT REPORTERGENEN

Zur Markierung von hMSC und Quantifizierung der Gen-Expression des Reportergens sollten Plasmide mit den Reportern EGFP und Luziferase in hMSC transient und stabil mit liposomalem Gentransfer eingebracht werden. Diese Plasmide wurden zunächst generiert und anschließend in hMSC mittels liposomalen Gentransfers transfiziert.

D2.1 Generierung von Plasmiden mit Reporter genen

D2.1.1 pEGFPLuc-IRESneo2

Das EGFP-Luziferase-Gen sollte als Fusionskonstrukt aus dem Vektor pEGFPLuc geschnitten und in die *multiple cloning site* (MCS) des Vektors pIRESneo2 inseriert werden. Dazu wurden beide Plasmide mit den Restriktionsendonukleasen *NheI* und *HpaI* »über Kreuz« verdaut.

Nach einer Ethanol fällung und einer Dephosphorylierung wurden die entsprechenden DNA-Fragmente von 5,3 bzw. 2,6 kb über ein präparatives Gel isoliert (Abb. 11a) und ligiert. Nach Transformation ergab der anschließende analytische Verdau von zwölf Klonen mit *NheI* und *HpaI*, dass sieben Klone das gewünschte Insert trugen (Vektor: 5,3 kb; Insert: 2,6 kb; Abb. 11b). Die Vektorkarte von pEGFPLuc-IRESneo2 ist in Abb. 12 dargestellt.

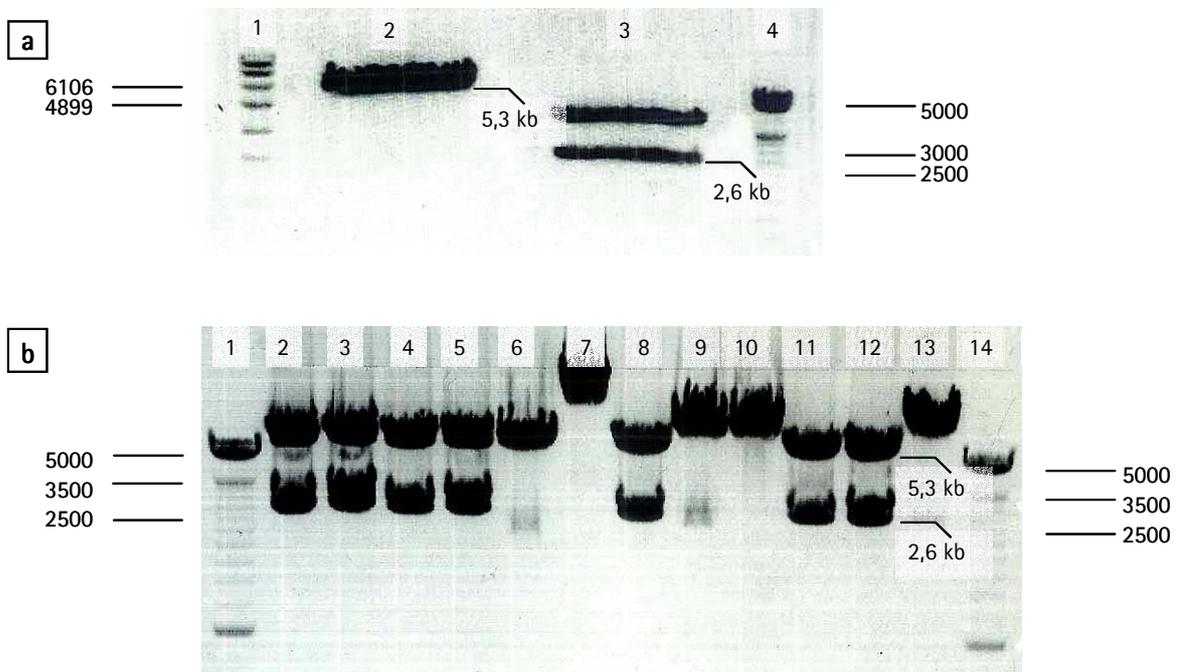


Abb. 11 Präparative und analytische Agarose-Gel-Elektrophorese zur Herstellung von pEGFPLuc-IRESneo2.

a Präparative Elektrophorese von pIRESneo2 und pEGFPLuc. 1: DNA-Marker VII; 2: pIRESneo2 x *NheI* und *HpaI*; 3: pEGFPLuc x *NheI* und *HpaI*; 4: 250 bp-DNA-Marker.

b Analytischer Restriktionsverdau des Vektors pEGFPLuc-IRESneo2. 1: 250 bp-DNA-Marker; 2-13: pEGFPLuc-IRESneo2 x *NheI* und *HpaI*; 14: 250 bp-DNA-Marker.

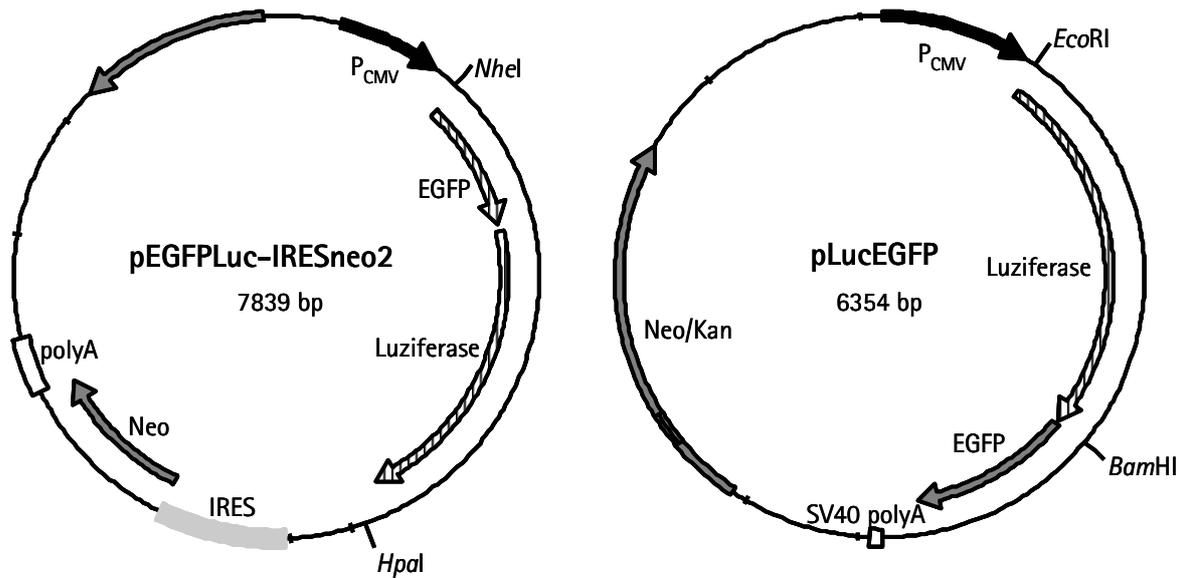


Abb. 12 Vektorkarten von pEGFPLuc-IRESneo2 und pLucEGFP. Das Vektorgrundgerüst von pEGFPLuc-IRESneo2 besteht aus pIRESneo2, während das inserierte Fragment ein Fusionskonstrukt aus EGFP und Luziferase darstellt. Zur Generierung von pLucEGFP wurde in das Plasmid pEGFP-N3 das Luziferase-Fragment am 5'-Ende von EGFP über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *BamHI* inseriert.

D2.1.2 pLucEGFP

Zur Herstellung dieses Vektorkonstrukts wurde das Luziferase-Gen aus dem Vektor pEGFPLuc mittels PCR amplifiziert und in die MCS des Vektors pEGFP-N3 inseriert. Das PCR-Produkt von 1,7 kb wurde über ein präparatives Gel aufgereinigt, und – genauso wie der Vektor – per Kreuzrestriktion mit *BamHI* und *EcoRI* geschnitten. Der Vektor (4,7 kb) wurde nach der Dephosphorylierung über ein präparatives Gel isoliert, während das Insert nach der Restriktion über eine Ethanol-fällung gereinigt wurde. Nach Ligation und Transformation waren fünf von acht untersuchten Klonen positiv (Vektor 4,7 kb; Insert 1,7 kb; Abb. 13). Die Vektorkarte von pEGFPLuc-IRESneo2 ist in Abb. 12 dargestellt.

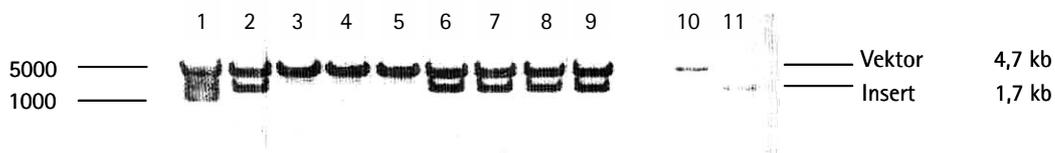


Abb. 13 Analytische Agarose-Gel-Elektrophorese von pLucEGFP. 1: 250 bp-DNA-Marker; 2-9: pLucEGFP x *BamHI* und *EcoRI*; 10: pEGFP-N3 x *BamHI* x *EcoRI*; 11: Luziferase-Insert.

D2.2 Transiente Transfektion von Plasmiden mit Reporter genen

Nach Generierung der Plasmide wurden diese unter Variation verschiedener Parameter in hMSC transfiziert, um die optimalen Bedingungen für eine maximale Transfektionseffizienz zu ermitteln. Die Auswertung erfolgte dabei über die EGFP-Fluoreszenz und die Quantifizierung der Luziferase-Aktivität.

D2.2.1 Optimierung über EGFP-Fluoreszenz

Zur Optimierung der Transfektionseffizienz der Luziferase-Plasmide pEGFPLuc, pEGFPLuc-IRESneo2 und pLucEGFP in hMSC wurden unterschiedliche Mengen von Vektor-DNA und *Lipofectamine 2000* eingesetzt, wobei die Auswertung über die EGFP-Fluoreszenz erfolgte. Die DNA-Mengen wurden zwischen 0,32 und 3,9 µg/ml variiert. Die Verhältnisse von Liposomenreagenz und DNA lagen zwischen 1:0,5 und 1:12. Hierbei zeigte sich bei allen Transfektionsansätzen nur eine sehr schwache Fluoreszenz. In Abb. 14 ist hier beispielhaft die Transfektion von pEGFPLuc dargestellt, wobei das beste Resultat bei 3,5 % EGFP-positiven hMSC lag (1,6 µg/ml DNA bei zweifacher Menge an *Lipofectamine 2000* in einer 12-Kavitäten-Zellkulturplatte). Als Kontrolle wurde immer der Vektor pEGFP-N3 (0,6 µg/ml, 1,5-fache Menge von *Lipofectamine 2000*) transfiziert, wobei bis zu 40 % der Zellen EGFP-positiv waren.

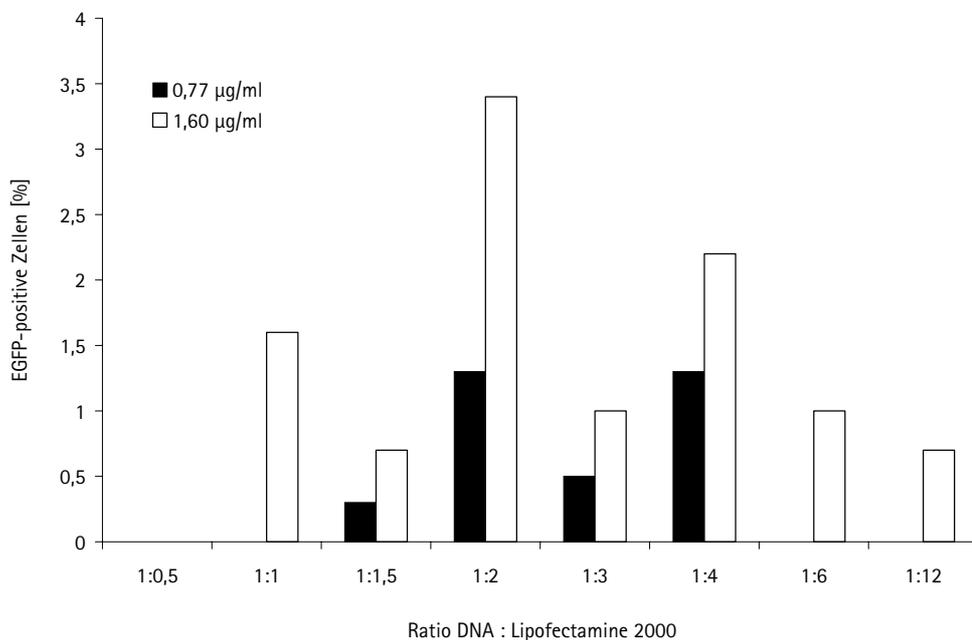


Abb. 14 Effizienz der *Lipofectamine 2000*-vermittelten Transfektion von pEGFPLuc in hMSC 24 Stunden nach Transfektion unter Variation des DNA-*Lipofectamine 2000*-Verhältnisses (1:0,5 bis 1:12) und der DNA-Konzentration (0,77 und 1,6 µg/ml). Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis eines Experimentes, welches zweimal wiederholt wurde.

D2.2.2 Verifizierung über Luziferase-Aktivität

Die drei Plasmide pEGFPLuc, pEGFPLuc-IRESneo2 und pLucEGFP wurden hierzu erneut im 12-Kavitäten-Format transfiziert. Dabei wurden DNA-Mengen von jeweils 0,80 µg/ml eingesetzt, bzgl. des Transfektionsreagenz wurde jeweils die 3-fache Menge (2,40 µl/ml) verwendet. Nach zwei Tagen erfolgte die Bestimmung der Luziferase-Aktivität. Aus den in Abb. 15 dargestellten Ergebnissen wird ersichtlich, dass der Vektor pEGFPLuc unter diesen Bedingungen zur höchsten Luziferase-Expression führte. Der Vektor pEGFPLuc-IRESneo2 zeigte eine deutlich geringere Luziferase-Aktivität. Das Vektor-Konstrukt pLucEGFP erbrachte hingegen keine Luziferase-Expression.

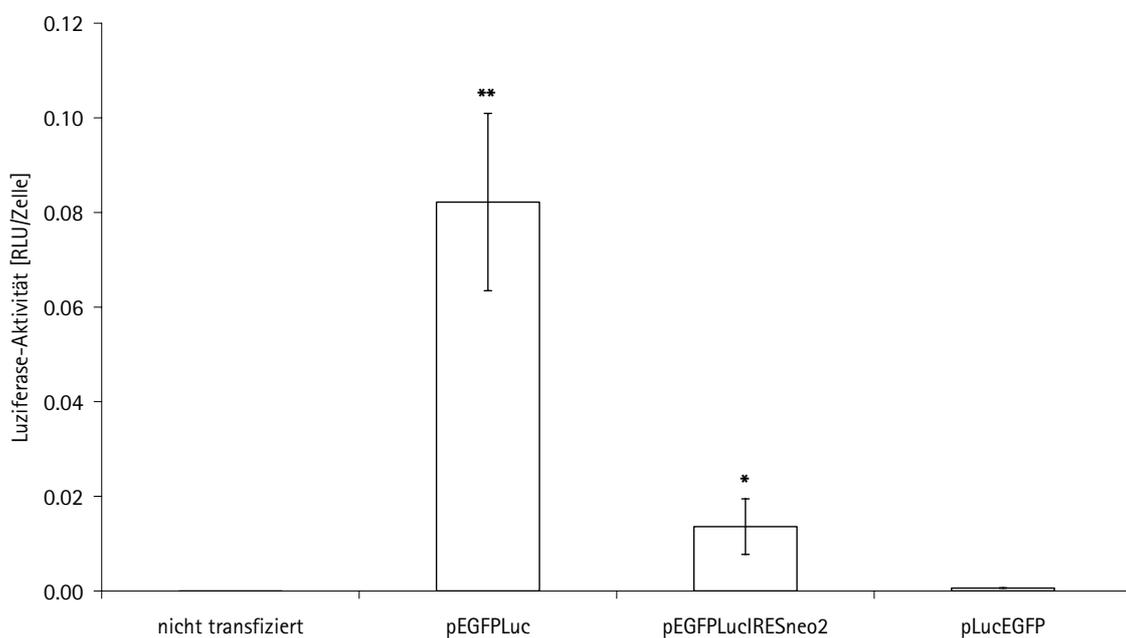


Abb. 15 Luziferase-Aktivität in hMSC 48 Stunden nach Transfektion mit den Vektoren pEGFPLuc, pEGFPLuc-IRESneo2 und pLucEGFP.

Die gezeigten Daten stellen die Mittelwerte +/- Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten dar, welche jeweils in drei Ansätzen durchgeführt wurden (**: $p < 0,01$; *: $p < 0,5$ im Vergleich zur nicht-transfizierten Kontrolle).

D3 INDUZIERBARE GENEXPRESSION MITTELS DES TET-ON-SYSTEMS

Zur Etablierung des Tet-On-Systems in hMSC wurde zunächst nach dem Standardprotokoll vorgegangen (www.bdbiosciences.com). Das beinhaltete neben Vorarbeiten wie die Validierung des Systems an einer etablierten Zelllinie (Tet-Off-CHO-Zelllinie), die Untersuchung des FBS auf Doxycyclin-Rückstände und die Generierung von Plasmiden auch transiente Transfektionen. Dazu zählte außerdem eine stabile Transfektion, gefolgt von klonaler Expansion und konsekutiver Transfektion.

D3.1 Validierung an CHO-Zellen

An der mit den Vektoren pTet-Off und pTRE2hyg-Luc doppelt stabil transfizierten Tet-Off-CHO-Zelllinie wurde zunächst der Nachweis erbracht, dass verschiedene Luziferase-Expressionsniveaus durch unterschiedliche Doxycyclin-Konzentrationen erzielt werden können. In diesem Tet-Off-System resultiert eine Zugabe von Doxycyclin in einer Repression der Luziferase-Aktivität. Eine Regulation der Luziferase-Expression war in einem Doxycyclin-Konzentrations-Bereich zwischen 0 bis 0,1 µg/ml möglich. Bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml konnte dabei die maximale Repression (700-fach) erreicht werden. Eine vollständige Repression wurde dabei nicht erreicht, d. h. es zeigte sich eine verbleibende unspezifische Aktivität.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch Einfrieren bei -80 °C die Luziferase-Aktivität um einen konstanten Betrag erhöht werden kann (Simpson and Hammond, 1991) (Abb. 16). Deshalb wurde für alle in dieser Arbeit durchgeführten Luziferasemessungen diese Modifikation (Lagerung der Zellen bei -80 °C für mindestens einen Tag) übernommen.

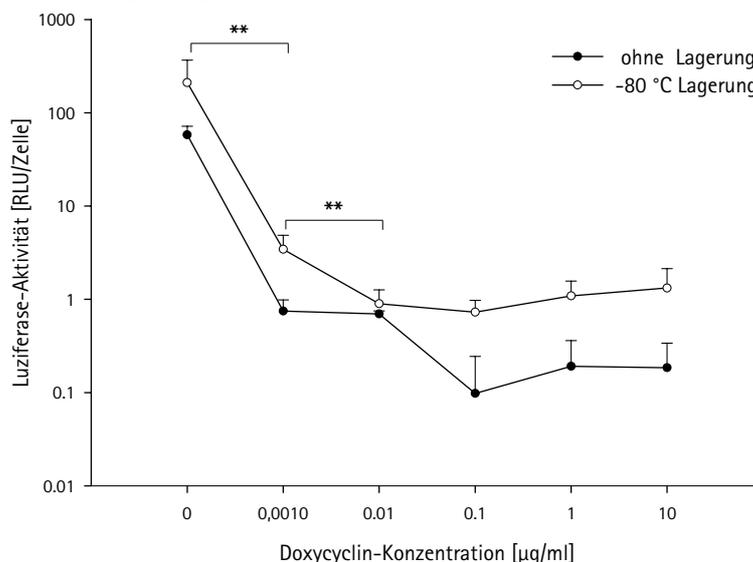


Abb. 16 Abhängigkeit der Luziferase-Aktivität von der Doxycyclin-Konzentration in pTet-Off/pTRE2hyg-Luc doppelt stabil transfizierten CHO-Zellen. Steigende Konzentrationen führen dabei zu einer Abnahme der Aktivität.

Die Daten sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten dargestellt, welche jeweils in drei Ansätzen durchgeführt wurden. Mit einer Konzentration von 0,001 und 0,01 µg/ml Doxycyclin kann eine signifikante Repression gegenüber dem Vorwert erreicht werden (**: $p < 0,01$).

D3.2 FBS-Untersuchung

Durch die häufige Gabe von Antibiotika in der Tierhaltung, kann es zu Rückständen von Tetracyclin/Doxycyclin im fötalen Kälberserum kommen. Um das verwendete FBS der Fa. Cambrex, USA auf dessen Doxycyclingehalt zu überprüfen, wurde zunächst ein Medium hergestellt, das Doxycyclin-freies FBS (TET-System geprüftes FBS, BD Biosciences, USA) enthielt. Die Analyse erfolgte durch eine Kotransfektion der Vektoren pTet-On und pTRE2hyg-Luc (s. Abb. 22) ohne Doxycyclin und unter Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin mit anschließender Luziferase-Aktivitätsbestimmung. Als Kontrolle wurde die Luziferase-Expression von pEGFPLuc-transfizierten bzw. nicht-transfizierten hMSC gemessen (nicht dargestellt). Bei beiden zum Vergleich herangezogenen Medien ist eine unspezifische Expression (Expression ohne Induktion) zu sehen, die in Abb. 17 durch logarithmische Darstellung hervorgehoben wird.

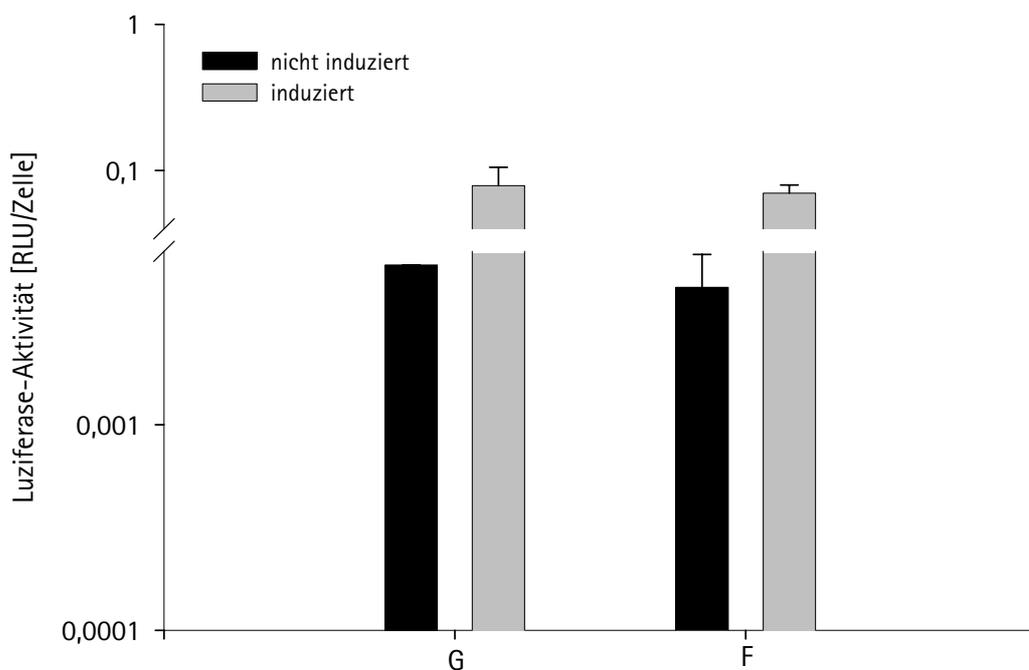


Abb. 17 Luziferase-Aktivität in hMSC nach Kotransfektion von pTet-On und pTRE2hyg-Luc und Induktion mit 1 µg/ml Doxycyclin in unterschiedlichen Kultivierungsmedien;

(G: Stammzellwachstumsmedium; F: Stammzellwachstumsmedium mit Doxycyclin-freiem FBS).

Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten dargestellt, welche jeweils in drei Ansätzen durchgeführt wurden. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen G und F sowohl im nicht-induzierten als auch im induzierten Zustand festgestellt werden.

D3.3 Plasmid-Generierung zur regulierbaren Genexpression

Die regulierbare Genexpression erforderte die Generierung von weiteren Plasmiden.

Die Klonierungen der Vektoren pTRE2hyg-EGFP und pTRE2hyg-POU5F1_iA bzw. -POU5F1_iB werden hier gemeinsam beschrieben, da sie demselben Prinzip folgten: In das Vektorgerüst (pTRE2hyg) sollte in die MCS die entsprechende cDNA von EGFP, POU5F1_iA bzw. POU5F1_iB eingefügt werden, um die Genexpression durch den regulierbaren Promotor zu kontrollieren.

D3.3.1 pTRE2hyg-EGFP

Das EGFP-Gen wurde mit *Bam*HI und *Not*I sequentiell aus dem Vektor pEGFP-N3 geschnitten. Der Vektor wurde gleichermaßen verdaut und dephosphoryliert. Die Fragmente (0,76 kb bzw. 5,3 kb) wurden über ein präparatives Gel aufgereinigt und ligiert. Durch einen Verdau mit *Eco*RV und *Bam*HI wurden vier analysierte Transformanden als positiv identifiziert (Abb. 18).

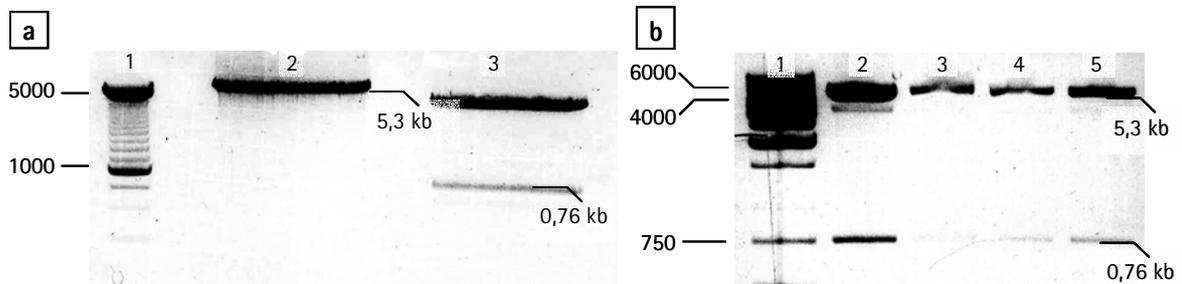


Abb. 18 Präparative und analytische Agarose-Gel-Elektrophorese zur Herstellung von pTRE2hyg-EGFP.

a Präparative Elektrophorese von pTRE2hyg und pEGFP-N3. 1: 250 bp-DNA-Marker; 2: pTRE2hyg x *Bam*HI und *Not*I; 3: pEGFP-N3 x *Bam*HI und *Not*I.

b Analytische Elektrophorese von pTRE2hyg-EGFP. 1: 250 bp-DNA-Marker; 2-5: pTRE2hyg-EGFP x *Eco*RV und *Bam*HI.

D3.3.2 pTRE2hyg-POU5F1_iA bzw. -POU5F1_iB

Die POU5F1_iA- bzw. POU5F1_iB-cDNA stammten aus den Vektoren pCR2.1-TOPO-POU5F1_iA bzw. -POU5F1_iB (s. D5.1). Dazu wurden diese genauso wie der Vektor pTRE2hyg mit *Sal*I und *Nhe*I »über Kreuz« verdaut. Der Vektor wurde zusätzlich dephosphoryliert. Danach wurden alle DNA-Fragmente (Vektor 5,3 kb; POU5F1_iA bzw. POU5F1_iB 1,1 bzw. 0,8 kb) über ein Gel isoliert und ligiert. Jeweils neun der zehn Klone, die durch Verdau mit *Eco*RV und *Nhe*I analysiert wurden, waren positiv für POU5F1_iA bzw. POU5F1_iB (Abb. 19).



Abb. 19 Analytische Agarose-Gel-Elektrophorese von pTRE2hyg-POU5F1_iA-bzw. POU5F1_iB.

a Analytische Restriktion von pTRE2hyg-POU5F1_iA. 1: 250 bp-DNA-Marker; 2-11: pTRE2hyg-POU5F1_iA x *Eco*RV und *Nhe*I; 12: pTRE2hyg x *Sal*I und *Nhe*I; 13: POU5F1_iA-Fragment.

b Analytische Restriktion von pTRE2hyg-POU5F1_iB. 1: 250 bp-DNA-Marker; 2-11: pTRE2hyg-POU5F1_iB x *Eco*RV und *Nhe*I; 12: pTRE2hyg x *Sal*I und *Nhe*I; 13: POU5F1_iB-Fragment.

D3.4 Transiente Transfektionen

Die Etablierung des Tet-On-Systems erforderte nach Generierung der Plasmide die Transfektion dieser in hMSC. Unter Variation verschiedener Parameter sollten die optimalen Bedingungen für eine maximale Transfektionseffizienz ermittelt werden.

D3.4.1 Optimierung der Transfektion von pTet-On

Für die Ermittlung der optimalen Bedingungen zur Transfektion von pTet-On wurden hMSC mit unterschiedlichen Mengen von DNA (0,3 bis 0,8 µg/ml) und *Lipofectamine 2000* (1,5- bis 9-facher Überschuss) im 12-Kavitäten-Format transfiziert. Die Auswertung erfolgte hierbei über die Geneticin-Resistenz, da das Plasmid pTet-On kein Reporter gen enthält. Dazu wurde am ersten Tag nach der Transfektion Geneticin in einer höheren Konzentration als üblicherweise (1 mg/ml im Vergleich zu 100 µg/ml) zugegeben. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass durch eine transiente Transfektion wesentlich höhere Transgen-Expressionsraten erzielt werden als bei einer stabilen Transfektion. In dem Zeitraum der transienten Transfektion (12 – 72 Stunden) (Li and Huang, 2000) starben hauptsächlich Zellen, die höheren Mengen an DNA und *Lipofectamine 2000* ausgesetzt waren. Beispielhaft ist in Abb. 20 der 2. Tag dargestellt.

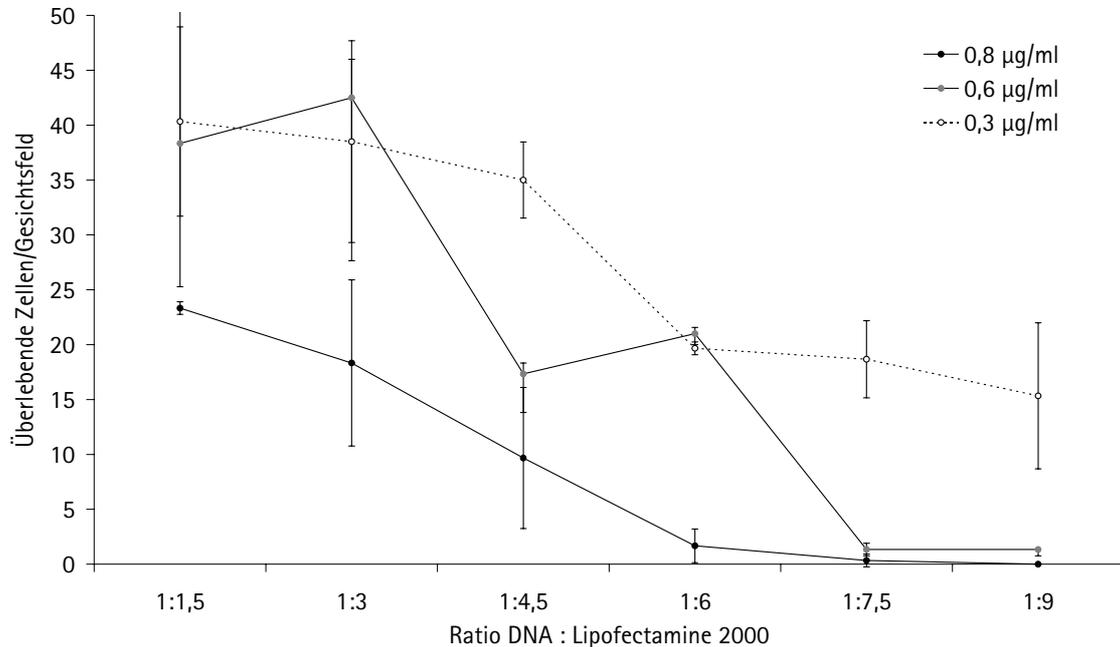


Abb. 20 Überlebende Zellen nach Transfektion mit pTet-On und 2-tägiger Geneticin-Behandlung (1 mg/ml) unter Variation des DNA-*Lipofectamine 2000*-Verhältnisses (1:1,5 bis 1:9) und der DNA-Konzentration (0,3 bis 0,8 µg/ml). Die dargestellten Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von Vierfachbestimmungen aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Versuche wurden jeweils in drei Ansätzen durchgeführt.

Bei einer DNA-Menge von 0,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und einem 1,5-fachen Überschuss an *Lipofectamine 2000* überlebten dagegen die meisten Zellen einen Selektionszeitraum von sieben Tagen (Abb. 21).

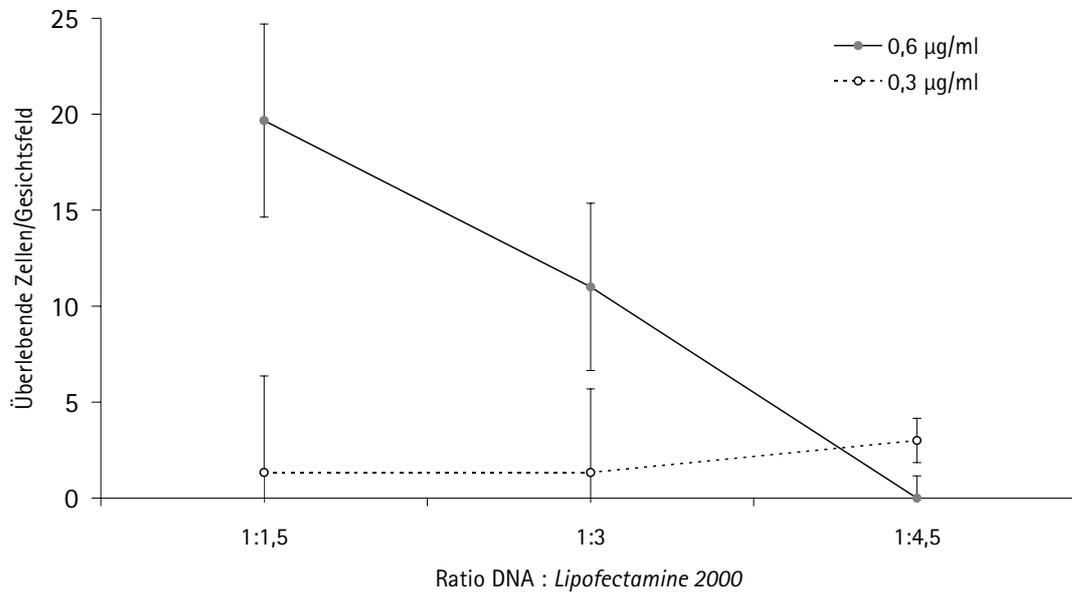


Abb. 21 Überlebende Zellen nach Transfektion mit pTet-On und 7-tägiger Geneticin-Behandlung (1 mg/ml) unter Variation des DNA-*Lipofectamine 2000*-Verhältnisses (1:1,5 bis 1:9) und der DNA-Konzentration (0,3 und 0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von Vierfachbestimmungen aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Versuche wurden jeweils in drei Ansätzen durchgeführt.

D3.4.2 Kotransfektion von pTet-On und pTRE2hyg-Luc

OPTIMIERUNG

Die zuerst nur zur Prüfung der Kompatibilität in hMSC durchgeführte Kotransfektionen der Vektoren pTet-On und pTRE2hyg-Luc erwiesen sich als gutes Mittel für weitere Untersuchungen (s. D3.2 und unten). Parameter, die hier zur Optimierung variiert wurden, waren die DNA-Gesamtmenge, das Verhältnis der beiden Vektoren zueinander und die *Lipofectamine 2000*-Mengen. Die Luziferase-Aktivität wurde dabei mit einer Doxycyclin-Konzentration von 1 µg/ml induziert. Die besten Induktionsraten wurden mit 0,9 µg/ml DNA und einem 3-fachen Überschuss an Transfektionsreagenz erreicht. Mit 0,09 µg/ml DNA von pTet-On und 0,81 µg/ml von pTRE2hyg-Luc (Verhältnis 1:10) wurden dieselben Luziferase-Expressionsraten erzielt wie mit 0,45 µg/ml pTet-On und 0,45 µg/ml pTRE2hyg-Luc (Verhältnis 1:1). Bei darauf folgenden Experimenten wurde immer ein Vektorenverhältnis von 1:10 bei einer Gesamtmenge von 0,9 µg/ml DNA und einem 3-fachen Überschuss an Transfektionsreagenz verwendet. Eine Transfektion beider Vektoren ohne Induktion zeigte, dass der induzierbare Promotor ohne Doxycyclin nur eine sehr geringe Luziferase-Expression vermittelte (Abb. 22), d. h. nur wenig unspezifische Aktivität zeigte.

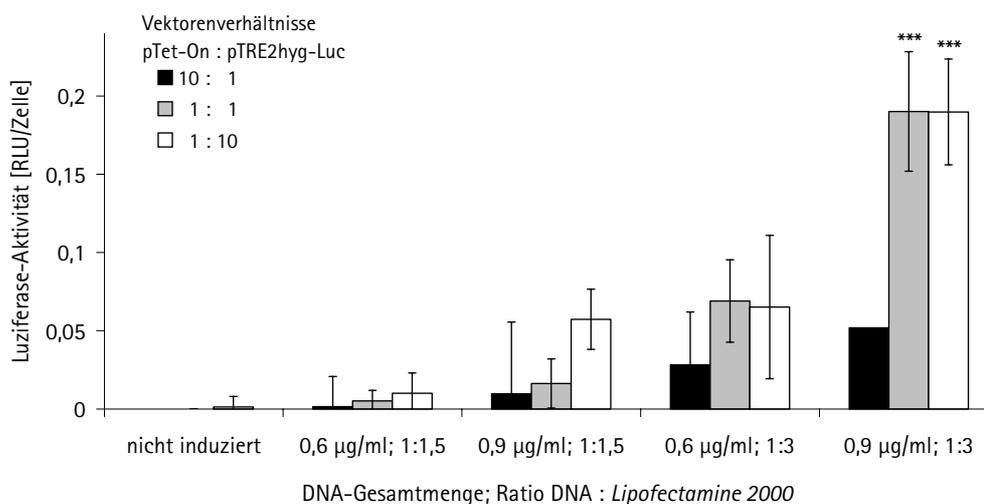


Abb. 22 Luziferase-Aktivität nach Transfektion der Vektoren pTet-On und pTRE2hyg-Luc mit verschiedenen *Lipofectamine 2000*- und DNA-Mengen bzw. Vektorverhältnissen nach Doxycyclin-Induktion mit 1 µg/ml. Bei der nicht-induzierten Kontrolle wurde mit einer Gesamtmenge von 0,9 µg/ml DNA im Vektorenverhältnis von 1:10 und einem 3-fachen Überschuss an *Lipofectamine 2000* transfiziert.

Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen, welche jeweils in drei Ansätzen durchgeführt wurden. Die besten Induktionsraten wurden mit 0,9 µg/ml DNA und einem 3-fachen Überschuss an Transfektionsreagenz und den Vektorenverhältnissen von 1:1 und 1:10 erreicht (signifikanter Unterschied zu anderen Transfektionsbedingungen; ***: $p < 0,001$; kein signifikanter Unterschied zwischen 1:1 und 1:10 bei 0,9 µg/ml DNA und 3-fachen Überschuss an *Lipofectamine 2000*).

DOXYCYCLIN-TITRATIONSREIHE

Da sich die transiente Kotransfektion der Vektoren pTet-On und pTRE2hyg-Luc unter den o. g. Bedingungen als geeignetes Mittel für die Untersuchung einer regulierten Genexpression

in hMSC herausstellte, sollte untersucht werden, ob und inwieweit unterschiedliche Doxycyclin-Konzentrationen das Expressionsniveau steuern können. Die Versuche zeigten, dass mit steigenden Doxycyclin-Konzentrationen eine erhöhte Expression der Luziferase einherging (Abb. 23). Aus dem Verhältnis nicht-induziert zu induziert ließ sich der jeweilige Induktionsfaktor berechnen (Tab. 4). So konnte z. B. mit einer Doxycyclin-Konzentration von 10 µg/ml eine Induktion um das 40-fache erreicht werden.

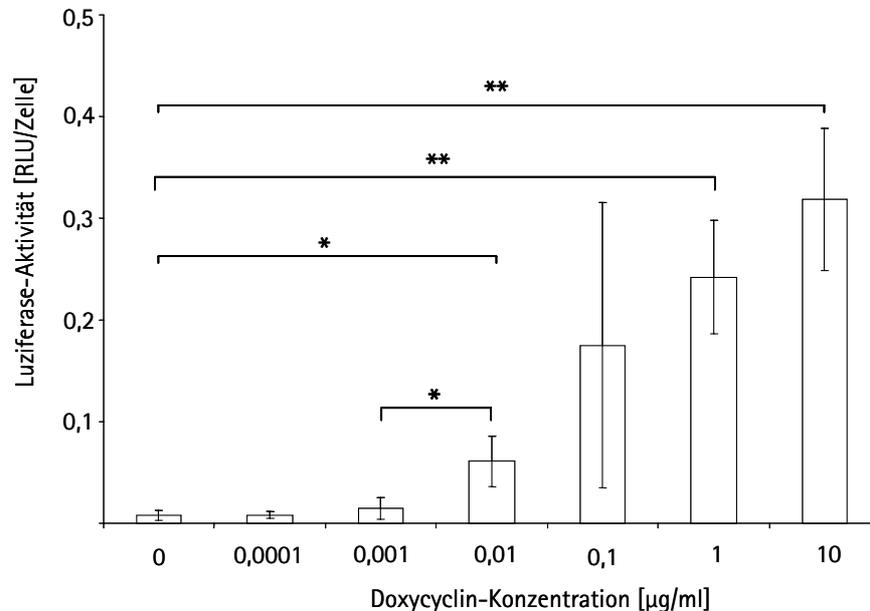


Abb. 23 Luziferase-Aktivität nach Transfektion der Vektoren pTet-On und pTRE2hyg-Luc mit Induktion durch verschiedene Doxycyclin-Konzentrationen. Die Regulation beschränkt sich nicht nur auf einen An- bzw. Ausmechanismus, sondern lässt eine quantitative Steuerung der Genexpression zu. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente zu verstehen, wobei jeder Versuch aus drei Ansätzen bestand (signifikanter Unterschied zum Vorwert bei einer Doxycyclin-Konzentration von 0,01 µg/ml; signifikante Unterschiede zur nicht-induzierten Kontrolle bei den Doxycyclin-Konzentration von 0,01 µg/ml, 1 und 10 mg/ml; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$).

Tab. 4 Induktion der Luziferase-Expression bei steigenden Doxycyclin-Konzentrationen.

Doxycyclin-Konzentration [µg/ml]	0,0001	0,001	0,01	0,1	1	10
Induktionsfaktor	1	2	8	22	30	40

D3.4.3 Kotransfektion von pTet-On und pTRE2hyg-EGFP

Bei diesem Versuch wurden die Plasmide pTet-On und pTRE2hyg-EGFP wie bei der Optimierung der Kotransfektion von pTet-On und pTRE2hyg-Luc transfiziert, d. h. unter Variation der DNA-Gesamtmenge (0,6 und 0,9 µg/ml), der Ratio der beiden Vektoren (1:1, 1:10 und 10:1) und der *Lipofectamine 2000*-Menge (1,5- und 3-facher Überschuss). Induziert wurde dabei mit einer Doxycyclin-Konzentration von 10 µg/ml. Unter den gewählten Bedingungen konnte allerdings keine Induktion der EGFP-Fluoreszenz detektiert werden.

D3.5 Stabile Transfektion von pTet-On

Für die Etablierung des Tet-On-Systems nach dem Standardprotokoll ist die Generierung von pTet-On stabilen Zellklonen notwendig (www.bdbiosciences.com). Für hMSC wurde dafür folgendes Protokoll etabliert (Abb. 24).

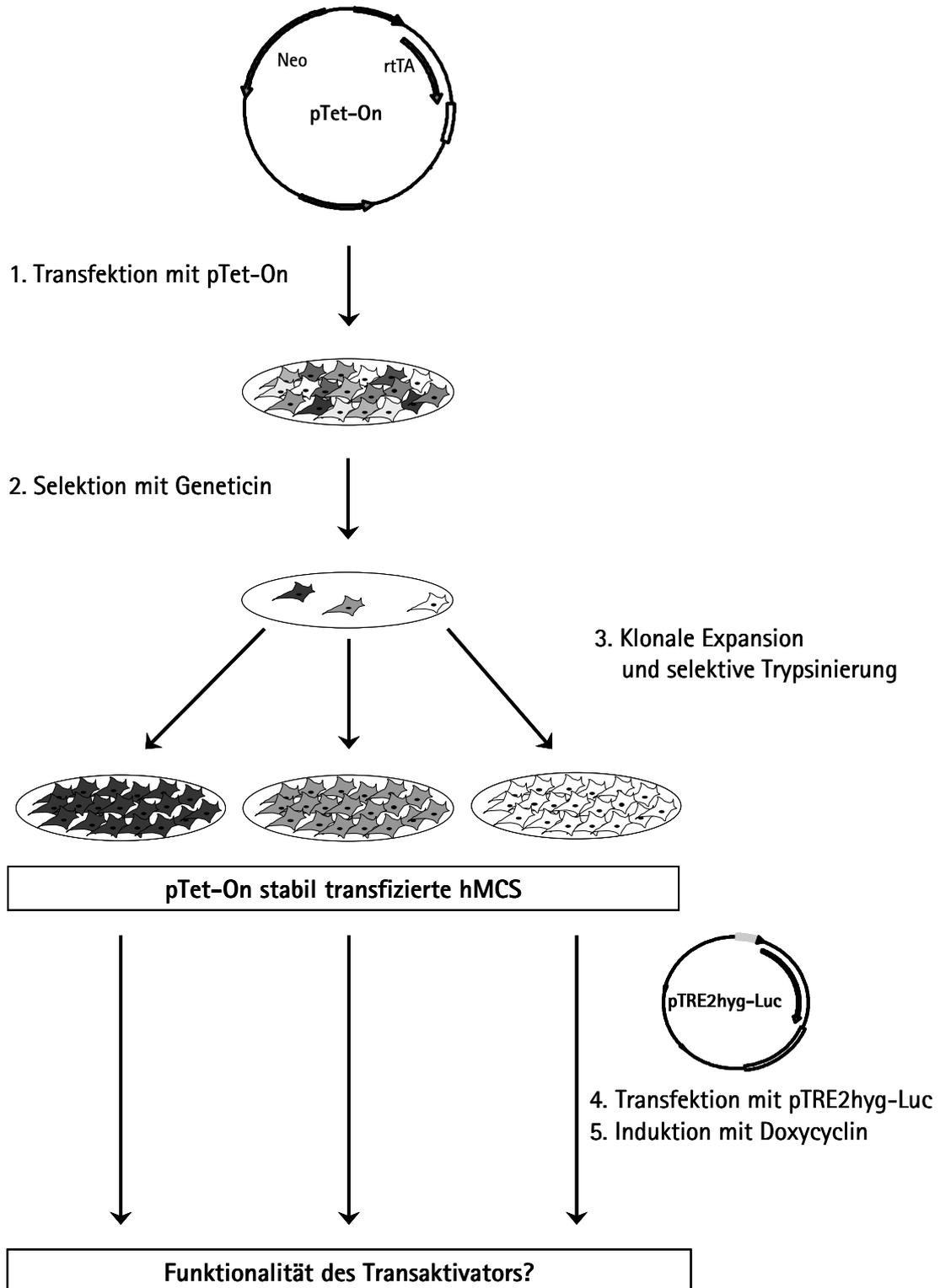


Abb. 24 Generierung und Testung von pTet-On stabil transfizierten hMSC.

D3.5.1 Transfektion und Selektion von pTet-On stabil transfizierten hMSC

Zur stabilen Transfektion wurden Zellen in der 4. Passage in einer T75-Kulturflasche mit der standardisierten Dichte von 8000 Zellen/cm² ausgesät. Die Transfektion erfolgte nach 18 Stunden unter den in D3.4.1 beschriebenen, optimierten Bedingungen. Die Zellen wurden als »stabil transfiziert« bezeichnet, wenn sie dem Selektionsdruck in Geneticin-haltigem Medium (c = 100 µg/ml) über einen Zeitraum von 16 Tagen standhalten konnten. Um mit Sicherheit von einer Selektion der letztgenannten Zellpopulation ausgehen zu können, wurde jeweils eine Kontrollpopulation von nicht-transfizierten Zellen mit Geneticin behandelt. Die Selektion wurde zu dem Zeitpunkt beendet, an dem keine adhärente Zelle in der nicht-transfizierten Kontrolle mehr nachgewiesen werden konnte.

D3.5.2 Klonale Expansion und selektive Trypsinierung

Die Subkultivierung der pTet-On stabil transfizierten hMSC erfolgte mit einer äußerst geringen Zelldichte (eine Zelle/cm²), um eine klonale Expansion zu ermöglichen. Schon nach drei Tagen konnte man Zellansammlungen entdecken, die aus einer Zelle entstanden waren. Diese bildeten das Anfangsstadium von Kolonien. Auffällig war, dass sich die Zellen zunächst sehr verstreut anordneten, ohne direkten Kontakt zueinander auszubilden. Des Weiteren zeigte sich, dass die Proliferationskapazität der Zellen von der Morphologie abhängig war. Waren sie sehr klein und bildeten am Zellrand einen hellen Saum und dunkle Flecken (Abb. 25a), konnte man von einer Zellteilung und Kolonienbildung ausgehen. Waren sie dagegen groß und flach auf der Kultivierungsschale ausgebreitet, war keine klonale Expansion zu erwarten (Abb. 25b).

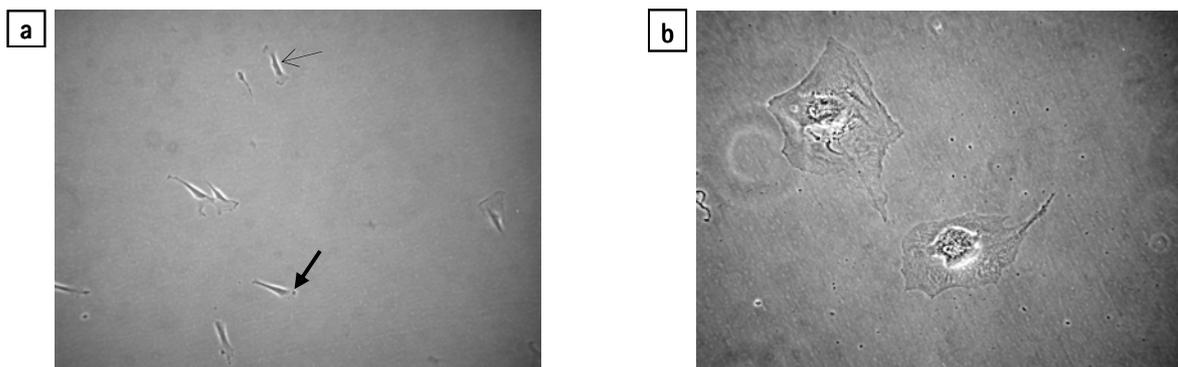


Abb. 25 hMSC in der 6. Passage nach stabiler Transfektion von pTet-On zu Beginn der klonalen Expansion (10 × Vergrößerung).

a Schnell proliferierende Zellen mit hellem Saum (dünner Pfeil) und dunklen Flecken am Rand (dicker Pfeil).

b Langsam bzw. nicht proliferierende Zellen.

Aus den vereinzelt Zellen bildeten sich im Laufe von ein bis zwei Wochen Kolonien. Dabei füllten diese jetzt die leeren Zwischenräume und legten sich dicht aneinander. Nach außen hin breiteten sie sich innerhalb eines bestimmten Radius aus, der aber nicht überschritten wurde (Abb. 26). Für die selektive Trypsinierung der Zellkolonien wurde deren Position an der Unterseite der Zellkulturschale markiert, wie in Abb. 26b zu sehen ist.

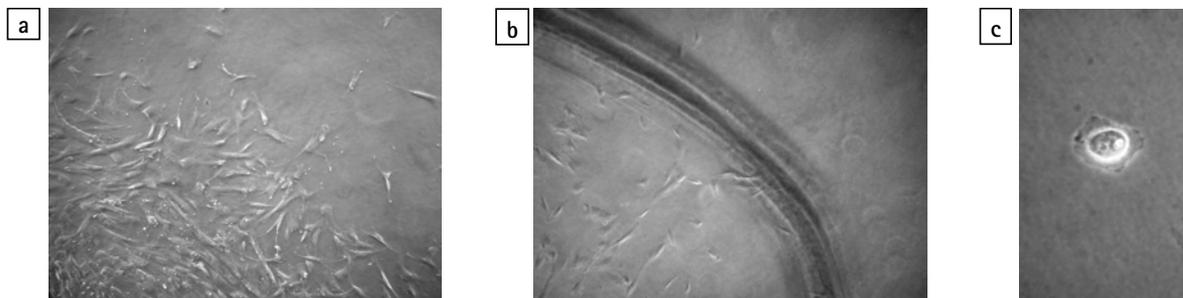


Abb. 26 hMSC in der 6. Passage nach stabiler Transfektion mit pTet-On und Kolonienbildung (10 × Vergrößerung).

a Ausschnitt der Randzone einer Kolonie.

b Zur Trypsinierung mit *Cloning Discs* markierte Kolonie (segmentaler Ausschnitt).

c Zelle, die sich vom *Cloning Disc* abgelöst hat und sich gerade auf der Kultivierungsfläche anheftet.

Anschließend wurden die mit Trypsin getränkten *Cloning Discs* auf diese Stellen gelegt. Dadurch konnten sich die Zellen lösen und an den Papierplättchen adhären. Nachdem diese in unterschiedliche Kultivierungsschalen gegeben wurden, konnten einzelne Klone jetzt getrennt kultiviert werden. Schon vier Stunden nach dem Transfer war zu beobachten, wie die Zellen am Boden der neuen Kultivierungsschale adhärten (Abb. 26c). In dieser Arbeit wurden insgesamt 120 verschiedene Kolonien isoliert. Von diesen ließen sich 44 weiter expandieren. Ausgehend von einer Zelle (4. Passage) wurden Zellzahlen von etwa 80.000 erreicht (6. Passage).

D3.5.3 Test auf Expression bzw. Funktionalität des Transaktivators rtTA

Bei den Zellklonen, die wie oben beschrieben generiert worden waren, wurden nun die Expression bzw. Funktionalität des auf dem Vektor pTet-On kodierten Transaktivators rtTA überprüft. Dazu wurde ein Teil jedes Zellklons (ca. 15.000 Zellen) auf je zwei Kulturschalen ausgesät und mit dem Vektor pTRE2hyg-Luc (1,0 µg/ml, 3-fache Menge an *Lipofectamine 2000*) sowohl ohne als auch mit Doxycyclin-Induktion (1 µg/ml) transient transfiziert. Nach 48 Stunden wurde die Luziferase-Aktivität bestimmt.

MORPHOLOGIE DER hMSC

Während dieser Untersuchungen stellte sich heraus, dass sich hMSC trotz einer stabilen Transfektion und ausgedehnter klonaler Expansion noch kultivieren, passagieren sowie ein zweites Mal transfizieren ließen. Auch deren Morphologie ähnelte dem Aussehen von nicht-transfizierten hMSC, die nach dem Standardprotokoll subkultiviert worden waren.

INDUKTION UND UNSPEZIFISCHE AKTIVITÄT

Im Rahmen der hMSC-Zellklonanalyse (Abb. 27) wurde zunächst die Luziferase-Aktivität von 44 Klonen ohne und mit Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin bestimmt. Daraus wurde der Induktionsfaktor für jeden einzelnen Zellklon berechnet (Tab. 5). Für eine niedrige unspezifische Aktivität (Aktivität ohne Doxycyclin) wurde eine Grenze von 0,008 RLU/Zelle festgelegt. Die höchste Induktion (114,5-fach) wies Klon 2.30 auf. Weitere 10 Klone mit niedriger unspezifischer Aktivität zeigten eine Induktion über das 10-fache. 16 Klone konnten nicht induziert werden.

Tab. 5 Induktion und unspezifische Aktivität der einzelnen hMSC-Klone.

Klon-Nr.	Induktion (x-fach)	unspezifische Aktivität	Klon-Nr.	Induktion (x-fach)	unspezifische Aktivität
2, 5, 9, 11, 19.2, 38, 40, 41, 42, 48, 109, 2.9, 2.18, 2.25, 2.26, 2.31	keine		2.12	50,5	nein
13	1,9	ja	2.14	1,2	nein
14	1,3	ja	2.15	4,5	nein
15	36,8	nein	2.16	2,9	ja
19	3,1	ja	2.17	4,7	ja
47	29,3	nein	2.19	6,7	nein
50	1,5	ja	2.2	1,1	nein
2.2	46,3	nein	2.21	1,2	nein
2.3	6,1	ja	2.22	12,9	nein
2.4	10,6	ja	2.23	30,1	nein
2.6	17,1	nein	2.24	10,7	nein
2.7	2,9	nein	2.27	1,7	ja
2.8	2,3	nein	2.28	4,1	nein
2.11	13,2	nein	2.29	2,9	nein
			2.30	114,5	nein

D3.5.4 Kryokonservierung und Subkultivierung von pTet-On stabilen hMSC

Parallel zur Aussaat für die transiente Transfektion mit dem Vektor pTRE2hyg-Luc (s. D3.5.3) wurden die restlichen Zellen der Klone (ca. 50.000) zunächst eingefroren. Um diese nun stabil mit dem Vektor pTRE2hyg-Luc zu transfizieren, wurden die Zellen wie gewohnt aufgetaut und in einer 25 cm² großen Zellkulturflasche kultiviert. Die das Auftauen überlebenden Zellen (80 %) adhärirten zwar, waren aber entsprechend vereinzelt (1600 Zellen/cm²) und zeigten keine Proliferation. In den folgenden Tagen starben auch adhärente Zellen, so dass eine zweite stabile Transfektion mit pTRE2hyg-Luc nicht durchgeführt werden konnte. Ein Vorgehen nach dem Standardprotokoll zur Generierung doppelt stabiler Zellklone in hMSC war also nicht möglich.

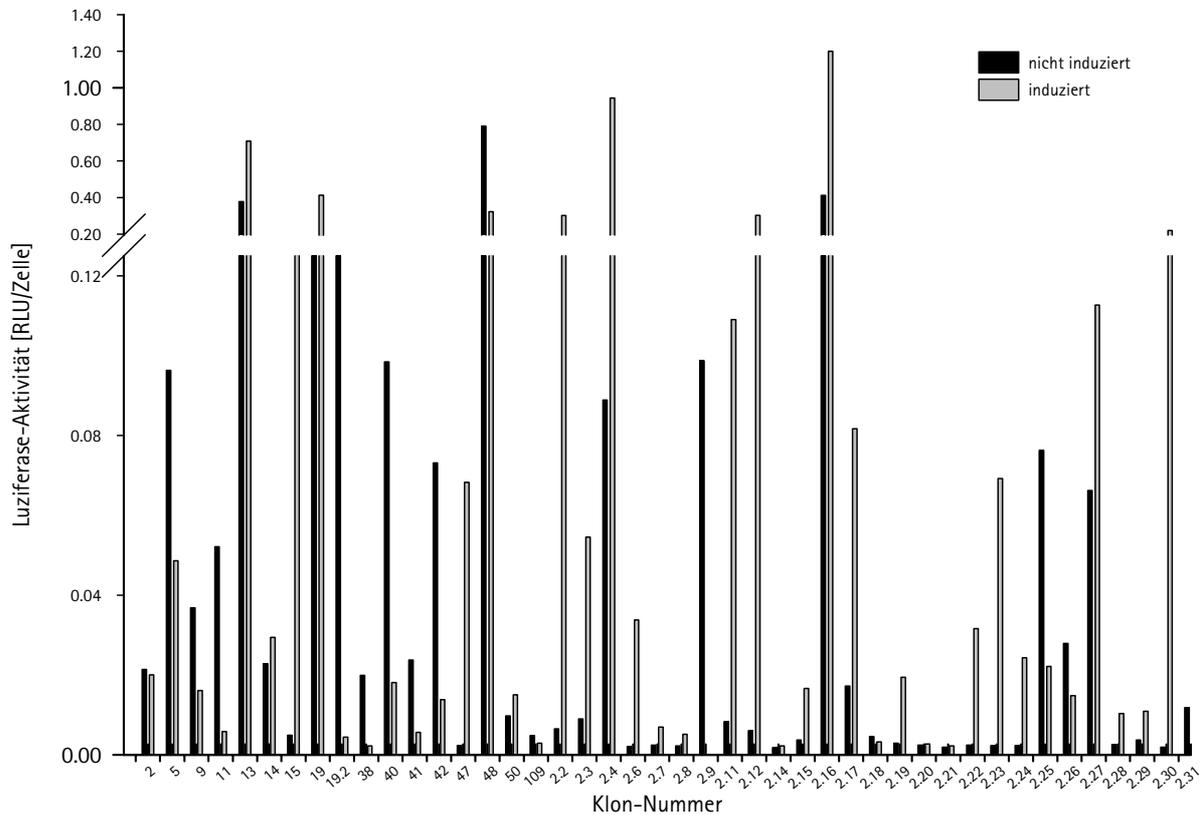


Abb. 27 Luciferase-Aktivität stabil Transaktivator-exprimierender hMSC-Zellklone nach Transfektion mit dem Vektor pTRE2hyg-Luc sowohl ohne als auch mit Doxycyclin-Induktion (1 µg/ml). Dargestellt sind die Ergebnisse von Doppelbestimmungen.

D4 INDUZIERBARE GENEXPRESSION MIT p2IN1

Da eine regulierbare Genexpression durch die zwei Plasmide pTet-On und pTRE2hyg-Luc und den damit verbundenen zwei stabilen Transfektionen in hMSC sich als nicht durchführbar erwiesen, wurde ein Plasmid entwickelt, das die essentiellen Elemente beider Vektoren auf einem vereint und von uns als p2in1 bezeichnet wurde. Hierbei war es von besonderer Bedeutung, dass der regulierbare Promotor nicht in die Nähe – und damit unter die Kontrolle – des CMV-Promoters P_{hCMV} gelangte, was zur konstitutiven Expression des zu regulierenden Transgens geführt hätte. Deshalb wurde der Transaktivator unter die Kontrolle des regulierbaren Promotors gestellt. Das setzt allerdings eine unspezifische Aktivität im nicht-induzierten Zustand voraus. Nach Doxycyclin-Induktion sollte sich die Expression der beiden Transgene (Transaktivator rtTA und Luciferase) im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus verstärken.

D4.1 Generierung des Vektors p2in1

Für die Klonierung des Plasmids (Abb. 28) waren die in Abb. 29 gezeigten Zwischenschritte notwendig.

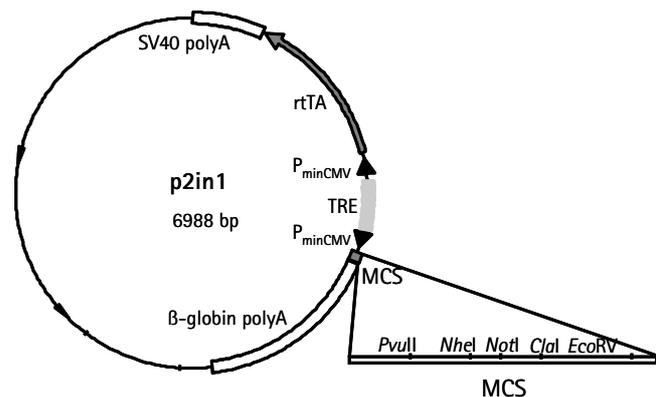


Abb. 28 Vektorkarte von p2in1.

1. Generierung von pTet-On-P_{minhCMV}

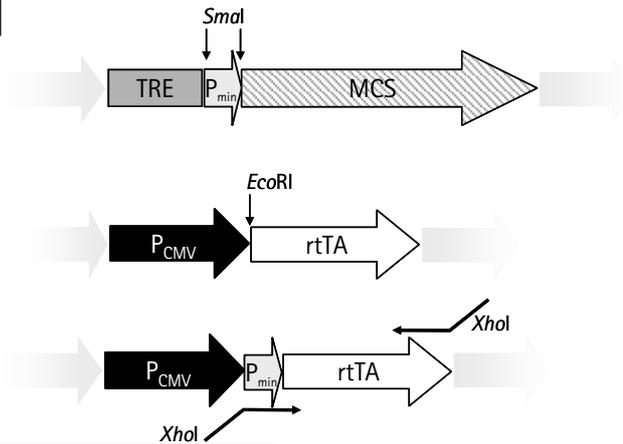
Insert: P_{minhCMV} aus pTRE2hyg x SmaI (blunt)

+

Vektor: pTet-On x EcoRI und Klenow-Auffüllreaktion



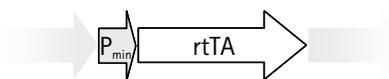
pTet-On-P_{minhCMV}



2. Generierung von pCR2.1-TOPO-P_{minhCMV} - rtTA-polyA

Insert: PCR-Produkt von P_{minhCMV} und rtTA aus pTet-On-P_{minhCMV} mit modifizierten Primern (XhoI-Schnittstelle)

Vektor: pCR2.1-TOPO



3. Generierung von pTRE2hygΔXhoI 5329

Vektor: pTRE2hyg x XhoI, partieller Verdau, Klenow-Auffüllreaktion
XhoI 5392 mutiert

4. Generierung von p2in1

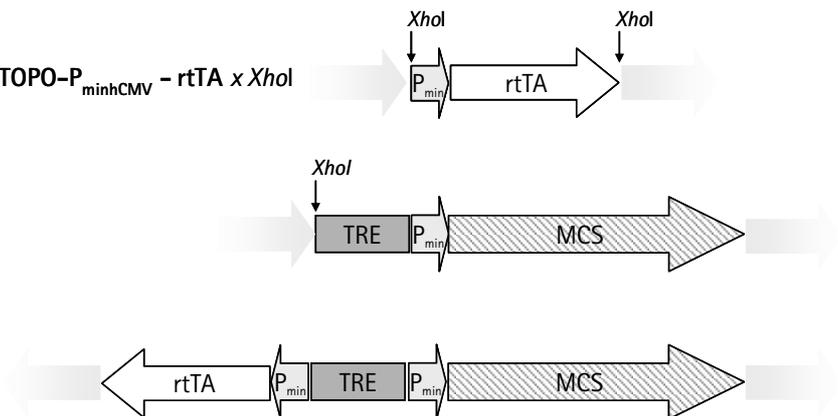
Insert: P_{minhCMV} und rtTA aus pCR2.1-TOPO-P_{minhCMV} - rtTA x XhoI

+

Vektor: pTRE2hygΔXhoI5392 x XhoI



p2in1



5. Generierung von p2in1-Luc

Vektor: p2in1 x PvuII (blunt), x NheI

+

Insert: Luziferase aus pTRE2hyg-Luc x SmaI (blunt), x NheI



p2in1-Luc

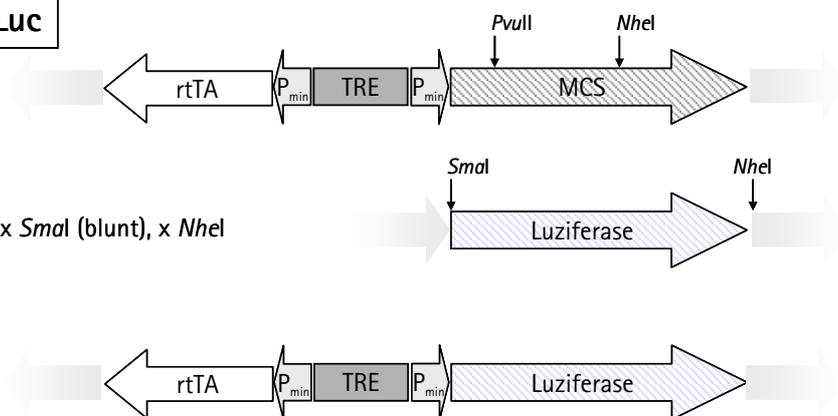


Abb. 29 Generierung von p2in1.

Die Pfeile symbolisieren die Genabschnitte. rtTA: reverser Transaktivator, P_{min} = P_{minhCMV}: minimierter humaner Cytomegalovirus *immediate early* Promotor, TRE: *tet response element*; MCS: *multiple cloning site*.

D4.1.1 Generierung von pTet-On-P_{minhCMV}

Dieser Vektor stellte ein reines Hilfskonstrukt für die Generierung von p2in1 dar. Zunächst wurde der minimierte *immediate early* Promotor des Cytomegalievirus (P_{minhCMV}) mit *SmaI* (*blunt*) aus pTRE2hyg geschnitten. Dieser sollte in den Vektor pTet-On vor den Transaktivator inseriert werden. Deshalb wurden pTet-On mit *EcoRI* geschnitten und die überhängenden Enden nach einer Ethanol-fällung mit einer Klenow-Reaktion aufgefüllt. Nach einer Dephosphorylierung wurde der linearisierte Vektor (7,5 kb) und das Insert-Fragment (157 bp) über ein präparatives Gel isoliert, ligiert und transformiert. Sieben Klone wurden durch eine Restriktion mit *SacI* untersucht. Das analytische Gel erwies, dass vier Klone positiv für das Insert waren und dieses zudem die korrekte Orientierung zeigte. Folgende Banden mussten im letzteren Fall vorhanden sein: 6,5 und 0,82 kb, 144 und 104 bp (Abb. 30).

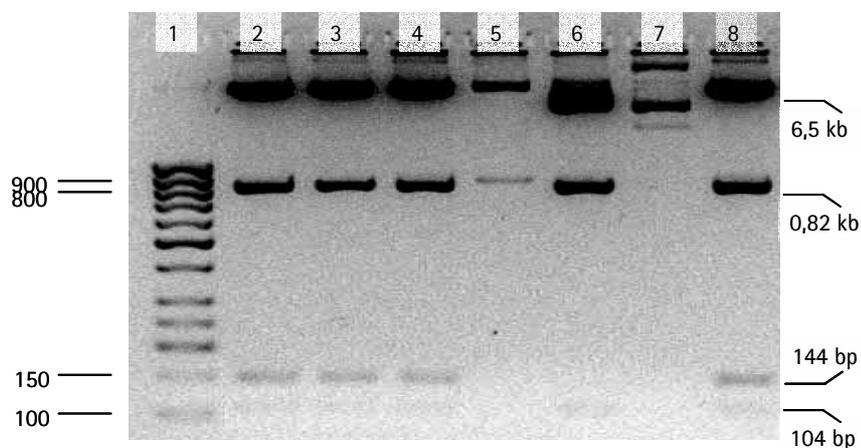


Abb. 30 Analytische Restriktion von pTet-On-P_{minhCMV} x *SacI*.

1: 50 bp-DNA-Marker; 2-8: pTet-On-P_{minhCMV} x *SacI*. 2, 3, 4 und 8 präsentieren das richtige Bandenmuster.

D4.1.2 Generierung von pCR2.1-TOPO-P_{minhCMV}-rtTA-polyA

Dieser Vektor stellte den zweiten Zwischenschritt für die Herstellung von p2in1 dar. Dafür wurde der DNA-Abschnitt P_{minhCMV}-rtTA-polyA aus pTet-On-P_{minhCMV} mittels PCR amplifiziert (Abb. 31). Das PCR-Produkt (1,7 kb) wurde direkt zur TOPO-TA-Klonierung eingesetzt. Nach Transformation und Blau-Weiß-Selektion wurde ein positiver Klon durch Sequenzierung und Vergleich mit der Original-Sequenz überprüft, wobei sich in den relevanten Bereichen volle Kongruenz mit dieser ergab.

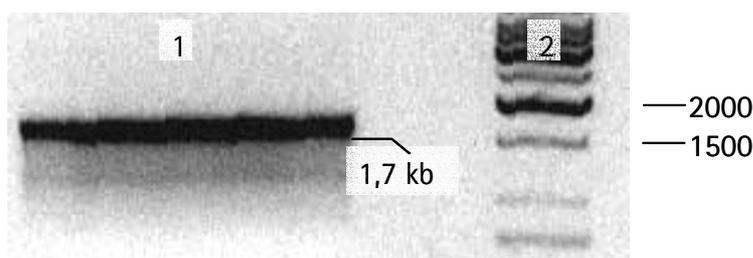


Abb. 31 Analytische Agarose-Gel-Elektrophorese des PCR-Produkts P_{minhCMV}-rtTA-polyA.

1: PCR-Produkt; 2: 250 bp-DNA-Marker.

D4.1.3 Generierung von pTRE2hyg- Δ XhoI 5392

Das Hilfskonstrukt pTRE2hyg- Δ XhoI 5392 wurde hergestellt, um die XhoI-Schnittstelle an Position 5329 im Vektor pTRE2hyg zu deletieren. Dies war notwendig, da in diesem Vektor zwei XhoI-Schnittstellen (Position 1 und 5329) vorhanden waren und man für die Klonierung auf die Schnittstelle an Position 1 unbedingt angewiesen war. Dazu wurde der Vektor pTRE2hyg mit dem Restriktionsenzym XhoI partiell verdaut. Das beinhaltete, dass zum einen mit einer geringeren Enzymmenge gearbeitet wurde und zum anderen die Inkubationszeit der Restriktion variiert werden musste, um die optimalen Bedingungen für einen partiellen Verdau zu erhalten.

OPTIMIERUNG DES PARTIELLEN VERDAUS

Zum partiellen Verdau wurden aus dem Restriktionsansatz alle 20 Minuten ein Aliquot entnommen und die Reaktion sofort durch Einfrieren unterbrochen. Danach wurden die Restriktionsansätze mittels eines analytischen Gels aufgetrennt. Dabei stellte sich eine Inkubationszeit von 40 Minuten als optimal heraus, um nur eine XhoI-Schnittstelle zu spalten (Abb. 32, Spur 3 und Tab. 6).

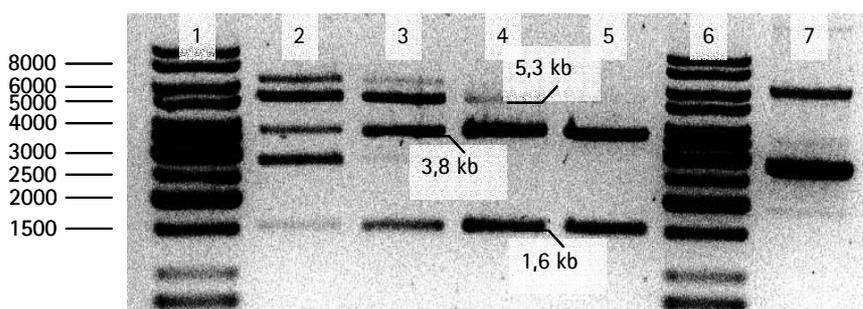


Abb. 32 Analytische Agarose-Gel-Elektrophorese von pTRE2hyg x XhoI (partieller Verdau). 1: 250 bp-DNA-Marker; 2-5: pTRE2hyg x XhoI, mit Inkubationszeiten von 20, 40, 60 und 80 Minuten; 6: 250 bp-DNA-Marker; 7: pTRE2hyg (ungeschnitten).

Tab. 6 Fragmentmuster bei partiellem Verdau. 0 Min entspricht Spur 7 in Abb. 32; 20 Min entspricht Spur 2, 40 Min Spur 3, 60 Min Spur 4 und 80 Min Spur 5. Eine Inkubationszeit von 40 Minuten wird benötigt, um nur eine XhoI-Schnittstelle zu spalten (+: im Gel sichtbare Bande; -: keine Bande im Gel).

Bande	Interpretation	Inkubationszeiten				
		0 Min	20 Min	40 Min	60 Min	80 Min
~7000 bp	ungeschnitten (supercoiled)	+	+	+	-	-
5323 bp	1mal geschnitten	-	+	+	+	-
3758 bp	2mal geschnitten, 1. Fragment	-	+	+	+	+
~3000 bp	ungeschnitten (supercoiled)	+	+	+	-	-
1567 bp	2mal geschnitten, 2. Fragment	-	+	+	+	+

PRÄPARATION UND ANALYSE DES pTRE2hyg- Δ XhoI 5392

Der präparative Verdau fand unter den optimierten Bedingungen statt (s. Abb. 32, Spur 3 und Tab. 6). Die überhängenden Enden wurden mit Klenow-Enzym aufgefüllt, das Plasmid nach Ethanolfällung ligiert und transformiert. Sieben Klone wurden durch einen Verdau mit *XhoI* und *NheI* auf einem Agarose-Gel analysiert (Abb. 33). Die Zerstörung der *XhoI*-Schnittstelle an Position 5329 konnte durch ein Bandenmuster von 501 bp und 4,8 kb bei vier Klonen nachgewiesen werden. Fragmentlängen von 3,3 und 1,6 kb sprachen für die Eliminierung der falschen Schnittstelle an Position 1. Banden bei 3,3, 1,6 kb und 501 bp indizierten, dass die Klenow-Reaktion nicht ordnungsgemäß stattgefunden und das Plasmid unverändert religiert hatte.

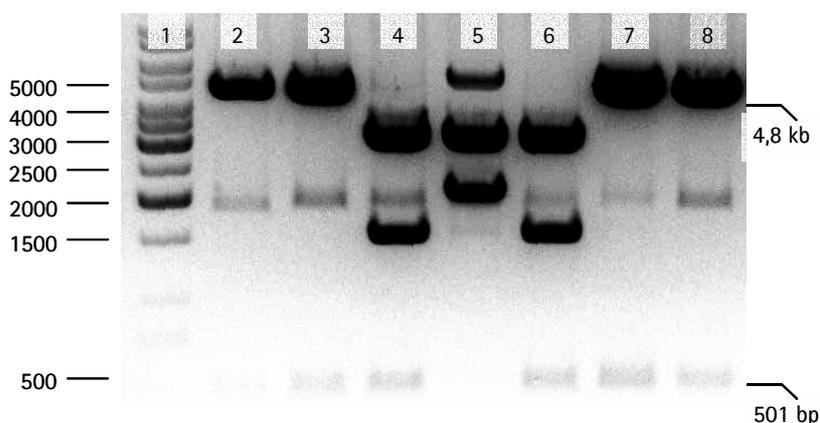


Abb. 33 Analytische Agarose-Gel-Elektrophorese von pTRE2hyg- Δ XhoI 5392 x *XhoI* / *NheI*.
1: 250 bp-DNA-Marker; 2-8: pTRE2hyg (nach Δ XhoI 5392 und Klenow-Auffüllreaktion) x *XhoI* / *NheI*;
2, 3, 7, 8: Δ XhoI 5392. Bande bei 2000 bp: wahrscheinlich unverdautes Plasmid.

D4.1.4 Generierung von p2in1

Für das Plasmid p2in1 wurden pTRE2hyg- Δ XhoI 5329 an Position 1 mit *XhoI* geöffnet und die Enden nach Ethanolfällung dephosphoryliert. Als Insert wurde das DNA-Fragment P_{minhCMV}-rtTA-polyA aus dem Vektor pCR2.1-TOPO-P_{minhCMV}-rtTA-polyA herangezogen, das aufgrund der vorherigen Verwendung von *XhoI*-elongierten Primern auch mit *XhoI* geschnitten werden konnte. Beide Fragmente (1,7 kb des Inserts bzw. 5,3 kb des Vektors) wurden über ein präparatives Gel isoliert und ligiert. Nach Transformation wurden Transformanten in je zwei analytischen Restriktionsansätzen untersucht. Beim Verdau mit *XhoI* zeigte sich auf dem analytischen Gel, dass drei Klone das Insert beinhalten (Vektor: 5,3 kb; Insert: 1,7 kb; Abb. 34a). Der Verdau mit *SmaI* ließ mit Banden von 5,5 und 1,4 kb Länge erkennen, dass die Orientierung des Inserts bei einem Klon richtig war (Abb. 34b).

Das Plasmid p2in1 enthält eine *multiple cloning site* (MCS), die die Restriktion mit gängigen Restriktionsenzymen erlaubt (s. Abb. 28).

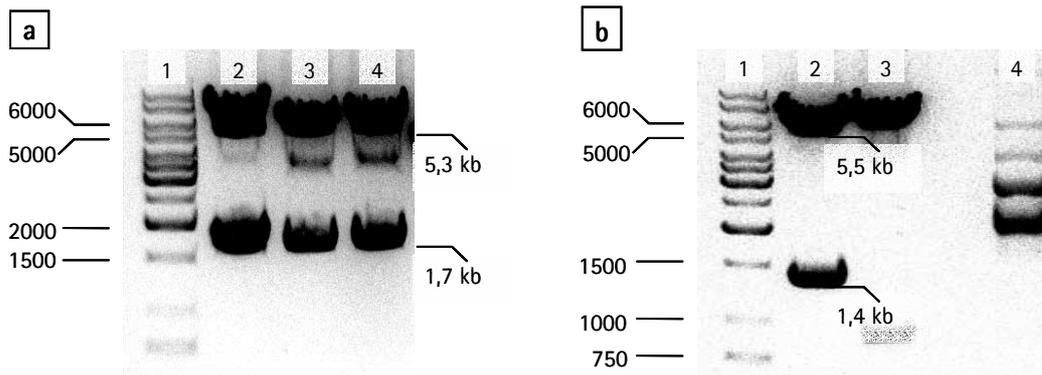


Abb. 34 Analytische Restriktion von p2in1.

a 1: 250 bp-DNA-Marker; 2-4: p2in1 x *XhoI*. Unvollständiger Verdau.

b 1: 250 bp-DNA-Marker; 2-4: p2in1 x *SmaI*; 2: Klon mit korrekter Orientierung des Inserts.

D4.1.5 Generierung von p2in1-Luc

Für den Vektor p2in1-Luc wurde in die MCS des Vektors p2in1 die codierende Sequenz der Luziferase ligiert. Diese wurde aus dem Vektor pTRE2hyg-Luc mit *SmaI* und – nach Ethanol-fällung – mit *NheI* geschnitten. Der Vektor p2in1 wurde durch Kreuzrestriktion mit *PvuII* und *NheI* geschnitten und anschließend dephosphoryliert. Die Fragmente (Vektor p2in1: 7,0 kb bzw. Insert Luziferase: 1,6 kb) wurden über ein präparatives Gel isoliert, ligiert und das entstandene Plasmid transformiert. Nach analytischer Restriktion mit *EcoRI* konnten elf positive Klone anhand des Bandenmusters mit 3,6 kb, 2,4 kb, 2,1 kb und 601 bp identifiziert werden (Abb. 35).

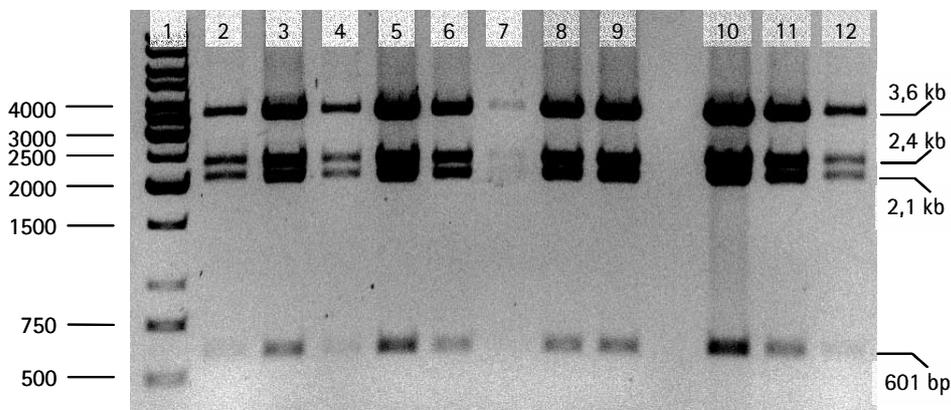


Abb. 35 Analytische Restriktion von p2in1-Luc.

1: 250 bp-DNA-Marker; 2-12: p2in1-Luc x *EcoRI*.

Es wurden jeweils unterschiedliche Mengen an DNA aufgetragen.

D4.2 Transiente Transfektion von p2in1-Luc

OPTIMIERUNG

Um die prinzipielle Funktionsfähigkeit des Plasmids p2in1 bzw. des Derivats p2in1-Luc zu testen, wurden hMSC im 48-Kavitäten-Format mit unterschiedlichen DNA- (0,55 und 1,10 µg/ml) und *Lipofectamine 2000*-Mengen (1,5- und 3-facher Überschuss im Vergleich zur DNA-Menge) transfiziert. Induziert wurde dabei mit 1 µg/ml Doxycyclin. Aus Abb. 36 geht hervor, dass mit der Vektorkonzentration von 1,1 µg/ml und einem 3-fachen Überschuss von *Lipofectamine 2000* das beste Ergebnis erreicht werden konnte. Außerdem wird aus dem Vergleich mit der Kontrolle (Transfektion von hMSC mit pEGFP-Luc mit 1,1 µg/ml DNA und einem 3-fachen Überschuss von *Lipofectamine 2000*) deutlich, dass durch den induzierbaren Promotor in hMSC mindestens dieselben Luziferase-Aktivitäten erreicht werden können wie mit dem nicht-induzierbaren Promotor des Cytomegalievirus.

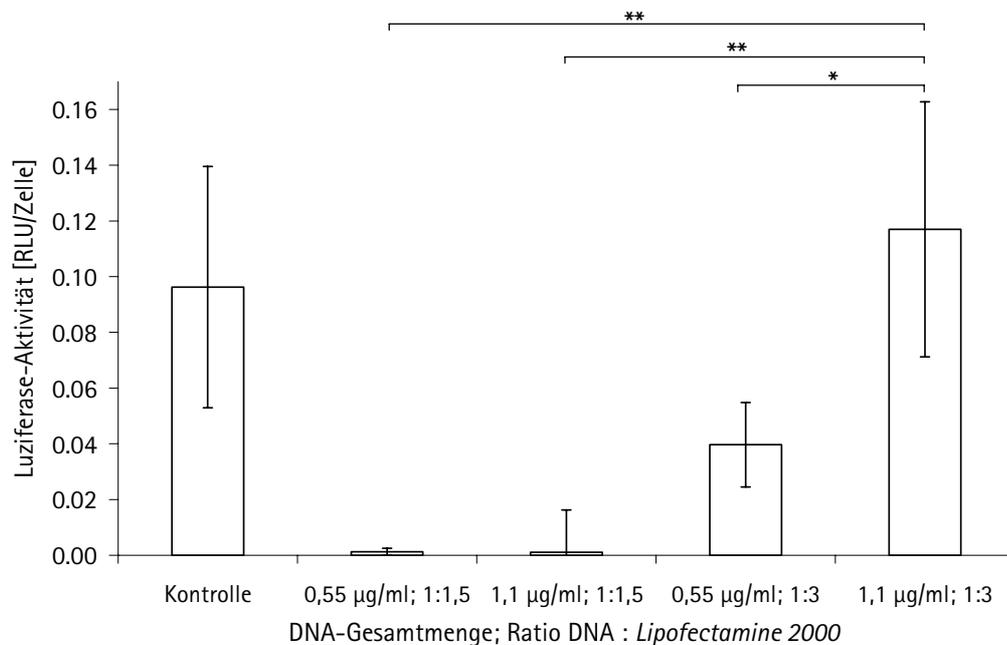


Abb. 36 Luziferase-Aktivität 48 Stunden nach Transfektion von p2in1-Luc in hMSC unter Induktion mit 1 µg/ml Doxycyclin. (Kontrolle: Transfektion von hMSC mit pEGFP-Luc mit 1,1 µg/ml DNA und einem 3-fachen Überschuss von *Lipofectamine 2000*). Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen, welche jeweils in drei Ansätzen durchgeführt wurden.

Die besten Induktionsraten wurden mit 1,1 µg/ml DNA und einem 3-fachen Überschuss an *Lipofectamine 2000* erreicht (signifikanter Unterschied zu anderen Transfektionsbedingungen; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$).

DOXYCYCLIN-TITRATIONSREIHE

Nachdem die grundsätzliche Funktionalität des p2in1-Luc erwiesen war, stellte sich die Frage, inwieweit die Luziferase-Aktivität durch verschiedene Doxycyclin-Konzentrationen gesteuert werden kann. Dazu wurden hMSC mit 1,1 µg/ml p2in1-Luc und der 3-fachen Menge an *Lipofectamine 2000* im 12-Kavitäten-Format transfiziert sowie Doxycyclin-Konzentrationen von 0, 0,01, 0,1 und 1 µg/ml eingesetzt. Abb. 37 zeigt die Doxycyclin-abhängige Luziferase-Expression in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,01 und 1 µg/ml. Unter nicht-induzierten Bedingungen zeigt der Vektor eine relativ hohe unspezifische Aktivität. Aus dem Verhältnis nicht-induziert zu induziert lässt sich der jeweilige Induktionsfaktor berechnen (Tab. 7). So kann z. B. mit einer Doxycyclin-Konzentration von 1 µg/ml eine Induktion um das 4,8-fache erreicht werden.

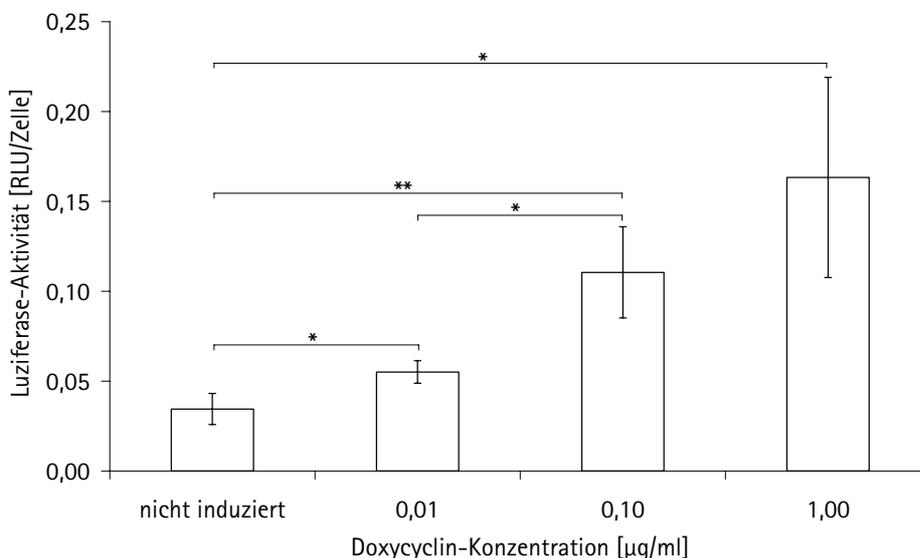


Abb. 37 Luziferase-Aktivität nach transients Transfektion von p2in1-Luc (1,1 µg/ml DNA und der 3-fachen Menge an *Lipofectamine 2000*) in hMSC unter Induktion mit verschiedenen Doxycyclin-Konzentrationen. Die Regulation beschränkt sich nicht nur auf einen An- bzw. Ausmechanismus, sondern lässt eine quantitative Steuerung der Genexpression zu. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen, wobei jeder Versuch aus drei Ansätzen bestand (signifikanter Unterschied zum Vorwert bei einer Doxycyclin-Konzentration von 0,01 und 0,1 µg/ml; signifikante Unterschiede zur nicht-induzierten Kontrolle bei den allen Doxycyclin-Konzentration; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$).

Tab. 7 Induktionsraten von p2in1-Luc in Abhängigkeit von der Doxycyclin-Konzentration.

Doxycyclin-Konzentration [µg/ml]	0,01	0,1	1
Induktionsfaktor	1,7	3,2	4,8

D5 EXPRESSION DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS POU5F1_iA

Das Expressionsniveau des Transkriptionsfaktors POU5F1 ist in embryonalen Stammzellen mitverantwortlich für deren Pluripotenzeigenschaften. Zur Untersuchung der Frage, ob durch dessen quantitativ regulierbare Expression das Stammzellpotential von hMSC beeinflusst werden kann, sollten zunächst Plasmide zur (regulierbaren) POU5F1-Expression generiert werden. Aufgrund der Tatsache, dass POU5F1_iB in ES-Zellen nicht nachweisbar ist, wird die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters POU5F1_iA zugeschrieben (Cauffman et al., 2006). Vor diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit alle Transfektion mit POU5F1_iA durchgeführt. Dabei sollte die mRNA-Expression kontrolliert und mit nicht-transfizierten hMSC verglichen werden. Um zu untersuchen, inwiefern die Expression von POU5F1_iA das Wachstumsverhalten von hMSC beeinflusst, wurden Proliferationsstudien durchgeführt.

D5.1 Generierung von Plasmiden

Die cDNA der beiden Spleißvarianten POU5F1_iA und POU5F1_iB wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. P. Neth kloniert und durch Sequenzierung bestätigt. In dieser Arbeit fanden die beiden Plasmide pCR2.1-TOPO-POU5F1_iA bzw. -POU5F1_iB Verwendung.

D5.1.1 Generierung von p-POU5F1_iA bzw. POU5F1_iB-IRES-neo2

Zur Generierung dieser Vektoren diente als Grundgerüst pIRES-neo2, in das die POU5F1_iA- bzw. POU5F1_iB-cDNA aus den Vektoren p-POU5F1_iA- bzw. POU5F1_iB-IRES-EGFP inseriert wurden. Die Spaltung der DNA wurde durch *NheI* und *BamHI* über einen Kreuzverdau erreicht. Der Vektor wurde zusätzlich noch dephosphoryliert, bevor alle benötigten Fragmente (5,3 kb bzw. 1,1 und 0,8 kb) mittels eines präparativen Gels aufgereinigt wurden. Jeweils sechs Transformanden wurden anhand einer Plasmidpräparation und einer analytischen Restriktion mit *XhoI* untersucht. Das Bandenmuster von 3,6 kb, 2,4 und 0,37 kb (für iA) bzw. 3,6 kb, 2,2 und 0,37 kb (für iB) zeigte an, dass alle geprüften Klone positiv waren (Abb. 38a).

D5.1.2 Generierung von pcDNA3.1-POU5F1_iA bzw. POU5F1_iB

Hierfür diente das Plasmid pcDNA3.1 als Vektor-Rückgrat, in das die cDNAs für POU5F1_iA bzw. POU5F1_iB eingefügt wurden. Der Vektor (5,4 kb) wurde mit *NheI* und *BamHI* über einen Kreuzverdau in der MCS geschnitten, dephosphoryliert und anschließend über ein präparatives Gel gereinigt. Danach wurde der Vektor mit den cDNA-Fragmenten ligiert, die bei der Generierung von p-POU5F1_iA bzw. POU5F1_iB-IRES-neo2 schon als Insert gedient hatten (s. D5.1.1). Zur Analyse wurden je sechs Klone mit *NheI* und *SacI* verdaut. Ein Bandenmuster von 5,4 und 1,1 kb (für iA) bzw. 0,8 kb (für iB) belegte, dass alle untersuchten Klone positiv waren (Abb. 38b).

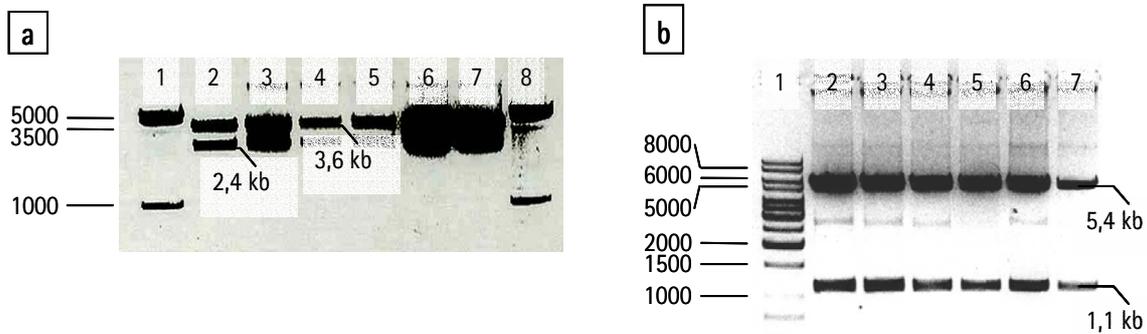


Abb. 38 Analytische Agarose-Gel-Elektrophorese von p-POU5F1_iA-IRES-neo2 bzw. pcDNA3.1-POU5F1_iA. Es wurden jeweils unterschiedliche Mengen an DNA aufgetragen.

a Analytische Agarose-Gel-Elektrophorese von p-POU5F1_iA-IRES-neo2.

1, 8: 250 bp-DNA-Marker; 2-7: p-POU5F1_iA-IRES-neo2 x *XhoI*.

b Analytische Agarose-Gel-Elektrophorese von pcDNA3.1-POU5F1_iA.

1: 250 bp-DNA-Marker; 2-7: pcDNA3.1-POU5F1_iA x *NheI* und *SacI*.

D5.1.3 Generierung von p-POU5F1_iA- bzw. POU5F1_iB-IRES-EGFP

Zur Generierung der Vektoren p-POU5F1_iA- bzw. POU5F1_iB-IRES-EGFP wurde der Vektor pIRES2-EGFP per Kreuzrestriktion mit *NheI* und *SacI* in der MCS geschnitten. Zur Herstellung der Inserts wurden die Plasmide pCR2.1-TOPO-POU5F1_iA bzw. -POU5F1_iB in gleicher Weise mit den vorher genannten Restriktionsenzymen verdaut. Bevor die entsprechenden Fragmente über ein Gel gereinigt und ligiert wurden (POU5F1_iA: 1,1 kb; POU5F1_iB: 0,8 kb; Abb. 39a), erfolgte die Dephosphorylierung des Vektors. Je sechs Transformanden wurden durch analytische Restriktion mit *NheI* und *BamHI* untersucht. Dabei zeigten drei (für iA) bzw. fünf Klone (für iB) das richtige Bandenmuster (Vektor 5,2 kb; Insert 1,1 bzw. 0,8 kb; Abb. 39b bzw. c).

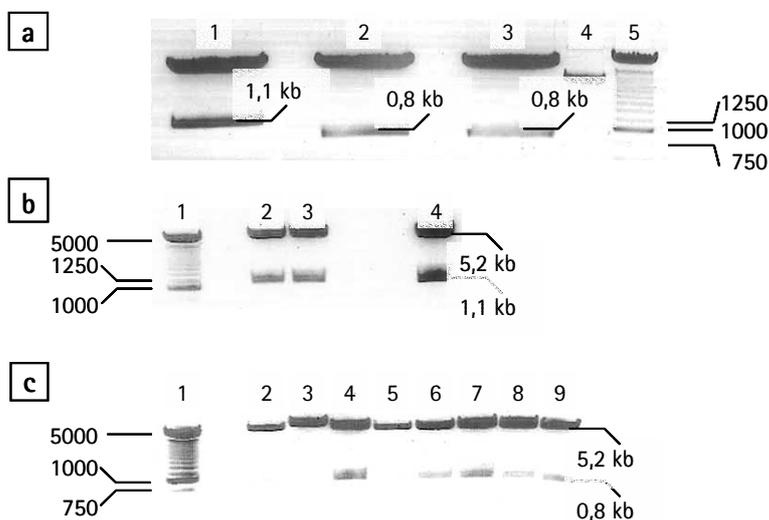


Abb. 39 Präparative und analytische Agarose-Gel-Elektrophorese zur Herstellung von p-POU5F1_iA- bzw. POU5F1_iB-IRES-EGFP. Es wurden jeweils unterschiedliche Mengen an DNA aufgetragen.

a Präparative Agarose-Gel-Elektrophorese von pCR2.1-TOPO-POU5F1_iA bzw. -POU5F1_iB.

1: pCR2.1-TOPO-POU5F1_iA x *NheI* und *SacI*; 2, 3: pCR2.1-TOPO-POU5F1_iB x *NheI* und *SacI*; 4: pCR2.1-TOPO-POU5F1_iA; 5: 250 bp-DNA-Marker.

Analytische Agarose-Gel-Elektrophorese von p-POU5F1_iA- bzw. POU5F1_iB-IRES-EGFP.

b 1: 250 bp-DNA-Marker; 2-4: p-POU5F1_iA-IRES-EGFP x *NheI* und *BamHI*.

c 1: 250 bp-DNA-Marker; 2-9: POU5F1_iB-IRES-EGFP x *NheI* und *BamHI*.

D5.2 Transiente Transfektion

Da POU5F1_iA und nicht POU5F1_iB für die Stammzeleigenschaften von ES-Zellen mitverantwortlich sein soll (Cauffman et al., 2006), wurden in meinem Projekt alle Transfektionen mit POU5F1_iA durchgeführt. Die generierten Plasmide sollten unter optimalen Bedingungen transfiziert und die mRNA-Expression kontrolliert werden.

D5.2.1 Optimierung der Transfektion

Um optimale Bedingungen für die Transfektion von p-POU5F1_iA-IRES-EGFP zu finden, wurden hMSC mit unterschiedlichen DNA-*Lipofectamine 2000*-Verhältnissen (zwischen 1:0,75 und 1:4,5) und DNA-Mengen (0,32 – 1,0 µg/ml) im 12-Kavitäten-Format transfiziert. Bei der Auswertung der EGFP-Expression des Vektors p-POU5F1_iA-IRES-EGFP war eine sehr schwache Fluoreszenz detektierbar, so dass die optimalen Mengen auf einen Bereich zwischen 0,32 und 0,91 µg/ml der Vektorkonzentration bzw. ein 1,5- bis 4,5-facher Überschuss an *Lipofectamine 2000* im Vergleich zur DNA-Menge eingegrenzt werden konnten. Für die Transfektionen der Plasmide p-POU5F1_iA-IRES-EGFP, p-POU5F1_iA-IRES-neo2 und pcDNA3.1-POU5F1_iA wie auch der Kontrollen pIRES-EGFP und pIRES-neo2 wurde mit 0,8 µg/ml und einem 3-fachen Überschuss an *Lipofectamine 2000* gearbeitet.

Für die Kotransfektion wurden die für pTet-On und pTRE2hyg-Luc optimierten Bedingungen herangezogen (0,9 µg/ml Gesamt-DNA; Verhältnis pTet-On: pTRE2hyg-POU5F1_iA: 1:10; 3-facher Überschuss an *Lipofectamine 2000*; s. Abb. 22).

D5.2.2 Expressionskontrolle über quantitative RT-PCR

Um die Funktionsfähigkeit der generierten Plasmide p-POU5F1_iA-IRES-EGFP, p-POU5F1_iA-IRES-neo2 und pcDNA3.1-POU5F1_iA auf mRNA-Ebene zu prüfen, wurden diese ebenso wie die Kontrollen pIRES-EGFP und pIRES-neo2 unter den oben beschriebenen Bedingungen im 6-Kavitäten-Format transfiziert. Nach zwei Tagen erfolgte die Messung der POU5F1_iA- bzw. GAPDH-mRNA-Transkripte durch quantitative RT-PCR. Die Bestimmung der GAPDH-Transkripte diente hier zur Normierung der POU5F1_iA-Expression. Die in Abb. 40 dargestellten Ergebnisse demonstrieren, dass alle POU5F1_iA-codierenden Vektoren auch zu einer Expression dieses Zielgens auf mRNA-Ebene führten. Die mit den Kontrollplasmiden transfizierten bzw. nicht-transfizierten hMSC zeigten keine POU5F1_iA-mRNA-Expression.

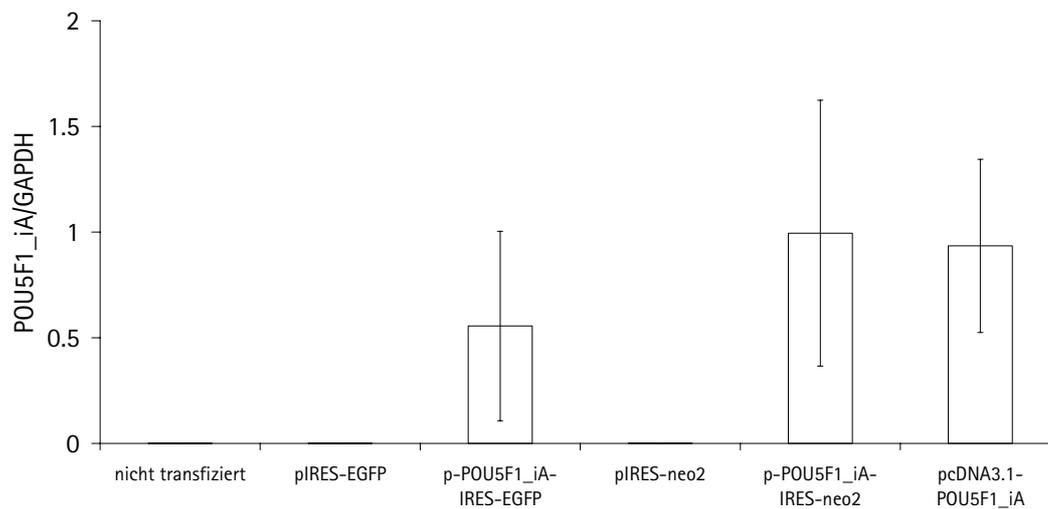


Abb. 40 POU5F1_iA-mRNA-Expression in hMSC nach Transfektion mit den Vektoren p-POU5F1_iA-IRES-EGFP, p-POU5F1_iA-IRES-neo2 und pcDNA3.1-POU5F1_iA bzw. den entsprechenden Kontrollen. Die Daten sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung eines Experiments dargestellt, das aus drei Ansätzen bestand.

In einem weiteren Versuch sollte durch eine transiente Kotransfektion von pTet-On und pTRE2hyg-POU5F1_iA in hMSC untersucht werden, ob bzw. inwieweit – analog zu den Kotransfektionen von pTet-On und pTRE2hyg-Luc (s. Abb. 23) – eine regulierte Expression von POU5F1_iA im Rahmen einer transienten Transfektion möglich ist. Dazu wurden die Vektoren unter den in Abschnitt D5.2.1 beschriebenen Bedingungen im 6-Kavitäten-Format transfiziert und mit 0,1 und 10 µg/ml Doxycyclin induziert. Nach 48 Stunden wurde die POU5F1_iA- und GAPDH-mRNA-Kopienanzahl gemessen. Nach Normierung auf GAPDH ergab sich folgendes Bild (Abb. 41): Steigende Doxycyclin-Konzentrationen bewirkten eine zunehmende Expression von POU5F1_iA (4,6-fache Induktion mit 0,1 µg/ml bzw. 20-fach mit 10 µg/ml Doxycyclin). Allerdings wurde POU5F1_iA unter nicht-induzierten Bedingungen bereits basal exprimiert.

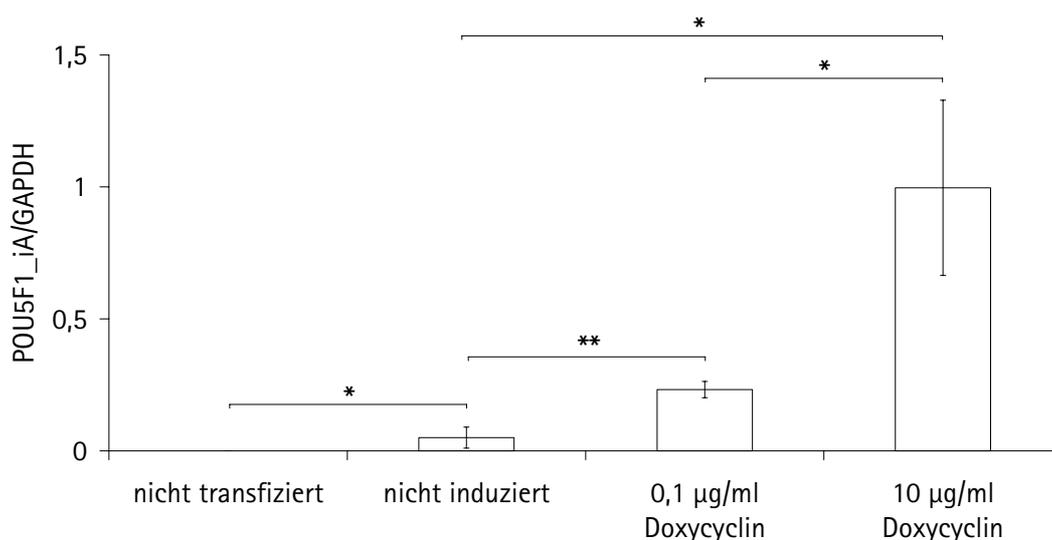


Abb. 41 POU5F1_iA-mRNA-Expression in hMSC 48 Stunden nach Kotransfektion von pTet-On und pTRE2hyg-POU5F1_iA. Die Daten sind normiert auf die GAPDH-mRNA-Kopienanzahl und als Mittelwerte +/- Standardabweichung eines Experiments dargestellt, das aus drei Ansätzen bestand (signifikante Unterschiede zur nicht-induzierten Kontrolle bei den Doxycyclin-Konzentration; signifikanter Unterschied zwischen den Doxycyclin-Konzentration von 0,1 und 10 µg/ml; signifikanter Unterschied zwischen nicht transfiziert und nicht induziert; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$).

D5.2.3 Proliferationsverhalten von POU5F1_iA-transfizierten hMSC

Um zu untersuchen, ob die Expression von POU5F1_iA das Wachstumsverhalten von hMSC beeinflusst, wurden Proliferationsstudien durchgeführt. Dazu wurden hMSC mit den Vektoren p-POU5F1_iA-IRES-neo2 sowie der Kontrolle pIRES-neo2 wie in Abschnitt D5.2.1 dargestellt im 48-Kavitäten-Format transfiziert. In Abb. 42 ist das Zellwachstum über den Untersuchungszeitraum von sieben Tagen dargestellt, wobei am ersten, zweiten, fünften und siebten Tag die Zellzahl mittels des CyQuant-Assays bestimmt worden war.

Die Ergebnisse zeigen, dass nicht-transfizierte Zellen innerhalb von sieben Tagen um mehr als das Doppelte proliferierten. Ein Vergleich der Zellzahl am zweiten Tag macht deutlich, dass die Anzahl der transfizierten Zellen um 30 % reduziert war. Erst ab dem fünften Tag stiegen die Zellzahlen nach Transfektion erneut an und erreichten am siebten Tag wieder die Ausgangszellzahl. Der Unterschied der Zellzahlen zwischen nicht-transfizierten und transfizierten Zellen vergrößerte sich im Laufe der Woche und bestand am Ende in einer Differenz von 60 %. Die Proliferationshemmung durch POU5F1_iA lässt sich am Vergleich zwischen p-POU5F1_iA-IRES-neo2 und pIRES-neo2 erkennen. Vor allem am zweiten, fünften und siebten Tag fällt der Unterschied auf, der am ersten Tag noch nicht vollkommen ausgeprägt war.

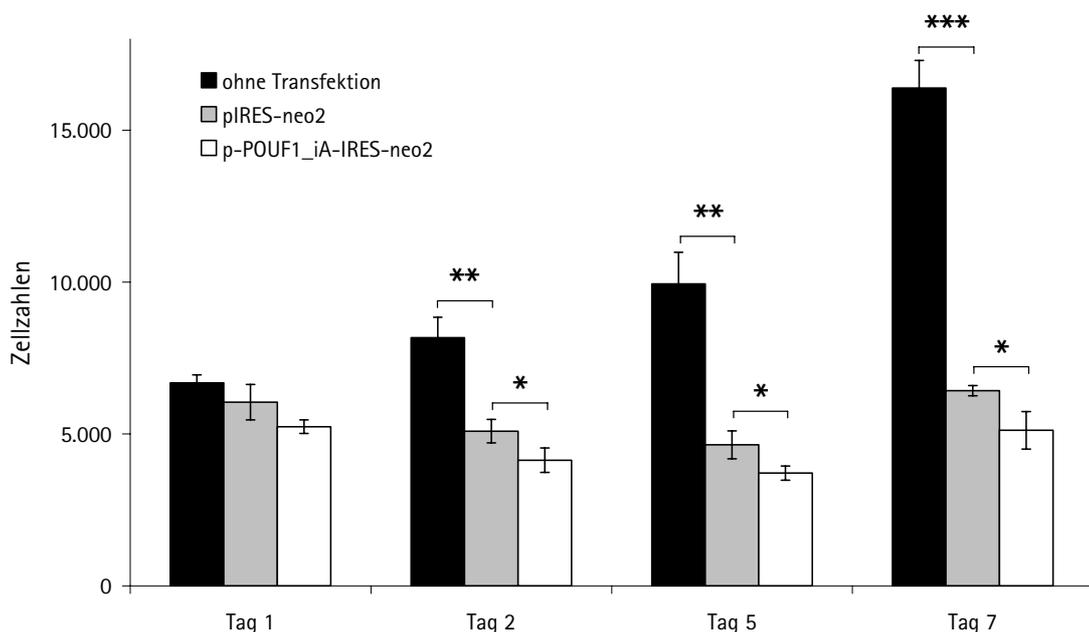


Abb. 42 Proliferationsverhalten von hMSC nach transienter Transfektion mit p-POU5F1_iA-IRES-neo2 über einen Zeitraum von sieben Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung zweier unabhängiger Experimente, wobei jeder Versuch in drei Ansätzen durchgeführt wurde (signifikante Unterschiede zwischen nicht transfiziert und transfiziert mit pIRES-neo2 am Tag 2, 5 und 7, kein signifikanter Unterschied am Tag 1; signifikante Unterschiede zwischen p-POU5F1_iA-IRES-neo2 und pIRES-neo2 am Tag 2, 5 und 7, kein signifikanter Unterschied am Tag 1; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$).

E DISKUSSION

Mit dem langfristigen Ziel, durch genetische Modifikationen von Stammzellen letztlich einen effektiven Patienten-spezifischen Zell- und Gewebeersatz generieren zu können, wurden in dem vorgestellten Promotionsprojekt zunächst mehrere Möglichkeiten der nicht-viralen, induzierbaren Expression von Reporterplasmiden evaluiert und schließlich erstmals die Auswirkungen des Pluripotenz-vermittelnden Transkriptionsfaktors POU5F1 auf die Proliferationsfähigkeit von hMSC untersucht.

Im Folgenden sollen nun wesentliche Ergebnisse insbesondere hinsichtlich der Methodenoptimierung im Kontext bekannter Literaturdaten diskutiert werden.

E1 TRANSFEKTION IN hMSC

Wie in Tab. 8 zusammengefasst, wurden diverse Transfektionen in hMSC mit unterschiedlichen Zielsetzungen durchgeführt. So diente die Transfektion von Plasmiden, die die Reporter-Gene Luziferase und/oder EGFP enthielten zum einen der Methodenoptimierung. Zum anderen waren Transfektionsuntersuchungsexperimente zur Etablierung des regulierbaren Tet-On-Systems in hMSC unerlässlich. Dafür wurden die Vektoren sowohl transient (einzeln und kombiniert) als auch stabil transfiziert. Ein weiterer Schwerpunkt bestand in der Transfektion von Plasmiden, die für den Transkriptionsfaktor POU5F1_{iA} codieren.

E1.1 Liposomaler Gentransfer

Aufgrund der in der Arbeitsgruppe von Dr. P. Neth vorliegenden Erfahrungen hinsichtlich der für die Transfektion von hMSC geeignetsten Methoden wurde der bereits etablierte liposomale Gentransfer mittels *Lipofectamine 2000* gewählt und für die eigenen Erfordernisse adaptiert (Hoelters et al., 2005). Die optimierten Konzentrationen von DNA und *Lipofectamine 2000* lagen in einem Bereich von 0,6 – 1,1 µg/ml bzw. 0,9 – 3,3 µl/ml. Die besten Transfektionseffizienzen ergaben sich bei einem Verhältnis von 1:1,5 und 1:3. Unter diesen Bedingungen zeigte sich in Übereinstimmung mit den publizierten Daten eine Überlebensrate von mehr als 80 % (Hoelters et al., 2005). Höhere *Lipofectamine 2000*- bzw. DNA-Konzentrationen gingen mit einer höheren Zellmortalität einher und sollten deshalb nicht verwendet werden.

Tab. 8 Übersicht über die durchgeführten Transfektionen. APH: Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase.

Vektoren	Größe [kb]	DNA [$\mu\text{g/ml}$]	Lipofectamine 2000 x-fach ($\mu\text{l/ml}$)	exprimierte Proteine	IRES	stabil	Kapitel
Reporter-Plasmide							
pEGFPLuc-IRES-neo2	7,8	0,8	3 (2,4)	Luziferase, EGFP, APH	+		B2.2.
pLucEGFP	6,4	0,8	3 (2,4)	Luziferase, EGFP, APH			B2.2.
pEGFPLuc	6,4	0,8	3 (2,4)	Luziferase, EGFP, APH			B2.2.
pEGFP-N3	4,7	0,6	1,5 (0,9)	EGFP, APH			B2.2.
Plasmide zur regulierbaren Genexpression							
pTet-On	7,4	0,6	1,5 (0,9)	Transaktivator, APH		+	B3.4.1.; B3.5.
p2in1-Luc	8,6	1,1	3 (3,3)	Luziferase, Transaktivator, APH			B4.2.
pTRE2hyg-Luc	7,0	1	3 (3,0)	Transaktivator, APH, Luziferase, APH			B3.5.3.
Kotransfektionen							
pTet-On und pTRE2hyg-Luc	7,4 7,0	0,9 (0,09 0,81)	3 (2,7)	Transaktivator, APH, Luziferase, Hygromycin- Phosphorylase			B3.4.2.
pTet-On und pTRE2hyg-EGFP	7,4 6,0	0,9 (0,09 0,81)	3 (2,7)	Transaktivator, APH, EGFP, Hygromycin- Phosphorylase			B3.4.3.
pTet-On und pTRE2hyg-POU5F1_iA	7,4 6,4	0,9 (0,09 0,81)	3 (2,7)	Transaktivator, APH, POU5F1_iA, Hygromycin- Phosphorylase			B3.4.1
Plasmide mit POU5F1_iA							
pIRESneo2	5,3	0,8	3 (2,4)	APH	+	+	B5.2.
p-POU5F1_iA- IRESneo2	6,4	0,8	3 (2,4)	POU5F1_iA, APH	+	+	B5.2.
pIRES2-EGFP	5,3	0,8	3 (2,4)	APH, EGFP	+	+	B5.2.
p-POU5F1_iA-IRES- EGFP	6,4	0,8	3 (2,4)	POU5F1_iA, EGFP, APH	+	+	B5.2.
pcDNA3.1-POU5F1_iA	6,5	0,8	3 (2,4)	POU5F1_iA, APH			B5.2., B5.3.

E1.2 Transiente Transfektion

Um die Bedingungen der liposomalen Transfektion von hMSC weiter zu optimieren, wurde die Effizienz des Gentransfers der verschiedenen Plasmide in mehreren Versuchsreihen bestimmt. Der Nachweis erfolgte nach 24 bis 48 Stunden, da in diesem Zeitraum die Expression des Transgens am höchsten zu sein scheint (Tseng et al., 1997; Hoelters et al., 2005).

TRANSFEKTION VON EGFP-PLASMIDEN

Bei der Bestimmung der Transfektionseffizienz spielt insbesondere »grün fluoreszierendes Protein« (GFP) eine große Rolle, da hier vergleichende Analysen durch die prozentuale Angabe der leuchtenden Zellen möglich sind (Labas et al., 2002). So wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. P. Neth bei der Transfektion von hMSC mit pEGFP-N3 eine Effizienz von 50 % erreicht (Hoelters et al., 2005). Im Vergleich hierzu zeigte der liposomale Gentransfer in MSC von Ratten nur eine Effizienz von 25 % (McMahon et al., 2006) und in murinen neuralen Stammzellen von 15 % (Falk et al., 2002). Mittels anderer Gentransfermethoden wie z. B. der Elektroporation wurden ebenfalls nur 12 % der hMSC transfiziert (Peister et al., 2004), während der Einsatz von viralen Vektoren in MSC von Ratten zu 96 % GFP-positiven Zellen führte (McMahon et al., 2006). Wiewohl die Verwendung von GFP als Fusionsprotein auch in Stammzellen eine übliche Methode zur Untersuchung von einzelnen Molekülen darstellt (Cao et al., 2006; Li et al., 2006), konnte bei den in meiner Arbeit durchgeführten Transfektionen von pEGFPLuc-IRES-neo2, pEGFPLuc und pLucEGFP (s. Tab. 8) nur wenige schwach GFP-positiv Zellen detektiert werden. Eine Fusion mit GFP sollte dessen Fluoreszenzeigenschaften nicht verändern (Ponomarev et al., 2004). Eingeschränkt werden die Spezifität und Sensitivität der GFP-Fluoreszenz durch eine Hintergrund-Emission, welche sich aus der Autofluoreszenz der Zellen (z. B. Stoffwechselprodukte) und der Fluoreszenz von Zellkulturgefäßen bzw. Mediumkomponenten (z. B. Serum, Vitamine, Aminosäuren, Phenolrot) zusammensetzt (Feliciano et al., 2006). Um die Hintergrundfluoreszenz zu übersteigen und detektierbare Level zu erhalten, muss eine bestimmte Anzahl an GFP-Molekülen in der Zelle exprimiert werden (Aubin, 1979; Amsterdam et al., 1996). Die Expression wiederum ist abhängig von der Kopienanzahl der aufgenommenen Plasmide und Expressionslevel pro Gen. Obwohl die für die Aufnahme wichtigen Parameter – wie z. B. die DNS-Menge und das Ladungsverhältnis des positiv geladenen Lipids zum negativ geladenen DNS-Rückgrat – optimiert worden waren, wurden in meiner Arbeit nicht die ausreichende Anzahl an GFP-Molekülen in der Zelle erreicht. Im Falle der Plasmide pIRES2-EGFP und p-POU5F1_iA-IRES-EGFP könnte eine Erklärung für die schwache GFP-Expression die Verwendung des IRES-Elements darstellen (s. E1.4).

TRANSFEKTION VON LUZIFERASE-PLASMIDEN

Während die Transfektion von EGFP-Plasmiden in diesem Projekt der schnellen Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Fluoreszenzmikroskopie diente, erfolgte die Transfektion von Luziferase-Plasmiden vor allem zur Quantifizierung der Proteinexpression des transfizierten Luziferase-Gens *in vitro* nach Zelllyse (s. Tab. 8). Der Vergleich der erzielten Luziferase-Aktivitäten mit Literaturdaten ist allerdings schwierig, da meist nur absolute Zahlen angegeben werden (Bornkamm et al., 2005; Cao et al., 2006) oder die Luziferase-Expression auf die Gesamtzell-Proteinmenge bezogen wird (Baron and Bujard, 2000; Krueger et al., 2006). In meiner Arbeit wurde die Aktivität auf die Zellzahl normiert (Tab. 9). Die Luziferase erwies sich als ideales Mittel zur genauen Bestimmung des Genexpressionsniveaus, insbesondere bei der Etablierung des Tet-On-Systems und dessen Titrierbarkeit, womit auch kürzlich von Krueger et al. veröffentlichten Daten bestätigt wurden (2006). Beim Einsatz der Plasmide pEGFPLuc-IRES-neo2, pEGFPLuc und pLucEGFP ging es vornehmlich darum, die Funktionsfähigkeit der Luziferase nach Transfektion der Plasmide in hMSC zu beweisen. Der kommerziell erworbene Vektor pEGFPLuc zeigte hier die höchste Expression, pEGFPLuc-IRES-neo2 eine reduzierte und pLucEGFP keine Aktivität (Tab. 9). Alle drei Vektoren tragen das Gen für die Luziferase als Fusion mit dem EGFP-Gen, was die Aktivität der Luziferase reduzieren kann (Soling et al., 2004). Der Nachweis von Luziferase-Aktivität ohne Beobachtung einer GFP-Fluoreszenz bei Verwendung der Plasmide pEGFPLuc-IRES-neo2 und pEGFPLuc dürfte in der höheren Sensitivität des Luziferase-Nachweises begründet sein.

Tab. 9 Maximale Luziferase-Aktivitäten.

hMSC (transiente Transfektion)	Luziferase-Aktivität [RLU/Zelle]
pEGFPLuc-IRES-neo2	0,02
pLucEGFP	0
pEGFPLuc	0,08
p2in1-Luc	bis 0,16
pTet-On und pTRE2hyg-Luc	bis 0,35
hMSC (pTet-On stabil, transiente Transfektion)	
pTRE2hyg-Luc	bis 1,2 (Mittelwert 0,16)
CHO-Zellen (stabil)	
pTet-Off- und pTRE2hyg-Luc	bis 200

OPTIMIERUNG DER TRANSFEKTION VON pTET-ON MITTELS GENETICIN

Üblicherweise wird die auf dem Plasmid pTet-On kodierte Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase (APH) zur Herstellung stabil transfizierter Zellen genutzt (Gubin et al., 1997; Hamra et al., 2005) (s. C2.2.2). In diesem Teil der Arbeit wurde sie zur Optimierung der Transfektionseffizienz von pTet-On verwendet, da dieses Plasmid keine anderen quantifizierbaren Reportergene enthält (s. Tab. 8). Die Idee dabei war, dass in der Kulturschale mit den

effizientesten Transfektionsbedingungen die meisten Zellen die Behandlung mit hoher Konzentration von Geneticin überlebten. Vor dem Hintergrund, dass durch eine transiente Transfektion wesentlich höhere Transgen-Expressionsraten erzielt werden (Sambrook, 2001), wurden höhere Antibiotika-Konzentrationen als zur gewöhnlichen Selektionierung verwendet (1 mg/ml im Vergleich zu 100 µg/ml bei der Selektionierung). Eine Resistenz gegen eine hohe Antibiotikum-Konzentration geht meist auch mit einer hohen Proteinexpression des Transgens einher. Dies beruht auf einer höheren Kopienanzahl an Vektoren in der Zelle (Sautter and Enenkel, 2005), womit auch ein ausreichendes Niveau an Transaktivator erwartet werden kann. Außerdem wurde Geneticin schon nach 24 Stunden zugegeben (vgl. nach 96 Stunden bei Selektionierung), da in diesem Zeitraum im Regelfall die maximale Expression erreicht wird (Tseng et al., 1997). Schon am zweiten Tag zeigte sich, dass alle Zellen, die mehr als 4 µl/ml *Lipofectamine 2000* ausgesetzt waren, nicht überlebten. Dies basierte wahrscheinlich vor allem auf der Zytotoxizität des Transfektionsreagenz, verbunden mit der toxischen Wirkung der transfizierten DNA und des exprimierten Transaktivatorproteins (Fussenegger, 2001). Am siebten Tag waren die optimalen Transfektionsbedingungen deutlich (0,6 µg/ml pTet-On-DNA; 1,5-fache Menge an *Lipofectamine 2000*). Bei der Wahl der Konzentrationen an DNA und *Lipofectamine 2000* muss daher ein Mittelweg zwischen zu hoher Toxizität und zu niedriger Gentransferrate eingeschlagen werden (Tseng et al., 1997). Das hier beschriebene Vorgehen – Optimierung der Transfektionsbedingungen mittels der APH – eignet sich daher als generelle Methode beim Fehlen anderer Marker.

TRANSFEKTION VON POU5F1_iA

Nach Transfektion der Plasmide p-POU5F1_iA-IRESneo2 und pcDNA3.1-POU5F1_iA war die erreichte Transkriptionsstärke beider Vektoren gleich hoch, während bei p-POU5F1_iA-IRES-EGFP nur etwa die Hälfte der vorgenannten mRNA-Kopienzahl erreicht wurde. Hier könnte der Grund in der zusätzlichen Expression des EGFPs liegen, da dieses Reportergen den wesentlichen Unterschied zwischen p-POU5F1_iA-IRESneo2 und p-POU5F1_iA-IRES-EGFP darstellt.

Eine Aussage über die Auswirkungen des Transfektionsereignis auf die Zellen lässt die Zellzahlmessung nach Transfektion über einen Zeitraum von einer Woche zu (s. Abb. 42), wobei die Unterschiede zwischen p-POU5F1_iA-IRESneo2 und p-IRESneo2 auf die Wirkung von POU5F1_iA zurückgeführt werden können (s. E3.2). Die Folgen der Transfektion macht die Zellzahl-Differenz zwischen nicht-transfizierter Kontrolle und mit p-IRESneo2 transfizierten Zellen deutlich. Ein Vergleich der Zellzahl am zweiten Tag nach Transfektion lässt erkennen, dass die Anzahl der transfizierten Zellen um 30 % reduziert ist. Dies ist einerseits durch Zelltod, andererseits auch durch Hemmung der Proliferation durch die Transfektion erklärbar (Tseng et al., 1997). Bei den transfizierten Zellen war ab dem fünften Tag wieder ein Anstieg der Zellzahlen nachweisbar, d. h. erst zu diesem Zeitpunkt überwiegt die Proliferation wieder die Hemmung bzw. den Zelltod durch die Transfektion.

E1.3 Stabile Transfektion

GENERIERUNG STABIL TRANSFIZIERTER hMSC

Um hMSC zu generieren, welche die Transgene rtTA permanent exprimieren, wurden die Zellen mit dem Plasmid pTet-On nach dem optimierten *Lipofectamine 2000*-Protokoll transfiziert (s. D3.5, Tab. 8). Eine stabile Transfektion ist gekoppelt mit einer Integration des Vektors in das Genom der jeweiligen Zelle. Ob die Zelle den Selektionsprozess überlebt, ist davon abhängig, an welcher Stelle die Linearisierung des Vektors erfolgt. Rein rechnerisch (bezogen auf pTet-On) können nur 80 % diesem Selektionsprozess standhalten. Der Grund hierfür liegt in der 20%igen Wahrscheinlichkeit, dass die Linearisierung des Vektors im Resistenzgen erfolgt. Des Weiteren exprimieren nur 60 % der überlebenden Zellen den Transaktivator, da bei 40 % dieser Zellen eine Öffnung des Vektors im Transaktivator-Gen erfolgt. Diese Kalkulation stimmt mit unserer Klonanalyse sehr gut überein, da 64 % der transfizierten Klone eine Transaktivator-Aktivität aufwiesen (s. D3.5.3). Außerdem ist die Höhe der Transgenexpression vom chromosomalen Integrationsort abhängig (Rosenqvist et al., 2002). Die Frage nach dem Expressionsniveau des Transgens während der Differenzierung wird in der Literatur kontrovers beantwortet, da teils eine reduzierte Expression (Lindemann et al., 2002), teils eine unveränderte Transgenexpression beobachtet wurde (Lee et al., 2001; Hoelters et al., 2005).

KLONALE EXPANSION VON pTET-ON STABILEN hMSC

pTet-On stabile hMSC zeigten bei der Subkultivierung ein für hMSC typisches Verhalten. Es konnten zwei morphologische Zelltypen erkannt werden, die sich in ihrem Proliferationsverhalten unterschieden. Während kleine »spindelförmige« Zellen in der Lage waren, Kolonien zu bilden, war bei großen, flachen Zellen keine Koloniebildung zu erkennen. Verschiedene Arbeitsgruppen haben anhand der Morphologie differente Subpopulationen von hMSC beschrieben. 1981 identifizierten T. Mets und G. Verdonk zwei Typen, deren Unterschied sie durch den Alterungsprozess erklärten (Mets and Verdonk, 1981). Kleine Zellen traten in frühen Passagen auf, bildeten größere Klone und zeichneten sich durch eine hohe Proliferationskapazität aus, während größere das gegenteilige Verhalten aufzeigten. Colter et al. beobachtete eine weitere Gruppe sehr kleiner Zellen mit noch höherer Proliferationskapazität und führte den Begriff der RS-Zellen ein (RS: *recycling stem cell*) (2000; 2001).

Um eine maximale Anzahl an proliferierenden Zellen zu erhalten, ist es wichtig, diese in möglichst geringer Dichte zu kultivieren (Sekiya et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen zum einen aus diesem Grund sehr dünn ausgesät (eine Zelle/cm²; vgl. 10 Zellen/cm²), aber auch, um nach klonaler Expansion durch ausreichend großen Abstand eine Überlappung der unterschiedlichen Zellklone zu verhindern. Große flache Zellen werden als Ergebnis eines Alterungsprozesses gesehen, wobei die sog. Hayflick-Grenze bei 50 Zellteilungen angegeben wird (Hayflick and Moorhead, 1961; Fehrer and Lepperdinger, 2005).

TRANSIENTE TRANSFEKTION VON pTET-ON STABIL TRANSFIZIERTEN hMSC

Die klonal expandierten pTet-On stabil transfizierten hMSC wurden ein zweites Mal transient transfiziert, um die Funktionalität des stabil exprimierten Transaktivators zu bestimmen. Dieses für die Etablierung der induzierbaren Genexpression übliche Vorgehen führte in unserem Fall zu dem bemerkenswerten Erkenntnis, dass hMSC eine zeitlich versetzte Doppel-Transfektion durchaus überleben. Ein Problem dabei ist allerdings, dass durch die aufwendige stabile Transfektion hMSC häufig subkultiviert werden müssen und durch die klonale Expansion einem schnellen Alterungsprozess unterliegen (Tab. 10).

Tab. 10 Mehrfachpassagierung zur Generierung pTet-On stabil transfizierter Klone.

Zweck	Passage
1. Transfektion: mit pTet-On	4
Selektion mit Geneticin (100 µg/ml)	5
Klonale Expansion	6
Weitere Expansion nach selektiver Trypsinierung	7
Weitere Expansion	8
2. Transfektion: mit pTRE2hyg-Luc zur Transaktivatorprüfung bzw. Einfrieren	9

Nachdem in dieser Arbeit eine zweite transiente Transfektion der stabil pTet-On exprimierenden Zellklone durch optimale Kultivierungsbedingungen gelang, wurden die übrigen, nicht transient transfizierten Zellklone für weitere Versuche eingefroren. Nach dem Auftauen war die Proliferation dieser Zellklone jedoch stark eingeschränkt. Ein Grund hierfür stellt möglicherweise die hohe Passagenzahl dar. Des Weiteren zeigten diese Zellen nicht die für hMSC typische Morphologie. Dieser veränderte Zellphänotyp könnte durch die zelltoxischen Einflüsse während des Einfrier- und Auftauprozesses induziert worden sein. So wird für das im Einfriermedium enthaltene DMSO ein wachstumshemmender Effekt diskutiert, der durch eine Beeinflussung der Membranfluidität aber auch durch eine Veränderung des DNA-Methylierungsmusters bedingt sein kann (Freschney, 1990). Weiterhin exprimieren diese Zellen stabil das Transaktivatorprotein, das für sich ein toxisches Potential beinhaltet (Fussenegger, 2001). Allerdings erscheint diese Toxizität als alleiniger Grund eher unwahrscheinlich, vielmehr wird wohl die Summe der o. g. Faktoren für die starke Beeinträchtigung der Zellproliferation verantwortlich gewesen sein.

Die genannten Beeinträchtigungen dürften möglicherweise dafür verantwortlich sein, dass bisher eine zweite Transfektion von hMSC nach vorheriger stabiler Transfektion in der Literatur nicht beschrieben ist.

E1.4 Einsatz bicistronischer Vektoren

Um die Effektivität des zeit- und kostenintensiven Selektionsprozesses für zukünftige stabile Transfektionen zu erhöhen, wurden bicistronische Vektoren hergestellt, die das Transgen in Korrelation zum Selektionsgen APH bzw. EGFP exprimieren. Somit werden lediglich solche Zellen selektioniert, die gleichzeitig das Transgen und das Selektionsgen exprimieren. Das sog. IRES-Element, das bereits in Abschnitt C1.2.7 dieser Arbeit beschrieben wurde, erlaubt hierbei die Translation zweier offener Leserahmen von einer mRNA, so dass die Expression der beiden Gene miteinander gekoppelt wird (Gurtu et al., 1996).

In meinem Projekt fanden drei bicistronische Vektoren Verwendung (s. Tab. 8). Der erste transfizierte bicistronische Vektor pEGFPLuc-IRES-neo2 zeigte nur ein Viertel der Luziferase-Aktivität wie der gewöhnliche Expressionsvektor pEGFPLuc (s. Tab. 9). Außerdem wurden die bicistronischen Vektoren p-POU5F1_iA-IRES-EGFP und p-POU5F1_iA-IRESneo2 genutzt. Beim Vergleich mit dem einfachen Vektor pcDNA3.1-POU5F1_iA ergab sich für p-POU5F1_iA-IRESneo2 eine gleichstarke Transkriptionsstärke, während p-POU5F1_iA-IRES-EGFP nur die Hälfte aufwies. Das deutet darauf hin, dass im Falle von pEGFPLuc-IRES-neo2 und p-POU5F1_iA-IRES-EGFP das IRES-Element mit einer Beeinträchtigung der Transkription einhergeht, bei p-POU5F1_iA-IRESneo2 hingegen nicht. Der angeführte Vergleich (pEGFPLuc-IRES-neo2 mit pEGFPLuc; p-POU5F1_iA-IRES-EGFP bzw. p-POU5F1_iA-IRESneo2 mit pcDNA3.1-POU5F1_iA) muss kritisch betrachtet werden, da sich die Grundgerüste der Vektoren pEGFPLuc und pcDNA3.1-POU5F1_iA unterscheiden, verschiedene Gene transkribiert werden und der Plasmidtransfer auf unterschiedlichen Ebenen nachgewiesen wurde (Luziferase-Aktivität bzw. RT-PCR).

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die Effizienz der IRES-vermittelten Translation, also die des 3'-Cistrons, von zahlreichen Faktoren abhängig ist. Dazu gehören zelluläre Charakteristika, angefangen vom Zelltyp, über den Differenzierungszustand bis hin zum Zellalter (Vagner et al., 2001). Prinzipiell ist die IRES-vermittelte Translation schwächer als die des 5'-Cistrons (Kozak, 2005).

E2 INDUZIERBARE GENEXPRESSION

Neben der beschriebenen Transfektion stellt die induzierbare Genexpression eine erweiterte Form der genetischen Modifikation von hMSC dar. Sie gilt als viel versprechendes Mittel, um komplexe molekulare Steuerungsmechanismen zu verstehen.

E2.1 Angewandte Methoden zur Geninduktion in hMSC

E2.1.1 Induzierbare Genexpression in hMSC mittels transienter Kotransfektion

Die transiente Transfektion von Regulationsplasmiden stellt eine geeignete Methode dar, um die Funktionsfähigkeit des Regulationssystems in den gewünschten Zellen einzuschätzen (Weber and Fussenegger, 2006). Da mit dieser Methode bereits in humane Myoblasten eine Doxycyclin-abhängige Insulin-Expression gezeigt werden konnte (Wilson et al., 2005), wurde dieses Verfahren auch zur funktionellen Testung des Tet-On-Systems in hMSC herangezogen. Dabei konnten wir erstmals nachweisen, dass eine Doxycyclin-abhängige Genregulation in hMSC möglich ist. Zwar wurde eine Anwendung des Tet-On-Systems in embryonalen Stammzellen beschrieben (Niwa et al., 2000; Adachi et al., 2006), aber Daten zur Verwendung in hMSC fehlen bislang. Meist wird bei transienter Transfektion eine hohe unspezifische Aktivität beobachtet, was aber bei den hMSC meist nicht der Fall war. Deshalb wurden weitere Vorexperimente durchgeführt, die zum Test des Serums auf Doxycyclin (s. Abb. 17) und zum prinzipiellen Nachweis einer titrierbaren Induktion in hMSC (s. Abb. 23) dienen.

E2.1.2 Induzierbare Genexpression in pTet-On stabil transfizierten hMSC

Um den Transaktivator in pTet-On stabil transfizierten hMSC funktionell zu testen, wurden diese Zellen mit dem Vektor pTRE2hyg-Luc transfiziert. Die Analyse ergab in 64 % der Fälle die Möglichkeit einer Regulation, was für die Funktionsfähigkeit des Transaktivators spricht. Ein Drittel davon wies eine stärkere unspezifische Aktivität auf. Letztere bzw. die maximale Induktion dieser transienten Transfektion lassen aber nicht auf die genauen zukünftigen Regulationseigenschaften des Klons bei einer erneuten Transfektion schließen, da diese auf den Vektor pTRE2hyg zurückzuführen sind (Baron and Bujard, 2000).

Die Klone mit funktionsfähigem Transaktivator sollten für weitere Untersuchungen verwendet werden, wobei hierfür der Vektor pTRE2hyg mit dem entsprechenden Transgen entweder stabil oder transient transfiziert werden sollte. Durch diese konsekutiven Transfektionen sollte die gemeinsame Integration der beiden Vektoren vermieden werden, da dies zu einer erhöhten unspezifischen Aktivität führen kann (Baron and Bujard, 2000).

Dieser strategische Ansatz war allerdings experimentell nicht durchführbar. So war es zwar möglich, pTet-On stabil transfizierte Klone zu generieren und deren Regulationskapazität durch Testung des Transaktivators zu bestimmen, eine weitere stabile Transfektion mit pTRE2hyg war allerdings wegen des fehlenden Proliferationsvermögens nicht möglich (s. E1.3).

E2.1.3 Induzierbare Genexpression in hMSC mit p2in1

Um das in E2.1.2 beschriebene Problem zu umgehen, war es notwendig, die essentiellen Komponenten des Tet-On-Systems, pTet-On und pTRE2hyg, auf einem Plasmid zusammenzubringen – auf dem von uns als p2in1 bezeichneten Vektor. Hierzu wurde ein bidirektionaler Promoter verwendet, der aus der Operatorsequenz und zweier entgegengesetzt orientierter minimaler Promotoren P_{minhCMV} besteht (Baron et al., 1995; Strathdee et al., 1999). Flankierend wurde zum einen das zu untersuchende Gen und zum anderen der Transaktivator kloniert. Diese Anordnung ermöglichte eine gemeinsame Induktion von dem entsprechenden Transgen und dem Transaktivator. Hierbei kommt es zu einer Autoregulation, bei der die Expression des Transaktivators nach Doxycyclin-Zugabe durch positive Rückkopplung verstärkt wird. Dies führt wiederum zu einer höheren Expression des Transgens als unter Standardbedingungen (Fussenegger, 2001) (Abb. 43). Da der Vektor p2in1 die Komponenten der Autoregulation mithilfe des bidirektionalen Promoters und das Tet-On-System beinhaltet, besteht ein Vorteil vor allem in der transienten Zugabe des Doxycyclins im Gegensatz zum Tet-Off-System, bei dem zur Aufrechterhaltung des nicht-induzierten Zustands eine permanente Gabe von Doxycyclin notwendig ist (Baron et al., 1995).

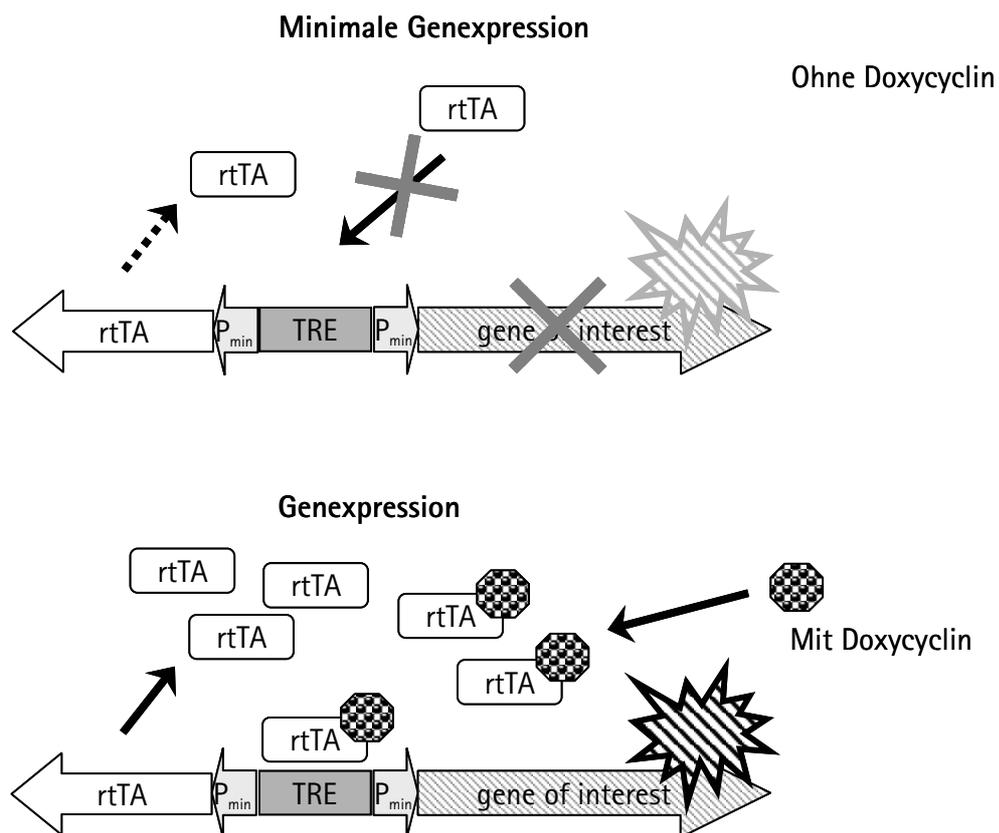


Abb. 43 Schematische Darstellung der induzierbaren Genexpression mit dem Vektor p2in1.

Ohne Doxycyclin werden geringe Mengen des Transaktivators $rtTA$ und des Zielgens exprimiert. Die Zugabe von Doxycyclin führt zur Aktivierung der Transkription beider Gene. Die neu synthetisierten Transaktivator-Moleküle binden wiederum Doxycyclin und verstärken damit die Expression beider Gene.

Mit diesem Ansatz konnten wir nun erstmals zeigen, dass mit dem liposomal transfizierten Vektor p2in1 in hMSC eine Induktion möglich ist, die zu vergleichbaren maximalen Expressionsstärken wie bei der Verwendung von zwei Plasmiden (s. E2.2.2) führt. Außerdem konnte auch hier die Induktion in Abhängigkeit von der Doxycyclin-Konzentration gesteuert werden (s. E2.2.4). Allerdings trat auch mit diesem Vektorkonstrukt das Problem der unspezifischen Aktivität auf (s. E2.2.1).

In den letzten Jahren wurden einige virale Vektoren für die Anwendung in Tiermodellen, z. B. zur Entwicklung von Parkinson-Therapien entwickelt (Vogel et al., 2004; Goverdhana et al., 2005). Unter anderem beschrieb die Arbeitsgruppe von A. Chtarto einen Vektor für die Anwendung im ZNS, der auf derselben Anordnung der Regulationselemente beruht wie p2in1. Ein wichtiger Unterschied zu unserem System ist allerdings der zusätzliche Einsatz eines Adeno-assoziierten Virus (AAV) zur Transduktion, der weitere DNA-Elemente wie ITR für seine Funktionsfähigkeit benötigt. Da ITR aktivierende Eigenschaften auf Promotoren ausüben können, wurde eine Interaktion durch Isolationselemente begrenzt. Dieser Vektor wurde in HEK-293-Zellen auch mittels liposomalen Gentransfers transfiziert (Chtarto et al., 2003a). EGFP, welches als Reporter diente, wurde auf verschiedene Weisen detektiert, was zum Teil zu erheblichen Unterschieden im Ergebnis führte. Die Analyse per *fluorescence activated cell sorting* (FACS) zeigte weniger als die zweifache Menge an EGFP-positive Zellen nach Induktion im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle. Die Bestimmung des EGFP in Zellextrakten ergab eine 25-fache Induktion bei erhöhter unspezifischer Aktivität. Der Vergleich dieser 48-Stunden-Werte unter Induktion mit 1 µg/ml Doxycyclin mit den in unserer Arbeit gemessenen (4,8-fache Induktion) ist aufgrund der unterschiedlichen Zelltypen bzw. Reporteranalysen problematisch.

E2.2 Vergleich der angewandten Methoden für induzierbare Genexpression

E2.2.1 Unspezifische Aktivität

Ein bekanntes Problem des Tet-On-Systems ist die unspezifische Aktivität, d. h. eine basale Expression des Gens unter der Kontrolle des induzierbaren Promotor P_{minhCMV} ohne Anwesenheit des Induktors. In dieser Arbeit wurde die niedrigste unspezifische Aktivität bei transienter Kotransfektion der beiden Vektoren pTet-On und pTRE2hyg-Luc beobachtet. Im Vergleich dazu wurde bei der transienten Transfektion von p2in1-Luc in hMSC etwa das Vierfache dieser basalen Aktivität gemessen. Die transiente Transfektion von pTet-On stabil transfizierten hMSC führte zu heterogenen Ergebnissen, da diese Experimente auf unterschiedlichen Klonen basierten. Die mittlere unspezifische Aktivität war höher (Abb. 44).

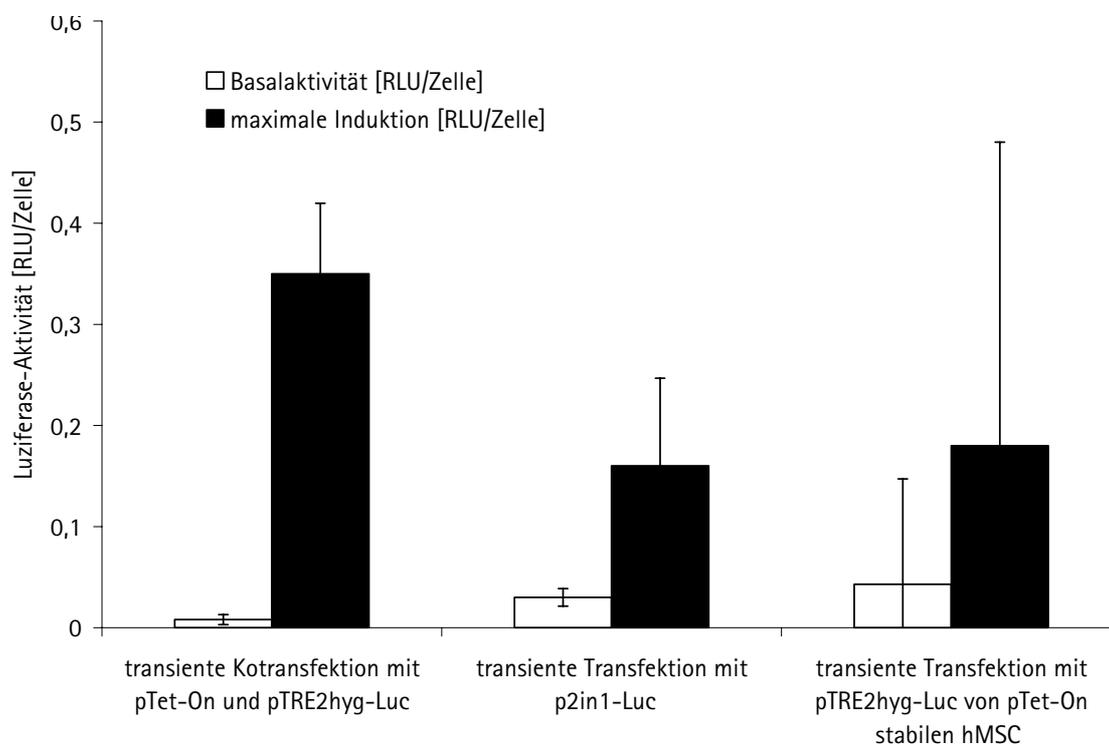


Abb. 44 Unspezifische Aktivitäten und maximale Induktion der angewandten Methoden zur induzierbaren Genexpression in hMSC. Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abb. 23, Abb. 37 und Abb. 27.

Die unspezifische Aktivität ist beim Tet-On-System üblicher Weise im Vergleich zu Tet-Off erhöht (Gossen et al., 1995). Sie resultiert aus einer Restaffinität des reversen Transaktivators (rtTA) zu TRE in Abwesenheit von Doxycyclin. Um dieses Manko zu beheben, wurden deshalb zahlreiche Modifikationen des Transaktivators und des Doxycyclin-empfindlichen Promotors durchgeführt. Eine neue Version des Transaktivators, genannt $\text{rtTA}^{\text{S}}\text{-M2}$, reduzierte nicht nur die unspezifische Aktivität, sondern zeigte auch erhöhte Ansprechbarkeit auf Doxycyclin. Darüber hinaus steigerte dieser Transkriptionsfaktor auch die maximale Aktivität (Urlinger et al., 2000a). Ähnliche Effekte wurden mit der Verwendung verschiedener minimaler Promotoren, der Korrektur der Distanz zwischen Operatorsequenzen und minimalen Promotor (Agha-Mohammadi et al., 2004) bzw. der Veränderung der Anzahl der Kopien der Operatorsequenz erreicht (Gossen and Bujard, 1992).

Eine andere Strategie ist die Koexpression eines zusätzlichen Repressors tTS, der eine Fusion aus TetR mit der KRAB-Silencer-Domäne des humanen KOXF1-Gens darstellt und in Abwesenheit der Induktoren an die TRE-Sequenz des Zielgens bindet. Mit diesem System können rtTA und Repressor parallel in der Zelle exprimiert und gegensätzlich vom Induktor kontrolliert werden. In Anwesenheit von Doxycyclin dissoziiert der Repressor von der TRE-Sequenz, wodurch der rtTA dort binden und die Transkription initiieren kann (Freundlieb et al., 1999). Auch *in vivo* wurde diese Strategie angewendet, wobei die unspezifische Aktivität gesenkt werden konnte, ohne die Induktionsfähigkeit zu beeinträchtigen (Zhu et al., 2001). Die Kombination des Repressors mit der o. g. Transaktivator-Variante rtTA^{2^s}-M2 verspricht noch bessere Ergebnisse (Lamartina et al., 2003).

Unspezifische Aktivität entsteht auch, wenn der induzierbare Pomotor unter die Kontrolle eines Verstärkerelements gerät, was auch *enhancer trap* bezeichnet wird. Das kann beispielsweise durch den starken CMV-Promotor von pTet-On verursacht werden, wenn dieser bei Kotransfektion zusammen mit pTRE2hyg integriert. Des Weiteren können auch Verstärkerelemente im Genom der Zielzelle derartige Effekte induzieren. Mögliche Lösungen liegen in der strikten Beachtung des Protokolls mit konsekutiver Transfektion und sorgfältiger Testung der stabilen Klone (Pankiewicz et al., 2005) (s. E2.1.2), der Vermeidung des starken CMV-Promoters (s. E2.1.3), der Verwendung von Isolationselementen (Pluta et al., 2005) (s. E2.1.3) und der zielgerichteten Integration ins Genom (Bertoni et al., 2006).

Zudem können auch endogene Regulationsfaktoren an TRE binden, was ebenso zur Aktivität ohne Induktion führen kann. So konnte gezeigt werden, dass die Sequenz des Interferon-cis-Elements mit der TRE-Sequenz überlappt (Gould and Chernajovsky, 2004).

Bei transienter Transfektion können die hohe Kopienanzahl der Vektoren und die fehlende Chromatinrepression verstärkte unspezifische Aktivität induzieren. Dabei ist zudem auf das zur Transfektion eingesetzte Verhältnis der Vektoren pTet-On und pTRE2hyg zu achten (s. E2.2.6). Eine weitere mögliche Ursache von unspezifischer Aktivität ist außerdem die Verunreinigung des Serums in der Zellkultur durch Tetracyclin, was in dieser Arbeit allerdings (s. E2.2.3) ausgeschlossen werden konnte.

Abschließend kann festgestellt werden, dass sich die unspezifische Aktivität durch eine Kombination unterschiedlichster Faktoren zusammensetzt und je nach Zelltyp, genomischen Kontext und eingesetzten Vektoren Schwankungen unterworfen ist (Freundlieb et al., 1999).

E2.2.2 Maximale Induktion

Die maximal gemessenen Luziferase-Aktivitäten lagen bei den drei angewandten Methoden der induzierbaren Genexpression in hMSC im Bereich zwischen 0,2 bis 0,35 RLU/Zelle, wobei mit transienter Kotransfektion die höchsten Werte erreicht wurden. Aus den bisherigen Ergebnissen ist ersichtlich, dass mit dem induzierbaren Promotor $P_{hCMV^{-1}}$ bei maximaler Aktivierung eine höhere Expression erzielt werden konnte als mit dem starken konstitutiven CMV-Promotor P_{hCMV} (Transfektion von pEGFPLuc i. Vgl. zur Kotransfektion von pTet-On und pTRE2hyg-Luc: 0,08 bzw. 0,35 RLU/Zelle, s. Tab. 9). Eine plausible Ursache könnte die starke Aktivierung durch die VP16-Domäne sein (Liang et al., 1996). Bei Ersatz dieser durch noch stärkere Aktivierungsdomänen wie z. B. p65 wird eine gesteigerte Maximalexpression bewirkt, die jedoch mit einer erhöhten unspezifischen Aktivität einhergeht. Diese kann allerdings mit den in Abschnitt E2.2.1 geschilderten Strategien – wie z. B. durch die Verwendung des Repressors tTS – wirksam unterdrückt werden (Urlinger et al., 2000b). Auch mit anderen Promotoren wie z. B. einer minimalen Version des Promotors der Thymidinkinase des H. simplex Virus, welcher analog dem $P_{hCMV^{-1}}$ mit der Operatorsequenzen TRE fusioniert wurde, wird das Expressionsniveau des $P_{hCMV^{-1}}$ erreicht, jedoch wiederum mit Erhöhung der unspezifischen Aktivität (Gossen and Bujard, 1992). Deshalb spielen neben den absoluten Werten die jeweiligen Induktionsraten eine besondere Rolle. Diese werden vor allem durch die unspezifische Aktivität begrenzt, auch wenn die induzierte Aktivität hoch ist. Beispielsweise erzielte das Tet-On-System in einer vergleichenden Analyse die höchste absolute induzierte Aktivität, aber nur eine 2,5-fache Induktionsrate (Ecdyson-System: 1000-fach, Tet-Off: 60-fach) (No et al., 1996).

Auch die Ergebnisse meiner Arbeit weisen in diese Richtung. Durch die Kotransfektion der beiden Vektoren in hMSC ließ sich die Expression um das 40-fache steigern, während die beiden anderen Methoden 3,6-fache (transiente Transfektion von pTRE2hyg-Luc in pTet-On stabile hMSC) bzw. 4,8-fache (transiente Transfektion von p2in1) Induktionsraten erzielten. Da das TET-System stark vom Zelltyp abhängig ist (Senner et al., 2001; Meyer-Ficca et al., 2004), sollten die erhaltenen Ergebnisse mit ähnlichen Studien verglichen werden. Dies gestaltet sich jedoch schwierig, da eine induzierbare Genexpression in hMSC mit liposomalem Transfer in der Literatur bisher nicht beschrieben ist.

Nach Transduktion des Tet-On-Systems mithilfe eines Adenovirus in hMSC wurde eine 10-fache Steigerung der Genexpression *in vitro* beobachtet (Gafni et al., 2004). Vergleichend hierzu zeigte die liposomale Transfektion des Tet-Off-Systems *in vitro* in humanen Myoblasten eine Repression um das 24-fache, wobei dieses System aufgrund der geringeren unspezifischen Aktivität oft höhere Repressionsraten erreichte (Wilson et al., 2005). Damit sind die in dieser Arbeit verwendeten Regulationsysteme im Hinblick auf die Induktionsraten durchaus mit konventionellen Strategien vergleichbar. Allerdings gilt zu berücksichtigen, dass es sich bei den o. g. Studien nicht um die Expression von Luziferase handelt, sondern um *bone morphogenetic protein* (BMP) bzw. Insulin.

E2.2.3 Tetracyclin als Induktor der Genexpression

Tetracyclin bzw. sein effektiveres Derivat Doxycyclin aktivieren im Tet-On-System durch ihre Gegenwart die Genexpression. Für eine klinische Anwendung spielt insbesondere die Pharmakokinetik eine wichtige Rolle. Entscheidend ist dabei, dass das Antibiotikum seit Jahrzehnten als Antiinfektivum in der Humanmedizin eingesetzt wird und dadurch gut für die klinische Anwendung charakterisiert ist. Doxycyclin wird vom Körper rasch metabolisiert und ausgeschieden und ermöglicht so eine relativ schnelle Änderung des Induktionsstatus (Goverdhana et al., 2005). Es weist eine gute Bioverfügbarkeit auf und überwindet die Blut-Hirn-Schranke (Lee et al., 2005b). Eine Akkumulation in Knochen und anderen Geweben tritt nur bei prolongierter Anwendung in hohen Dosen auf (Fussenegger, 2001).

In meiner zellexperimentellen Arbeit wurde kein zytotoxischer oder proliferationshemmender Effekt des Doxycyclins beobachtet (s. D1.1). Dies ist u. a. darin begründet, dass Doxycyclin eine hohe Sensitivität für den Transaktivator aufweist. Deshalb liegt die für die Aktivierung erforderliche Konzentration unter der für die antibiotische Therapie verwendeten Dosis.

Speziell für die Anwendung *in vivo* wird das Derivat Minocyclin empfohlen, das – bei gleicher Effektivität – noch nebenwirkungsärmer ist und schneller ausgeschieden wird (Chtarto et al., 2003b).

Der Transaktivator rtTA (Tet-On) benötigt zur maximalen Aktivierung der Transkription laut Literatur 1 µg/ml Doxycyclin, während das Ablösen des tTA (Tet-Off) schon ab einer Konzentration von 20 ng/ml vollständig erfolgt. In eigenen Zellkulturexperimenten in hMSC zur Doxycyclin-Abhängigkeit von Transaktivatoren erreichte rtTA bei 10 µg/ml eine hohe, aber evtl. noch steigerbare Aktivierung (Baron and Bujard, 2000). Die erforderlichen Konzentrationen variieren allerdings mit dem Zelltyp und der Charge des Doxycyclins (www.clontech.com).

Die Anwesenheit von Tetracyclin in unserer Nahrungskette hat in den letzten Jahrzehnten zugenommen, was auf die weit verbreitete prophylaktische Gabe von Tetracyclin als Antiinfektivum im Viehfutter zurückzuführen ist. Die Tetracyclin-Verunreinigung ist so dramatisch, dass das in der Zellkultur verwendete Serum bzgl. dieses Antibiotikums getestet werden muss (Freundlieb et al., 1997). In meiner Arbeit wurde kein Unterschied in der unspezifischen Aktivität zwischen dem verwendeten Serum der Fa. Cambrex und dem zum Vergleich garantiert Tetracyclin-freiem Medium der Fa. BD Biosciences festgestellt (s. D3.2), d. h. das hier routinemäßige eingesetzte Serum enthielt kein interferierende Menge an Doxycyclin und konnte weiterhin genutzt werden.

E2.2.4 Dosisabhängige Luziferase-Expression

Neben dem An- und Abschalten von Genen ist der Wunsch nach der exakten Einstellung des Expressionsniveaus Gegenstand intensiver Bemühungen. Auch in dieser Arbeit konnten durch Variation der Doxycyclin-Konzentration unterschiedliche Expressionsniveaus erreicht werden. Dies gelang am besten mit der Kotransfektion von pTet-On und pTRE2hyg-Luc (s. D3.4.2). Hier konnten wir mit der Wahl einer bestimmten Menge an Doxycyclin aus einem Bereich von sechs Zehnerpotenzen Induktionsraten von 2-fach bis zum 40-fachen erzielen. Ähnliches konnte bei der Doxycyclin-induzierten Expression von POU5F1_iA mittels Kotransfektion gezeigt werden (s. D5.2.2). Im Vergleich wurden die Transgen-Expressionsraten von p2in1 durch Doxycyclin-Konzentrationen von 0,01 bis 1 µg/ml um den Faktor 5 verändert (Tab. 11).

Tab. 11 Induktionsraten bei induzierbarer Genexpression in hMSC in Abhängigkeit von der Doxycyclin-Konzentration (nt: nicht getestet).

	Doxycyclin-Konzentration [µg/ml]						
	0	0,0001	0,001	0,01	0,1	1	10
transiente Kotransfektion mit pTet-On und pTRE2hyg-Luc	1	1	2	8	22	30	40
transiente Transfektion mit p2in1-Luc	1	nt	nt	1,7	3,2	4,8	nt

Während die Variation der Doxycyclin-Konzentration *in vitro* einfach zu erreichen ist, erfordert die *in vivo*-Anwendung alternative Möglichkeiten, da hier eine exakt definierte Konzentration nur schwer eingestellt werden kann. Die bisherigen Strategien zur Steuerung des Expressionsniveaus beinhalteten die Herstellung heterozygoter *knock-outs* (Gao et al., 2004), die Verwendung verschiedener IRES-Elemente (Ren, 2004) sowie die Auswahl von Klonen mit unterschiedlichen Expressionsniveaus, die durch zufällige Integration der Vektoren in verschiedene Bereiche im Genom zustande gekommen sind (Liu et al., 2000).

Aktuelle Studien beschreiben die Kombination verschiedener Regulationssysteme (Kramer et al., 2003), die durch Zugabe diverser Antibiotika eine Einstellung der Expressionshöhe erlauben. Letzteres wird außerdem durch das Zusammenspiel des Transaktivators rtTA des Tet-On-Systems mit einem neu entwickelten Repressor ermöglicht, welche sich aufgrund unterschiedlicher Sensitivitäten auf Tetracyclin-Derivate gezielt steuern lassen (Krueger et al., 2006).

E2.2.5 Effekte des Transaktivators

Bei der Generierung pTet-On stabil transfizierter Zellen wird manchmal eine Zytotoxizität des Transaktivators, sog. *sqelching*, beobachtet. Dieser Prozess beruht auf der sehr effizienten Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren durch die VP16-Domäne des Transaktivators, die zu einer Reduktion freier Transkriptionsfaktoren führt und sich so toxisch auf die Zelle auswirken kann (Gill and Ptashne, 1988). Für die Generierung stabiler Linien würde dies bedeuten, dass nur diejenigen Klone überleben, in denen der Transaktivator aufgrund chromosomaler Einflüsse in geringerem Maße exprimiert wird. Eine zu niedrige Expression wird durch die Selektion mit Geneticin verhindert, da dafür auch eine Mindestanzahl an Aminoglycosid-3'-phosphotransferase (APH)-Molekülen vorhanden sein muss (Freundlieb et al., 1997). Die in HeLa-Zellen tolerierbare kritische Menge von Transaktivatoren wird mit ca. 10.000 Molekülen/Zelle angegeben, wobei für eine vollständige Aktivierung ca. 4000 Moleküle/Zelle ausreichen (Fussenegger, 2001). *Squelching* wurde aber nur in bestimmten Zellen beobachtet (Bohl et al., 1997). In Anbetracht der nicht verstärkten Zytotoxizität bei transienter Transfektion und den unveränderten Charakteristika nach stabiler Transfektion scheinen hMSC nicht nachhaltig betroffen zu sein (s. E1).

Die geringe Anzahl von benötigten Transaktivatormolekülen ist auf die hohe Spezifität des Transaktivators für die Operatorsequenzen zurückzuführen. Dementsprechend konnten wir bei der transienten Kotransfektion von pTet-On und pTRE2hyg-Luc zeigen, dass nur ein Zehntel (0,09 µg/ml) des Transaktivator-Plasmids im Vergleich zum pTRE2hyg-Luc-Plasmid notwendig ist, um eine volle Induktion der Luziferase-Expression zu gewährleisten (s. Abb. 22). Die optimierten absoluten DNA-Konzentrationen von pTet-On und p2in1-Luc lagen bei 0,6 bzw. 1,1 µg/ml. Diese DNA-Konzentrationen sagen allerdings nichts über die Transaktivatormolekül-Zahl in hMSC aus, da diese vor allem von der jeweiligen Transfektionseffizienz abhängt. Weniger Transaktivator-Moleküle bedeuten auch, dass weniger Induktormoleküle, d. h. eine geringere Doxycyclin-Konzentration erforderlich ist, was wiederum die Nebenwirkungen reduzieren kann (Baron and Bujard, 2000).

E2.2.6 Verhältnis des Transaktivators zu TRE

Bei transienter Kotransfektion und transienter Transfektion in pTet-On stabil transfizierten Zellen kommt es durch die große Menge an DNA in einer Zelle zu einer höheren unspezifischen Aktivität, was wiederum zu einer rechnerisch niedrigeren Aktivierungsrate führt. Um die volle Promotoraktivierung von pTRE2hyg-Luc mit hohen Aktivierungsraten zu erreichen, sollte mit einem Überschuss des Transaktivator-Plasmids gearbeitet werden (Verhältnis 10:1 bis 100:1) (Baron et al., 1997). Allerdings zeigt vor allem der reverse Transaktivator des Tet-On-Systems (rtTA) in Abwesenheit von Doxycyclin eine Restaffinität zu TRE. Dieser Umstand bedingt die unspezifische Aktivität des Tet-On-Systems. In diesem Fall kann die Transfektion des Transaktivatorkonstrukts im Überschuss keine Lösung sein. Unter Berücksichtigung der Restaffinität von rtTA sollte eine Verschiebung des Transfektionsverhältnisses zugunsten von pTRE2hyg-Luc zu einer Erhöhung des Aktivierungsfaktors führen.

Tatsächlich konnten wir bei der transienten Kotransfektion von pTet-On und pTRE2hyg-Luc maximale Aktivitäten bei den Verhältnissen von 1:1 und 1:10 zeigen, die mit einer niedrigen unspezifischen Aktivität einhergingen (s. Abb. 22). Die Transfektion des Vektors p2in1 resultierte in einem starren Verhältnis des Transaktivators zu TRE von 1:1, was auch zur seiner erhöhten Aktivität ohne Induktion beitragen könnte.

Auch bei einer zweiten stabilen Transfektion von pTet-On stabil transfizierten Zellen, die in dieser Arbeit nicht zum Erfolg geführt hat, sind die Konzentrations-Verhältnisse der verschiedenen Vektoren Gegenstand kontroverser Diskussionen (Smith-Arica et al., 2000; Lee et al., 2005b).

So gilt es also für jeden Zelltyp oder die spezielle Anwendung, die Bedingungen zu optimieren (Goverdhana et al., 2005).

E2.2.7 Folgerungen

Zusammenfassend ist zu sagen, dass alle verwendeten Strategien (die Kotransfektion von pTet-On und pTRE2hyg, die transiente Transfektion in pTet-On stabil transfizierte hMSC und die transiente Transfektion des Vektors p2in1) hohe, mit konstitutiven Promotoren vergleichbare Maximalaktivitäten erzielten. Da das Nichtauftreten von unspezifischer Aktivität nur mit zwei konsekutiven Transfektionen zu erreichen ist (Smith-Arica et al., 2000; Chenuaud et al., 2004), aber hMSC aufgrund ihrer limitierten Proliferationseigenschaften verbunden mit liposomalen Gentransfer dafür nicht geeignet sind, muss eine gewisse unspezifische Aktivität in dieser Situation akzeptiert werden. Für bestimmte Untersuchungen ist diese sogar wünschenswert, wenn ohne Doxycyclin eine Basalexpression des Zielgens vorliegt, z. B. bei der Insulinsekretion *in vivo*. Diese erreicht nur bei Mahlzeiten Spitzenwerte, während ansonsten eine Basalrate notwendig ist (Devries et al., 2007).

E3 EXPRESSION DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS POU5F1_iA IN hMSC

Bisher wurde bei Untersuchungen zur POU5F1-Expression die Existenz zweier Isoformen nicht beachtet. Im Jahre 2006 konnte gezeigt werden, dass es zwischen den beiden Isoformen sehr wohl Unterschiede gibt (Cauffman et al., 2006). Im Gegensatz zur nukleären Lokalisation von POU5F1_iA wurde POU5F1_iB im Zytoplasma während den ersten Zellteilungsstadien detektiert, was auf andere Funktionen als die direkte Transkriptionsregulation hinweist. Aufgrund der Tatsache, dass POU5F1_iB nicht in ES-Zellen exprimiert wird, wird die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters der Isoform POU5F1_iA zugeschrieben (Cauffman et al., 2006). Vor diesem Hintergrund wurden in meiner Arbeit alle Experimente mit POU5F1_iA durchgeführt.

Das Bestreben, pluripotente Zellen als Ausgangspunkt für den Ersatz von Gewebe bzw. als Modell zur Untersuchung der Entwicklung, Prävention und Heilung von pathologisch veränderten Geweben einzusetzen, motiviert zur Suche nach Alternativen zu humanen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen). Aufgrund der Tatsache, dass diese aus der inneren Zellmasse (*inner cell mass*, ICM) fremder Blastozysten gewonnen werden, ergeben sich zum einen ethische Bedenken und zum anderen immunologische Komplikationen, wie sie z. B. bei Abstoßungsreaktionen nach allogener Transplantation auftreten (Boiani and Scholer, 2005; Surani and McLaren, 2006).

Um den Stammzellcharakter von hMSC zu erhalten, wurde beispielsweise gezeigt, dass durch Transfektion und Expression von Telomerase die Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit über viele Passagen erhalten bleiben (Simonsen et al., 2002).

Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse über POU5F1 als verantwortlicher Faktor für die Pluripotenz von ES-Zellen (Pan et al., 2002) entstand die Idee, durch Transfektion dieses Transkriptionsfaktors die Stammzeleigenschaften von hMSC zu beeinflussen. Ein Hauptziel stellte hierfür eine mögliche Erweiterung des Differenzierungspotentials dar. Dazu haben wir erstmals das POU5F1-Gen in verschiedene Vektoren kloniert, die eine einfache (pcDNA3.1-POU5F1_iA; p-POU5F1_iA-IRES-EGFP; p-POU5F1_iA-IRES-neo2) bzw. eine induzierbare Expression (pTRE2hyg-POU5F1_iA) in hMSC erlaubten (s. D5.1).

Durch die technisch einfache Isolierung und Verfügbarkeit zeichnen sich hMSC prinzipiell gegenüber humanen ES-Zellen aus (s. B1). Außerdem ist bekannt, dass Zellen mit einem weit gefächerten Differenzierungspotential sich besser reprogrammieren lassen als unipotente somatische Stammzellen (Hochedlinger and Jaenisch, 2006). Neben der erweiterten Differenzierungsfähigkeit könnte die Transfektion von POU5F1 außerdem das Problem der Zellalterung beseitigen, da die unbegrenzte Selbsterneuerung eine Eigenschaft embryonaler Stammzellen darstellt. Interessanterweise exprimieren auch MAPC (*multipotent adult progenitor cells*, s. B1.3), die eine Subpopulation der hMSC repräsentieren, POU5F1. Auch diese Zellen zeichnen sich durch unbegrenzte Selbsterneuerung aus (Jiang et al., 2002a).

E3.1 Basale Expression des Transkriptionsfaktors POU5F1 in hMSC

Zunächst wurde untersucht, ob und in welchen Mengen hMSC den Faktor POU5F1 unter Standard-Kulturbedingungen exprimieren. Dabei konnten auf mRNA-Ebene keine POU5F1-Transkripte nachgewiesen werden (s. Abb. 40). Zu diesem Ergebnis kamen auch Song et al. (2006), die das gesamte Transkriptom von un- und differenzierten hMSC verglichen.

Dagegen konnten verschiedene andere Arbeitsgruppen POU5F1 in hMSC auch auf mRNA-Ebene demonstrieren. Allerdings wurde hierbei POU5F1 meist in Subpopulationen exprimiert, welche durch besondere Kultivierungsbedingungen isoliert worden waren. Diese wiesen interessanterweise ein erhöhtes Differenzierungspotential im Vergleich zu den ursprünglichen hMSC auf: So zeigen MAPC ähnliche Eigenschaften wie ES-Zellen (Jiang et al., 2002b), MIAMI-Zellen (*marrow-isolated adult multilineage inducible*) erhöhtes Differenzierungspotential und gesteigerte Proliferationskapazität (D'Ippolito et al., 2004) und SD-Zellen (*serum deprived*) eine verstärkte Expression von embryonalen Genen (Pochampally et al., 2004). Des Weiteren wird eine POU5F1-Expression in hMSC beschrieben (Young et al., 2004; Moriscot et al., 2005), die mit der Differenzierung bzw. einer weniger dichten Aussaat während der Kultivierung abnimmt (Tai et al., 2005; Ren et al., 2006).

Zusammenfassend lässt sich vor diesem Hintergrund folgern, dass die Expression von POU5F1 von den Kultivierungsbedingungen und dem Differenzierungsstatus abhängig ist. Darüber hinaus exprimiert wohl nur eine Untergruppe von hMSC diesen Transkriptionsfaktor.

In den o. g. Publikationen wie auch in meiner Arbeit wurde POU5F1 auf mRNA-Ebene mit RT-PCR bzw. mit Microarray nachgewiesen. Da es Unterschiede zwischen der POU5F1-mRNA- und Proteinexpression geben kann (Cauffman et al., 2005), muss zusätzlich ein Nachweis auf Proteinebene mit Bestimmung der Proteingröße (*Western Blot*) und der Lokalisation in der Zelle (Immunzytologie) gefordert werden (Prusa et al., 2003; Tai et al., 2005). Entscheidend hierbei ist, das richtige POU5F1-Transkript nachzuweisen. So muss durch eine entsprechende Wahl der Primer zum einen zwischen den Isoformen POU5F1_iA und POU5F1_iB differenziert werden (Cauffman et al., 2006). Zum anderen wurden von POU5F1 bisher sechs verschiedene Pseudogene beschrieben. In einigen Tumoren werden positive PCR-Ergebnisse auf Pseudogene zurückgeführt und nicht auf Expression von POU5F1 (Looijenga et al., 2003). So ist also der spezifische Nachweis von POU5F1 generell in Frage zu stellen, wenn die o. g. Punkte nicht berücksichtigt wurden. In unserer Arbeit konnte durch die geeignete Wahl der Primer die Detektion der Transkripte von POU5F1_iB und den verschiedenen Pseudogenen ausgeschlossen werden.

E3.2 Auswirkungen der Transfektion des Transkriptionsfaktors POU5F1 in hMSC

Für den Nachweis von Pluripotenz nach Transfektion von POU5F1 müssen verschiedene Kriterien vorliegen. Unter <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/appendixE.asp> findet sich eine aktualisierte Liste der Stammzellmarker.

Auch die Zellteilung als Voraussetzung der Selbsterneuerung stellt einen wesentlichen Bestandteil des Stammzellcharakters dar. Eine gesteigerte Proliferation von hMSC Subpopulationen konnte dabei mit der gleichzeitigen Expression von POU5F1 und Cyclin A assoziiert (Prusa et al., 2003) oder durch Zell- bzw. Klonzählung (Pochampally et al., 2004; D'Ippolito et al., 2006) gezeigt werden. Dagegen haben wir nach transienter Transfektion von POU5F1 im Vergleich zur Transfektion eines Vektors ohne Insert reduzierte Zellzahlen gemessen. Dies könnte zum einen durch die kurze Expression von POU5F1 nach einer transienten Transfektion begründet sein. Zum anderen werden durch eine transiente Expression initial sehr hohe POU5F1-Expressionsniveaus erreicht, was auch zu einer Differenzierung und damit zu einer Proliferationshemmung führen könnte.

An ES-Zellen der Maus konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass das Expressionsniveau von POU5F1 für das Entwicklungspotential von zentraler Bedeutung ist. Es stellte sich heraus, dass das Differenzierungspotential von ES-Zellen von der Menge an POU5F1-Protein abhängt. Differenzierung findet bei einer POU5F1-Proteinmenge von 50 % über oder unter dem normalen Niveau statt, wobei ein Anstieg zur Bildung von primitivem Entoderm und Mesoderm und eine Reduktion zur Bildung von Trophektoderm führten. Es wird also eine definierte Menge an POU5F1 benötigt, um die Selbsterneuerung der Stammzellen aufrecht zu erhalten (Niwa et al., 2000).

Da in meiner Arbeit die POU5F1-Expression zu einer Hemmung der Proliferation führte, muss man wohl eher von einer Differenzierung der Zellen ausgehen.

E3.3 Die Interaktion von POU5F1 mit anderen Faktoren

Mit der Transfektion von POU5F1 in Kombination mit drei weiteren Faktoren (*SRY-box containing gene 2*, SOX2, c-Myc und Klf4) konnten K. Takahashi und S. Yamanaka Stammzeleigenschaften auch auf Fibroblasten übertragen (2006), welche dem pluripotenten Charakter von ES-Zellen nahe kommen (Wernig et al., 2007; Okita et al., 2007). Dieses Beispiel zeigt, dass neben dem Expressionsniveau auch das Zusammenspiel mit anderen Faktoren wichtig ist. Interessanterweise ist hier die Transfektion des Stammzell-spezifischen Transkriptionsfaktors Nanog nicht nötig. Dieser konnte jedoch in den transfizierten Zellen nachgewiesen werden (Takahashi and Yamanaka, 2006). Die Entdeckung Nanogs, ein Transkriptionsfaktor mit einer Homeobox (s. B4.3), durch zwei unabhängige Arbeitsgruppen (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003) stellte die weit verbreitete Ansicht in Frage, dass POU5F1 als einziger Faktor die Pluripotenz reguliert (Boiani and Scholer, 2005; Pan and Thomson, 2007). Außerdem konnten zwei Gruppen die Bindungsstellen von POU5F1, SOX2 und Nanog im gesamten Genom identifizieren (Boyer et al., 2005; Loh et al., 2006). Die häufig gemeinsam besetzten Gene kodieren meist für Entwicklungs-relevante Transkriptions-faktoren. Die Bedeutung dieser Beeinflussung ist bisher nur ansatzweise untersucht (Babaie et al., 2006; Loh et al., 2006; Ivanova et al., 2006; Masui et al., 2007).

F AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit gelang eine induzierbare Genexpression in hMSC zum einen mit der transienten Kotransfektion der Vektoren pTet-On und pTRE2hyg-Luc des Tet-On-System. Zum anderen wurde das Plasmid p2in1 generiert, welches die zentralen Elemente der beiden o. g. Plasmide auf einem Vektorsystem vereinigt. Durch die Transfektion dieses Plasmids wurde die induzierbare Genexpression in hMSC wesentlich vereinfacht. Die Prüfung des Plasmids p2in1 mittels des Luziferase-Reportergens zeigte, dass in hMSC grundsätzlich eine induzierbare Genexpression möglich ist, die zudem durch die Konzentration des Induktors Doxycyclin dynamisch reguliert werden kann.

Es sind jedoch weitere Experimente erforderlich. So wäre z. B. eine Steigerung der Expression durch höhere Doxycyclin-Konzentrationen vorstellbar (Baron and Bujard, 2000). Daneben sind außerdem Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der Genexpression notwendig. Obwohl das TET-System durch eine sehr schnelle Reaktion auf Doxycyclin charakterisiert ist (Gossen and Bujard, 1992; Baron and Bujard, 2000), sollte der Verlauf der Induktion mit Messungen nach 24, 48 und 72 Stunden dargestellt werden (Wilson et al., 2005), da insbesondere der Vektor p2in1 wahrscheinlich eine gewisse Zeit zur Ausprägung seiner maximalen Expression benötigt. In der in E2.1.3 erwähnten Arbeit von A. Chtarto entfaltet der Vektor nach Transduktion und Induktion erst nach ca. zwei Wochen seine maximale Aktivität. Eine Beendigung der Expression wurde drei Tage nach Entfernung des Doxycyclins gezeigt. Genau diese Reversibilität bzw. ihre Kinetik nach Entfernen des Doxycyclin muss für die hier angewandten Methoden Gegenstand zusätzlicher Untersuchungen sein, besonders auch nach stabiler Transfektion (Chtarto et al., 2003a).

Darüber hinaus wurde in meinem Projekt die Funktion des Pluripotenz-vermittelnden Transkriptionsfaktors POU5F1 in hMSC untersucht. Erste Expressionstests von POU5F1 bestätigen die Wichtigkeit dieses Transkriptionsfaktors hinsichtlich des Proliferationsverhaltens von hMSC.

Gefordert sind Experimente, die klären, ob die POU5F1-Expression in hMSC tatsächlich zu einer Differenzierung der Zellen führt, wobei auch die Auswirkungen unterschiedlicher POU5F1-Niveaus in hMSC geprüft werden sollten. Die Voraussetzungen dafür wurden mit der Klonierung des Vektors pTRE2hyg-POU5F1 (s. D3.3.2) und seiner funktionelle Testung (s. D5.2.2) geschaffen.

Die Bedeutung der für Pluripotenz verantwortlichen Transkriptionsfaktoren ist bisher nur ansatzweise untersucht (Babaie et al., 2006; Loh et al., 2006; Ivanova et al., 2006) und sollte Anlass zu weiteren Experimenten sein (Boyer et al., 2006). Durch die Aufklärung der zugrunde liegenden Signalwege werden sich zudem neue Möglichkeiten der Beeinflussung eröffnen, die einen potentiell erfolgreichen Weg zu Patienten-spezifischen pluripotenten Zellen im Rahmen des Zell- und Gewebeersatzes bei geschädigten Organen versprechen.

G LITERATURVERZEICHNIS

- Abdel-Rahman, B., Fiddler, M., Rappolee, D., and Pergament, E. (1995). Expression of transcription regulating genes in human preimplantation embryos. *Hum. Reprod.* 10, 2787-2792.
- Adachi, K., Kawase, E., Yasuchika, K., Sumi, T., Nakatsuji, N., and Suemori, H. (2006). Establishment of the gene-inducible system in primate embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 24, 2566-2572.
- Agha-Mohammadi, S., O'Malley, M., Etemad, A., Wang, Z., Xiao, X., and Lotze, M.T. (2004). Second-generation tetracycline-regulatable promoter: repositioned tet operator elements optimize transactivator synergy while shorter minimal promoter offers tight basal leakiness. *J Gene Med* 6, 817-28.
- Aluigi, M., Fogli, M., Curti, A., Isidori, A., Gruppioni, E., Chiodoni, C., Colombo, M.P., Versura, P., D'Errico-Grigioni, A., Ferri, E., Baccarani, M., and Lemoli, R.M. (2006). Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 454-461.
- Ambrosetti, D.C., Basilico, C., and Dailey, L. (1997). Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. *Mol. Cell Biol.* 17, 6321-6329.
- Amsterdam, A., Lin, S., Moss, L.G., and Hopkins, N. (1996). Requirements for green fluorescent protein detection in transgenic zebrafish embryos. *Gene* 173, 99-103.
- Andersen, B. and Rosenfeld, M.G. (2001). POU domain factors in the neuroendocrine system: lessons from developmental biology provide insights into human disease. *Endocr. Rev.* 22, 2-35.
- Aubin, J.E. (1979). Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *J. Histochem. Cytochem.* 27, 36-43.
- Auriscchio, L., De Tomassi, A., La Monica, N., Ciliberto, G., Traboni, C., and Palombo, F. (2005). Regulated and liver-specific tamarin alpha interferon gene delivery by a helper-dependent adenoviral vector. *J. Virol.* 79, 6772-6780.
- Babaie, Y., Herwig, R., Greber, B., Brink, T.C., Wruck, W., Groth, D., Lehrach, H., Burdon, T., and Adjaye, J. (2006). Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 25, 500-510.
- Bailey, A.S., Jiang, S., Afentoulis, M., Baumann, C.I., Schroeder, D.A., Olson, S.B., Wong, M.H., and Fleming, W.H. (2004). Transplanted adult hematopoietic stems cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood* 103, 13-19.
- Balsam, L.B., Wagers, A.J., Christensen, J.L., Kofidis, T., Weissman, I.L., and Robbins, R.C. (2004). Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428, 668-673.
- Baron, U. and Bujard, H. (2000). Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Methods Enzymol.* 327, 401-421.
- Baron, U., Freundlieb, S., Gossen, M., and Bujard, H. (1995). Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acids Res* 23, 3605-6.
- Baron, U., Gossen, M., and Bujard, H. (1997). Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res.* 25, 2723-2729.

- Ben Shushan, E., Pikarsky, E., Klar, A., and Bergman, Y. (1993).
Extinction of Oct-3/4 gene expression in embryonal carcinoma x fibroblast somatic cell hybrids is accompanied by changes in the methylation status, chromatin structure, and transcriptional activity of the Oct-3/4 upstream region.
Mol. Cell Biol. 13, 891-901.
- Bertoni, C., Jarrahan, S., Wheeler, T.M., Li, Y., Olivares, E.C., Calos, M.P., and Rando, T.A. (2006).
Enhancement of plasmid-mediated gene therapy for muscular dystrophy by directed plasmid integration.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 103, 419-424.
- Bianco, P. and Robey, P.G. (2001).
Stem cells in tissue engineering.
Nature 414, 118-121.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979).
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523.
- Blau, H.M., Brazelton, T.R., and Weimann, J.M. (2001).
The evolving concept of a stem cell: entity or function?
Cell 105, 829-841.
- Bodner, M., Castrillo, J.L., Theill, L.E., Deerinck, T., Ellisman, M., and Karin, M. (1988).
The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein.
Cell 55, 505-518.
- Bohl, D., Naffakh, N., and Heard, J.M. (1997).
Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice transplanted with engineered primary myoblasts.
Nat. Med. 3, 299-305.
- Boiani, M. and Scholer, H.R. (2005).
Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells.
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6, 872-884.
- Bornkamm, G.W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J.M., Laux, G., Bachl, J., Korndoerfer, M., Schlee, M., Holzel, M., Malamoussi, A., Chapman, R.D., Nimmerjahn, F., Mautner, J., Hillen, W., Bujard, H., and Feuillard, J. (2005).
Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system.
Nucleic Acids Res. 33, e137.
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein, B., and Schaffner, W. (1985).
A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus.
Cell 41, 521-530.
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., Gifford, D.K., Melton, D.A., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2005).
Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells.
Cell 122, 947-956.
- Boyer, L.A., Mathur, D., and Jaenisch, R. (2006).
Molecular control of pluripotency.
Curr. Opin. Genet. Dev. 16, 455-462.
- Brehm, A., Ohbo, K., and Scholer, H. (1997).
The carboxy-terminal transactivation domain of Oct-4 acquires cell specificity through the POU domain.
Mol. Cell Biol. 17, 154-162.
- Brown, J.M. and Wilson, W.R. (2004).
Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment.
Nat. Rev. Cancer 4, 437-447.
- Bryder, D., Rossi, D.J., and Weissman, I.L. (2006).
Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell.
Am. J. Pathol. 169, 338-346.
- Cao, F., Lin, S., Xie, X., Ray, P., Patel, M., Zhang, X., Drukker, M., Dylla, S.J., Connolly, A.J., Chen, X., Weissman, I.L., Gambhir, S.S., and Wu, J.C. (2006).
In vivo visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery.
Circulation 113, 1005-1014.
- Cauffman, G., Liebaers, I., Van Steirteghem, A., and Van, d., V (2006).
POU5F1 isoforms show different expression patterns in human embryonic stem cells and preimplantation embryos.
Stem Cells 24, 2685-2691.
- Cauffman, G., Van, d., V, Liebaers, I., and Van Steirteghem, A. (2005).
Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development.
Mol. Hum. Reprod. 11, 173-181.

- Chamberlain, J.R., Schwarze, U., Wang, P.R., Hirata, R.K., Hankenson, K.D., Pace, J.M., Underwood, R.A., Song, K.M., Sussman, M., Byers, P.H., and Russell, D.W. (2004). Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Science* 303, 1198-1201.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643-655.
- Chan, A.W., Chong, K.Y., Martinovich, C., Simerly, C., and Schatten, G. (2001). Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. *Science* 291, 309-312.
- Chenuaud, P., Larcher, T., Rabinowitz, J.E., Provost, N., Joussemet, B., Bujard, H., Samulski, R.J., Favre, D., and Moullier, P. (2004). Optimal design of a single recombinant adeno-associated virus derived from serotypes 1 and 2 to achieve more tightly regulated transgene expression from nonhuman primate muscle. *Mol. Ther.* 9, 410-418.
- Chien, K.R. (2004). Stem cells: lost in translation. *Nature* 428, 607-608.
- Chtarto, A., Bender, H.U., Hanemann, C.O., Kemp, T., Lehtonen, E., Levivier, M., Brotchi, J., Velu, T., and Tenenbaum, L. (2003a). Tetracycline-inducible transgene expression mediated by a single AAV vector. *Gene Ther.* 10, 84-94.
- Chtarto, A., Tenenbaum, L., Velu, T., Brotchi, J., Levivier, M., and Blum, D. (2003b). Minocycline-induced activation of tetracycline-responsive promoter. *Neurosci. Lett.* 352, 155-158.
- Cheng, L., Fu, J., Tsukamoto, A., and Hawley, R.G. (1996). Use of green fluorescent protein variants to monitor gene transfer and expression in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 14, 606-609.
- Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Marh, J., Lu, S.J., Johnson, J., Meisner, L., and Lanza, R. (2006). Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* 439, 216-219.
- Clerc, R.G., Corcoran, L.M., LeBowitz, J.H., Baltimore, D., and Sharp, P.A. (1988). The B-cell-specific Oct-2 protein contains POU box- and homeo box-type domains. *Genes Dev.* 2, 1570-1581.
- Cohen, S.N., Chang, A.C., and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 69, 2110-2114.
- Colbere-Garapin, F., Horodniceanu, F., Kourilsky, P., and Garapin, A.C. (1981). A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. *J. Mol. Biol.* 150, 1-14.
- Colosimo, A., Goncz, K.K., Holmes, A.R., Kunzelmann, K., Novelli, G., Malone, R.W., Bennett, M.J., and Gruenert, D.C. (2000). Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *Biotechniques* 29, 314-2, 324.
- Colter, D.C., Class, R., DiGirolamo, C.M., and Prockop, D.J. (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 3213-3218.
- Colter, D.C., Sekiya, I., and Prockop, D.J. (2001). Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 7841-7845.
- Contag, P.R. (2002). Whole-animal cellular and molecular imaging to accelerate drug development. *Drug Discov. Today* 7, 555-562.
- D'Ippolito, G., Diabira, S., Howard, G.A., Menei, P., Roos, B.A., and Schiller, P.C. (2004). Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J. Cell Sci.* 117, 2971-2981.
- D'Ippolito, G., Howard, G.A., Roos, B.A., and Schiller, P.C. (2006). Sustained stromal stem cell self-renewal and osteoblastic differentiation during aging. *Rejuvenation. Res.* 9, 10-19.

- Daley, G.Q., Ahrlund, R.L., Auerbach, J.M., Benvenisty, N., Charo, R.A., Chen, G., Deng, H.K., Goldstein, L.S., Hudson, K.L., Hyun, I., Junn, S.C., Love, J., Lee, E.H., McLaren, A., Mummery, C.L., Nakatsuji, N., Racowsky, C., Rooke, H., Rossant, J., Scholer, H.R., Solbakk, J.H., Taylor, P., Trounson, A.O., Weissman, I.L., Wilmut, I., Yu, J., and Zoloth, L. (2007). Ethics. The ISSCR guidelines for human embryonic stem cell research. *Science* 315, 603-604.
- de Boer, J., van Blitterswijk, C., and Lowik, C. (2006). Bioluminescent imaging: emerging technology for non-invasive imaging of bone tissue engineering. *Biomaterials* 27, 1851-1858.
- Devine, S.M., Cobbs, C., Jennings, M., Bartholomew, A., and Hoffman, R. (2003). Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* 101, 2999-3001.
- Devries, J.H., Natrass, M., and Pieber, T.R. (2007). Refining basal insulin therapy: what have we learned in the age of analogues? *Diabetes Metab Res. Rev.*
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., and Siebert, P.D. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 6025-6030.
- Diatchenko, L., Lukyanov, S., Lau, Y.F., and Siebert, P.D. (1999). Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol.* 303, 349-380.
- Edinger, M., Cao, Y.A., Hornig, Y.S., Jenkins, D.E., Verneris, M.R., Bachmann, M.H., Negrin, R.S., and Contag, C.H. (2002). Advancing animal models of neoplasia through in vivo bioluminescence imaging. *Eur. J. Cancer* 38, 2128-2136.
- Edinger, M., Cao, Y.A., Verneris, M.R., Bachmann, M.H., Contag, C.H., and Negrin, R.S. (2003). Revealing lymphoma growth and the efficacy of immune cell therapies using in vivo bioluminescence imaging. *Blood* 101, 640-648.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Weber, K., and Tuschl, T. (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26, 199-213.
- Evans, M.J. and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Falk, A., Holmstrom, N., Carlen, M., Cassidy, R., Lundberg, C., and Frisen, J. (2002). Gene delivery to adult neural stem cells. *Exp. Cell Res.* 279, 34-39.
- Fehrer, C. and Lepperdinger, G. (2005). Mesenchymal stem cell aging. *Exp. Gerontol.* 40, 926-930.
- Feldman, B., Poueymirou, W., Papaioannou, V.E., DeChiara, T.M., and Goldfarb, M. (1995). Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science* 267, 246-249.
- Feliciano, J., Liu, Y., and Daunert, S. (2006). Novel reporter gene in a fluorescent-based whole cell sensing system. *Biotechnol. Bioeng.* 93, 989-997.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., and Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 7413-7417.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., and Mavilio, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 1528-1530.
- Finney, M. and Ruvkun, G. (1990). The unc-86 gene product couples cell lineage and cell identity in *C. elegans*. *Cell* 63, 895-905.
- Freschney, R.I. (1990). Culture of animal cells: a manual of basic techniques. Alan Liss, New York.
- Freundlieb, S., Baron, U., Bonin, A.L., Gossen, M., and Bujard, H. (1997). Use of tetracycline-controlled gene expression systems to study mammalian cell cycle. *Methods Enzymol.* 283, 159-173.

- Freundlieb, S., Schirra-Muller, C., and Bujard, H. (1999).
A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells.
Journal of Gene Medicine 1, 4-12.
- Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., and Gerasimov, U.V. (1987).
Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers.
Cell Tissue Kinet. 20, 263-272.
- Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., and Kulagina, N.N. (1976).
Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs.
Exp. Hematol. 4, 267-274.
- Fussenegger, M. (2001).
The impact of mammalian gene regulation concepts on functional genomic research, metabolic engineering, and advanced gene therapies.
Biotechnol. Prog. 17, 1-51.
- Fussenegger, M., Morris, R.P., Fux, C., Rimann, M., von Stockar, B., Thompson, C.J., and Bailey, J.E. (2000).
Streptogramin-based gene regulation systems for mammalian cells.
Nat. Biotechnol. 18, 1203-1208.
- Fux, C., Langer, D., and Fussenegger, M. (2004).
Dual-regulated myoD- and msx1-based interventions in C2C12-derived cells enable precise myogenic/osteogenic/adipogenic lineage control.
J. Gene Med. 6, 1159-1169.
- Gafni, Y., Pelled, G., Zilberman, Y., Turgeman, G., Apparailly, F., Yotvat, H., Galun, E., Gazit, Z., Jorgensen, C., and Gazit, D. (2004).
Gene therapy platform for bone regeneration using an exogenously regulated, AAV-2-based gene expression system.
Molecular Therapy 9, 587-595.
- Gao, H., Ouyang, X., Banach-Petrosky, W., Borowsky, A.D., Lin, Y., Kim, M., Lee, H., Shih, W.J., Cardiff, R.D., Shen, M.M., and Abate-Shen, C. (2004).
A critical role for p27kip1 gene dosage in a mouse model of prostate carcinogenesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 101, 17204-17209.
- Gawlik, A. and Quaggin, S.E. (2005).
Conditional gene targeting in the kidney.
Curr. Mol. Med. 5, 527-536.
- Gerdes, H.H. and Kaether, C. (1996).
Green fluorescent protein: applications in cell biology.
FEBS Lett. 389, 44-47.
- Gidekel, S. and Bergman, Y. (2002).
A unique developmental pattern of Oct-3/4 DNA methylation is controlled by a cis-demodification element.
J. Biol. Chem. 277, 34521-34530.
- Gill, G. and Ptashne, M. (1988).
Negative effect of the transcriptional activator GAL4.
Nature 334, 721-724.
- Glover, D.J., Lipps, H.J., and Jans, D.A. (2005).
Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans.
Nat. Rev. Genet. 6, 299-310.
- Gossen, M. and Bujard, H. (1992).
Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 89, 5547-5551.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., and Bujard, H. (1995).
Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells.
Science 268, 1766-1769.
- Gould, D.J. and Chernajovsky, Y. (2004).
Endogenous GATA factors bind the core sequence of the tetO and influence gene regulation with the tetracycline system.
Mol. Ther. 10, 127-138.
- Goverdhana, S., Puntel, M., Xiong, W., Zirger, J.M., Barcia, C., Curtin, J.F., Soffer, E.B., Mondkar, S., King, G.D., Hu, J., Sciascia, S.A., Candolfi, M., Greengold, D.S., Lowenstein, P.R., and Castro, M.G. (2005).
Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges.
Mol. Ther. 12, 189-211.
- Grafi, G. and Avivi, Y. (2004).
Stem cells: a lesson from dedifferentiation.
Trends Biotechnol. 22, 388-389.
- Gruen, L. and Gabel, L. (2006).
Concise review: scientific and ethical roadblocks to human embryonic stem cell therapy.
Stem Cells 24, 2162-2169.

- Gu, P., Le Menuet, D., Chung, A.C., and Cooney, A.J. (2006). Differential recruitment of methylated CpG binding domains by the orphan receptor GCNF initiates the repression and silencing of Oct4 expression. *Mol. Cell Biol.* 26, 9471-9483.
- Gubin, A.N., Reddy, B., Njoroge, J.M., and Miller, J.L. (1997). Long-term, stable expression of green fluorescent protein in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 347-350.
- Guillaudeau, T., Mattei, M.G., Depetris, D., Le Bouteiller, P., and Pontarotti, P. (1993). In situ hybridization localizes the human OTF3 to chromosome 6p21.3-->p22 and OTF3L to 12p13. *Cytogenet. Cell Genet.* 63, 212-214.
- Gurtu, V., Yan, G., and Zhang, G. (1996). IRES bicistronic expression vectors for efficient creation of stable mammalian cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229, 295-298.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J.L., Fraser, C.C., Cavazzana-Calvo, M., and Fischer, A. (2003a). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 348, 255-256.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser P., Cohen J.I., de Saint, B.G., Alexander, I., Wintergerst U., Frebourg T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva L.E., Wissler M., Prinz, C., Rabbitts, T.H., le Deist, F., Fischer, A., and Cavazzana-Calvo, M. (2003b). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-419.
- Hadjantonakis, A.K., Gertsenstein, M., Ikawa, M., Okabe, M., and Nagy, A. (1998). Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mech. Dev.* 76, 79-90.
- Hamra, F.K., Chapman, K.M., Nguyen, D.M., Williams-Stephens, A.A., Hammer, R.E., and Garbers, D.L. (2005). Self renewal, expansion, and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 17430-17435.
- Hansis, C., Grifo, J.A., and Krey, L.C. (2000). Oct-4 expression in inner cell mass and trophectoderm of human blastocysts. *Mol. Hum. Reprod.* 6, 999-1004.
- Hansis, C., Tang, Y.X., Grifo, J.A., and Krey, L.C. (2001). Analysis of Oct-4 expression and ploidy in individual human blastomeres. *Mol. Hum. Reprod.* 7, 155-161.
- Hasan, M.T., Schonig, K., Berger, S., Graewe, W., and Bujard, H. (2001). Long-term, noninvasive imaging of regulated gene expression in living mice. *Genesis*. 29, 116-122.
- Hattori, N., Nishino, K., Ko, Y.G., Hattori, N., Ohgane, J., Tanaka, S., and Shiota, K. (2004). Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J. Biol. Chem.* 279, 17063-17069.
- Hayflick, L. and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585-621.
- Herr, W. and Cleary, M.A. (1995). The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain. *Genes Dev.* 9, 1679-1693.
- Herr, W., Sturm, R.A., Clerc, R.G., Corcoran, L.M., Baltimore, D., Sharp, P.A., Ingraham, H.A., Rosenfeld, M.G., Finney, M., and Ruvkun, G. (1988). The POU domain: a large conserved region in the mammalian pit-1, oct-1, oct-2, and *Caenorhabditis elegans* unc-86 gene products. *Genes Dev.* 2, 1513-1516.
- Herschman, H.R. (2003). Molecular imaging: looking at problems, seeing solutions. *Science* 302, 605-608.
- Herzog, E.L., Chai, L., and Krause, D.S. (2003). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 102, 3483-3493.
- Hillen, W. and Berens, C. (1994). Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 345-369.
- Hochedlinger, K. and Jaenisch, R. (2006). Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature* 441, 1061-1067.

- Hoelters, J., Ciccarella, M., Drechsel, M., Geissler, C., Gulkan, H., Bocker, W., Schieker, M., Jochum, M., and Neth, P. (2005).
Nonviral genetic modification mediates effective transgene expression and functional RNA interference in human mesenchymal stem cells. *J. Gene Med.* 7, 718-728.
- Huang, W.Y., Aramburu, J., Douglas, P.S., and Izumo, S. (2000).
Transgenic expression of green fluorescence protein can cause dilated cardiomyopathy. *Nat. Med.* 6, 482-483.
- Huntriss, J., Hinkins, M., Oliver, B., Harris, S.E., Beazley, J.C., Rutherford, A.J., Gosden, R.G., Lanzendorf, S.E., and Picton, H.M. (2004).
Expression of mRNAs for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins in the human female germ line, preimplantation embryos, and embryonic stem cells. *Mol. Reprod. Dev.* 67, 323-336.
- Hwang, W.S., Roh, S.I., Lee, B.C., Kang, S.K., Kwon, D.K., Kim, S., Kim, S.J., Park, S.W., Kwon, H.S., Lee, C.K., Lee, J.B., Kim, J.M., Ahn, C., Paek, S.H., Chang, S.S., Koo, J.J., Yoon, H.S., Hwang, J.H., Hwang, Y.Y., Park, Y.S., Oh, S.K., Kim, H.S., Park, J.H., Moon, S.Y., and Schatten, G. (2005).
Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts. *Science* 308, 1777-1783.
- Hwang, W.S., Ryu, Y.J., Park, J.H., Park, E.S., Lee, E.G., Koo, J.M., Jeon, H.Y., Lee, B.C., Kang, S.K., Kim, S.J., Ahn, C., Hwang, J.H., Park, K.Y., Cibelli, J.B., and Moon, S.Y. (2004).
Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 303, 1669-1674.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2004).
Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931-945.
- in 't Anker, P.S., Noort, W.A., Scherjon, S.A., Kleijburg-van der Keur, C., Kruisselbrink, A.B., van Bezooijen, R.L., Beekhuizen, W., Willemze, R., Kanhai, H.H., and Fibbe, W.E. (2003).
Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* 88, 845-852.
- Ivanova, N., Dobrin, R., Lu, R., Kotenko, I., Levorso, J., DeCoste, C., Schafer, X., Lun, Y., and Lemischka, I.R. (2006).
Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 442, 533-538.
- Jacob, F. and Monod, J. (1961).
Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3, 318-356.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A., and Verfaillie, C.M. (2002a).
Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.
- Jiang, Y., Vaessen, B., Lenvik, T., Blackstad, M., Reyes, M., and Verfaillie, C.M. (2002b).
Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp. Hematol.* 30, 896-904.
- Jordan, C.T., Guzman, M.L., and Noble, M. (2006).
Cancer stem cells. *N. Engl. J. Med.* 355, 1253-1261.
- Kehler, J., Tolkunova, E., Koschorz, B., Pesce, M., Gentile, L., Boiani, M., Lomeli, H., Nagy, A., McLaughlin, K.J., Scholer, H.R., and Tomilin, A. (2004).
Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep.* 5, 1078-1083.
- Kennedy, D. (2004).
Stem cells, redux. *Science* 303, 1581.
- Kennedy, D. (2006).
Editorial retraction. *Science* 311, 335.
- Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jurecic, J., Ullmer, C., Lubbert, H., and Bujard, H. (1996).
Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10933-8.
- Klemm, J.D., Rould, M.A., Aurora, R., Herr, W., and Pabo, C.O. (1994).
Crystal structure of the Oct-1 POU domain bound to an octamer site: DNA recognition with tethered DNA-binding modules. *Cell* 77, 21-32.

- Ko, K. and Scholer, H.R. (2006).
Embryonic stem cells as a potential source of gametes.
Semin. Reprod. Med. 24, 322-329.
- Korbling, M. and Estrov, Z. (2003).
Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept?
N. Engl. J. Med. 349, 570-582.
- Kozak, M. (2005).
A second look at cellular mRNA sequences said to function as internal ribosome entry sites.
Nucleic Acids Res. 33, 6593-6602.
- Kramer, B.P., Fischer, C., and Fussenegger, M. (2004a).
BioLogic gates enable logical transcription control in mammalian cells.
Biotechnol. Bioeng. 87, 478-484.
- Kramer, B.P. and Fussenegger, M. (2005).
Hysteresis in a synthetic mammalian gene network.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 102, 9517-9522.
- Kramer, B.P., Viretta, A.U., Daoud-El-Baba, M., Aubel, D., Weber, W., and Fussenegger, M. (2004b).
An engineered epigenetic transgene switch in mammalian cells.
Nat. Biotechnol. 22, 867-870.
- Kramer, B.P., Weber, W., and Fussenegger, M. (2003).
Artificial regulatory networks and cascades for discrete multilevel transgene control in mammalian cells.
Biotechnol. Bioeng. 83, 810-820.
- Krebsbach, P.H., Zhang, K., Malik, A.K., and Kurachi, K. (2003).
Bone marrow stromal cells as a genetic platform for systemic delivery of therapeutic proteins in vivo: human factor IX model.
J. Gene Med. 5, 11-17.
- Krueger, C., Danke, C., Pfeleiderer, K., Schuh, W., Jack, H.M., Lochner, S., Gmeiner, P., Hillen, W., and Berens, C. (2006).
A gene regulation system with four distinct expression levels.
J. Gene Med. 8, 1037-1047.
- LaBarge, M.A. and Blau, H.M. (2002).
Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury.
Cell 111, 589-601.
- Labas, Y.A., Gurskaya, N.G., Yanushevich, Y.G., Fradkov, A.F., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S.A., and Matz, M.V. (2002).
Diversity and evolution of the green fluorescent protein family.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 99, 4256-4261.
- Lakshminpathy, U. and Verfaillie, C. (2005).
Stem cell plasticity.
Blood Rev. 19, 29-38.
- Lamartina, S., Silvi, L., Roscilli, G., Casimiro, D., Simon, A.J., Davies, M.-E., Shiver, J.W., Rinaudo, C.D., Zampaglione, I., and Fattori, E. (2003).
Construction of an rtTA2s-m2/ttskid-Based transcription regulatory switch that displays no basal activity, good inducibility, and high responsiveness to doxycycline in mice and Non-Human primates.
Molecular Therapy 7, 271-280.
- Lee, J., Rhee, B.K., Bae, G.Y., Han, Y.M., and Kim, J. (2005a).
Stimulation of Oct-4 activity by Ewing's sarcoma protein.
Stem Cells 23, 738-751.
- Lee, K., Majumdar, M.K., Buyaner, D., Hendricks, J.K., Pittenger, M.F., and Mosca, J.D. (2001).
Human mesenchymal stem cells maintain transgene expression during expansion and differentiation.
Mol. Ther. 3, 857-866.
- Lee, Y.B., Glover, C.P., Cosgrave, A.S., Bienemann, A., and Uney, J.B. (2005b).
Optimizing regulatable gene expression using adenoviral vectors.
Exp. Physiol 90, 33-37.
- Li, S. and Huang, L. (2000).
Nonviral gene therapy: promises and challenges.
Gene Ther. 7, 31-34.
- Li, S., Kimura, E., Ng, R., Fall, B.M., Meuse, L., Reyes, M., Faulkner, J.A., and Chamberlain, J.S. (2006).
A highly functional mini-dystrophin/GFP fusion gene for cell and gene therapy studies of Duchenne muscular dystrophy.
Hum. Mol. Genet. 15, 1610-1622.
- Liang, X., Hartikka, J., Sukhu, L., Manthorpe, M., and Hobart, P. (1996).
Novel, high expressing and antibiotic-controlled plasmid vectors designed for use in gene therapy.
Gene Ther. 3, 350-356.

- Lindemann, C., Schilz, A.J., Emons, B., Baum, C., Low, R., Fauser, A.A., Kuehlcke, K., and Eckert, H.G. (2002).
Down-regulation of retroviral transgene expression during differentiation of progenitor-derived dendritic cells.
Exp. Hematol. 30, 150-157.
- Liu, X., Constantinescu, S.N., Sun, Y., Bogan, J.S., Hirsch, D., Weinberg, R.A., and Lodish, H.F. (2000).
Generation of mammalian cells stably expressing multiple genes at predetermined levels.
Anal. Biochem. 280, 20-28.
- Loh, Y.H., Wu, Q., Chew, J.L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., Wong, K.Y., Sung, K.W., Lee, C.W., Zhao, X.D., Chiu, K.P., Lipovich, L., Kuznetsov, V.A., Robson, P., Stanton, L.W., Wei, C.L., Ruan, Y., Lim, B., and Ng, H.H. (2006).
The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells.
Nat. Genet. 38, 431-440.
- Looijenga, L.H., Stoop, H., de Leeuw, H.P., Gouveia Brazao, C.A., Gillis, A.J., van Roozendaal, K.E., van Zoelen, E.J., Weber, R.F., Wolffenbuttel, K.P., van Dekken, H., Honecker, F., Bokemeyer, C., Perlman, E.J., Schneider, D.T., Kononen, J., Sauter, G., and Oosterhuis, J.W. (2003).
POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors.
Cancer Res. 63, 2244-2250.
- Maggi, A., Ottobriani, L., Biserni, A., Lucignani, G., and Ciana, P. (2004).
Techniques: reporter mice - a new way to look at drug action.
Trends Pharmacol. Sci. 25, 337-342.
- Martin-Rendon, E. and Watt, S.M. (2003).
Stem cell plasticity.
Br. J. Haematol. 122, 877-891.
- Martinez-Serrano, A., Villa, A., Navarro, B., Rubio, F.J., and Bueno, C. (2000).
Human neural progenitor cells: better blue than green?
Nat. Med. 6, 483-484.
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A.A., Ko, M.S., and Niwa, H. (2007).
Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells.
Nat. Cell Biol. 9, 625-635.
- McMahon, J.M., Conroy, S., Lyons, M., Greiser, U., O'Shea, C., Strappe, P., Howard, L., Murphy, M., Barry, F., and O'Brien, T. (2006).
Gene transfer into rat mesenchymal stem cells: a comparative study of viral and nonviral vectors.
Stem Cells Dev. 15, 87-96.
- Meissner, A. and Jaenisch, R. (2006).
Mammalian nuclear transfer.
Dev. Dyn. 235, 2460-2469.
- Meissner, M., Krejany, E., Gilson, P.R., Koning-Ward, T.F., Soldati, D., and Crabb, B.S. (2005).
Tetracycline analogue-regulated transgene expression in *Plasmodium falciparum* blood stages using *Toxoplasma gondii* transactivators.
PNAS 102, 2980-2985.
- Mets, T. and Verdonk, G. (1981).
In vitro aging of human bone marrow derived stromal cells.
Mech. Ageing Dev. 16, 81-89.
- Meyer-Ficca, M.L., Meyer, R.G., Kaiser, H., Brack, A.R., Kandolf, R., and Kupper, J.H. (2004).
Comparative analysis of inducible expression systems in transient transfection studies.
Anal. Biochem. 334, 9-19.
- Mimeault, M. and Batra, S.K. (2006).
Concise review: Recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies.
Stem Cells 24, 2319-2345.
- Minucci, S., Botquin, V., Yeom, Y.I., Dey, A., Sylvester, I., Zand, D.J., Ohbo, K., Ozato, K., and Scholer, H.R. (1996).
Retinoic acid-mediated down-regulation of Oct3/4 coincides with the loss of promoter occupancy in vivo.
EMBO J. 15, 888-899.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003).
The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells.
Cell 113, 631-642.
- Moriscot, C., de Fraipont, F., Richard, M.J., Marchand, M., Savatier, P., Bosco, D., Favrot, M., and Benhamou, P.Y. (2005).
Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro.
Stem Cells 23, 594-603.

- Moser, S., Rimann, M., Fux, C., Schlatter, S., Bailey, J.E., and Fussenegger, M. (2001). Dual-regulated expression technology: a new era in the adjustment of heterologous gene expression in mammalian cells. *J. Gene Med.* 3, 529-549.
- Murry, C.E., Soonpaa, M.H., Reinecke, H., Nakajima, H., Nakajima, H.O., Rubart, M., Pasumarthi, K.B., Virag, J.I., Bartelmez, S.H., Poppa, V., Bradford, G., Dowell, J.D., Williams, D.A., and Field, L.J. (2004). Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428, 664-668.
- Neth, P., Ciccarella, M., Egea, V., Hoelters, J., Jochum, M., and Ries, C. (2006). Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 1892-1903.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379-391.
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 24, 372-376.
- No, D., Yao, T.P., and Evans, R.M. (1996). Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 3346-3351.
- Nordhoff, V., Hubner, K., Bauer, A., Orlova, I., Malapetsa, A., and Scholer, H.R. (2001). Comparative analysis of human, bovine, and murine Oct-4 upstream promoter sequences. *Mamm. Genome* 12, 309-317.
- Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T., and Nishimune, Y. (1997). 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 407, 313-319.
- Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M., and Hamada, H. (1990). A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* 60, 461-472.
- Okazawa, H., Okamoto, K., Ishino, F., Ishino-Kaneko, T., Takeda, S., Toyoda, Y., Muramatsu, M., and Hamada, H. (1991). The oct3 gene, a gene for an embryonic transcription factor, is controlled by a retinoic acid repressible enhancer. *EMBO J.* 10, 2997-3005.
- Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313-317.
- Okumura-Nakanishi, S., Saito, M., Niwa, H., and Ishikawa, F. (2005). Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 280, 5307-5317.
- Ovitt, C.E. and Scholer, H.R. (1998). The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 1021-1031.
- Ozawa, T., Hu, J.L., Hu, L.J., Kong, E.L., Bollen, A.W., Lamborn, K.R., and Deen, D.F. (2005). Functionality of hypoxia-induced BAX expression in a human glioblastoma xenograft model. *Cancer Gene Ther.* 12, 449-455.
- Palmieri, S.L., Peter, W., Hess, H., and Scholer, H.R. (1994). Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev. Biol.* 166, 259-267.
- Pan, G. and Thomson, J.A. (2007). Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.* 17, 42-49.
- Pan, G.J., Chang, Z.Y., Scholer, H.R., and Pei, D. (2002). Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res.* 12, 321-329.
- Pankiewicz, R., Karlen, Y., Imhof, M.O., and Mermod, N. (2005). Reversal of the silencing of tetracycline-controlled genes requires the coordinate action of distinctly acting transcription factors. *J. Gene Med.* 7, 117-132.

- Papapetrou, E.P., Zoumbos, N.C., and Athanassiadou, A. (2005). Genetic modification of hematopoietic stem cells with nonviral systems: past progress and future prospects. *Gene Ther.* 12 Suppl 1, S118-S130.
- Payen, E., Bettan, M., Henri, A., Tomkiewicz, E., Houque, A., Kuzniak, I., Zuber, J., Scherman, D., and Beuzard, Y. (2001). Oxygen tension and a pharmacological switch in the regulation of transgene expression for gene therapy. *J. Gene Med.* 3, 498-504.
- Peister, A., Mellad, J.A., Wang, M., Tucker, H.A., and Prockop, D.J. (2004). Stable transfection of MSCs by electroporation. *Gene Ther.* 11, 224-228.
- Pesce, M. and Scholer, H.R. (2000). Oct-4: control of totipotency and germline determination. *Mol. Reprod. Dev.* 55, 452-457.
- Pesce, M. and Scholer, H.R. (2001). Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* 19, 271-278.
- Phimister, E.G. and Drazen, J.M. (2004). Two fillips for human embryonic stem cells. *N. Engl. J. Med.* 350, 1351-1352.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
- Plautz, J.D., Day, R.N., Dailey, G.M., Welsh, S.B., Hall, J.C., Halpain, S., and Kay, S.A. (1996). Green fluorescent protein and its derivatives as versatile markers for gene expression in living *Drosophila melanogaster*, plant and mammalian cells. *Gene* 173, 83-87.
- Pluta, K., Luce, M.J., Bao, L., Agha-Mohammadi, S., and Reiser, J. (2005). Tight control of transgene expression by lentivirus vectors containing second-generation tetracycline-responsive promoters. *The Journal of Gene Medicine* 7, 803-817.
- Pochampally, R.R., Smith, J.R., Ylostalo, J., and Prockop, D.J. (2004). Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood* 103, 1647-1652.
- Polak, J.M. and Bishop, A.E. (2006). Stem cells and tissue engineering: past, present, and future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1068, 352-366.
- Ponomarev, V., Doubrovin, M., Serganova, I., Vider, J., Shavrin, A., Beresten, T., Ivanova, A., Ageyeva, L., Tourkova, V., Balatoni, J., Bornmann, W., Blasberg, R., and Gelovani, T.J. (2004). A novel triple-modality reporter gene for whole-body fluorescent, bioluminescent, and nuclear noninvasive imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 31, 740-751.
- Prusa, A.R., Marton, E., Rosner, M., Bernaschek, G., and Hengstschlager, M. (2003). Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum. Reprod.* 18, 1489-1493.
- Remenyi, A., Lins, K., Nissen, L.J., Reinbold, R., Scholer, H.R., and Wilmanns, M. (2003). Crystal structure of a POU/HMG/DNA ternary complex suggests differential assembly of Oct4 and Sox2 on two enhancers. *Genes Dev.* 17, 2048-2059.
- Ren, H., Cao, Y., Zhao, Q., Li, J., Zhou, C., Liao, L., Jia, M., Zhao, Q., Cai, H., Han, Z.C., Yang, R., Chen, G., and Zhao, R.C. (2006). Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347, 12-21.
- Ren, R. (2004). Modeling the dosage effect of oncogenes in leukemogenesis. *Curr. Opin. Hematol.* 11, 25-34.
- Reya, T. and Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843-850.
- Rideout, W.M., Hochedlinger, K., Kyba, M., Daley, G.Q., and Jaenisch, R. (2002). Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell* 109, 17-27.

- Rivera, V.M., Clackson, T., Natesan, S., Pollock, R., Amara, J.F., Keenan, T., Magari, S.R., Phillips, T., Courage, N.L., Cerasoli, F., Jr., Holt, D.A., and Gilman, M. (1996).
A humanized system for pharmacologic control of gene expression.
Nat. Med. 2, 1028-1032.
- Rosenqvist, N., Hard Af, S.C., Samuelsson, C., Johansen, J., and Lundberg, C. (2002).
Activation of silenced transgene expression in neural precursor cell lines by inhibitors of histone deacetylation.
J. Gene Med. 4, 248-257.
- Rosner, M.H., Vigano, M.A., Ozato, K., Timmons, P.M., Poirier, F., Rigby, P.W., and Staudt, L.M. (1990).
A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo.
Nature 345, 686-692.
- Ryan, A.K. and Rosenfeld, M.G. (1997).
POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes.
Genes Dev. 11, 1207-1225.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988).
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science 239, 487-491.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001).
Molecular Cloning, a laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory Press,
Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sanchez-Bustamante, C.D., Kelm, J.M., Mitta, B., and Fussenegger, M. (2006).
Heterologous protein production capacity of mammalian cells cultivated as monolayers and microtissues.
Biotechnol. Bioeng. 93, 169-180.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977).
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 74, 5463-5467.
- Sautter, K. and Enenkel, B. (2005).
Selection of high-producing CHO cells using NPT selection marker with reduced enzyme activity.
Biotechnol. Bioeng. 89, 530-538.
- Schelp. *Herzessache.*
Zeit Campus , 71-72. 2007.
- Schlatter, S., Senn, C., and Fussenegger, M. (2003).
Modulation of translation-initiation in CHO-K1 cells by rapamycin-induced heterodimerization of engineered eIF4G fusion proteins.
Biotechnol. Bioeng. 83, 210-225.
- Scholer, H.R., Ciesiolka, T., and Gruss, P. (1991).
A nexus between Oct-4 and E1A: implications for gene regulation in embryonic stem cells.
Cell 66, 291-304.
- Scholer, H.R., Dressler, G.R., Balling, R., Rohdewold, H., and Gruss, P. (1990a).
Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex.
EMBO J. 9, 2185-2195.
- Scholer, H.R., Hatzopoulos, A.K., Balling, R., Suzuki, N., and Gruss, P. (1989).
A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor.
EMBO J. 8, 2543-2550.
- Scholer, H.R., Ruppert, S., Suzuki, N., Chowdhury, K., and Gruss, P. (1990b).
New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4.
Nature 344, 435-439.
- Schoorlemmer, J., van Puijenbroek, A., van Den, E.M., Jonk, L., Pals, C., and Kruijer, W. (1994).
Characterization of a negative retinoic acid response element in the murine Oct4 promoter.
Mol. Cell Biol. 14, 1122-1136.
- Sekiya, I., Larson, B.L., Smith, J.R., Pochampally, R., Cui, J.G., and Prockop, D.J. (2002).
Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality.
Stem Cells 20, 530-541.
- Senner, V., Sotoodeh, A., and Paulus, W. (2001).
Regulated gene expression in glioma cells: a comparison of three inducible systems.
Neurochem. Res. 26, 521-524.
- Siminovitch, L., McCulloch, E.A., and Till, J.E. (1963).
The distribution of colony-forming cells among spleen colonies.
J. Cell Physiol 62:327-36., 327-336.

- Simonsen, J.L., Rosada, C., Serakinci, N., Justesen, J., Stenderup, K., Rattan, S.I., Jensen, T.G., and Kassem, M. (2002).
Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells.
Nat. Biotechnol. 20, 592-596.
- Simonsson, S. and Gurdon, J. (2004).
DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei.
Nat. Cell Biol. 6, 984-990.
- Simpson, W.J. and Hammond, J.R. (1991).
The effect of detergents on firefly luciferase reactions.
J. Biolumin. Chemilumin. 6, 97-106.
- Smith, A. (2006).
A glossary for stem-cell biology.
Nature 441, 1060.
- Smith-Arica, J.R., Morelli, A.E., Larregina, A.T., Smith, J., Lowenstein, P.R., and Castro, M.G. (2000).
Cell-type-specific and regulatable transgenesis in the adult brain: adenovirus-encoded combined transcriptional targeting and inducible transgene expression.
Mol Ther 2, 579-87.
- Soling, A., Theiss, C., Jungmichel, S., and Rainov, N.G. (2004).
A dual function fusion protein of Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and firefly luciferase for noninvasive in vivo imaging of gene therapy in malignant glioma.
Genet. Vaccines. Ther. 2, 7.
- Song, L. and Tuan, R.S. (2004).
Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow.
FASEB J. 18, 980-982.
- Song, L., Webb, N.E., Song, Y., and Tuan, R.S. (2006).
Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency.
Stem Cells 24, 1707-1718.
- Stamm, C., Westphal, B., Kleine, H.D., Petzsch, M., Kittner, C., Klinge, H., Schumichen, C., Nienaber, C.A., Freund, M., and Steinhoff, G. (2003).
Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration.
Lancet 361, 45-46.
- Stilwell, J.L. and Samulski, R.J. (2004).
Role of viral vectors and virion shells in cellular gene expression.
Mol. Ther. 9, 337-346.
- Strathdee, C.A., McLeod, M.R., and Hall, J.R. (1999).
Efficient control of tetracycline-responsive gene expression from an autoregulated bi-directional expression vector.
Gene 229, 21-29.
- Strauer, B.E., Brehm, M., Zeus, T., Kostering, M., Hernandez, A., Sorg, R.V., Kogler, G., and Wernet, P. (2002).
Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans.
Circulation 106, 1913-1918.
- Sturm, R.A., Das, G., and Herr, W. (1988).
The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain.
Genes Dev. 2, 1582-1599.
- Surani, M.A. (2004).
Stem cells: how to make eggs and sperm.
Nature 427, 106-107.
- Surani, M.A. and McLaren, A. (2006).
Stem cells: a new route to rejuvenation.
Nature 443, 284-285.
- Sylvester, I. and Scholer, H.R. (1994).
Regulation of the Oct-4 gene by nuclear receptors.
Nucleic Acids Res. 22, 901-911.
- Tai, M.H., Chang, C.C., Kiupel, M., Webster, J.D., Olson, L.K., and Trosko, J.E. (2005).
Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis.
Carcinogenesis 26, 495-502.
- Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006).
Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.
Cell 126, 663-676.
- Takeda, J., Seino, S., and Bell, G.I. (1992).
Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues.
Nucleic Acids Res. 20, 4613-4620.

- Taranger, C.K., Noer, A., Sorensen, A.L., Hakelien, A.M., Boquest, A.C., and Collas, P. (2005). Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol. Biol. Cell* 16, 5719–5735.
- Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D.M., Nakano, Y., Meyer, E.M., Morel, L., Petersen, B.E., and Scott, E.W. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416, 542–545.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.
- Torbett, B.E. (2002). Reporter genes: too much of a good thing? *J. Gene Med.* 4, 478–479.
- Tosh, D., Shen, C.N., and Slack, J.M. (2002). Conversion of pancreatic cells to hepatocytes. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 51–55.
- Tseng, W.C., Haselton, F.R., and Giorgio, T.D. (1997). Transfection by cationic liposomes using simultaneous single cell measurements of plasmid delivery and transgene expression. *J. Biol. Chem.* 272, 25641–25647.
- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M.T., Bujard, H., and Hillen, W. (2000a). Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: Novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7963–7968.
- Urlinger, S., Helbl, V., Guthmann, J., Pook, E., Grimm, S., and Hillen, W. (2000b). The p65 domain from NF- κ B is an efficient human activator in the tetracycline-regulatable gene expression system. *Gene* 247, 103–110.
- Vaananen, H.K. (2005). Mesenchymal stem cells. *Ann. Med.* 37, 469–479.
- Vagner, S., Galy, B., and Pyronnet, S. (2001). Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep.* 2, 893–898.
- Verma, M. (2003). Viral genes and methylation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 983, 170–180.
- Verrijzer, C.P., Alkema, M.J., van Weperen, W.W., Van Leeuwen, H.C., Strating, M.J., and van der Vliet, P.C. (1992). The DNA binding specificity of the bipartite POU domain and its subdomains. *EMBO J.* 11, 4993–5003.
- Verrijzer, C.P., Kal, A.J., and van der Vliet, P.C. (1990). The oct-1 homeo domain contacts only part of the octamer sequence and full oct-1 DNA-binding activity requires the POU-specific domain. *Genes Dev.* 4, 1964–1974.
- Verrijzer, C.P. and van der Vliet, P.C. (1993). POU domain transcription factors. *Biochem. Biophys. Acta* 1173, 1–21.
- Villard, J. (2004). Transcription regulation and human diseases. *Swiss. Med. Wkly.* 134, 571–579.
- Vogel, R., Amar, L., Thi, A.D., Saillour, P., and Mallet, J. (2004). A single lentivirus vector mediates doxycycline-regulated expression of transgenes in the brain. *Hum. Gene Ther.* 15, 157–165.
- Wang, J., Rao, S., Chu, J., Shen, X., Levasseur, D.N., Theunissen, T.W., and Orkin, S.H. (2006). A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 444, 364–368.
- Wang, X., Willenbring, H., Akkari, Y., Torimaru, Y., Foster, M., Al Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., Olson, S., and Grompe, M. (2003). Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422, 897–901.
- Wang, Y.V., Tang, H., and Gilmour, D.S. (2005). Identification in vivo of different rate-limiting steps associated with transcriptional activators in the presence and absence of a GAGA element. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3543–3552.
- Weber, W. and Fussenegger, M. (2006). Pharmacologic transgene control systems for gene therapy. *J. Gene Med.* 8, 535–556.

- Weber, W., Fux, C., Daoud-El Baba, M., Keller, B., Weber, C.C., Kramer, B.P., Heinzen, C., Aubel, D., Bailey, J.E., and Fussenegger, M. (2002a). Macrolide-based transgene control in mammalian cells and mice. *Nat. Biotechnol.* 20, 901-907.
- Weber, W., Kramer, B.P., Fux, C., Keller, B., and Fussenegger, M. (2002b). Novel promoter/transactivator configurations for macrolide- and streptogramin-responsive transgene expression in mammalian cells. *J. Gene Med.* 4, 676-686.
- Wegner, M. (2005). Secrets to a healthy Sox life: lessons for melanocytes. *Pigment Cell Res.* 18, 74-85.
- Wegner, M., Drolet, D.W., and Rosenfeld, M.G. (1993). POU-domain proteins: structure and function of developmental regulators. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 488-498.
- Weingartner, M., Pelayo, H.R., Binarova, P., Zwerger, K., Melikant, B., de la Torre, C., Heberle-Bors, E., and Bogre, L. (2003). A plant cyclin B2 is degraded early in mitosis and its ectopic expression shortens G2-phase and alleviates the DNA-damage checkpoint. *J. Cell Sci.* 116, 487-498.
- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., and Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318-324.
- Wiedenmann, J. and Nienhaus, G.U. (2006). Live-cell imaging with EosFP and other photoactivatable marker proteins of the GFP family. *Expert. Rev. Proteomics.* 3, 361-374.
- Wilson, M.O., Scougall, K.T., Ratanamart, J., McIntyre, E.A., and Shaw, J.A. (2005). Tetracycline-regulated secretion of human (pro)insulin following plasmid-mediated transfection of human muscle. *J. Mol. Endocrinol.* 34, 391-403.
- Wissmuller, S., Kosian, T., Wolf, M., Finzsch, M., and Wegner, M. (2006). The high-mobility-group domain of Sox proteins interacts with DNA-binding domains of many transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 34, 1735-1744.
- Wolbank, S., Peterbauer, A., Wassermann, E., Hennerbichler, S., Voglauer, R., van Griensven, M., Duba, H.C., Gabriel, C., and Redl, H. (2007). Labelling of human adipose-derived stem cells for non-invasive in vivo cell tracking. *Cell Tissue Bank.* 8, 163-177.
- Wu, A.M., Till, J.E., Siminovitch, L., and McCulloch, E.A. (1968). Cytological evidence for a relationship between normal hemotopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system. *J. Exp. Med.* 127, 455-464.
- Wu, X., Li, Y., Crise, B., and Burgess, S.M. (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 300, 1749-1751.
- Yamazaki, Y., Fujita, T.C., Low, E.W., Alarcon, V.B., Yanagimachi, R., and Marikawa, Y. (2006). Gradual DNA demethylation of the Oct4 promoter in cloned mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 180-188.
- Yang, H.M., Do, H.J., Oh, J.H., Kim, J.H., Choi, S.Y., Cha, K.Y., Chung, H.M., and Kim, J.H. (2005). Characterization of putative cis-regulatory elements that control the transcriptional activity of the human Oct4 promoter. *J. Cell Biochem.* 96, 821-830.
- Yao, T.P., Forman, B.M., Jiang, Z., Cherbas, L., Chen, J.D., McKeown, M., Cherbas, P., and Evans, R.M. (1993). Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature* 366, 476-479.
- Yen, L., Svendsen, J., Lee, J.S., Gray, J.T., Magnier, M., Baba, T., D'Amato, R.J., and Mulligan, R.C. (2004). Exogenous control of mammalian gene expression through modulation of RNA self-cleavage. *Nature* 431, 471-476.
- Yeom, Y.I., Fuhrmann, G., Ovitt, C.E., Brehm, A., Ohbo, K., Gross, M., Hubner, K., and Scholer, H.R. (1996). Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* 122, 881-894.
- Ying, Q.L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115, 281-292.

- Young, H.E., Duplala, C., Yost, M.J., Henson, N.L., Floyd, J.A., Detmer, K., Thompson, A.J., Powell, S.W., Gamblin, T.C., Kizziah, K., Holland, B.J., Boev, A., Van De Water, J.M., Godbee, D.C., Jackson, S., Rimando, M., Edwards, C.R., Wu, E., Cawley, C., Edwards, P.D., Macgregor, A., Bozof, R., Thompson, T.M., Petro, G.J., Jr., Shelton, H.M., McCampbell, B.L., Mills, J.C., Flynt, F.L., Steele, T.A., Kearney, M., Kirincich-Greathead, A., Hardy, W., Young, P.R., Amin, A.V., Williams, R.S., Horton, M.M., McGuinn, S., Hawkins, K.C., Ericson, K., Terracio, L., Moreau, C., Hixson, D., Tobin, B.W., Hudson, J., Bowyer, F.P., III, and Black, A.C., Jr. (2004). Clonogenic analysis reveals reserve stem cells in postnatal mammals. II. Pluripotent epiblastic-like stem cells. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* 277, 178-203.
- Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C., and Dailey, L. (1995). Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev.* 9, 2635-2645.
- Zhang, G., Gurtu, V., and Kain, S.R. (1996). An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227, 707-711.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., Harris, S., Wiedemann, L.M., Mishina, Y., and Li, L. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425, 836-841.
- Zhu, Z., Ma, B., Homer, R.J., Zheng, T., and Elias, J.A. (2001). Use of the Tetracycline-controlled Transcriptional Silencer (tTS) to Eliminate Transgene Leak in Inducible Overexpression Transgenic Mice. *J. Biol. Chem.* 276, 25222-25229.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.L., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., and Hedrick, M.H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 4279-4295.

DANKSAGUNG

an ...

... Dr. rer. nat. Peter Neth für seine vielseitige Unterstützung, die einprägsamen Lebensweisheiten, für die Anhebung der Toleranzschwelle, für die Deutung der Bandenrätsel und die detaillierten Besprechungen, für die gründlichen Korrekturen, für die wissenschaftliche Förderung, für seine Bodenhaftung und seine menschliche Wertschätzung.

... Prof. Dr. M. Jochum für die problemlose, freundliche Übernahme der offiziellen Betreuung und Zweitkorrektur der Promotionsschrift.

... Prof. Dr. Dr. J. Heesemann (Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie), dass er dieser Arbeit durch den Promotionsstudiengang »Molekulare Medizin« den optimalen Rahmen gab.

... Prof. Dr. med J. Eberle (Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie) für die Verwendung des Luminometers.

... Claudia Geißler und Dr. Hülya Gülkan für die Weitergabe ihrer Laborerfahrung und dass sie mich in die Geheimnisse der Klonierung einweihten.

... alle Mitarbeiter der Abteilung für Klinische Chemie und Biochemie für ihre Stryer-Ideologie und Restriktionsenzyme.

... Jürgen Hölters, Marisa Karow und alle Freunde der »MolMeds«.

... meine Familie.

... Stefan Arnold.

LEBENS LAUF

Name Marei Drechsel

Geboren 1979 in München

Ausbildung

2000-2005 Studium der Humanmedizin,
Ludwig-Maximilians-Universität München
2005-2006 Praktisches Jahr,
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Doktorarbeit »Induzierbare Genexpression in humanen mesenchymalen Stammzellen«
betreut durch Dr. rer. nat. P. Neth
(Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie)
im Rahmen des Promotionsstudiengangs »Molekulare Medizin«
(Leitung: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann, Max von Pettenkofer-Institut für
Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, LMU München)

Publikation »Nonviral Genetic Modification Mediates Effective Transgene
Expression And Functional RNA Interference In Human Mesenchymal
Stem Cells.«
Hoelters, J., Cicarella, M., Drechsel, M., Geissler, C., Gulkan, H.,
Bocker, W., Schieker, M., Jochum, M., and Neth, P. (2005).
J. Gene Med. 7, 718-728.

Auszüge der Arbeit wurden bei folgenden **Kongressen** vorgestellt:

- Joint Meeting of the »Tissue Engineering International« and the
»European Tissue Engineering Society«, Lausanne, Suisse 2004.
- Cooperation Forum »Technologies for Stem Cells«, München 2004.
- Keystone Symposia »Stem Cells«, Keystone, Colorado, USA 2004.
- Second International Meeting Stem Cell Network North Rhine
Westphalia, Bonn 2004.
- Keystone Symposia »Stem Cells«, Keystone, Colorado, USA 2004.
- 1st World Congress of Regenerative Medicine, Leipzig 2003.
- 2nd Meeting of the European Tissue Engineering Society, Genua,
Italy 2003.